

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
ZAKŁAD WSTĘPNYCH BADAŃ FARMAKOLOGICZNYCH KATEDRY
FARMAKODYNAMIKI

mgr Katarzyna Nowińska

*Badanie nowych związków o właściwościach
 α_1 -adrenolitycznych w eksperymentalnych modelach
nadciśnienia tętniczego.*

ROZPRAWA DOKTORSKA



Promotor: dr hab. Jacek Sapa, prof. UJ
Promotor pomocniczy: dr Marek Bednarski

Kraków 2017

Serdecznie dziękuję Panu Promotorowi

Dr hab. Jackowi Sapie, prof. UJ

za opiekę naukową

niezastąpione uwagi i wskazówki merytoryczne,

życzliwość, poświęcony czas

oraz za to, że o farmakologii potrafi mówić jak

o najpiękniejszym dziele literackim

Serdecznie dziękuję Panu Promotorowi Pomocniczemu

Dr Markowi Bednarskiemu

za cenne uwagi, wskazówki merytoryczne,

życzliwość, poświęcony czas

oraz uśmiech nawet w kryzysowych momentach pracy

doktorskiej

Serdecznie dziękuję

Prof. dr hab. Henrykowi Maronie

oraz Śp. dr hab. Katarzynie Kulig, prof. UJ

za syntezę badanych związków

i owocną współpracę naukową

Serdecznie dziękuję

Całemu Zespołowi

Zakładu Wstępnych Badań Farmakologicznych UJ CM

za owocną współpracę

i wsparcie w każdym z aspektów pracy naukowej

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	11
I. WSTĘP	14
1.1. Wprowadzenie	14
1.2. Nadciśnienie tętnicze	14
1.2.1. Terapia hipotensyjna	18
1.2.2. Powikłania narządowe	20
1.2.2.1. Śródbłonek.....	21
1.2.2.1.1. Profilaktyka i leczenie farmakologiczne dysfunkcji śródbłonka.....	25
1.3. Leki blokujące receptory α_1 -adrenergiczne	29
1.3.1. Rola α_1 – adrenolityków w sercu	31
1.3.2. Rola α_1 – adrenolityków w układzie naczyniowym	32
1.3.3. Rola α_1 – adrenolityków w układzie moczowo-płciowym	33
1.3.4. Wskazania kliniczne dla α_1 – adrenolityków	34
1.4. Zwierzęce modele nadciśnienia tętniczego	35
1.4.1. Modele nie-genetyczne.....	36
1.4.1.1. Nadciśnienie indukowane chirurgicznie	36
1.4.1.2. Nadciśnienie uwarunkowane endokrynologicznie, metabolicznie, indukowane dietą.....	37
1.4.2. Modele genetyczne.....	39
1.4.2.1. Fenotypowe Modele Genetyczne	39
1.4.2.2. Genotypowe Modele Genetyczne	40
1.4.3. Leki hipotensyjne w poszczególnych modelach nadciśnienia	42
1.5. Podsumowanie.....	44
II. CEL PRACY.....	45
III. WZORY, NAZWY CHEMICZNE I SYMBOLE BADANYCH ZWIĄZKÓW	46
IV. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI	48
4.1. Badane związki.....	48

4.2.	Związki odniesienia	48
4.3.	Stosowane leki i odczynniki	48
4.4.	Zwierzęta	51
4.5.	Materiał biologiczny	51
4.6.	Aparatura	51
4.7.	Obliczenia statystyczne	52
V.	METODYKA	53
5.1.	Walidacja modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego	53
5.1.1.	Indukcja nadciśnienia tętniczego w zwierzęcych modelach doświadczalnych.....	53
5.1.1.1.	Model DEX	54
5.1.1.2.	Model DOCA	54
5.1.1.3.	Model FRU	54
5.1.1.4.	Model L-NAME.....	56
5.1.2.	Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na śródbłonek wyizolowanej aorty	56
5.1.3.	Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na profil lipidowy	57
5.1.3.1.	Cholesterol całkowity.....	57
5.1.3.2.	Frakcja HDL cholesterolu	58
5.1.3.3.	Frakcji LDL cholesterolu	59
5.1.3.4.	Trójglicerydy	60
5.1.4.	Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na profil węglowodanowy 61	
5.2.	Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków o właściwościach α_1-adrenolitycznych oraz związku referencyjnego (prazosyny) w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego (model L-NAME)	62
5.2.1.	Oznaczenie aktywności hipotensyjnej badanych związków.....	63
5.2.2.	Oznaczenie wpływu badanych związków na funkcje rozkurczowe aorty	64
5.2.3.	Oznaczenie wpływu badanych związków na profil lipidowy	64
5.2.4.	Oznaczenie wpływu badanych związków na profil węglowodanowy	65
5.2.5.	Oznaczenie parametrów stresu oksydacyjnego	65

5.2.5.1.	Białko całkowite	65
5.2.5.2.	MDA w osoczu	66
5.2.5.3.	MDA w mózgu.....	66
5.2.5.4.	Aktywność katalazy.....	67
5.2.5.5.	Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej	67
5.2.5.6.	Aktywność peroksydazy glutationowej.....	68
5.2.6.	Oznaczenie stężenia azotanów(III) oraz azotanów(V).....	68
5.2.7.	Oznaczenie wybranych parametrów biochemicznych	69
5.2.7.1.	ADMA.....	69
5.2.7.2.	VEGF.....	69
5.2.8.	Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem podtypów receptora α_1-adrenergicznego	70
5.2.8.1.	Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1A} -adrenergicznych metodą GeneBLAzer	70
5.2.8.2.	Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1B} -adrenergicznych metodą AequoScreen.....	71
5.2.8.3.	Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1D} -adrenergicznych metodą AequoScreen.....	72
VI.	WYNIKI	73
6.1.	Walidacja modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego	73
6.1.1.	Indukcja nadciśnienia tętniczego w zwierzęcych modelach doświadczalnych.....	73
6.1.1.1.	Model DEX	73
6.1.1.2.	Model DOCA	75
6.1.1.3.	Model FRU	77
6.1.1.4.	Model L-NAME.....	80
6.1.2.	Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na śródbłonek aorty	81
6.1.3.	Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na profil lipidowy	83
6.1.4.	Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na profil węglowodanowy	86
6.2.	Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków o właściwościach α_1-adrenolitycznych oraz związku referencyjnego (prazosyny) w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego (model L-NAME)	87
6.2.1.	Ocena aktywności hipotensyjnej.....	87
6.2.2.	Ocena funkcji rozkurczowych aorty.....	98
6.2.3.	Ocena parametrów profilu lipidowego.....	100

6.2.4.	Ocena parametrów profilu węglowodanowego	104
6.2.5.	Ocena parametrów stresu oksydacyjnego.....	105
6.2.6.	Ocena stężenia azotanów(III) oraz azotanów(V).....	111
6.2.7.	Ocena wybranych parametrów biochemicznych	114
6.2.7.1.	ADMA.....	114
6.2.7.2.	VEGF.....	116
6.2.8.	Ocena aktywności wewnętrznej względem podtypów receptorów α_{1A}- adrenergicznych.....	118
VII.	PODSUMOWANIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	121
VIII.	WNIOSKI.....	137
IX.	STRESZCZENIE.....	139
	Summary	140
X.	BIBLIOGRAFIA	141

WYKAZ SKRÓTÓW

11 β -HSD2	Dehydrogenaza 11beta-hydroksysteroidowa
A II	Angiotensyna II
ACEI	Inhibitory konwertazy angiotensyny
ACh	Acetylocholina
ADMA	Asymetryczna dimetyloarginina
ALLHAT	Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial
ATRB	Blokery receptora angiotensynowego
AT ₁	Receptory angiotensynowe typu 1
BMI	Wskaźnik masy ciała
BP	Ciśnienie tętnicze
BPH	Łagodny rozrost gruczołu krokowego
BSA	Powierzchnia ciała
CABG	Pomostowanie tętnic wieńcowych
CAT	Katalaza
ChC	Cholesterol całkowity
CPT	Transferaza palmityno-karnitynowa
CVD	Choroba układu sercowo-naczyniowego
CVS	Układ sercowo-naczyniowy
DAG	Diacyloglicerol
DEX	Deksametazon
DOCA	Octan deoksykortykosteronu
EDHF	Śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
EF	Fracja wyrzutowa
eGFR	Szacowana filtracja kłębuszkowa
EPC	Endotelialne komórki progenitorowe

ET ₁	Endotelina 1
GLU	Glukoza
GPx	Peroksydaza glutationowa
H ₂ O ₂	Nadtlenek wodoru
HALT	Hypertension and Lipid Trial
HDL	Lipoproteiny wysokiej gęstości
IMT	Grubość błony wewnętrznej i środkowej
IP3	Trisfosforan inozytolu
ISH	Izolowane nadciśnienie skurczowe
LDL	Lipoproteiny o małej gęstości
L-NAME	Ester metylowy N ω -Nitro-L-argininy
LT	Leukotrieny
LVH	Przerost lewej komory
LVM	Masa lewej komory
MDA	Dialdehyd malonowy
NO	Tlenek azotu
NOS	Syntaza tlenku azotu
PAF	Czynniki aktywujący płytki
PChN \geq 4	Przewlekła choroba nerek od 4 stadium (eGFR < 30 ml/min/1,73 m ²)
PChN 3	Przewlekła choroba nerek w 3 stadium
PCI	Przezskórna interwencja wieńcowa
PGI ₂	Prostacyklina
PKC	Kinaza białkowa C
PRA	Aktywność reninowa osocza
PTNT	Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego
PWV	Prędkość fali tętna
RAAS	Układ renina-angiotensyna-aldosteron

ROS	Reaktywne formy tlenu
SBP	Skurczowe ciśnienie tętnicze
SCORE	Skala oceny ryzyka sercowo-naczyniowego
SHR	Szczurzy model samoistnego nadciśnienia tętniczego
SHRSP	Szczurzy model samoistnego nadciśnienia tętniczego ze skłonnością do udaru
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa
TAC	Całkowita pojemność antyoksydacyjna
TG	Trójglicerydy
TIA	Incydent przemijającego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego
TOMHS	Treatment of Mild Hypertension Study
TPA	Tkankowy aktywator plazminogenu
TXA ₂	Tromboksan
VEGF	Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
VHeFT-I	Vasodilator-Heart Failure Trial I
VLDL	Lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości
vWF	Czynnik von Willebranda

I. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Leczenie nadciśnienia tętniczego, a właściwie wciąż niedoskonałe metody leczenia tego schorzenia, skłaniają eksperymentatorów do ciągłego poszukiwania nowych możliwych ścieżek terapeutycznych. Pożądane jest by leki nie tylko obniżały podwyższone ciśnienie krwi, ale posiadały również dodatkowe właściwości, m.in. minimalizowały ryzyko wystąpienia epizodów sercowo-naczyniowych, działały nefroprotektoryjne, śródłonkowo i korygowały współistniejące zaburzenia metaboliczne.

W pierwszym etapie badań nad tego typu potencjalnymi lekami wykorzystywane są eksperymentalne modele zwierzęce nadciśnienia tętniczego. Sukcesywne wyznaczenie modeli nadciśnienia pozwala na testowanie skuteczności leków hipotensyjnych oraz ocenę stanu narządów narażonych na przewlekłe działanie nadciśnienia tętniczego.

1.2. Nadciśnienie tętnicze

Nadciśnienie tętnicze to przewlekła choroba cywilizacyjna. Jest jednym z najistotniejszych czynników ryzyka choroby wieńcowej, niewydolności serca, niewydolności nerek i udaru mózgu. U osób chorych na nadciśnienie tętnicze ryzyko zgonu jest 3-5 razy wyższe niż u osób z prawidłowym ciśnieniem krwi [1,2].

Nadciśnienie tętnicze to podwyższenie skurczowego i/lub rozkurczowego ciśnienia krwi o charakterze pierwotnym (nadciśnienie samoistne) lub wtórnym. Obserwuje się liniową zależność pomiędzy wysokością ciśnienia tętniczego krwi, a śmiertelnością i zapadalnością na choroby układu krążenia. Podstawowa klasyfikacja chorych oparta jest o średnią wartość skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego. Progowe wartości uznawane są za zwiastujące chorobę oraz sugerują zwiększone ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych. W Polsce ciśnienie tętnicze kwalifikuje się według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) [1]. W 2015 roku PTNT utrzymało

trzystopniową klasyfikację nadciśnienia tętniczego z wyróżnieniem podtypu izolowanego nadciśnienia skurczowego - ISH (*ang. isolated systolic hypertension*) [2]. Za górną wartość ciśnienia skurczowego przyjęto 139 mmHg, a ciśnienia rozkurczowego 89 mmHg. Wyróżniono następujące kategorie ciśnienia tętniczego: optymalne, prawidłowe, wysokie prawidłowe, nadciśnienie tętnicze 1-go, 2-go, 3-go stopnia i izolowane nadciśnienie skurczowe (tab. 1) [5,6,7,8].

Tabela 1. Klasyfikacja ciśnienia tętniczego krwi

Kategoria	Skurczowe BP [mmHg]		Rozkurczowe BP [mmHg]
Optymalne BP	<120	i	<80
Prawidłowe BP	120-129	i/lub	80-84
Wysokie prawidłowe BP	130-139	i/lub	85-89
Nadciśnienie tętnicze 1-go stopnia	140-159	i/lub	90-99
Nadciśnienie tętnicze 2-go stopnia	160-179	i/lub	100-109
Nadciśnienie tętnicze 3-go stopnia	≥180	i/lub	≥110
Izolowane nadciśnienie skurczowe	≥140	i	<90

* BP – ciśnienie tętnicze (*ang. blood pressure*)

Nadciśnienie tętnicze zostaje rozpoznane jeżeli średnia arytmetyczna wyników kilku pomiarów ciśnienia przeprowadzonych podczas co najmniej dwóch odrębnych wizyt (pomiarów gabinetowe) wynosi 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego i/lub 90 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego, bądź przekracza te wartości [9,10]. Za wyniki wskazujące na nadciśnienie tętnicze, odnotowywane przez pacjenta podczas pomiarów domowych, przyjmuje się wartości 135 mmHg dla ciśnienia skurczowego i/lub 85 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego, bądź wyższe.

U pacjentów z rozpoznaniem nadciśnieniem tętniczym często występują dodatkowe czynniki, zwiększające ogólne ryzyko sercowo-naczyniowe. Stąd istotne jest by u pacjentów oszacować ogólne ryzyko sercowo-naczyniowe, które wpływa na dobór odpowiedniego leczenia. W tabeli numer 2 przedstawiono podział globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym na: niskie, umiarkowane, wysokie i bardzo wysokie (tab. 2). Poszczególne czynniki uwzględnione w ocenie globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego zamieszczono w tabeli numer 3 (tab. 3).

Tabela 2. Ocena globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym (wg wytycznych PTNT z 2015)

Wartość BP [mmHg] \ Czynniki ryzyka	Brak czynników ryzyka	1-2 czynniki ryzyka	≥ 3 czynniki ryzyka	Powikłania narządowe, cukrzyca, PChN 3 ³	Jawna choroba w obrębie CVS, PChN ≥ 4 ⁴
Wysokie prawidłowe	Standardowe ²	Niskie	Umiarkowane	Wysokie	B wysokie
Nadciśnienie tętnicze 1-go stopnia	Niskie	Umiarkowane	Umiarkowane	Wysokie	B wysokie
Nadciśnienie tętnicze 2-go stopnia	Umiarkowane	Umiarkowane	Wysokie	Wysokie	B wysokie
Nadciśnienie tętnicze 3-go stopnia	Wysokie	Wysokie	Wysokie	B wysokie	B wysokie

¹CVS (ang. Cardiovascular System) – układ sercowo-naczyniowy

² ryzyko sercowo-naczyniowe w populacji zdrowej

³ PChN 3 — przewlekła choroba nerek w 3 stadium (eGFR 30–59 ml/min/1,73 m²)

⁴ PChN ≥ 4 — przewlekła choroba nerek od 4 stadium (eGFR < 30 ml/min/1,73 m²)

Tabela 3. Czynniki ryzyka, uszkodzenia narządowe i choroby metaboliczne, choroby układu sercowo-naczyniowego i nerek wykorzystywane do stratyfikacji globalnego ryzyka sercowo-naczyniowego (w odniesieniu do tabeli nr 2)

wg wytycznych PTNT z 2015

Czynniki ryzyka
Płeć męska
Wiek (mężczyźni: ≥ 55 lat, kobiety: ≥ 65 lat)
Palenie tytoniu
Zaburzenia lipidowe <ul style="list-style-type: none"> cholesterol całkowity > 4,9 mmol/l (190 mg/dl) i/lub cholesterol frakcji LDL > 3,0 mmol/l (115 mg/dl) i/lub cholesterol frakcji HDL < 1,0 mmol/l (40 mg/dl) u mężczyzn, < 1,2 mmol/l (46 mg/dl) u kobiet i/lub triglicerydy > 1,7 mmol/l (150 mg/dl)
Glukoza w osoczu na czczo 5,6–6,9 mmol/l (102–125 mg/dl) Nieprawidłowy wynik próby tolerancji glukozy
Otyłość (BMI ≥ 30 kg/m ²) Otyłość brzuszna (obwód talii: mężczyźni ≥ 102 cm, kobiety ≥ 88 cm — u osób rasy białej)
Przedwczesna CVD w wywiadzie rodzinnym (u mężczyzn w wieku < 55 lat, u kobiet w wieku < 65 lat)

cd. Tabela 3.

Subkliniczne uszkodzenia narządowe
Ciśnienie tętna (u osób w podeszłym wieku) ≥ 60 mm Hg
Elektrokardiograficzne cechy ¹⁰ LVH <ul style="list-style-type: none"> • wskaźnik Sokolov-Lyon $> 3,5$ mV • amplituda załamka R w aVL $> 1,1$ mV • iloczyn Cornell > 244 mV*MS lub echokardiograficzne cechy LVH <ul style="list-style-type: none"> • wskaźnik ¹¹LVM > 115 g/m² BSA² u mężczyzn, > 95 g/m² BSA u kobiet
Pogrubienie ściany tętnicy szyjnej (⁸ IMT $> 0,9$ mm) lub obecność blaszki miażdżycowej
¹³ PWV między tętnicą szyjną a tętnicą udową > 10 m/s
Wskaźnik kostka–ramię $< 0,9$
Przewlekła choroba nerek z ⁶ eGFR 30–60 ml/min/1,73 m ²
Albuminuria (30–300 mg/24 h) lub stosunek stężenia albumin w moczu do stężenia kreatyniny w moczu (30–300 mg/g; 3,4–34 mg/mmol) – najlepiej oceniany w porannej próbce moczu
Choroby metaboliczne - Cukrzyca
Glukoza w osoczu na czczo $\geq 7,0$ mmol/l (126 mg/dl) w dwóch oznaczeniach
Glikemia przygodna $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl)
Występowanie objawów hiperglikemii: wzmożone pragnienie, wielomocz, osłabienie
Glukoza w osoczu po obciążeniu $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl)
Jawne choroby układu sercowo-naczyniowego lub nerek
Choroba naczyniowo-mózgowa: udar niedokrwienny, krwawienie śródmózgowe, TIA ¹⁴
Choroba sercowo-naczyniowa: zawał serca, dławica piersiowa, rewaskularyzacja mięśnia sercowego za pomocą ¹² PCI lub CABG ³
Niewydolność serca, w tym niewydolność serca z zachowaną ⁵ EF
Objawowa choroba tętnic obwodowych w obrębie kończyn dolnych
Przewlekła choroba nerek z eGFR < 30 ml/min/1,73 m ² (BSA), białkomocz > 300 mg/24 h
Zaawansowana retinopatia: krwawienia lub ogniska wysięku, obrzęk tarczy nerwu wzrokowego

¹BMI (*ang. body mass index*) — wskaźnik masy ciała;

²BSA (*ang. body surface area*) — powierzchnia ciała;

³CABG (*ang. coronary artery bypass grafting*) — pomostowanie tętnic wieńcowych;

⁴CVD (*ang. cardiovascular disease*) — choroba układu sercowo-naczyniowego;

⁵EF (*ang. ejection fraction*) — frakcja wyrzutowa;

⁶eGFR (*ang. estimated glomerular filtration rate*) — szacowana filtracja kłębuszkowa;

⁷HDL (*ang. high-density lipoproteins*) — lipoproteiny wysokiej gęstości;

⁸IMT (*ang. intima media thickness*) — grubość błony wewnętrznej i środkowej;

⁹LDL (*ang. low-density lipoproteins*) — lipoproteiny o małej gęstości;

¹⁰LVH (*ang. left ventricular hypertrophy*) — przerost lewej komory;

¹¹LVM (*ang. left ventricular mass*) — masa lewej komory;

¹²PCI (*ang. percutaneous coronary interventions*) — przezskórna interwencja wieńcowa;

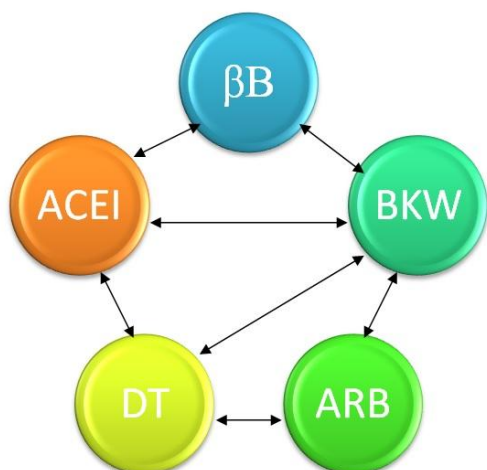
¹³PWV (*ang. pulse wave velocity*) — prędkość fali tętna;

¹⁴TIA (*ang. transient ischemic attack*) — incydent przemijającego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego

Według aktualnych wytycznych, w szacunkowej ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego u chorych w przebiegu nadciśnienia tętniczego, pomocne jest oznaczanie parametrów, tj.: morfologia krwi obwodowej, stężenie glukozy w osoczu na czczo, stężenie cholesterolu całkowitego, stężenie cholesterolu frakcji LDL, frakcji HDL, trójglicerydów, stężenia potasu, sodu, kwasu moczowego, kreatyniny w surowicy (z oszacowaniem eGFR), badanie ogólne moczu, albuminuria, EKG. Według europejskiej skali SCORE (*ang. Systematic Coronary Risk Evaluation*) 10-letnie absolutne ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych zakończonych zgonem w przybliżeniu wynosi: poniżej 4% dla osób z grupy niskiego ryzyka, 4% dla osób z grupy umiarkowanego ryzyka, 5-8% dla osób z grupy wysokiego ryzyka i powyżej 8% dla osób z grupy bardzo wysokiego ryzyka.

1.2.1. Terapia hipotensyjna

Postępowanie terapeutyczne u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ma za zadanie zmniejszyć śmiertelność oraz powikłania sercowo-naczyniowe i nerkowe. Leczenie powinno prowadzić do obniżenia wartości ciśnienia tętniczego. Docelowe wartości ciśnienia tętniczego krwi u większości chorych nie powinny przekraczać 140/90 mmHg, u chorych na cukrzycę 140/85 mmHg, a u chorych po 80-tym roku życia 150 mmHg. Niezależnie od terapii lekami, niezbędna jest modyfikacja stylu życia, a zwłaszcza zapobieganie otyłości oraz zwiększenie aktywności fizycznej. W terapii hipotensyjnej wyróżnia się 5 głównych grup leków: diuretyki tiazydowe (szczególnie tiazydopodobne), β -blokery (szczególnie wazodylatacyjne), blokery kanału wapniowego (przede wszystkim z grupy pochodnych dihydropirydyny), inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) oraz blokery receptora angiotensynowego (ATRB). Przy nadciśnieniu 1-go stopnia najbardziej pożądaną formą leczenia jest monoterapia, natomiast przy nadciśnieniu 2-go i 3-go stopnia należy wprowadzać leczenie oparte na kombinacji dwóch leków. Preferowane połączenia dwulekowe przedstawiono na poniższej rycinie (ryc. 1).



β B *β -blokery*
ACEI *inhibitory konwertazy angiotensyny*
BKW *blokery kanału wapniowego*
ARB *blokery receptora angiotensynowego*
DT *diuretyki tiazydowe*

Rycina 1. Preferowane połączenia dwulekowe w terapii hipertensyjnej

W wytycznych PTNT z 2015 roku podkreślono, że w niepowikłanym nadciśnieniu tętniczym powinno się stosować optymalny trójlekowy schemat leczenia, oparty na leku hamującym układ renina-angiotensyna, blokerze kanału wapniowego i diuretyku tiazydowym/tiazydopodobnym. W izolowanym skurczowym nadciśnieniu tętniczym u osób w podeszłym wieku preferowane są diuretyki tiazydowe/tiazydopodobne i dihydropirydynowe blokery kanału wapniowego. U osób po 80-tym roku życia, lekiem pierwszego rzutu powinien być indapamid, a drugiego rzutu ACEI. Leczenie chorych z współtowarzyszącą cukrzycą należy rozpocząć od przyjmowania leku z grupy ACEI bądź ARB, natomiast w terapii skojarzonej zaleca się stosowanie diuretyku tiazydowego i dihydropirydynowego blokera kanału wapniowego. Ponadto, w przypadku chorych na cukrzycę, bardzo istotne jest dodatkowe włączenie statyn. U chorych na chorobę wieńcową, szczególnie po zawale serca, zalecane są ACEI i β -blokery, a w przypadku dolegliwości dławicowych również blokery kanału wapniowego.

1.2.2. Powikłania narządowe

Badania ostatnich lat udowodniły, że współistniejące z nadciśnieniem tętniczym inne choroby, tj. otyłość, hipertrójglicerydemia czy cukrzyca typu II, działają synergistycznie, pogłębiając rozwój licznych powikłań [3]. Długotrwałe nadciśnienie tętnicze powoduje powstanie i utrwalenie zmian w układzie sercowo-naczyniowym [12,13,14].

Kliniczna klasyfikacja nadciśnienia tętniczego, dokonana w oparciu o występujące powikłania narządowe, wyróżnia trzy jego okresy: okres I – charakteryzujący się brakiem zmian narządowych, okres II – w którym dochodzi do przerostu lewej komory serca oraz okres III – z istniejącymi zawansowanymi zmianami narządowymi.

Wystąpienie nadciśnienia tętniczego skutkuje zmianami w obrębie ścian naczyń krwionośnych, poprzez wzrost obwodowego oporu naczyniowego i wzrost naprężenia ściany naczyniowej. Rodzaj występujących zmian zależy od rodzaju naczynia, którego te zmiany dotyczą. W wyniku wzrostu ciśnienia tętniczego funkcjonujące mechanizmy mają za zadanie ochronę kapilar dla zapewnienia ciągłości procesów dyfuzji pomiędzy naczyniami a tkankami. W tym celu w tętniczkach aktywowane są kanały wapniowe, co skutkuje zwiększonym dokomórkowym napływem jonów Ca^{2+} , wzrostem napięcia mięśni gładkich i zmniejszeniem promienia w obrębie światła naczyń oporowych. Proces ten jest intensyfikowany poprzez zmiany zachodzące w śródbłonku. Dochodzi w nim do zmniejszenia wydzielania naczyniorozszerzającego tlenku azotu (NO), przy jednoczesnym wzroście wydzielania czynników naczyniozwężających, tj. endoteliny i tromboksanu. Skutkuje to pobudzeniem fosfolipaz w efekcie czego wzrasta stężenie diacyloglicerolu (DAG), który razem z jonami Ca^{2+} aktywuje kinazy białkowe C (PKC), fosforylujące łańcuchy lekkie miozyny. Łańcuchy te mają zdolność wiązania jonów Ca^{2+} . Zachodzące procesy wmagają wychwyty jonów wapniowych i pogłębiają skurcz mięśni gładkich ściany naczyniowej. W tym przypadku zmniejszony promień naczynia nie jest skutkiem przerostu komórek, a ich przemodelowania wokół zmniejszonego światła. Przeciwna sytuacja dotyczy tętnic przewodzących, w obrębie których dochodzi do przerostu i namnażania miocytów, a także rozrostu tkanki łącznej przy niezmiennym promieniu naczynia. W naczyniach tych wzrost ciśnienia tętniczego skutkuje wzmożonym naprężeniem ściany, a długotrwałe naprężenie pobudza procesy przerostowe. Zgrubienie warstwy środkowej naczynia prowadzi do zwiększonej sztywności jego ścian. Proces ten pogłębiany jest przez upośledzone funkcjonowanie śródbłonka, wydzielającego zmniejszoną ilość tlenku azotu, który w warunkach fizjologicznych pełni funkcje antyproliferacyjne.

W obrębie naczyń z przerastającą błoną środkową, wraz z upływem czasu dochodzi do jej ogniskowego szkliwienia, odcinkowego zaniku i zwłóknienia. Zaczynają pogłębiać się zmiany miażdżycowe. Światło naczyń ulega stopniowemu zwężeniu. W narządach uruchamiają się liczne mechanizmy adaptujące organizm do występujących zaburzeń. Masa mięśnia sercowego powiększa się, by przy wzmożonym oporze obwodowym utrzymać prawidłową pojemność minutową. Wskutek przeciążenia lewej komory dochodzi do jej koncentrycznego przerostu. Po początkowym okresie zwiększonej kurczliwości mięśnia serca, następuje stopniowe pogarszanie się jego funkcji. Najwcześniejszą obserwowaną zmianą jest upośledzenie napływu krwi do lewej komory, a następnie zaburzenia czynności skurczowej. Przy długotrwałe utrzymującym się nadciśnieniu, pojemność minutowa zmniejsza się, zaczynają rozwijać się kliniczne objawy niewydolności serca. Przerostowi mięśnia sercowego towarzyszy zmniejszenie rezerwy wieńcowej [15,16]. Zmiany w mięśniu sercowym i krążeniu wieńcowym zwiększają ryzyko choroby wieńcowej, arytmii oraz zawału serca. W nerkach rozwijają się wyraźnie dostrzegalne zaburzenia. Najbardziej narażone są tętniczki doprowadzające oraz tętniczki międzyzrazikowe. Następuje zeszkliwienie niektórych kłębuszków oraz zmiany w obrębie cewek nerkowych. Dochodzi do ubytku czynnego miąższu nerek [17,18,19]. Niedrożność tętniczek prowadzi do ogniskowego szkliwienia kłębuszków i rozrostu tkanki łącznej. W układzie nerwowym oprócz zaburzeń w obrębie małych tętnic, może dojść do rozwoju miażdżycy dużych tętnic śród- i zewnątrzczaszkowych. Zmiany w tętniczkach mózgu predysponują do wytwarzania mikrotętniaków, których pęknięcie powoduje wynaczynienia krwi do tkanki mózgowej. W wyniku niesprawnych mechanizmów autoregulacji może powstać obrzęk mózgu, wzrosnąć ciśnienie śródczaszkowe, a następnie pojawić się upośledzenie przepływu mózgowego, co prowadzi do udaru.

1.2.2.1. Śródbłonek

Analizując występujące w przebiegu nadciśnienia tętniczego zmiany w układzie naczyniowym, można zauważyć jak ważną rolę odgrywa w nich śródbłonek. Warto zaznaczyć, że zaburzenia śródbłonka mogą być jedną z przyczyn wystąpienia nadciśnienia tętniczego, bądź też pojawiają się i pogłębiają w trakcie jego trwania. Dodatkowo zaburzenia w obrębie śródbłonka są potęgowane przez miażdżycę. Mając wzgląd na to wszystko,

stopniowo odkrywano, że śródbłonek nie jest jedynie warstwą komórek wyścielającą naczynia, a należy traktować go całościowo, jako narząd wydzielniczy, regulujący wiele procesów i przemian biochemicznych. Endotelium wytwarza substancje oddziałujące na komórki mięśni gładkich ściany naczyniowej oraz na elementy morfotyczne krwi, a także działa auto- i parakrynnie, umożliwiając utrzymanie homeostazy naczyń (tab. 4) [13,20]. Ponadto, dzięki leczeniu zaburzeń śródbłonka u osób ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym, prawdopodobne jest w dłuższej perspektywie, ograniczenie śmiertelności z powodu schorzeń układu krwionośnego.

Tabela 4. Substancje wytwarzane przez endotelium (wg [4])

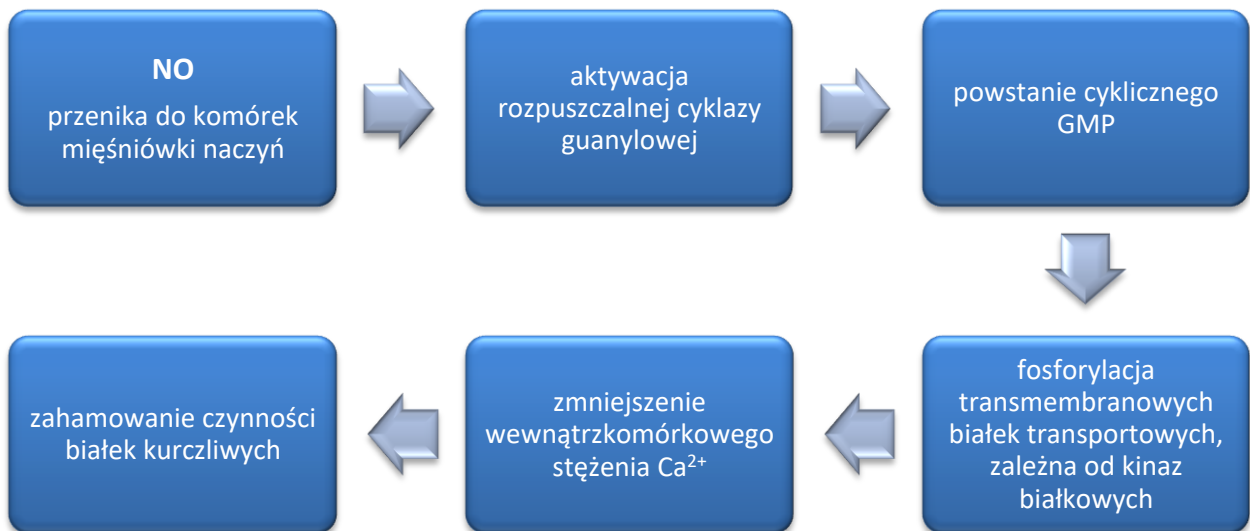
Rola	Substancje wytwarzane przez śródbłonek
Przeciwwzakrzepowa	NO Prostacyklina Tkankowy aktywator plazminogenu Trombomodulina Heparyna Białka C i S
Proagregacyjna	Tromboksan tPA-I Czynnik tkankowy Czynnik von Willebranda Czynnik V
Czynniki immunologiczne	Interleukina - 1, 6, 18 VCAM-1 ICAM-1 TNF MCP-1 E-selektyna

Choroby układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną zgonów w dzisiejszej cywilizacji. Wśród nich dysfunkcja śródbłonna jest jednym z najczęściej występujących zaburzeń, prowadzących do wystąpienia poważnych powikłań. Nieprawidłowości w obrębie endotelium stymulują powstawanie blaszki miażdżycowej, a więc sprzyjają rozwojowi miażdżycy, zakrzepicy, zawałowi serca, angiopatii cukrzycowej, nadciśnieniu tętniczemu, niedokrwinnemu udarowi mózgu, a także zaburzeniom krążenia obwodowego.

Dowodzono, że endotelium odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu odpowiedniego napięcia i struktury ścian naczyń. Jako główny regulator homeostazy naczyniowej, wywiera szereg efektów naczyniowych, tj. wazorelaksację, inhibicję wzrostu komórek mięśni gładkich naczyń oraz bierze czynny udział w hamowaniu procesu zapalnego [22,23].

W prawidłowo funkcjonującym organizmie, oddziałujące siły tarcia przepływającej krwi, acetylocholina, angiotensyna oraz inne substancje czynne biologicznie powodują wydzielanie przez śródbłonek naczyniorozkurczowych czynników, m.in.: tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI₂) i śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDHF). Czynniki wywołujące rozkurcz naczyń pozostają w równowadze z czynnikami naczyniokurczącymi: endoteliną 1 (ET₁), tromboksanem (TXA₂) - syntetyzowanym przede wszystkim w płytkach krwi, a w mniejszej ilości w śródbłonku, angiotensyną II (AT II), czynnikiem aktywującym płytki (PAF) i leukotrienami (LT).

Ze wszystkich związków endogennych, najsilniej naczyniorozkurczowo działa tlenek azotu. Powstaje on pod wpływem syntazy tlenku azotu (NOS) z L-argininy. Działa wielokierunkowo: bezpośrednio – powodując relaksację ściany naczyniowej (ryc. 2), parakrynnie – powstrzymując agregację i adhezję płytek krwi, antyoksydacyjnie – ograniczając utlenianie LDL [5], a także antyproliferacyjnie w stosunku do komórek mięśni gładkich naczyń [6].



Rycina 2. Bezpośrednie działanie NO na ścianę naczyniową

W odpowiedzi na siły ścierania przepływającej krwi, acetylocholinę i hipoksję, powstaje kolejny związek działający relaksacyjnie na naczynia, a mianowicie prostacyklina. Działa ona poprzez zwiększanie stężenia cyklicznego AMP oraz aktywację kanałów potasowych. Obok funkcji relaksacyjnej, hamuje agregację płytek krwi. Kolejnym czynnikiem posiadającym funkcję naczyniorozkurczową jest EDHF, który bezpośrednio aktywuje ATP-zależne błonowe kanały potasowe, prowadząc do hiperpolaryzacji błony komórkowej i zmniejszenia napływu Ca^{2+} do wnętrza komórki. Ogranicza to czynność białek kurczliwych i powoduje rozkurcz naczyń [7].

W związku z wydzielaniem wazodylatorów, w odpowiedzi syntetyzowane są i uwalniane czynniki kurczące naczynia. Najsilniej z nich działa endotelina 1, wytwarzana bezpośrednio przez śródbłonek. ET_1 działa poprzez dwa typy receptorów błonowych: ET_A znajdujące się w mięśniach gładkich naczyń i ET_B obecne są w endotelium. Stymulacja receptora ET_A poprzez szlak fosfolipazy C, prowadzi do skurczu mięśniówki naczyń, natomiast pobudzenie receptora ET_B powoduje rozszerzenie naczyń, dlatego też działanie ET_1 na naczynia krwionośne jest wypadkową jej wpływu na receptory ET_A w mięśniach gładkich oraz na receptory ET_B w śródbłonce. W warunkach fizjologicznych naczyniokurczący wpływ ET_1 jest maskowany jej działaniem na śródbłonek, który pod jej wpływem uwalnia naczyniorozkurczający tlenek azotu oraz prostacyklinę [8].

Utrzymanie homeostazy w obrębie wytwarzania czynników naczyniokurczących i rozkurczających jest niezwykle ważne dla prawidłowej pracy śródbłonna, a tym samym pośrednio dla prawidłowej czynności całego układu sercowo-naczyniowego.

Jak zauważono poprzednio, czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych mogą powodować dysfunkcję śródbłonna, co zmniejsza biodostępność śródbłonkowych substancji naczyniorozszerzających, w głównej mierze NO. Dzieje się tak na skutek zmniejszonej syntezy NO i/lub inaktywacji NO. Biochemiczny obraz uszkodzonego śródbłonna wyraża się we wzroście stężenia czynnika von Willebranda (vWF), podwyższeniu poziomu tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) i jego inhibitora typu 1 oraz zwiększeniu ekspresji cząstek adhezyjnych. Dochodzi do nasilenia oddziaływań międzykomórkowych – adhezji i agregacji leukocytów oraz płytek krwi, aktywacji lokalnej i ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej, a także rośnie potencjał prozakrzepowy. Wszystkie te procesy sprzyjają tworzeniu i narastaniu blaszek miażdżycowych oraz ich destabilizacji. W konsekwencji wielokrotnie zwiększa się ryzyko wystąpienia ostrych zespołów wieńcowych, udarów mózgu i chorób naczyń obwodowych [28,29].

1.2.2.1.1. Profilaktyka i leczenie farmakologiczne dysfunkcji śródbłonna

Leczenie zaburzeń pracy śródbłonna stanowi wielki potencjał współczesnej medycyny. Chociaż nie ustalono jeszcze wspólnej koncepcji jak powinno przebiegać takie leczenie, coraz lepsze poznanie mechanizmów fizjologii i biochemii endotelium pozwoliło na obranie pewnych strategii, pomocnych w korygowaniu dysfunkcji śródbłonna. Jak w przypadku wielu schorzeń i w tym wypadku, istotną rolę odgrywa wdrożenie nefarmakologicznych metod leczenia, polegających m.in. na stosowaniu zbilansowanej diety, zwiększeniu aktywności fizycznej oraz wyeliminowaniu używek. Ma to na celu zminimalizowanie czynników działających uszkodzająco na śródbłonek.

Z epidemiologicznego punktu widzenia, profilaktyka dysfunkcji śródbłonna jest niezwykle istotna, jednakże przy wystąpieniu jego zaburzeń należy włączyć leczenie farmakologiczne (tab. 5). Nieprawidłowości w obrębie endotelium obserwuje się przy wysokim poziomie cholesterolu LDL. Pacjentom podawane są wówczas statyny (inhibitory reduktazy hydroksymetyloglutarylo-koenzymu A). Istotną poprawę funkcji śródbłonna można

stwierdzić po 1 – 2 miesiącach ich stosowania [9]. Mechanizm śródbłonkowego działania statyn jest dwojaki, laktonowe statyny, tj. simwastatyna, stymulują uwalnianie ze śródbłonka głównie NO, podczas gdy syntetyczne, lipofilne statyny, tj. atorwastatyna, stymulują uwalnianie głównie PGI₂ [10].

Wśród osób z wysokim ciśnieniem tętniczym krwi, odnotowano poprawę funkcji endotelium po zastosowaniu inhibitorów konwertazy angiotensynowej i antagonistów kanałów wapniowych (pochodnych dihydropirydyny). Pozytywny wpływ ACEI na funkcję śródbłonka wynika z obniżania stężenia angiotensyny II i wzrostu stężenia bradykininy, która wtórnie reguluje ilość korzystnie działających: NO, PGI₂, EDHF oraz t-PA [11]. Pochodne dihydropirydyny zwiększają aktywność estrów cholesterolowych, zmniejszając tym samym ich odkładanie się w komórkach endotelium i przeciwdziałają procesom oksydacji frakcji LDL cholesterolu. Ponadto zapobiegają proliferacji śródbłonka oraz mięśniówki naczyni, a także hamują agregację płytek krwi [12].

Przy dysfunkcji endotelium istotną rolę odgrywa biodostępność NO. Obniżony poziom tlenu azotu można korygować poprzez zwiększenie podaży L-argininy (substrat NO), jak i stosując substancje o działaniu przeciwutleniającym, hamujące unieczynnienie NO. Aktualne dane naukowe wskazują, że w nieprawidłowym śródbłonku, L-arginina jest wypierana przez endogenne inhibitor NOS – asymetryczną dimetyloargininę (ADMA) [13]. Obniżenie stężenia ADMA w surowicy krwi można osiągnąć za pomocą diety niskotłuszczowej, zwiększonej aktywności fizycznej oraz suplementacji kwasu foliowego i witamin z grupy B [14]. Warto zaznaczyć, że donorem grup metylowych w syntezie ADMA jest metionina, dlatego też obniżenie spożycia metioniny może jednocześnie skutkować obniżeniem stężenia ADMA.

Ważną funkcję w uszkodzonym endotelium pełnią antyutleniacze, pomagające walczyć z negatywnymi skutkami nadmiernego stresu oksydacyjnego. Coraz częściej podkreśla się istotną rolę witaminy C, jako endotelialnego przeciwutleniacza, który hamuje śródbłonkowe tworzenie się nadtlenoazotu (ONOO⁻) z NO i O₂⁻ [15], a dzięki temu chroni PGI₂ przed zniszczeniem. Do cytoplazmy komórek śródbłonka poprzez Na⁺-zależny transporter błonowy trafiają duże ilości kwasu askorbowego. W cytoplazmie askorbinian zapobiega utlenianiu NO do ONOO⁻, sam utleniając się do dehydroaskorbinianu, który z powrotem jest redukowany przez glutaredoksynę do kwasu askorbinowego [16]. Proces ten zachodzi bardzo szybko, dlatego aby w pełni wykorzystać cytoplazmatyczną glutaredoksynę, komórki śródbłonka w dużych ilościach pobierają z krwi zużyty kwas dehydroaskorbowy (za pomocą transporterów dla glukozy – GLUT-1, -2). Przemiany te wskazują na złożone

śródbłonkowe mechanizmy koncentracji i regeneracji witaminy C, broniące komórki endotelium przed toksycznym ONOO⁻. Zważywszy na ten mechanizm stosowanie witaminy C w dysfunkcji śródbłonka jest w pełni uzasadnione i jak najbardziej wskazane.

