

UNIWERSYTET MEDYCZNY WE WROCŁAWIU

WYDZIAŁ LEKARSKI

lek. Jakub Konrad Jasiczek

**Wpływ układu RAA na wybrane funkcje
śródbłonka i płytek krwi u osób zdrowych oraz
z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: dr hab. Małgorzata Trocha

WROCŁAW 2020

Projekt finansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu Wrovasc – Zintegrowane Centrum Badań Sercowo-Naczyniowych nr POIG.01.01.02-02-001/08

Badanie wykonano w ramach realizacji projektu autorstwa A. Doroszko w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu we współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym we Wrocławiu. Autor i promotor niniejszej rozprawy byli współwykonawcami projektu i uzyskali zgodę na wykorzystanie części wyników badań na potrzeby niniejszego opracowania.

Serdeczne podziękowania za życzliwość i pomoc składam:

Pani Promotor dr hab. n. med. Małgorzacie Trocha

Panu dr hab. n. med. Adrianowi Doroszko, prof. nadzw. UMW

Pani mgr Ewie Szahidewicz-Krupskiej

Babci i Dziadkowi, którzy zawsze zachęcali mnie do pracy i we mnie wierzyli

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	4
I. WSTĘP	6
1. Układ RAA.....	6
2. Tkankowy system RAA	20
3. Leki modulujące aktywność układu RAA.....	21
4. Śródbłonek naczyniowy – fizjologia i patologia	27
5. Płytki krwi.....	34
II. CELE PRACY	38
III. MATERIAŁ I METODY	40
1. Protokół badania	41
2. Zabezpieczenie materiału biologicznego.....	43
3. Badanie funkcji wazodylatacyjnej śródbłonka metodą dopplerowską (FMD)	44
4. Sztywność tętnic – badanie szybkości propagacji fali tętna (PWV).....	45
5. Oznaczone parametry laboratoryjnej	45
6. Ocena agregacji płytek krwi pełnej.....	55
7. Analiza statystyczna	56
IV. WYNIKI.....	57
1. Charakterystyka demograficzna, stratyfikacja ryzyka sercowo-naczyniowego	57
2. FMD	59
3. Porównanie wybranych parametrów biodostępności tlenu azotu i stresu nitrozacyjnego.....	59
4. Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego	61
5. Ocena wybranych elementów układu RAA.....	63
6. Ocena wybranych markerów funkcji zapalnej i angiogennej śródbłonka.....	65
7. Ocena wybranych markerów aktywacji oraz testów agregacji płytek krwi	71
V. DYSKUSJA	75
VI. WNIOSKI	91
VII. STRESZCZENIE	93
VIII. SUMMARY	96
IX. ZGODA KOMISJI BIOETYKI	99
X. OŚWIADCZENIE KIEROWNIKA PROJEKTU.....	101
XI. SPIS RYCIN.....	102
XII. SPIS TABEL.....	102
XIII. BIBLIOGRAFIA	103

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

AA - kwas arachidonowy - (ang. arachidonic acid)
ACC - Amerykańskie Kolegium Kardiologów - (ang. American College of Cardiology)
ACE - enzym konwertujący angiotensynę - (ang. angiotensin-converting enzyme)
ACE2 - enzym typu 2 konwertujący angiotensynę - (ang. angiotensin-converting enzyme type 2)
ACEI - inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę - (ang. angiotensin-converting enzyme inhibitors)
ACTH - hormon adrenokortykotropowy - (ang. adrenocorticotrophic hormone)
ADMA - asymetryczna dimetyloarginina - (ang. asymmetric dimethylarginine)
ADP - adenozyndifosforan - (ang. adenosine diphosphate)
AHA - Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne - (ang. American Heart Association)
Ang (1-12) - angiotensyna (1-12) - (ang. angiotensin 1-12)
Ang (1-7) - angiotensyna (1-7) - (ang. angiotensin 1-7)
Ang (1-9) - angiotensyna (1-9) - (ang. angiotensin 1-9)
Ang (2-8) - angiotensyna (2-8) - (ang. angiotensin 2-8)
Ang (3-8) - angiotensyna (3-8) - (ang. angiotensin 3-8)
Ang I - angiotensyna I - (ang. angiotensin I)
Ang II - angiotensyna II - (ang. angiotensin II)
Ang III - angiotensyna III - (ang. angiotensin III)
Ang IV - angiotensyna IV - (ang. angiotensin IV)
ANP - przedsionkowy peptyd natriuretyczny - (ang. atrial natriuretic peptide)
APA - aminopeptydaza A - (ang. aminopeptidase A)
APN - aminopeptydaza N - (ang. aminopeptidase N)
ARB - bloker receptora angiotensyny II - (ang. angiotensin II receptor blocker)
ARO - aktywność reninowa osocza - (ang. plasma renin activity)
ARR - współczynnik aldosteronowo-reninowy - (ang. aldosteron to renin ratio)
ASA - kwas acetylosalicylowy - (ang. acetylosalicylic acid)
ASPI - agregacja indukowana kwasem arachidonowym
AT1 - (receptor) angiotensynowy typu 1 - (ang. angiotensin type 1 (receptor))
AT1R - receptor angiotensynowy typu 1 - (ang. angiotensin type 1 receptor)
AT2 - (receptor) angiotensynowy typu 2 - (ang. angiotensin type 2 (receptor))
AT2R - receptor angiotensynowy typu 2 - (ang. angiotensin type 2 receptor)
AT4 - receptor dla angiotensyny IV - (ang. angiotensin IV receptor)
BK1 - receptor 1 dla bradykininy - (ang. bradykinin receptor 1)
BK2 - receptor 2 dla bradykininy - (ang. bradykinin receptor 2)
BNP - peptyd natriuretyczny typu B - (ang. brain natriuretic peptide)
cAMP - 3',5'-cykliczny adenozynomonofosforan - (ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate)
cGMP - 3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan - (ang. 3',5'-cyclic guanosine monophosphate)
CKD-EPI - (ang. chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)
COX - cyklooksygenaza - (ang. cyclooxygenase)
CTGF - czynnik wzrostowy tkanki łącznej - (ang. connective tissue growth factor)
DAG - diacyloglicerol - (ang. diacylglycerol)
DDAH - dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy - (ang. dimethylarginine dimethylaminohydrolase)
EDHF - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący - (ang. endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy - (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
eGFR - oszacowany współczynnik przesączania kłębuszkowego - (ang. estimated glomerular filtration rate)
ELISA - immunoenzymatyczne testy fazy stałej (ang. enzyme linked immunosorbent assay)
eNOS - śródbłonkowa syntaza tlenu azotu - (ang. endothelial nitro oxide synthase)
ESC - Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne - (ang. European Society of Cardiology)
ESH - Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego - (ang. European Society of Hypertension)
FMD - wazodylatacja zależna od przepływu - (ang. flow mediated dilatation)
GDP - guanozyno-5'-difosforan - (ang. guanosine 5'-diphosphate)
GP IIb/IIIa - glikoproteina IIb/IIIa - (ang. glycoprotein IIb/IIIa)
GSH/GSSG - glutation/utleniony glutation - (ang. glutathione/oxidized glutathione)
hsCRP - wysokie czułe białko C-reaktywne - (ang. high-sensitivity C-reactive protein)
HFpEF - niewydolność serca z zachowaną funkcją skurczową lewej komory - (ang. heart failure with preserved ejection fraction)
ICAM - wewnątrzkomórkowa molekula adhezyjna - (ang. intercellular adhesion molecule)
IL - interleukina - (ang. interleukin)
IP3 - trifosforanu inozytolu - (ang. inositol triphosphate)
IRAP - aminopeptydaza regulowana przez insulinę - (ang. insulin-regulated aminopeptidase)
Kd - stała dysocjacji (ang. dissociation constant)
L-Arg - L-Arginina - (ang. L-Arginine)
LC-MS - wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową - (ang. liquid chromatography-mass spectrometry)

LOX-1 - lektynopodobny receptor dla utlenowanych cząsteczek LDL - (ang. lectin-like oxidized low-density lipoprotein)

LPS - lipopolisacharyd - (ang. lipopolysaccharide)

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami - (ang. mitogen-activated protein kinases)

MasR - receptor Mas - (ang. MAS receptor)

MCP-1 - białko chemotaktyczne dla monocytów - (ang. monocyte chemoattractant protein 1)

MDA - dialdehyd malonowy - (ang. malondialdehyde)

MDRD - ang. Modification of Diet in Renal Disease

MLCK - kinaza łańcuchów lekkich miozyny - (ang. myosin light chains kinase)

MR - receptor mineralokortykoidowy - (ang. mineralocorticoid receptor)

MRA - antagonisci receptora mineralokortykoidowego - (ang. mineralocorticoid receptor antagonists)

NAFLD - niealkoholowe stłuszczenie wątroby - (ang. non-alcoholic fatty liver disease)

NEP - neprylizyna - (ang. neprilysin)

NETs - neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe - (ang. neutrophil extracellular traps)

NF- κ B - czynnik jądrowy kappa B - (ang. nuclear factor kappa B)

NFAT - jądrowy czynnik aktywowanych komórek T - (ang. nuclear factor of activated T-cell)

NO - tlenek azotu - (ang. nitric oxide)

NOS - syntaza tlenku azotu - (ang. nitric-oxide synthase)

NSAIDs - niesteroidowe leki przeciwzapalne - (ang. nonsteroidal anti-inflammatory drugs)

ox-LDL - utlenowany cholesterol LDL - (ang. oxidized low-density lipoprotein)

PAF - czynnik aktywujący są płytki - (ang. platelet-activating factor)

PAI-1 - inhibitor aktywatora plazminogenu 1 - (ang. plasminogen activator inhibitor-1)

PAT - obwodowa tonometria tętnicza - (ang. peripheral arterial tonometry)

PEP - propyl-endopeptydaza - (ang. propyl endopeptidase)

PF4 - czynnik płytkowy 4 - (ang. platelet factor 4)

PGE2 - prostaglandyna E2 - (ang. prostaglandin E2)

PGF2a - prostaglandyna F2a - (ang. prostaglandin F2a)

PGG2 - prostaglandyna G2 - (ang. prostaglandin G2)

PGH2 - prostaglandyna H2 - (ang. prostaglandin H2)

PGI2 - prostacyklina - (ang. prostacyclin)

PGIS - syntaza prostacykliny - (ang. prostacyclin synthase)

PKC - kinaza białkowa C - (ang. protein kinase C)

PLA2 - fosfolipaza A2 - (ang. phospholipase A2)

PLC - fosfolipaza C - (ang. phospholipase C)

PLD - fosfolipaza D - (ang. phospholipase D)

PRC - osoczone stężenie reniny - (ang. plasma renin concentration)

PRMT - metylotransferaza argininowa - (ang. protein arginine methyltransferase)

PTNT - Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego

PWV - szybkość propagacji fali tętna - (ang. pulse wave velocity)

RAA - renina-angiotensyna-aldosteron (układ) - (ang. renin-angiotensin-aldosterone system)

ROS - reaktywne formy tlenu - (ang. reactive oxygen species)

RISTO - agregacja zależna od czynnika von Willebranda

SDMA - symetryczna dimetyloarginina - (ang. symmetric dimethylarginine)

sICAM1 - wewnątrzkomórkowa molekula adhezyjna, forma rozpuszczalna - (ang. soluble intercellular adhesion molecule-1)

SR-A - receptory zmiatające - (ang. scavenger receptors A)

sVCAM1 - cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyń (forma rozpuszczalna) - (ang. soluble vascular cell adhesion molecule)

sVEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (forma rozpuszczalna) - (ang. soluble vascular endothelial growth factor)

TFPI - inhibitor szlaku czynnika tkankowego - (ang. tissue factor pathway inhibitor)

TGF- β 1 - transformujący czynnik wzrostu beta 1 - (ang. transforming growth factor beta 1)

TLR - receptor toll-podobny - (ang. toll like receptor)

TNF- α - czynnik martwicy nowotworu - (ang. tumor necrosis factor alpha)

TP - receptor dla tromboksanu - (ang. thromboxane prostanoid (receptor))

tPA - tkankowy aktywator plazminogenu - (ang. tissue plasminogen activator)

TRALI - ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc - (ang. transfusion-related acute lung injury)

TxA2 - tromboksan A2 - (ang. thromboxane A2)

TXAS - Syntaza tromboksanu - (ang. thromboxane synthase)

TxB2 - tromboksan B2 - (ang. thromboxane B2)

VCAM-1 - cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyń - (ang. vascular cell adhesion molecule-1)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego - (ang. vascular endothelial growth factor)

VSMC - komórki naczyń mięśni gładkich - (ang. vascular smooth muscle cells)

vWF - czynnik von Willebranda - (ang. von Willebrand factor)

(P)RR - receptor (pro)reniny - (ang. (pro)renin receptor)

15-HETE - kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy - (ang. 15-hydroxyeicosatetraenoic acid)

I. WSTĘP

1. Układ RAA

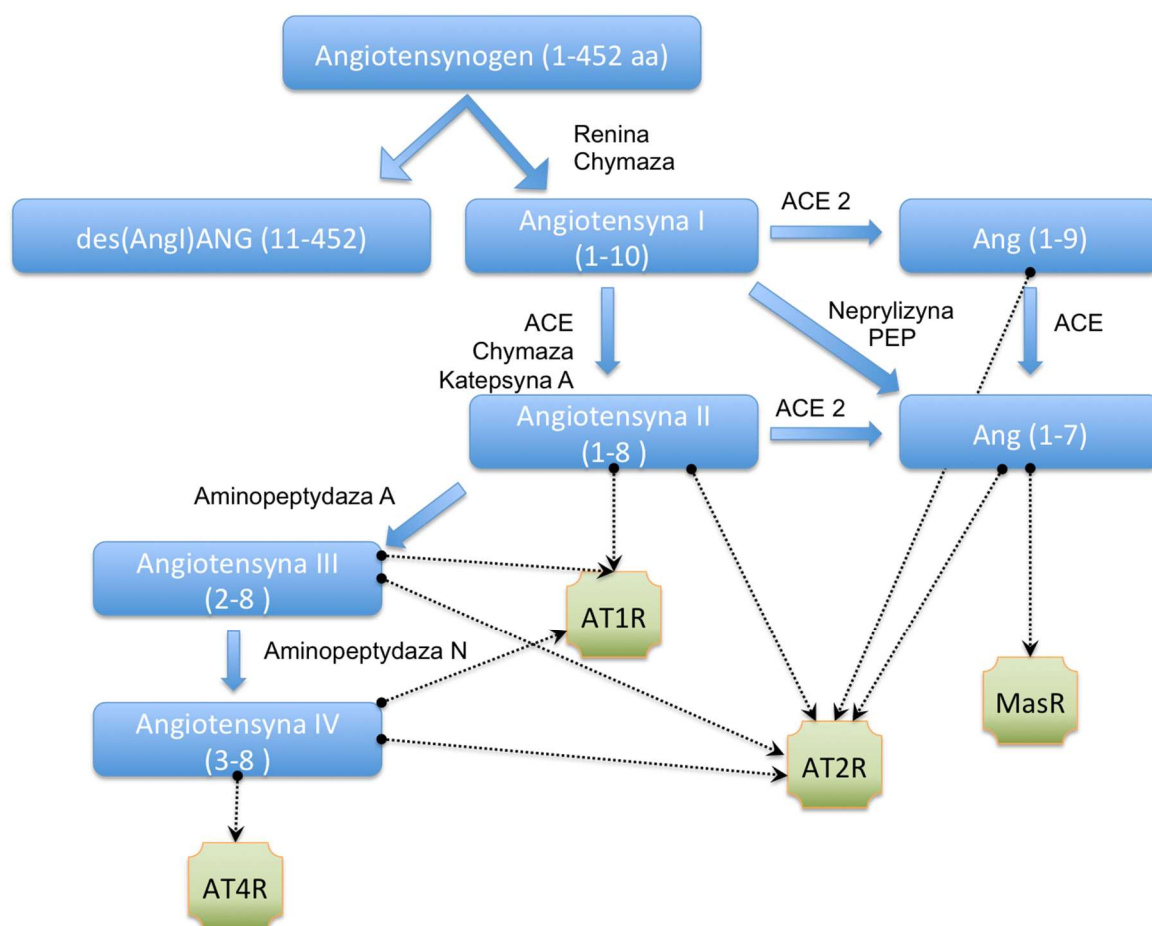
Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA; ang. renin-angiotensin-aldosterone) jest jednym z najważniejszych enzymatyczno-hormonalnych systemów homeostatycznych ustroju. Poprzez swoją plejotropową aktywność kontroluje czynność m.in. układu sercowo-naczyniowego, nerek oraz nadnerczy. Za pośrednictwem regulacji ciśnienia tętniczego i gospodarki wodno-elektrolitowej wpływa on na efektywną objętość krwi krążącej oraz równowagę wodno-elektrolitową i kwasowo-zasadową¹. Jego nadmierna aktywacja znajduje się w centrum patofizjologicznych procesów prowadzących do rozwoju nadciśnienia tętniczego, niewydolności serca czy przewlekłej choroby nerek².