Tabela 5. Leki poprawiające funkcjonowanie endotelium

Zaburzenia układowe	Farmakoterapia
Podwyższony poziom cholesterolu	Statyny
Nadciśnienie tętnicze	ACEI (Inhibitory konwertazy angiotensyny) Antagoniści wapnia (poch. dihydropirydyny)
Zmniejszona biodostępność NO	<p>Wzrost podaży L-argininy</p> <p><i>Wzrost aktywność NOS</i> Regularny wysiłek fizyczny Oleje ryb morskich ACEI Spironolakton Estrogenowa terapia zastępcza Nebivolol Insulina</p> <p><i>Zahamowanie rozkładu NO</i> Witamina C i E Karotenoidy Flawonoidy Statyny Glutation Dihydropirydyny Kwas acetylosalicylowy Deferoksamina Allopurinol</p>
Cukrzyca typu - 2	<p><i>Biguanidy</i> Metformina</p> <p><i>Sulfonylomoczniki</i> Gliklazyd Glibenklamid</p>

Rozważając istotę prawidłowo funkcjonującego śródbłonka klaruje się teza, iż możliwość odnowy uszkodzonych komórek endotelium ma fundamentalne znaczenie w zmniejszaniu ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych. Biorąc pod uwagę fakt, iż uważano, że dojrzałe komórki śródbłonka mają ograniczoną zdolność do regeneracji, wielkim przełomem było odkrycie przez Asaharę i wsp. w 1997 roku [17], endotelialnych komórek progenitorowych – EPC (*ang. endothelial progenitor cells*), zdolnych do różnicowania się w komórki endotelialne. Przeprowadzono liczne badania [18] poszukując korelacji pomiędzy komórkami EPC a różnymi stanami chorobowymi. Wyniki wielu prac pozwoliły udowodnić, że komórki EPC są nowym markerem funkcji śródbłonka i pozwalają oszacować ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. Wykazano, iż liczba EPC spada wraz z wiekiem, a także w określonych sytuacjach klinicznych, tj. hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, otyłość, reumatoidalne zapalenie stawów oraz choroby układu sercowo-naczyniowego. Spadek liczby komórek EPC w chorobach układu krwionośnego może być wynikiem ich przyspieszonej apoptozy oraz wyczerpania magazynów komórek progenitorowych w szpiku kostnym [19,20]. Długotrwałe narażenie na czynniki ryzyka, w sposób ciągły uszkadza komórki endotelium, które wymagają intensywnej wymiany, a także wpływa na ciągłą mobilizację i ingerencję komórek EPC w miejscach uszkodzenia naczyń, co wyczerpuje ich pulę. Należy zaznaczyć, że ilość komórek EPC można korygować przy pomocy leków. Korzystny wpływ, powodujący stymulację aktywności i proliferacji EPC, odnotowano w przypadku farmakoterapii statynami, inhibitorami konwertazy angiotensyny [21] oraz erytropoetyną u pacjentów z niedokrwistością pochodzenia nerkowego [22]. Nadzieję na przyszłość daje też terapia komórkowa. Być może komórki EPC z sukcesem będzie można transplantować, podobnie jak obecnie transplantuje się komórki szpiku kostnego [23].

Postęp w zakresie technik badawczych oraz aktualne doniesienia literaturowe na temat potencjalnych możliwości regeneracji komórek śródbłonka, dają szansę na wprowadzenie w przyszłości farmakoterapii, umożliwiającej odbudowę uszkodzonego chorobowo śródbłonka i w efekcie poprawę rokowań pacjentów cierpiących z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego. Wyzwaniem współczesnej farmakoterapii są poszukiwania leków cechujących się z jednej strony obojętnością metaboliczną, z drugiej natomiast posiadających pewne, dodatkowe cechy – właściwości plejotropowe – umożliwiające korygowanie różnych zaburzeń towarzyszących. Pośród leków hipotensyjnych poszukuje się takich, które mają dodatkową zdolność korygowania zaburzonego profilu węglowodanowo-lipidowego i dysfunkcji śródbłonka. Z taką charakterystyką idealnie korespondują leki α_1 -adrenolityczne,

które w ostatnim czasie zyskują kolejnych zwolenników. Pojawienie się nowych technik badawczych umożliwia określenie preferencyjności działania leków i związków α_1 -adrenolitycznych względem podtypów receptora α_1 , a to daje z kolei możliwość wyjaśnienia mechanizmu ich korzystnego działania plejotropowego w ludzkim organizmie.

1.3. Leki blokujące receptory α_1 -adrenergiczne

Leki wykazujące właściwości α_1 -adrenolityczne działają hipotensyjnie poprzez selektywne blokowanie postsynaptycznych receptorów α_1 -adrenergicznych w ścianie naczyń krwionośnych. W wyniku ich blokady dochodzi do rozszerzenia tętniczek oporowych oraz naczyń pojemnościowych, a tym samym do spadku oporu obwodowego i ciśnienia tętniczego krwi. Jednocześnie zachowana pozostaje czynność zlokalizowanych presynaptycznie receptorów α_2 , dzięki czemu nie dochodzi do wyraźnego wzrostu poziomu amin katecholowych. Opierając się na licznych badaniach biofunkcyjnych, radioreceptorowych, a także badaniach wykorzystujących techniki inżynierii genetycznej oraz biologii molekularnej stworzono aktualną klasyfikację podtypów receptorów α_1 , rozróżniającą podtyp α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} oraz podtyp α_{1L} , będący rodzajem receptora α_{1A} występującego w odmiennym stanie funkcjonalnym [45,46,47]. Podtypy receptora α_1 mają różną gęstość w poszczególnych tkankach i narządach, stąd pełnią specyficzne funkcje wynikające z ich lokalizacji. Podtyp α_{1A} wykazuje najwyższą ekspresję w obrębie wątroby, nieznacznie niższą w obrębie serca, mózdzku i kory mózgowej. Podtyp α_{1B} występuje najliczniej w obrębie tkanek śledziony, nerek oraz mózgu płodu. Podtypu α_{1D} jest najwięcej w korze mózgowej, aortce, a także pęcherzu moczowym [48,49]. Czwarty podtyp, podtyp α_{1L} , występuje m.in. w ludzkiej i szczurzej prostatie oraz nasieniowodach [50,51,52].

Skuteczność α_1 -adrenolityków w terapii hipotensyjnej została potwierdzona w wielu randomizowanych badaniach klinicznych [53,54], mimo to w zaleceniach Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego nie zostały one zakwalifikowane jako leki pierwszego rzutu w leczeniu nadciśnienia. Wpływ na wytyczne w dużym stopniu miały wyniki słynnego wielośrodkowego badania klinicznego ALLHAT (*ang. Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial*) [24]. Badanie to miało wykazać czy najnowsze leki hipotensyjne, a mianowicie α_1 -adrenolityki, antagoniści wapnia

i inhibitory ACE są skuteczniejsze niż diuretyki, w zapobieganiu śmiertelnym zdarzeniom wieńcowym i zawałom serca. Badanie z udziałem chorych leczonych doksazosyną zostało wcześniej zakończone, ze względu na istotne zwiększenie liczby powikłań w stosunku do chorych otrzymujących chlortalidon. W grupie z doksazosyną zaobserwowano wzrost o 25% liczby epizodów sercowo-naczyniowych, zwiększenie o 19% ryzyka udaru i 2-krotnie częstszą hospitalizację z powodu niewydolności krążenia. Pacjenci otrzymujący doksazosynę charakteryzowali się nieco wyższymi wartościami ciśnienia skurczowego w stosunku do tych, którzy przyjmowali chlortalidon. W przypadku obu leków skuteczność w zapobieganiu zawałom serca i zgonom była zbliżona. Po zakończeniu eksperymentu pojawiło się wiele wątpliwości dotyczących słuszności podjętych decyzji co do doksazosyny. Zarzucano eksperymentatorom m.in. to, że w badaniu ALLHAT nie zastosowana placebo. Dodatkowo protokół badania dla osób zakwalifikowanych do grupy z doksazosyną wymagał nagłego odstawienia dotychczasowych leków hipotensyjnych, co mogło spowodować wystąpienie dysfunkcji lewej komory, która wcześniej była maskowana stosowanym leczeniem. W opozycji stawiano badania VHeFT-I (*ang. Vasodilator-Heart Failure Trial I*), które nie wykazały negatywnego wpływu α_1 -adrenolityków na przebieg kliniczny niewydolności serca [25]. W badaniu tym stosowanie prazosyny nie zmniejszyło, jak również nie zwiększyło ryzyka zgonu chorych z niewydolnością serca. W świetle niniejszych argumentów sugeruje się, że warto przyrzeć się ponownie α_1 -adrenolitykom jako lekom hipotensyjnym, tym bardziej że wykazują one wielokierunkowe działanie farmakologiczne, przede wszystkim korzystnie wpływają na profil metaboliczny. W badaniach TOMHS (*ang. Treatment of Mild Hypertension Study*) [26] i HALT (*ang. Hypertension and Lipid Trial*) [27] udowodniono, że obok skuteczności hipotensyjnej, doksazosyna koryguje zaburzony profil lipidowy.

W licznych eksperymentach udokumentowano, że doksazosyna istotnie statystycznie obniża stężenia trójglicerydów, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, VLDL, glicerolu i mleczanów, zwiększając stężenia frakcji cholesterolu HDL, a także β -hydroksymaślanu [28]. Leki α_1 -adrenolityczne nasilają usuwanie trójglicerydów z krwi poprzez uwrażliwienie receptora LDL oraz zwiększenie aktywności lipazy lipoproteinowej i acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej. Ponadto wpływają na transport cholesterolu przez makrofagi, hamując tym samym syntezę kolagenu i komórek piankowatych w mięśniach gładkich naczyń [29]. Wykazują również korzystny wpływ na fibrylizację, przeciwdziałając agregacji płytek. Efektem tych działań jest hamowanie procesu tworzenia i narastania blaszki miażdżycowej. Ponadto α_1 -adrenolityki poprawiają wrażliwość tkanek na insulinę i regulują metabolizm glukozy. Uwrażliwienie na insulinę w przebiegu leczenia doksazosyną wynika z rozszerzenia

drobnych naczyń oporowych oraz poprawy ukrwienia w tkankach obwodowych, co daje w tych obszarach możliwość efektywniejszej interakcji insuliny i glukozy.

1.3.1. Rola α_1 – adrenolityków w sercu

Narządem, w którym warto podkreślić rolę receptorów α_1 -adrenergicznych jest serce. W sercu występują wszystkie podtypy receptora α_1 , natomiast ich ilość jest różna. Przeważa podtyp α_{1A} , a w znikomej ilości występuje podtyp α_{1D} [30,31]. W prawidłowo funkcjonującym sercu, to receptory β -adrenergiczne odgrywają kluczową rolę, natomiast w sytuacjach patologicznych, np. w przewlekłej niewydolności serca w wyniku kompensacyjnej nasilonej aktywności układu współczulnego dochodzi do down regulacji receptorów β -adrenergicznych [32], wówczas to receptory α_1 -adrenergiczne przejmują częściowo rolę inotropową. W chorobach przebiegających z dysfunkcją kurczliwości mięśnia sercowego wrażliwość i gęstość receptorów α_1 -adrenergicznych pozostaje stała. Mechanizm działania inotropowego poprzez receptory α_1 -adrenergiczne nie jest w pełni poznany. Prawdopodobnie dochodzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych przekaźników IP3 i DAG, a tym samym zwiększa się napływ jonów wapniowych przez kanały jonowe siateczki sarkoplazmatycznej [32] i rośnie siła skurczu mięśnia sercowego. Receptory α_1 -adrenergiczne mają też swój udział w regulacji rytmu serca, szczególnie w niewydolności serca, niedokrwieniu i następnej reperfuzji naczyń wieńcowych. Dochodzi wówczas do wzmożonej impulsacji układu adrenergicznego oraz wzrostu poziomu IP3, który w warunkach niedotlenienia mięśnia sercowego może być czynnikiem arytmogennym [33]. Ponadto w wyniku niedoboru tlenu dochodzi do zaburzeń funkcjonowania kanałów jonowych. Następuje blokada prądów potasowych, wydłuża się czas repolaryzacji i zmniejsza automatyzm we włóknach Purkiniego [33]. To predysponuje do zaburzeń elektrofizjologicznych i prowadzi do arytmii. W tym wypadku, przy niedotlenionym sercu, zastosowanie α_1 -adrenolityków może zwiększyć potencjał arytmogenny [31], w efekcie jednoczesnej blokady receptorów α_1 w naczyniach i w sercu, co przyczynia się do wystąpienia odruchowej tachykardii i potęguje stymulację adrenergiczną. Problem ten pokazuje jak istotne jest odkrycie wysoce selektywnych związków o powinowactwie do konkretnych podtypów receptora α_1 . To skutkowałoby precyzyjnym działaniem na określony narząd, a także pomogłoby określić i wyjaśnić rolę poszczególnych podtypów receptora α_1 w sercu i układzie naczyniowym. Obok braku ściśle selektywnych związków pojawia się też problem

z ekstrapolacją wyników otrzymanych w eksperymentach na zwierzętach do organizmu ludzkiego. Rozmieszczenie podtypów receptora α_1 i ich ilość zdaje się być różna u poszczególnych gatunków zwierząt oraz u człowieka. Na podstawie licznych badań eksperymentalnych można stwierdzić, że gatunki takie jak szczur, kawia domowa, mysz, królik oraz świnia mają dużo wyższą niż człowiek zawartość receptorów α_1 w sercu. Najwyższą gęstością receptorów α_1 w sercu odznacza się szczur, u którego stwierdza się około 5-krotnie wyższe zagęszczenie w porównaniu do innych gatunków [34].

1.3.2. Rola α_1 – adrenolityków w układzie naczyniowym

W regulacji napięcia mięśni gładkich naczyń, prowadzącej do zmian oporu naczyniowego i regulacji ciśnienia tętniczego krwi najprawdopodobniej biorą udział wszystkie trzy podtypy receptora α_1 -adrenergicznego. Badania eksperymentalne na zwierzętach sugerują, że podtypy α_{1A} i α_{1D} odpowiadają za utrzymanie prawidłowego ciśnienia krwi [35], natomiast podtyp α_{1B} bierze udział w odpowiedzi presyjnej wywołanej wyrzutem amin katecholowych. U zwierząt pozbawionych genów dla receptorów α_{1A} i α_{1D} ciśnienie tętnicze krwi jest istotnie statystycznie niższe w porównaniu do grupy zwierząt pozbawionych genów dla receptora α_{1B} , wśród których nie odnotowano zmian w zakresie wartości ciśnienia tętniczego krwi [36, 37]. Przy zastosowaniu noradrenaliny i fenylefryny w grupach zwierząt pozbawionych podtypów α_{1A} i α_{1D} wzrost ciśnienia był niższy w odniesieniu do zwierząt nie zmienionych genetycznie, posiadających wszystkie podtypy receptora α_1 . W mięśniówce gładkiej oporowych naczyń krwionośnych szczególnie licznie występuje podtyp α_{1B} , który bierze udział w obwodowej regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Wyjaśnia to dlaczego w przebiegu terapii zaburzeń urologicznych nieselektywnymi podtypowo lekami α_1 -adrenolitycznymi, jako działanie niepożądane, bardzo często występuje hipotonia ortostatyczna.

1.3.3. Rola α_1 – adrenolityków w układzie moczowo-płciowym

Jak już wspomniano, leki α_1 -adrenolityczne, znalazły zastosowanie w schorzeniach urologicznych u mężczyzn, przede wszystkim w zaburzeniach rozwijających się na tle łagodnego rozrostu gruczołu krokowego. Receptory α_{1A} zlokalizowane są głównie w zrębie gruczołu krokowego, natomiast mniej liczne receptory α_{1D} znajdują się w mięśniówce szyi pęcherza moczowego i w sterczowym odcinku cewki moczowej. W hipertroficznym tkance stercza przewaga receptorów α_{1A} jest jeszcze większa niż w przypadku zdrowej prostaty. W mięśniówce gładkiej wypieracza pęcherza moczowego, obok receptorów α_{1A} , występują w przewodzie receptory α_{1D} , nie występują natomiast receptory α_{1B} . Blokada receptora α_{1A} -adrenergicznego obniża napięcie mięśniówki gładkiej stercza oraz cewki moczowej, co ułatwia odpływ moczu i poprawia parametry urodynamiczne. Blokada receptora α_{1D} odpowiada natomiast za zmniejszenie napięcia i reaktywności mięśnia wypieracza pęcherza moczowego, zmniejszając tym samym uczucie parcia na pęcherz [38]. To tłumaczy dlaczego w zaburzeniach związanych z łagodnym rozrostem prostaty znalazły zastosowanie α_1 -adrenolityki o preferencyjności względem podtypów receptora α_{1A} i α_{1D} .

Obecnie zarejestrowane w Polsce leki α_1 -adrenolityczne to: doksazosyna, terazosyna, alfuzosyna, tamsulozyna oraz sylodozyna [39]. W niektórych krajach, m.in. w Japonii, dostępny jest także naftopidil. Trzy z pięciu zarejestrowanych aktualnie leków α_1 -adrenolitycznych, tj. terazosyna, doksazosyna oraz alfuzosyna należą do środków nieselektywnie blokujących wszystkie podtypy receptora α_1 -adrenergicznego. Czwarty lek - tamsulozyna, wykazuje 10-krotnie większą preferencyjność wiązania w stosunku do receptorów α_{1A} i α_{1D} względem podtypu α_{1B} . Alfuzosyna nie wykazuje preferencyjności wiązania do konkretnego podtypu receptora α_1 -adrenergicznego, jednak w zakresie stosowanych dawek cechują się urospecyficznością. Naftopidil oraz silodozyna to środki wykazujące znacznego stopnia preferencyjność względem podtypów receptora α_1 . Naftopidil wykazuje 3-krotną preferencyjność wiązania podtypu α_{1D} w odniesieniu do podtypu α_{1A} oraz 17-krotną w odniesieniu do podtypu α_{1B} [40]. Silodozyna przejawia 583-krotną i 56-krotną preferencyjność wiązania receptorów α_{1A} w odniesieniu do odpowiednio podtypów α_{1B} i α_{1D} i jest zarazem najbardziej wybiórczą substancją tego typu dostępną komercyjnie [41].

1.3.4. Wskazania kliniczne dla α_1 – adrenolityków

Leki niewybiórcze podtypowo, tj. doksazosyna i terazosyna są stosowane w terapii nadciśnienia samoistnego, nadciśnienia współistniejącego z łagodnym rozrostem gruczołu krokowego lub nadciśnienia z zaburzeniami węglowodanowo-lipidowymi. Alfuzosyna, naftopidyl, tamsulozyna i sylodozyna poprawiają parametry urodynamiczne i ułatwiają mikcję. Prazosyna, będąca prototypem selektywnych leków α_1 -adrenolitycznych, nie jest obecnie stosowana u pacjentów. Poprzednio miała wskazania w terapii nadciśnienia samoistnego, natomiast ze względu na jej krótki czas działania i gwałtowne obniżanie ciśnienia tętniczego, czego efektem były omdlenia i nagłe zawroty głowy, została zastąpiona przez nowsze, bezpieczniejsze w tym aspekcie α_1 -adrenolityki.

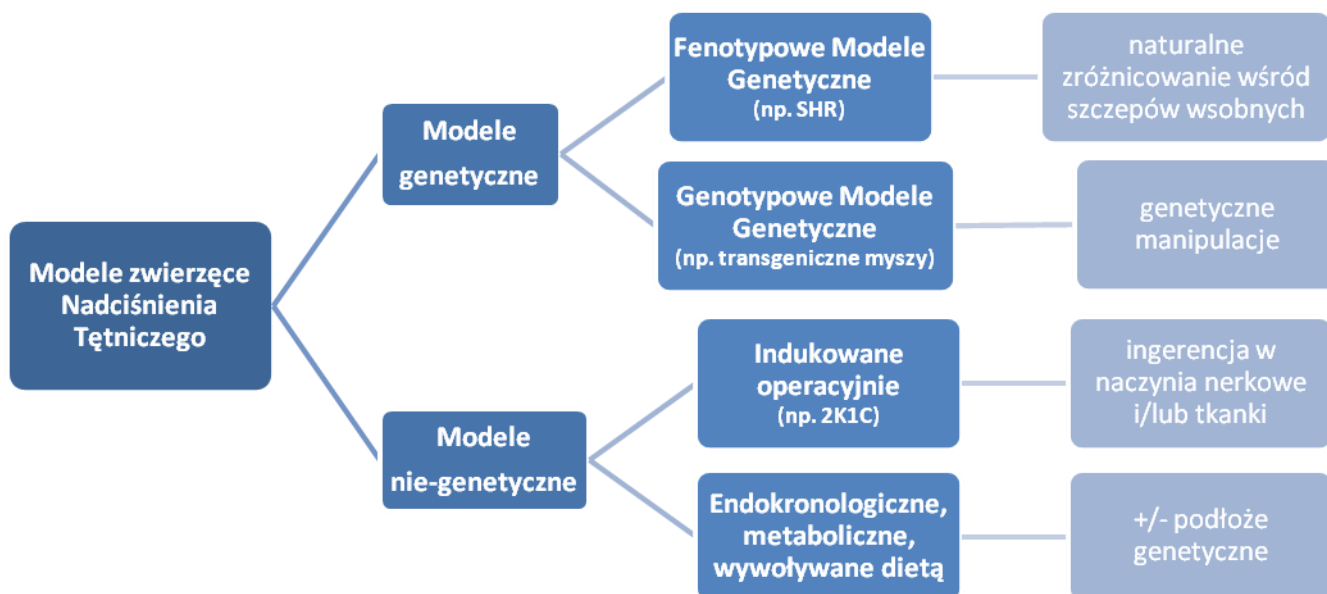
W tabeli poniżej przedstawiono działania niepożądane popularnych leków α_1 -adrenolitycznych dostępnych na rynku (tab. 6). Tabela wskazuje na pewne podobieństwo poszczególnych nieselektywnych antagonistów receptorów α_1 -adrenergicznych w zakresie wywoływanych przez nie efektów niepożądanych. Pojawiająca się podczas ich stosowania hipotonia oraz zawroty głowy są najbardziej uciążliwymi efektami niepożądanymi, które zasadniczo wpływają na tolerancję tej grupy leków przez chorych. Niemniej jednak leki blokujące receptory α_1 -adrenergiczne są na ogół dobrze tolerowane, a częstość działań niepożądanych, które wywołują, zależy od selektywności wobec postsynaptycznych receptorów α_1 . Dotychczasowe doświadczenia kliniczne wskazują, że α_1 -adrenolityki są szczególnie przydatne i cenne u chorych na nadciśnienie współistniejące z zaburzeniami lipidowymi, zespołem metabolicznym, łagodnym rozrostem prostaty, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, miażdżycą zarostową kończyn dolnych i niewydolnością nerek.

Tabela 6. Zestawienie najczęstszych działań niepożądanych wynikających ze stosowania poszczególnych leków α_1 -adrenolitycznych [28,39,40,41]

Lek	Terazosyna	Doksazosyna	Alfuzosyna	Tamsulozyna
Wiązane receptory	$\alpha_{1A}=\alpha_{1D}=\alpha_{1B}$	$\alpha_{1A}=\alpha_{1D}=\alpha_{1B}$	$\alpha_{1A}=\alpha_{1D}=\alpha_{1B}$	$\alpha_{1A}=\alpha_{1D}>\alpha_{1B}$
Działania niepożądane	<ul style="list-style-type: none"> • Astenia • Zawroty głowy • Senność • Hipotonia • Obrzęk błony śluzowej nosa • Zaburzenia wzroku 	<ul style="list-style-type: none"> • Zawroty głowy • Zmęczenie • Obrzęki obwodowe • Dusznosc • Hipotonia 	<ul style="list-style-type: none"> • Zawroty głowy • Bóle głowy • Nudności • Suchość w ustach • Biegunka • Hipotonia 	<ul style="list-style-type: none"> • Zaburzenia ejakulacji • Zawroty głowy • Infekcje • Bóle głowy • Objawy grypopodobne

1.4. Zwierzęce modele nadciśnienia tętniczego

Badanie mechanizmów patogenetycznych nadciśnienia tętniczego, a także związków które mają potencjalne działanie hipotensyjne i plejotropowe wymagają dostępności doświadczalnych modeli zwierzęcych. Idealny do badań nadciśnienia model zwierzęcy, powinien mieć podobną do człowieka anatomię i fizjologię układu sercowo-naczyniowego, a także w odpowiednio krótkim czasie dla eksperymentu, rozwijać powikłania charakterystyczne dla nadciśnienia. Żaden gatunek nie może konsekwentnie odpowiedzieć na wszystkie te potrzeby, dlatego często typ doświadczenia i inne ograniczenia dyktują wybór określonych modeli zwierzęcych. W związku z tym, że nadciśnienie to wieloczynnikowa choroba, w rozwoju której mają udział czynniki genetyczne i środowiskowe, wśród zwierzęcych modeli nadciśnienia tętniczego wyróżnia się modele genetyczne i nie-genetyczne (ryc. 3) [42,43,203].



Rycina 3. Schemat przedstawiający podział Modeli Zwierzęcych Nadciśnienia Tętniczego

1.4.1. Modele nie-genetyczne

W przeciwieństwie do nadciśnienia pierwotnego, w którym nie wykrywa się jednoznacznej przyczyny podwyższonych wartości ciśnienia krwi, wtórne nadciśnienie tętnicze ma konkretną etiologię. Spośród wszystkich postaci nadciśnienia wtórnego, najczęstszym jest nadciśnienie nerkopochodne, występujące w przewlekłych chorobach nerek, np. w przewlekłym kłębuszkowym zapaleniu nerek lub nadciśnienie naczyniowo-nerkowe, spowodowane niedokrwieniem jednej lub obu nerek, w wyniku którego dochodzi do zwężenia światła naczyń. Rzadszymi przyczynami nadciśnienia wtórnego mogą być: pierwotny nadmiar aldosteronu (pierwotny hiperaldosteronizm), kortyzolu oraz guz chromochłonny rdzenia nadnerczy (pheochromocytoma), produkujący w dużych ilościach katecholaminy. Kolejne przyczyny nadciśnienia tętniczego leżą u podłoża zaburzeń hormonalnych, przede wszystkim zaburzeń funkcji nadnerczy (guz chromochłonny, zespół Cushinga, zespół Conna, zespół nadnerczowo-płciowy) oraz innych gruczołów wydzielania wewnętrznego. Nadciśnienie mogą wywołać również leki, m.in. doustne środki antykoncepcyjne, niesteroidowe leki przeciwzapalne i glikokortykosteroidy.

Nie-genetyczne nadciśnienie tętnicze doprowadziło do rozwoju bardzo użytecznych modeli doświadczalnych, umożliwiających badanie wpływu indukowanego nadciśnienia na zmiany narządowe u różnych gatunków zwierząt.

1.4.1.1. Nadciśnienie indukowane chirurgicznie

Dzięki pionierskim pracom Goldblatta i wsp. [42] w 1934 roku na rynek wprowadzono pierwszy zwierzęcy model nadciśnienia tętniczego, wywołany u psów. Otrzymano go przez jednostronne zwężenie tętnicy nerkowej i nazwano modelem wysokooporowego nadciśnienia 2K1C [44]. W krótkim czasie model ten zastosowano u szczurów [45], królików [46], świń [47], małp [48] i myszy [44]. W kolejnych latach stworzono model, w którym dokonano nefrektomii nerki przeciwnej do tętnicy nerkowej, na której umieszczono klip, co pogłębiło konsekwencje zwężenia tętnicy nerkowej. Model z jedną nerką i klipsem na tętnicy nerkowej nazwano modelem nadciśnienia zależnego od objętości 1K1C [12]. Obydwa modele, zarówno model 2K1C jak i 1K1C [49] wykazały wrażliwość na dietę wysokosodową, ograniczenie sodu osłabiało rozwój nadciśnienia

tętniczego u młodych szczurów. Ciśnienie skurczowe krwi było również wysokie w modelu 2K1C, jak i w modelu 1K1C. W odniesieniu do zmian narządowych w modelu 1K1C szczury miały przerośniętą lewą komorę i prawidłową aktywność reninową osocza (PRA), podczas gdy w modelu 2K1C PRA była podwyższona, a morfologia lewej komory w normie. W obu przypadkach stwierdzono zaburzenie laminarnego przepływu krwi, a także dysfunkcję śródbłonna, do którego przyczyniała się aktywacja oksydoreduktaz, m.in. NAD(P)H-oksydazy oraz zmiany w dostępności tlenu azotu i tym samym nasilanie stresu oksydacyjnego.

Nadciśnienie nerkowe można również uzyskać w wyniku koarktacji aorty [50]. Wówczas klip na aorcie umieszcza się powyżej tętnic nerkowych, co powoduje zmniejszony dopływ krwi do nerek. To uruchamia szereg reakcji kompensacyjnych, m.in. pobudzenie układu renina-angiotensyna-aldosteron oraz układu współczulnego, czego efektem jest podwyższenie ciśnienia krwi.

W 1939 r. Page [51] opracował model nadciśnienia tętniczego uzyskany przez owijanie nerki w celofan lub jedwab. Prowadziło to do śródmiąższowego zapalenia nerki i zmniejszenia jej masy. Model ten zastosowano u psów, kotów, królików i małp. W modelu odnotowano zwiększoną aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) i endoteliny.

W modelach zwierzęcych, podobnie jak u ludzi, zaobserwowano, że w niektórych przypadkach nadciśnienie rozwija się jako powikłanie po przebytych ciężkim kłębuszkowym zapaleniu nerek lub śródmiąższowym zapaleniu nerek [52]. Najczęściej nosi wówczas znamiona złośliwego nadciśnienia tętniczego i jest odporne na dostępne leczenie.

1.4.1.2. Nadciśnienie uwarunkowane endokrynologicznie, metabolicznie, indukowane dietą

Najpopularniejszą endokrynologiczną metodę wywoływania nadciśnienia wprowadzono ponad 60 lat temu, polega ona na indukcji nadciśnienia przy pomocy mineralokortykoidów [53], szczególnie deoksykortykosteronu (DOCA). U szczurów i psów model nadciśnienia indukowanego deoksykortykosteronem wymaga dodatkowo usunięcia nerki i diety bogatosodowej. Obok rozwijającego się nadciśnienia tętniczego dochodzi do

charakterystycznych zmian: przerostu serca, zwiększonej objętości i pojemności minutowej, dysfunkcji śródbłonna, stwardnienia kłębuszków nerkowych oraz białkomoczu [54].

W wyniku podawania glikokortykosteroidów, np. deksametazonu również można wywołać nadciśnienie tętnicze. Metodę tę stosuje się z powodzeniem u szczurów i myszy [55] [56]. Do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi dochodzi w dużej mierze poprzez aktywację mechanizmów wolnorodnikowych.

Do wywoływania nadciśnienia tętniczego stosowane są także przewlekłe infuzje składników układu renina-angiotensyna. W 1965 r. McCubbin i wsp. wykazali [57], że wlewy angiotensyny II skutkują powolnym i stopniowym wzrostem ciśnienia tętniczego. W doświadczeniu tym stwierdzono oprócz narastającego nadciśnienia tętniczego, remodeling tętniczki doprowadzającej i naczyń kłębuszka nerkowego, a także zwiększony poziom stresu oksydacyjnego.

Wrodzona wrażliwość na sól ma istotny wpływ na rozwój nadciśnienia tętniczego, stąd różne interwencje dietetyczne mogą posłużyć do indukcji nadciśnienia, szczególnie jeżeli dieta bogatosodowa połączona jest z odpowiednimi predyspozycjami genetycznymi. Dahl i wsp. [58] wyizolowali szczepy szczurów sodowrażliwych, charakteryzujące się wysokim ciśnieniem krwi i niskim tętnem. U szczurów tych nawet podczas diety o stosunkowo niskiej zawartości sodu (0,5% NaCl) występuje wzrost objętości osocza, zwiększona retencja sodu i wody, zwiększona aktywność współczulnego układu nerwowego oraz zmiany w mięszu nerek. Wysoko-sodowa i wysoko-cholesterolowa dieta u szczurów szczepu Dahl pogłębia uszkodzenie kłębuszków nerkowych.

Nadciśnienie indukowane dietą można także osiągnąć stosując żywienie wysoko-fruktozowe. Prowadzi ono do nadciśnienia współistniejącego z insulinoopornością, szczególnie u szczurów szczepów Sprague-Dawley oraz Wistar – Kyoto [43]. Prawdopodobnie przyczynia się do tego down-regulacja receptorów insuliny i up-regulacja receptorów angiotensynowych typu 1 (AT₁). Oprócz tego dieta wysoko-fruktozowa wywołuje u szczurów hipertrójglicydemię i stłuszczenie wątroby.

1.4.2. Modele genetyczne

Zsekwencjonowanie ludzkiego i mysiego genomu pozwoliło na stworzenie modeli transgenicznych oraz modeli z genami, które prawdopodobnie predysponują do rozwoju nadciśnienia i charakterystycznych jego powikłań.

Wyróżniamy dwie kategorie modeli genetycznych, modele oparte o fenotyp oraz oparte o genotyp. Fenotypowe Modele Genetyczne wykorzystują naturalne zróżnicowanie wśród szczepów wsobnych i ich krzyżówek. Używa się ich do badania poligenowości schorzenia i ustalenia, które geny odpowiadają za rozwój nadciśnienia [59]. Natomiast Genotypowe Modele Genetyczne bazują na zmianach zachodzących w obrębie określonego genu. Dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwa jest izolacja konkretnego genu i doprowadzenie do jego nadekspresji bądź ablacji.

1.4.2.1. Fenotypowe Modele Genetyczne

Szczurzy Fenotypowy Model Genetyczny jest najczęściej wykorzystywanym modelem w badaniach nadciśnienia i ma szczególne znaczenie w badaniach nad poligenowym podłożem tego schorzenia.

Rozwój homozygotycznych szczepów szczurów z nadciśnieniem tętniczym osiąga się poprzez krycie rodzeństwa. W ten sposób otrzymuje się selektywną hodowlę zwierząt wykazujących żądany fenotyp. Szczury krzyżowane w pokrewieństwie to laboratoryjne szczury nazwane szczepem Wistar. Szczep Wistar posłużył do opracowania kolejnych modeli: modelu SHR (*ang. Spontaneously Hypertensive Rats*) i SHRSP (*ang. Stroke Prone Rats*). Modele te używane są do badań nadciśnienia i chorób układu krążenia, chorób metabolicznych, zaburzeń nerek, oporności na insulinę, hipertrójglicydemii, hiperinsulinemii, hipercholesterolemii, udarów mózgu, nefropatii oraz osteoporozy [60].

Inne ważne modele uzyskiwane podobnymi technikami to modele sodowrażliwych szczurów Dahl i Sabra. Badania przeprowadzone na szczurach Dahl umożliwiły identyfikację licznych loci, zlokalizowanych na chromosomach 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 13 i 17. Prawdopodobnie zawierają one geny odpowiedzialne za wrażliwość na sód. Niestety nie udało się określić, które z tych loci są ściśle związane z opornością na dietę wysoko-sodową, ponieważ u szczurów Dahl nawet przy ograniczonej podaży soli z wiekiem rozwija się samoistne

nadciśnienie tętnicze. W innych modelach eksperymentalnych potencjalne geny odpowiedzialne za sodowrażliwość były umiejscowione na wielu odmiennych loci, co sugeruje dużą heterogenność cechy. Kolejnym modelem nadciśnienia związanego z sodowrażliwością stały się szczury Sabra [61]. W tym modelu genetycznie uwarunkowane nadciśnienie tętnicze ujawnia się wyłącznie w warunkach obciążenia sodem, zaś przy ograniczeniu podaży sodu nie zostaje wywołane.

Wiele modeli zwierzęcych bardzo dobrze naśladuje ludzką postać nadciśnienia. Szczególnie istotne z medycznego punktu widzenia są modele ze współistniejącymi schorzeniami, na przykład cukrzycą typu II. Poprzez wielopokoleniowe kojarzenie wsobne otrzymano szczepy Sprague-Dawley [62], Zucker i Wistar-fatty [63], u których występuje skłonność do otyłości, a także cukrzycy typu II.

W większości Fenotypowych Modeli Genetycznych nadciśnienie wiąże się z poważnymi zmianami narządowymi, przerostem mięśnia sercowego, dysfunkcją śródbłonna oraz zaburzeniami w funkcjonowaniu wątroby i nerek. Często obserwowany jest białkomocz i spadek klirensu kreatyniny. Wyniki zależą od użytego szczepu szczurów, podłoża genetycznego, a nawet różnic wewnątrzgatunkowych. Przypuszcza się np., że szczury Dahl są bardziej podatne na ciężką niewydolność serca i niewydolność nerek niż szczury SHR, które z kolei mogą rozwinąć wyższe wartości ciśnienia krwi. Należy też pamiętać, że w modelach zwierzęcych, w odróżnieniu od pacjentów z nadciśnieniem rzadko dochodzi do ciężkich powikłań, takich jak miażdżyca, zawał serca, tętniak, udar mózgu czy schyłkowa niewydolność serca. Wynika to oczywiście z różnic międzygatunkowych, ale i z faktu, iż czas ekspozycji na podwyższone ciśnienie krwi u zwierząt jest znacznie krótszy niż u ludzi i nie towarzyszą mu liczne schorzenia dodatkowe.

1.4.2.2. Genotypowe Modele Genetyczne

Na podstawie badań molekularnych wskazano geny podatności na nadciśnienie. Zidentyfikowano mutacje w kilku genach, wpływających m.in. na krążenie krwi, receptory dla mineralokortykoidów i nerkowe kanały jonowe. Przyjmuje się, że około 40% zmienności nadciśnienia w populacji może być determinowane działaniem produktów określonych genów. Wyodrębniono też kilka rzadko występujących postaci nadciśnienia tętniczego, wywołanych mutacjami pojedynczych genów, co wskazuje, że u podłoża nadciśnienia może

leżeć mutacja w pojedynczym genie. Do najważniejszych, pojawiających się sporadycznie postaci nadciśnienia o zbadanym podłożu monogenowym należą: hiperaldosteronizm (podatny na leczenie glikokortykosteroidami), zespół Liddle'a (zespół pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów), zespół Gordona oraz nadciśnienie z brachydaktylią.

Badania inżynierii genetycznej i stworzenie Genotypowych Modeli Genetycznych przyczyniły się do lepszego zrozumienia genetycznego podłoża nadciśnienia. Poznanie struktury genów kontrolujących peptydy i receptory związane z regulacją ciśnienia krwi, pomogły wyjaśnić rolę specyficznych mechanizmów biorących udział w patogenezie tego schorzenia. Techniki inżynierii genetycznej były wypróbowane na kilku gatunkach, spośród których najbardziej odpowiednie okazały się myszy i stały się powszechnie używane przez naukowców [64].

W wyniku bezpośredniej ingerencji w strukturę genomu uzyskano dwa modele zwierzęce, model transgeniczny i model knock-out. Model transgeniczny (z nadekspresją genu) to model obrazujący wpływ nadmiernego wytwarzania reniny. Powstał poprzez wprowadzenie do genomu szczura genu Ren-2 myszy, odpowiedzialnego za syntezę reniny. W modelu knock-out wyeliminowano ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę substancji wazoaktywnych.

U transgenicznych szczurów z Ren-2 wykazano występowanie złośliwego nadciśnienia tętniczego oraz zwiększenie ekspresji reniny. Duże stężenie angiotensyny II odnotowano w sercu, nadnerczach i miocytach naczyńowych, pomimo niskiego stężenia angiotensyny II w surowicy krwi [65]. Wyniki tych badań podkreślają znaczącą rolę tkankowych układów RAAS w powstawaniu nadciśnienia tętniczego.

Delecja genu kodującego angiotensynogen u zwierząt manifestuje się spadkiem systemowego ciśnienia tętniczego, dużą śmiertelnością pourodzeniową oraz zmianami naczyniowymi nerek u zwierząt dożywających wieku dorosłego. Myszy pozbawione genu dla ACE-1 wykazują niskie ciśnienie tętnicze, upośledzenie zagęszczania moczu, zanik rdzenia i brodawek nerkowych, zgrubienie naczyń nerkowych i poszerzenie kielichów nerkowych. Zwierzęta pozbawione genu dla ACE-2 charakteryzują się normalną budową nerek, chociaż stwierdza się pogrubienie ścian naczyń nerkowych [66]. Zarówno delecji genu ACE-1 jak i ACE-2 towarzyszy wzrost kaliemii. Delecja genu kodującego receptor AT₁ przyczynia się do niskiego ciśnienia tętniczego i wysokiej aktywności reninowej osocza. Podanie angiotensyny II takim zwierzętom nie powoduje spodziewanego wzrostu ciśnienia tętniczego.

Wyniki badań genetycznych odnoszących się do delecji lub nadekspresji genów kodujących poszczególne ogniwa układu renina-angiotensyna-aldosteron potwierdzają istotną

rolę tego układu w regulacji ciśnienia tętniczego i gospodarce wodnoelektrolitowej oraz kwasowo-zasadowej.

1.4.3. Leki hipotensyjne w poszczególnych modelach nadciśnienia

W oparciu o liczne prace można wnioskować, że model szczura ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym SHR, jak dotąd jest najczęściej używanym modelem zwierzęcym. Pozostałe sznurze modele są rzadziej stosowane, chociaż jak wykazały badania [50], występują istotne różnice pomiędzy poszczególnymi modelami i przygotowując eksperyment warto wziąć pod rozwagę możliwości jakie oferują poszczególne z nich. W każdym z modeli zakwalifikowanych do porównania (tab. 7) rozwija się nadciśnienie tętnicze i występuje przerost mięśnia sercowego, natomiast znaczące zmiany narządowe, m.in. niewydolność serca, udar mózgu, niewydolność nerek obecne są tylko w niektórych modelach. Istotnym jest fakt, że efekty leków hipotensyjnych w poszczególnych modelach różnią się od siebie (tab. 7). Powszechny jest pogląd, że leki które skutecznie obniżają ciśnienie, zapobiegają również uszkodzeniu narządów. Występują tu jednak pewne rozbieżności, np. hydralazyna, która efektywnie obniża nadciśnienie w modelu SHR, nie przeciwdziała przerostowi mięśnia sercowego. Tak więc lek obniżający ciśnienie krwi nie gwarantuje skutecznej ochrony przed uszkodzeniem narządowym. Pewne niejasności występują również w odniesieniu do β -blokerów. Niektóre badania dowodzą ich niskiej skuteczności, podczas gdy inne potwierdzają efekt hipotensyjny metoprololu i jego działanie na zmniejszenie masy serca. Sugeruje się także, że inhibitory ACE wykazują dużo mniejszą skuteczność w modelach Dahl i DOCA w przeciwieństwie do modeli SHR, 2K1C, TGR(mRen2)27. Natomiast antagoniści endoteliny wykazują pozytywny efekt w modelach SHR, 2K1C, TGR(mRen2)27 i brak działania w modelach Dahl i DOCA.

Niestety niewystarczająca ilość badań bezpośrednio porównujących wszystkie klasy leków hipotensyjnych w każdym z obecnych modeli, uniemożliwia wykonanie kompletnego zestawienia i utrudnia jednoznaczną interpretację.

Tabela 7. Efekty działania leków hipotensyjnych w modelach zwierzęcych

Modele nadciśnienia	Wpływ na:				
	<i>nadciśnienie</i>	<i>przerost m. sercowego</i>	<i>niewydolność serca</i>	<i>białkomocz</i>	<i>uszkodzenie śródbłonna</i>
SHR	A +	A +	A +	A +	A +
	B -	B +	B +		
	C +	C +	C + ?		C +
	D -	D -	E +/-	E +	D -?
	E -				
	F +	F -		F -	F -
DOCA	A -	A -	A -		A -
	B -				
	C +	C +		C +	
	D +	D +			
	E +	E +			
	F +	F -			
2K1C	A +	A +			
	B -	B -			
	C +	C +			
	D - ?				
	E -				
	F +	F -			
TGR(mRen2)27¹	A +	A +			A +
	B -	B -			B -
	C -	C -			
	F -	F -			F -
Dahl	A +	A +		A +/-	
	B +/-			B -	
	C -	C -		C -	
	D +	D -		D -	D +
	E +?			E -	
	F +				F +

¹⁾ Transgeniczny szczur z nadekspresją genu Ren2 pochodzącego od myszy

„+” efekt ochronny, „-” brak efektu

A = inhibitory ACE/RAAS,

B = β-blokery,

C = antagoniści wapnia,

D = diuretyki,

E = antagoniści endoteliny,

F = leki rozszerzające tętniczki o działaniu bezpośrednim

Zwierzęce modele nadciśnienia tętniczego, ze względu na ich mnogość i zróżnicowane, dają wiele możliwości badaczom pod kątem swojej specyfiki prac naukowych. Niemniej jednak nie należy zapominać o rozważnym podejściu do wyników badań przeprowadzanych na zwierzętach, ponieważ nie mają one jednoznacznego przełożenia na organizm ludzki. Ponadto niejednokrotnie wybór modelu zwierzęcego istotnie rzutuje na uzyskiwane efekty, szczególnie przy badaniach chorób wieloczynnikowych o poligenicznym charakterze.

1.5. Podsumowanie

Obszerność zgromadzonej dotychczas wiedzy na temat prawdopodobnych przyczyn rozwoju nadciśnienia tętniczego, nie znajduje odzwierciedlenia w liczbie możliwości jego skutecznej farmakoterapii, szczególnie w obszarze zapobiegania zmianom naczyniowo-narządowym, a po ich zaistnieniu, w możliwościach przywracania zaburzonych funkcji. Brak odpowiedniego postępowania terapeutycznego w tym zakresie, powoduje nieustanne poszukiwania nowych selektywnych struktur chemicznych o potencjalnie wyższej skuteczności terapeutycznej.

Pewne nadzieje na przyszłość pokładane są w nowoczesnych narzędziach diagnostycznych z dziedziny biologii molekularnej. Od kilku lat dzięki metodom tak zwanego wysoce przepustowego genotypowania (*ang. high-throughput genotyping*), poznaje się zmienności całego genomu w kształtowaniu podatności na różne choroby m.in. nadciśnienie tętniczego i predyspozycje do powstawania powikłań narządowych [205,206]. Aktualnie trwają próby zgłębienia dziedzicznych mechanizmów warunkujących skuteczność i bezpieczeństwo terapii hipotensyjnej. Sukces tego typu badań dałby szansę na adekwatny wybór leku dla chorego, który zapewniłby osiągnięcie maksymalnego efektu terapeutycznego przy braku działań ubocznych. To innowacyjna część badań związana z najnowszymi technikami molekularnymi, która w pewnym stopniu mogłaby zastąpić obarczone dużymi ograniczeniami modele zwierzęce nadciśnienia tętniczego.

II. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności hipotensyjnej i właściwości plejotropowych związków po podawaniu przewlekłym w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego. Badaniami objęto siedem związków, wykazujących aktywność α_1 -adrenolityczną, należących do dwóch odrębnych pod względem struktury chemicznej grup:

✓ Grupa I:

MH-2	}	pochodne ksantonu
MH-3		
MH-99		

✓ Grupa II:

EP-46	}	pochodne pirolidyn-2-onu
EP-47		
EP-49		
EP-58		

Zasadniczy przedmiot rozprawy doktorskiej, wymagał walidacji kilku wybranych modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego, a mianowicie **modelu DEX**, **modelu DOCA**, **modelu FRU**, **modelu L-NAME**, dla wyselekcjonowania tego, który najpełniej pozwoliłby określić plejotropowe cechy badanych związków.

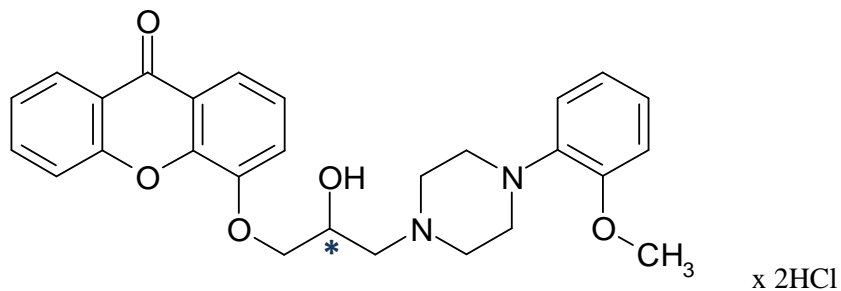
Dla oceny właściwości analizowanych związków oraz związku referencyjnego – **prazosyny**, podawanych przewlekłe po indukcji nadciśnienia tętniczego wg wybranego modelu, oznaczono ich wpływ na:

- ✓ ciśnienie tętnicze
- ✓ funkcje rozkurczowe aorty
- ✓ profil lipidowy
- ✓ profil węglowodanowy
- ✓ parametry stresu oksydacyjnego
- ✓ stężenie azotanów(III) oraz azotanów(V)
- ✓ poziom wybranych biomarkerów krążeniowych (ADMA, VEGF)
- ✓ wewnętrzną transdukcję sygnału w komórkach z ekspresją ludzkich receptorów α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} -adrenergicznych

III. WZORY, NAZWY CHEMICZNE I SYMBOLE BADANYCH ZWIĄZKÓW

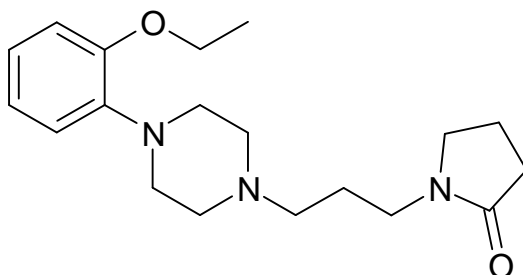
1. MH-99 (R,S); MH-2 (R-(+)); MH-3 (S-(-)):

Dichlorowodorek 4-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyno]-2-hydroksypropoksy}ksantonu



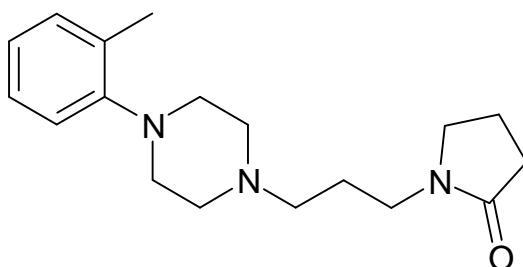
2. EP-46:

1-(3-(4-(2-etoksyfenylo)piperazyn-1-ylo)propylo)pirolidyn-2-on



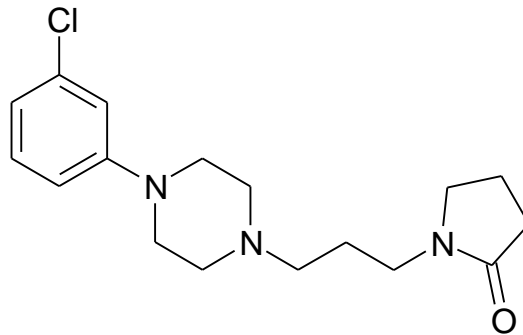
3. EP-47:

1-(3-(4-(o-tolilo)piperazyn-1-ylo)propylo)pirolidyn-2-on



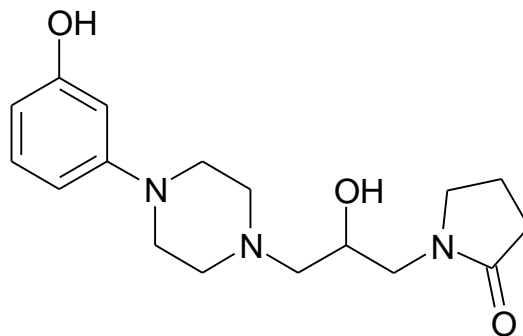
4. EP-49:

1-(3-(4-(3-chlorofenylo)piperazyn-1-ylo)propylo)pirolidyn-2-on



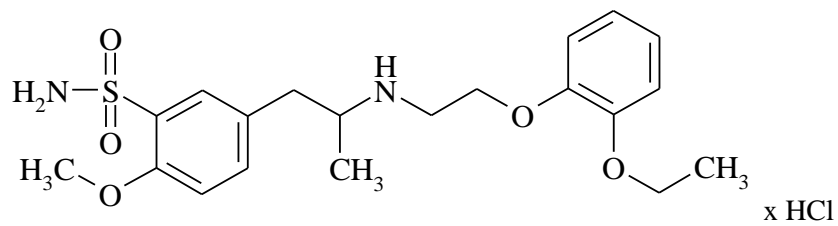
5. EP-58:

1-(3-(4-(3-hydroksyfenylo)piperazyn-1-ylo)2-hydroksypropylo)pirolidyn-2-on



6. Prazosyna:

Chlorowodorek 1-(4-amino-6,7-dimetoksy-2-hinazolinylo)-4-(2-furanylokarbonylo)-piperazyny



IV. MATERIAŁY I ODCZYNNIKI

4.1. Badane związki

Obiektem badań jest siedem związków o właściwościach α_1 -adrenolitycznych, należących do dwóch odrębnych grup pod względem budowy chemicznej, a mianowicie **pochodnych ksantonu** oraz **pochodnych pirolidyn-2-onu**. Syntezę pochodnych ksantonu przeprowadzono w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Marony. Pochodne pirolidyn-2-onu zostały zsyntetyzowane przez dr hab. Katarzynę Kulig, prof. UJ w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Malawskiej. Wzory, nazwy chemiczne oraz symbole badanych struktur przedstawiono w rozdziale III.

4.2. Związki odniesienia

Jako związek referencyjny użyto dostępnej komercyjnie **prazosyny**, która jest prototypem selektywnych leków α_1 -adrenolitycznych. Wzór oraz nazwę chemiczną związku przedstawiono w rozdziale III.

4.3. Stosowane leki i odczynniki

- ✓ 1,1',3,3'-tetraoksypropan (Sigma-Aldrich)
- ✓ [^3H]-CGP-12177 (aktywność specyficzna 30 Ci/mmol, Perkin-Elmer)
- ✓ [^3H]-Klonidyna (aktywność specyficzna 70.5 Ci/mmol, Perkin-Elmer)
- ✓ [^3H]-Prazosyna (aktywność specyficzna 85 Ci/mmol, Perkin-Elmer)
- ✓ Adrenalina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Bufor fosforanowy (P.O.Ch.)
- ✓ Bufor octanowy (P.O.Ch.)
- ✓ Butylowany hydroksytoluen (Sigma-Aldrich)

- ✓ CDNB (Sigma-Aldrich)
- ✓ Chlorek magnezu (Magnesii chloridum – P.O.Ch.)
- ✓ Chlorek potasu (Kalii chloridum – P.O.Ch.)
- ✓ Chlorek sodu (Natrii chloridum – P.O.Ch.)
- ✓ Chlorek wapnia (Calcii chloridum – P.O.Ch.)
- ✓ Chlorek żelaza (II) (P.O.Ch.)
- ✓ Deksametazon (Dexaven – Polfa S.A.)
- ✓ Diwodorofosforan sodu (P.O.Ch.)
- ✓ DMEM z GlutaMAX (Invitrogen)
- ✓ DMSO (dimetylosulfotlenek – Sigma-Aldrich)
- ✓ Doksazosyna (Doxazosin mesylate - Sigma-Aldrich)
- ✓ Dwutlenek węgla (CO₂ 100%, Linde Gaz Polska)
- ✓ Dwuwodorofosforan potasu (P.O.Ch.)
- ✓ EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid – Sigma-Aldrich)
- ✓ FBS (Fetal bovine serum dialized – Invitrogen)
- ✓ Fentolamina (Phentolamine hydrochloride – Sigma-Aldrich)
- ✓ Fenylefryna (Phenylephrine – Sigma-Aldrich)
- ✓ Fruktaza (P.O.Ch.)
- ✓ Glukoza bezwodna (D-(+)-Glukoza bezwodna – P.O.Ch.)
- ✓ Glutation zredukowany (Sigma-Aldrich)
- ✓ Heparyna (Heparin sodium inj. 25000 j.m./ml – Polfa S.A.)
- ✓ HEPES 1M, pH = 7.3 (Invitrogen)
- ✓ Karbogen (95% O₂ i 5% CO₂ – Linde Gaz Polska)
- ✓ Kolenterazyna (Colenterazine – Sigma-Aldrich)
- ✓ Komercyjne zestawy odczynnikowe (BioMaxima): cholesterol całkowity, HDL, LDL ,
Trójglicerydy, Glukoza
- ✓ Komercyjne zestawy odczynnikowe (MyBioSource): ADMA, VEGF
- ✓ Kwas askorbinowy (L-ascorbic acid – Sigma-Aldrich)
- ✓ Kwas chlorowodorowy (P.O.Ch.)
- ✓ Kwas octowy (P.O.Ch.)
- ✓ Kwas solny (P.O.Ch.)
- ✓ Kwas tiobarbiturowy (P.O.Ch.)
- ✓ Kwas trichlorooctowy (P.O.Ch.)
- ✓ L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride – Sigma-Aldrich)

- ✓ NADPH (Sigma-Aldrich)
- ✓ Nadtlenek wodoru (Chempur)
- ✓ NEAA (Non-essential amino acids – Invitrogen)
- ✓ Octan deoksykortykosteronu (Sigma-Aldrich)
- ✓ Odczynnik do oznaczenia zawartości cholesterolu (BioMaxima)
- ✓ Odczynnik Folin-Ciocalteu'a (P.O.Ch.)
- ✓ Odczynnik R1 – bufor (Biolabo)
- ✓ Odczynnik R2 – enzymy (Biolabo)
- ✓ Penicillin/Streptomycin (Antybiotyki – Invitrogen)
- ✓ Pirogronian sodu (Sigma-Aldrich)
- ✓ Płyn scyntylicyjny Ultima Gold MV (Perkin-Elmer)
- ✓ Prazosyna (Prazosin hydrochloride – Sigma-Aldrich)
- ✓ Reduktaza glutationowa (Sigma-Aldrich)
- ✓ Siarczan magnezu (Magnezu siarczan bezwodny – P.O.Ch.)
- ✓ Siarczan miedzi (II) (P.O.Ch.)
- ✓ Tamsulozyna (Tamsulosin hydrochloride – Sigma-Aldrich)
- ✓ Terazosyna (Terazosin hydrochloride – Sigma-Aldrich)
- ✓ Tiopental (Thiopentalum natricum – Sandoz GmgH)
- ✓ TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane – Sigma-Aldrich)
- ✓ Tween 80 (Serva)
- ✓ Węglan sodu (Natrii carbonas – P.O.Ch.)
- ✓ Winian sodowo-potasowy (P.O.Ch.)
- ✓ Woda do iniekcji (Aqua pro injectione inj. 10 ml - Polpharma)
- ✓ Wodorofosforan disodu (P.O.Ch.)
- ✓ Wodorotlenek sodu (P.O.Ch.)
- ✓ Wodorowęglan sodu (Natrii hydrocarbonas – P.O.Ch.)

4.4. Zwierzęta

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar (samce), pochodzących ze Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Początkowa masa ciała szczurów wynosiła 180 ± 20 g. Pomieszczenia, w których znajdowały się szczury, miały stałą temperaturę $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Były to pomieszczenia bez dostępu światła dziennego, o automatycznie zmieniającym się cyklu dzień/noc (co 12 godzin, 100-250 luksów), o wilgotności względnej 65-75%, klimatyzowane.

Wszystkie procedury na zwierzętach zostały wykonane zgodnie z protokołem eksperymentu i obowiązującymi rekomendacjami o traktowaniu zwierząt laboratoryjnych na podstawie Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Na przeprowadzenie eksperymentu uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (**zgoda nr 147/2013**).

4.5. Materiał biologiczny

- ✓ Komórki: ADRA1A CHO-K1 DA Perkin Elmer®
- ✓ Komórki: Human Adrenergic α_{1B} Receptor AequeoScreen Frozen Cells Perkin Elmer®
- ✓ Komórki: Human Adrenergic α_{1D} Receptor AequeoScreen Frozen Cells Perkin Elmer®

4.6. Aparatura

- ✓ Aparat do nieinwazyjnego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi u małych zwierząt LE5007 Automatic Blood Pressure Computer (Panlab S.L. Harvard Apparatus)
- ✓ Automatyczna cieplarka i skaner LE 5650/6 (Panlab S.L. Harvard Apparatus)
- ✓ Cieplarka CL-65 (Elcon)
- ✓ Cieplarka Thermoblock TB-941T (JW Electronic)
- ✓ Czytnik mikropłytek ELISA RT2100c (Rayto)
- ✓ Czytnik multidentyfikacyjny FLUOstar OPTIMA S/N 413-3805 (BMG Labtech)
- ✓ Filtry GF/C (Perkin-Elmer)
- ✓ Homogenizator ULTRA TURRAX T25 basic (IKA Labortechnik)
- ✓ Inkubator Smart Cell HF90 (Heal Force)

- ✓ Komora z laminarnym nawiewem powietrza HERASAFE KS 12 (Thermo Scientific)
- ✓ Łaźnia wodna ET basic (YellowLine)
- ✓ Miniwirówka MCF-2360 (Omnilab)
- ✓ Myjka ultradźwiękowa Sonic-3 (Polsonic)
- ✓ Oprogramowanie komputerowe GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.)
- ✓ Płytki inkubacyjne 384-dołkowe z czarnymi ściankami i przezroczystym dnem (Millipore Sp. Z O. O.)
- ✓ Płytki inkubacyjne MAFCNOB 10 (Millipore Sp. Z O. O.)
- ✓ Probówki okrągłodenne z korkiem 7 ml (Equimed)
- ✓ Probówki reakcyjne z korkiem gumowym (Equimed)
- ✓ Vortex Lab Dancer Vario (Yellowline)
- ✓ Wirówka MPW-260R Centrifuge (MPW Med. Instruments)
- ✓ Wirówka MPW-340 Centrifuge (MPW Med. Instruments)
- ✓ Wirówka MPW-375 (MPW Med. Instruments)
- ✓ Zacisk tętnicy wieńcowej (Harvard Apparatus)
- ✓ Zestaw do badania narządów izolowanych DMT Tissue Organ Bath System – 750 TOBS

4.7. Obliczenia statystyczne

Wyniki przedstawiono jako średnie pomiarów \pm błąd standardowy średniej (\pm SEM). Przy porównaniu wartości średnich dla dwóch różnych grup stosowano test t-Studenta, natomiast przy porównaniu kilku różnych grup badanych oraz wartości średnich, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, poszerzoną o procedurę porównań wielokrotnych według testu Dunnett'a. Różnicę średnich uznawano za znamiennej statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Do opracowania wyników wykorzystano program komputerowy GraphPad Prism 5.0.

Wpływ wyidukowanego nadciśnienia tętniczego na śródbłonek aorty oceniono przy użyciu programu komputerowego LabChart 7 Pro.

V. METODYKA

5.1. Walidacja modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego

5.1.1. Indukcja nadciśnienia tętniczego w zwierzęcych modelach doświadczalnych

Szczury podzielono losowo na 8 grup, po 6 osobników w każdej z nich. Grupy oznaczono kolejno numerami rzymskimi I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII. Szczury w grupach I, III, V, VII zostały zakwalifikowane jako kontrola zgodnie z protokołem badawczym: grupa I - kontrola dla modelu z deksametazonem, grupa III – kontrola dla modelu z octanem deoksykortykosteronu, grupa V – kontrola dla modelu fruktozowego, grupa VII – kontrola dla modelu L-NAME. Szczury w grupach oznaczonych numerami II, IV, VI, VIII miały indukowane nadciśnienie tętnicze, przy zastosowaniu odpowiednio: w grupie II – deksametazonu (model DEX), w grupie IV – octanu deoksykortykosteronu i roztworu NaCl (model DOCA), w grupie VI – diety wysokofruktozowej (model FRU), w grupie VIII – estru metylowego N ω -Nitro-L-argininy (L-NAME).

W każdej z grup prowadzono pomiary ciśnienia za pomocą aparatu do nieinwazyjnego pomiaru ciśnienia krwi u gryzoni - LE 5007 Panlab Harvard Apparatus. W tym celu przez okres 7 dni oswajano szczury z dotykiem ludzkiej ręki i przyzwyczajano je do tub pomiarowych. Pomiar ciśnienia odbywał się zgodnie z metodą NIBP (*ang. Non-Invasive Blood Pressure*), opierającą się na technice mankietowej stosowanej do pomiaru ciśnienia tętniczego krwi u ludzi. Aparat LE 5007 wyposażony jest w mankiety do zamykania przepływu krwi oraz czujnik pulsu umożliwiający śledzenie tętna. Pomiar ciśnienia tętniczego wykonywano w oparciu o pomiar pulsu na tętnicy ogonowej szczurów, które umieszczone były w specjalnych tubach pomiarowych. Wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi były wizualizowane w czasie rzeczywistym na cyfrowym wyświetlaczu jednostki rejestrującej.

Pomiar ciśnienia przeprowadzano między godziną 10:00 a 13:00. Dla każdego z osobników na jedną sesję pomiarową przypadła 5-krotny odczyt ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi, na podstawie którego wyliczano średnią arytmetyczną. W razie trudności z odczytem, np. brak zapisu ciśnienia rozkurczowego lub wartość ciśnienia skurczowego przekraczająca 200 mmHg pomiar odrzucano i powtarzano. W trosce

o dobrostan zwierząt maksymalna dozwolona liczba powtórzeń wynosiła 3 powtórzenia. Szczury na zakończenie każdej sesji pomiarowej były ważone, w celu kontroli masy ciała.

5.1.1.1. Model DEX

Szczury w grupie nr I i II otrzymywały w dowolnych ilościach standardową paszę granulowaną dla małych zwierząt laboratoryjnych oraz wodę do picia ze skalowanych poidełek, które znajdowały się na wieku klatek.

Zwierzęta w grupie nr I otrzymywały podskórnie 0,9% roztwór NaCl w objętości 1 ml/ kg m.c. Zwierzęta w grupie nr II otrzymywały podskórnie roztwór deksametazonu w soli fizjologicznej w dawce 10 µg/kg m.c. codziennie przez okres 14 dni. Iniekcje odbywały się pomiędzy godziną 13:00 a 14:00 [67,68].

5.1.1.2. Model DOCA

Szczury w grupie nr III i IV miały nieograniczony dostęp do standardowej paszy granulowanej dla małych zwierząt laboratoryjnych. Szczury w grupie nr III do picia otrzymywały wodę, natomiast szczury w grupie nr IV 1% roztwór NaCl w dowolnych ilościach.

Zwierzęta w grupie nr III otrzymywały podskórnie oliwę z oliwek w objętości 1 ml/kg m.c. Zwierzęta w grupie nr IV otrzymywały podskórnie octan deoksykortykosteronu, zawieszony w oliwie z oliwek w dawce 50 mg/kg m.c., 2 razy w tygodniu przez okres 6 tygodni. Iniekcje odbywały się pomiędzy godziną 13:00 a 14:00 [69,70].

5.1.1.3. Model FRU

Szczury w grupie nr V i VI miały nieograniczony dostęp do standardowej paszy granulowanej dla małych zwierząt laboratoryjnych. Szczury w grupie nr V do picia otrzymywały wodę, natomiast szczury w grupie nr VI 10% roztwór fruktozy w dowolnych ilościach przez okres 8 tygodni. W obydwu grupach prowadzono pomiar ilości spożytej karmy oraz kontrolę objętości wypitego płynu (tab. 8) [71] [72].

Tabela 8. Kontrola spożycia karmy, wody oraz 10% roztworu fruktozy przez szczury modelu fruktozowego (Model FRU)

Dzień eksperymentu	Szczury normotensyjne Grupa V				Szczury hipertensyjne Grupa VI			
	Karma [g]		Woda [ml]		Karma [g]		Roztwór fruktozy [ml]	
	Masa	Różnica	Objętość	Różnica	Masa	Różnica	Objętość	Różnica
1	400		500		400		500	
2		230	325	175		210	140	360
3	170		500	190	190		600	400
6	400	300	310	585	400	400	200	980
9	100		700		0		1200	
11	500	360	115	650	600	465	220	1050
13	140		800	430	135	317	1200	750
15	400	263	150	445	500	295	150	730
17	137		600	380	183	325	900	870
20	500	232	170	450	500	350	150	710
22	268		600	330	205	390	30	800
25	500	322	150	510	500	544	1000	1000
27	205	295	220	390	175	380	290	745
29	700	360	800	280	800	383	1300	690
32	340	200	290	640	290	578	200	1200
36	500	383	600	780	500	790	1000	1510
39	300	200	270	615	110	560	290	1000
41	700	383	800	405	800	400	1300	790
45	317		210	930	256	805	100	1450
49	500	175	600	910	500	750	310	1600
53	325		210	890	120	780	255	1525
56	500	187	600	730	500	807	1000	1510
	290	298	160		100		210	
	800	505	1200	780	1000		1800	
	295	330	420	615	210		290	
	700	210	800	405	800		1300	
	370	298	185	405	240		300	
	500	210	600	405	500		1000	
	290	210	195	405	100		210	
	800	460	1500	930	1000		1800	
	340	460	570	930	195		350	
	800	395	1200	910	1000		1800	
	405	395	290	910	250		200	
	800	375	1200	890	1000		1800	
	425	375	310	890	220		275	
	700	300	800	730	1000		1800	
	400	300	70	730	193		290	

5.1.1.4. Model L-NAME

Szczury w grupie nr VII i VIII miały nieograniczony dostęp do standardowej paszy granulowanej dla małych zwierząt laboratoryjnych. Szczury w grupie nr VII do picia otrzymywały wodę.

Szczury w grupie nr VIII do picia otrzymywały roztwór L-NAME w dawce 40 mg/kg m.c./dzień przez okres 4 tygodni [73,74,75]. W celu zapewnienia precyzyjnej kontroli ilości przyjmowanego roztworu w stosunku do masy ciała, szczury przez okres trwania eksperymentu pozostawały w osobnych klatkach z przypisanymi im poidełkami na roztwór L-NAME.

5.1.2. Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na śródbłonek wyizolowanej aorty

W celu zbadania wpływu wywołanego nadciśnienia tętniczego na śródbłonek aorty, pobierano aortę piersiową od szczura znieczulonego tiopentalem (75 mg/kg m.c. i.p.). Aortę oczyszczano z przylegających tkanek, umieszczano w buforze KHB (Kreb's-Henseleit buffer), natlenionym karbogenem (mieszanina 95% O₂ i 5% CO₂) i dzielono na pierścienie o długości 3-5 mm. Bufor KHB to roztwór o składzie (Mm) NaCl: 118, KCl: 4.7, MgSO₄: 1.64, CaCl₂: 2.25, KH₂PO₄: 1.18, NaHCO₃: 24,88, glukoza: 10, C₃H₃O₃Na: 2,2, EDTA: 0,05.

Oznaczenie wykonano na aparaturze przeznaczonej do badań narządów izolowanych DMT Tissue Organ Bath System – 750 TOBS. Pierścienie aorty o długości 3-5 mm umieszczono w termostatowanych naczynkach o objętości 30 ml, wypełnionych natlenionym buforem KHB o temp. 37°C i zawieszono pomiędzy dwoma haczykami, z których jeden przymocowywano do uchwytu w naczynku, a drugi przy użyciu żyłki do transducera z ciągłym zapisem napięcia. Po zamontowaniu pierścieni napięcie spoczynkowe stopniowo zwiększano, aż do osiągnięcia wartości 4 g, a następnie pozostawiano do ustabilizowania przez okres 2 godzin. Preparaty przepłukiwano co 20 minut buforem KHB. Po rozciągnięciu aorty i okresie równoważenia rejestrowano siłę maksymalnego skurczu, w odpowiedzi na 60 mM KCl. Następnie po serii płukań buforem KHB i okresie stabilizacji wywoływano skurcz przy użyciu fenylefryny. Dla wykreślenia kumulacyjnej krzywej dawka - odpowiedź, fenylefrynę podawano w rosnących stężeniach (0,003 – 3 μM) wg metody van Rossum.

Ponownie przepłukiwano preparaty buforem KHB i stabilizowano. Po okresie stabilizacji podano fenylefrynę w bolusie (stężenie 1 μM). Na szczycie skurczu rozpoczęto podawanie acetylocholino w rosnących stężeniach (0,001 – 10 μM) w celu sprawdzenia zdolności rozkurczowych aorty.

Wyniki przeprowadzanych badań rejestrowano przy użyciu programu komputerowego LabChart 7 Pro.

5.1.3. Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na profil lipidowy

5.1.3.1. Cholesterol całkowity

Oznaczenie poziomu cholesterolu całkowitego wykonano w osoczu krwi szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.1.1. Przed pobraniem krwi, zwierzętom podawano heparynę w dawce 200 j.m. w objętości 1 ml/kg m.c. Po upływie 30 minut wyodrębniono tętnicę szyjną wspólną szczura, z której po przecięciu, pobierano krew do naczynek okrągłodennych z korkiem, o objętości 7 ml. Otrzymaną krew odwirowywano w wirówce laboratoryjnej MPW-340 w prędkości 4000 x g przez 10 minut w celu oddzielenia osocza od elementów morfotycznych krwi. Z otrzymanego osocza sporządzono próbę badaną. W tym celu do probówek reakcyjnych dodano 1000 μl gotowego odczynnika do oznaczania zawartości cholesterolu (bufor MES –50 mmol/l o pH = 6,4, esteraza cholesterolu – CHE > 0,4 kU/l, oksydaza cholesterolu – CHO > 0,1 kU/l, peroksydaza – POD > 1,5 kU/l, 4-aminoantypiryna – 4-AA 0,3 mmol/l, fenol – 4 mmol/l, siarczan magnezu – 25 mmol/l, cholan sodu – 3,5 mmol/l, azydek sodu < 13,9 mmol/l), ogrzano go do ok. 25°C, a następnie dodano 10 μl uzyskanego osocza. Próbę wzorcową wykonano analogicznie dodając 10 μl wzorca, natomiast próbę ślepą odczynnikową stanowił sam odczynnik do oznaczania zawartości cholesterolu w objętości 1000 μl . Otrzymane próby przenoszono na płytki inkubacyjne płaskodenne i inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 minut. Po inkubacji dokonano pomiaru absorbancji próby badanej oraz wzorcowej względem próby zawierającej sam odczynnik przy długości fali 492 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek ELISA. Otrzymana intensywność zabarwienia była wprost

proporcjonalna do stężenia cholesterolu całkowitego w badanych próbkach. Stężenie cholesterolu całkowitego obliczono wg wzoru:

$$[\text{ChC}] = \frac{APB}{APW} \times [\text{PW}]$$

Gdzie:

[ChC] – stężenie cholesterolu całkowitego

[PW] – stężenie próbki wzorcowej

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki wzorcowej

5.1.3.2. Frakcja HDL cholesterolu

Oznaczenie poziomu frakcji HDL cholesterolu wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.1.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w poprzednim podrozdziale. Otrzymany w ten sposób materiał poddano właściwemu oznaczeniu zawartości poszczególnych frakcji lipidowych. W pierwszym etapie wykonano oddzielenie frakcji HDL od pozostałych frakcji cholesterolu. W tym celu do zakręczanych naczynek o pojemności 1,5 ml dodano po 500 µl otrzymanego osocza oraz odczynnika strącającego (kwas fosforowolframowy – 1 mmol/l, chlorek magnezu – 50 mmol/l, benzoesan sodu – 6,94 mmol/l) i poddano inkubacji w temperaturze pokojowej przez okres 15 minut. W analogiczny sposób sporządzono próbkę wzorcową (500 µl odczynnika strącającego + 500 µl próbki wzorca). Wytrącone chylomikrony oraz frakcje LDL i VLDL odwirowywano z prędkością 4000 x g przez 10 minut. Otrzymany supernatant ostrożnie zbierano i oznaczono w nim zawartość frakcji HDL cholesterolu. Próbkę badaną otrzymano przez dodanie do probówek reakcyjnych 1000 µl gotowego odczynnika do oznaczania zawartości cholesterolu, ogrzanie go do temperatury ok. 25°C i dodanie 50 µl otrzymanego wcześniej osocza. Próbę ślepą i wzorcową wykonano analogicznie dodając do 1000 µl wspomnianego, ogrzanego odczynnika odpowiednio po 50 µl wody destylowanej i próbki wzorcowej. Po wymieszaniu otrzymane próby przenoszono na płytki inkubacyjne płaskodenne

i inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 minut. Po inkubacji odczytano absorbancję prób badanych względem prób wzorcowych i ślepych, przy długości fali 492 nm wykorzystując czytnik mikroplitek ELISA. Otrzymana intensywność zabarwienia była wprost proporcjonalna do zawartości frakcji HDL w badanych próbkach. Stężenie frakcji HDL cholesterolu obliczono wg wzoru:

$$[\text{HDL}] = \frac{APB}{APW} \times [\text{PW}]$$

Gdzie:

[HDL] – stężenie frakcji HDL cholesterolu

[PW] – stężenie próbki wzorcowej

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki wzorcowej

5.1.3.3. Frakcji LDL cholesterolu

Oznaczenie poziomu frakcji LDL cholesterolu wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.1.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w poprzednich podrozdziałach. Z otrzymanego osocza sporządzono próbę badaną. W tym celu do probówek reakcyjnych dodano 225 µl odczynnika R1 (bufor Good'a – 25 mmol/l o pH = 6,8, HDAOS – 0,64 mmol/l, esteraza cholesterolu – CHE 5,0 kU/l, oksydaza cholesterolu – CO 5,0 kU/l, katalaza – 1000 kU/l) oraz 2,5 µl badanego osocza. Próbę wzorcową i odczynnikową wykonano analogicznie dodając do 225 µl odczynnika R1, odpowiednio 2,5 µl wzorca dla próby wzorcowej oraz 2,5 µl wody destylowanej dla próby odczynnikowej. Otrzymane próby przenoszono na płytki inkubacyjne płaskodenne, mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 5 minut. Po inkubacji dokonano pomiaru absorbancji (A1) próby badanej oraz wzorcowej względem próby odczynnikowej przy długości fali 600 nm wykorzystując czytnik mikroplitek ELISA. Następnie do prób dodano 75 µl odczynnika R2 (bufor Good'a – 25 mmol/l o pH = 7,0, 4-Aminoantypiryna – 4-AA

3,4 mmol/l, peroksydaza – POD 20 kU/l, azydek sodu < 13,9 mmol/l). Po wymieszaniu próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 5 minut. Ponownie zmierzono absorbancję (A2) próby wzorcowej oraz próby badanej wobec próby odczynnikowej przy długości fali 600 nm. Stężenie frakcji LDL cholesterolu obliczono wg wzoru:

$$[\text{LDL}] = \frac{A2 \text{ PB} - A1 \text{ PB}}{A2 \text{ PW} - A1 \text{ PW}} \times [\text{PW}]$$

Gdzie:

[LDL] – stężenie frakcji LDL cholesterolu

[PW] – stężenie próbki wzorcowej

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki wzorcowej

5.1.3.4. Trójglicerydy

Oznaczenie poziomu trójglicerydów wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.1.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w poprzednich podrozdziałach. Otrzymany w ten sposób materiał poddano właściwemu oznaczeniu zawartości trójglicerydów. Pierwszym etapem oznaczenia było sporządzenie odczynnika do oznaczenia zawartości trójglicerydów w osoczu. W tym celu wymieszano odczynnik R1 – bufor (PIPES – 100 mmol/l, chlorek magnezu – 9,8 mmol/l, 4-chlorofenol – 3,5 mmol/l) z odczynnikiem R2 – enzymy (lipaza \geq 1000 IU/l, peroksydaza \geq 1700 IU/l, oksydaza \geq 3000 IU/l, kinaza glicerolowa \geq 660 IU/l, 4-aminoantypiryna – 0,5 mmol/l i ATP – 1,3 mmol/l) i odczekano ok. 2 minuty w celu całkowitego rozpuszczenia się otrzymanego odczynnika. Próbkę badaną wykonano poprzez dodanie do probówek reakcyjnych 1000 μ l otrzymanego wcześniej odczynnika i 10 μ l badanego osocza, które wcześniej były ogrzane do temperatury pokojowej. W analogiczny sposób otrzymano próbę wzorcową oraz ślepą dodając odpowiednio po 10 μ l wzorca oraz wody destylowanej. Otrzymane próbki mieszano i przenoszono na płytki inkubacyjne płaskodenne i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po zakończeniu inkubacji odczytano absorbancję próbek badanych względem

próbki wzorcowej i ślepej przy długości fali 492 nm wykorzystując czytnik mikroplątek ELISA. Otrzymana intensywność zabarwienia była wprost proporcjonalna do stężenia trójglicerydów w badanych próbkach. Stężenie trójglicerydów obliczono wg wzoru:

$$[TG] = \frac{APB}{APW} \times [PW]$$

Gdzie:

[TG] – stężenie trójglicerydów

[PW] – stężenie próbki wzorcowej

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki wzorcowej

5.1.4. Oznaczenie wpływu indukcji nadciśnienia tętniczego na profil węglowodanowy

Oznaczenie poziomu glukozy wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.1.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w rozdziale 5.1.3.1. Otrzymany w ten sposób materiał poddano właściwemu oznaczeniu zawartości glukozy. Próbkę badaną sporządzono poprzez dodanie do próbówki reakcyjnej 1000 µl gotowego odczynnika do oznaczania zawartości glukozy (bufor fosforanowy – 250 mmol/l o pH = 7,5, oksydaza glukozy > 20 kU/l, peroksydaza > 1.5 kU/l, 4-aminoantypiryna 0,4 mmol/l, fenol – 5 mmol/l, EDTA – 2 mmol/l, azydek sodu < 13.9 mmol/l), ogrzanie go do temperatury ok. 25°C, a następnie dodanie 10 µl osocza próbki badanej. Próbkę wzorcową wykonano analogicznie dodając 10 µl wzorca, natomiast próbkę ślepa stanowił sam odczynnik w objętości 1000 µl. Otrzymane próbki mieszano i nanoszono na płytki inkubacyjne płaskodenne. Całość inkubowano w temperaturze 25°C przez okres 10 minut, następnie odczytano absorbancję próbki badanej względem wzorcowej i odczynnikowej przy długości fali 492 nm, wykorzystując czytnik mikroplątek ELISA. Otrzymana intensywność zabarwienia była wprost proporcjonalna do zawartości glukozy w badanych próbkach.

Stężenie glukozy obliczono wg wzoru:

$$[\text{Glu}] = \frac{APB}{APW} \times [\text{PW}]$$

Gdzie:

[Glu] – stężenie glukozy

[PW] – stężenie próbki wzorcowej

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki wzorcowej

5.2. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków o właściwościach α_1 -adrenolitycznych oraz związku referencyjnego (prazosyny) w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego (model L-NAME)

Konsekwentnie wszystkie stawiane wymagania wobec modelu zwierzęcego nadciśnienia tętniczego udało się osiągnąć w modelu L-NAME, dlatego też model ten posłużył do oceny potencjalnych właściwości plejotropowych 7 wybranych związków o cechach α_1 -adrenolityków i aktywności krążeniowej udowodnionej wynikami badań, które przeprowadzono w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Wybrane związki zostały szerzej omówione w rozdziale „Podsumowanie i dyskusja wyników”. Należą one do dwóch odrębnych grup, a mianowicie:

- 1) pochodnych ksantonu (**MH-2, MH-3, MH-99**)
- 2) pochodnych pirolidyn-2-onu (**EP-46, EP-47, EP-49, EP-58**)

Jako związek odniesienia wybrano **prazosynę**, która jest protoplastą selektywnych α_1 -adrenolityków.

5.2.1. Oznaczenie aktywności hipotensyjnej badanych związków

Model L-NAME wywołano według procedury opisanej w punkcie 5.1.1.4. Szczury podzielono na 9 grup, po 7 osobników w każdej grupie, oznaczonych kolejno symbolami badanych związków: PRA (prazosyna), MH-2, MH-3, MH-99, EP-46, EP-47, EP-49, EP-58 oraz L-NAME (grupa kontrolna modelu L-NAME, u której nie podawano żadnego z badanych związków).

W trakcie indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME, podczas 28-dniowej procedury, w ramach weryfikacji poprawności modelu, czterokrotnie: w I, VIII, XV, XXV dniu eksperymentu, wykonywano pomiar ciśnienia tętniczego krwi, według procedury opisanej w punkcie 5.1.1. Po 28-dniach indukcji nadciśnienia kontynuowano podawanie L-NAME w wodzie pitnej w dawce 40 mg/kg m.c. oraz rozpoczęto dootrzewnowe iniekcje związków, w dawce 10 mg/kg m.c. dla związków MH-2, MH-3, MH-99, EP-46, EP-47, EP-49, EP-58 oraz w dawce 5 mg/kg m.c. dla prazosyny. Związki zawieszano w 1% roztworze TWEEN 80. Szczury kontrolne modelu L-NAME przez okres, w którym podawano związki w badanych grupach, otrzymywały L-NAME w wodzie pitnej w dawce 40 mg/kg m.c., a dootrzewnowo 1% TWEEN 80 w objętości 1 ml/kg m.c.

Iniekcje odbywały się o stałej porze pomiędzy godziną 13:00 a 14:00 w schemacie 1x dziennie przez okres 14-stu dni.

Na zakończenie eksperymentu z uśpionych tiopentalem (75 mg/kg m.c.) i heparynizowanych zwierząt pobrano aorty, osocze oraz narządy wewnętrzne w celu oznaczenia poziomu lipidów, glukozy, zmian gęstości receptorów, parametrów stresu oksydacyjnego i innych markerów krążeniowych.

5.2.2. Oznaczenie wpływu badanych związków na funkcje rozkurczowe aorty

Po 42 dniach eksperymentu, składających się z 28-dniowej fazy indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME oraz 14-dniowej fazy podawania dootrzewnonowego badanych związków, oznaczono wpływ tychże związków na śródbłonek aorty. W tym celu od szczurów znieczulonych tiopentalem (75 mg/kg m.c.) pobierano aortę piersiową. Jako grupy porównawcze posłużyły aorty pochodzące od szczurów kontrolnych (zdrowe osobniki bez indukowanego nadciśnienia), aorty pochodzące od szczurów modelu L-NAME oraz aorty, w których mechanicznie uszkodzono śródbłonek. W ten sposób nastąpiła próba zobrazowania funkcji nieuszkodzonego śródbłonka, śródbłonka narażonego na nadciśnienie indukowane L-NAME oraz aorty zupełnie pozbawionej funkcjonującego śródbłonka. Dalsze postępowanie oraz opis metodyki oznaczenia wykonywanego na aparaturze przeznaczonej do badań narządów izolowanych **DMT Tissue Organ Bath System – 750 TOBS** opisano w rozdziale 5.1.2.

5.2.3. Oznaczenie wpływu badanych związków na profil lipidowy

Oznaczenie wpływu na profil lipidowy po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym badanych związków w modelu L-NAME wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.2.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w rozdziale 5.1.3.1. Otrzymany w ten sposób materiał poddano właściwemu oznaczeniu zawartości: cholesterolu całkowitego wg procedury opisanej w rozdziale 5.1.3.1, frakcji HDL cholesterolu wg procedury opisanej w rozdziale 5.1.3.2, frakcji LDL cholesterolu wg procedury opisanej w rozdziale 5.1.3.3 oraz trójglicerydów wg procedury opisanej w rozdziale 5.1.3.4.

5.2.4. Oznaczenie wpływu badanych związków na profil węglowodanowy

Oznaczenie wpływu na profil węglowodanowy po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym badanych związków w modelu L-NAME wykonano w osoczu krwi otrzymanej od szczurów, które uczestniczyły w przewlekłym eksperymencie opisanym w rozdziale 5.2.1. Przebieg procedury wyodrębniania osocza wyglądał analogicznie jak to opisano w poprzednich podrozdziałach. Otrzymany w ten sposób materiał poddano właściwemu oznaczeniu zawartości glukozy wg procedury opisanej w rozdziale 5.1.4.

5.2.5. Oznaczenie parametrów stresu oksydacyjnego

5.2.5.1. Białko całkowite

Oznaczenie poziomu białka całkowitego w osoczu/homogenacie tkankowym szczurów wykonano wg zmodyfikowanej metody Lowry'ego [76]. W metodzie tej wykorzystywane są dwie reakcje: reakcja jonów miedzi(II) z wiązaniami peptydowymi (reakcja biuretowa) oraz reakcje aminokwasów aromatycznych z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. Do 20 μ l osocza/supernatantu rozcieńczonego 50-krotnie buforem fosforanowym o pH 7,4, dodano 20 μ l 1M NaOH oraz 200 μ l odczynnika miedziowego o składzie: 2% Na_2CO_3 , 2% winian sodowo-potasowy, 1% CuSO_4 , zmieszanych w stosunku 98:1:1. Próby inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej, następnie dodawano do nich 20 μ l 1M odczynnika Folina-Ciocalteu'a. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję prób, przy długości fali 500 nm wobec próby ślepej, w której osocze/supernatant zastąpiono buforem fosforanowym. Stężenie białka odczytano z krzywej wzorcowej.

5.2.5.2. MDA w osoczu

Produkty peroksydacji lipidów w osoczu zostały określone przez zmierzenie reaktywnych składników reagujących z kwasem tiobarbiturowym spektrofluorymetrycznie, metodą podaną przez Austa (1994) [77]. Pomiaru stężenia malonyldialdehydu – MDA (*ang. malonyl dialdehyde*) w osoczu krwi dokonano za pomocą oznaczenia fluorymetrycznego. Po wykonaniu derywatywacji kwasem tiobarbiturowym (TBA) robiono pomiary fluorymetryczne powstałego ugrupowania chromatoforowego. Przygotowanie próbki do analizy polegało na zmieszaniu 250 μ l próbki osocza z 250 μ l wody i 1 ml mieszaniny roztworu roboczego (TBA/TCA/HCL rozcieńczony czterokrotnie wodą). Po wytrząśnięciu, próby umieszczano w łaźni wodnej na okres 10 minut w temperaturze 100°C. Po ochłodzeniu pod zimną wodą do prób dodawano 20 μ l 50% TCA i wirowano z prędkością 4000 x g przez 10 min. Roztwór wzorcowy otrzymano przez hydrolizę 1,1,3,3-tetrametoksypropanu. Pomiaru absorbancji powstałego adduktu TBA-MDA dokonano przy długości fali 535 nm, stężenie MDA odczytano z krzywej wzorcowej.

5.2.5.3. MDA w mózgu

Oznaczenie stopnia peroksydacji lipidów dokonano poprzez określenie stężenia MDA w homogenacie mózgow badanych szczurów [77]. Do 1 ml supernatantu dodawano 50 μ l 0,5mM FeCl₂ oraz 50 μ l 2mM kwasu askorbinowego. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C do prób dodawano 100 μ l 0,2% roztworu hydroksylowanego di-tert-butylotoluenu (BHT) oraz 2 ml odczynnika TBA/TCA/HCL o składzie: 3,75% TCA, 0,37% TBA oraz 50nM HCl. Próby umieszczano w łaźni wodnej na okres 15 minut w temperaturze 100°C. Po ochłodzeniu pod zimną wodą odwirowywano je z prędkością 4000 x g przez 10 minut. Roztwór wzorcowy otrzymano przez hydrolizę 1,1,3,3-tetrametoksypropanu [78]. Absorbancję zmierzono przy długości fali 535 nm względem etanolu. Stężenie MDA odczytano z krzywej wzorcowej.