Kluczowymi elementami układu RAA z klinicznego punktu widzenia są: renina, angiotensyna II (Ang II, ang. angiotensin II) i aldosteron, które z uwagi na ścisłe wzajemne interakcje traktowane są jako jedna oś enzymatyczno-hormonalna. Oprócz tego, w skład szeroko pojętego układu RAA wchodzi także prorenina, angiotensynogen, szereg innych angiotensyn i liczne enzymy konwertujące^{3 4} (Ryc. 1).

Szlak sygnałowy układu RAA, według klasycznego opisu, rozpoczyna się od przekształcenia angiotensynogenu (peptydowego prohormonu produkowanego w wątrobie) do angiotensyny I (Ang I; ang. angiotensin I) przy udziale reniny, uwalnianej z płamki gęstej aparatu przykłębuszkowego w nerkach, w odpowiedzi na zmniejszony ładunek sodu przepływającego w osoczu. Ang I ulega następnie enzymatycznej konwersji do Ang II przez aktywowaną śródbłonkową izoformę konwertazy angiotensyny (ACE; ang. angiotensin-converting enzyme), której ekspresja jest najsilniej wyrażona w płucnym łożysku naczyniowym^{5 6}.

Naczynioskurczowy efekt działania Ang II w połączeniu ze stymulacją kory nadnerczy do uwalniania aldosteronu, prowadzi do zwiększonej retencji sodu oraz wzrostu ciśnienia tętniczego. W konsekwencji dochodzi do przebudowy ściany naczyń i postępującej dysfunkcji narządowej, w tym przerostu i włóknienia mięśnia lewej komory serca^{7 8 9}. Zdecydowana większość oddziaływań Ang II na organizm odbywa się przy udziale błonowego receptora dla Ang II typu 1 (AT1R; ang. angiotensin type 1 receptor), którego efekty działania są zasadniczo równoważone przez receptor typu 2 (AT2)¹⁰.

Udowodniono, że klasyczny pogląd na endokrynną szlak przekazywania sygnału w układzie RAA nie odzwierciedla w pełni jego aktywności. Udokumentowano obecność tkankowego układu RAA w licznych narządach, m.in. w sercu, mózgu, nerkach, jądrach czy prostaty. Wytwarzana w ten sposób Ang II i jej działanie w organizmie są niezależne od wytworzonej w nerkach reniny¹¹.



Ryc. 1. Układ renina-angiotensyna-aldosteron (schemat własny)

aa - aminokwasy ang. amino acids; ACE - enzym konwertujący angiotensynę, ang. angiotensin-converting enzyme; ACE 2 - enzym konwertujący angiotensynę typu 2, ang. angiotensin-converting enzyme type 2; Ang (1-7) - angiotensyna (1-7); Ang (1-9)-angiotensyna (1-9); AT1R - receptor angiotensynowy typu 1; AT2R - receptor angiotensynowy typu 2; AT4R - receptor dla angiotensyny IV; MasR - receptor Mas; PEP - propyl-endopeptydaza

Układ RAA jest także obecny w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie wpływa na zwiększenie syntezy i wydzielania hormonu antydiuretycznego z tylnego płata przysadki nasilając w efekcie retencję płynów i rozwój nadciśnienia tętniczego¹².

Wykazano, że klasyczna oś ACE -> Ang II -> AT1R /AT2R nie jest jedynym szlakiem sygnałowym uczestniczącym w aktywacji układu RAA. W wyniku enzymatycznego przekształcania angiotensynogenu i jego pochodnych zidentyfikowano liczne angiotensyny, m.in. Ang I, Ang II, Ang (1-7), Ang (1-9), Ang III/(Ang 2-8), Ang IV/(Ang 3-8) i Ang (1-12)¹³. Wielokierunkowe działanie tych peptydów różni się często od działania zasadniczego szlaku, co jest związane z obecnością wielu receptorów i ich odmiennej aktywności. Przykładem może być chociażby przeciwstawny do Ang II efekt pobudzenia szlaku sygnałowego ACE2/Ang (1-7)/receptor Mas w układzie sercowo-naczyniowym i nerkach^{14 15}.

1.1. Renina

Renina jest proteazą aspartylową (EC 3.4.23.15) wytwarzaną z prohormonu (proreniny) w wyniku enzymatycznej konwersji w komórkach przykłębuszkowych tętniczki doprowadzającej kłębuszka nerkowego¹⁶. Z uwagi na bardzo wysoką swoistość substratową reniny względem angiotensynogenu, jej synteza jest istotnym elementem ograniczającym aktywację układu RAA. W wyniku działania reniny dochodzi do odszczepienia deka-peptydu (Ang I) od angiotensynogenu, co rozpoczyna całą kaskadę enzymatyczną i produkcję poszczególnych angiotensyn.

Od czasu odkrycia w 1898 roku obecności reniny w nerce, wykazano ekspresję genu dla reniny, a dokładniej dla proreniny w różnych tkankach. Udowodniono, że krążąca enzymatycznie aktywna postać reniny pochodzi niemal wyłącznie z komórek produkujących ten hormon w obrębie aparatu przykłębuszkowego, a komórki znajdujące się poza nerkami są zdolne do uwalniania tylko proreniny.

Jednakże obecność lokalnego układu RAA w licznych tkankach wskazuje, że miejscowa produkcja Ang I może być wynikiem lokalnego wytwarzania i uwalniania do najbliższego otoczenia niewielkich ilości aktywnej postaci reniny¹⁷.

1.2. Prorenina

Prorenina jest nieaktywnym prekursorem reniny. Centrum aktywne proreniny jest zablokowane przez N-końcowy fragment, który to z kolei jest przesłonięty przez pro-segment będący fragmentem cząsteczki proreniny¹⁸.

Prorenina jest uwalniana do krążenia stale w niewielkich ilościach (konstytutywnie), gdzie znajduje się w stężeniu około 10 razy większym od reniny. Wykazano, że w przebiegu cukrzycy oraz podczas ciąży stężenie proreniny jest nawet 100 razy większe niż stężenie reniny. Co ciekawe, podwyższone stężenie proreniny w osoczu, przy tzw. niskim prawidłowym (ang. low-normal) stężeniu reniny, może poprzedzać wystąpienie powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy^{19 20}.

Dotychczas nie udało się jednak odpowiedzieć jednoznacznie na pytanie dotyczące niezależnej aktywności proreniny poza nerkami. W 2002 roku Nguyen wraz ze współpracownikami odkryli receptor wykazujący zdolność wiązania proreniny i reniny nazwany receptorem (pro)reniny ((P)RR; ang. (pro)renin receptor). Przyłączenie proreniny do (P)RR skutkowało zmianą konformacji proreniny, odsłonięciem jej centrum aktywnego i uzyskaniem aktywności katalitycznej²¹. Teoretycznie mogłoby to powodować lokalne zainicjowanie syntezy angiotensyn w tkankach wykazujących ekspresję (P)RR. Jednakże pomimo wyników badań *in vitro* wykorzystujących niefizjologicznie wysokie stężenie proreniny,

potwierdzających słuszność tych założeń, stężenie proreniny *in vivo* jest o wiele rzędów poniżej stałej dysocjacji (K_d , dissociation constant) wymaganej dla kompleksu prorenina-(P)RR, co czyni wspomniane koncepcje mało prawdopodobnymi i sugeruje, że działanie (P)RR jest niezależne od krążącej proreniny^{22 23}.

1.3. Angiotensynogen

Ludzki angiotensynogen jest glikoproteina składającą się z 485 aminokwasów z uwzględnieniem 33 aminokwasowego peptydu sygnałowego. Produkowany jest on w większości przez komórki wątroby. Angiotensynogen uznawany jest za jedyny prekursor wszystkich angiotensyn. Jest też jedynym substratem dla reniny, biorącej udział w kaskadzie enzymatycznej odpowiedzialnej za powstanie tych angiotensyn. W wyniku enzymatycznego odłączenia N-końcowego, 10-aminokwasowego peptydu powstaje Angiotensyna I (Ang I) oraz białko nazwane des(AngI)AGT. Des(AngI)AGT stanowi około 98% pierwotnej struktury angiotensynogenu, jednak jego biologiczne właściwości oraz dalszy metabolizm pozostają nieznanymi²⁴.

Obecność mRNA dla angiotensynogenu potwierdzono w wielu tkankach i narządach, m.in. w wątrobie, tkance tłuszczowej, mózgu, sercu, nerkach i naczyniach krwionośnych. Wykazano, że do produkcji angiotensynogenu poza komórkami wątroby, zdolne są także adipocyty, komórki nabłonka kanalików proksymalnego nefronu oraz astrocyty^{25 26 27 28 29 30}.

Obecnie wzrasta ilość badań wykazujących, że angiotensynogen nie jest jedynie biernym substratem wykorzystanym do produkcji angiotensyn, ale posiada również własną aktywność biologiczną. Stwierdzono, że angiotensynogen poprzez mechanizmy zależne od des(AngI)AGT, a bez związku z produkcją angiotensyny II (Ang II) przyczynia się do indukowanego dietą przyrostu masy ciała oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD – ang. non-alcoholic fatty liver disease), uznawanego ostatnio za istotny czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego³¹.

1.4. Konwertazy angiotensyny / Metabolizm angiotensyn

Peptydy angiotensynowe są metabolizowane przez szereg enzymów konwertujących. Większość z nich, z wyjątkiem ACE i ACE 2, wykazuje działanie głównie lokalne przekształcając angiotensyny produkowane w poszczególnych tkankach. Należą do nich m.in. endopeptydazy (neprylizyna (NEP, (ang. neprilysin), propyl-endopeptydaza (PEP, ang. propyl endopeptidase)), chymaza tkankowa, propyl-karboksy-peptydaza, katepsyna, elastaza oraz tkankowy aktywator plazminogenu^{11 32}.

1.4.1. ACE

Enzym konwertujący angiotensynę – konwertaza angiotensyny (ACE; ang. angiotensin-converting enzyme) (EC 3.4.15.1) jest enzymem z grupy egzoptydaz, który katalizuje przekształcenie dekaptydu – Ang I do oktapeptydu – Ang II poprzez odszczepienie C-końcowego dwupeptydu³³. Istnieją dwie izoformy ACE u ludzi – somatyczna i germinalna. Obie kodowane są przez jeden gen zlokalizowany na chromosomie 17, jednakże o innym początku transkrypcji. Somatyczna forma ACE składa się z domeny wewnątrzkomórkowej, domeny przezbłonowej oraz dwóch homologicznych, aktywnych katalitycznie domen zewnątrzkomórkowych, będących wynikiem duplikacji w obrębie genu^{34 35}. Germinalna forma ACE odpowiada natomiast C-końcowemu fragmentowi formy somatycznej i składa się z analogicznych domen wewnątrzkomórkowej i przezbłonowej oraz pojedynczej zewnątrzkomórkowej pomniejszonej o początkowe 36 aminokwasów w stosunku do formy somatycznej³⁶. Badania wykorzystujące barwienie immunohistochemiczne wykazały, że somatyczna forma ACE wytwarzana jest w komórkach śródbłonka naczyniowego kapilar płucnych, jednak stwierdzono także jej obecność w innych tkankach, m.in. w śródbłonku naczyniowym nerek, jelita cienkiego czy najądrzy³⁷. Ilościowe metody mapowania genomu, jak np. sekwencyjne znaczniki ekspresji (EST; ang. expressed sequence tag), potwierdzają obecność enzymu konwertującego także w nerkach, mózgu, tarczycy, mięśniach szkieletowych, prostaty i jądrach. Obecność germinalnej izoformy ACE ograniczona jest do jąder oraz nasienia^{38 39 40}.

Ze względu na tak szerokie występowanie ACE, wielonarządowy efekt farmakologicznego zahamowania tego enzymu może wynikać nie tylko z jego blokady w krążeniu płucnym, ale także z lokalnego hamowania w pozostałych tkankach. Jednakże ostateczny kliniczny efekt blokady ACE w różnych narządach pozostaje nie do końca wyjaśniony^{41 42 43}.

1.4.2. ACE 2

Homolog ACE, nazwany ACE 2 (EC 3.4.17.23) jest glikoproteiną przezbłonową, której gen znajduje się na chromosomie X. Strukturalna analiza genomu wskazuje na wspólne pochodzenie ewolucyjne genu dla ACE oraz ACE 2 i ich powstanie w wyniku duplikacji genu⁴⁴. Jej obecność na podstawie analizy ekspresji mRNA stwierdzono głównie w sercu, nerkach, jądrach, jak również w mniejszych ilościach w okrężnicy, jelicie cienkim i jajnikach. Analiza immunohistochemiczna wykazała obecność ACE 2 w śródbłonku naczyń wieńcowych i oraz nabłonku kanalików nerkowych. W przeciwieństwie do ACE, zawiera ona pojedynczą domenę katalityczną o aktywności karboksypeptydazy i szczególnym powinowactwie do hydrofobowych i/lub zasadowych aminokwasów. Nie jest ona hamowana przez ACEI^{44 45}.

Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią masową (LC-MS; ang. liquid chromatography-mass spectrometry) wykazały, że ACE 2 hydrolizuje Ang I, Ang II, oraz metabolity bradykininy, jednak w odróżnieniu od ACE, nie rozkłada samej bradykininy⁴⁶.

W reakcji enzymatycznej katalizowanej przez ACE 2, Ang I oraz Ang II ulegają przekształceniu do angiotensyny 1-9 (Ang 1-9) oraz angiotensyny 1-7 (Ang 1-7), które to wykazują pozytywne działanie zapobiegające przebudowie mięśnia sercowego, przeciwstawne do szkodliwego działania Ang II^{44 47}. Zainteresowanie oddziaływaniem ACE 2 na układ sercowo-naczyniowy rozpoczęło się od wykazania obecności tego enzymu w prawidłowej tkance ludzkiego serca. Zwiększoną produkcję ACE 2 zaobserwowano zarówno u ludzi, jak i u szczurów w trakcie rozwijającej się niewydolności serca, jak również w następstwie przebytego zawału mięśnia serca^{15 48}.