5.2.5.4. Aktywność katalazy

Oznaczenie aktywności katalazy bazuje na pomiarze szybkości rozpadu substratu, jakim jest nadtlenek wodoru (H_2O_2), podczas katalizowanej przez nią reakcji [77]. Szybkość spadku absorbancji pochodzącej od H_2O_2 jest wprost proporcjonalna do aktywności katalazy, zawartej w badanym materiale biologicznym. Do 650 μl 0,05M buforu fosforanowego o pH 7,0 oraz 300 μl 54 mM H_2O_2 dodawano 50 μl osocza. Spadek absorbancji mierzono przez okres 2 minut w temperaturze 25°C przy długości fali 240 nm, wykorzystując do pomiaru kuwety kwarcowe. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty rozkłada 1 μmol H_2O_2 .

5.2.5.5. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej

Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej wykonano metodą pośrednią z wykorzystaniem reakcji hamowania spontanicznego rozpadu adrenaliny do adrenochromu [77]. Do kuwety spektrofotometrycznej dodano: 960 μl 50mM buforu węglanowego o pH 10,2 zawierającego 0,1mM EDTA, 10 μl badanego osocza oraz 30 μl 10mM adrenaliny w 10mM HCl. Przyrost absorbancji mierzono przez okres 2 minut w temperaturze 30°C przy długości fali 480 nm. Przyrost absorbancji próby badanej mierzono względem absorbancji próby kontrolnej, którą wykonano analogicznie do próby badanej, w roztworze reakcyjnym zastępując osocze wodą. Względną szybkość utleniania adrenaliny obliczono wg wzoru:

$$U [\%] = \frac{\Delta AB}{\Delta AK}$$

Gdzie:

U – względną szybkość utleniania adrenaliny

APB – absorbancja próbki badanej

APW – absorbancja próbki kontrolnej

5.2.5.6. Aktywność peroksydazy glutationowej

Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej wykonywano metodą pośrednią, przy pomocy pomiaru spadku absorbancji NADPH. W metodzie tej utleniony glutation GSSG tworzący się w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową został zredukowany przez reduktazę glutationową przy jednoczesnym utlenieniu NADPH. Oksydacja NADPH spowodowała spadek absorbancji przy długości fali 340 nm w temperaturze 37°C [77]. W kuwecie spektrofotometrycznej umieszczano: 500 µl 0,1M buforu fosforanowego o pH 7,0, zawierającego 0,1mM EDTA, 100 µl 10mM GSH (zredukowanego glutationu), 100 µl 1,5mM NADPH w 0,1% NaHCO₃, 100 µl reduktazy glutationowej (2,4 U/ml), 100 µl osocza oraz 100 µl 1,5 mM H₂O₂. Spadek absorbancji mierzono przez 2 minuty. Aktywność enzymu obliczono na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji dla NADPH, wynoszącego 6,22 mmol/cm.

5.2.6. Oznaczenie stężenia azotanów(III) oraz azotanów(V)

Oznaczenie stężenia azotanów(III) (NO_2^-) oraz azotanów(V) (NO_3^-) w osoczu zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu ENO-20 (Eicom). Pomiar wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii z zastosowaniem postkolumnowej derywatyzacji z użyciem odczynnika Griess'a (NO-RAP oraz NO-PBP powder, Eicom). Próbkę osocza poddano procesowi oczyszczania przez zastosowanie odczynnika strącającego (metanol) w stosunku 1:1 (v/v). Następnie próbkę odwirowano 10000 x g przez 10 min w temp 4°C (Sigma 1-14K, Polygen). Na kolumnę analityczną dozowano automatycznie 10 µL próbki (AS-700, Eicom).

Ze względu na zaistniałe ograniczenia ilościowe, do badań wybrano próbki pochodzące od zwierząt z grup: kontrolnej, L-NAME, prazosyny, MH-3, MH-99.

Oznaczenie wykonano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Stefana Chłopickiego przez dr Agnieszkę Zakrzewską w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków – JCET (ang. Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics) w Krakowie.

5.2.7. Oznaczenie wybranych parametrów biochemicznych

5.2.7.1. ADMA

Oznaczenia ADMA (*ang. asymmetric dimethylarginine*) w próbkach osocza pobranych od szczurów modelu L-NAME oraz szczurów, którym podawano badane związki po indukcji nadciśnienia wg modelu L-NAME dokonano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (MyBioSource MBS2510210), typ kompetycyjny. Płytki zostały fabrycznie opłaszczona ADMA. W trakcie reakcji, ADMA obecna w próbce/standardzie konkurowała o wyznakowane przeciwciała specyficzne dla ADMA, ze stałą ilością ADMA z podłoża. Intensywność uzyskanej reakcji barwnej w tym wypadku była odwrotnie proporcjonalna do stężenia ADMA obecnego w osoczu. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek ELISA.

Stężenie ADMA w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej z 7 próbek standardowych o stężeniach ADMA: 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000. Czułość metody wynosi 9,375 ng/ml.

5.2.7.2. VEGF

Oznaczenia VEGF (*ang. Vascular endothelial growth factor*) w próbkach pobranych od szczurów modelu L-NAME oraz szczurów, którym podawano badane związki po indukcji nadciśnienia wg modelu L-NAME, dokonano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA typu „Sandwich” – test podwójnego wiązania (MyBioSource MBS8506132). Płytki fabrycznie opłaszczana jest monoklonalnymi przeciwciałami specyficznymi dla VEGF, które łączą się z VEGF obecnym w próbkach badanych oraz próbkach standardów, po dodaniu ich do dołków płytki. Niezwiązane produkty są wymywane podczas procedury płukania. Następnie dodawane są przeciwciała specyficzne dla VEGF, które zostają wychwytywane przez związany na powierzchni kompleks przeciwciało-VEGF. Ich nadmiar zostaje ponownie wypłukany i dodawane są przeciwciała drugorzędowe, znakowane enzymem – peroksydazą chrzanową. Następnie roztwór chromoforu jest nastrzykiwany na płytkę, dochodzi do katalizowania reakcji przez enzym i obserwowany jest barwny produkt, występujący

w ilościach proporcjonalnych do VEGF obecnego w próbkach. Detekcję absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm, wykorzystując czytnik mikroplątek ELISA.

Stężenie VEGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej, przygotowanej z 7 próbek standardowych o stężeniach VEGF: 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000. Czułość metody wynosi 7 pg/ml.

5.2.8. Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem podtypów receptora α_1 -adrenergicznego

5.2.8.1. Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1A} -adrenergicznych metodą GeneBLAzer

Oznaczenia aktywności wewnętrznej badanych związków względem receptorów α_{1A} -adrenergicznych dokonano przy wykorzystaniu gotowych do użycia komórek z ekspresją ludzkiego receptora α_{1A} -adrenergicznego - Perkin Elmer® ADRA1A CHO-K1 DA. Istotą metody GeneBLAzer® jest aktywacja genu dla beta-laktamazy (BLA), który wykazuje sprzężenie z receptorem na powierzchni komórki. W zależności od charakteru liganda receptorowego (agonista, częściowy agonista lub antagonist), gen może ulegać ekspresji bądź nie. Substratem dla powstającej beta-laktamazy w tej metodzie jest specyficzny substrat, który zbudowany jest z dwóch ugrupowań fluoroforowych, tj. kumaryny i fluoresceiny. Podczas detekcji, gdy gen BLA jest nieaktywny (antagonista), na skutek wzbudzenia promieniowaniem o długości fali 409 nm, we wspomnianym substracie następuje przeniesienie energii fluorescencji FRET (*ang. fluorescence resonance energy transfer*) z fluoresceiny na kumarynę, co w efekcie warunkuje detekcję zielonej barwy fluorescencji (długość fali 530 nm). W sytuacji gdy gen BLA jest aktywny (agonista), beta-laktamaza rozdziela oba ugrupowania fluoroforowe substratu, warunkując detekcję niebieskiej barwy fluorescencji (długość fali 447 nm).

Zasadniczą część oznaczenia wykonano w warunkach aseptycznych w komorze z laminarnym nawiewem powietrza postępując zgodnie ze specyfikacją producenta. Właściwości agonistyczne badanych związków oznaczono przez inkubację (37°C, 5% CO₂)

komórek w medium z testowanymi związkami przez okres 5 godzin. Właściwości antagonistyczne badanych związków oznaczono przez preinkubację (37°C, 5% CO₂) komórek w medium z testowanymi związkami przez okres 30 minut. Następnie dodawano agonistę referencyjnego – fenylefrynę w medium, w stężeniu odpowiadającym wartości EC₈₀, wyznaczonej dla tej linii komórek i inkubowano przez okres 5 godzin. Po 5 godzinnym okresie inkubacji, w zaciemnionym pomieszczeniu, do dołków z komórkami dodano otrzymaną wcześniej mieszaninę substratu dla beta-laktamazy – liveBLAzer-FRET B/G substrate mixture, płytki delikatnie zwirowano, a następnie nakryto przykrywkami nieprzepuszczającymi światła i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny.

Odczytu dokonano w temperaturze pokojowej wykorzystując czytnik FLUOstar OPTIMA S/N wyposażony w filtr wzbudzenia 409/20 nm (barwa zielona i niebieska) oraz filtry emisyjne 460/40 nm (barwa niebieska) i 530/30 nm (barwa zielona).

5.2.8.2. *Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1B} -adrenergicznych metodą AequoScreen*

Oznaczenia aktywności wewnętrznej badanych związków względem receptorów α_{1B} -adrenergicznych dokonano przy wykorzystaniu komórek gotowych do użycia z ekspresją ludzkiego receptora α_{1B} -adrenergicznego oraz fotoproteiny – apoequoriny – human Adrenergic α_{1B} Receptor AequoScreen Frozen Cells Perkin Elmer®. Aktywacja receptorów sprzężonych z białkiem G_q powoduje za pośrednictwem fosfolipazy C, a następnie inozytolotrójfosforanu (IP₃) oraz diacyloglicerolu (DAG), wtórny, wewnątrzkomórkowy wyrzut jonów wapnia (wzrost stężenia jonów Ca²⁺). Apoequorina jest proenzymem, który zostaje przekształcony pod wpływem działania hydrofobowych grup prostetycznych kolenterazyny do aktywnej postaci – aequoriny. Ta ostatnia wiążąc uwolnione z retikulum endoplazmatycznego jony Ca²⁺, utlenia kolenterazynę do kolenteramidu. W wyniku tego procesu następuje uwolnienie CO₂ oraz emisja światła (466 nm). Wysokie powinowactwo aequoriny do jonów Ca²⁺ warunkuje aktywność enzymu proporcjonalną do zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ w fizjologicznym zakresie (50 nM do 50 μ M). Przez fotometryczny pomiar natężenia światła emitowanego podczas utleniania kolenterazyny przez aequorinę dokonywany zostaje pośrednio pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia

jonów Ca^{2+} , dając tym samym informację na temat rodzaju liganda, jego aktywności wewnętrznej oraz siły działania (zakres stężeń, EC_{50}).

Zasadniczą część oznaczenia wykonano w warunkach aseptycznych w komorze z laminarnym nawiewem powietrza postępując zgodnie ze specyfikacją producenta. Przed rozpoczęciem właściwej części eksperymentu komórki były inkubowane w temperaturze pokojowej ze wspomnianą kolenterazyną przez 24h w celu uzyskania aktywnej aequoriny. Następnie oszacowano liczbę komórek (zliczanie przy pomocy mikroskopu) i rozcieńczone do odpowiedniej (wskazanej w metodyce producenta) ilości komórek w przeliczeniu na dołek płytki.

W celu określenia właściwości agonistycznych badanych związków odpowiednio rozcieńczone komórki były nastrzykiwane na białe płytki titracyjne - 1/2 areaplate-96, w których przygotowano uprzednio odpowiednio rozcieńczone testowane związki. Bezpośrednio po nastrzyknięciu komórek do każdego dołka, dokonywano pomiaru emisji światła przez okres 60 sekund od nastrzyknięcia. Intensywność emitowanego światła (466 nm) jest wprost proporcjonalna do siły działania potencjalnego agonisty.

W celu określenia właściwości antagonistycznych badanych związków, komórki użyte do oznaczenia były preinkubowane z testowanymi związkami przez okres 20 minut. Następnie nakrapiano specyficznego agonistę receptora α_{1B} -adrenergicznego – fenylefrynę w medium, w stężeniu odpowiadającym wartości EC_{80} , wyliczonej dla tej linii komórkowej i dokonywano pomiaru emitowanego światła przez okres 60 sekund od nakropienia agonisty. Siła działania potencjalnego antagonisty jest odwrotnie proporcjonalna do intensywności emitowanego światła (466 nm).

5.2.8.3. Oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów α_{1D} -adrenergicznych metodą AeQuoScreen

Oznaczenia aktywności wewnętrznej badanych związków względem receptorów α_{1D} -adrenergicznych dokonano przy wykorzystaniu komórek gotowych do użycia z ekspresją ludzkiego receptora α_{1D} -adrenergicznego oraz fotoproteiny – apoaequoriny – human Adrenergic α_{1D} Receptor AeQuoScreen Frozen Cells Perkin Elmer®. Oznaczenie wykonano wg procedury opisanej w rozdziale 5.2.8.2.

VI. WYNIKI

6.1. Walidacja modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego

6.1.1. Indukcja nadciśnienia tętniczego w zwierzęcych modelach doświadczalnych

Wyniki opracowano na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji – ANOVA, poszerzonej o procedurę porównań wielokrotnych, według testu Dunnett'a.

Porównano wartości przyrostu ciśnienia tętniczego dla każdego z modeli z wartością pomiaru ciśnienia w pierwszym dniu eksperymentu (pomiar „zero”), tak by wyznaczyć najniższe wartości ciśnienia, dla których różnica jest znacząca przy poziomie istotności $p < 0,05$.

W trakcie trwania eksperymentu w żadnej z grup kontrolnych (I, III, V, VII) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wartościach skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi. Natomiast w grupach, w których indukowano nadciśnienie tętnicze (II, IV, VI, VIII) odnotowano znaczący jego wzrost.

Poszczególne modele różniły się między sobą czasem trwania, a zwierzęta w każdym z nich rozwinęły nadciśnienie w różnym odstępie czasowym od momentu rozpoczęcia eksperymentu. Model DEX trwał 2 tygodnie, model DOCA – 6 tygodni, model FRU – 8 tygodni, model L-NAME – 4 tygodnie. W każdym z modeli osiągnięto odmienne maksymalne wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi.

6.1.1.1. Model DEX

W modelu DEX znamiennej statystycznie wzrost ciśnienia skurczowego odnotowano podczas 5 pomiaru – w VIII dniu eksperymentu, natomiast ciśnienia rozkurczowego podczas 4 pomiaru – w VII dniu eksperymentu (tab. 9). Średnia wartość ciśnienia skurczowego wyniosła wówczas 138,9 mmHg, a rozkurczowego 107,6 mmHg. Wartość średniego ciśnienia skurczowego podniosła się o 26,1 mmHg (23,1%) w stosunku do pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 112,8 mmHg), a średniego ciśnienia rozkurczowego

o 17,0 mmHg (18,8%) w stosunku do wartości średniej z pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 90,6 mmHg).

Najwyższe średnie wartości jakie osiągnięto w tym modelu dla ciśnienia skurczowego wyniosły 144,5 mmHg – wzrost o 31,7 mmHg (28,1%), a dla ciśnienia rozkurczowego 118,5 mmHg – wzrost o 27,9 mmHg (30,8%).

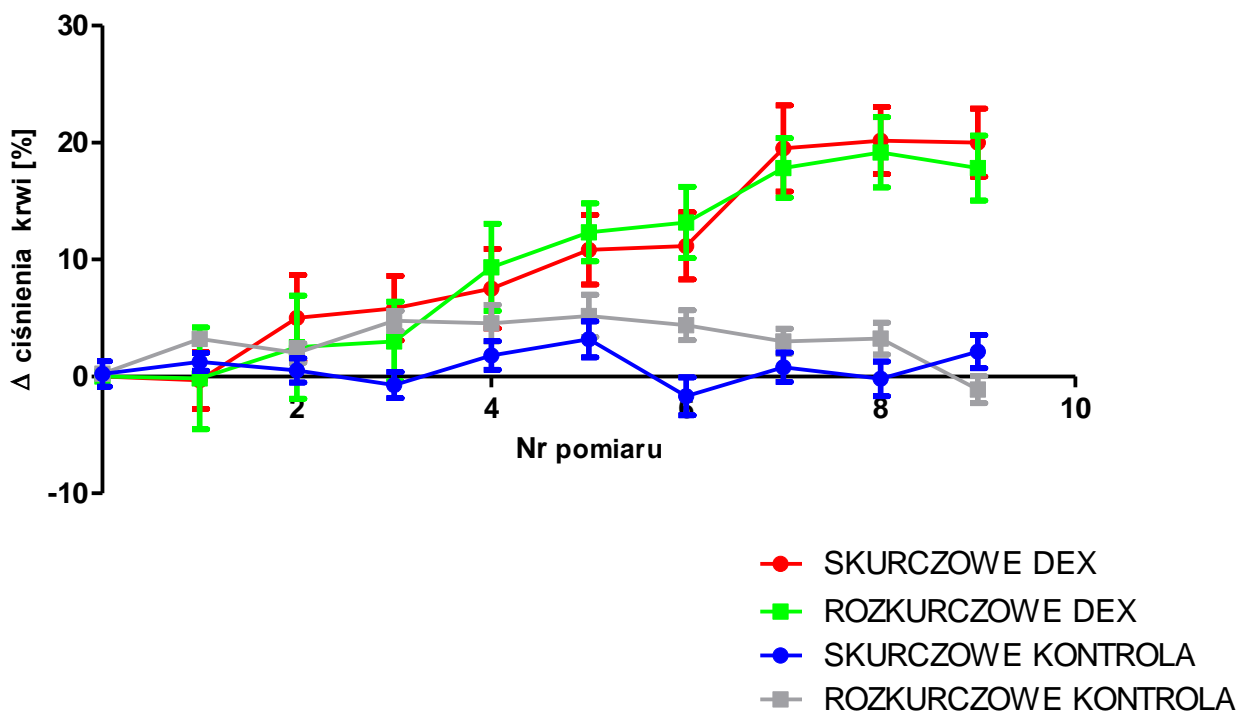
Na wykresie przedstawiono procentową zmianę skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w modelu DEX i w grupie kontrolnej w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” (ryc. 4).

Tabela 9. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w modelu DEX

	Nr pomiaru	Dzień eksperymentu										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
			I	III	V	VI	VII	VIII	XI	XII	XIII	XIV
KONTROLA	Skurczowe	Średnia ± SEM	119,5 ± 4,9	121,3 ± 3,4	119,0 ± 6,1	118,2 ± 7,6	121,7 ± 4,7	122,7 ± 6,3	117,7 ± 3,6	120,6 ± 5,4	119,2 ± 4,1	121,6 ± 6,5
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	90,5 ± 3,5	94,3 ± 4,8	92,3 ± 3,6	102,4 ± 5,5	99,47 ± 2,4	95,97 ± 5,5	94,7 ± 6,6	94,2 ± 4,1	94,4 ± 7,3	89,4 ± 2,1
DEX	Skurczowe	Średnia ± SEM	112,8 ± 5,3	123,7 ± 5,2	125,7 ± 2,4	127,6 ± 6,6	129,4 ± 3,3	138,9 ± 4,3 ** ¹⁾	138,1 ± 2,6 **	144,5 ± 6,1 ***	143,2 ± 3,2 ***	137,9 ± 3,3 **
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	90,6 ± 7,1	96,4 ± 9,4	93,2 ± 4,3	103,3 ± 6,8	107,6 ± 9,6 *	111,9 ± 5,4 **	113,2 ± 6,9 **	112,9 ± 3,5 **	118,5 ± 5,6 ***	114,2 ± 7,9 **

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett’a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 4. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla modelu DEX i grupy kontrolnej

6.1.1.2. Model DOCA

W **modelu DOCA** istotny statystycznie wzrost ciśnienia skurczowego odnotowano począwszy od 3 pomiaru – w XI dniu trwania eksperymentu, a ciśnienia rozkurczowego od 4 pomiaru – w XIV dniu eksperymentu (tab. 10). Średnia wartość ciśnienia skurczowego wyniosła wówczas 131,1 mmHg, a rozkurczowego 109,3 mmHg. Wartość średniego ciśnienia skurczowego wzrosła o 11,3 mmHg (9,4%) w stosunku do pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 119,8 mmHg), a średniego ciśnienia rozkurczowego o 14,3 mmHg (15,1%) w stosunku do wartości średniej z pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 95,0 mmHg).

Najwyższe średnie wartości uzyskane w tym modelu dla ciśnienia skurczowego wyniosły 147,8 mmHg – wzrost o 28,0 mmHg (23,4 %), a dla ciśnienia rozkurczowego 125,2 mmHg – wzrost o 30,2 mmHg (31,8 %).

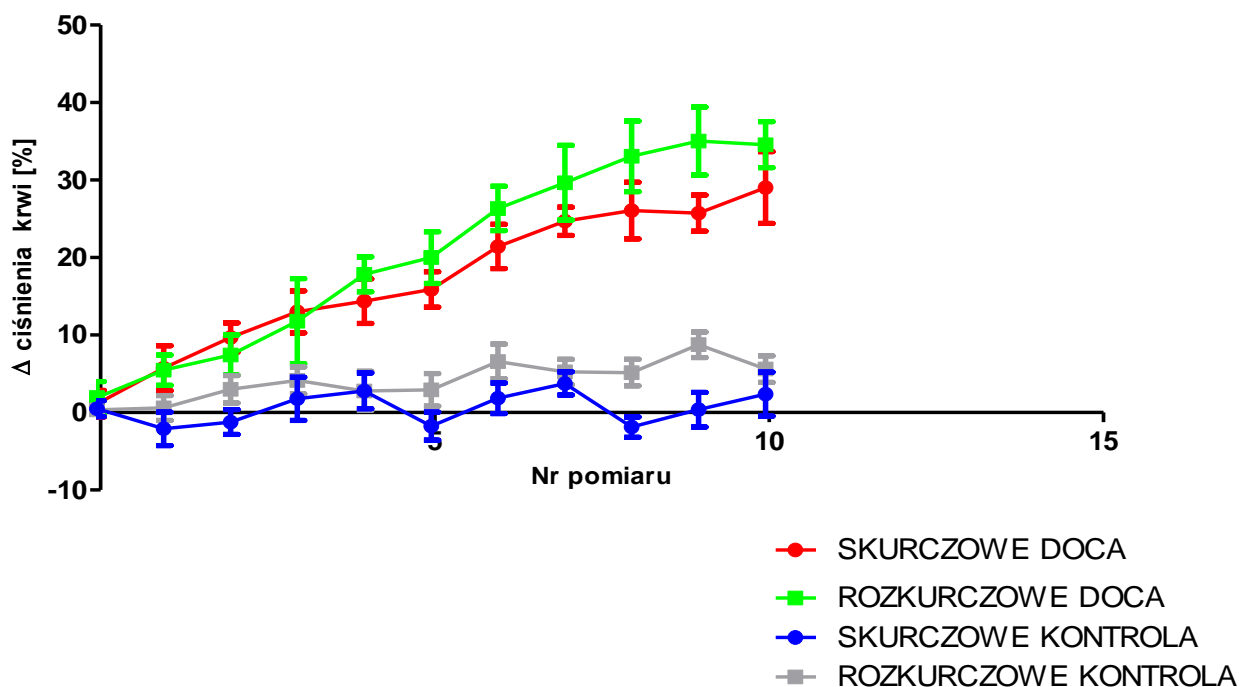
Na wykresie przedstawiono procentową zmianę skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w modelu DOCA i w grupie kontrolnej w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” (ryc. 5).

Tabela 10. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w modelu DOCA

Nr pomiaru		X	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dzień eksperymentu			I	IV	VIII	XI	XIV	XVIII	XXIII	XXVII	XXXI	XXXVI	XLII
KONTROLA	Skurczowe	Średnia ± SEM	121,8 ± 4,3	117,9 ± 5,0	120,7 ± 2,4	123,7 ± 2,8	124,9 ± 3,1	120,1 ± 4,1	124,7 ± 5,2	126,5 ± 2,3	119,9 ± 3,4	122,3 ± 4,1	124,3 ± 3,2
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	90,5 ± 2,5	91,0 ± 3,7	94,2 ± 5,3	95,9 ± 6,5	93,7 ± 2,0	93,6 ± 1,6	97,0 ± 2,8	95,8 ± 1,3	95,9 ± 4,2	101,0 ± 1,9	96,5 ± 3,1
DOCA	Skurczowe	Średnia ± SEM	119,8 ± 2,0	124,4 ± 1,76	128,3 ± 1,0	131,1 ± 1,5 * ¹⁾	133,2 ± 3,7 **	135,6 ± 3,6 **	140,1 ± 5,8 ***	143,3 ± 1,9 ***	144,7 ± 3,5 ***	144,4 ± 1,9 ***	147,8 ± 3,3 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	95,0 ± 4,4	95,3 ± 3,9	97,4 ± 1,7	104,3 ± 6,3	109,3 ± 2,7 **	112,2 ± 3,2 ***	116,6 ± 3,6 ***	119,6 ± 3,7 ***	123,2 ± 3,5 ***	125,2 ± 1,6 ***	124,7 ± 1,5 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett’a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



Rycina 5. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla modelu DOCA i grupy kontrolnej

6.1.1.3. Model FRU

W **modelu FRU** znamiennej statystycznie wzrost ciśnienia skurczowego odnotowano podczas 3 pomiaru – w IX dniu eksperymentu, natomiast ciśnienia rozkurczowego podczas 5 pomiaru – w XV dniu eksperymentu (tab. 11). Średnia wartość ciśnienia skurczowego wyniosła wówczas 125,9 mmHg, a rozkurczowego 116,6 mmHg. Wartość średniego ciśnienia skurczowego podniosła się o 9,8 mmHg (8,4%) w stosunku do pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 116,1 mmHg), a średniego ciśnienia rozkurczowego o 17,7 mmHg (17,9%) w stosunku do wartości średniej z pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 98,9 mmHg).

Najwyższe średnie wartości jakie osiągnięto w tym modelu dla ciśnienia skurczowego wyniosły 152,8 mmHg – wzrost o 36,7 mmHg (31,6%), a dla ciśnienia rozkurczowego 135,3 mmHg – wzrost o 36,4 mmHg (36,8%).

Na wykresie przedstawiono procentowy przyrost skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w modelu DOCA i w grupie kontrolnej w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” (ryc. 6).

Tabela 11. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w modelu FRU

Nr pomiaru		X	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dzień eksperymentu			I	III	VI	IX	XIII	XV	XVII	XX	XXII	XXV
KONTROLA	Skurczowe	Średnia ± SEM	118,9 ± 3,5	121,5 ± 3,9	120,1 ± 4,7	119,4 ± 8,6	123,2 ± 4,3	121,5 ± 7,4	126,2 ± 3,3	122,4 ± 9,0	119,2 ± 6,7	121,9 ± 5,2
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	88,4 ± 4,2	92,1 ± 4,5	86,3 ± 7,1	92,5 ± 5,9	99,1 ± 8,8	91,7 ± 2,1	94,7 ± 6,1	91,2 ± 7,4	89,3 ± 7,4	96,4 ± 9,1
FRU	Skurczowe	Średnia ± SEM	116,1 ± 6,3	118,0 ± 4,7	122,6 ± 6,3	125,9 ± 5,6 **1)	133,9 ± 4,1 ***	136,5 ± 4,4 ***	135,2 ± 3,8 ***	138,9 ± 1,0 ***	140,0 ± 1,7 ***	141,9 ± 2,2 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	98,9 ± 10,1	105,4 ± 4,5	108,6 ± 3,7	112,4 ± 3,4	113,3 ± 3,8	116,6 ± 5,1 *	117,0 ± 4,0 *	122,1 ± 4,6 ***	123,4 ± 3,0 ***	124,7 ± 2,4 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

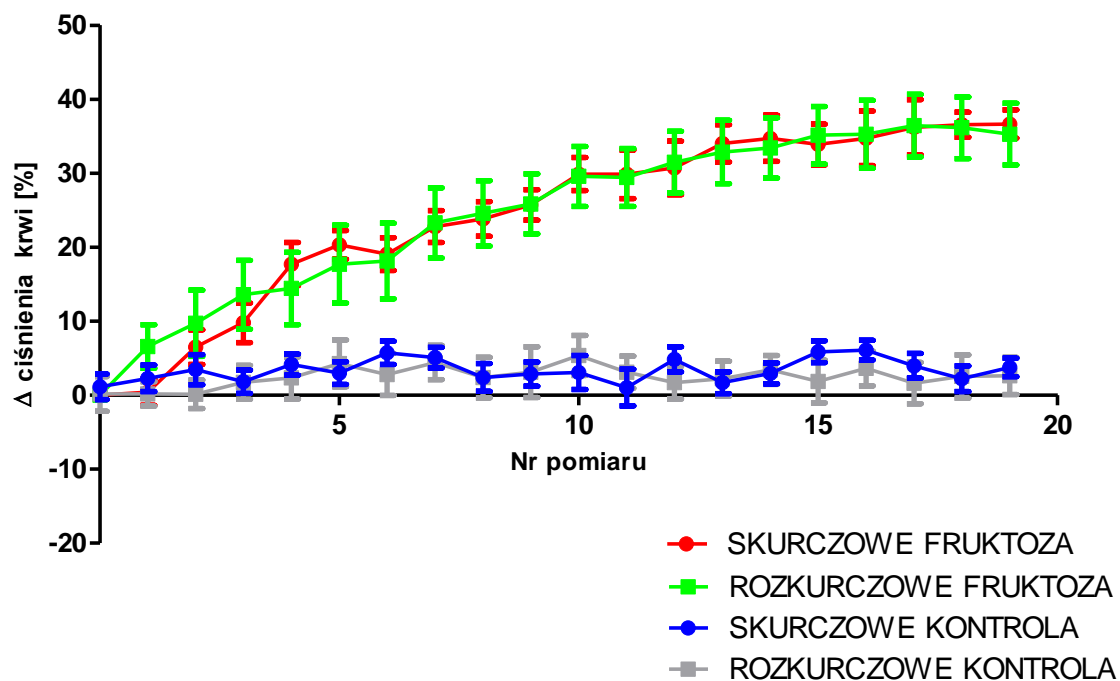
* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001

Cd. Tabela 11. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w modelu FRU

	Nr pomiaru	Dzień eksperymentu	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
			XXVI I	XXIX	XXXII	XXXVI	XXXIX	XLI	XLV	XLIX	LIII	LVI
KONTROLA	Skurczowe	Średnia ± SEM	121,0 ± 3,9	118,4 ± 8,7	123,1 ± 6,7	121,2 ± 1,2	120,3 ± 3,7	124,2 ± 5,2	125,9 ± 6,8	122,7 ± 4,2	119,9 ± 1,5	120,7 ± 8,2
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	102,1 ± 6,3	92,4 ± 6,4	97,2 ± 7,9	81,0 ± 3,5	97,9 ± 8,4	87,5 ± 8,5	93,8 ± 2,6	91,6 ± 5,8	93,7 ± 7,3	99,8 ± 5,5
FRU	Skurczowe	Średnia ± SEM	146,0 ± 2,9 ***	145,8 ± 2,8 ***	146,9 ± 5,1 ***	150,2 ± 4,5 ***	152,2 ± 4,2 ***	150,0 ± 1,1 ***	150,9 ± 4,9 ***	152,4 ± 5,2 ***	151,9 ± 4,0 ***	152,8 ± 3,3 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	128,4 ± 2,1 ***	128,3 ± 0,9 ***	130,4 ± 1,5 ***	131,7 ± 4,2 ***	132,3 ± 4,2 ***	131,4 ± 39,9 ***	134,1 ± 4,5 ***	135,3 ± 5,3 ***	135,0 ± 4,0 ***	134,1 ± 3,3 ***

¹⁾Znamiennosć wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



Rycina 6. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla modelu FRU i grupy kontrolnej

6.1.1.4. Model L-NAME

W modelu L-NAME znamiennej statystycznie wzrost ciśnienia skurczowego odnotowano podczas 3 pomiaru – w VII dniu eksperymentu, natomiast ciśnienia rozkurczowego podczas 4 pomiaru – w IX dniu eksperymentu (tab. 12). Średnia wartość ciśnienia skurczowego wyniosła wówczas 146,6 mmHg, a rozkurczowego 131,1 mmHg. Wartość średniego ciśnienia skurczowego podniosła się o 25,5 mmHg (21,1%) w stosunku do pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 121,1 mmHg), a średniego ciśnienia rozkurczowego o 43,7 mmHg (50,0%) w stosunku do wartości średniej z pierwszego dnia eksperymentu (pomiar „zero”: 87,4 mmHg).

Najwyższe średnie wartości jakie osiągnięto w tym modelu dla ciśnienia skurczowego wyniosły 180,4 mmHg – wzrost o 59,3 mmHg (49,0%), a dla ciśnienia rozkurczowego 146,9 mmHg – wzrost o 59,5 mmHg (68,1%).

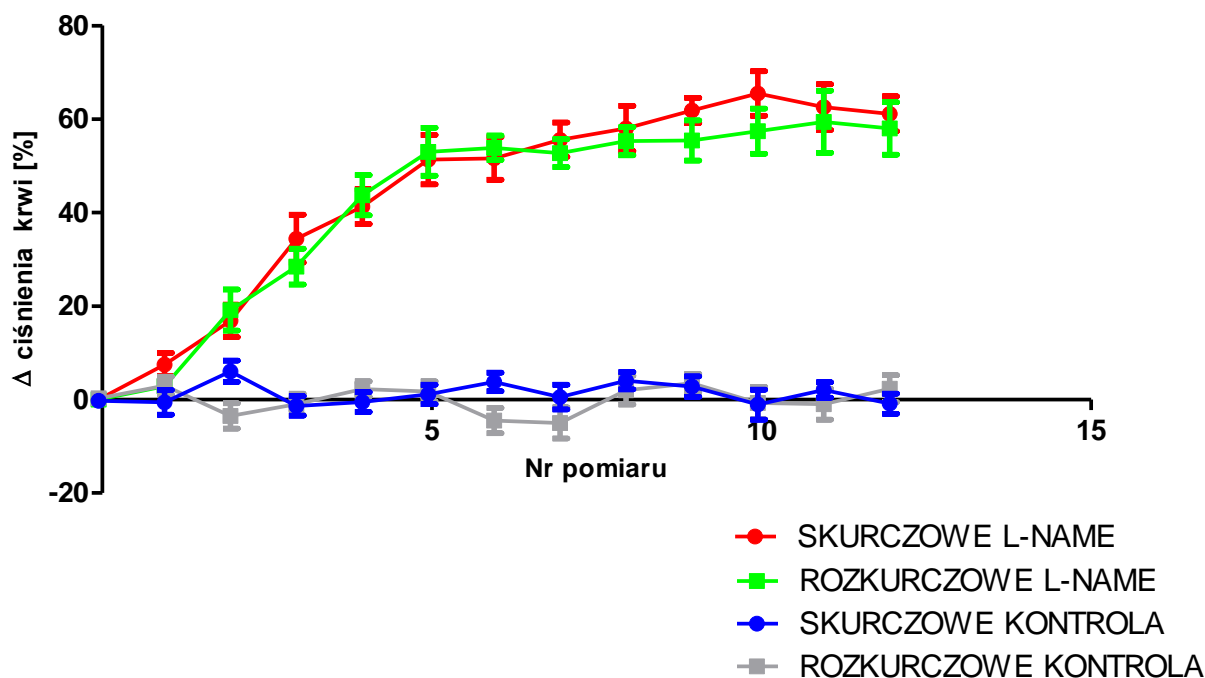
Na wykresie przedstawiono procentową zmianę skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w modelu DOCA i w grupie kontrolnej w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” (ryc. 7).

Tabela 12. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		I	III	V	VII	IX	XII	XV	XVII	XIX	XXI	XXIII	XXVI	XXVIII	
KONTROLA	Skurczowe	Średnia ± SEM	120,2 ± 4,1	119,9 ± 3,4	127,3 ± 5,2	118,7 ± 4,8	119,8 ± 7,1	121,5 ± 7,3	125,6 ± 6,9	120,7 ± 4,4	124,9 ± 7,3	123,1 ± 4,9	120,9 ± 2,7	122,9 ± 8,5	119,4 ± 6,8
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	93,4 ± 3,1	96,7 ± 7,7	88,2 ± 4,9	87,9 ± 3,5	95,3 ± 6,9	91,3 ± 3,8	90,9 ± 5,8	85,9 ± 6,3	95,1 ± 8,5	98,3 ± 7,4	92,4 ± 5,8	91,2 ± 7,3	95,6 ± 5,2
L-NAME	Skurczowe	Średnia ± SEM	121,1 ± 2,8	118,1 ± 1,7	129,0 ± 2,0	146,6 ± 3,2 *1)	153,4 ± 2,5 *	166,7 ± 3,5 ***	163,7 ± 3,9 ***	167,7 ± 3,2 ***	170,1 ± 3,5 ***	174,0 ± 3,2 ***	180,4 ± 4,1 ***	174,7 ± 4,2 ***	173,3 ± 3,0 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	87,4 ± 4,2	90,3 ± 4,3	106,6 ± 2,2	115,9 ± 3,5	131,1 ± 4,2 *	144,3 ± 4,5 ***	141,3 ± 3,0 ***	140,1 ± 3,8 ***	142,7 ± 3,8 ***	142,9 ± 4,1 ***	144,9 ± 4,2 ***	146,9 ± 5,8 ***	145,4 ± 4,5 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett’a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 7. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla modelu L-NAME i grupy kontrolnej

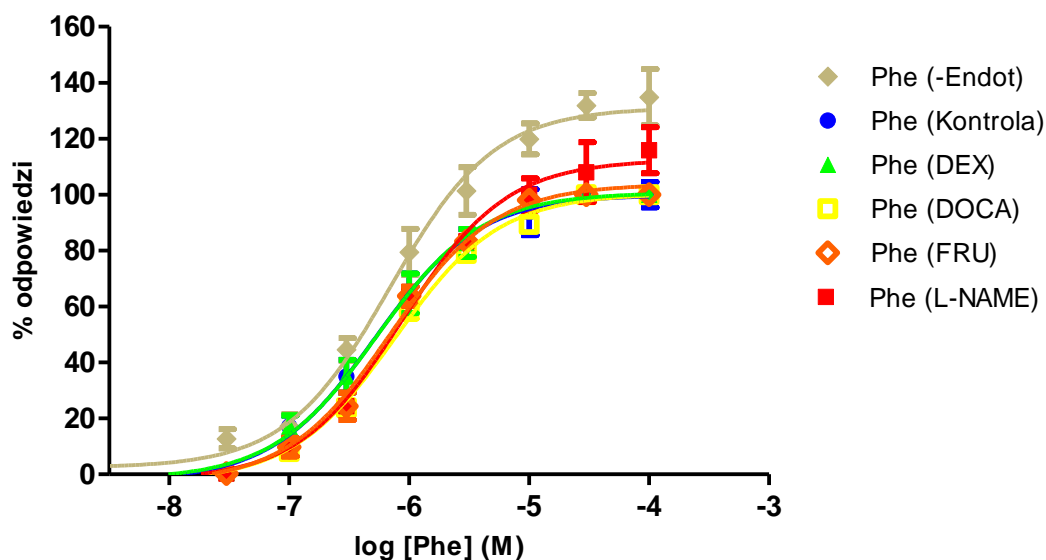
6.1.2. Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na śródbłonek aorty

Na wykresach przedstawiono zależność dawka – odpowiedź (log ze stężenia badanej substancji do odpowiedzi wyrażonej w procentach, jaka wystąpiła po zadziałaniu substancji na śródbłonek izolowanej aorty). Każdy punkt przedstawiono jako średnią \pm SEM.

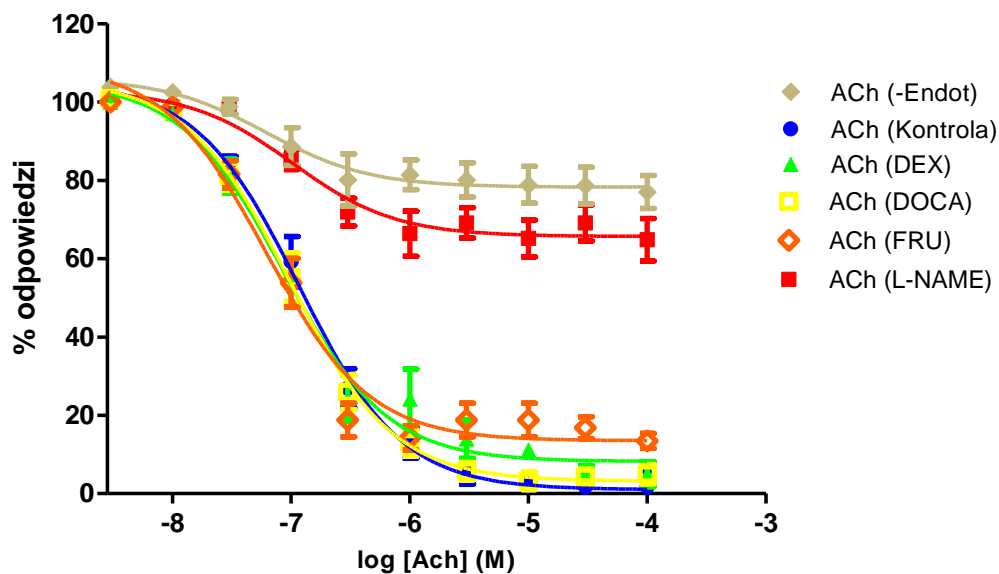
Na pierwszym wykresie (ryc. 8) oceniono kurczliwość aorty pod wpływem fenylefryny. Przebieg krzywej w każdym z modeli był porównywalny z kontrolą. Jedynie w **modelu L-NAME** zaobserwowano nieznaczny, 13% wzrost odpowiedzi skurczowej aorty pod wpływem fenylefryny. W żadnym z modeli nie odnotowano wzmożonej kurczliwości

aorty pod wpływem fenylefryny, zbliżonej do kurczliwości aorty z mechanicznie usuniętym śródbłonkiem, w przypadku której obserwowano 32% wzrost odpowiedzi skurczowej.

Wykorzystując izolowane aorty, będące w stanie submaksymalnego skurczu indukowanego fenylefryną, dokonano oceny czynnościowego stanu śródbłonka. W tym celu oceniono zależny od NO rozkurcz mięśniówki gładkiej aorty, pod wpływem acetylocholiny, podawanej w rosnących stężeniach (0,01-10 μM). Dla porównania testowany był również rozkurcz aorty mechanicznie pozbawionej śródbłonka. Wyniki przedstawiono na kolejnym wykresie (ryc. 9). W przypadku aort mechanicznie pozbawionych endothelium obserwowano znacznego stopnia upośledzoną funkcję rozkurczową. Wspomniane aorty rozkurczały się jedynie w 20%. Aorty pochodzące od szczurów z **modelu L-NAME** również wykazywały znacznego stopnia upośledzoną funkcję rozkurczową, rozkurczając się zaledwie w 32%. Nieznacznie upośledzoną funkcję rozkurczową obserwowano w aortach pochodzących od szczurów **modelu FRU** (rozkurcz w 81,8%) oraz w aortach pochodzących od szczurów **modelu DEX** (rozkurcz 89,6%). W przypadku aort pobranych od szczurów z **modelu DOCA** obserwowano pełną relaksację mięśniówki gładkiej indukowanej acetylocholimą.



Rycina 8. Skurcz izolowanej aorty pod wpływem fenylefryny



Rycina 9. Rozkurcz izolowanej aorty pod wpływem acetylocholinyl

6.1.3. Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na profil lipidowy

W każdym z modeli, tj. **modelu DEX**, **modelu DOCA**, **modelu FRU** oraz **modelu L-NAME** wystąpiły znamienne statystycznie zmiany w stężeniach poszczególnych składowych osoczowego profilu lipidowego w odniesieniu do grup kontrolnych.

W **modelu DEX** wystąpił wzrost stężenia cholesterolu całkowitego o 0,72 mmol/l (38,9%), spadek stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,52 mmol/l (45,6%), wzrost stężenia frakcji LDL cholesterolu o 1,09 mmol/l (178,9%) oraz wzrost stężenia trójglicerydów o 0,36 mmol/l (78,2%).

W **modelu DOCA** wyidukowano wzrost stężenia cholesterolu całkowitego o 0,31 mmol/l (15,3%), spadek stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,26 mmol/l (29,9%), wzrost stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,53 mmol/l (77,9%) oraz wzrost stężenia trójglicerydów o 0,23 mmol/l (51,1%).

W **modelu FRU** wywołano wzrost stężenia cholesterolu całkowitego o 0,50 mmol/l (29,6%), spadek stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,28 mmol/l (29,2%), wzrost stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,21 mmol/l (30,0%) oraz wzrost stężenia trójglicerydów o 0,78 mmol/l (144,4%).

W modelu L-NAME wystąpił wzrost stężenia cholesterolu całkowitego o 0,21 mmol/l (12,0%), spadek stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,38 mmol/l (52,8%), wzrost stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,39 mmol/l (75,0%) oraz wzrost stężenia trójglicerydów o 0,45 mmol/l (77,6%).

Wyniki zostały przedstawione w tabeli nr 13 (tab. 13) i na rycinie nr 10 (ryc. 10).

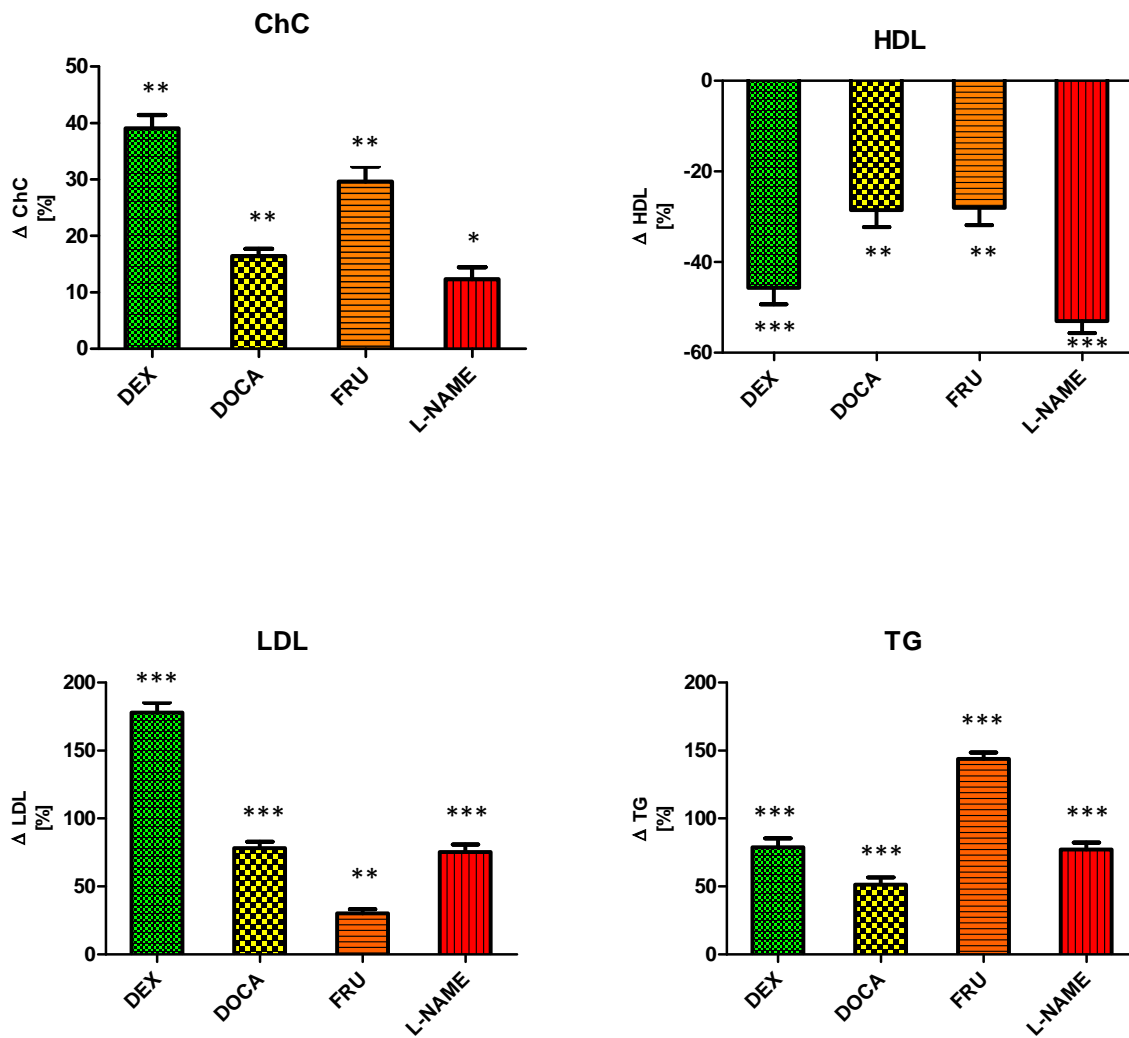
Tabela 13. Zmiany w poszczególnych frakcjach lipidowych w osoczu szczurów po indukcji nadciśnienia tętniczego w modelach doświadczalnych

ChC – cholesterol całkowity, HDL – frakcja cholesterolu o wysokiej gęstości, LDL – frakcja cholesterolu o niskiej gęstości, TG – trójglicerydy

Związek	Stężenie poszczególnych frakcji lipidowych [mmol/l]			
	średnia ± SEM			
	ChC	HDL	LDL	TG
Kontrola DEX	1,85 ± 0,09	1,14 ± 0,08	0,61 ± 0,04	0,46 ± 0,03
DEX	2,57 ± 0,10 *** ¹⁾	0,62 ± 0,03 ***	1,70 ± 0,08 ***	0,82 ± 0,03 ***
Kontrola DOCA	2,02 ± 0,06	0,87 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,45 ± 0,02
DOCA	2,33 ± 0,09 **	0,61 ± 0,03 ***	1,21 ± 0,05 ***	0,68 ± 0,03 ***
Kontrola FRU	1,69 ± 0,07	0,96 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,54 ± 0,03
FRU	2,19 ± 0,13 **	0,68 ± 0,05 ***	0,91 ± 0,08 ***	1,32 ± 0,11 ***
Kontrola L-NAME	1,75 ± 0,08	0,72 ± 0,03	0,52 ± 0,04	0,58 ± 0,03
L-NAME	1,96 ± 0,11 *	0,34 ± 0,06 ***	0,91 ± 0,09 ***	1,03 ± 0,09 ***

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 10. Procentowa zmiana poziomu osoczowych frakcji lipidowych w modelach w odniesieniu do kontroli czystej

6.1.4. Wpływ indukcji nadciśnienia tętniczego na profil węglowodanowy

We wszystkich modelach: **modelu DEX**, **modelu DOCA**, **modelu FRU** oraz **modelu L-NAME** wystąpił wzrost osoczowego stężenia glukozy w odniesieniu do grup kontrolnych, jednakże tylko w modelu DEX i modelu L-NAME wzrost ten był istotny statystycznie.

Model DEX i **model L-NAME** indukowały statystycznie istotny wzrost stężenia glukozy, odpowiednio o 1,71 mmol/l (38,3%) oraz o 0,89 mmol/l (17,0%).

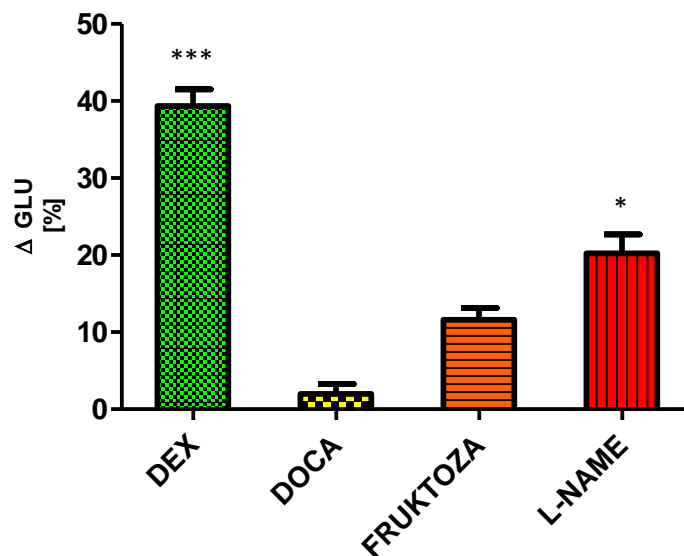
Wyniki zostały przedstawione w tabeli nr 14 (tab. 14) i na rycinie nr 11 (ryc. 11).

Tabela 14. Wpływ badanych związków na osoczowy poziom glukozy po indukcji nadciśnienia tętniczego

Związek	Stężenie glukozy [mmol/l]
	średnia ± SEM
Kontrola DEX	4,47 ± 0,19
DEX	6,18 ± 0,23 *** ¹⁾
Kontrola DOCA	5,14 ± 0,17
DOCA	5,40 ± 0,29
Kontrola FRUKTOZA	4,93 ± 0,14
FRUKTOZA	5,43 ± 0,24
Kontrola L-NAME	5,24 ± 0,23
L-NAME	6,13 ± 0,36 *

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 11. Procentowa zmiana osoczowego poziomu glukozy w modelach w odniesieniu do kontroli czystej

6.2. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków o właściwościach α_1 -adrenolitycznych oraz związku referencyjnego (prazosyny) w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego (model L-NAME)

6.2.1. Ocena aktywności hipotensyjnej

W wywołanym wg modelu L-NAME nadciśnieniu tętniczym, ciśnienie skurczowe u szczurów osiągnęło wartości od 159,1 do 171,8 mmHg, natomiast rozkurczowe od 125,2 do 139,3 mmHg, w zależności od grupy badanej. Po indukcji nadciśnienia, przewlekłe dootrzewnowo podawano badane związki i oceniano ich potencjał hipotensyjny. Za dzień I eksperymentu, nazwany pomiarem „zero” przyjęto dzień, w którym zakończono indukcję nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME i rozpoczęto podawanie badanych związków.

Wszystkie związki w podobnym stopniu jak związek odniesienia – **prazosyna**, obniżały wydrukowane nadciśnienie tętnicze. Znamiennej statystycznie spadek ciśnienia skurczowego dla **prazosyny** oraz związków **MH-2, MH-99, EP-47, EP-49, EP-58** nastąpił podczas 3 pomiaru ciśnienia – w VI dniu podawania dootrzewnowego, a dla związków **MH-3** oraz **EP-46** podczas 2 pomiaru – w IV dniu podawania dootrzewnowego. Ciśnienie skurczowe zostało wówczas obniżone: dla prazosyny o 21,7 mmHg (13,4%), dla związku MH-2 o 15,5 mmHg (9,0%), dla związku MH-3 o 11,9 mmHg (7,1%), dla związku MH-99 o 20,0 mmHg (12,1%), dla związku EP-46 o 15,2 mmHg (8,7%), dla związku EP-47 o 19,8 mmHg (11,6%), dla związku EP-49 o 22,8 mmHg (14,3%), dla związku EP-58 o 32,2 mmHg (19,2%).

Znamiennej statystycznie spadek ciśnienia rozkurczowego dla **prazosyny** oraz związków **MH-2, MH-3, MH-99, EP-47, EP-58** nastąpił podczas 4 pomiaru – w VIII dniu podawania dootrzewnowego, a dla związków **EP-46** oraz **EP-49** podczas 3 pomiaru – w VI dniu podawania dootrzewnowego. Ciśnienie rozkurczowe zostało obniżone: dla prazosyny o 17,7 mmHg (13,4%), dla związku MH-2 o 13,5 mmHg (9,8%), dla związku MH-3 o 13,0 mmHg (10,2%), dla związku MH-99 o 17,9 mmHg (14,3%), dla związku EP-46 o 11,2 mmHg (8,0%), dla związku EP-47 o 10,0 mmHg (7,5%), dla związku EP-49 o 16,1 mmHg (12,6%), dla związku EP-58 o 17,5 mmHg (13,0%).

W grupie kontrolnej dla modelu L-NAME nie odnotowano żadnych istotnych zmian w zakresie wartości ciśnienia tętniczego.

Wyniki średnich wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego uzyskane w trakcie podawania badanych związków zestawiono w tabelach, a średnią zmianę ciśnienia skurczowego i rozkurczowego wyrażoną w % zilustrowano na rycinach:

- **Kontrola** : tabela nr 15 (tab. 15), rycina nr 12 (ryc. 12),
- **Prazosyna**: tabela nr 16 (tab. 16), rycina nr 13 (ryc. 13),
- **MH-2**: tabela nr 17 (tab. 17), rycina nr 14 (ryc. 14),
- **MH-3**: tabela nr 18 (tab. 18), rycina nr 15 (ryc. 15),
- **MH-99**: tabela nr 19 (tab. 19), rycina nr 16 (ryc. 16),
- **EP-46**: tabela nr 20 (tab. 20), rycina nr 17 (ryc. 17),
- **EP-47**: tabela nr 21 (tab. 21), rycina nr 18 (ryc. 18),
- **EP-49**: tabela nr 22 (tab. 22), rycina nr 19 (ryc. 19),

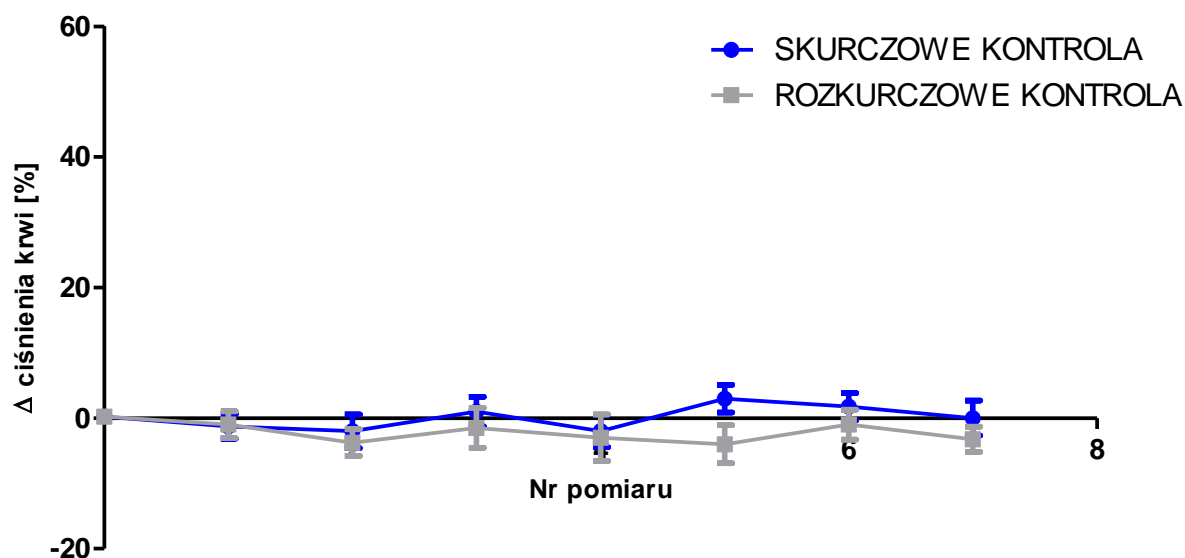
Tabela 15. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane w kontroli modelu L-NAME w trakcie przewlekłego podawania dootrzewnowego badanych związków

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
KONTROLA MODELU L-NAME	Skurczowe	Średnia ± SEM	158,9 ± 1,4	157,4 ± 2,8	154,9 ± 3,0	160,4 ± 1,4	157,0 ± 2,5	162,1 ± 3,2	160,5 ± 2,1	159,0 ± 1,9
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	131,2 ± 3,1	130,0 ± 2,7	127,9 ± 2,4	130,2 ± 1,8	128,3 ± 2,1	127,5 ± 2,5	130,8 ± 1,7	128,4 ± 2,2

1) Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001

KONTROLA MODELU L-NAME



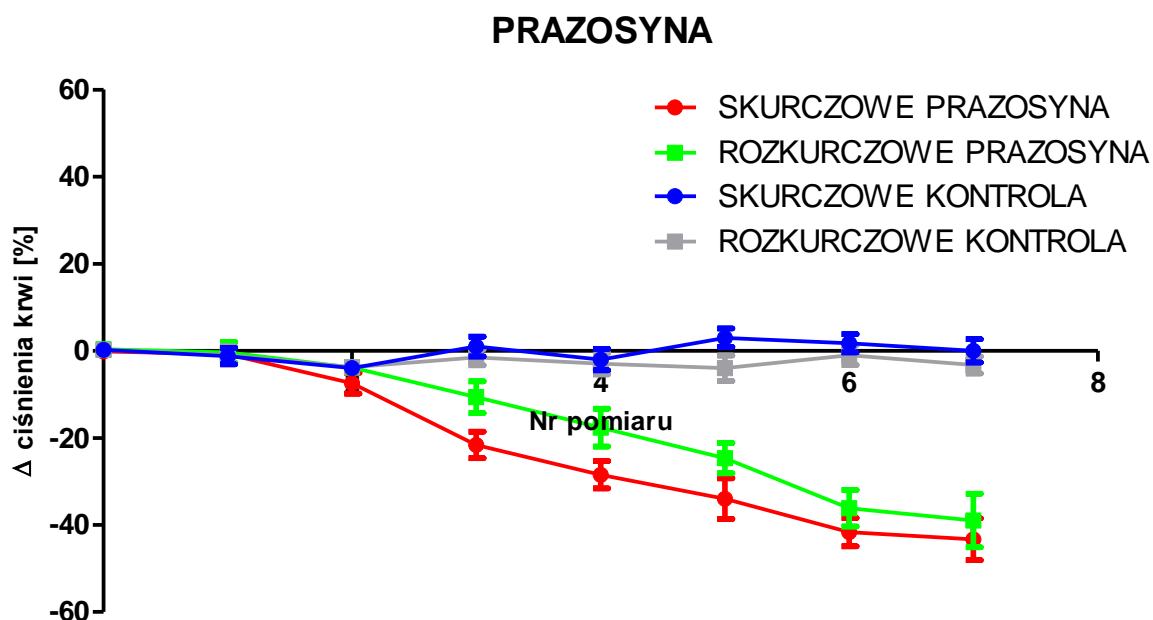
Rycina 12. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej modelu L-NAME

Tabela 16. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **prazosyny** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	8
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
PRAZOSYNA	Skurczowe	Średnia ± SEM	162,5 ± 3,2	161,7 ± 3,1	155,0 ± 2,9	140,8 ± 1,9 ****1)	134,0 ± 2,3 ***	128,5 ± 2,3 ***	120,8 ± 2,5 ***	119,2 ± 2,2 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	132,0 ± 2,9	131,7 ± 3,0	128,2 ± 3,0	121,3 ± 3,2	114,3 ± 2,5 ***	107,3 ± 2,8 ***	95,8 ± 2,9 ***	93,0 ± 2,6 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



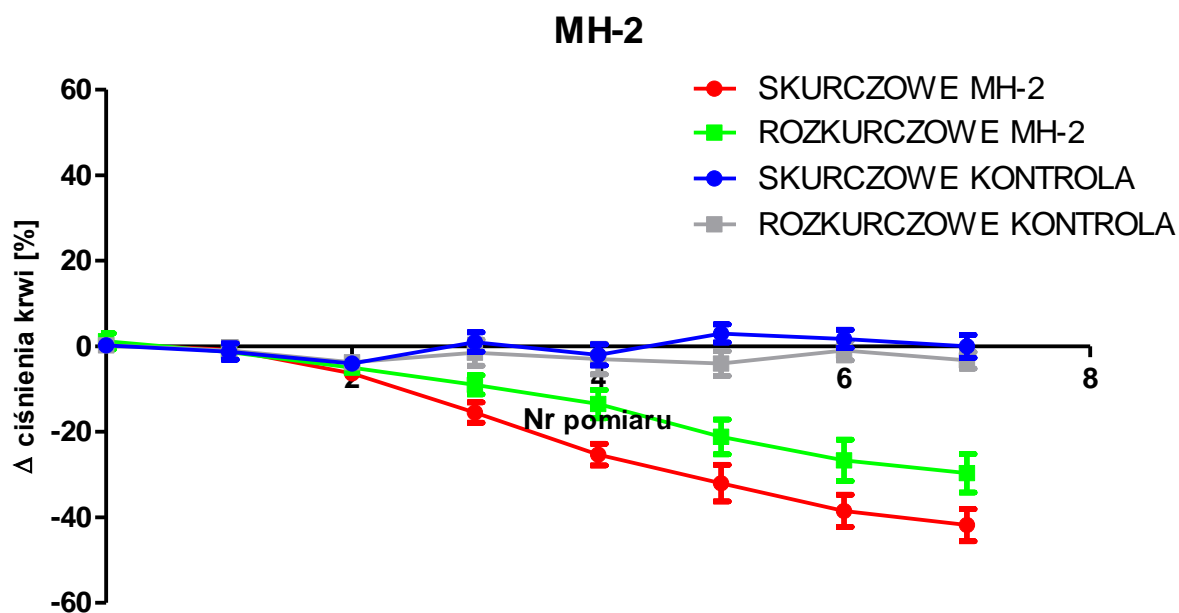
Rycina 13. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **prazosyny** w modelu L-NAME

Tabela 17. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **MH-2** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	8
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
MH-2	Skurczowe	Średnia ± SEM	171,8 ± 2,5	170,5 ± 2,4	165,5 ± 2,8	156,3 ± 2,4 *** ¹⁾	146,5 ± 1,5 ***	139,8 ± 1,6 ***	133,3 ± 1,5 ***	130,0 ± 1,7 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	138,0 ± 3,2	136,7 ± 2,8	133,0 ± 2,4	129,0 ± 2,4	124,5 ± 3,0 *	116,8 ± 4,2 ***	111,3 ± 2,6 ***	108,3 ± 4,3 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



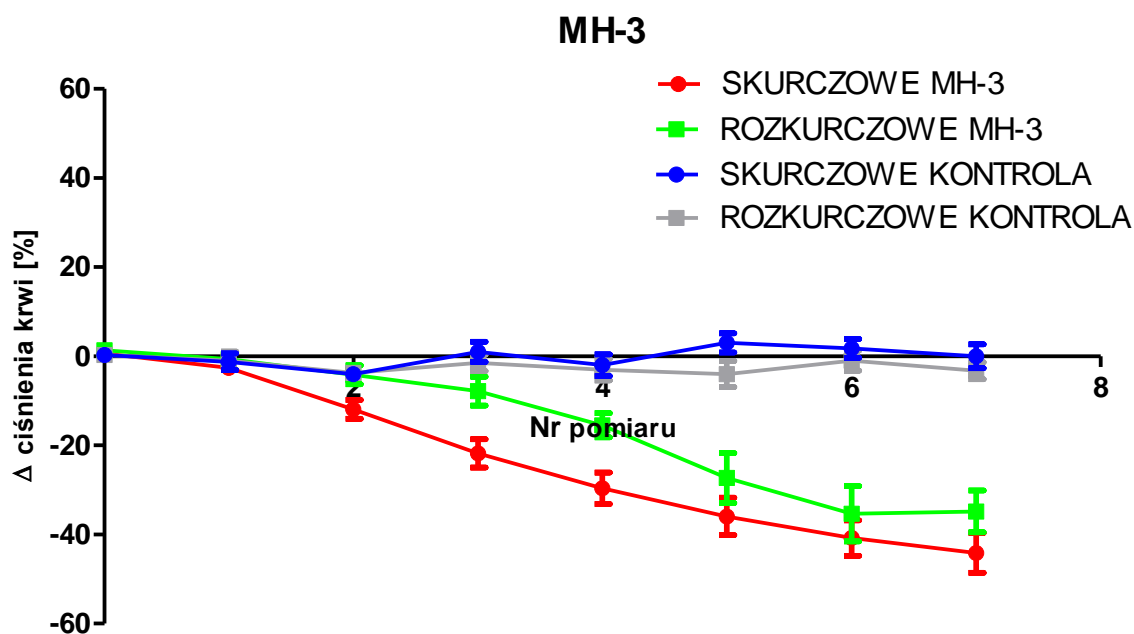
Rycina 14. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **MH-2** w modelu L-NAME

Tabela 18. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **MH-3** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
MH-3	Skurczowe	Średnia ± SEM	167,0 ± 3,6	164,4 ± 3,1	155,1 ± 2,2 ** ¹⁾	145,2 ± 1,2 ***	137,3 ± 0,7 ***	131,0 ± 1,1 ***	126,2 ± 1,5 ***	122,8 ± 1,9 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	128,0 ± 3,8	127,3 ± 3,4	123,8 ± 3,5	120,2 ± 3,1	115,0 ± 3,8 ***	100,7 ± 5,1 ***	92,7 ± 5,0 ***	93,2 ± 2,9 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



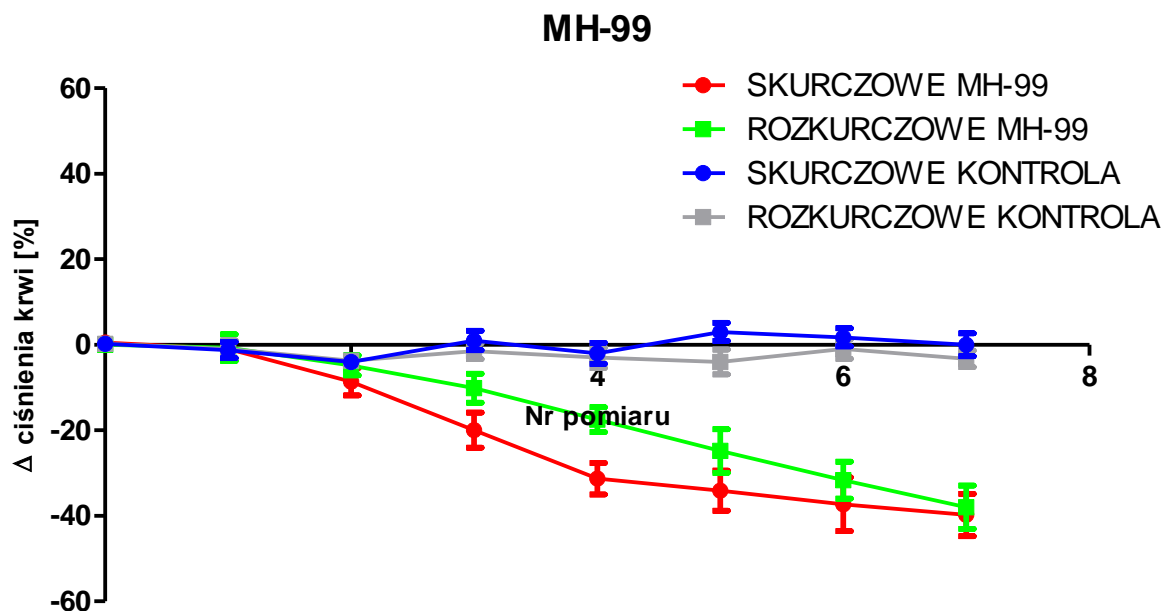
Rycina 15. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **MH-3** w modelu L-NAME

Tabela 19. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **MH-99** w modelu L-NAME

	Nr pomiaru	Dzień eksperymentu	0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
MH-99	Skurczowe	Średnia ± SEM	165,0 ± 4,3	164,0 ± 4,4	156,3 ± 4,0	145,0 ± 4,1 **1)	133,7 ± 4,1 ***	130,8 ± 2,9 ***	127,7 ± 2,4 ***	125,2 ± 2,2 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	125,6 ± 3,1	122,5 ± 2,9	118,3 ± 3,0	115,0 ± 2,7	107,7 ± 4,1 **	100,3 ± 2,9 ***	97,5 ± 2,8 ***	88,7 ± 2,6 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



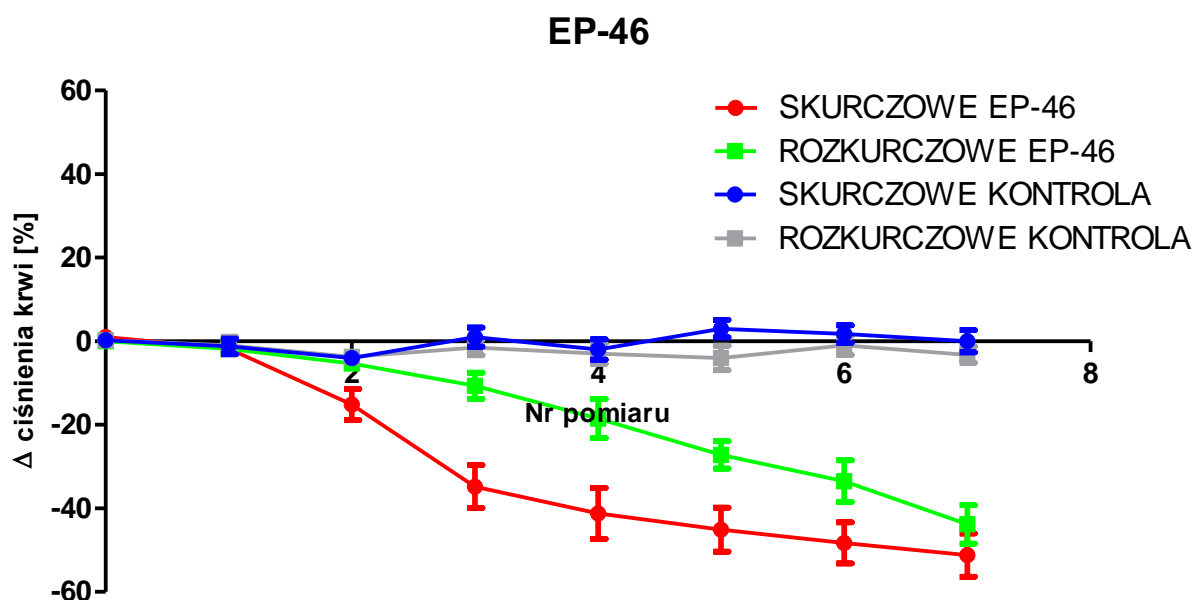
Rycina 16. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **MH-99** w modelu L-NAME

Tabela 20. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **EP-46** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
EP-46	Skurczowe	Średnia ± SEM	175,1 ± 4,5	173,4 ± 4,3	159,9 ± 2,9 **1)	140,3 ± 1,8 ***	133,9 ± 2,3 ***	128,5 ± 1,4 ***	126,8 ± 1,2 ***	123,9 ± 3,4 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	139,3 ± 2,3	137,5 ± 2,0	134,0 ± 1,9	128,7 ± 2,7 *	120,8 ± 2,1 ***	112,2 ± 2,8 ***	105,8 ± 2,3 ***	95,5 ± 3,5 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



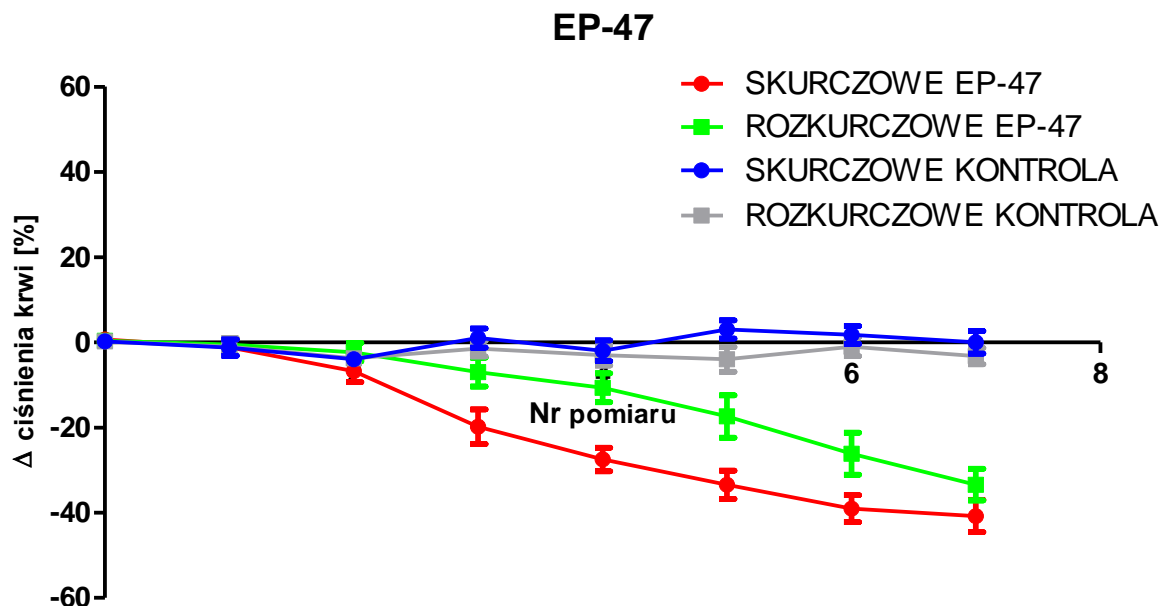
Rycina 17. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **EP-46** w modelu L-NAME

Tabela 21. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **EP-47** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
EP-47	Skurczowe	Średnia ± SEM	170,7 ± 2,5	169,6 ± 3,0	162,6 ± 3,1	150,9 ± 2,7 *** ¹⁾	143,2 ± 1,2 ***	137,3 ± 3,1 ***	131,7 ± 4,2 ***	130,0 ± 4,0 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	134,0 ± 2,7	133,5 ± 2,4	131,7 ± 2,0	129,2 ± 3,1	124,0 ± 2,2 **	119,4 ± 2,4 ***	107,8 ± 2,7 ***	100,6 ± 3,6 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



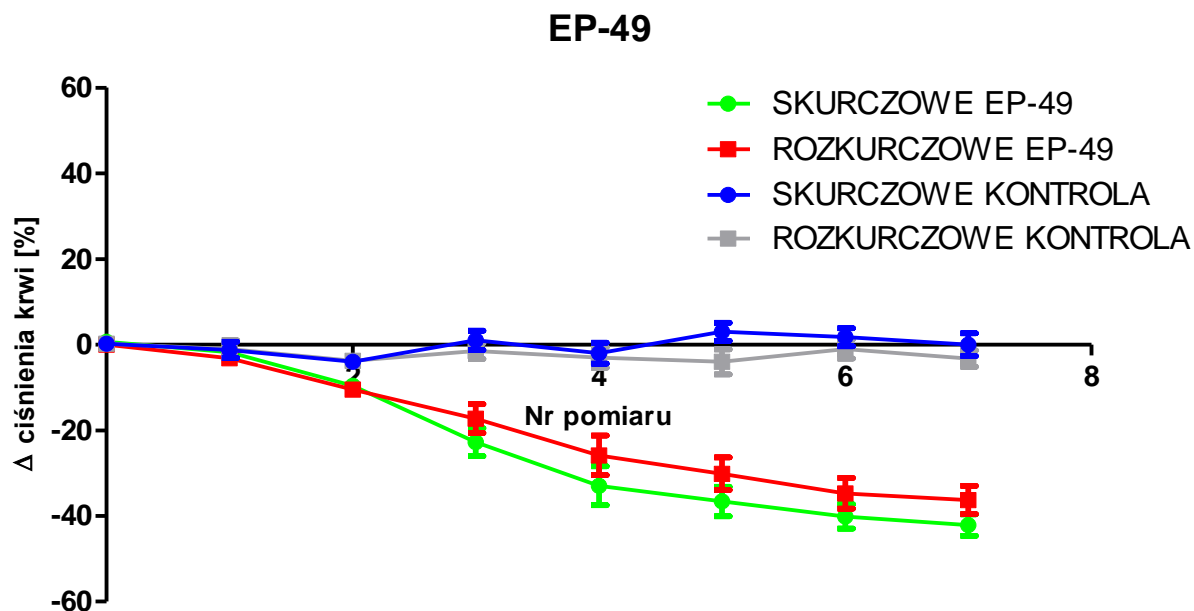
Rycina 18. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **EP-47** w modelu L-NAME

Tabela 22. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **EP-49** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
EP-49	Skurczowe	Średnia ± SEM	159,1 ± 2,1	157,4 ± 2,5	149,6 ± 2,3	136,3 ± 3,8 *** ¹⁾	126,2 ± 4,4 ***	124,5 ± 2,9 ***	119,0 ± 2,2 ***	117,0 ± 1,8 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	127,3 ± 4,1	124,0 ± 2,7	116,8 ± 3,1	111,2 ± 2,4 *	103,7 ± 2,7 ***	98,8 ± 2,6 ***	94,0 ± 2,8 ***	92,2 ± 3,1 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05; ** p < 0,02; *** p < 0,001



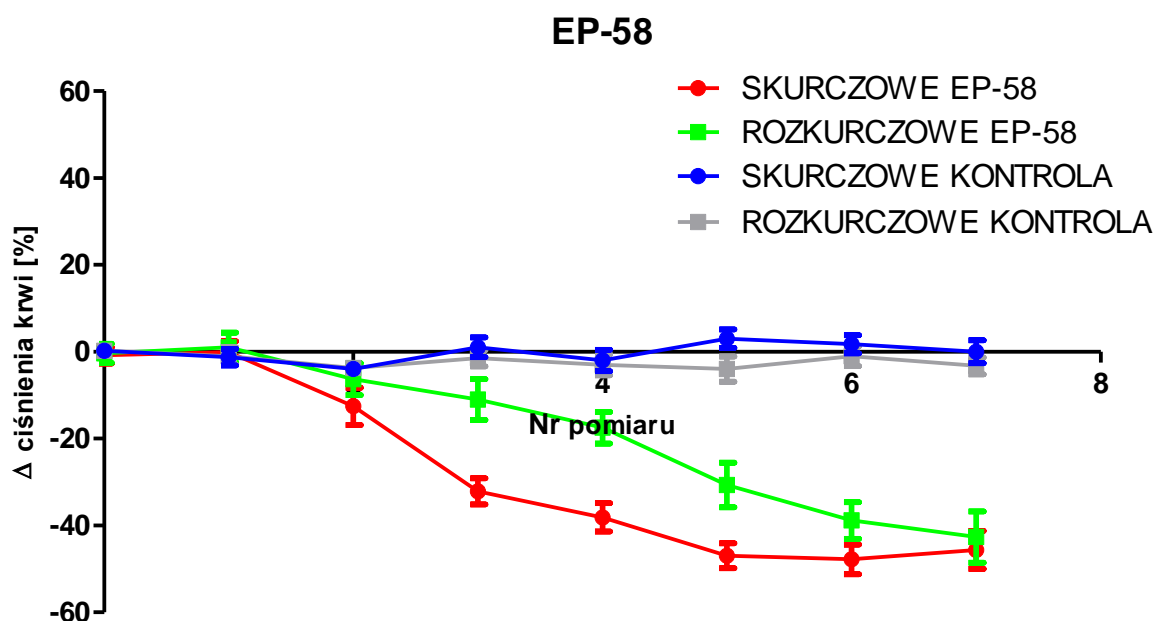
Rycina 19. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **EP-49** w modelu L-NAME

Tabela 23. Wartości średnie ciśnienia krwi [mmHg] uzyskane po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym **EP-58** w modelu L-NAME

Nr pomiaru	Dzień eksperymentu		0	1	2	3	4	5	6	7
			I	II	IV	VI	VIII	X	XII	XIV
EP-58	Skurczowe	Średnia ± SEM	167,5 ± 2,9	167,4 ± 2,3	154,9 ± 3,7	135,3 ± 1,7 **1)	129,3 ± 0,6 ***	120,5 ± 0,9 ***	119,7 ± 1,3 ***	121,8 ± 2,3 ***
	Rozkurczowe	Średnia ± SEM	134,2 ± 3,5	135,2 ± 2,0	127,8 ± 2,4	123,2 ± 3,0	116,7 ± 4,4 **	103,5 ± 4,9 ***	95,5 ± 3,4 ***	91,5 ± 3,1 ***

¹⁾ Znamienność wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a, w oparciu o wartości średnie ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero”

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



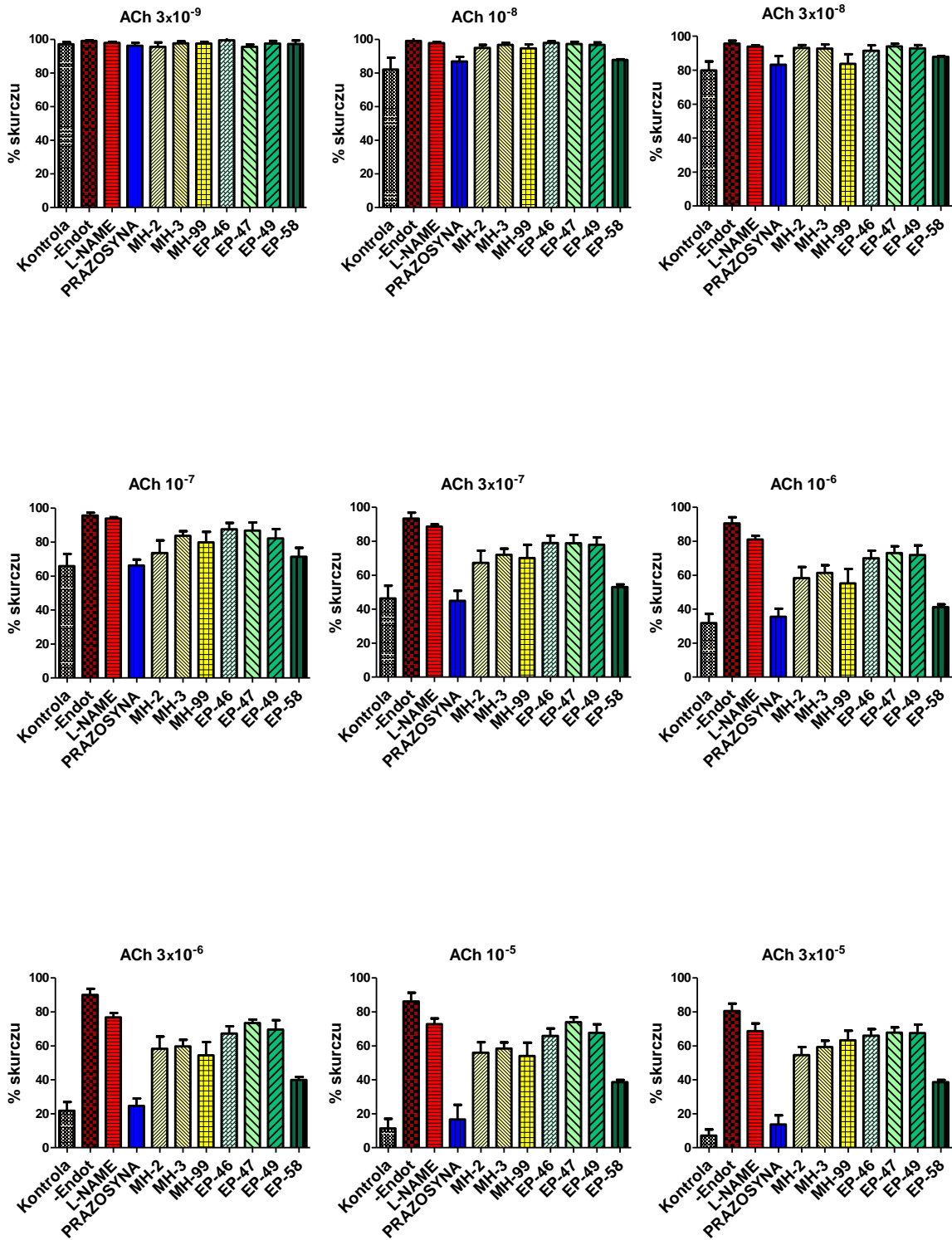
Rycina 20. Procentowa zmiana skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi w odniesieniu do pomiaru z dnia „zero” dla grupy kontrolnej i po przewlekłym podawaniu dootrzewnowym związku **EP-58** w modelu L-NAME

6.2.2. Ocena funkcji rozkurczowych aorty

Czynnościowy stan śródbłónka oceniono na podstawie zależnego od NO rozkurczu naczyń, wywołanego przez acetylocholiny podawaną, w rosnących stężeniach, do przykurczonych submaksymalnie fenylefryną aort, dla których wartość maksymalną skurczu przyjęto za 100%.

Na wykresach porównano wartości procentowe skurczu mięśniówki gładkiej izolowanych aort w poszczególnych grupach, pod wpływem wzrastających stężeń acetylocholiny, osiągniętych w naczynkach termostatowanych (*ang. Organ Bath*), które wynosiły: 3×10^{-9} M, 10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M. Aorty wyizolowane od zwierząt z poszczególnych grup rozkurczały się w różnym zakresie, w miarę podawania wzrastających stężeń acetylocholiny. Na końcu eksperymentu przy stężeniu acetylocholiny wynoszącym 3×10^{-5} M porównano efekt rozkurczu aort. Aorty po mechanicznym usunięciu endotelium rozkurczyły się średnio w 19,5%, aorty pochodzące od szczurów z modelu L-NAME w 31,2%, a aorty pochodzące od szczurów kontrolnych w 92,9%. Rozkurcz aort dla badanych związków podawanych w modelu nadciśnienia L-NAME wyniósł odpowiednio: **prazosyna** – 86,4%, **MH-2** – 45,3%, **MH-3** – 40,7%, **MH-99** – 36,6%, **EP-46** – 34%, **EP-47** – 32%, **EP-49** – 33%, **EP-58** – 61,4%.

Wartości procentowe skurczu aorty obserwowane w trakcie podawania rosnących stężeń acetylocholiny przedstawiono na wykresach zamieszczonych na rycinie nr 21 (ryc. 21).



Rycina 21. Procentowy skurcz izolowanej aorty pod wpływem rosnących stężeń acetylocholiny

6.2.3. Ocena parametrów profilu lipidowego

Związek odniesienia – **prazosyna** oraz związki: **MH-2**, **MH-3**, **MH-99**, **EP-46**, **EP-47**, **EP-49** oraz **EP-58** podawane przewlekle przez okres 14 dni szczurom, u których uprzednio wywołano nadciśnienie tętnicze wg modelu L-NAME wpływały na stężenia poszczególnych składowych osoczonego profilu lipidowego w odniesieniu do szczurów kontrolnych modelu L-NAME.

Żaden ze związków nie wywołał istotnego statystycznie spadku stężenia cholesterolu całkowitego.