Badanie Crackower i wsp., przeprowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego ACE 2, jako jedno z pierwszych wykazało istotną rolę tego enzymu w regulacji pracy serca i patogenezie chorób sercowo-naczyniowych. W badaniu tym stwierdzono, że pozbawienie myszy genu kodującego ACE 2 powodowało znaczne upośledzenie funkcji skurczowej mięśnia serca oraz wzrost indukowanej niedotlenieniem ekspresji genów dla mitochondrialnego białka indukującego śmierć komórek – BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3)⁴⁹, a także inhibitora dla aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1; ang. plasminogen activator inhibitor-1)⁵⁰ w tkance mięśnia sercowego.

W badanej grupie niedobór ACE 2, przy niezmiennym poziomie ACE, wiązał się z istotnie podwyższonym poziomem zarówno Ang II w sercu, nerkach i osoczu, jak również Ang I w sercu, i nerkach. Wyniki tego doświadczenia potwierdzają hipotezę o wpływie modulacyjnym ACE 2 na układ RAA poprzez wspólny z ACE, kompetycyjny substrat – Ang I, oraz poprzez wpływ na poziom endogennej Ang I i Ang II⁵¹.

W badaniu przeprowadzonym przez Gurley i wsp. na myszach pozbawionych genu dla ACE 2, wykazano, że brak aktywności tego enzymu prowadzi do gromadzenia Ang II w nerkach i zwiększonej podatności na rozwój nadciśnienia tętniczego zależnego od Ang II. Wyniki tego doświadczenia wskazują więc na udział ACE 2 w regulacji ciśnienia tętniczego krwi⁵². Wykazano także, że dzięki konwersji Ang II do Ang (1-7), ACE 2 przeciwdziała włóknieniu i rozrostowi kardiomiocytów⁵³.

Wykazano także, że częściowa utrata funkcji ACE 2 przyczynia się do zwiększonej podatności na przeciążenie ciśnieniowe oraz rozwoju chorób serca, naczyń oraz nerek w odpowiedzi na działanie Ang II. Obserwowano nasilony przerost i włóknienie mięśnia sercowego oraz nasilony stres oksydacyjny⁵⁴. Wyniki te potwierdzają zatem ochronną rolę ACE 2 na serce i naczynia, przez co zachęcają do rozwoju strategii terapeutycznych mających na celu promowanie działania ACE 2 w układzie sercowo-naczyniowym.

Należy zaznaczyć, że powszechnie stosowane leki hamujące ACE (ACEI), mające pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, nie hamują aktywności ACE 2. Działanie tego enzymu powoduje spadek stężenia Ang II w osoczu, co może ograniczać szkodliwy efekt działania Ang II na układ sercowo-naczyniowy⁴⁵.

Badania Gallagher i wsp. wykazały, że zarówno Ang II jak i endotelina-1, w mechanizmie zależnym od kinaz ERK1/2, powodują zwrotnie zmniejszenie ilości ACE 2 w kardiomiocytach oraz fibroblastach obecnych w mięśniu sercowym. Podanie antagonisty receptora angiotensynowego typu 1 (AT1R; ang. angiotensin type 1 receptor) przeciwdziała wspomnianemu efektowi poprzez blokowanie spadku aktywności ACE 2 w kardiomiocytach sugerując, że Ang II zmniejsza ilość ACE 2 poprzez aktywację receptora AT1⁵⁵.

Wykazano, że zablokowanie receptorów AT1 przez sartany, czyli blokery receptora angiotensyny II (ARB; ang. angiotensin II receptor blocker) zapobiega przerostowi mięśnia serca u szczurów z wywołanym eksperymentalnie zawałem, powoduje wzrost stężenia Ang I, Ang II, Ang (1-7) oraz zmniejszenie stężenia aldosteronu w porównaniu do grupy po zawale serca nie otrzymującej ARB. Dodatkowo zaobserwowano, że w wyniku zastosowanej terapii wzrastał poziom mRNA dla ACE 2 w sercu, co może dodatkowo wzmacniać korzystne działanie sartanów⁵⁶.

Zwiększony wgląd w możliwe metaboliczne szlaki sygnałowe wykorzystujące peptydy powiązane z angiotensyną oraz bradykininą, jak również ich receptory i dalsze przekazywanie sygnału, może prowadzić do optymalizacji terapii celowanej oraz jej indywidualizacji.

1.5. Angiotensyny

1.5.1. Angiotensyna II

Angiotensyna II jest jednym z aktywnych końcowych produktów układu RAA. Zbudowana jest z pierwszych ośmiu N-końcowych aminokwasów pierwotnie będących częścią angiotensynogenu. Powstaje po enzymatycznej konwersji angiotensynogenu przez reninę do angiotensyny I – związku o znikomej aktywności biologicznej, który następnie, w wyniku rozszczepienia przez enzym konwertujący (ACE), przekształcany jest w angiotensynę II (Ang II) i C-końcowy dwupeptyd. Wyodrębniono dwa główne receptory, z którymi łączy się Ang II: receptor dla angiotensyny II typu 1 (AT1) oraz receptor dla angiotensyny II typu 2 (AT2).

Klasyczny pogląd na ogólnoustrojowy efekt działania Ang II skupia się na jej aktywności naczynioskurczowej oraz na utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej. W wyniku skurczu tętniczek z udziałem Ang II zwiększa się opór systemowy i wzrasta ciśnienie tętnicze. Działanie Ang II na gospodarkę wodno-elektrolitową polega na stymulowaniu zwiększonej resorpcji sodu bezpośrednio w kanaliku bliższym oraz pośrednio w kanalikach zbiorczych w wyniku

wydzielania aldosteronu przez korę nadnerczy. Oba te efekty mają za zadanie ograniczenie skutków niedociśnienia lub hipowolemii, co jest możliwe dzięki zwiększonemu wydzielaniu reniny w wymienionych stanach. Na wydzielanie reniny ma wpływ spadek ciśnienia transmuralnego w tętniczce doprowadzającej wtórny do spadku ciśnienia perfuzyjnego w tętnicy nerkowej lub wynikający ze wzrostu ciśnienia śródmiąższowego w nerce, np. w wyniku uropatii zaporowej. Na wydzielanie reniny mają wpływ również takie czynniki, jak aktywacja układu współczulnego w wyniku oddziaływania na receptory beta1 komórek aparatu przykłębuszkowego, stężenie jonów sodu w moczu dopływającym do komórek płamki gęstej w obrębie kanalika dystalnego nefronu, jak również substancje działające lokalnie na komórki aparatu przykłębuszkowego m.in. tlenek azotu czy prostanoidy. Nagły spadek ciśnienia perfuzyjnego w nerkach lub nagła aktywacja układu współczulnego są prawdopodobnie najbardziej istotnymi (pato)fizjologicznymi stanami powodującymi szybkie uwolnienie reniny i aktywację układu RAA.

Efekty wywierane przez angiotensynę II odgrywają istotną rolę w regulowaniu filtracji kłębuszkowej oraz ukrwieniu nerek. Ang II w zależności od stężenia powoduje różnie nasilony skurcz tętniczki doprowadzającej i odprowadzającej kłębuszków nerkowych, jak również tętniczek międzypłacikowych w nerkach. Tętniczka odprowadzająca jest bardziej wrażliwa na działanie Ang II niż tętniczka doprowadzająca. Przy niskich stężeniach Ang II dominuje skurcz tętniczki odprowadzającej, co skutkuje zwiększonym przesączaniem kłębuszkowym i zmniejszonym przepływem krwi przez nerkę. Natomiast wysokie stężenie Ang II powoduje jednoczesny skurcz zarówno tętniczki odprowadzającej, jak i doprowadzającej, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia filtracji kłębuszkowej oraz zmniejszenia nerkowego przepływu krwi^{57 58 59}. Ma to zasadnicze znaczenie w autoregulacji i utrzymaniu filtracji kłębuszkowej przez aktywowany układ renina-angiotensyna w warunkach obniżonego ciśnienia tętniczego.

1.5.1.1. Wpływ angiotensyny II na układ krążenia

Ang II wywiera wielokierunkowy wpływ na funkcję układu sercowo-naczyniowego przez działanie bezpośrednie na kardiomiocyty i komórki mięśni gładkich ściany naczyń, jak również pośrednio przez działanie ośrodkowe, nerkowe oraz wpływ na układ immunologiczny. Molekularne i komórkowe efekty działania Ang II odbywają się głównie za pośrednictwem receptora AT1, którego obecność wykazano w wielu tkankach, m.in. w komórkach śródbłona naczyniowego, w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, kardiomiocytach oraz fibroblastach w sercu⁶⁰.

Większość dobrze poznanych efektów działania Ang II odbywa się przy udziale receptora AT1. Są to m.in. działanie naczynioskurczowe, przerost komórek mięśnia serca

i naczyń, wydzielanie aldosteronu oraz aktywacja stresu oksydacyjnego i rozwoju procesów zapalnych. Działanie Ang II za pośrednictwem receptora AT2 jest znacznie mniej poznane, jednak liczne badania wskazują, że w większości wykazuje on efekt przeciwny do pobudzenia receptora AT1⁶¹.

W badaniach na szczurach wykazano, że w wyniku oddziaływania Ang II na receptor AT1 w sercu, dochodzi m.in. do zwiększonej ekspresji białek kurczliwych o fenotypie płodowym^{62 63}, produkcji transformującego czynnika wzrostu beta 1 (TGF- β 1; ang. transforming growth factor beta 1)⁶⁴, proliferacji fibroblastów oraz zwiększonego odkładania się w tkance śródmiąższowej substancji zewnątrzkomórkowych takich, jak kolagen I/III⁶⁵ i fibronektyna⁶⁶, co przyczynia się do postępującego włóknienia i niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego. W wyniku oddziaływania Ang II na mięsień sercowy zwiększa się z kolei ekspresja genu dla czynnika wzrostowego tkanki łącznej (CTGF; ang. connective tissue growth factor), podobnie jak podczas niedokrwienia, co skutkuje niewłaściwą zmianą stosunku kardiomiocytów do fibroblastów⁶⁷.

Wykazano, że Ang II jest kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do włóknienia przedsionków serca poprzez aktywację kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK; ang. mitogen-activated protein kinases) i wzrost poziomu TGF- β 1 oraz CTGF⁶⁸. Dowiedziono, że zastosowanie ACEI lub antagonistów receptora AT1 przyczynia się do spowolnienia włóknienia przedsionków oraz zmniejszenia ryzyka rozwoju migotania przedsionków^{69 70}.

1.5.1.2. Prozapalne i aterogenne działanie ANG II

Zapalenie odgrywa istotną rolę w rozwoju szeroko pojętych chorób sercowo-naczyniowych, m.in. nadciśnienia tętniczego i miażdżycy. Stanowi również podstawę rozwoju takich procesów jak restenoza po angioplastyce wieńcowej czy kardiomiopatia pozapalna^{71 72 73}. Układ renina-angiotensyna-aldosteron jest uważany za kluczowy element w inicjowaniu i podtrzymywaniu procesu zapalnego w obrębie naczyń, co przyczynia się do ich dalszej przebudowy.

Wykazano, że Ang II, w wyniku oddziaływania na wiele mechanizmów, pośredniczy w rozwoju procesów zapalnych m.in. w tętnicach, w sercu oraz w nerkach poprzez regulację ekspresji odpowiednich cytokin. W komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych Ang II powoduje aktywację czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B; ang. nuclear factor kappa B) i zwiększoną produkcję IL-6⁷⁴. Ang II aktywuje i zwiększa przyleganie monocytów do komórek śródbłonna naczyniowego. Aktywacja monocytów wyraża się m.in. wzrostem syntezy czynnika martwicy nowotworu (TNF- α ; ang. tumor necrosis factor alpha) oraz białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1; ang. monocyte chemoattractant protein 1)⁷⁵. Zwiększona produkcja wewnątrzkomórkowych i naczyniowych cząstek adhezyjnych⁷⁶ (ICAM; ang. intracellular adhesion molecule, VCAM; ang. vascular cell adhesion molecule) oraz

zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS; ang. reactive oxygen species)⁷⁷ odpowiada za nasilenie działania prozapalnego.

Większość prozapalnych efektów działania Ang II odbywa się za pośrednictwem receptora AT1, jednakże w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych wykazano zwiększoną aktywację NF-κB również za pośrednictwem receptora AT2⁷⁸.

Istnieją liczne dowody wskazujące na powiązania pomiędzy rozwojem nadciśnienia tętniczego i miażdżycy a nasileniem procesu zapalnego spowodowanego przez angiotensynę II. W wyniku oddziaływania cytokin prozapalnych dochodzi do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego i progresji miażdżycy⁷⁹. W przeprowadzonych badaniach na szczurach wykazano zwiększoną produkcję cząsteczek adhezyjnych w odpowiedzi na podaż Ang II, co skutkowało zwiększonym przyleganiem leukocytów do śródbłonka naczyniowego w ścianie tętnic⁸⁰.

Zarówno efekt prozapalny, jak i wzmożone włóknienie tkanek serca i naczyń związane z aktywnością układu RAA, odbywają się za pośrednictwem aldosteronu⁸¹.

W badaniach oceniających efekt działania sartanów zaobserwowano ich korzystny wpływ na funkcję śródbłonka naczyniowego, reaktywność ścian naczyń oraz reakcję zapalną. Regulują one wytwarzanie cytokin prozapalnych i cząstek adhezyjnych (CRP, ICAM-1, Il-6) m.in. poprzez hamowanie aktywności NF-κB. Zahamowanie stresu oksydacyjnego widoczne było poprzez zmniejszenie wytwarzania reaktywnych form tlenu. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że przeciwzapalny efekt ARB jest powiązany z hamowaniem prozapalnych komórkowych receptorów toll-podobnych (TLR2 i TLR4, ang. toll-like receptors 2 and 4)^{82 83 84}.

1.5.2. Angiotensyna 1-7

Angiotensyna II, niezależnie od swojej aktywności biologicznej, może ulegać dalszym przekształceniom z udziałem poszczególnych enzymów. W wyniku degradacji przy udziale ACE 2 z Ang II zostaje odłączony pojedynczy peptyd i powstaje Ang (1-7) aktywująca receptor Mas, który z kolei nie jest aktywowany przez samą Ang II.

Ponadto Ang (1-7) może powstać w wyniku bezpośredniego przekształcenia z Ang I z udziałem neprylizyny (NEP) lub propyl-endopeptydazy (PEP) albo alternatywnie z Ang (1-9), powstałej z Ang I przy udziale ACE 2 i następczej eliminacji końcowego dwupeptydu przez ACE lub NEP^{14 85}.

Ang (1-7), z uwagi na swoją zapobiegawczą rolę w rozwoju schorzeń sercowo-naczyniowych, stała się obiektem wielu badań. Uważa się, że główne oddziaływanie Ang (1-7) na organizm odbywa się za pośrednictwem receptora Mas związanego z białkiem G. Genetyczne usunięcie receptora Mas powoduje pogorszenie funkcji skurczowej w odpowiedzi na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne oraz zwiększone odkładanie kolagenu w sercu

wtórnie do wysiłku fizycznego. Wykazano również, że u szczurów z nadciśnieniem tętniczym trening fizyczny zwiększał ilość wytwarzanej Ang (1-7) oraz ekspresję receptora Mas.