Związek odniesienia **prazosyna** wywołał istotne statystycznie: wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,17 mmol/l (44,7%), spadek stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,34 mmol/l (37,4%) oraz spadek stężenia trójglicerydów o 0,35 mmol/l (34,0%).

Związek **MH-2** powodował istotne statystycznie: wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,12 mmol/l (31,6%) oraz spadek stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,21 mmol/l (23,1%). Nie wpływał znamienne na stężenie trójglicerydów.

Związek **MH-3** wywołał istotne statystycznie: spadek stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,26 mmol/l (28,6%) oraz spadek stężenia trójglicerydów o 0,28 mmol/l (27,2%). Nieznamienne podnosił stężenie frakcji HDL cholesterolu.

Związek **MH-99** powodował istotne statystycznie: wzrost stężenia frakcji HDL cholesterolu o 0,14 mmol/l (36,8%) oraz spadek stężenia trójglicerydów o 0,33 mmol/l (32,0%). Nieznamienne statystycznie obniżał stężenie frakcji LDL cholesterolu.

Związki **EP-46**, **EP-47**, **EP-49** nie powodowały statystycznie istotnych zmian w zakresie stężeń osoczonego profilu lipidowego.

Związek **EP-58** indukował istotne statystycznie: spadek stężenia frakcji LDL cholesterolu o 0,20 mmol/l (22,0%) oraz spadek stężenia trójglicerydów o 0,27 mmol/l (26,2%). Nie wpływał znacząco na stężenie frakcji HDL cholesterolu.

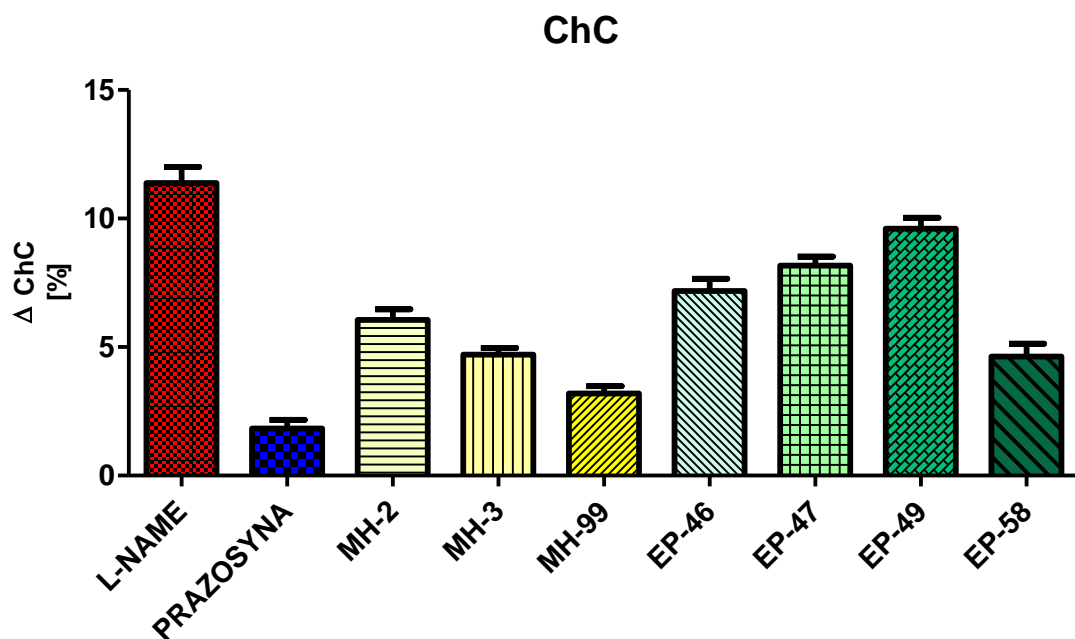
Wyniki zostały przedstawione w tabeli nr 24 (tab. 24) i na rycinach: nr 22 – dla cholesterolu całkowitego (ryc. 22), nr 23 – dla cholesterolu frakcji HDL (ryc. 23), nr 24 – dla cholesterolu frakcji LDL (ryc. 24), nr 25 – dla trójglicerydów (ryc. 25).

Tabela 24. Wpływ badanych związków na osoczowy poziom poszczególnych frakcji lipidowych po indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME

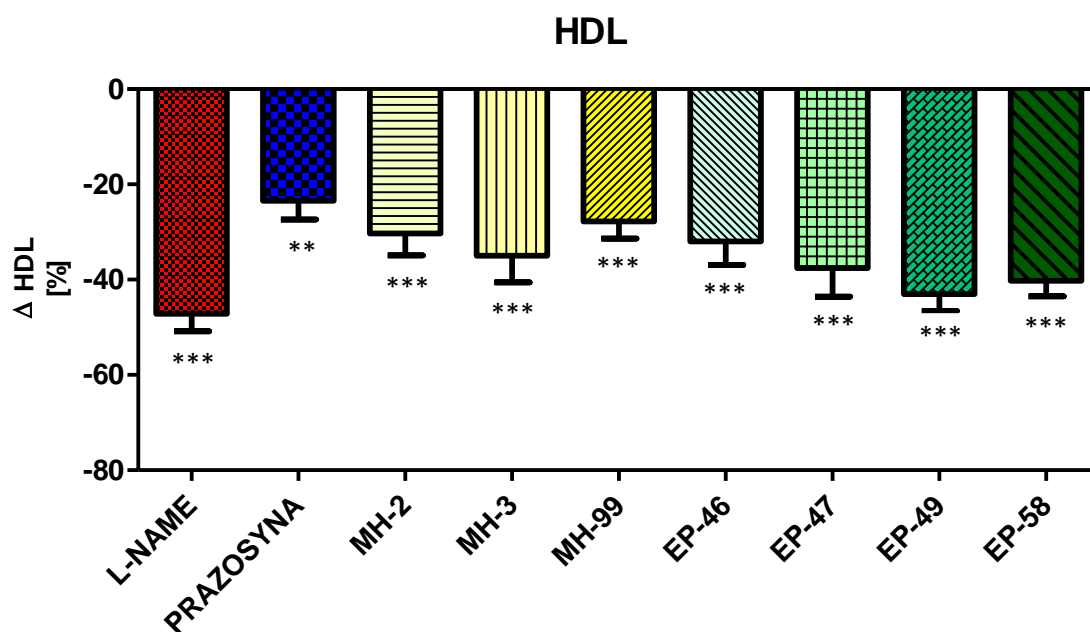
Grupa doświadczalna	Stężenie poszczególnych frakcji lipidowych [mmol/l]			
	średnia ± SEM			
	ChC	HDL	LDL	TG
Kontrola	1,76 ± 0,06	0,72 ± 0,03 *** ¹⁾	0,48 ± 0,05 ***	0,58 ± 0,04 ***
L-NAME	1,95 ± 0,10	0,38 ± 0,04	0,91 ± 0,03	1,03 ± 0,03
PRAZOSYNA	1,80 ± 0,04	0,55 ± 0,06 **	0,57 ± 0,05 ***	0,68 ± 0,07 **
MH-2	1,87 ± 0,04	0,50 ± 0,06 *	0,70 ± 0,07 *	0,77 ± 0,09
MH-3	1,85 ± 0,06	0,47 ± 0,08	0,65 ± 0,08 **	0,75 ± 0,06 *
MH-99	1,82 ± 0,07	0,52 ± 0,07 *	0,68 ± 0,09 *	0,70 ± 0,07 **
EP-46	1,91 ± 0,08	0,49 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,78 ± 0,04
EP-47	1,90 ± 0,067	0,45 ± 0,05	0,75 ± 0,10	0,80 ± 0,07
EP-49	1,93 ± 0,10	0,41 ± 0,07	0,81 ± 0,07	0,86 ± 0,06
EP-58	1,84 ± 0,07	0,43 ± 0,08	0,71 ± 0,10 *	0,76 ± 0,05 *

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

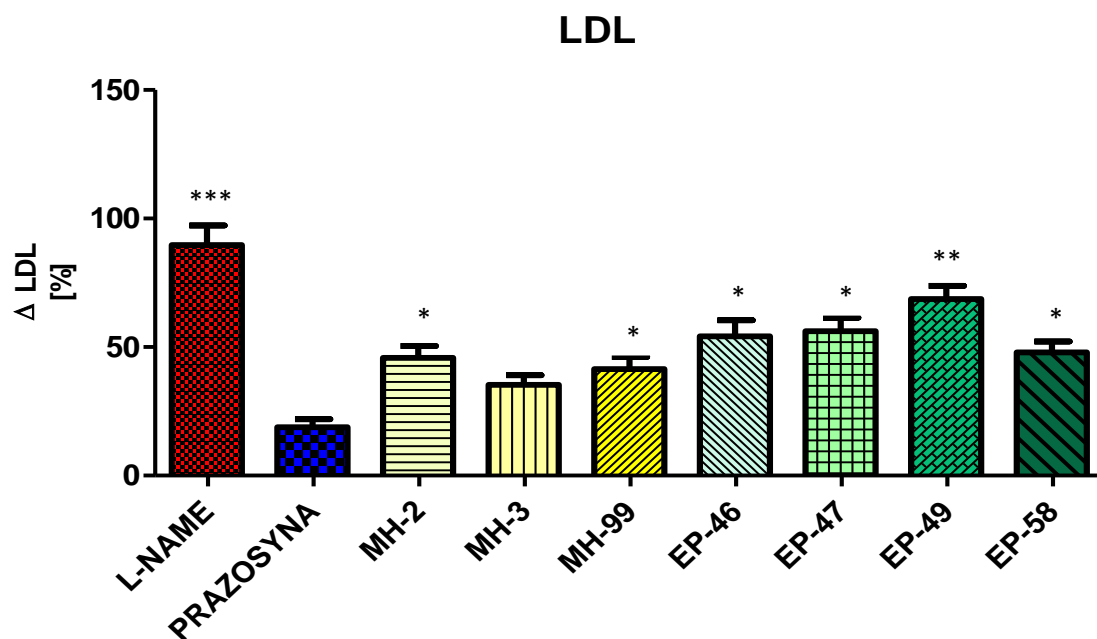
* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



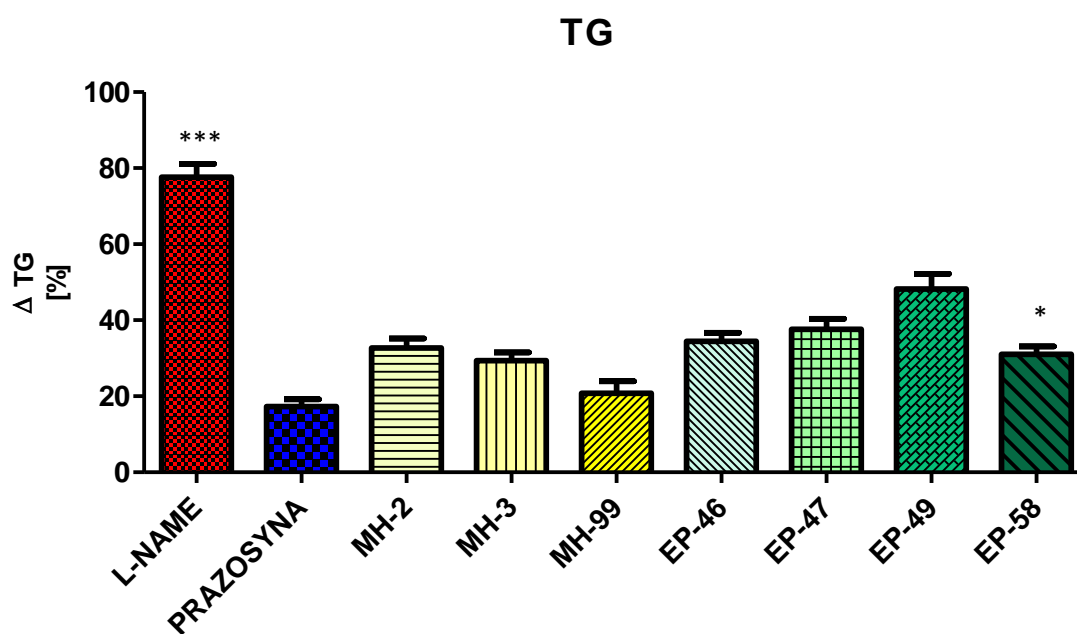
Rycina 22. Procentowa zmiana oszczowego poziomu cholesterolu całkowitego po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 23. Procentowa zmiana oszczowego poziomu frakcji HDL po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 24. Procentowa zmiana osoczowego poziomu frakcji LDL po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 25. Procentowa zmiana osoczowego poziomu trójglicerydów po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.4. Ocena parametrów profilu węglowodanowego

Związki podawane przewlekle przez okres 14 dni szczurom z wyidukowanym nadciśnieniem tętniczym wg modelu L-NAME, powodowały spadek stężenia glukozy do wartości mieszczących się w zakresie od 5,13 mmol/l do 6,00 mmol/l. Istotny statystycznie spadek stężenia glukozy w odniesieniu do szczurów modelu L-NAME uzyskano po zastosowaniu **prazosyny** spadek o 1,04 mmol/l (16,6%), związku **MH-2** spadek o 1,01 mmol/l (16,2%), związku **MH-3** spadek o 1,12 mmol/l (17,9%) oraz związku **MH-99** spadek o 1,05 mmol/l (16,8%).

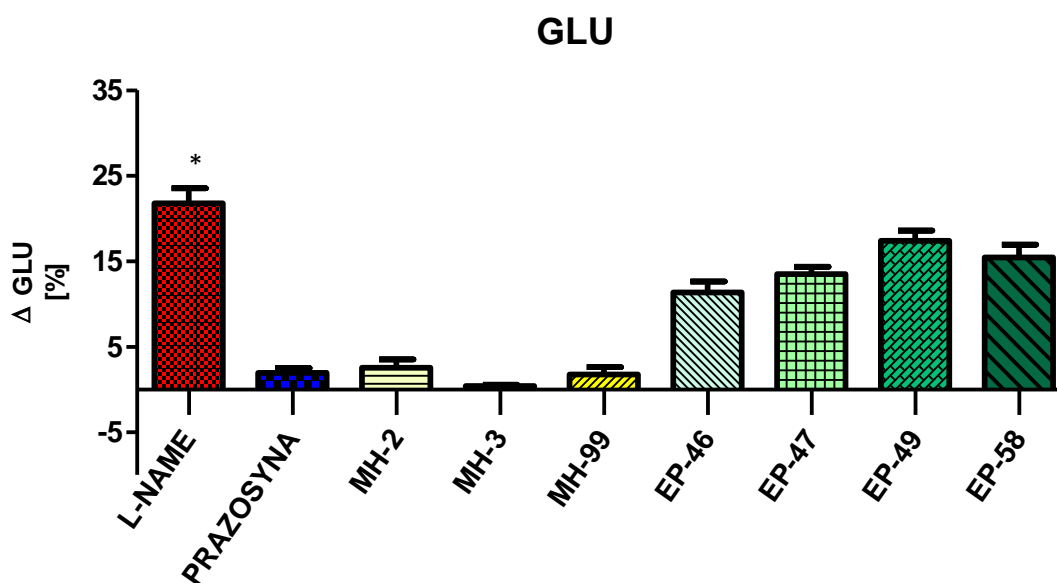
Wyniki zostały przedstawione w tabeli nr 25 (tab. 25) i na rycinie nr 26 (ryc. 26).

Tabela 25. Wpływ badanych związków na osoczowy poziom glukozy po indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME

Związek	Stężenie glukozy [mmol/l]
	średnia ± SEM
Kontrola	5,11 ± 0,22 * ¹⁾
L-NAME	6,25 ± 0,28
PRAZOSYNA	5,21 ± 0,30 *
MH-2	5,24 ± 0,21 *
MH-3	5,13 ± 0,19 *
MH-99	5,20 ± 0,17 *
EP-46	5,69 ± 0,34
EP-47	5,80 ± 0,29
EP-49	6,00 ± 0,31
EP-58	5,90 ± 0,21

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 26. Procentowa zmiana osoczowego poziomu glukozy po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.5. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego

Dla poszerzenia charakterystyki modelu L-NAME oznaczono markery stresu oksydacyjnego: produkt peroksydacji lipidów oraz enzymy antyoksydacyjne. Dzięki temu uzyskano możliwość stwierdzenia wpływu badanych związków podawanych przewlekle w modelu L-NAME na poziom stresu oksydacyjnego.

Jednym z najczęściej oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego jest dialdehyd malonowy (MDA), będący wyznacznikiem autooksydacji lipidów. W modelu L-NAME oznaczono poziom osoczowego MDA oraz tkankowego MDA, pochodzącego z mózgow badanych zwierząt.

U szczurów, którym indukowano nadciśnienie przy użyciu L-NAME poziom osoczowego MDA wzrósł istotnie statystycznie o 0,00399 nmol/mg białka (56,8%). Zastosowanie **prazosyny** u szczurów z nadciśnieniem indukowanym L-NAME istotnie statystycznie obniżało poziom osoczowego MDA o 0,00322 nmol/mg białka (29,2%).

W takim samym zakresie poziom osocznego MDA obniżał związek **MH-3** – o 0,00321 nmol/mg białka (29,2%). W nieznacznie mniejszym stopniu MDA obniżały: związek **MH-2** o 0,00281 nmol/mg białka (25,5%), związek **MH-99** o 0,00252 nmol/mg białka (22,9%) oraz związek **EP-46** o 0,00219 nmol/mg białka (19,9%).

Nie uzyskano znaczącego wzrostu tkankowego poziomu MDA u szczurów modelu L-NAME w odniesieniu do szczurów kontrolnych, podobnie jak nie wykazano żadnych istotnych zmian w poziomie tego wskaźnika po przewlekłym podawaniu badanych związków.

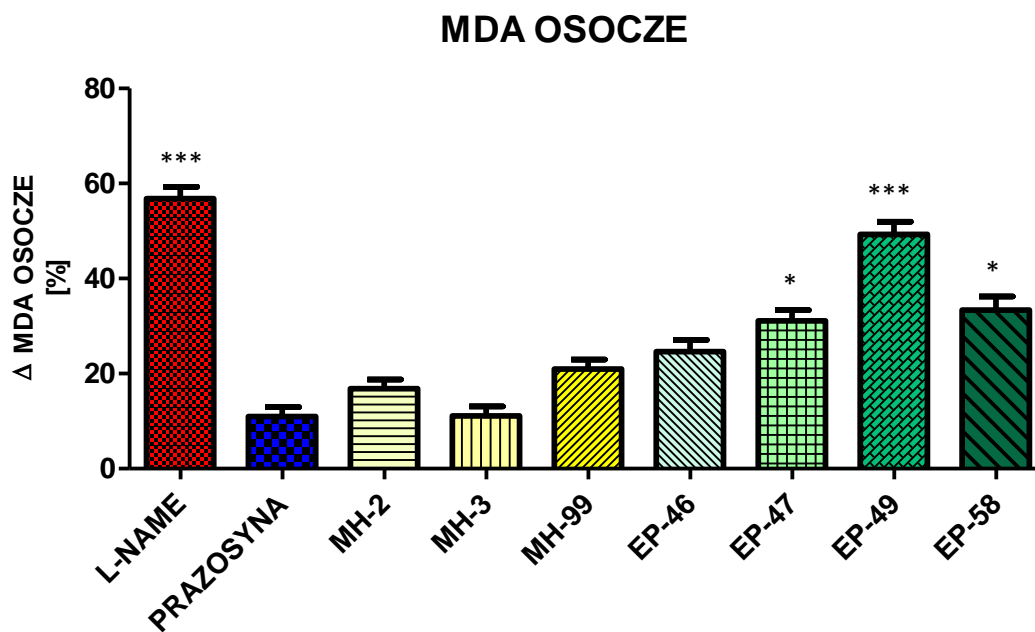
Wyniki przedstawiające poziom peroksydacji lipidów mierzony osoczym MDA i MDA oznaczanym w mózgu zaprezentowano w tabeli nr 26 (tab. 26), natomiast procentowy przyrost/spadek poziomu MDA w odniesieniu do kontroli na rycinach nr 27 (ryc. 27) i rycinie nr 28 (ryc. 28).

Tabela 26. Wpływ badanych związków na poziom peroksydacji lipidów po indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME

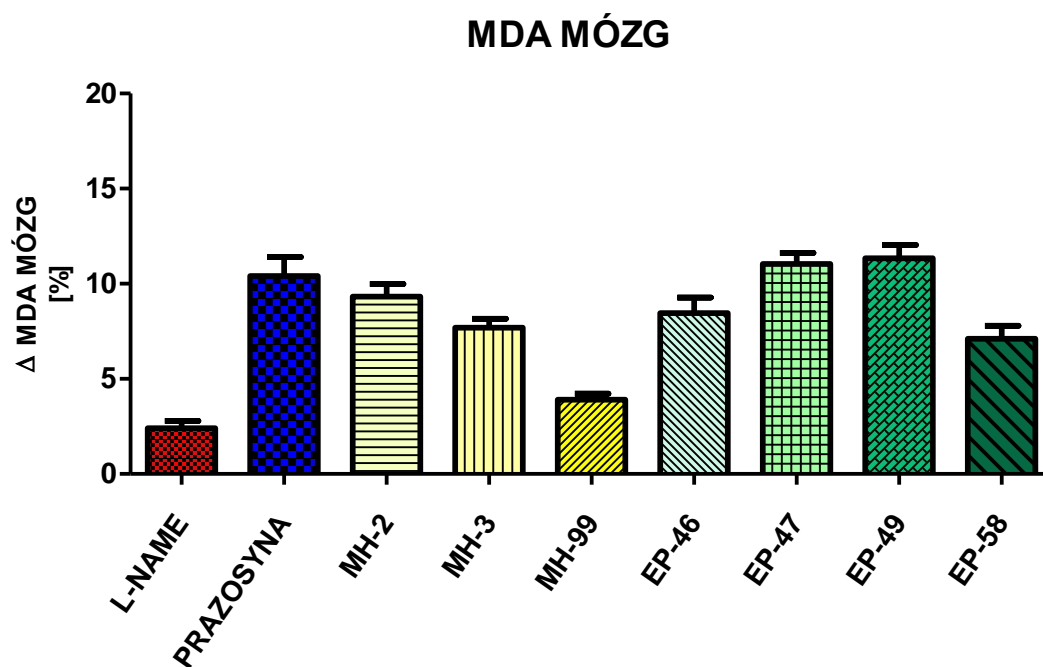
Grupa doświadczalna	Poziom peroksydacji lipidów	
	średnia ± SEM	
	MDA [nmol/mg białka]	MDA MÓZG [nmol/mg białka]
Kontrola	0,00702 ± 0,0004 ***	1,747 ± 0,05
L-NAME	0,01101 ± 0,0007	1,789 ± 0,05
PRAZOSYNA	0,00779 ± 0,0003 ***	1,931 ± 0,07
MH-2	0,00820 ± 0,0004 **	1,910 ± 0,06
MH-3	0,00780 ± 0,0004 ***	1,882 ± 0,06
MH-99	0,00849 ± 0,0002 *	1,816 ± 0,09
EP-46	0,00882 ± 0,0007 *	1,895 ± 0,06
EP-47	0,00920 ± 0,0008	1,940 ± 0,08
EP-49	0,01048 ± 0,0005	1,945 ± 0,10
EP-58	0,00936 ± 0,0008	1,871 ± 0,11

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 27. Procentowa zmiana osoczkowego poziomu MDA po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 28. Procentowa zmiana tkankowego poziomu MDA MÓZG po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

Enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GPx) tworzą enzymatyczną barierę przeciwutleniającą organizmu. W przebiegu nadciśnienia tętniczego wywołanego podawaniem L-NAME w osoczu szczurów wykazano istotny statystycznie wzrost poziomu CAT o 1,94 U/mg białka (65,5%) oraz SOD o 0,0113 % hamowania utleniania adrenaliny/mg białka (69,8%), natomiast obniżeniu uległa GPx o 0,0256 U/mg białka (31,5%).

Prazosyna istotnie statystycznie obniżała poziom CAT o 1,28 U/mg białka (26,1%) oraz SOD o 0,071 % hamowania utleniania adrenaliny/mg białka (25,8%), podnosiła natomiast aktywność GPx o 0,0231 U/mg białka (41,5%).

Spośród badanych związków poziom CAT istotnie statystycznie obniżały związki: **MH-3** o 0,95 U/mg białka (19,4%) oraz **MH-99** o 1,05 U/mg białka (21,4%). Żaden ze związków istotnie statystycznie nie wpływał na poziom SOD. Wszystkie badane związki, w porównaniu do szczurów modelu L-NAME, podnosiły aktywność GPx. Poziom GPx wzrósł: dla związku MH-2 o 0,0190 U/mg białka (34,2%), dla związku MH-3 o 0,0168 U/mg białka (30,2%), dla związku MH-99 o 0,0194 U/mg białka (34,8%), dla związku EP-46 o 0,0219 U/mg białka (39,3%), dla związku EP-47 o 0,0148 U/mg białka (26,6%), dla związku EP-49 o 0,0137 U/mg białka (24,6%), a dla związku EP-58 o 0,0191 U/mg białka (34,3%).

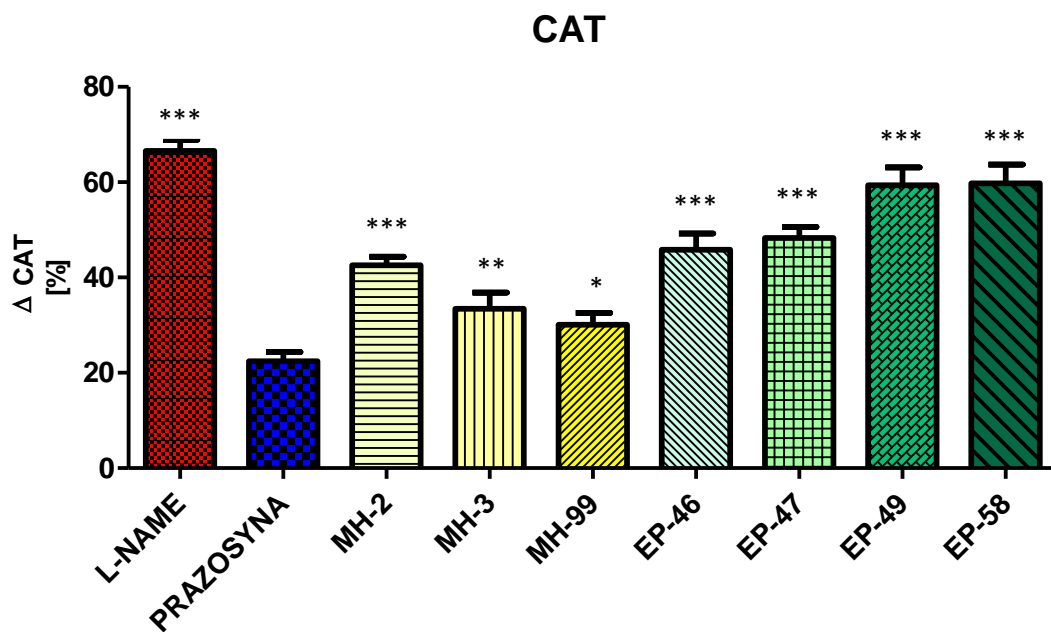
Wyniki przedstawiające poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych zaprezentowano w tabeli nr 27 (tab. 27), procentową zmianę poziomu CAT w odniesieniu do kontroli na rycinie nr 29 (ryc. 29), procentową zmianę poziomu SOD w odniesieniu do kontroli na rycinie nr 30 (ryc. 30), procentową zmianę poziomu GPx w odniesieniu do kontroli na rycinie nr 31 (ryc. 31).

Tabela 27. Wpływ badanych związków na poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych po indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME

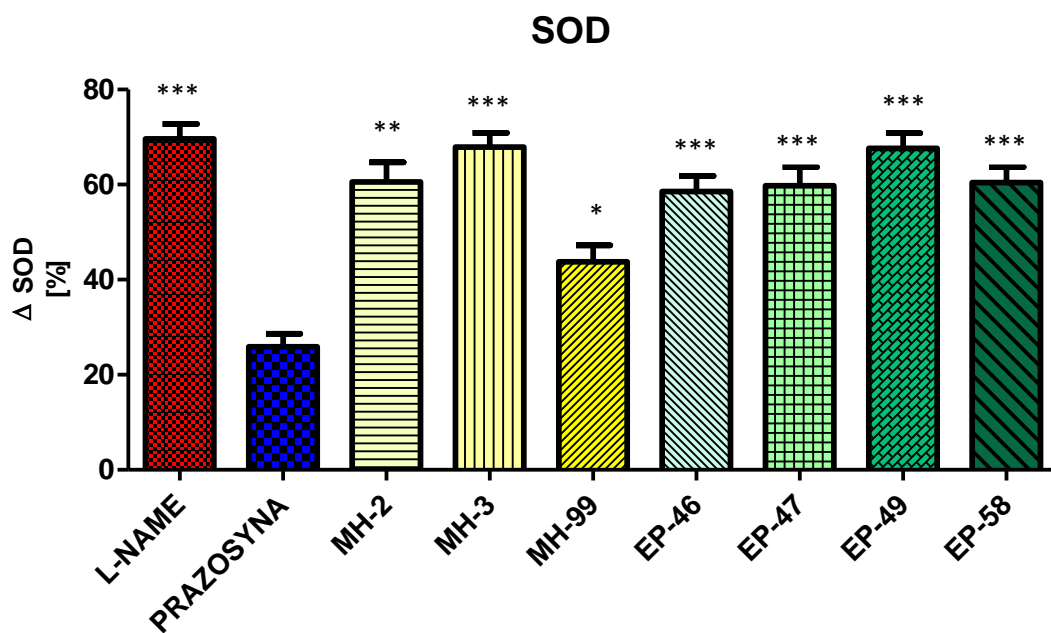
Grupa doświadczalna	Poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych		
	średnia ± SEM		
	CAT [U/mg białka]	SOD [% hamowania utleniania adrenaliny/mg białka]	GPx [U/mg białka]
Kontrola	2,96 ± 0,21 *** ¹⁾	0,162 ± 0,07 ***	0,0813 ± 0,003 ***
L-NAME	4,90 ± 0,30	0,275 ± 0,02	0,0557 ± 0,003
PRAZOSYNA	3,62 ± 0,17 ***	0,204 ± 0,19 *	0,0788 ± 0,005 ***
MH-2	4,22 ± 0,19	0,260 ± 0,08	0,0747 ± 0,001 ***
MH-3	3,95 ± 0,18 *	0,272 ± 0,06	0,0725 ± 0,004 ***
MH-99	3,85 ± 0,12 **	0,233 ± 0,02	0,0751 ± 0,004 ***
EP-46	4,32 ± 0,22	0,257 ± 0,04	0,0776 ± 0,003 ***
EP-47	4,39 ± 0,33	0,259 ± 0,02	0,0705 ± 0,002 **
EP-49	4,73 ± 0,22	0,272 ± 0,01	0,0694 ± 0,002 **
EP-58	4,72 ± 0,15	0,260 ± 0,07	0,0748 ± 0,005 ***

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

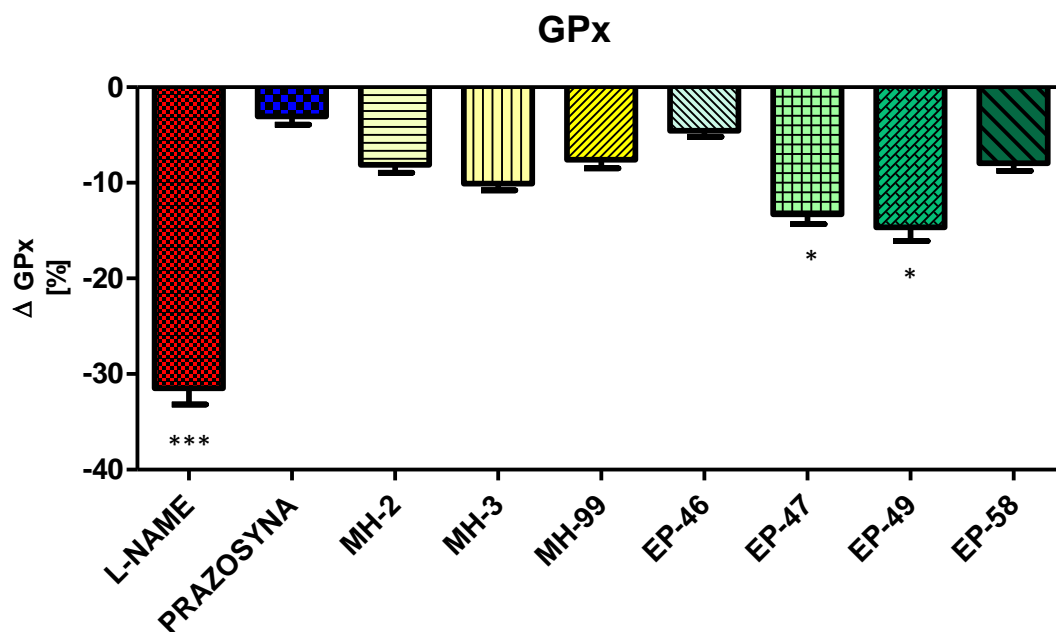
* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 29. Procentowa zmiana osoczowego poziomu CAT po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 30. Procentowa zmiana osoczowego poziomu SOD po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 31. Procentowa zmiana osoczkowego poziomu GPx po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.6. Ocena stężenia azotanów(III) oraz azotanów(V)

Dla poszerzenia charakterystyki modelu L-NAME oznaczono stężenia azotanów(III) oraz azotanów(V) w osoczu szczurów poddanych indukcji nadciśnienia tętniczego. Porównano także wpływ na ten parametr badanych związków podawanych przewlekle w modelu L-NAME. Ze względu na zaistniałe ograniczenia ilościowe, do badań wybrano próbki pochodzące od zwierząt z grup: **kontrolnej, L-NAME, prazosyny, MH-3, MH-99.**

Stężenia NO_2^- oraz NO_3^- w grupie zwierząt **modelu L-NAME** były w znaczącym stopniu obniżone w stosunku do kontroli, a mianowicie o $0,0940 \mu\text{M}$ (63,6%) dla NO_2^- i o $9,68 \mu\text{M}$ (59,8%) dla NO_3^- . Po 14-dniowym stosowaniu **badanych związków** dochodziło do wzrostu stężeń NO_2^- oraz NO_3^- . Stężenie NO_2^- wzrosło dla: **prazosyny** o $0,0496 \mu\text{M}$ (92,4%), dla związku **MH-3** o $0,0866 \mu\text{M}$ (161,3%), a dla związku **MH-99** o $0,0683 \mu\text{M}$ (127,2%). Stężenie NO_3^- również podniosło się, dla: **prazosyny** o $9,2 \mu\text{M}$ (141,1%), dla związku **MH-3** o $5,13 \mu\text{M}$ (78,6%), a dla związku **MH-99** o $6,16 \mu\text{M}$ (94,5%).

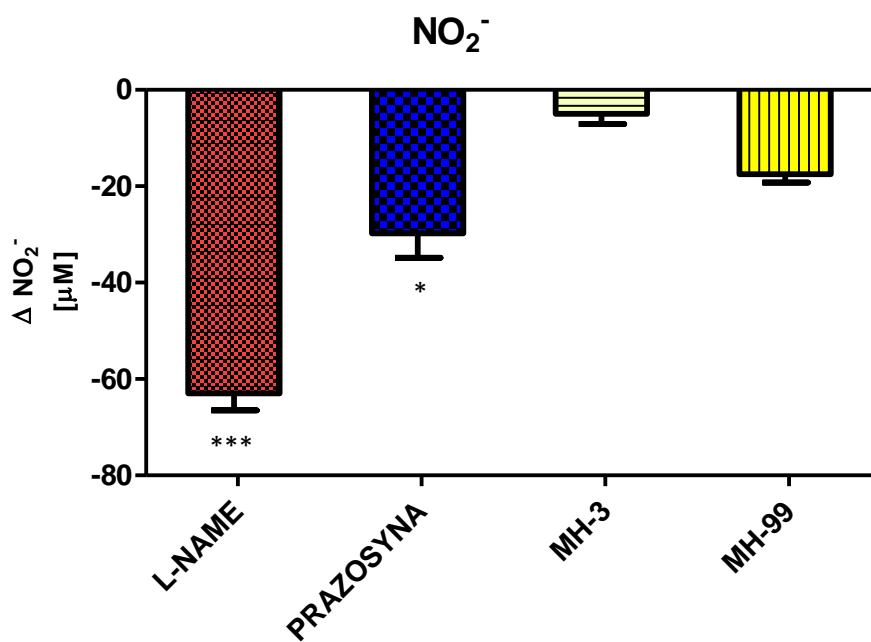
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 28 (tab. 28) oraz na rycinie nr 32 (ryc. 32) dla analizy porównawczej stężeń NO_2^- i na rycinie nr 33 (ryc. 33) dla analizy porównawczej stężeń NO_3^- .

Tabela 28. Wpływ badanych związków na poziom azotanów i azotynów w osoczu po indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME

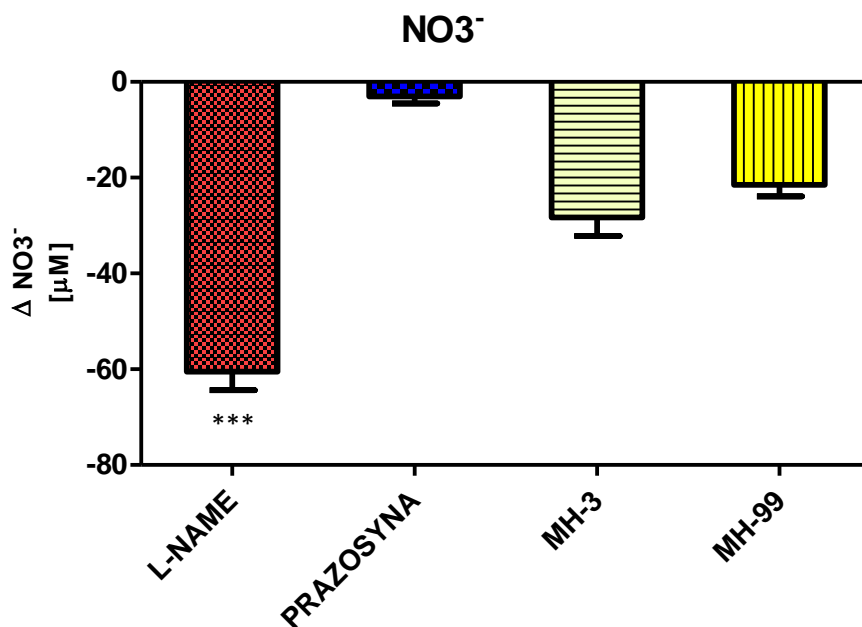
Grupa doświadczalna	Poziom azotanów i azotynów w osoczu [μM]	
	średnia ± SEM	
	NO_2^-	NO_3^-
Kontrola	0,1477 ± 0,011 *** ¹⁾	16,20 ± 1,1 ***
L-NAME	0,0537 ± 0,013	6,52 ± 1,4
PRAZOSYNA	0,1033 ± 0,062 *	15,72 ± 1,3 ***
MH-3	0,1403 ± 0,016 ***	11,65 ± 1,2 **
MH-99	0,1220 ± 0,011 **	12,68 ± 1,1 **

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$



Rycina 32. Procentowa zmiana osoczowego poziomu NO_2^- po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej



Rycina 33. Procentowa zmiana osoczowego poziomu NO_3^- po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.7. Ocena wybranych parametrów biochemicznych

6.2.7.1. ADMA

Dla poszerzenia charakterystyki modelu L-NAME oznaczono stężenia ADMA w osoczu szczurów poddanych indukcji nadciśnienia tętniczego. Porównano także wpływ na ten parametr badanych związków podawanych przewlekle w modelu L-NAME.

Stężenia ADMA w grupie zwierząt modelu L-NAME były w znaczącym stopniu obniżone w stosunku do kontroli o 0,8605 μM (71,5%). Po 14-dniowym stosowaniu badanych związków dochodziło do wzrostu stężeń ADMA dla: grupy z **prazosyną** o 0,6785 μM (198,1%), związku **MH-2** o 0,7205 μM (210,4%), związku **MH-3** o 0,6223 μM (181,7%), związku **MH-99** o 0,6515 μM (190,2%), związku **EP-46** o 0,5605 μM (71,5%) **oraz** związku **EP-47** o 0,5111 μM (149,2%). Podawanie związku **EP-49** i **EP-58** nie wpływało istotnie statystycznie na poziom ADMA w porównaniu do zwierząt modelu L-NAME.

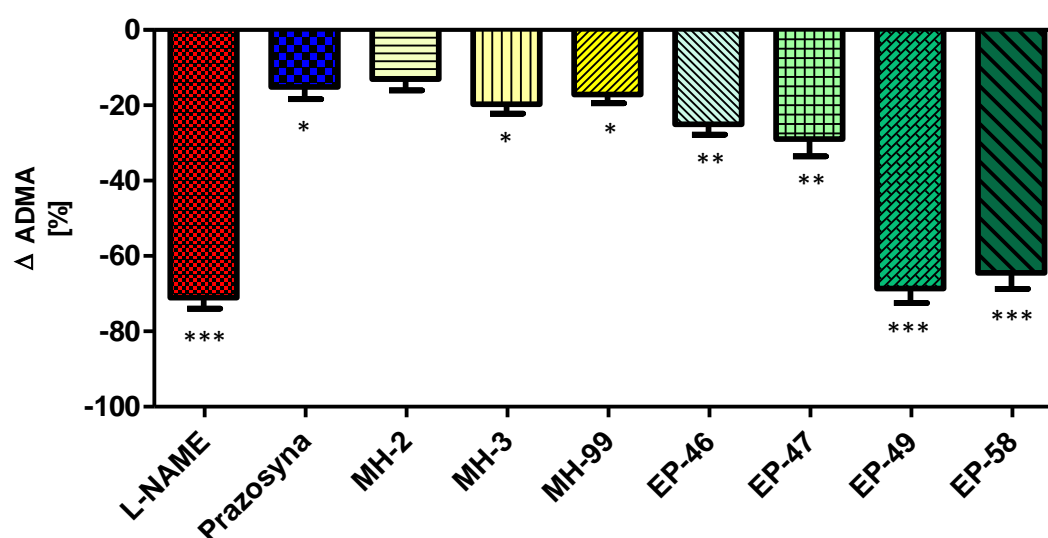
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 29 (tab. 29) oraz na rycinie nr 34 (ryc. 34).

Tabela 29. Wpływ badanych związków na ADMA po indukcji nadciśnienia tętniczego w osoczu wg modelu L-NAME

Związek	Stężenie ADMA [μM] średnia ± SEM
Kontrola	1,2030 ± 0,05 *** ¹⁾
L-NAME	0,3425 ± 0,01
PRAZOSYNA	1,0210 ± 0,04 ***
MH-2	1,0630 ± 0,03 ***
MH-3	0,9648 ± 0,03 ***
MH-99	0,9940 ± 0,02 ***
EP-46	0,9030 ± 0,01 ***
EP-47	0,8536 ± 0,01 ***
EP-49	0,3741 ± 0,01
EP-58	0,4222 ± 0,02

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 34. Procentowa zmiana osoczowego poziomu ADMA po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.7.2. VEGF

Dla poszerzenia charakterystyki modelu L-NAME oznaczono stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu – VEGF (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor*) w osoczu szczurów poddanych indukcji nadciśnienia tętniczego. Porównano także wpływ na ten parametr badanych związków podawanych przewlekle w modelu L-NAME.

Stężenia VEGF w grupie zwierząt modelu L-NAME były istotnie podwyższone w stosunku do kontroli, wzrost o 17,12 pg/ml (213,7%). Po 14-dniowym stosowaniu badanych związków dochodziło do znamiennego spadku stężeń VEGF dla wszystkich badanych grup. Spadek stężeń ADMA wyniósł dla: grupy z **prazosyną** o 15,03 pg/ml (59,8%), związku **MH-2** o 14,50 pg/ml (57,7%), związku **MH-3** o 14,52 pg/ml (57,8%), związku **MH-99** o 15,00 pg/ml (59,7%), związku **EP-46** o 11,73 pg/ml (46,7%), związku **EP-47** o 11,63 pg/ml (46,3%), związku **EP-49** o 13,53 pg/ml (53,8%) oraz związku **EP-58** o 14,38 pg/ml (57,2%).

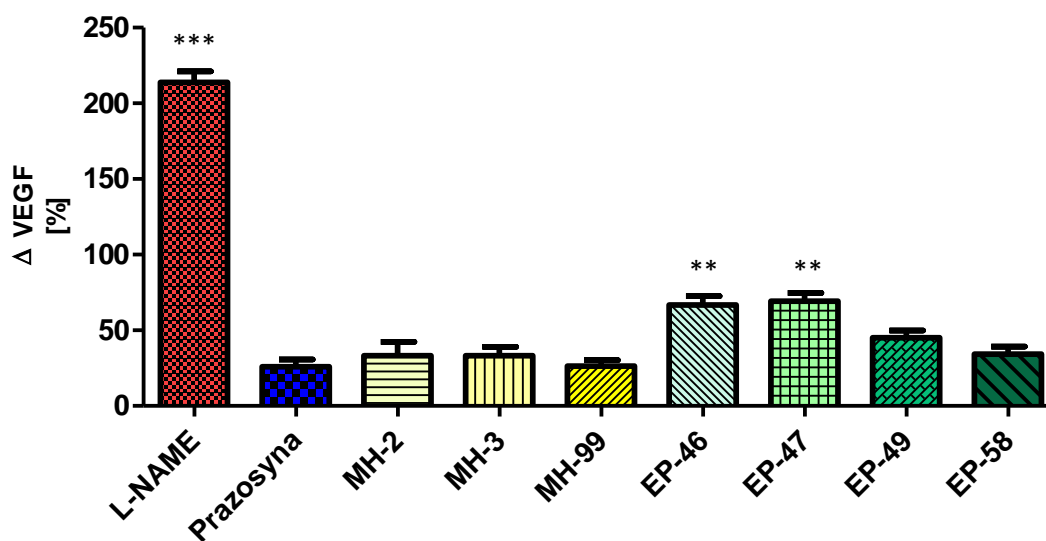
Wyniki przedstawiono w tabeli nr 30 (tab. 30) oraz na rycinie nr 35 (ryc. 35).

Tabela 30. Wpływ badanych związków na VEGF po indukcji nadciśnienia tętniczego w osoczu wg modelu L-NAME

Związek	Stężenie VEGF [pg/ml] średnia ± SEM
Kontrola	8,010 ± 0,120 *** ¹⁾
L-NAME	25,125 ± 0,249
PRAZOSYNA	10,100 ± 0,350 ***
MH-2	10,630 ± 0,405 ***
MH-3	10,600 ± 0,139 ***
MH-99	10,125 ± 0,215 ***
EP-46	13,400 ± 0,190 ***
EP-47	13,503 ± 0,285 ***
EP-49	11,600 ± 0,425 ***
EP-58	10,752 ± 0,280 ***

¹⁾ Znamienność statystyczna wg analizy Anova poszerzonej o test Dunnett'a w porównaniu z grupą L-NAME

* p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,001



Rycina 35. Procentowa zmiana osoczowego poziomu VEGF po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli czystej

6.2.8. Ocena aktywności wewnętrznej względem podtypów receptorów α_{1A} -adrenergicznych

W celu określenia charakteru aktywności oraz wybiórczości wyselekcjonowanych związków względem podtypów receptora α_1 -adrenergicznego oznaczono ich aktywność wewnętrzną względem ludzkich receptorów α_{1A} -, α_{1B} - i α_{1D} -adrenergicznych. Wyniki badań aktywności wewnętrznej uzyskane dla testowanych struktur porównano z wynikami uzyskanymi dla trzech związków referencyjnych, nioselektywnych prazosyny i terazosyny oraz preferencyjnej względem receptora α_{1A} i α_{1D} tamsulozyny.

Uzyskane w metodach AequoScreen® (α_{1B} i α_{1D}) oraz GeneBLAzer® (α_{1A}) wartości EC_{50} dla badanych związków pozwoliły ocenić wybiórczość testowanych związków względem wspomnianych podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych (tab. 31).

Wszystkie badane związki wykazały właściwości antagonistyczne względem receptorów α_{1A} -, α_{1B} - i α_{1D} -adrenergicznych hamując wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału indukowaną fenylefryną.

Związek **EP-46** najsilniej hamował wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału w przypadku podtypu α_{1D} . Związek wykazał przy tym ok. 3-krotną i 9-krotną preferencyjność hamowania podtypu α_{1D} w porównaniu do odpowiednio podtypów α_{1B} i α_{1A} (tab. 32).

Związek **EP-47** nie wpływał praktycznie na czynność receptora α_{1A} -adrenergicznego, hamował natomiast ok. 3-krotnie silniej aktywność receptora α_{1D} w porównaniu do receptora α_{1B} (tab. 28).

Związek **EP-49** hamował ok. 5-cio krotnie silniej indukowaną fenylefryną czynność receptora α_{1A} w porównaniu do receptorów α_{1B} i α_{1D} (tab. 32).

Związek **EP-58** hamował z porównywalną siłą indukowaną fenylefryną transdukcję sygnału w przypadku wszystkich podtypów receptorów α_1 , tj. α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} (tab. 32).

Związki **MH-2**, **MH-3** oraz **MH-99** hamowały z porównywalną siłą transdukcje sygnału receptorów α_{1A} i α_{1B} . Wykazały jednak ok. 15-krotnie silniejszą zdolność hamowania indukowanej fenylefryną transdukcji sygnału receptora α_{1D} w porównaniu do podtypów α_{1A} i α_{1B} (tab. 32).

Prazosyna, związek referencyjny o ugruntowanych właściwościach antagonistycznych względem wszystkich podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych, hamował z porównywalną siłą czynność wszystkich podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych (tab. 32).

Terazosyna, związek referencyjny o ugruntowanych właściwościach antagonistycznych względem wszystkich podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych, wykazał ok. 3-krotną preferencyjność hamowania podtypu α_{1B} w odniesieniu do podtypów α_{1A} i α_{1D} (tab. 32).

Tamsulozyna, antagonistą referencyjny o ugruntowanej preferencyjności hamowania podtypów α_{1A} - i α_{1D} , hamował ok. 19-krotnie silniej czynność receptora α_{1A} i ok. 28-krotnie silniej czynność receptora α_{1D} w porównaniu do receptora α_{1B} (tab. 32).

Wyniki uzyskane w badaniu aktywności wewnętrznej testowanych związków zestawiono w tabeli nr 31 (tab. 31).

Tabela 31. Wartości EC50 uzyskane dla badanych związków oraz związków referencyjnych w badaniu aktywności wewnętrznej względem ludzkich podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych, tj. α_{1A} , α_{1B} i α_{1D}

Związek	EC 50 [nM]		
	średnia \pm SEM		
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Prazosyna	0,4899 \pm 0,17	0,3778 \pm 0,08	0,6313 \pm 0,21
Tamsulozyna	0,06755 \pm 0,18	1,305 \pm 0,44	0,04632 \pm 0,12
Terazosyna	51,89 \pm 19,71	1,732 \pm 0,41	1,82 \pm 0,47
Fenylefryna	56,13 \pm 18,1	0,862 \pm 0,22	12,15 \pm 2,78
MH-2	18,44 \pm 4,22	25,54 \pm 5,27	1,77 \pm 0,43
MH-3	23,11 \pm 6,11	18,91 \pm 4,71	1,23 \pm 0,31
MH-99	39,13 \pm 6,78	41,76 \pm 5,44	2,61 \pm 0,44
EP-46	178,7 \pm 35,74	30,49 \pm 7,15	9,51 \pm 2,17
EP-47	42510 \pm 12145	32,57 \pm 8,19	11,16 \pm 4,62
EP-49	54,26 \pm 18,13	254,12 \pm 67,3	228,5 \pm 52,25
EP-58	235,9 \pm 32,3	267,7 \pm 22,34	181,1 \pm 51,1

Tabela 32. Wyliczona na podstawie wartości EC_{50} preferencyjność hamowania indukowanej fenylefryną czynności podtypów receptora α_1 -adrenergicznego dla badanych związków oraz związków referencyjnych

Grupa badana	preferencyjność	
	$EC_{50} \alpha_{1B} / EC_{50} \alpha_{1A}$ – preferencyjność do α_{1A}	$EC_{50} \alpha_{1B} / EC_{50} \alpha_{1D}$ - preferencyjność do α_{1D}
Prazosyna	0,77	0,59
Tamsulozyna	19,32	28,17
Terazosyna	0,33	0,95
MH-2	1,39	14,43
MH-3	0,82	15,37
MH-99	1,07	16
EP-46	0,17	3,2
EP-47	0,00077	2,92
EP-49	4,68	1,11
EP-58	1,13	1,48

VII. PODSUMOWANIE I Dyskusja Wyników

Dowody z wielośrodkowych badań klinicznych i eksperymentalnych wskazują na ważną rolę czynników środowiskowych w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Ten niewątpliwy wpływ współistniejący z uwarunkowaniami genetycznymi dał szerokie spectrum sposobności do badań nadciśnienia tętniczego, które od wielu lat jest najczęstszą chorobą cywilizacyjną o wciąż nie w pełni zidentyfikowanej etiologii.

Prowadzone są liczne badania pomagające zidentyfikować mechanizmy powstawania zmian w przebiegu nadciśnienia tętniczego, jak również mechanizmy odpowiedzialne za jego wystąpienie. Otrzymanie wyników o wartości prognostycznej wymaga wyboru odpowiednich modeli nieklinicznych i właściwych gatunków zwierząt. W przypadku wielu eksperymentów korzysta się z naukowo opracowanych strategii i modeli, które zostały już zwalidowane i zastosowane w badaniach naukowych. Zasadniczo właściwy wybór gatunku zwierząt do badań bazuje na podobieństwie do ludzi w aspekcie farmakodynamiki, farmakokinetyki, fizjologii i patofizjologii. Oczywiście żaden z gatunków nie koresponduje w sposób jednoznaczny z wieloma cechami ludzkimi, stąd ekstrapolacja wyników uzyskiwanych na zwierzętach do ludzi wymaga rozważnej interpretacji. Wiele doświadczeń przeprowadzanych jest na dużych zwierzętach, takich jak owce, świnie i ssaki naczelne, jednak najliczniej wykorzystywane są modele z udziałem gryzoni. Jest to podyktowane między innymi dostępnością gatunku, łatwością jego wykorzystania oraz krótkim czasem życia osobniczego tych zwierząt, a tym samym stosunkowo krótkim czasem wymaganym do rozwinięcia badanych cech. Żywieniowe, chirurgiczne i farmakologiczne modele doświadczalne pozwalają śledzić i interpretować wiele mechanizmów oraz zależności. Dawniej do tego typu badań wykorzystywano zdrowe zwierzęta, jednak fizjologia ludzka zmieniona w przebiegu choroby w znacznym stopniu odbiegała od zwierzęcej, dlatego też obecnie w badaniach przedklinicznych często korzysta się z modeli zwierzęcych z chorobą, której dotyczą badane zależności.

Zważywszy na zasadniczy przedmiot będący tematem tejże rozprawy doktorskiej, a mianowicie nowe związki o właściwościach α_1 -adrenolitycznych, wymagane było zastosowanie do badań nad nimi eksperymentalnych modeli zwierzęcych. W tym przypadku były to szczerze modele nadciśnienia tętniczego. W ramach badań ujętych w rozprawie

doktorskiej w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM dokonano walidacji kilku wybranych modeli zwierzęcego nadciśnienia tętniczego:

- ✓ Model DEX
- ✓ Model DOCA
- ✓ Model FRU
- ✓ Model L-NAME

W modelach tych poszukiwano zaburzeń, które pozwoliłyby na wykazanie bądź wykluczenie plejotropowych właściwości badanych α_1 -adrenolityków. Od modelu wymagano wysokiego potencjału hipertensyjnego (stosunkowo krótki czas potrzebny do rozwoju nadciśnienia tętniczego oraz wydrukowane wysokie średnie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi), uszkodzeń w obrębie endotelium, a także wystąpienia zaburzeń profilu węglowodanowo-lipidowego.

Pierwszy model nadciśnienia tętniczego został wywołany w wyniku podawania podskórnego deksametazonu w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. przez okres 14 dni [67,68]. Wpływ glikokortykosteroidów, zarówno endogennych, jak i syntetycznych, na układ sercowo-naczyniowy wciąż jest tematem wielu badań. W aspekcie wywoływania nadciśnienia tętniczego przez endogenne glikokortykosteroidy postulowane są dwa mechanizmy, nieprawidłowa funkcja dehydrogenazy 11beta-hydroksysteroidowej ($11\beta\text{-HSD2}$) [79,80,81] oraz obniżenie poziomu NO. $11\beta\text{-HSD2}$ przekształca aktywny kortyzol w jego mniej aktywną formę kortyzon i tym samym zapobiega łączeniu się kortyzolu z receptorem mineralokortykoidowym, chroniąc go przed nadmierną aktywacją. Zaburzenia aktywności $11\beta\text{-HSD2}$, mogą prowadzić do pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów, powodując zatrzymywanie wody i w konsekwencji nadciśnienie tętnicze. Zjawisko to jednak nie wyjaśnia hipertensyjnego wpływu deksametazonu, który pozbawiony jest efektu mineralokortykosteroidowego i nie powoduje zwiększonej retencji jonów sodowych ani objętości płynu pozakomórkowego [82]. Wykazano ponadto, że glikokortykosteroidy hamują wytwarzanie NO przez wszystkie trzy formy syntazy tlenku azotu, poprzez bezpośredni wpływ na zmniejszenie ekspresji NOS oraz destabilizację mRNA [83], a także pośrednio poprzez obniżanie dostępności substratu i kofaktora do syntezy NO. Glikokortykosteroidy obniżają ekspresję cyklohydrolazy GTP, enzymu biorącego udział w syntezie BH_4 z GTP i ograniczają dostępność L-argininy, zmniejszając ilość specyficznych białek transportujących

ten aminokwas — CAT-1, CAT-2B, CAT-2A, a także obniżają ekspresję mRNA syntazy bursztynianu argininy, który katalizuje odtwarzanie L-argininy z L-cytruliny [84]. Jak wynika z badań Turner'a i wsp. [85] podanie substratu L-argininy chroni organizm przed wystąpieniem nadciśnienia indukowanego endogennymi glikokortykosteroidami, natomiast nie ma znaczącego wpływu w nadciśnieniu indukowanym deksametazonem. Zważywszy na to, jak również na fakt, że deksametazon pozbawiony jest efektu mineralokortykosteroidowego, sugeruje się, że za jego hipertensyjny charakter odpowiedzialne są mechanizmy wolnorodnikowe. Reaktywne formy tlenu reagują z NO zmniejszając istotnie jego biodostępność. W badaniach z antyoksydantami dochodziło do normalizacji nadciśnienia tętniczego indukowanego deksametazonem [67,68], co przemawia za słusznością tej tezy. Wykazano również, że deksametazon może hamować poziom dysmutazy ponadtlenkowej i innych przeciwutleniaczy [86,87], a także zwiększać poziom aktywności oksydazy ksantynowej, która jest potencjalnym źródłem wolnych rodników.

W trakcie badań wywołano nadciśnienie tętnicze, przy użyciu deksametazonu w modelu DEX. Najwyższe średnie wartości osiągnęte w modelu wynosiły 144,5 mmHg dla ciśnienia skurczowego i 118,5 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego, co jest zgodne z wynikami uzyskiwanymi przez innych badaczy [67,68]. Nie udało się wywołać znamienych zaburzeń śródłonkowych. Aorty pobrane od szczurów modelu DEX po zakończonym eksperymencie, nie wykazywały wzmożonej kurczliwości pod wpływem fenylefryny. Ich rozkurcz po dodaniu acetylocholinę był nieznacznie obniżony w stosunku do kontroli – osiągnięto rozkurcz na poziomie 89,6%, podczas gdy w aortach mechanicznie pozbawionych śródłonka odnotowano rozkurcz na poziomie 20%.

Chroniczne narażenie na nadmiar glikokortykosteroidów prowadzi do znacznego wzrostu stężenia trójglicerydów, co jest spowodowane ich upośledzonym metabolizmem na drodze β -oksydacji. Ponadto, dochodzi do dyslipidemii, ponieważ nadmierne pobudzenie receptora glikokortykoidowego w wątrobie przyczynia się do zahamowania aktywności lipazy lipoproteinowej w tkance tłuszczowej [88]. Glikokortykosteroidy wywierają także działanie antyinsulinowe. Powodują wzrost stężenia glukozy w osoczu, na skutek zahamowania obwodowego wychwytu glukozy przez mięśnie i tkankę tłuszczową, tym samym zwiększając wydzielanie insuliny, co indukuje insulinooporność [88]. U szczurów w modelu DEX udało się zaobserwować zmiany w profilu węglowodanowo-lipidowym. Doszło do znamienego statystycznie ($p < 0,001$) wzrostu stężenia glukozy, cholesterolu całkowitego, cholesterolu

frakcji LDL oraz trójglicerydów, natomiast znacząco ($p < 0,001$) obniżył się cholesterol frakcji HDL.

Kolejnym walidowanym modelem nadciśnienia tętniczego, tym razem powiązaniem z wrażliwością na sód był model DOCA. Jest to model szeroko wykorzystywany przez eksperymentatorów do badań złośliwej fazy nadciśnienia tętniczego oraz oceny remodelingu w układzie sercowo-naczyniowym [89,90]. W modelu nadciśnienia tętniczego DOCA szczurom podawany jest podskórnie octan deoksykortykosteronu oraz roztwór NaCl do picia, a dodatkowo wykonuje się nefrektomie jednej z nerek. U zwierząt tych stwierdza się wzrost poziomu endoteliny, która posiada silne właściwości wazokonstrykcyjne, a ponadto stymuluje powstawanie kwasu 20-hydroksyeikozatetraenowego (20-HETE), metabolitu kwasu arachidonowego, który odpowiada za skurcz naczyń [91,92]. W eksperymentach z użyciem modelu DOCA stwierdza się wzrost aktywności wazopresyny, co istotne, po podaniu przeciwciał skierowanych przeciwko wazopresynie dochodzi do obniżenia ciśnienia krwi, a to pozwala przypuszczać, iż wazopresyna ma znaczenie w rozwoju fazy złośliwej nadciśnienia tętniczego [93]. Model DOCA charakteryzuje się, podobnie jak w populacji ludzi z nadciśnieniem sodowrażliwym, obniżoną aktywnością reniny.

Iniekcja octanu deoksykortykosteronu u szczurów będących na diecie wysokosodowej symuluje zwiększoną aktywność kory nadnerczy, a w konsekwencji powoduje retencję sodu. Kandlika i wsp. [69] przebadali impulsację współczulną w modelu DOCA bez wykonanej nefrektomii. Wyniki sugerują, że w modelu DOCA u szczurów z zachowanymi dwiema nerkami zasadniczą rolę w rozwoju zaburzeń układu sercowo-naczyniowego odgrywa zwiększona wrażliwość na fizjologiczną impulsację współczulną. Dodatkowo w modelu DOCA w badaniach przeprowadzanych przez Mohring i wsp. [93] nie wykazano zmian w stężeniu osoczowego tlenu azotu, ADMA oraz całkowitej pojemności antyoksydacyjnej TAC (*ang. total antioxidant capacity*). To sugeruje, że wzrost nadciśnienia tętniczego w tym przypadku nie jest powiązany bezpośrednio z mechanizmami wzmożonego stresu oksydacyjnego, a ze zmianami pojemnościowymi w łożysku naczyniowym, co w połączeniu ze wspomnianym powyżej uwrażliwieniem na impulsację współczulną powoduje istotny statystycznie wzrost ciśnienia tętniczego i jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Rozwijając nadciśnienie tętnicze wg modelu DOCA ze względu na ograniczone warunki laboratoryjne i niską przeżywalność szczurów nie wykonywano nefrektomii. Zakres

dawek z zastosowaniem octanu deoksykortykosteronu w przeglądzie literaturowym mieści się w przedziale od 20 do 150 mg/kg m.c., a stężenie NaCl w wodzie pitnej od 0,6% do 1% [53,94,95]. Najczęściej stosowana dawka w eksperymentach, w których operacyjnie usuwa się jedną z nerek to 25 mg/kg m.c. [53,96,97]. Ze względu na brak ingerencji chirurgicznej w prowadzonych badaniach, przy walidacji modelu DOCA zastosowano 2-krotnie wyższą dawkę od zwykle stosowanej, to znaczy 50 mg/kg m.c., którą podawano 2 razy w tygodniu przez okres 6 tygodni [70]. W modelu udało się wyidukować nadciśnienie tętnicze, natomiast jego wartości były znacząco niższe w porównaniu z eksperymentami, w których zastosowano nefrektomię. Najwyższe wartości średnie dla skurczowego ciśnienia tętniczego wyniosły 147,8 mmHg, a rozkurczowego 125,2 mmHg, podczas gdy u szczurów w modelu DOCA po nefrektomii eksperymentatorzy osiągnęli wartości ciśnienia skurczowego sięgające od 186,1 mmHg do 233,2 mmHg [98,99,100]. W modelu nie zaobserwowano zaburzeń w obrębie śródbrzońka, mierzonych zdolnością rozkurczową aorty w odpowiedzi na acetylocholinę. Nie odnotowano też znaczących statystycznie zmian w stężeniu glukozy, natomiast profil lipidowy uległ zaburzeniu. Doszło do znamiennego statystycznie wzrostu stężenia cholesterolu całkowitego ($p < 0,02$), cholesterolu frakcji LDL oraz trójglicerydów ($p < 0,001$), a także obniżenia cholesterolu frakcji HDL ($p < 0,001$).

Trzecim walidowanym modelem był model fruktozowy. Wzbogacenie diety szczurów w fruktozę powoduje u nich indukcję stresu oksydacyjnego [101], wynikającego m.in. z narastającej insulinooporności tkanek, hipertrójglicydemii i otyłości. Busserolles i wsp. [102] wykazali, że szczury stymulowane nadmierną podażą fruktozy w diecie, charakteryzują się zarówno zmniejszonym potencjałem antyoksydacyjnym, jak również 3-krotnie wyższym stężeniem wolnych rodników, co sugeruje istotny udział mechanizmów wolnorodnikowych w indukcji nadciśnienia tętniczego według modelu fruktozowego. W eksperymentach model fruktozy, w którym szczurom podawany jest 10% roztwór fruktozy do picia, wielokrotnie wykorzystywano do badań związków o potencjalnym działaniu hipotensyjnym [71,103,104], a także związków będących inhibitorami reduktazy aldozy. W warunkach hiperglikemii reduktaza aldozy powoduje przemianę glukozy do sorbitolu, który w nadmiernych ilościach podwyższa ciśnienia osmotyczne oraz zaburza przewodnictwo nerwowe [72].

W modelu fruktozowym walidowanym w trakcie pracy doktorskiej osiągnięto wyniki zgodne z danymi literaturowymi [105,106], a mianowicie znamienne statystycznie wzrost zarówno ciśnienia skurczowego, jak i rozkurczowego krwi, zaburzenia w profilu lipidowym oraz brak znamienych statystycznie zmian w stężeniu glukozy. Porównywalne stężenie

glukozy w osoczu grupy otrzymującej 10% roztwór fruktozy w odniesieniu do grupy kontrolnej występuje prawdopodobnie na skutek początkowej silnej kompensacji insulinowej, co przejawia się znacznym podwyższeniem poziomu insuliny w osoczu i narastającą insulinoopornością. Zaburzenia lipidowe wiązały się ze wzrostem stężenia cholesterolu całkowitego ($p < 0,02$), cholesterolu frakcji LDL oraz trójglicerydów ($p < 0,001$), a także obniżeniem cholesterolu frakcji HDL ($p < 0,001$). W przykurczonych submaksymalnie fenylefryną aortach pobranych po zakończonym eksperymencie od szczurów modelu fruktozowego, oceniono czynnościowy stan śródbłonna aorty. Nie stwierdzono jego uszkodzeń. Funkcja rozkurczowa aort była tylko w nieznacznym stopniu obniżona (82,8%), w porównaniu do kontroli (100%).

NO pełni kluczową rolę w regulacji napięcia mięśniówki gładkiej naczyń, potwierdza to fakt, iż zahamowanie innego ważnego wazodylatora, a mianowicie prostacykliny, przez inhibitor cyklooksygenazy, w większości naczyń nie zmienia napięcia i nie upośledza perfuzji [107]. Wskazuje to na słuszność teorii o stałym podstawowym uwalnianiem tlenu azotu, utrzymującym naczynia w stanie odpowiedniego napięcia, stąd uzasadnione jest, że jego niedobór może przyczyniać się do wzrostu oporu obwodowego i rozwoju nadciśnienia. W badaniach eksperymentalnych *in vivo*, *ex vivo* oraz *in vitro*, skutkiem hamowania syntazy NO przez analogi argininy, np. L-NMMA (L-N-monometyloargininę) lub L-NAME (ester metylowy N ω -Nitro-L-argininy) jest śródbłonkowiedziejna wazokonstrykcja i istotny wzrost ciśnienia tętniczego krwi, a dłuższe podawanie L-NAME wywołuje trwałe nadciśnienie tętnicze oraz znacząco upośledza funkcje śródbłonna [108,109,110,111]. Zważywszy na te zależności i brak osiągnięcia istotnych statystycznie zaburzeń w obrębie śródbłonna w poprzednich modelach, podjęto decyzję o walidacji kolejnego modelu zwierzęcego – modelu L-NAME.

Przewlekłe stosowanie L-NAME jest dobrze przebadanym i często stosowanym modelem patologii sercowo-naczyniowej. L-NAME jest nieselektywnym inhibitorem syntazy tlenu azotu o złożonym działaniu [74], powodującym liczne zmiany w układzie sercowo-naczyniowym. Zmiany te są efektem dysfunkcji śródbłonna oraz niedokrwienia mięśnia sercowego, powstałego w wyniku zwłóknienia i przerostu lewej komory, na skutek zahamowanie antyproliferacyjnego działania NO [112]. Ponadto, w wyniku niedoboru NO i wazokonstrykcji w tętnicy nerkowej wzrasta wytwarzanie angiotensyny II [112,113]. Bezpośrednie działanie angiotensyny II i aldosteronu, pobudzające proliferację mięśniówki gładkiej i fibroblastów, ma dużo bardziej niepożądany wpływ na układ sercowo-naczyniowy

niż sam deficyt NO. Tak więc każda zmiana strukturalna i hemodynamiczna występująca przy przewlekłym stosowaniu L-NAME jest powodowana współistnieniem niedoboru NO i stymulacją układu angiotensyna - aldosteron, co ma istotne znaczenie przy rozwoju nadciśnienia tętniczego. W walidowanym modelu szczurom podawano L-NAME w dawce 40 mg/kg m.c./dzień, przez okres 4 tygodni [73,74,114]. W efekcie uzyskano znamienne statystycznie wzrost ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi, które wynosiło średnio 180,4 mmHg dla ciśnienia skurczowego i 146,9 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego.

Obniżenie syntezy NO prowadzi do aktywacji i agregacji płytek krwi, pobudzenia proliferacji komórek mięśni gładkich oraz zmniejszenia wrażliwości komórek na insulinę, stąd zaburzenia w obrębie profilu węglowodanowego i podwyższony poziom glukozy w osoczu. Ponadto przewlekłe stosowanie L-NAME wzmacnia proces peroksydacji lipidów oraz lipoprotein o małej gęstości. Mechanizm ten uszkadza błony fosfolipidowe, przez co zwiększa się stężenie fosfolipidów we krwi. Dochodzi do zaburzeń w obrębie całego profilu lipidowego, z silnie zaznaczonym wzrostem poziomu trójglicerydów. Inhibicja powstawania NO powoduje zwiększenie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu poprzez obniżenie aktywności transferazy palmityno-karnitynowej (CPT), która zmniejsza wnikanie kwasów tłuszczowych do mitochondriów i ich utlenianie [115,116]. W związku z tym w osoczu występuje wysokie stężenie trójglicerydów, cholesterolu LDL i cholesterolu całkowitego, natomiast obniżone zostaje stężenie frakcji HDL cholesterolu. W modelu L-NAME uzyskano tożsame zaburzenia, znamienne statystycznie wzrost cholesterolu całkowitego ($p < 0,05$), cholesterolu frakcji LDL oraz trójglicerydów ($p < 0,001$), obniżenie cholesterolu frakcji HDL ($p < 0,001$), a także wzrost stężenia glukozy ($p < 0,05$).

Model L-NAME jest modelem, w którym postuluje się występowanie zaburzeń w obrębie endotelium. Dysfunkcję śródbłónka w aorcie oceniono na podstawie wielkości zależnego od śródbłónkowego NO rozkurczu wywołanego przez acetylocholinę. Wyindukowane zmiany w modelu prowadziły do istotnych zaburzeń funkcji rozkurczowych aorty. Aorty pochodzące od szczurów modelu L-NAME rozkurczały się średnio w 32%, podczas gdy aorty pochodzące od szczurów kontrolnych wykazywały niemalże całkowity rozkurcz. Dla porównania wielkości zaburzeń relaksacyjnych aorty, przebadano aorty z mechanicznie usuniętym śródbłónkiem, które rozkurczały się w niecałych 20%.

Po przeanalizowaniu wyników uzyskanych w indukowanych modelach nadciśnienia tętniczego, konsekwentnie wszystkie stawiane wymagania wobec modelu zwierzęcego

nadciśnienia tętniczego, udało się osiągnąć w modelu L-NAME. Dlatego też model ten posłużył do oceny potencjalnych właściwości plejotropowych wybranych związków o cechach α_1 -adrenolityków. Dla lepszej oceny właściwości plejotropowych wyselekcjonowanych związków oznaczono dodatkowe parametry w modelu L-NAME, były to wskaźnik peroksydacji lipidów, enzymy stresu oksydacyjnego, poziom NO_3^- NO_2^- , a także osoczowy poziom parametrów biochemicznych, tj. asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) oraz śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (VEGF).

Podsumowując, model L-NAME po walidacji i oznaczeniu dodatkowych parametrów, wskazano jako ten, który może wykazać potencjalne właściwości plejotropowe, badanych w trakcie pracy doktorskiej, siedmiu związków o właściwościach α_1 -adrenolitycznych.

Aktualne wytyczne dotyczące farmakoterapii nadciśnienia tętniczego nie zalecają stosowania α_1 -adrenolityków jako leków I rzutu. W dużej mierze za odsunięcie tej grupy leków odpowiada omawiane we wstępie wielośrodkowe badanie kliniczne ALLHAT [24], w którym to stwierdzono, że zastosowanie doksazosyną wiązało się ze zwiększoną ilością nowych przypadków niewydolności serca w porównaniu z chlortalidonem (diuretyk). Przygotowane jednak na podstawie wielu badań analizy pokazują, że α_1 -adrenolityki pod względem bezpieczeństwa i skuteczności nie wydają się odbiegać od innych leków krążeniowych, a poprawność przeprowadzenia i interpretacji wyników ALLHAT wciąż poddawane są w wątpliwość. Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na wielokierunkowość działania farmakologicznego α_1 -adrenolityków, co tym bardziej może wskazywać na potrzebę krytycznej analizy wobec słuszności stosowania ich jedynie jako leków pomocniczych w terapii hipotensyjnej. Niewątpliwe korzyści z ich stosowania mogą dotyczyć pacjentów cierpiących z powodu nadciśnienia tętniczego z towarzyszącym łagodnym rozrostem gruczołu krokowego – BPH (*ang. benign prostatic hyperplasia*) i zaburzeniami lipidowymi [117]. W tym wypadku dają one możliwość zastosowania jednego leku, minimalizując tym samym ryzyko niepożądanych interakcji. Biorąc pod uwagę fakt wspomnianej wielokierunkowości działania α_1 -adrenolityków, w ramach rozprawy doktorskiej, wyselekcjonowano do badań przewlekłych siedem związków o właściwościach α_1 -adrenolitycznych i aktywności krążeniowej, wykazanej na podstawie szeregu testów przesiewowych, przeprowadzonych w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Wybrane związki należą do dwóch odrębnych pod względem struktury chemicznej grup, a wyniki badań dotyczących ich aktywności zostały opublikowane w latach 2008 – 2016:

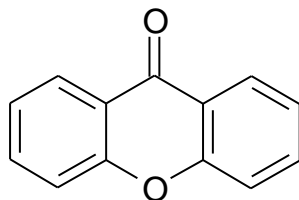
✓ Grupa I:

MH-2	}	pochodne ksantonu
MH-3		[118,119,120,121,122,123,124,125,126,204]
MH-99		

✓ Grupa II:

EP-46	}	pochodne piperolidyn-2-onu
EP-47		[127,128,129,130,131,132,133,134,135]
EP-49		
EP-58		

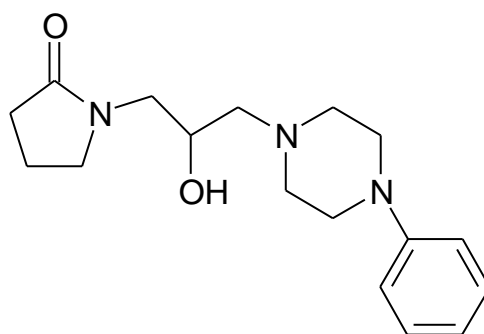
Związki MH-2, MH-3, MH-99 są pochodnymi ksantonu, zawierającymi układ aminoalkoholowy połączony z pierścieniem podstawionej piperazyny. Związki MH-2 i MH-3 to izomery optyczne związku MH-99, który jest mieszaniną racemiczną obu tych enancjomerów. Zostały one zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierownictwem prof. dr hab. Henryka Marony. Powstały jako efekt modyfikacji syntetycznych pochodnych ksantanu, zmierzającej do uzyskania związków o aktywności krążeniowej. Poniżej przedstawiono strukturę ksantonu (9H-ksanten-9-on) będącego organicznym związkiem heterocyklicznym:



Rycina 36. Układ ksantonu

Ksantony i pochodne ksantonu, naturalne jak i syntetyczne, wykazują różne właściwości farmakologiczne, m.in.: antyoksydacyjne, przeciwzapalne, hipotensyjne, wazodylatacyjne, hamujące agregację płytek krwi, a także przeciwzakrzepowe [136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147]. Silne działanie wazodylatacyjne tych związków ciągle zgłębiane jest pod kątem możliwego mechanizmu działania [142,147,148,149,150]. Działanie przeciwzakrzepowe opiera się najprawdopodobniej na pośrednim lub bezpośrednim blokowaniu czynnika krzepnięcia Xa. Działanie przeciwplatek sulfonowanych pochodnych ksantonu polega na hamowaniu przemian kwasu arachidonowego oraz hamowaniu agregacji płytek indukowanej ADP [137,142], natomiast działanie przeciwhiperlipidemiczne jest prawdopodobnie związane z inhibicją alfa-glukozydazy [151,152,153]. W ostatnim czasie wykazano też możliwość hamowania zwłóknienia mięśnia sercowego u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, u których po zastosowaniu pochodnej ksantanu dochodziło do wzrostu poziomu angiotensyny 1-7 [154], która ma działanie m.in. wazodylatacyjne, przeciwzapalne oraz przeciwproliferacyjne [153,155].

Związki EP-46, EP-47, EP-49, EP-58 to pochodne pirolidyn-2-onu. Zostały zsyntetyzowane przez dr hab. Katarzynę Kulig, prof. UJ, w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM pod kierownictwem prof. dr hab. Barbary Malawskiej. Pierwowzorem zsyntetyzowanych do badań nowych pochodnych pirolidyn-2-onu był 1-(2-hydroksy-3/4-fenilo-1-piperazyno/-propylo)-pirolidyn-2-on, którego strukturę przedstawiono poniżej:



Rycina 37. 1-(2-hydroksy-3/4-fenilo-1-piperazyno/-propylo)-pirolidyn-2-on

W pierwszym etapie badań przesiewowych dla związków z obydwu grup oznaczono powinowactwo do receptorów adrenergicznych metodą radioreceptorową w korze mózgowej szczura. Przeprowadzone badanie pozwoliło stwierdzić silne powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych i słabe lub brak powinowactwa do receptorów α_2 -adrenergicznych [121,123,127,128,129,127,130,156,204]. W kolejnych badaniach wykazano m.in. silną aktywność w modelu arytmii indukowanej adrenaliną i barem, brak wpływu na prawidłowy elektrokardiogram szczura, istotne działanie przeciwoarytmiczne w modelu poreperfuzyjnych zaburzeń rytmu i istotną aktywność hipotensyjną po jednokrotnym podaniu dożylnym [118,119,120,122,123,127,129,133,134,135,156].

Podjęte przeze mnie badania przewlekłe w modelu nadciśnienia tętniczego dostarczyły nowych danych o aktywności omawianych związków.

Wszystkie badane związki, w podobnym stopniu jak **prazosyna**, obniżały wydrukowane w modelu L-NAME nadciśnienie tętnicze krwi. Znamienne statystycznie spadek ciśnienia skurczowego dla **prazosyny** oraz związków **MH-2**, **MH-99**, **EP-47**, **EP-49**, **EP-58** nastąpił podczas 3 pomiaru ciśnienia tętniczego, w VI dniu podawania dootrzewnowego, a dla związków **MH-3** oraz **EP-46** podczas 2 pomiaru, w IV dniu podawania dootrzewnowego. Znamienne statystycznie spadek ciśnienia rozkurczowego dla prazosyny oraz związków **MH-2**, **MH-3**, **MH-99**, **EP-47**, **EP-58** nastąpił podczas 4 pomiaru, w VIII dniu podawania dootrzewnowego, a dla związków **EP-46** oraz **EP-49** podczas 3 pomiaru, w VI dniu podawania dootrzewnowego. Badane związki obniżały ciśnienie skurczowe krwi do poziomu mieszczącego się w przedziale 117,0 mmHg – 130,0 mmHg, a rozkurczowe 88,7 mmHg – 108,3 mmHg, co jest tożsame z ciśnieniem tętniczym u normotensyjnych szczurów.

Następnie oceniano czynnościowy stan śródbłonna aort, po przewlekłym podawaniu badanych związków w modelu L-NAME, na podstawie zależnego od NO rozkurczu naczyń, wywołanego przez acetylocholinę. Zaburzoną funkcję endotelium po indukcji nadciśnienia wg modelu L-NAME w znacznym stopniu poprawiała **prazosyna**, w nieco mniejszym związek **EP-58**, niewielką poprawę funkcji zaobserwowano również dla związku **MH-2** oraz **MH-3**. Można zatem postulować, że związki te korzystnie wpływały na uszkodzony śródbłonek, podczas gdy pozostałe nie miały na niego wpływu.

W wyniku indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME doszło również do zaburzeń profilu węglowodanowo-lipidowego. Przewlekłe podawanie **prazosyny** korygowało te zaburzenia. Podobną poprawę parametrów profilu można było zaobserwować po zastosowaniu związków **MH-2, MH-3, MH-99** oraz w mniejszym stopniu związku **EP-58**, który w przeciwieństwie do **MH-2, MH-3** i **MH-99**, nie wpływał istotnie statystycznie na stężenia glukozy oraz cholesterolu frakcji HDL, natomiast podobnie jak one znamienne obniżał poziomy cholesterolu frakcji LDL i trójglicerydów.

Fizjologicznie w organizmie występuje równowaga pomiędzy utleniaczami i przeciwutleniaczami. Wzrost produkcji wolnych rodników lub spadek aktywności antyoksydacyjnej powoduje zachwianie tej równowagi w kierunku reakcji utlenienia, co jest przyczyną stresu oksydacyjnego. Podczas stresu oksydacyjnego stacjonarne stężenia reaktywnych form tlenu wzrasta w znaczący sposób. Najczęstszymi przyczynami stresu oksydacyjnego są wzrost szybkości wytwarzania reaktywnych form tlenu, niedobory niskocząsteczkowych antyoksydantów bądź obniżenie aktywności enzymów o działaniu antyoksydacyjnym. Jednym z najczęściej oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego jest dialdehyd malonowy (MDA), będący wyznacznikiem autooksydacji lipidów. Łańcuchowa peroksydacja lipidów jest najpowszechniej występującym procesem wolnorodnikowym w komórce, polegającym na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które wchodzi w skład fosfolipidów błonowych i lipoprotein. Zastosowanie **prazosyny** istotnie statystycznie obniżało poziom MDA u szczurów modelu L-NAME, u których był on wysoki na skutek wystąpienie silnych procesów wolnorodnikowych, w wyniku indukcji nadciśnienia tętniczego. Znamienne poziom osoczowego MDA obniżały również związki: **MH-2, MH-3, MH-99** oraz **EP-46**, co wskazuje na hamowanie procesów wolnorodnikowych.

Nie uzyskano zmian w tkankowym poziomie MDA u szczurów modelu L-NAME, podobnie jak nie wykazano żadnych istotnych zmian w poziomie tego wskaźnika po przewlekłym podawaniu badanych związków. Istnieje prawdopodobieństwo, że jest to wynik niewystarczającego czasu ekspozycji na badane związki.

Enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GPx) tworzą enzymatyczną barierę przeciwutleniającą organizmu. W warunkach fizjologicznych enzymy te współdziałają ze sobą, m.in. w celu przekształcenia anionorodnika ponadtlenkowego w tlen i wodę, natomiast w sytuacjach

patologicznych dochodzi do zaburzenia ich aktywności, osłabienia obrony antyoksydacyjnej organizmu i narastającego stresu oksydacyjnego [158]. W indukowanym nadciśnieniu tętniczym modelu L-NAME wykazano wzrost reakcji wolnorodnikowych. W odpowiedzi dochodziło do wzmożonej aktywności SOD i wzrostu poziomu nadtlenu wodoru. Najprawdopodobniej w celu usuwania nadmiaru nadtlenu wodoru intensywnie aktywowała się katalaza, niestety poziom GPx był obniżony, co mogło skutkować zaburzeniami upośledzającymi obronę antyoksydacyjną przed reaktywnymi formami tlenu. **Prazosyna** istotnie statystycznie obniżała poziom CAT oraz SOD, przy równoczesnym podnoszeniu aktywności GPx, co może sugerować przywracanie prawidłowego funkcjonowania bariery enzymatycznej w stresie oksydacyjnym. Spośród badanych związków, **wszystkie** znamienne zwiększały aktywność GPx. Związki **MH-3** oraz **MH-99** obniżały poziom CAT. Żaden ze związków istotnie statystycznie nie wpływał na poziom SOD.

Zaburzenie bariery antyoksydacyjnej u szczurów, którym indukowano nadciśnienie tętnicze przy użyciu L-NAME, wskazuje na wystąpienie silnych procesów wolnorodnikowych współzależnych z niedostateczną ilością NO. Dla weryfikacji poziomu NO oznaczono stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) w osoczu szczurów. Ilość NO_2^- oraz NO_3^- jest wprost proporcjonalna do ilości NO syntetyzowanego w organizmie, stąd jest dobrym wskaźnikiem efektywności hamowania wytwarzania NO w wyniku chronicznego zastosowania L-NAME, a także może posłużyć do oceny poziomu NO po zastosowaniu badanych związków. Ze względu na zaistniałe ograniczenia ilościowe, do badań wybrano próbki pochodzące od zwierząt z grup: kontrolnej, L-NAME, prazosyny, MH-3 oraz MH-99. Stężenia NO_2^- oraz NO_3^- w grupie zwierząt **modelu L-NAME** były w znaczącym stopniu obniżone w stosunku do kontroli. Po 14-dniowym stosowaniu badanych związków, tj. **prazosyny**, **MH-3** oraz **MH-99**, dochodziło do wzrostu stężeń NO_2^- oraz NO_3^- , co świadczy o wzroście produkcji NO.

Kolejnym z parametrów oznaczanym w celu poszerzenia charakterystyki modelu L-NAME była ocena stężenia asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA). Stężenia ADMA w grupie zwierząt **modelu L-NAME** były w znaczącym stopniu obniżone w stosunku do kontroli. Po 14-dniowym stosowaniu badanych związków dochodziło do wzrostu stężeń ADMA dla grupy z **prazosyną**, **MH-2**, **MH-3**, **MH-99**, **EP-46** oraz **EP-47**. Podawanie związku **EP-49** i **EP-58** nie wpływało istotnie statystycznie na poziom ADMA. ADMA jest endogennym, kompetycyjnym inhibitorem e-NOS, powodującym poważne dysfunkcje

śródbłonna. Powstaje w wyniku hydrolizy białek bogatych w metylowane reszty argininowe, głównie histonów [159]. Podwyższone stężenie ADMA związane jest ze znacznym ograniczeniem syntezy NO, a także jak pokazują badania z ostatnich lat, z nasiloną syntezą nadtlenu, co może odpowiadać za NOS-niezależne zaburzenia wywoływane przez ADMA, niepodlegające poprawie po podaniu argininy u osób z wysokimi wyjściowymi stężeniami ADMA w surowicy [160,161]. Wykazano silną korelację wysokiego stężenia ADMA z upośledzoną funkcją wazodylatacyjną śródbłonna [162], przede wszystkim u chorych z nadciśnieniem tętniczym [163], a także hipercholesterolemią, hiperhomocysteinemią, insulinoopornością oraz cukrzycą, czyli w zaburzeniach zaliczanych do klasycznych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Zważywszy na te zależności, ADMA jest coraz częściej oznaczanym parametrem prognostycznym. Wzrost poziomu ADMA w praktyce klinicznej świadczy o patologii. W badaniach przeprowadzonych w trakcie rozprawy doktorskiej wykazano spadek jego osoczowego poziomu u szczurów modelu L-NAME w odniesieniu do kontroli oraz wzrost po zastosowaniu α_1 -adrenolityków do wartości pokrywających się z wartościami kontrolnymi. Ta odwrócona prawidłowość może przemawiać za faktem, iż w warunkach w których zewnętrznie dostarczany jest inhibitor syntazy tlenu azotu, aktywność endogennego inhibitora jakim jest ADMA w znaczący sposób ulega kompensacyjnemu obniżeniu. W sytuacji poprawy funkcji śródbłonkowych, w wyniku zastosowania α_1 -adrenolityków, przywracane są mechanizmy fizjologicznie występujące w organizmie, rośnie więc też stężenie ADMA.