Nadekspresja ACE 2 i następcze zwiększone wytwarzanie Ang (1-7) w niewydolnym sercu wydaje się być mechanizmem kompensacyjnym mającym za zadanie przeciwstawianie się szkodliwym wpływom Ang II. Aktywacja receptora Mas przez Ang (1-7) przeciwdziała zależnej od Ang II fosforylacji ERK 1/2 i wtórnej proliferacji oraz różnicowaniu fibroblastów w sercu⁸⁶. Dodatkowo Ang (1-7), poprzez zależną od wapnia syntezę tlenku azotu (NO, ang. nitric oxide) i inicjację aktywacji (zależnej od 3',5'-cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP, ang. 3',5'-cyclic guanosine monophosphate)) szlaku sygnałowego kalcyneuryny i jądrowego czynnika aktywowanych komórek T (NFAT; ang. nuclear factor of activated T-cell), przeciwdziała indukowanemu przez Ang II przerostowi kardiomiocytów^{87 88}.

Wzrastająca ilość dowodów dla korzystnego oddziaływania Ang (1-7) na tkankę mięśnia sercowego zapoczątkowała serię badań wykorzystujących niepeptydowego agonistę receptora Mas – AVE-0991⁸⁹. Ograniczał on rozwój niedokrwiennej niewydolności serca⁹⁰, przebudowę mięśnia serca w przebiegu hiperglikemii, podaż Ang II czy stres oksydacyjny^{91 92 93}.

W eksperymentalnym modelu nadciśnienia tętniczego podanie antagonisty receptora Mas (A-779) powodowało osłabienie działania ACEI oraz ARB, co dodatkowo sugeruje, że Ang (1-7) może przynajmniej częściowo odpowiadać za korzystne działanie tych leków^{94 95 96}.

1.5.3. Angiotensyna 1-9

Jak już wspomniano, ACE 2 jest zdolna także do przekształcania Ang I w Ang (1-9), która stanowi kolejny element układu RAA. Przypisuje się jej ochronną funkcję polegającą na zapobieganiu przebudowie mięśnia sercowego⁴⁴. Może ona ulegać dalszemu przekształceniu do Ang (1-7) z wykorzystaniem ACE lub NEP⁹⁷ oraz, w niektórych tkankach, do Ang II⁹⁸. Przeprowadzono badania w celu określenia czy Ang (1-9) posiada własną aktywność biologiczną lub czy efekty jej działania są wynikiem przekształcenia do Ang (1-7) bądź Ang II. W badaniu Ocaranza i wsp. wykazano, że ciągły wlew Ang (1-9) po zawale serca może zapobiegać przerostowi kardiomiocytów oraz, że powoduje spadek aktywności ACE i obniżenie poziomu Ang II w surowicy. Działanie to nie było znoszone przez jednoczesne podanie antagonisty receptora Mas, co wskazuje raczej na brak zaangażowania Ang (1-7). Dodatkowo, pokazano, że podanie po zawale serca sartanu lub leku hamującego enzym konwertujący angiotensynę (ACEI) zwiększało stężenie Ang (1-9) w surowicy, co dodatkowo może się wiązać z zapobieganiem przerostowi mięśnia sercowego⁹⁹.

Wykazano, że Ang (1-9) ma zdolność wiązania się z receptorem AT2. Zaobserwowano, że podanie antagonisty tego receptora znosiło pozytywny, ograniczający przerost miokardium,

efekt działania Ang (1-9). Takie obserwacje sugerują, że działanie kardioprotekcyjne tej angiotensyny może odbywać się w dużej części za pośrednictwem receptora AT2. Z drugiej jednak strony, powinowactwo Ang (1-9) do receptora AT2 jest ok 100-krotnie niższe niż Ang II, co rodzi pytanie, czy stężenie *in vivo* Ang (1-9) jest wystarczające do pobudzenia receptora AT2¹⁰⁰.

Wydaje się, że naczyniorozszerzające działanie Ang (1-9) jest zależne nie tylko od receptora AT2, ale też od śródbłonna naczyniowego i produkcji tlenku azotu. Długotrwałe podawanie Ang (1-9) szczurom z nadciśnieniem tętniczym spowodowało jego obniżenie, a także ograniczenie przerostu mięśnia serca i ściany aorty, zahamowanie stresu oksydacyjnego i produkcji czynników wzrostowych (np. TGF- β 1) oraz zmniejszenie odkładania kolagenu, co ostatecznie przyczyniło się do poprawy funkcji serca i śródbłonna naczyniowego. Dowiedziono, że wymienione korzystne działanie Ang (1-9) było związane z jej oddziaływaniem na receptor AT2 oraz były niezależne od osi Ang (1-7)-receptor Mas. Warto jednak zaznaczyć, że obserwowane efekty mogły nie wynikać jedynie z bezpośredniego działania Ang (1-9), ale występować wtórnie do obniżenia ciśnienia tętniczego¹⁰¹.

1.5.4. Inne angiotensyny

1.5.4.1. Ang (2-8) / Ang III

Angiotensyna III (Ang III), zwana też angiotensyną (2-8), jest wytwarzana w wyniku enzymatycznego przekształcenia angiotensyny II w reakcji z udziałem aminopeptydazy A (APA; ang. aminopeptidase A). Ang III wykazuje podobne do Ang II oddziaływanie na organizm, posiada powinowactwo do receptorów AT1 i AT2¹⁰². Ang III działa przede wszystkim w obrębie mózgu, gdzie wpływa na wzrost ciśnienia tętniczego, zwiększa wydzielanie aldosteronu i wazopresyny oraz wzmacnia pragnienie i apetyt sodowy^{103 104}.

Badania doświadczalne na szczurach po zawale mięśnia serca, wskazują, że zarówno APA jak i Ang III w mózgu mogą ogrywać kluczową rolę we wzmożonej aktywności współczulnej (ang. sympathetic hyperactivity) oraz w rozwoju pozawałowej dysfunkcji lewej komory. Podanie do OUN inhibitora APA (RB150) poprawiało funkcję lewej komory. Podanie losartanu wywoływało podobny, lecz mniej wyraźny efekt, bez wpływu na aktywność APA. Być może RB150 stanie się potencjalnym kandydatem w terapii celowanej u pacjentów po zawale mięśnia serca¹⁰⁵.

Istnieją jednak również prace wskazujące na odmienną rolę Ang III. Wykazano, że za pośrednictwem receptorów AT2 oraz kanałów potasowych wrażliwych na ATP(K_{ATP}) zapobiega ona niedokrwienneму uszkodzeniu mięśnia serca¹⁰⁶.

1.5.4.2. Ang (3-8) / Ang IV

Angiotensyna IV (Ang IV) powstaje z Ang III w wyniku reakcji z udziałem aminopeptydazy N (APN; ang. aminopeptidase N). Część jej oddziaływań odbywa się za pośrednictwem receptora AT1 i AT2, jednak większość biologicznej aktywności jest związana z przyłączeniem do swoistego receptora dla angiotensyny IV (receptor AT4) nazwanego także aminopeptydazą regulowaną przez insulinę (IRAP; ang. insulin-regulated aminopeptidase) o strukturze białka przezbłonowego typu 2¹⁰⁷.

Poprzez analizę ekspresji genu i reakcje immunochemiczne wykryto obecność IRAP w wielu tkankach: OUN, sercu, nerkach, śródbłonku, mięśniach gładkich naczyń, mięśniach szkieletowych czy adipocytach¹⁰⁸. Ang IV została uznana za peptyd wywierający pozytywny wpływ na aktywność ośrodkowego układu nerwowego (OUN), poprzez zwiększanie zdolności uczenia i zapamiętywania^{109 110}. Aktywność IRAP jest także istotnym czynnikiem regulującym wytwarzanie takich neurohormonów jak wazopresyna i oksytocyna¹¹¹.

Sugeruje się też udział Ang IV w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych poprzez wpływ na wzrost fibroblastów w sercu, komórek śródbłonka naczyniowego oraz mięśni gładkich naczyń (VSMC; ang. vascular smooth muscle cells)¹¹². Jest to spowodowane głównie zdolnością Ang IV do aktywacji NF- κ B i zwiększenia produkcji czynników prozapalnych jak MCP-1, ICAM-1, IL-6, TNF- α , jak również zwiększenia syntezy czynnika prozakrzepowego – inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1^{113 114}.

1.5.4.3. Ang (1-12)

Zidentyfikowano także angiotensynę 1-12 – peptyd składający się z 12 aminokwasów pochodzących z N-końca cząsteczki angiotensynogenu, którego obecność wykryto w licznych tkankach mezodermalnych¹¹⁵. Ang (1-12), w wyniku lokalnej aktywności enzymatycznej chymazy i neprylizyny, może być przekształcana w sercu do Ang II i Ang (1-7) w mechanizmie niezależnym od reniny¹¹⁶.

1.6. Receptory dla angiotensyn

Omówione peptydy wywierają wielokierunkowe działanie regulacyjne na układ sercowo-naczyniowy za pośrednictwem szeregu receptorów m.in. receptorów AT1, AT2, AT4. oraz receptora Mas (MasR; ang. MAS receptor).

Przekazywanie sygnału przez angiotensynę II odbywa się głównie z udziałem dwóch głównych receptorów AT1 i AT2. Należą one do wspólnej rodziny siedmio-helikalnych receptorów transbłonowych sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G zbudowanymi z trzech podjednostek: α (połączonej z guanozyno-5'-difosforanem (GDP; ang. guanosine 5'-

diphosphate)), β i γ . Wykazano, że pomiędzy tymi receptorami jest tylko ok. 34 procentowa homologia sekwencji. Uważa się, że aktywacja receptorów AT1 i AT2 rozpoczyna różne szlaki sygnałowe i powoduje odmienne efekty¹¹⁷.

1.6.1. Receptor AT1 (AT1R)

Receptor AT1 jest glikoproteiną błonową obecną w wielu tkankach. Jego gen został zlokalizowany na chromosomie 3. W badaniach na zwierzętach wykryto dwa podtypy tego receptora AT_{1a} oraz AT_{1b} posiadające podobne rozmieszczenie i właściwości farmakologicznie. Jest on sprzężony z różnymi białkami G, m.in. z G_{q/11}, G_{i/o}, G_{α12}, G_{α13} inicjującymi odmienne kaskady sygnałowe. Aktywacja AT1R i jego połączenia z białkiem G_{q/11} powoduje stymulację fosfolipazy C (PLC; ang. phospholipase C) katalizującej hydrolizę fosfatydyloinozytolu z wytworzeniem diacyloglicerolu (DAG; ang. diacylglycerol) – aktywującego kinazę białkową C (PKC; ang. protein kinase C) oraz trifosforanu inozytolu (IP₃; ang. inositol triphosphate) – powodującego otwarcie kanałów wapniowych i uwolnienie wapnia z siateczki śródplazmatycznej. Ang II powoduje także aktywację fosfolipazy D (PLD; ang. phospholipase D), w wyniku czego dochodzi do hydrolizy fosfatydylocholinyliny z wytworzeniem cholinyliny i kwasu fosfatydowego, będącego prekursorem wspomnianego wcześniej DAG prowadząc do aktywacji PKC. Dalsze przekazywanie sygnału zależnego od uwolnionych jonów wapnia w połączeniu aktywacją PKC jest powiązane z efektem naczynioskurczowym oraz przerostem mięśnia serca. Ang II aktywuje także fosfolipazę A₂ (PLA₂; ang. phospholipase A2), co prowadzi do produkcji kwasu arachidonowego (AA, ang. arachidonic acid), z którego powstają m.in. prostaglandyny odpowiadające za wzrost komórek mięśni gładkich naczyń i przerost mięśnia serca¹¹⁸.

Aktywacja AT1R i jego połączenia z białkiem G_{i/o} hamuje syntezę 3',5'-cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP, ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate) wywierając na tej drodze efekt naczynioskurczowy. Aktywacja AT1R i jego połączenia z białkami G_{α12/13} powoduje z kolei otwarcie kanałów wapniowych typu L i wzrost napływu dokomórkowego jonów wapnia¹¹⁹.

1.6.2. Receptor AT2 (AT2R)

Tkankowa dystrybucja receptora angiotensynowego typu 2 (AT2R; ang. angiotensin type 2 receptor) zmienia się podczas rozwoju osobniczego. Wykryto jego wysoką ekspresję w tkankach płodu, która stopniowo maleje po urodzeniu. U dorosłych osobników, w przeciwieństwie do AT1R, tkankowa lokalizacja AT2R jest bardzo rozproszona. Jego zwiększoną ilość wykryto m.in. w śródbłonku naczyniowym, nerkach i mózgu. Wykazano także, że niedokrwienne uszkodzenie serca i OUN prowadzi do zwiększonej ekspresji AT2R w wymienionych tkankach¹²⁰. Występowanie AT2R w komórkach mięśni gładkich naczyń

krwionośnych i śródbłonku naczyniowym może mieć znaczenie w przeciążeniu ciśnieniowym serca i uszkodzeniu naczyń krwionośnych¹²¹.

Przekazywanie sygnału wywołane aktywacją AT2R pozostaje nadal do końca niewyjaśnione. Wykazano obecność trzech głównych szlaków wykorzystujących aktywację białek G. Jest to aktywacja specyficznych serynowo-treoninowych fosfataz białkowych (np. SHP-1; ang. (SH2) domain-containing phosphatase 1) odpowiedzialnych za defosforylację białek. Dodatkowo, stwierdzana jest aktywacja szlaku NO/cGMP, stymulacja fosfolipazy A2 i uwolnienie kwasu arachidonowego. Aktywacja AT2R, poprzez zapoczątkowanie defosforylacji odpowiednich kinaz białkowych, przeciwdziała niekorzystnym efektom wywieranym przez czynniki wzrostowe uwolnione w wyniku pobudzenia AT1R⁶¹.

Aktywacja AT2R prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych w mechanizmie zależnym od bradykininy i produkcji NO^{122 123 124}.

Biorąc pod uwagę zwiększenie ekspresji AT2R w warunkach patologicznych wydaje się, że jest on potencjalnym celem terapeutycznym leczenia nadciśnienia tętniczego, udaru i uszkodzenia serca¹²⁵.

1.7. Aldosteron

Aldosteron wywiera negatywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy poprzez powodowanie przerostu i włóknienia mięśnia sercowego, jak również przebudowę i włóknienie naczyń krwionośnych¹²⁶.

Wydzielanie aldosteronu jest regulowane m.in. przez Ang II, hiperkaliemię, hormon adrenokortykotropowy (ACTH; ang. adrenocorticotropic hormone) oraz stężenie jonów sodu w surowicy¹²⁷.

Zablokowanie receptorów dla aldosteronu, poprzez podanie spironolaktonu lub eplerenonu, obniża ciśnienie tętnicze i zmniejsza albuminurię. Ma korzystne działanie u pacjentów z niewydolnością serca, zawałem mięśnia serca lub powikłaniami naczyniowymi związanymi z cukrzycą¹²⁸.

2. Tkankowy system RAA

W wielu badaniach wykazano istnienie dwóch niezależnych układów RAA: nerkowo-osoczkowego i tkankowego^{129 130}. W jednym z badań wprowadzono szczurom ludzki gen ACE do tętnicy szyjnej. W okolicy podania zaobserwowano zwiększone wytwarzanie Ang II oraz wzrost mięśni gładkich naczyń. Powyższy efekt naczyniowy był niezależny od systemowego układu RAA i nie miał wpływu na systemowe ciśnienie tętnicze. Wcześniejsze dootrzewnowe podanie leku blokującego receptory AT1 (losartanu) spowodowało zniesienie obserwowanego efektu¹³¹.

Obecność obu układów tłumaczy skuteczność leczenia nadciśnienia tętniczego za pomocą ACEI oraz ARB u pacjentów z prawidłowym stężeniem reniny i Ang II w osoczu. Trudno jest jednak rozdzielić aktywność Ang II osoczowej od tej wytwarzanej lokalnie, ponieważ efekty ich działania wydają się być zbliżone.

3. Leki modulujące aktywność układu RAA

Do leków bezpośrednio wpływających na aktywność układu RAA należą między innymi: inhibitory enzymu konwertującego (ACEI; ang. angiotensin-converting enzyme inhibitors), leki blokujące receptor AT1 – sartany (ARB; ang. angiotensin II receptor blockers), a także leki będące antagonistami receptora mineralokortykotropowego (MRA; ang. mineralocorticoid receptor antagonist).

Dodatkowo, na aktywność tego układu wpływają także inhibitory reniny (aliskiren) i beta-adrenolityki, które hamują uwalnianie reniny w wyniku blokowania receptorów beta 1 w aparacie przykłębuszkowym nerek¹³².

Modulujący wpływ na aktywność układu RAA mają wpływ także inne grupy leków, np. przez zmianę objętości krwi krążącej (leki moczopędne), jak również przez bezpośrednie rozszerzenie naczyń tętniczych. Zastosowanie np. hydralazyny powoduje, wtórnie do rozszerzenia naczyń i spadku ciśnienia tętniczego, zwiększenie wydzielania reniny¹³³. Interesujące jest, że lek ten podany szczurom zmniejsza również przyjmowanie wody stymulowane dożylnym podaniem reniny i powoduje obniżenie stosunku Ang II/aktywność reninowa osocza (ARO; ang. PRA - plasma renin activity). Wydaje się więc, że hydralazyna posiada dodatkowe działanie na układ RAA poprzez spadek syntezy Ang II i/lub zwiększenie jej klirensu¹³⁴.

3.1. ACEI

ACEI zostały podzielone w oparciu o chemiczną strukturę ugrupowania wiążącego cynk, za pomocą którego łączą się z miejscem aktywnym ACE. Może ono zawierać grupę sulfhydrylową (-SH), karboksylową (-COOH) albo resztę kwasu fosfinowego (-PH₂O₂; np. aktywny metabolit fosinoprilu (fosinoprilat)). ACEI z wyjątkiem kaptoprilu i lisinoprilu są prolekami ulegającymi, po wchłonięciu z przewodu pokarmowego, przekształceniu do formy aktywnej^{135 136}.

Pierwszym wprowadzonym ACEI jest kaptopril. Lek ten oraz aktywny metabolit zofenoprilu (zofenoprilat) posiadają w swojej budowie grupę sulfhydrylową, która może odpowiadać m.in. za ich działanie antyoksydacyjne i korzystny wpływ na funkcję śródbłonna, ale

także za obecność charakterystycznych działań niepożądanych, jak np. powstawania zmian skórnych^{137 138}.

Mechanizm działania tej grupy leków polega na hamowaniu enzymu przekształcającego angiotensynę I w II, co w efekcie prowadzi do spadku stężenia Ang II, a tym samym do ograniczenia wielu opisanych wyżej niekorzystnych efektów jej działania.

Dodatkowo, ACEI hamują degradację bradykininy, która łącząc się ze swoistymi receptorami B1 i B2 powoduje wzrost syntezy prostacykliny i tlenku azotu w śródbłonku naczyniowym. Odpowiedzialna jest jednak także za występowanie takich działań niepożądanych jak kaszel i obrzęk naczynioruchowy^{139 140}.

Inne główne działania niepożądane ACEI są związane bezpośrednio lub pośrednio z ich wpływem na zmniejszone wytwarzanie Ang II i obejmują m.in. niedociśnienie, ostrą niewydolność nerek, hiperkaliemię jak również zaburzenia rozwoju płodu¹⁴¹.

Inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę są powszechnie stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego jak również jego głównych powikłań w postaci: zawału mięśnia serca (m.in. badania SAVE, AIRE, and TRACE)¹⁴², przewlekłej niewydolności serca z obniżoną frakcją wyrzutową (m.in. badania ATLAS¹⁴³, CONSENSUS¹⁴⁴, SOLVD¹⁴⁵) oraz przewlekłej choroby nerek (np. badanie REIN)¹⁴⁶.

Do najważniejszych przeciwwskazań do stosowania omawianej grupy leków należy przebyty obrzęk naczynioruchowy i ciąża. Na uwagę zasługuje omówienie stosowania ACEI przy istnieniu obustronnego zwężenia tętnic nerkowych lub jednostronnego zwężenia jedynej czynnej nerki. Ostatnie wytyczne PTNT oraz ESC/ESH (Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne; ang. European Society of Cardiology/Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego; ang. European Society of Hypertension) dotyczące leczenia nadciśnienia tętniczego podtrzymują zalecenia, że stosowanie tych leków w omówionej sytuacji jest przeciwwskazane, co jest zgodne z najczęstszą praktyką kliniczną^{147 148}. Duża ostrożność terapeutyczna i ścisłe monitorowanie leczenia wymagane są przy współistniejącej istotnej hiperkaliemii oraz niedociśnieniu. Warto zaznaczyć, że istnieją rozbieżności w równoważnych wytycznych wydanych przez ESC dotyczące stosowania ACEI i ARB w obustronnym zwężeniu tętnic nerkowych. Według wytycznych dotyczących rozpoznawania i leczenia chorób tętnic obwodowych można rozważyć taką terapię pod warunkiem dobrej tolerancji i ścisłego monitorowania leczenia^{149 150 151}.

ACEI oraz ARB skuteczniej niż pozostałe leki hipotensyjne zmniejszają albuminurię oraz spowalniają progresję przewlekłej choroby nerek. Leczenie w przypadku łagodnie upośledzonej funkcji nerek należy rozpocząć od małych dawek, natomiast przy eGRF <30ml/min/1,73m² prowadzić pod nadzorem nefrologa¹⁴⁷.

3.2. ARB

Leki blokujące receptor dla angiotensyny II zwane sartanami hamują działanie Ang II poprzez wiązanie i zablokowanie jednego z głównych typów receptorów – AT1R. Stosowane obecnie sartany różnią się między sobą budową chemiczną. Charakterystyczne jest występowanie podwójnego pierścienia fenyloвого i grupy tetrazolowej w cząsteczce losartanu, walsartanu, irbesartanu, kandesartanu i olmesartanu. W budowie telmisartanu grupa tetrazolowa jest zastąpiona resztą karboksylową, natomiast w przypadku eprosartanu zamiast całego wspomnianego ugrupowania występuje kwas benzoesowy¹⁵².

Kandesartan, olmesartan oraz losartan występują w postaci prolekw i ulegają przekształceniu w wątrobie do formy aktywnej, natomiast eprosartan, irbesartan, telmisartan i walsartan występują w postaci aktywnej. ARB różnią się między sobą m.in. przyswajalnością, metabolizmem oraz okresem półtrwania. Losartan charakteryzują się krótkim, około dwugodzinnym okresem półtrwania, ale częściowo jest metabolizowany do bardziej aktywnego metabolitu o okresie półtrwania wynoszącym 6-9 godzin. Telmisartan jest najdłużej działającym sartanem o ok. 24-godzinnym okresie półtrwania¹⁵³.

Około 20-30% obecnej w ustroju Ang II jest produkowana alternatywnymi szlakami metabolicznymi z pominięciem ACE, np. z wykorzystaniem chymazy. Zastosowanie sartanów daje możliwość zablokowania sygnału zapoczątkowanego przez wytworzoną w ten sposób Ang II na poziomie jej receptora^{154 155}.

Hamowanie receptora AT1 jest kluczowym mechanizmem działania sartanów. Receptor AT1 obecny jest w wielu tkankach m.in. w sercu, nerkach, mózgu, nadnerczach, naczyniach krwionośnych, jak i na powierzchni płytek krwi. W mechanizmie sprzężenia zwrotnego sartany zwiększają ilość krążącej Ang II, a tym samym nasilają jej działanie na niezablokowane receptory typu 2 (AT2). Zwiększone pobudzenie receptora AT2 może nasilać działanie hipotensyjne sartanów. Pewne znaczenie ma także zwiększone wytwarzanie Ang (1-7) przy udziale enzymu typu 2 konwertującego angiotensynę (ACE2; ang. angiotensin-converting enzyme type 2) i aktywacja receptora MAS¹⁵⁴.

Sartany należą do jednej z głównych grup leków stosowanych w leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego m.in. poprzez działanie kardio- i nefroprotektoryjne. Korzystną rolę sartanów w leczeniu nadciśnienia tętniczego, jak również niewydolności serca potwierdzono w dużych badaniach klinicznych m.in. ONTARGET¹⁵⁶ (dla telmisartanu) oraz VALUE¹⁵⁷, VAL-HEFT¹⁵⁸, VALIANT¹⁵⁹ (dla walsartanu), CHARM¹⁶⁰ i CATCH¹⁶¹ (dla kandesartanu).

Nefroprotektoryjny efekt ARB związany jest m.in. z antagonistycznym do Ang II, naczyniorozszerzającym działaniem w zakresie tętniczki odprowadzającej nefronu, co prowadzi do zmniejszenia nerkowej hiperfiltracji i przesączenia białka. Korzystne nerkowe działanie sartanów potwierdzono m.in. w badaniach z losartanem (RENAAL), telmisartanem (DETAIL) czy

walsartanem (MARVAL, VIVALDI). Jednocześnie we wspomnianym badaniu ONTARGET wykazano niekorzystny efekt łączenia ACEI z ARB powodujący zwiększoną liczbę działań niepożądanych (np. hipotensja, hiperkaliemia oraz pogorszenia funkcji nerek) jak również większą śmiertelność całkowitą^{162 163}.

W cytowanym uprzednio badaniu VALUE oceniającym skuteczność walsartanu w leczeniu nadciśnienia tętniczego, poza działaniem hipotensyjnym, zaobserwowano dodatkowy korzystny efekt metaboliczny w postaci rzadszego występowania cukrzycy w porównaniu do grupy pacjentów leczonych amlodypiną. W kolejnym badaniu (NAVIGATOR) przeprowadzonym w grupie ponad 9 tys. pacjentów z upośledzoną tolerancją glukozy, stwierdzono, że stosowanie przez 5 lat walsartanu (z lub bez nateglinidu) wraz z modyfikacją stylu życia powoduje zmniejszenie incydentów cukrzycy o 14% w porównaniu do grupy stosującej placebo (z lub bez nateglinidu) również z modyfikacją stylu życia¹⁶⁴.

W ostatnich latach, w leczeniu niewydolności serca coraz szersze zastosowanie znajduje nowa cząsteczka o nazwie LCZ696 będąca połączeniem walsartanu i sakubitrylu. Sakubitryl jest prolekiem metabolizowanym do czynnego inhibitora neprylizyny. Neprylizyna jest odpowiedzialna za rozkład naturalnych peptydów natriuretycznych–przedsiolkowego (ANP; ang. atrial natriuretic peptide) i mózgowego (BNP; ang. brain natriuretic peptide) oraz bradykinin. Zahamowanie neprylizyny powoduje więc wzrost natriurezy i relaksacji mięśnia sercowego^{165 166}.

Degradacja bradykininy przez ACE nie jest hamowana przez ARB, tym samym polekowy kaszel obserwowany przy stosowaniu ACEI pojawia się znacznie rzadziej, jednakże opisano pojedyncze przypadki jego wystąpienia¹⁶⁷. Prawdopodobny mechanizm wyzwalania odruchu kaszlu może być związany ze zwiększoną aktywacją AT2R (opisaną powyżej), która prowadzi do aktywacji szlaku bradykinina/tlenek azotu (NO; ang. nitric oxide)¹⁶⁸.

Najważniejsze przeciwwskazania do stosowania ARB są podobne jak dla ACEI. Sartanów nie stosuje się u kobiet w ciąży z uwagi na stwierdzone działanie teratogenne. Stwierdzony obrzęk naczynioruchowy po ARB, występujący rzadziej niż w przypadku terapii ACEI, jest również przeciwwskazaniem do dalszego ich stosowania. Podobnie jak w przypadku ACEI, należy zachować ostrożność w stosowaniu ARB u pacjentów z zaburzeniami funkcji nerek oraz hiperkaliemią¹⁴⁸.

3.3. MRA

Jądrowy receptor mineralokortykoidowy (MR; ang. mineralocorticoid receptor) reguluje transkrypcję różnych genów w odpowiedzi na przyłączenie ligandu – aldosteronu. Połączenie antagonisty do MR (MRA; ang. mineralocorticoid receptor antagonist) kompetywnie hamuje

tworzenie kompleksu MR-aldosteron, co blokuje aktywację receptora i dalsze efekty jego działania¹⁶⁹.

Obecnie w praktyce klinicznej stosowane są dwie substancje będące antagonistami tego receptora, spironolakton i eplerenon.

Spironolakton – starszy lek z tej grupy – charakteryzuje się dużą aktywnością wobec receptora mineralokortykoidowego. Ma on jednak podobną strukturę do progesteronu i poprzez krzyżową aktywność z płciowymi receptorami steroidowymi odpowiedzialny jest za antyandrogenowe objawy niepożądane u mężczyzn, takie jak ginekomastia i zaburzenia seksualne. U kobiet mogą pojawić się bolesność piersi i zaburzenia miesiączkowania¹⁷⁰. Dodatkowo, lek ten może powodować inne działania niepożądane, jak np. pogorszenie funkcji nerek czy zaburzenia elektrolitowe i metaboliczne w postaci np. hiperkaliemii i hiperurykemii. Spironolakton może wchodzić także w interakcje z innymi lekami i zwiększać ryzyko ich działań niepożądanych. W leczeniu chorób sercowo-naczyniowych należy zwracać szczególną uwagę m.in. na zwiększone ryzyko hiperkaliemii i pogorszenie funkcji nerek w terapii łączonej z ACEI/ARB. Lek może także zwiększać stężenie digoksyny w surowicy, jak również fałszować jej laboratoryjne oznaczenie, co zdarza się obecnie rzadko z uwagi na testy laboratoryjne nowszych generacji^{171 172}.

Lek drugiej generacji, eplerenon wykazuje mniejsze powinowactwo do MR. Wiąże się jednak bardziej wybiórczo z tym receptorem i dzięki temu zdecydowanie rzadziej wywołuje wspomniane objawy niepożądane charakterystyczne dla spironolaktonu. Jest też lepiej tolerowany, jednakże jego działanie hipotensyjne jest słabsze^{173 174}.

Aldosteron, poprzez aktywację MR, kontroluje homeostazę wodno-elektrolitową w organizmie. Receptor mineralokortykoidowy występuje w wielu narządach, m.in. w nerkach, w sercu, w mózgu i w naczyniach¹⁷⁵. W nerkach aldosteron powoduje zwiększenie resorpcji sodu w kanalikule dystalnym nefronu oraz w cewce zbiorczej, powodując wzmożone wydalanie jonów potasu i wodoru, co może doprowadzić do hipokaliemii oraz alkalizacji organizmu. Aldosteron, w wyniku łączenia się z MR, przyspiesza także uszkodzenie m.in. serca, naczyń i nerek nasilając w ich obrębie stres oksydacyjny, procesy zapalne, przerost i włóknienie¹⁷⁶. Stosowanie spironolaktonu lub eplerenonu powoduje nie tylko zahamowanie działania aldosteronu na gospodarkę wodno-elektrolitową, ale również zapobiega uszkodzeniu powyższych narządów¹⁷⁷. Korzystne działanie antagonistów aldosteronu w leczeniu niewydolności serca z upośledzoną funkcją skurczową lewej komory wykazano w wielu badaniach klinicznych (m.in. EPHEBUS, EMPHASIS-HF, RALES)¹⁷⁸.