Następnym z przeprowadzanych eksperymentów było oznaczenie osoczowego poziomu naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF). Stężenia VEGF w grupie zwierząt **modelu L-NAME** były istotnie podwyższone w stosunku do kontroli. Po 14-dniowym stosowaniu badanych związków dochodziło do znamiennego spadku stężeń VEGF dla grupy z **prazosyną** oraz dla **pozostałych grup badanych**. VEGF jest niespecyficznym markerem uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, który może wpływać na zwiększanie syntezy tlenu azotu poprzez up-regulację eNOS [164,165], stąd też w stanach patologicznych i przy zmniejszonej produkcji NO, w efekcie działania mechanizmów kompensacyjnych, dochodzi do wzrostu ilości VEGF, co wykazano w powyższym badaniu.

W celu określenia charakteru aktywności oraz wybiórczości wyselekcjonowanych związków o właściwościach α_1 -adrenergicznych wobec podtypów receptora

α_1 -adrenergicznego oznaczono ich aktywność wewnętrzną względem ludzkich receptorów α_{1A} -, α_{1B} - i α_{1D} -adrenergicznych. Wyniki badań aktywności wewnętrznej uzyskane dla testowanych struktur porównano z wynikami uzyskanymi dla trzech związków referencyjnych, nieselektywnych - prazosyny i terazosyny oraz preferencyjnej względem receptora α_{1A} i α_{1D} - tamsulozyny.

Wszystkie badane związki wykazały właściwości antagonistyczne względem receptorów α_{1A} -, α_{1B} - i α_{1D} -adrenergicznych, hamując wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału indukowaną fenylefryną. Związki **MH-2**, **MH-3** oraz **MH-99** wykazały silną preferencyjność hamowania receptora α_{1D} , hamując jego czynność ok 15-krotnie silniej w odniesieniu do receptorów α_{1A} i α_{1B} . Związki **EP-46** i **EP-47** wykazały umiarkowaną, około 3-krotną, preferencyjność hamowania receptora α_{1D} w odniesieniu do receptora α_{1B} , nie wpływając przy tym praktycznie na czynność receptora α_{1A} . Związek **EP-49** wykazał umiarkowaną preferencyjność hamowania czynności receptora α_{1A} , hamując jego wewnętrzną transdukcję sygnału ok 5-krotnie silniej w odniesieniu do pozostałych dwóch podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych. Związek **EP-58** hamował z porównywalną siłą indukowaną fenylefryną transdukcję sygnału w przypadku wszystkich podtypów receptorów α_1 , tj. α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} , nie wykazując tym samym wybiórczości względem żadnego z podtypów receptora α_1 . Można więc wnioskować, że związki odznaczające się najwyższą efektywnością w testach, a więc przypuszczalnie korygujące zaburzenia powstałe w wyniku indukcji nadciśnienia tętniczego wg modelu L-NAME, posiadają silną komponentę aktywności α_{1D} -adrenolitycznej. Uzyskane wyniki sugerują również mechanizm, za pośrednictwem którego związek referencyjny - prazosyna - wykazuje swoje korzystne efekty krążeniowe. Wspomniana prazosyna, pomimo braku preferencyjności receptorowej, cechuje się bardzo wysoką aktywnością antagonistyczną względem receptorów α_{1D} -adrenergicznych. Pozostaje to w zgodzie z doniesieniami literaturowymi, które wskazują na istotną rolę podtypu α_{1D} w rozwoju nadciśnienia tętniczego krwi [36,37,166,167]. Hosoda i wsp. [168] wykazali, że u myszy pozbawionych receptora α_{1D} poddanych nefrektomii i obciążanych dietą wysokosodową, obserwowano obniżenie ciśnienia tętniczego krwi i stężeń amin katecholowych, w porównaniu do myszy dzikich, podczas gdy u myszy pozbawionych receptora α_{1B} dochodziło do występowania silnego efektu hipertensyjnego porównywalnego do tego obserwowanego u myszy dzikich. Wynika z tego, iż podtypy α_{1B} i α_{1D} biorą udział w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, natomiast to podtyp α_{1D} jest odpowiada za rozwój nadciśnienia tętniczego.

Podsumowując uzyskane w pracy wyniki można zauważyć, że badane związki wykazały się aktywnością w przeprowadzonych testach. Biorąc pod uwagę fakt, iż ich wspólną cechą jest antagonizm w stosunku do receptora α_1 -adrenergicznego, może to sugerować, że blokada tego receptora ma korzystny wpływ na uszkodzenia występujące po indukcji nadciśnienia tętniczego w modelu L-NAME. Cicarelli i wsp. [169] od 2008 roku badają korzystny wpływ blokady receptorów α_1 -adrenergicznych na neo-angiogenezę, pozostającą pod ścisłą kontrolą komórek śródbłonna. Jako pierwsi podkreślali znaczenie endotelium w tym mechanizmie, wykazując, że śródbłonkowe receptory α_1 zmniejszają angiogenezę spowodowaną niedokrwieniem, poprzez bezpośrednie działanie komórek śródbłonna na pro-angiogenną odpowiedź. Dlatego też podjęli się badań, które pomogły wskazać, że blokowanie tychże receptorów przynosiło korzystne rezultaty. Fakt, iż coraz częściej zwraca się uwagę na wielokierunkowość działania farmakologicznego α_1 -adrenolityków i zadawalające efekty płynące z terapii z ich udziałem, a także nowe doniesienia naukowe i wyniki przedstawione w tejże rozprawie doktorskiej, można wskazać na potrzebę dalszych badań ich wpływu na mechanizmy śródbłonkowe, istotne w przebiegu chorób układu krążenia. Ponadto w rozprawie doktorskiej wykazano, że związki odznaczające się najwyższą efektywnością w testach, posiadają silną komponentę aktywności α_{1D} -adrenolitycznej. Planuje się dalsze badania w celu zgłębienia tej preferencyjności, co może mieć istotne znaczenie w terapii hipotensyjnej.

VIII. WNIOSKI

1. Poszukując optymalnego modelu eksperymentalnego o wysokim potencjale hipertensyjnym oraz zdolnością rozwijania zaburzeń w obrębie śródbłonka i profilu węglowodanowo-lipidowego, zwalidowano cztery modele nadciśnienia tętniczego u szczura:
 - ✓ **Model DEX**
 - ✓ **Model DOCA**
 - ✓ **Model FRU**
 - ✓ **Model L-NAME**
2. W **każdym z badanych modeli** wyidukowano nadciśnienie tętnicze, a także zaburzenia profilu lipidowego. Wzrost osoczowego stężenia glukozy uzyskano jedynie u szczurów **modelu DEX** i **modelu L-NAME**. Zaburzenia funkcji śródbłonka, charakterystyczne dla przewlekłego nadciśnienia tętniczego, wystąpiły wyłącznie w **modelu L-NAME**. Zważywszy na to, że **model L-NAME** spełnił wszystkie założenia pracy, został wybrany do oceny potencjalnych właściwości plejotropowych związków objętych rozprawą doktorską, a mianowicie:
 - ✓ pochodnych ksantonu (**MH-2, MH-3, MH-99**)
 - ✓ pochodnych pirolidyn-2-onu (**EP-46, EP-47, EP-49, EP-58**)
3. Dla poszerzenia charakterystyki **modelu L-NAME** wykonano szereg dodatkowych badań. Wykazano, że model ten generuje stres oksydacyjny, powoduje znaczące obniżenie poziomu tlenu azotu, a także znamienne wpływa na markery śródbłonkowo-naczyniowe, tzn. obniża stężenie ADMA i podwyższa stężenie VEGF.
4. **Wszystkie badane związki** obniżały wyidukowane w modelu L-NAME nadciśnienie tętnicze krwi, co potwierdza ich działanie hipotensyjne.
5. Związki **EP-58, MH-2, MH-3** przywracały zaburzoną funkcję relaksacyjną aorty, co świadczy o korekcyjnym wpływie tych związków na zaburzoną funkcję śródbłonka.
6. Podawanie związków **MH-2, MH-3, MH-99** korygowało zaburzenia w profilu węglowodanowo-lipidowym.

7. Badane związki osłabiały procesy wolnorodnikowe. Wykazano, że **wszystkie związki** zwiększały aktywność peroksydazy glutationowej, natomiast związki **MH-3** i **MH-99** obniżały poziom katalazy. Związki **MH-2**, **MH-3**, **MH-99** oraz **EP-46** zmniejszały stężenie osoczkowego MDA, co świadczy o redukcji wolnorodnikowego utleniania lipidów, prowadzącego do uszkodzeń błon biologicznych.
8. Związki **MH-3** oraz **MH-99** powodowały wzrost stężenia tlenu azotu, obniżonego na skutek podawania inhibitora syntazy tlenu azotu – L-NAME.
9. Związki **MH-2**, **MH-3**, **MH-99**, **EP-46** oraz **EP-47** powodowały wzrost stężenia ADMA, obniżonego w grupie zwierząt modelu L-NAME.
10. **Wszystkie badane związki** obniżały podwyższone stężenia VEGF, co świadczy o poprawie fizjologicznych funkcji śródbłonkowo-naczyniowych.
11. Każdy z badanych związków hamował wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału ludzkich receptorów α_{1A} -, α_{1B} - i α_{1D} -adrenergicznych. Związki **MH-2**, **MH-3** i **MH-99** wykazały wysoką, a związki **EP-46** i **EP-47** umiarkowaną preferencyjność hamowania względem receptorów α_{1D} . Uzyskane w pracy wyniki sugerują, iż silna blokada podtypu receptora α_{1D} ma istotny związek z działaniem hipotensyjnym i koryguje zaburzenia obserwowane w indukowanym nadciśnieniu tętniczym modelu L-NAME.

IX. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności hipotensyjnej i właściwości plejotropowych związków po podawaniu przewlekłym w wybranym modelu nadciśnienia tętniczego u szczura. Do badań wybrano siedem związków, wykazujących aktywność α_1 -adrenolityczną, należących do dwóch odrębnych grup, pochodnych ksantonu (MH-2, MH-3, MH-99) oraz pochodnych piroolidyn-2-onu (EP-46, EP-47, EP-49, EP-58). Zasadniczy przedmiot rozprawy doktorskiej, wymagał walidacji wybranych modeli zwierzęcych nadciśnienia tętniczego (modelu DEX, modelu DOCA, modelu FRU, modelu L-NAME). Model L-NAME spełnił wszystkie założenia pracy i został wybrany do oceny potencjalnych właściwości plejotropowych związków objętych rozprawą doktorską. W tym celu oznaczono aktywność związków w modelu L-NAME, badając ich wpływ na ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi po podawaniu przewlekłym, funkcje relaksacyjne aorty, profil węglowodanowo-lipidowy, parametry stresu oksydacyjnego, stężenie azotanów(III) oraz azotanów(V), poziom wybranych biomarkerów krążeniowych (ADMA, VEGF), a także wewnętrzną transdukcję sygnału w komórkach z ekspresją ludzkich receptorów α_{1A} , α_{1B} i α_{1D} -adrenergicznych.

Związki MH-2, MH-3, MH-99 odznaczające się dużą aktywnością w przeprowadzanych testach, wykazały wysoką preferencyjność hamowania czynności receptorów α_{1D} -adrenergicznych. To wskazuje, że blokada podtypu receptora α_{1D} odpowiada za efekt hipotensyjny oraz prawdopodobnie za działania korygujące zaburzenia obserwowane w indukowanym nadciśnieniu tętniczym w modelu L-NAME.

Summary

The aim of this doctoral study was evaluation of hypotensive and pleiotropic activity of tested compounds after chronic administration in the selected experimental models of hypertension. Seven compounds with α_1 -adrenolytic activity were selected for tests, three of which were xanthone derivatives (MH-2, MH-3 and MH-99) and others four were pyrrolidin-2-one derivatives (EP-46, EP-47, EP-49 and EP-58). The main aim of this study required validation of four different animal models of hypertension: DEX model, DOCA model, FRU model and L-NAME model. This last one – L-NAME model – met all assumptions of this study and was selected to evaluation of potential pleiotropic activities of tested compounds. All of tested compounds were evaluated in L-NAME model after chronic administration in terms of their potential hypotensive activity, influence on relaxation of isolated rat-aorta, on glucose and lipid plasma levels, on oxidative stress parameters, on NO_2^- and NO_3^- plasma levels, and also on two circulatory biomarker plasma levels – ADMA and VEGF. At the end intrinsic activity for tested compounds towards human α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors was also evaluated.

Compounds marked with symbols MH-2, MH-3 and MH-99 showed high therapeutic activity in all pharmacological and biochemical studies. Additionally, these compounds showed also high preferential α_{1D} -adrenolytic activity. These results suggest that α_{1D} -adrenolytic activity of tested compound may be connected with their hypotensive activity and with their corrective influence on disturbed endothelium function induced in L-NAME hypertension model.

X. BIBLIOGRAFIA

- [1] Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym — 2011 rok. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* 2011; 15: 55–82
- [2] Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym — 2015 rok. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce* 2015;1(1):1-70
- [3] Zanchetti A. Bottom blood pressure or bottom cardiovascular risk? How far can cardiovascular risk be reduced? *J. Hypertens.* 2009, 27(8): 1509-1520
- [4] Blann AD. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003/2004;33(5-6):256-261
- [5] Sanguinetti SM, Batthyany C, Trostchansky A. Nitric oxide inhibits prooxidant actions of uric acid during copper-mediated LDL oxidation. *Arch.Biochem. Biophys.*2004;423(2):302-308
- [6] Rosenblum WI. Platelet adhesion and aggregation without endothelialdenudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J. Vasc. Res.*1997;34(6):409-417
- [7] Suzuki H. Recent advances in the study of endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDHF). *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2003;121(2):85-90
- [8] Sunano S, Sekiguchi F. Endothelium-derived factors in hypertensive blood vessels, especially nitric oxide and hypertension. *Yakugaku Zasshi.* 2003;123(7):495-515
- [9] O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation.* 1997;95(5):1126-1131
- [10] Gryglewski RJ, Uracz W, Swies J, et al. Comparison of endothelial pleiotropic actions of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947:229-245
- [11] Mombouli JV, Illiano S, Nagao T. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992; 71: 137-144
- [12] Sznajderman M, Reweski W. Antagoniści wapnia. PZWL, Warszawa 2000;1:54-77
- [13] Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(9):2032-2037
- [14] Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM. Effect of diet and omega-3 fatty acid intervention on asymmetric dimethylarginine. A randomized controlled trial. *Nutr. Metab.* 2006;5:3-4

- [15] Davis KA, Samson SE, Best K. Ca²⁺ – mediated ascorbate release from coronary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2006; 147(1):131-139
- [16] Konya C, Ferdinandy P. Vitamin C: new role of the old vitamin in the cardiovascular system? *Br J Pharmacol* 2006; 147: 125-127
- [17] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275: 964–967
- [18] Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:1538–1547
- [19] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003; 348(7):593-600
- [20] Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A*. 2009;75(1):25-37
- [21] Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J. Hypertens*. 2005; 23: 97–104
- [22] Giannotti G, Doerries C, Mocharla PS, Mueller MF, Bahlmann FH, Horvath T, Jiang H, Sorrentino SA, Steenken N, Manes C, Marzilli M, Rudolph KL, Lüscher TF, Drexler H, Landmesser U. Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2010 Jun;55(6):1389-1397
- [23] Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn. Circ. J*. 2001; 65: 845–847
- [24] ALLHAT Collaborative Research Group. Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *JAMA*. 2000, 283: 1967-1975
- [25] Cheng JW. A review of isosorbide dinitrate and hydralazine in the management of heart failure in black patients, with a focus on a new fixed-dose combination. *Clin Ther*. 2006;28(5):666-678
- [26] Basile JN. Optimizing antihypertensive treatment in clinical practice. *Am J Hypertens*. 2003; 16(9.2):13S-17S
- [27] Levy D, Walmsley P, Levenstein M. Principal results of the Hypertension and Lipid Trial (HALT): a multicenter study of doxazosin in patients with hypertension. *Am Heart J*. 1996;131(5):966-973

- [28] Giorda C, Appendino M, Mason MG. Alpha-1 blocker doxazosin improves peripheral insulin sensitivity in diabetic hypertensive patients. *Metabolism* 1995; 44: 673–676
- [29] Taylor H. Pharmacotherapeutic status of doxazosin and role in coronary risk reduction. *Am. Heart J.* 1988; 116: 1735-1741
- [30] Ford AP. Pharmacological pleiotropism of the human recombinant α 1A-adrenoceptor: implications for α 1A-adrenoceptor classification. *Br J Pharmacol.* 1997; 121: 1127-1135
- [31] Hieble JP. Adrenoceptor subclassification: an approach to improved cardiovascular therapeutics. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 2000; 74: 163-171
- [32] Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100: 323-337
- [33] Woodcock EA. Cardiac α 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res.* 2008, 77: 452-462
- [34] Steinfath M, Chen YY, Lavický J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz H. Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol.* 1992;107(1):185-188
- [35] Tanoue A. Insights into α 1-adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14: 107-113
- [36] Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F, Cotecchia S. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11589-11594
- [37] Cohn HI, Harris DM, Pesant S, Pfeiffer M, Zhou RH, Koch WJ, Dorn GW 2nd, Eckhart AD. Inhibition of vascular smooth muscle G protein-coupled receptor kinase 2 enhances alpha1D-adrenergic receptor constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(4):1695-1704
- [38] Madersbacher S. The long-term outcome of medical therapy for BPH. *Eur Urol.* 2007; 51: 1522-1533
- [39] Committee AUA Practice Guidelines. AUA guideline on management of benign prostatic hyperplasia: Diagnosis and treatment recommendations. *J Urol.* 2003; 170:530-547
- [40] Kojima Y. Prostate Growth Inhibition by Subtype-Selective α 1-Adrenoceptor Antagonist Naftopidil in Benign Prostatic Hyperplasia. *Prostate.* 2009; 69:1521-1528
- [41] Yamanish T. Urodynamic Effects of Silodosin, a New α 1A-Adrenoceptor Selective Antagonist, for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *Neurourol and Urodynam.* 2010;29:558-562

- [42] Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies of experimental hypertension: I. Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp. Med.* 1934;59:347–379
- [43] Cosenzi A, Bernobich E, Bonavita M, Bertola G, Trevisan R, Bellini G. Antihypertensive treatment with enrasentan (SB217242) in an animal model of hypertension and hyperinsulinemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002;39(4):488–495
- [44] Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* 1997;29(4):1025–1030
- [45] Wilson C, Byrom F.B. Renal changes in malignant hypertension. *Lancet* 1939;1:136–139
- [46] Pickering GW, Prinzmetal M. Experimental hypertension of renal origin in the rabbit. *Clin. Sci.* 1937;3:357–368
- [47] Lerman LO, Schwartz RS, Grande JP, Sheedy PF, Romero JC. Noninvasive evaluation of a novel swine model of renal artery stenosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999;10:1455–1065
- [48] Panek RL, Ryan MJ, Weishaar RE, Taylor DG. Development of a high renin model of hypertension in the cynomolgus monkey. *Clin. Exp. Hypertens.* 1991;13:1395–1414
- [49] Thurston H, Swales JD. Influence of sodium restriction upon two models of renal hypertension. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1976;51: 275–279
- [50] Curry BB. Animal models used in identifying gender-related differences. *Int. J. Toxicol.* 2001; 20:153–160
- [51] Diamond JA. Hypertension due to perinephric compression: the “Page” kidney. *Am. J. Hypertens.* 2001;14(3):305
- [52] Sassard J, Lo M, Liu KL. Lyon genetically hypertensive rats: an animal model of “low renin hypertension.” *Acta. Pharmacol. Sin.* 2003;24(1):1–6
- [53] Anderson. PG, Bishop SP, Digerness SB. Coronary vascular function and morphology in hydralazine treated DOCA salt rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20(10):955–967
- [54] Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 2004;141(4):562–573
- [55] Fan WJ, Genade S, Genis A, Huisamen B, Lochner A. Dexamethasone-induced cardioprotection: A role for the phosphatase MKP-1? *Life Sci.* 2009;84(4): 838–846

- [56] Hu L, Zhang Y, Lim PS, Miao Y, Tan C, McKenzie KU, Schyvens CG, Whitworth JA. Apocynin but not L-arginine prevents and reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens.* 2006;19(4):413-418
- [57] Thomas M. Hypertension – clinical features and investigations. *Hosp. Pharm.* 2007;14(1):111-116
- [58] Dahl LK. Salt and hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.* 1972;25:231–244
- [59] Sugiyama F, Yagami K, Paigen B. Mouse models of blood pressure regulation and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2001;3(1):41– 48
- [60] Fortepiani LA, Yanes L, Zhang H, Racusen LC, Reckelhoff JF. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertension* 2003;42:952–955
- [61] Yagil C, Hubner N, Kreutz R, Ganten D, Yagil Y. Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in the Sabra rat model of hypertension. *Physiol. Genom.* 2003;12:85–95
- [62] Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. Renal.* 2003;285(F):619–628
- [63] Fruhbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr. Med. Chem.* 2004;2(3): 197–208
- [64] Vadolas J. Transgene copy number-dependent rescue of murine beta-globin knockout mice carrying a 183 kb human beta-globin BAC genomic fragment. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1728(4):150–162
- [65] Habibi J, Whaley-Connell A. Renin Inhibition Attenuates Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Pancreatic Remodeling in the Transgenic Ren2 Rat. *Endocrinology* 149(11):5643–5653
- [66] Kasi VS, Xiao HD, Shang LL. Cardiac restricted angiotensin converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293(H)182–192
- [67] Mondo CK, Yang WS, Zhang N, Huang TG. Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(11):1029-1034
- [68] Zhang Y, Croft KD, Mori TA, Schyvens CG, McKenzie KU, Whitworth JA. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens.* 2004;17(3):260-265
- [69] Kandlikar SS, Fink GD. Splanchnic sympathetic nerves in the development of mild DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):1965–1973

- [70] Lee LK, Kim MY, Kim JH, Lee JU, Park BS, Yang SM, et al. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J Phys Ther Sci.* 2015;27(1):303–307
- [71] Mahmoud MF, El-Nagar M, El-Bassossy HM. Anti-inflammatory Effect of Atorvastatin on Vascular Reactivity and Insulin Resistance in Fructose Fed Rats. *Arch Pharm Res.* 2012;35(1):155-162
- [72] El-Bassossy HM, El-Fawal R, Fahmy A, Watson ML. Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome. *British Journal of Pharmacology.* 2013;169(3):693-703
- [73] Ji W, Liu S, Dai J, Yang T, Jiang X, Duan X, Wu Y, Hydrogen sulfide defends against the cardiovascular risk of Nw-nitro-L-argininemethyl ester-induced hypertension in rats via the nitric oxide/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Chin Med J.* 2014;127(21):3751-3757
- [74] Aziriova S, Repova K, Krajcirovicova K, Baka T, Zorad S, Mojto V, Slavkovsky P, Hodosy J, Adamcova M, Paulis L, Simko FJ. Effect of ivabradine, captopril and melatonin on the behaviour of rats in L-nitro-arginine methylester induced hypertension. *Physiol Pharmacol.* 2016; 67(6):895-902
- [75] Saravanakumar M, Raja B. Effect of veratric acid on the cardiovascular risk of L-NAME-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012;59(6):553-562
- [76] Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-270
- [77] Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa 2004;369-371,377-379
- [78] Ohkawa H, Ohshi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thibarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358
- [79] Hammer F., Stewart P.M. Cortisol metabolism in hypertension. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 20: 337–353
- [80] Draper N., Stewart P.M. 11b-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* 2005; 186: 251–271
- [81] Whitworth J.A., Williamson P.M., Mangos G. i wsp. Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vasc. Health Risk Manag.* 2005;1(4):291–299
- [82] Whitworth JA, Schyvens CG, Zhang Y i wsp. The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension. *J. Hypertens.* 2002; 20:1035–1043

- [83] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87(24):10 043–10 047
- [84] Simmons WW, Ungureanu-Longrois D, Smith GK i wsp. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *J. Biol. Chem.* 1996;271(39): 23928-23937
- [85] Turner SW, Wen C, Li M, Whitworth JA. L-arginine prevents corticotropin-induced increases in blood pressure in the rat. *Hypertension* 1996;27(2):184–189
- [86] Valentine JF, Nick HS. Glucocorticoids repress basal and stimulated manganese superoxide dismutase levels in rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1994; 107:1662–1670
- [87] Rajashree S, Puvanakrishnan R. Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 181(1-2):77–85
- [88] Rose AJ, Vagiopoulos A, Herzig S. Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010;122(1-3):10-20
- [89] Iyer A, Chan V, Brown L. The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Curr Cardiol Rev.* 210;6(4): 291- 297
- [90] Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(1): 89-105
- [91] Roman RJ. P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the control of Cardiovascular Function. *Physiol. Rev.* 2002;82(1):131-185
- [92] Sarkis A, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Curr. Drug Metab.* 2004;5(3): 245-256
- [93] Möhring J, Möhring B, Petri M, Haack D. Is vasopressin involved in the pathogenesis of malignant desoxycorticosterone hypertension in rats. *Lancet* 1976;1(7952):170-173
- [94] Zicha J, Kunes J, Lebl M, Pohlova I, Slaninova J, Jelinek J. Antidiuretic and pressor actions of vasopressin in age-dependent DOCA-salt hypertension. *Am J Phys.* 1989;256(1 Pt 2):R138–145
- [95] Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):1–11
- [96] Grobe JL, Buehrer BA, Hilzendeger AM, Liu X, Davis DR, Xu D, et al. Angiotensinergic signaling in the brain mediates metabolic effects of deoxycorticosterone (DOCA)-salt in C57 mice. *Hypertension.* 2011;57(3):600–607

- [97] Xia H, Sriramula S, Chhabra K, Lazartigues E. Brain ACE2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ Res.* 2013;113(9):1087–1096
- [98] Ma SK, Choi JS, Joo SY. Activation of the Renal PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in a DOCA-Salt Model of Hypertension. *Chonnam Medical Journal.* 2012;48(3):150-154
- [99] Seifi B, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Golab F, Bakhshi E. Changes in serum and renal vitamin E levels in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Transplant Proc.* 2009; 41(7):2910-2911
- [100] Wenceslau CF, Rossoni LV. Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: the role of Na⁺K⁺-ATPase/ cSRC pathway. *J Hypertens.* 2014;32(3):542-554
- [101] Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J. Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition,* 2006;22(7-8):758-766
- [102] Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y. Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. *J Nutr.* 2002;132(11):3379-3382
- [103] Eizenberg Y, Grossman E, Peleg E, Shabtai Z, Sharabi Y. Neutral endopeptidase inhibitor versus angiotensin converting enzyme inhibitor in a rat model of the metabolic syndrome. *J Am Soc Hypertens.* 2014;8(4):227-231
- [104] El-Bassossy HM, Shaltout HA. Allopurinol alleviates hypertension and proteinuria in high fructose, high salt and high fat induced model of metabolic syndrome. *Transl Res.* 2015;165(5):621-630
- [105] [Conti FF, de Oliveira Brito J, Bernardes N, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:185
- [106] Singh A, Khan SA, Choudhary R, Bodakhe SH. Cinnamaldehyde Attenuates Cataractogenesis via Restoration of Hypertension and Oxidative Stress in Fructose-Fed Hypertensive rats. *J Pharmacopuncture.* 2016;19(2):137-144
- [107] [Lüscher TF. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J. Hypertens.* 1994;12(10):105–116
- [108] Trznadel-Budźko E, Kaszuba A, Seneczko F, Czyś P. Tlenek azotu w procesach fizjologicznych i patologicznych. *Przegląd Dermatologiczny.* 1997;84(6):571-576

- [109] Poręba R, Derkacz A, Poręba M, Andrzejak R. Funkcja śródbłonna u osób z chorobami krążenia. Część I: czynniki humoralne i badanie funkcji śródbłonna Arteria Hypertens. 2005;9(4):292-300
- [110] Ciechanowicz A. Aspekty genetyczne nadciśnienia tętniczego. Postępy Nauk Medycznych 2002;2-3:11-116
- [111] Tresham JJ, Dusting GJ, Coghlan JP, Whitworth JA. Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis in sheep. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1991;18:327-330
- [112] Simko F, Simko J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. Physiol Res 2000; 49:37-46
- [113] [Takemoto M, Egashira K, Usui M, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. J Clin Invest 1997; 99:278-287
- [114] Booranasubkajorn S, Huabprasert S, Wattanarangsarn J, Chotitham P, Jutasompakor P, Laohapand T, Akarasereenont P, Tripatara P. Vasculoprotective and vasodilatation effects of herbal formula (Sahatsatara) and piperin in spontaneously hypertensive rats. Phytomedicine. 2017;24:148-156
- [115] Khedara A, Kawai Y, Kayashita J, Kato N. Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N(omega)nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. J Nutr. 1996;126(10):2563-2567
- [116] Goto T, Ohnami S, Khedara A, Kato N, Ogawa H, Yanagita T. Feeding the nitric oxide synthase inhibitor L N(omega)nitroarginine elevates serum very low density lipoprotein and hepatic triglyceride synthesis in rats. J Nutr Biochem. 1999;10(5):274-278
- [117] Widecka K. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym – 2011 rok. Nadciśnienie tętnicze. 2011, 2:55-82
- [118] Marona H, Librowski T, Cegła M, Erdoğan C, Sahin NO. Antiarrhythmic and antihypertensive activity of some xanthone derivatives. Acta Pol Pharm. 2008;65(3):383-390
- [119] Marona H, Szkaradek N, Kubacka M, Bednarski M, Filipek B, Cegła M, Szneler E. Synthesis and evaluation of some xanthone derivatives for anti-arrhythmic, hypotensive properties and their affinity for adrenergic receptors. Arch Pharm (Weinheim). 2008;341(2):90-98
- [120] Marona H, Szkaradek N, Rapacz A, Filipek B, Dybała M, Siwek A, Cegła M, Szneler E. Preliminary evaluation of pharmacological properties of some xanthone derivatives. Bioorg Med Chem. 2009;17(3):1345-1352

- [121] Szkaradek N, Rapacz A, Pytka K, Filipek B, Siwek A, Cegła M, Marona H. Synthesis and preliminary evaluation of pharmacological properties of some piperazine derivatives of xanthone. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(2):514-522
- [122] Rapacz A, Pytka K, Sapa J, Kubacka M, Filipek B, Szkaradek N, Marona H. Antiarrhythmic, hypotensive and α_1 -adrenolytic properties of new 2-methoxyphenylpiperazine derivatives of xanthone. *Eur J Pharmacol.* 2014;735:10-16
- [123] Szkaradek N, Rapacz A, Pytka K, Filipek B, Żelaszczyk D, Szafranski P, Słoczyńska K, Marona H. Cardiovascular activity of the chiral xanthone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(20):6714-6724
- [124] Rapacz A, Sapa J, Nowiński L, Mogiński S, Pytka K, Filipek B, Siwek A, Szkaradek N, Marona H. Biofunctional studies of new 2-methoxyphenylpiperazine xanthone derivatives with α_1 -adrenolytic properties. *Pharmacol Rep.* 2015;67(2):267-274
- [125] Rapacz A, Sapa J, Pytka K, Dudek M, Filipek B, Szkaradek N, Marona H. Antiarrhythmic activity of new 2-methoxyphenylpiperazine xanthone derivatives after ischemia/reperfusion in rats. *Pharmacol Rep.* 2015;67(6):1163-1167
- [126] Kózka M, Słoczyńska K, Szkaradek N, Waszkielewicz AM, Pękala E, Marona H. Effect of some newly synthesized xanthone and piperazine derivatives with cardiovascular activity on rheology of human erythrocytes in vitro. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016 Aug 16 (praca w druku)
- [127] Sapa J. Nowe pochodne piperolidyn-2-onu o aktywności α_1 -adrenolitycznej jako potencjalne leki krążeniowe. Rozprawa habilitacyjna, Kraków 2011
- [128] Malawska B, Kulig K, Gippert A, Filipek B, Sapa J, Maciag D. Synthesis and development of new 2-substituted 1-[3-(4-arylpiperazin-1-yl)propyl]-pyrrolidin-2-one derivatives with antiarrhythmic, hypotensive, and alpha-adrenolytic activity. *Farmaco.* 2005;60(10):793-803
- [129] Kulig K, Sapa J, Maciag D, Filipek B, Malawska B. Synthesis and pharmacological evaluation of new 1-[3-(4-arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl]-pyrrolidin-2-one derivatives with antiarrhythmic, hypotensive, and alpha-adrenolytic activity. *Arch Pharm (Weinheim).* 2007;340(9):466-475
- [130] Kulig K, Sapa J, Nowaczyk A, Filipek B, Malawska B. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new 1-[3-(4-arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl]-3,3-diphenylpyrrolidin-2-one derivatives with antiarrhythmic, antihypertensive, and alpha-adrenolytic activity. *Eur J Med Chem.* 2009;44(10):3994-4003
- [131] Kulig K, Sapa J, Nowaczyk A, Filipek B, Malawska B. Synthesis and pharmacological evaluation of new 1-[3-(4-phenylpiperazin-1-yl)-propyl]- and 1-[3-(4-phenylpiperidine)-propyl]- 3-aryl-3-alkylpyrrolidin-2-one derivatives with antiarrhythmic and antihypertensive activity. *Acta Pol Pharm.* 2009;66(6):649-662

- [132] Kulig K, Spieces C, Sapa J, Caspers C, Filipek B, Malawska B. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrrolidin-2-one derivatives as antiarrhythmic, antihypertensive and alpha-adrenolytic agents. *Pharmacol Rep.* 2010;62(1):68-85
- [133] Sapa J, Nowaczyk A, Kulig K. Antiarrhythmic and antioxidant activity of novel pyrrolidin-2-one derivatives with adrenolytic properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;383(1):13-25
- [134] Sapa J, Filipek B, Nowiński L. Antiarrhythmic and hypotensive activities of 1-[2-hydroxy-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]-pyrrolidin-2-one (MG-1(R,S)) and its enantiomers. *Pharmacol Rep.* 2011;63(2):455-463
- [135] Sapa J, Kubacka M. The possible mechanism of hypotensive activity of some pyrrolidin-2-one derivatives with antagonist properties at alpha1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 2011;673(1-3):40-48
- [136] Chen WY, Ko FN, Lin CN, Teng CM. The effect of 3-[2-(cyclopropylamino) ethoxy]xanthone on platelet thromboxane formation. *Thromb Res* 1994, 75: 81-90
- [137] Correia-da-Silva M, Sousa E, Duarte B, Marques F, Carvalho F, Cunha-Ribeiro LM, Pinto MM. Polysulfated xanthenes: multipathway development of a new generation of dual anticoagulant/antiplatelet agents. *J Med Chem* 2011;54: 5373-5384
- [138] El-Seedi HR, El-Barbary MA, El-Ghorab DM, Bohlin L, Borg-Karlson AK, Göransson U, Verpoorte R. Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. *Curr Med Chem* 2010;17: 854-901
- [139] Hay AE, Aumond MC, Mallet S, Dumontet V, Litaudon M, Rondeau D, Richomme P. Antioxidant xanthenes from *Garcinia vieillardii*. *J Nat Prod* 2004;67: 707-709
- [140] Jiang DJ, Dai Z, Li YJ. Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. *Cardiovasc Drug Rev* 2004;22: 91-102
- [141] Kondo M, Zhang L, Ji H, Kou Y, Ou B. Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich Mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 8788-8792
- [142] Lin KW, Fang SC, Hung CF, Shieh BJ, Yang SC, Teng CM, Lin CN. Synthesis, antiplatelet and vasorelaxing activities of xanthone derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)* 2009; 342: 19-26
- [143] Pinto M, Sousa M, Nascimento M. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2517-2538

- [144] Santos CM, Silva AM, Filipe P, Santos R, Patterson LK, Mazière JC, Cavaleiro JA, Morlière P. Structure-activity relationships in hydroxy-2,3-diaryl-xanthone antioxidants. Fast kinetics spectroscopy as a tool to evaluate the potential for antioxidant activity in biological systems. *Org Biomol Chem* 2011; 9:3965-3974
- [145] Wang Y, Shi JG, Wang MZ, Che CT, Yeung JH. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1, 5-dihydroxy-2, 3-dimethoxy-xanthone, an active metabolite of 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxyxanthone isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. *Life Sciences* 2008; 82: 91-98
- [146] Wang Y, Shi JG, Wang MZ, Che CT, Yeung JH. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1-hydroxy-2,3,3-trimethoxy-xanthone, isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. *Life Sciences* 2007; 81:1016-1023
- [147] Wang Y, Shi JG, Wang MZ., Che CT, Yeung JH. Vasodilatory actions of xanthones isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*. *Phytomedicine* 2009; 16:1144-1150
- [148] Câmara DV, Lemos VS, Santos MH, Nagem TJ, Cortes SF. Mechanism of the vasodilator effect of Euxanthone in rat small mesenteric arteries. *Phytomedicine* 2010;17: 690-692
- [149] Cheng YW, Kang JJ. Mechanism of vasorelaxation of thoracic aorta caused by xanthone. *Eur J Pharmacol* 1997; 336: 23-28
- [150] Wang LW, Kang JJ., Chen IJ, Teng CM, Lin CN. Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives. *Bioorg Med Chem* 2002; 10:567-572
- [151] Li GL, He JY, Zhang A, Wan Y, Wang B, Chen WH. Toward potent α -glucosidase inhibitors based on xanthones: A closer look into the structure-activity correlations. *Eur J Med Chem* 2011, 46: 4050-4055
- [152] Ryu HW, Cho JK, Curtis-Long MJ, Yuk HJ, Kim YS, Jung S, Kim YS, Lee BW, Park KH. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthones from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*. 2011;72(17):2148-2154
- [153] Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011;32(10):2141-2150
- [154] Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA., Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol* 2011; 96: 287-294
- [155] Katovich MJ, Grobe JL, Raizada MK. Angiotensin-(1-7) as an antihypertensive, antifibrotic target. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10: 227-232
- [156] Rapacz A. Właściwości przeciwaritmiczne i hipotensyjne nowych pochodnych ksantonu o aktywności adrenolitycznej. Rozprawa doktorska, Kraków 2011

- [157] Sapa J. Antiarrhythmic activity of novel S-enantiomers of pyrrolidin-2-one derivatives with adrenolytic properties. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(5):537-542
- [158] Garcia ML, Pontes RB, Nishi EE, Ibuki FK, Oliveira V, Sawaya AC, Carvalho PO, Nogueira FN, Franco MD, Campos RR, Oyama LM, Bergamaschi CT. The antioxidant effects of green tea reduces blood pressure and sympathoexcitation in an experimental model of hypertension. *J Hypertens.* 2017;35(2):348-354
- [159] Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43: 542–548
- [160] Smith CL, Shelagh A, Hubank M. Effects of ADMA upon Gene Expression: An Insight into the Pathophysiological Significance of Raised Plasma ADMA *PLoS Med.* 2005; 2(10): 264
- [161] Suda O, Tsutsui M, Morishita T. Asymmetric dimethylarginine causes arteriosclerotic lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: Involvement of reninangiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1682–1688
- [162] Böger RH, Sydow K, Borlak J. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.* 2000; 87: 99–105
- [163] Takiuchi S, Fujii H, Kamide K. Plasma asymmetric dimethylarginine and coronary and peripheral endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* 2004; 17: 802–808
- [164] Horowitz JR, Rivard A, van der Zee R, Hariawala M, Sheriff DD, Esakof DD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17:2793-2800
- [165] Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 274:1054-1058
- [166] Lyssand JS, DeFino MC, Tang XB, Hertz AL, Feller DB, Wacker JL, Adams ME, Hague C. Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J Biol Chem.* 2008;283(27):18792-18800
- [167] Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest.* 2002;109(6):765-775
- [168] Hosoda C, Koshimizu TA, Tanoue A, Nasa Y, Oikawa R, Tomabechei T, Fukuda S, Shinoura H, Oshikawa S, Takeo S, Kitamura T, Cotecchia S, Tsujimoto G. Two alpha1-adrenergic receptor subtypes regulating the vasopressor response have differential roles in blood pressure regulation. *Mol Pharmacol.* 2005;67(3):912-922

- [169] Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Galasso G, Cervèro P, Altobelli GG, Cimini V, Pastore L, Piscione F, Trimarco B, Iaccarino G. Endothelial alpha1-adrenoceptors regulate neo-angiogenesis. *Br J Pharmacol.* 2008 ;153(5):936-946
- [170] Booranasubkajorn S, Huabprasert S, Wattanarangsarn J, Chotitham P, Jutasompakor P, Laohapand T, Akarasereenont P, Tripatara P. Vasculoprotective and vasodilatation effects of herbal formula (Sahatsatara) and piperin in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine.* 2017;24:148-156
- [171] Correia-da-Silva M., Sousa E., Duarte B., Marques F., Carvalho F., Cunha-Ribeiro L.M., Pinto M.M.: Polysulfated xanthenes: multipathway development of a new generation of dual anticoagulant/antiplatelet agents. *J Med Chem* 2011; 54: 5373-5384
- [172] Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RA., Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol* 2011; 96: 287-294
- [173] Sapa J, Filipek B, Kulig K, Malawska B. Antidepressant-like activity of the phenylpiperazine pyrrolidin-2-one derivatives in mice. *Pharmacol Rep.* 2011;63(1):71-78
- [174] Currie G, Delles C. Use of Biomarkers in the Evaluation and Treatment of Hypertensive Patients. *Curr Hypertens Rep.* 2016 Jul;18(7):54
- [175] Caligiuri SP, Pierce GN. A Review of the Relative Efficacy of Dietary, Nutritional Supplements, Lifestyle and Drug Therapies in the Management of Hypertension. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Aug 5 (praca w druku)".
- [176] Go AS, Bauman MA, Coleman King SM, Fonarow GC, Lawrence W, Williams KA, Sanchez E. An effective approach to high blood pressure control: a science advisory from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the Centers for Disease Control and Prevention. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(12):1230-1238
- [177] Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. A cooperative study. *JAMA.* 1977;237(3):255-261
- [178] James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8) *JAMA.* 2013;311:507–520
- [179] Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med.* 1997;157:2413–2145

- [180] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2007;25(6):1105-1187
- [181] Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;31(7):1281-1357
- [182] Zanchetti A, Grassi G, Mancia G. When should antihypertensive drug treatment be initiated and to what levels should systolic blood pressure be lowered? A critical reappraisal. *J. Hypertens.* 2009, 27(5): 923-934
- [183] Gao Y, Chen T, Raj JU. Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(4):451-60
- [184] Schiffrin EL. Mechanisms of remodelling of small arteries, antihypertensive therapy and the immune system in hypertension. *Clin Invest Med.* 2015;38(6):394-402
- [185] Meimoun P, Czitrom D. Coronary microvascular dysfunction and aortic stenosis: an update. *Ann Cardiol Angeiol.* 2014;63(5):353-361
- [186] Pinsky MR. The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation. *Crit Care.* 2016;20(1):266
- [187] Choi HY, Park HC, Ha SK. Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction. *Electrolyte Blood Press.* 2015;13(1):7-16
- [188] Kohagura K, Ohya Y. Renal tubulointerstitial damage and salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease: is the tubulointerstitium relevant beyond the glomerulus? *Hypertens Res.* 2015;38(2):102-103
- [189] Wilson C, Byrom FB. Renal changes in malignant hypertension. *Lancet* 1939, 1:136 –139

- [190] Ferro CJ, Webb DJ. Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs*. 1997;53(1):30-41
- [191] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Szuba A. i wsp. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98(18):1842-1847
- [192] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(1)7–36
- [193] Fischer D, Rossa S, Landmesser U. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J*. 2005; 26(1): 65-69
- [194] Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 111(3): 310-314
- [195] Docherty JR. Subtypes of functional α 1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci*. 2010, 67: 405-417
- [196] Nelson C. The α 1L-adrenoceptor is an alternative phenotype of the α 1A adrenoceptor. *Br J Pharmacol*. 2008; 155: 1-3
- [197] Price DT. Localization of mRNA for three distinct α 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human α -adrenergic physiology. *Mol Pharmacol*. 1994; 45: 171-175
- [198] Schwinn DA, Roehrborn CG. α 1-Adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol*. 2008; 15: 193-199
- [199] Amobi NI. Discrimination by SZL49 between contractions evoked by noradrenaline in longitudinal and circular muscle of human vas deferens. *Br J Pharmacol*. 2002; 136:127-135
- [200] Hiraoka Y. Binding and functional characterization of α 1-adrenoceptor subtypes in the rat prostate. *Eur J Pharmacol*. 1999; 366: 119-126
- [201] Shibata K, Foglar R i Horie K. KMD-3213, a novel, potent, α 1A-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human α 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol Pharmacol*. 1995; 48: 250-258
- [202] Höfner K, Claes H, De Reijke TM. Tamsulosin 0.4 mg once daily: effect on sexual function in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction. *Eur Urol*. 1999; 36: 335-341
- [203] Rażny K, Bednarski M, Sapa J, Gdula-Argasińska J, Tyszka-Czochara M, Librowski T, Sałat K. Animal models for hypertension research. *ABC Ser. Zool*. 2014; 55/56:124-129

- [204] Schlicker E, Pędzińska-Betiuk A, Kozłowska H, Szkaradek N, Żelaszczyk D, Baranowska-Kuczko M, Kieć-Kononowicz K, Marona H, Malinowska B. MH-3: evidence for non-competitive antagonism towards the low-affinity site of β 1-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(8):743-752
- [205] Hallberg P, Lind L, Michaëlsson K. Adipocyte-derived leucine aminopeptidase genotype and response to antihypertensive therapy. *BMC Cardiovasc Disord* 2003; 3(4):11-14
- [206] Dearlove AM. High throughput genotyping technologies. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2002;1(2):139-150