Rola MRA w leczeniu niewydolności serca z zachowaną funkcją skurczową lewej komory (HFpEF; ang. heart failure with preserved ejection fraction) wciąż nie jest do końca wyjaśniona (TOPCAT) i wymaga dalszej oceny¹⁷⁹. Stwierdzono m. in., że terapia MRA u pacjentów

z bezobjawową dysfunkcją rozkurczową lub HFpEF poprawia funkcję rozkurczową, jak również biochemiczne parametry włóknienia serca, jednakże wpływ terapii na rokowanie odległe, w tym przeżywalność, nie został udowodniony¹⁸⁰.

Wykazano również, że dołączenie eplerenonu do ACEI lub ARB zmniejsza albuminurię i obniża ciśnienie tętnicze u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i przewlekłą chorobą nerek¹⁸¹.

Trwają obecnie badania nad zastosowaniem nowego antagonisty receptora mineralokortykoidowego – finrenonu. Jest to związek charakteryzujący się wyższą selektywnością do MR w porównaniu do spironolaktonu, jak również większym od eplerenonu powinowactwem do MR. W przeprowadzonym badaniu ARTS-HF na grupie pacjentów z niewydolnością serca z towarzyszącą cukrzycą lub przewlekłą chorobą nerek, wykazano podobną redukcję NTproBNP przy stosowaniu finrenonu w porównaniu do eplerenonu¹⁸².

W badaniach klinicznych wykazano także korzystne działanie MRA w leczeniu szczególnych postaci nadciśnienia tętniczego, m.in opornego nadciśnienia tętniczego^{183 184}, które może być wtórne do towarzyszącego obturacyjnego bezdechu śródsewnego¹⁸⁵, jak również nadciśnienia związanego z pierwotnym hiperaldosteronizmem (zespołem Conna)¹⁸⁶.

3.4. Inhibitory reniny

Jak omówiono wcześniej, przekształcenie angiotensynogenu w Ang I, dzięki aktywności enzymatycznej reniny, jest kluczowym etapem produkcji Ang II. W oparciu o obserwacje nadciśnienia naczyniowo-nerkowego, jak i złośliwego nadciśnienia tętniczego wykazano, że nadmierna aktywność reniny jest główną przyczyną nadciśnienia tętniczego.

Przyjmowanie ACEI lub ARB związane jest ze zwiększonym wytwarzaniem reniny i Ang I w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Tym samym, poszukiwanie substancji hamujących wytwarzanie reniny stało się interesującym celem w terapii. Obecnie jedynym inhibitorem reniny stosowanym w praktyce klinicznej, jest aliskiren. Jako jedyny z leków hamujących układ RAA zmniejsza stężenie Ang I oraz aktywność reninową osocza (ARO) w wyniku połączenia i blokowania miejsca aktywnego cząsteczki reniny, nie wpływa natomiast na samo stężenie reniny. Skuteczność aliskirenu oceniono w kilku przeprowadzonych badaniach klinicznych¹⁸⁷. Nie wykazano dodatkowych istotnych korzyści ze stosowania aliskirenu w połączeniu z ACEI lub ARB w terapii osób z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym (badanie ALTITUDE), jak również w leczeniu niewydolności serca (badania ASTRONAUT, ATMOSPHERE), stwierdzono natomiast większe ryzyko wystąpienia działań niepożądanych w postaci m.in. hiperkaliemii, hipotensji, pogorszenia funkcji nerek czy udarów mózgu niezakończonych zgonem¹⁸⁸.

Aliskiren jest dopuszczony przez Europejską Agencję Leków i przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA; ang. Food and Drug Administration) w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Warto zauważyć, że w chwili obecnej aliskiren nie znajduje się w europejskich wytycznych (wytyczne ESC/ESH) leczenia nadciśnienia tętniczego, natomiast jako jeden w wielu preparatów znajduje się na liście stosowanych leków w wytycznych amerykańskich (ACC/AHA)¹⁸⁹. Aliskiren pozostaje więc alternatywą w leczeniu nadciśnienia u osób z nietolerancją ACEI oraz ARB, jak również u osób z wysoką aktywnością reninową osocza, jednak dokładne efekty i bezpieczeństwo tego leczenia wymaga dalszych badań.

4. Śródbłonek naczyniowy – fizjologia i patologia

Śródbłonek naczyniowy zbudowany jest z pojedynczej warstwy komórek o łącznej powierzchni ponad 1000 m² i masie ok. 1,5 kg. Wyściela on od wewnątrz całe drzewo naczyniowe. Z uwagi na swoją rozpiętość, wyjątkowe położenie od strony płynącej krwi oraz aktywność metaboliczną, można uznać go za osobny rozproszony organ endokryny, który w dynamiczny sposób współdziała z pozostałymi narządami¹⁹⁰.

Śródbłonek, poprzez wytwarzanie szeregu substancji o działaniu zarówno lokalnym, jak i odległym, pośredniczy w regulowaniu napięcia ściany naczynia, utrzymaniu miejscowej równowagi pomiędzy czynnikami pro- i przeciwzapalnymi, pro- i przeciwzakrzepowymi. Oddziałuje także z komórkami krwi krążącej i uczestniczy w tworzeniu nowych naczyń¹⁹¹.

4.1. Czynność śródbłonka

4.1.1. Aktywacja śródbłonka

Aktywację śródbłonka pierwotnie opisano jako zjawisko zwiększonego przylegania leukocytów do wyhodowanych komórek śródbłonka w następstwie ekspozycji na działanie czynników prozapalnych^{192 193}. Następnie definicja ta została rozszerzona o zaobserwowane zmiany fenotypowe, jak zaburzona reaktywność płytek krwi, zwiększone napięcie naczyniowe, czy utrata funkcji barierowej. Zgodnie z tymi założeniami, nieaktywowany śródbłonek wykazuje właściwości antyadhezyjne, naczyniorozszerzające i przeciwplatekcyjne. W wyniku aktywacji nabiera on właściwości prozakrzepowych, proadhezyjnych i naczynioskurczowych. Aktywacja śródbłonka jest procesem dynamicznym i ciągłym, zależnym od lokalnych lub ogólnoustrojowych czynników¹⁹⁴.

4.1.2. Funkcja wazodylatacyjna/wazokonstrykcyjna

Napięcie naczyniowe jest regulowane przez mechanizmy zależne i niezależne od śródbłonka. Komórki śródbłonka są zdolne do uwalniania czynników zarówno naczyniorozszerzających (np. tlenek azotu (NO; ang. nitric oxide), prostacyklina 2 (PGI₂; ang. prostacyclin 2) śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF; ang. endothelium-derived hyperpolarizing factor)), jak i naczynioskurczowych (np. endotelina, tromboksan A₂ (TxA₂; ang. thromboxane A₂), czynnik aktywujący są płytki (PAF; ang. platelet-activating factor)). Tlenek azotu jest jedną z najważniejszych cząsteczek powstających w śródbłonku, która, poprzez wpływ na VSMC, odpowiedzialna jest za rozszerzenie naczyń. NO wytwarzany jest przy udziale śródbłonkowej izoformy syntazy tlenku azotu (eNOS; ang. endothelial nitro oxide synthase) z L-Argininy (L-Arg; ang. L-Arginine). Z uwagi na swój auto i parakryny wpływ na organizm, NO w istotny sposób bierze udział w prawidłowym funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego. Chroni przed rozwojem miażdżycy i nadciśnienia tętniczego oraz ich powikłań¹⁹⁵.

Wraz z rozwojem chorób układu sercowo-naczyniowego i starzeniem organizmu dochodzi do upośledzonego rozszerzania naczyń związanego ze zwiększonym uwalnianiem przez śródbłonek czynników naczynioskurczowych, których kluczowym elementem są prostanoidy o działaniu presyjnym niwelujące wazodylatacyjny efekt NO i PGI₂. Zależny od śródbłonka skurcz naczyń jest z aktywacją śródbłonkowych izoform cyklooksygenazy i następczym wytworzeniem szeregu prostanoidów na drodze przemian w kaskadzie kwasu arachidonowego. W wyniku aktywacji receptora dla tromboksanu (TP; ang. thromboxane prostanoid) przez TxA₂ w warstwie mięśni gładkich naczyń dochodzi nie tylko do ich skurczu i proliferacji, ale także do aktywacji płytek krwi i śródbłonkowej reakcji zapalnej¹⁹⁶.

Istotne jest zachowanie równowagi pomiędzy NO a reaktywnymi formami tlenu w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych. Dlatego ocenę funkcji śródbłonka należy analizować biorąc pod uwagę ich wzajemny stosunek, a nie bezwzględne wartości¹⁹⁷.

4.1.3. Aktywność zapalna

Rekrutacja leukocytów w miejscu toczącego się zapalenia jest istotna dla prawidłowej odpowiedzi przeciwzapalnej w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego. Poznano rolę poszczególnych selektyn w komórkach zapalnych i śródbłonku. Przykładowo, P-selektyna, L-selektyna i ligand P-selektyny regulują przepływ neutrofilów i monocytów, podczas gdy śródbłonkowa E-selektyna kontroluje szybkość rolowania zapalnych monocytów. Umożliwia to sekwencyjne przenikanie leukocytów do tkanek zapalnych. Sprzyja temu zwiększona przepuszczalność śródbłonka podczas toczącego się zapalenia śródnaczyniowego¹⁹⁸.

W wyniku zapalnej aktywacji monocytów dochodzi do dalszego uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak np. interleukina 6 (IL-6), interleukina 1 beta (IL-1β) czy TNF-alfa.

Dochodzi do syntezy białka C-reaktywnego (hsCRP; ang. high-sensitivity C-reactive protein) w wątrobie, jak również pobudzenia śródbłonka do ekspresji cząsteczek adhezyjnych (wewnątrzkomórkowa molekula adhezyjna (ICAM-1, ang. intercellular adhesion molecule), cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyń (VCAM-1, ang. vascular cell adhesion molecule-1))¹⁹⁹.

W wewnątrznaczyniowym procesie zapalnym istotną rolę odrywa także lektynopodobny receptor dla utlenianych cząsteczek LDL (LOX-1; ang. lectin-like oxidized low-density lipoprotein), którego gęstość na komórkach śródbłonka zwiększa się pod wpływem cytokin prozapalnych, reaktywnych form tlenu, sił ścinających, jak i samych cząsteczek LDL. Zwiększoną syntezę LOX-1 wykazano w nadciśnieniu tętniczym, cukrzycy i hipercholesterolemii^{200 201}. W wyniku zwiększonej ekspresji VCAM-1, mającego powinowactwo do monocytów i limfocytów T, dochodzi do ich rekrutacji i dalszej propagacji wewnątrznaczyniowej reakcji zapalnej. W połączeniu ze zmniejszoną biodostępnością NO i związaną z tym zwiększoną ekspresją białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1, ang. monocyte chemoattractant protein 1) powoduje to dalszą chemotaksję makrofagów^{199 202}.

W wyniku różnicowania monocytów do makrofagów pojawiają się na ich powierzchni receptory zmiatające (SR-A; ang. scavenger receptors A), które odpowiadają za wychwyt utlenianych cząsteczek LDL (ox-LDL; ang. oxidized low-density lipoprotein). W ten sposób powstają komórki piankowe współtworzące blaszkę miażdżycową²⁰³.

4.1.4. Aktywność pro-/przeciwzakrzepowa

Śródbłonek naczyniowy kontroluje produkcję i aktywność trombiny, a tym samym odpowiada za aktywację płytek krwi i formowanie się skrzepliny. Nasila on ekspresję inhibitora szlaku czynnika tkankowego (TFPI; ang. tissue factor pathway inhibitor). Inhibitor ten jest białkiem przeciwzakrzepowym, które po połączeniu z czynnikiem Xa hamuje aktywność kompleksu czynnik tkankowy/czynnik VIIa uczestniczącego w aktywacji procesu krzepnięcia. Stąd komórki śródbłonka mogą wpływać hamująco na proces powstawania trombiny²⁰⁴.

Czynniki prozapalne mogą zmniejszać spoczynkową przeciwplateletową aktywność śródbłonka. W hodowlach komórkowych dodanie lipopolisacharydu (LPS; ang. lipopolysaccharide) lub odpowiednich cytokin prozapalnych powodowało zmniejszenie syntezy trombomoduliny, tkankowego aktywatora plazminogenu i siarczanu heparanu z jednoczesnym zwiększeniem ekspresji czynnika tkankowego, PAI-1, produkcją innych prozakrzepowych cząsteczek^{205 206 207}.

4.1.5. Aktywność angiogenna

Mechanizmy naprawcze uaktywniające się w odpowiedzi na uszkodzenie śródbłonna zapobiegają niekorzystnej przebudowie ściany tętnic, tworzeniu zakrzepów oraz rozwojowi miażdżycy²⁰⁸.

Główną cytokiną odpowiedzialną z angiogenezę jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF; ang. vascular endothelial growth factor). W wyniku oddziaływania tej cytokiny na odpowiednie, swoiste receptory dochodzi do proliferacji śródbłonna i dalszej ukierunkowanej migracji komórek w procesie tworzenia naczyń krwionośnych. VEGF wytwarzany jest przez szereg różnorodnych komórek, m.in. makrofagi, keratynocyty, megakariocyty, płytki krwi, komórki guzów nowotworowych, jak również przez same komórki śródbłonna w odpowiedzi m.in. na hipoksję²⁰⁹.

Ze względu na kluczową rolę zarówno w fizjologicznym, jak i patologicznym wytwarzaniu naczyń krwionośnych, VEGF jest istotnym punktem uchwytu w leczeniu biologicznym wielu chorób^{210 211}.

Angiostatyna jest endogennym inhibitorem wzrostu komórek śródbłonna naczyniowego²¹². Znanych jest kilka jej izoform, które stanowią część cząsteczki plazminogenu i powstają w wyniku jego proteolizy²¹³. Angiostatyna ogranicza neoangiogenezę w trakcie wzrostu nowotworów oraz w procesie tworzenia przerzutów. Działanie to związane jest z hamowaniem czynników wzrostowych powodujących migrację i rozrost komórek śródbłonna²¹⁴.

W chwili obecnej dysponujemy coraz większą liczbą danych świadczących o znacznie szerszym działaniu angiostatyny. Wykazano, że zwiększona ilość tej substancji w ścianie aorty oraz w miokardium wpływa negatywnie na rozwój wieńcowego krążenia obocznego u osób z chorobą niedokrwienną serca i cukrzycą typu 2²¹⁵. Egzogenna podaż angiostatyny ogranicza aterogenezę i tworzenie neointymy²¹⁶. Co ciekawe, zastosowanie simwastatyny u osób z chorobą niedokrwienną serca i hipercholesterolemią powoduje zmniejszenie stężenia angiostatyny we krwi²¹⁷. Lepsze poznanie roli angiostatyny w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego wymaga jednak dalszych obserwacji.

4.2. Dysfunkcja śródbłonna

Dysfunkcja śródbłonna jest definiowana jako utrata jego zdolności do kontrolowania oporu naczyniowego w warunkach zmniejszonej biodostępności tlenu azotu, upośledzenie właściwości przeciwzakrzepowych i przeciwzapalnych oraz zwiększenie przepuszczalności. Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi dysfunkcji jest m.in. zwiększona ilość krążących

reaktywnych form tlenu, obecność cytokin prozapalnych, bakteryjnych endotoksyn, jak również występowanie wielu tzw. czynników ryzyka sercowo-naczyniowego²¹⁸.

Ocenę funkcji śródbłonka można wykonać w sposób pośredni i bezpośredni. Ilościowa, bezpośrednia ocena czynności śródbłonka może być wykonana przy pomocy dotętniczego podania czynnika naczyniorozszerzającego zależnego od śródbłonka. Taką substancją jest acetylocholina. Ta metoda, z uwagi na swój inwazyjny charakter, nie jest powszechnie wykorzystywana w praktyce klinicznej²¹⁹.

Do nieinwazyjnej oceny funkcji śródbłonka można wykorzystać metodę wazodylatacji zależnej od przepływu (FMD; ang. flow-mediated dilation), w której, mierzy się zmianę średnicy tętnicy ramiennej w badaniu ultrasonograficznym w odpowiedzi na reaktywne przekrwienie po pięciominutowym zaciśnięciu a następnie zwolnieniu mankietu sfigmomanometru. W badaniu funkcji śródbłonka wykorzystywany jest także laser Doppler, przy użyciu którego oceniany jest przepływ krwi w odpowiedzi na opisane uprzednio reaktywne przekrwienie, lub z wykorzystaniem przezskórnego podania acetylocholiny przy użyciu jonoforezy²²⁰.

Kolejną nieinwazyjną metodą oceniającą funkcję śródbłonka jest pomiar obwodowej tonometrii tętniczej z wykorzystaniem urządzenia EndoPAT. Pozwala ono na pomiar reaktywności naczyń w warunkach przekrwienia tkanek bez niedogodności towarzyszących klasycznym pomiarom ultrasonograficznym. EndoPAT pletyzmograficznie wykrywa zmiany tętniczego przepływu krwi w czujniku umieszczonym na palcu i szacuje obwodowe napięcie tętnic (PAT; ang. peripheral arterial tonometry)²²¹.

W wyniku oddziaływania aldosteronu na śródbłonek naczyniowy dochodzi do rozwoju wewnątrznaczyniowego procesu zapalnego, a w jego następstwie do dysfunkcji śródbłonka²²². Jednym z mechanizmów tej dysfunkcji może być zmniejszenie ekspresji syntazy NO i spadek biodostępności tlenu azotu²²³. W wyniku przewlekłej ekspozycji na aldosteron dochodzi także do aktywacji COX-2 niezależnie od wartości ciśnienia tętniczego²²⁴.

Wykazano obecność wzajemnych zależności pomiędzy funkcją śródbłonka naczyniowego a aktywacją układu RAA oraz szlaków metabolicznych zależnych od cyklooksygenazy (COX; ang. cyclooxygenase). Dysfunkcję śródbłonka można ograniczyć zarówno poprzez zablokowanie receptora dla aldosteronu, jak również poprzez hamowanie aktywności COX przy użyciu selektywnych bądź nieselektywnych inhibitorów tego enzymu²²⁵.

Cyklooksygenaza jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie kwasu arachidonowego do prostaglandyny G₂ (PGG₂), która następnie ulega redukcji do prostaglandyny H₂ (PGH₂). Niestabilna PGH₂ jest prekursorem szeregu związków nazywanych prostanoidami, wykazującymi specyfikę tkankową. Przy udziale odpowiedniej izomerazy lub reduktazy PGH₂ jest przekształcana odpowiednio do prostaglandyny E₂ (PGE₂; ang. prostaglandin E₂) i prostaglandyny F_{2a} (PGF_{2a}; ang. prostaglandin F_{2a}). Wyróżniono dwie

główne izoformy COX. Pierwsza – endogenna, aktywna jest konstytutywnie (COX-1), druga natomiast (COX-2) jest indukowana przy udziale czynników zapalnych i mitogenów²²⁶.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSAIDs; ang. nonsteroidal anti-inflammatory drugs), od czasu zidentyfikowania kwasu acetylosalicylowego (ASA; ang. acetylosalicylic acid), są wiodącymi lekami przeciwbólowymi, przeciwgorączkowymi, jak i przeciwzapalnymi. Hamują one aktywność cyklooksygenazy poprzez wiązanie z jej miejscem aktywnym. Jest to duża, heterogenna grupa leków o zróżnicowanej sile i wybiórczości działania wobec obu izoform COX. Poszczególne leki różnią się również profilem działań niepożądanych, biodostępnością oraz ryzykiem istotnych klinicznie interakcji z innymi lekami.

Kwas acetylosalicylowy w małych dawkach – tzw. antyagregacyjnych – 75-150mg wykazuje ok. 100 razy mniejsze powinowactwo do COX-2 niż do COX-1. W większych dawkach, powyżej 325mg, działa podobnie na obie izoformy tego enzymu. W odróżnieniu od innych NSAIDs, po związaniu z COX-1 i COX-2 ASA acetyluje serynę w centrum aktywnym tych enzymów (Ser-529 dla COX-1 i Ser-516 dla COX-2), w wyniku czego dochodzi do trwałej zmiany konformacji i zablokowania miejsca aktywnego enzymu. Dodatkowo, w wyniku acetylacji COX-1 dochodzi do utraty jej aktywności enzymatycznej, natomiast acetylacja COX-2 powoduje zmianę jej aktywności katalitycznej prowadząc m.in. do syntezy kwasu 15-hydroksyeikozateraenowego (15-HETE; ang. 15-hydroxyeicosatetrenoic acid), który z udziałem 5-lipoksygenazy jest przekształcony do 15-epi-lipoksyny A4 o właściwościach przeciwzapalnych²²⁷.

Syntaza tromboksanu (TXAS; ang. thromboxane synthase) (EC 5.3.99.5), umiejscowiona m.in. w płytkach krwi i leukocytach oraz w wielu innych tkankach, odpowiedzialna jest za przekształcenie prostaglandyny H₂ do tromboksanu A₂²²⁸. Zahamowanie aktywności TXAS powinno działać korzystnie przez zmniejszenie syntezy tromboksanu i jednoczesne przesunięcie szlaku przemiany kwasu arachidonowego w kierunku zwiększonej produkcji PGI₂. Zastosowanie ridogrelu – syntetycznego inhibitora tego enzymu, nie potwierdziło jednak powyższych założeń. Sugeruje się, że zwiększona ilość powstałych w ten sposób prostaglandyn G₂ i H₂ (PGG₂ i PGH₂; ang. prostaglandin G₂ and H₂) może aktywować swoiste receptory na płytkach i śródbłonku osłabiając pożądane działania PGI₂²²⁹.

Tromboksan wiąże się z receptorem TP, który może być aktywowany również przez inne prostanoidy (np. PGG₂, PGH₂). Nie wykazano istotnych klinicznie korzyści ze stosowania terutrobanu – inhibitora dla tego receptora²³⁰. Podobnie pikotamin, związek będący jednocześnie inhibitorem TAXS oraz receptora TP, wykazuje niewielką skuteczność u pacjentów z miażdżycą kończyn dolnych oraz współistniejącą cukrzycą typu 2²³¹.

Wykazano obecność wzajemnych powiązań pomiędzy szlakiem COX a aldosteronem. W przypadku dysfunkcji śródbłonka indukowanej aldosteronem zaobserwowano zwiększoną produkcję TxA₂. Zablokowanie TP spowodowało zahamowanie rozwoju tej dysfunkcji.

Podobnych efektów nie obserwowano jednak podczas hamowania syntezy tromboksanu. Prawdopodobnie, TxA_2 pełni istotną rolę w rozwoju dysfunkcji śródbłonna w odpowiedzi na aldosteron²²⁵.

W komórkach śródbłonna naczyniowego głównym metabolitem powstającym w wyniku przemian kaskady kwasu arachidonowego jest prostacyklina PGI_2 , która powstaje w wyniku enzymatycznego przekształcenia z prostaglandyny PGH_2 przez enzym nazywany syntazą prostacykliny (PGIS; ang. prostacyclin synthase). Posiada ona silne właściwości naczyniorozszerzające zarówno w krążeniu systemowym, jak i płucnym i hamuje agregację płytek krwi. Do rozszerzenia naczyń dochodzi w wyniku pobudzenia receptora dla PGI_2 (receptora IP z metabotropowym układem transdukcji – sprzężonego z białkiem Gs), z następczą aktywacją cyklicznej adenozynowej cAMP , aktywując kinazę białkową A , fosforyluje i inaktywuje kinazę łańcuchów lekkich miozyny (MLCK; ang. myosin light chains kinase) i prowadzi do relaksacji mięśni gładkich naczyń w wyniku defosforylacji MLC ²³².

Okazuje się jednak, że w niektórych narządach, jak np. w ludzkich tętnicach wieńcowych²³³ czy w aorcie u szczurów²³⁴, prostacyklina może sprzyjać skurczowi naczyń poprzez aktywację receptora TP . Jest to tłumaczone występowaniem innych szlaków transdukcji sygnału z odmiennym efektem metabotropowym na poziomie efektorowym²³⁵.

W badaniu przeprowadzonym przez Husaina i wsp. oceniano wpływ naczynioskurczowych czynników powstających w wyniku aktywacji cyklooksygenazy na rozwój dysfunkcji śródbłonna i jej odwracalność po zastosowaniu kwasu acetylosalicylowego²³⁶. Badania przeprowadzono na osobach z rozpoznąłą miażdżycą tętnic wieńcowych oraz obciążonych licznymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. Wykazano, że podaż kwasu acetylosalicylowego wpływa na obwodową wazodylatację indukowaną przez acetylocholinę u pacjentów z rozpoznąłą miażdżycą. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z hamowaniem produkcji zależnych od cyklooksygenazy czynników naczynioskurczowych.

W kilku badaniach eksperymentalnych i klinicznych wykazano także, że spośród selektywnych inhibitorów COX-2 , jedynie celekoksyb zmniejsza dysfunkcję śródbłonna i stres oksydacyjny nie wpływając na normalizację ciśnienia u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym^{237 238 239}.

Ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój dysfunkcji śródbłonna jest proces zapalny^{240 241}. Lipopolisacharyd pochodzący ze ściany komórkowej bakterii jako superantygen, jest silnym czynnikiem powodującym zapalenie i dysfunkcję śródbłonna, szczególnie dobrze wyrażoną w ciężkich stanach klinicznych (np. sepsa)²⁴². Trwają badania kliniczne (CIRT, CANTOS) oceniające możliwość zastosowania leczenia przeciwzapalnego i immunosupresyjnego (np. metotreksatu i przeciwciała monoklonalnego blokującego IL-1b) celem poprawy funkcji śródbłonna²⁴³.

Reaktywne formy tlenu odgrywają istotną rolę w regulowaniu funkcji układu naczyniowego. Powstałe w wyniku utleniania tlenu azotu nadtlenoazotyny (ONOO⁻) nie tylko zmniejszają biodostępność tlenu azotu, ale także upośledzają czynność wydzielniczą śródbłonna naczyniowego²⁴⁴.

Wraz z opisanym uprzednio wewnątrznaczyniowym procesem zapalnym indukowanym przez aldosteron, zmniejszenie biodostępności tlenu azotu przez reaktywne formy tlenu tworzy błędne koło zależności prowadzące do postępującej dysfunkcji śródbłonna. Przeprowadzone dotychczas badania nie potwierdziły jednoznacznie korzyści z podawania doustnych antyoksydantów na funkcję śródbłonna. Ich potencjalna rola terapeutyczna wymaga dalszych badań²⁴⁵.

5. Płytki krwi

Płytki krwi są bezjądrzastymi elementami morfotycznymi wykazującymi niezwykle aktywność metaboliczną. Ich rola w regulowaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego wykracza daleko poza regulację procesów hemostazy. Biorą one także udział w regulacji systemowej odpowiedzi zapalnej, pośrednio wpływają na wewnątrznaczyniowy metabolizm tlenu azotu, a także regulują procesy neoangiogenezy i apoptozy. Poprzez bezpośrednie oddziaływanie z komórkami śródbłonna regulują jego czynność, wpływając na wszystkie elementy jego fenotypu funkcjonalnego. Aktywacja śródbłonna na drodze mechanizmów parakrynnych wpływa z kolei na właściwości płytek i pozostałych elementów morfotycznych krwi^{246 247}.

Ważnym elementem interakcji pomiędzy śródbłonkiem a czynnością płytek jest szlak metaboliczny kwasu arachidonowego, wykazujący ekspresję zarówno w płytkach, jak i śródbłonku. Uwalniane do osocza produkty pośrednie stanowią wspólną pulę regulującą zarówno procesy hemostazy, jak i kaskadę zapalną na poziomie ogólnoustrojowym. Ocena aktywacji kaskady kwasu arachidonowego oddzielnie w płytkach i w śródbłonku w warunkach *in vivo* jest praktycznie niemożliwa. Przyjmuje się, że tromboksan B2 jako stabilny, końcowy metabolit przemiany kwasu arachidonowego, odzwierciedla aktywację płytek, zaś 6-keto-PGF-1alfa odzwierciedla przemianę kwasu arachidonowego w śródbłonku, gdzie głównym jego produktem jest prostacyklina^{248 249}.

W warunkach zachowanej homeostazy ustrojowej uwalniane przez śródbłonek prostacyklina oraz NO hamują aktywację płytek i zapobiegają ich agregacji. W przypadku upośledzenia funkcji śródbłonna i odsłonięcia składników ściany naczyń w wyniku jej uszkodzenia lub pęknięcia blaszki miażdżycowej dochodzi do aktywacji płytek i ich przylegania do warstwy podśródbłonnej²⁵⁰.

Płytki krwi w sposób ciągły wzmacniają funkcję barierową nieaktywowanego śródbłonna, natomiast podczas toczącego się procesu zapalnego zwiększają jego przepuszczalność. Dodatkowo, hamują one krwawienie w wyniku tworzenia czopu hemostatycznego po uszkodzeniu ściany naczynia²⁵¹.

Płytki mogą wspierać funkcję śródbłonna naczyniowego na drodze wielu mechanizmów, np. poprzez fizyczne blokowanie możliwych przerw w liniowej ciągłości komórek endothelium²⁵², stymulowanie wzrostu komórek śródbłonna^{253 254}, uwalnianie aktywnych substancji z ziarnistości płytek wzmacniających funkcje barierową²⁵⁵. Zaobserwowano także, mniejsze nasilenie obrzęku, jak i słabsze przenikanie leukocytów w trombocytopenii²⁵⁶.

Płytki mogą wpływać także na wytwarzanie przez leukocyty tzw. neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych (NETs; ang. neutrophil extracellular traps). Powstanie i rozwój NETs powoduje zwrotnie dalszą aktywację i agregację płytek²⁵⁷. Dochodzi m.in. do interakcji neutrofilów i płytek krwi. Jest to zjawisko będące połączeniem procesu zapalnego i zakrzepowego, nazywane w literaturze angielskiej „*immuno-thrombosis*”, pełniące istotną rolę w zwalczaniu drobnoustrojów²⁵⁸. Z drugiej strony mogą one powodować także uszkodzenie różnych tkanek²⁵⁹. W badaniu na myszach, przetaczając płytki krwi, wyindukowano uszkodzenie płuc (TRALI; ang. transfusion-related acute lung injury) spowodowane wytwarzaniem NETs²⁶⁰. „*Immuno-thrombosis*” sprzyja także rozwojowi zakrzepicy żył głębokich oraz przyczynia się do powstawania zakrzepicy związanej z chorobą nowotworową^{261 262}.

We wczesnej fazie zapalenia aktywowane płytki zwiększają przepuszczalność naczyń poprzez wydzielenie m.in takich czynników jak serotonina, naczyniowy czynnik wzrostu typu A (VEGF-A; ang. vascular endothelial growth factor A) czy PAF. W dalszej kolejności płytki nasilają rekrutację i przenikanie leukocytów. Dzieje się to w wyniku wzrostu sekrecji odpowiednich chemokin (np. RANTES; ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), czynnika płytkowego 4 – (PF4; ang. platelet factor 4)), nasilenia ekspresji i/lub aktywacji cząstek adhezyjnych na powierzchni leukocytów i komórek śródbłonna oraz wydzielania cytokin prozapalnych²⁶³. Dodatkowo, interakcja płytek z naczyniami objętymi zapaleniem oraz z leukocytami wzmacniana jest przez odpowiednie receptory płytkowe (np. GPVI, GPIbIX-V, GPIIbIIIa, receptor dla P-selektyny). Glikoproteina IIb/IIIa (GP IIb/IIIa; ang. glycoprotein IIb/IIIa) jest receptorem integrynowym należącym do najliczniej reprezentowanych na błonie zewnętrznej i błonie ziarnistości α płytek krwi. Podczas aktywacji płytek dochodzi do zmian konformacyjnych GP IIb/IIIa, w wyniku czego wzrasta jej zdolność wiązania odpowiednich ligandów, z których głównym jest fibrynogen uznawany za najważniejszy mediator agregacji płytek. Innymi istotnymi glikoproteinami płytkowymi jest np. GP Ib/IX/V, która jest najważniejszym receptorem płytkowym dla czynnika von Willebranda i pośredniczy w procesie adhezji płytek do macierzy podśródbłonkowej oraz GP VI będąca receptorem dla kolagenu.

P-selektyna natomiast uczestniczy początkowym etapie przemieszczania leukocytów do ogniska zapalnego, jak również w aktywacji i agregacji płytek krwi²⁶⁴.

Kolejnym elementem charakterystycznym zarówno dla płytek krwi, jak i śródbłonna są procesy angiogenezy, oceniane przez oznaczenie śródbłonkowych czynników wzrostu (VEGF) oraz angiostatyny^{265 266}. Ich równowaga jest istotnym czynnikiem wpływającym na procesy nowotworzenia naczyń, co może mieć znaczenie zarówno ochronne (np. neowaskularyzacja podczas powstawania krążenia obocznego w przewlekłym niedokrwieniu), jak i patologiczne (np. procesy onkogenezy)²⁶⁷.

Wykazano, że w warunkach indukowanego niedokrwienia inhibitor reniny – aliskiren posiada dodatkowe działanie neoangiogenne²⁶⁸. Potencjalnym mechanizmem korzystnego wpływu aliskirenu na neoangiogenezę jest regulacja szlaku sygnałowego VEGF/NO. VEGF jest uznanym czynnikiem stymulującym rozwój naczyń, a tlenek azotu jest konieczny do samego rozpoczęcia procesu angiogenezy, jak również nowotworzenia naczyń w warunkach niedokrwienia²⁶⁹.

5.1. Powiązania funkcji płytek z układem RAA

Funkcja płytek jest regulowana przez układ RAA. Angiotensyna II, poprzez zwiększenie syntezy PAI-1, promuje procesy aterogenezy i trombogenezy, co prawdopodobnie częściowo odbywa się poprzez aktywację receptora AT1^{270 271}.

Jak już wspomniano, leki blokujące układ RAA powodują tzw. odwrotny (korzystny) remodeling układu sercowo naczyniowego, m.in. poprzez hamowanie wyżej wymienionego mechanizmu, co jest jednym z elementów ich plejotropowego działania. Tiplakstynina, poddawana obecnie badaniom II fazy, jest antagonistą PAI-1, który w badaniach eksperymentalnych cofa patologiczne procesy przebudowy układu sercowo–naczyniowego powstałe w wyniku aktywacji układu RAA^{272 273}.

Aktywacja układu RAA w zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego indukowanego angiotensyną II prowadzi do istotnych zmian proteomu płytek, głównie w zakresie białek strukturalnych. Postuluje się, że aktywacja płytek przez układ RAA odbywa się przy udziale receptora AT1 znajdującego się na ich powierzchni²⁷⁴.

Niedostatecznie poznany jest wpływ aktywności układu RAA na właściwości agregacyjne płytek, zarówno w ujęciu całościowym, jak i z uwzględnieniem indywidualnych torów aktywacji (szlak zależny od receptora P2Y12, GPIIb/IIIa, cyklooksygenazy).

Ciekawą i niedostatecznie zbadaną kwestią jest także wpływ aktywacji receptorów AT1 oraz ich hamowania przez sartany na funkcję płytek krwi. W badaniu *in vitro* Schemmer i wsp. wykazali, że losartan, ale nie kandesartan, hamuje aktywację płytek. Co ciekawe, działanie to

związane jest przede wszystkim z blokowaniem szlaku sygnałowego TxA₂, a nie poprzez hamowanie receptora AT₁²⁷⁵. Wykazanie antyagregacyjnego działania niektórych sartanów stanowić może kolejny mechanizm ich plejotropowego działania.

Podsumowując, istnieją liczne dowody na znaczące powiązania układu RAA z czynnością śródbłonna oraz aktywacją płytek krwi. Biorąc po uwagę, że nadciśnienie tętnicze stanowi jeden z elementów szerokiego spektrum chorób układu sercowo-naczyniowego oraz, że aktywacja układu RAA jest jednym z kluczowych elementów jego patogenezy, niezmiernie ciekawym jest udokumentowanie występowania tych zależności u osób z nadciśnieniem tętniczym. Dokładna znajomość wspomnianych patomechanizmów molekularnych w połączeniu z wiedzą na temat ich konsekwencji na poziomie fenotypu może okazać się niezbędna w optymalizacji farmakoterapii zmniejszającej ryzyko incydentów zakrzepowo-zatorowych u osób z nadciśnieniem tętniczym. Badania omawianych zależności stanowią treść niniejszej pracy.

II. CELE PRACY

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy jest ocena wpływu jednej z grup leków modyfikujących aktywność układu RAA – sartanów (w niniejszym badaniu, jako przedstawiciela grupy, zastosowano walsartan) na fenotyp funkcji śródbłonna u osób z izolowanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, a także analiza powiązań pomiędzy aktywnością i reaktywnością układu RAA a profilem funkcji śródbłonna – zarówno u osób normotensyjnych, jak i chorych z nadciśnieniem tętniczym. Z tego powodu pacjenci normotensyjni zaklasyfikowani zostali do jednego z trzech tercylów w oparciu o wyliczoną wartość współczynnika aldosteronowo-reninowego (ARR, ang. aldosteron to renin ratio). Umożliwiło to ocenę istnienia realnych powiązań pomiędzy fenotypem funkcji śródbłonna a aktywacją układu RAA i jej zmianami wskutek zastosowanych interwencji farmakologicznych, wykluczając jednocześnie losową koincydencję. Ze względu na wielokierunkowe aspekty badanej czynności śródbłonna, zasadniczy cel pracy został podzielony na zaprezentowane poniżej cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu ARB na biodostępność tlenku azotu rozumianą jako wypadkowa jego syntezy (stężenie L-Arg jako substratu dla eNOS oraz jej inhibitora kompetycyjnego – asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA; ang. asymmetric dimethylarginine)) i degradacji (produkcja nadtlenoazotynów i następcza nitracja reszt tyrozynowych).

W toku weryfikacji tej hipotezy oceniany będzie wpływ (możliwie dwukierunkowy), na syntezę oraz degradację NO.

Obalenie hipotezy o braku wpływu oznaczać będzie potwierdzenie zaangażowania śródbłonkowych szlaków biotransformacji NO jako efektów plejotropowego działania walsartanu.

2. Ocena wpływu walsartanu na aktywność i reaktywność wybranych elementów kaskady kwasu arachidonowego poprzez oznaczenie dwóch kluczowych jej produktów: tromboksanu B2 (TxB₂; ang. thromboxane B₂) – markera aktywacji zapalnej i agregacyjnej płytek krwi oraz 6keto-PGF-1alfa – markera przeciwzapalnej funkcji śródbłonna.

Falsyfikacja hipotezy o braku wpływu walsartanu na produkcję wymieniowych intermediatów oznaczać będzie istnienie plejotropowego (korzystnego albo negatywnego) wpływu tego leku na funkcję przeciwzapalną śródbłonna.

3. Badanie roli walsartanu w modulowaniu funkcji pro- i przeciwzapalnej, jak również prozakrzepowej i angiogennej śródbłonna ocenionej za pomocą takich markerów, jak sE-

selektyna, wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna (forma rozpuszczalna) (sICAM1; ang. soluble intercellular adhesion molecule-1), cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyń, forma rozpuszczalna (sVCAM1; ang. soluble vascular cell adhesion molecule), PAI-1 i czynnik wzrostu śródbłonia naczyniowego (forma rozpuszczalna) (sVEGF; ang. soluble vascular endothelial growth factor) .

Odrzucenie hipotezy o braku wpływu walsartanu na poziom tych markerów pozwoli na stwierdzenie występowania plejotropowego działania tego leku na powyższe funkcje śródbłonia.

4. Analiza roli walsartanu w modyfikowaniu właściwości naczyniorozszerzających śródbłonia ocenionych metodą FMD, według wystandardyzowanego i wcześniej opisanego protokołu Celermajera.

Falsyfikacja hipotezy o braku wpływu walsartanu na wartości FMD pozwoli na potwierdzenie istnienia plejotropowego działania tego leku na funkcje wazodylatacyjną śródbłonia.

5. Ocena wpływu walsartanu na właściwości płytek krwi ocenione poprzez:

- oznaczenie markerów ich aktywacji (sP-selektyny i TxB₂)
- badania agregacji zależnej od kwasu arachidonowego (szlaku cyklooksygenazy), adenylozynodifosforanu (ADP, ang. adenosine diphosphate) – szlaku aktywacji zależnego od receptora purynergicznego P₂Y₁₂ i czynnika von Willebranda metodą agregometrii impedacyjnej.

Odrzucenie hipotezy o braku wpływu walsartanu na markery aktywacji i agregację potwierdzi obecność jego działania modulującego na czynność płytek krwi.

III. MATERIAŁ I METODY

Do badania włączono 101 osób, w tym 31 pacjentów między 18 a 40 rokiem życia, z rozpoznaniem izolowanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (hospitalizowanych z tego powodu w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2012-2016) oraz 70 normotensyjnych ochotników dobranych do pacjentów z nadciśnieniem tętniczym pod względem demograficznym. Każda z osób włączonych do badania wyraziła uprzednio indywidualnie, świadomą, pisemną zgodę na udział w projekcie. Wszyscy uczestnicy zostali wyczerpująco poinformowani o założeniach i planowanym przebiegu badań, jak również o fakcie, że na każdym etapie mogą bez konsekwencji wycofać swoją zgodę. Na badanie uzyskano zgodę o numerze KB – 212/2019 wydaną przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (skan załączono do niniejszej rozprawy).

Kryteria włączenia do badania:

- ✓ wiek pacjenta: 18-80 lat
- ✓ płeć męska
- ✓ rozpoznane pierwotne izolowane nadciśnienie tętnicze lub jego wykluczenie (osoby normotensyjne bez schorzeń współistniejących)
- ✓ zachowana zdolność do wyrażenia świadomej zgody na udział w badaniu, przetwarzanie danych osobowych i wgląd do dokumentacji medycznej
- ✓ niespełnione żadne z poniższych kryteriów wyłączenia

Kryteria wyłączenia z badania:

- ✓ niemożność uzyskania w pełni świadomej zgody
- ✓ brak dokładnego wywiadu dotyczącego chorób przebytych lub współistniejących
- ✓ potwierdzone wtórne nadciśnienie tętnicze
- ✓ współistniejąca cukrzyca lub inne zaburzenia metaboliczne
- ✓ choroby tarczycy
- ✓ brak dokładnej informacji o stosowanej farmakoterapii
- ✓ niedokrwistość lub trombocytopenia
- ✓ choroba nowotworowa
- ✓ przewlekłe choroby zapalne
- ✓ aktywne zakażenia
- ✓ przewlekła choroba nerek z eGFR <45 ml / min / 1,73 m²

- ✓ występowanie u osób z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym przeciwwskazań do stosowania sartanów i kwasu acetylosalicylowego, uniemożliwiających w efekcie przeprowadzenie planowanych badań
- ✓ stosowanie leków potencjalnie wpływających na wyniki badań (m.in. niesterydowe leki przeciwzapalne, leki przeciwzakrzepowe, inhibitory fosfodiesterazy typu 5, nitraty)
- ✓ płeć żeńska (ze względu na interferencję cyklu miesięcznego i antykoncepcję hormonalną lub hormonalną terapię zastępczą oraz wiek rozrodczy, kiedy to należy unikać leków blokujących RAA)

Projekt badawczy został zrealizowany w ramach projektu Wrovasc – Zintegrowanego Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, jako projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013. POIG.01.01.02-02-001/08.

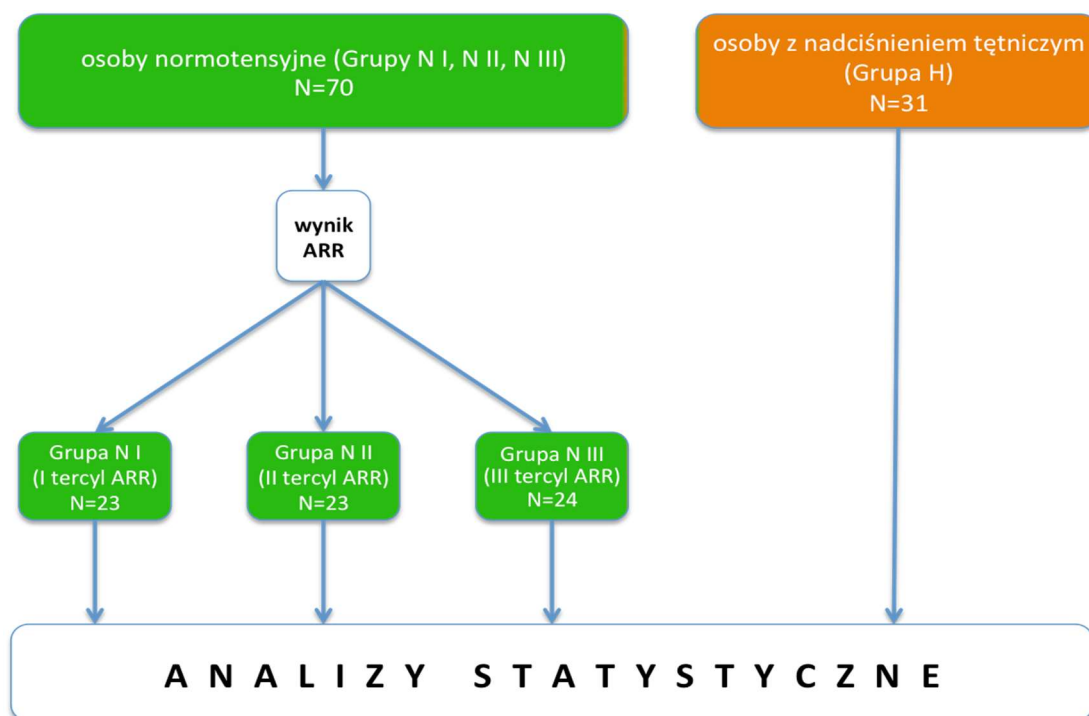
METODY

1. PROTOKÓŁ BADANIA

Rekrutacja pacjentów do badania była poprzedzona wstępnym badaniem podmiotowym i przedmiotowym. Spośród wstępnie wyselekcjonowanych pacjentów ostatecznie zakwalifikowano tych, którzy wyrazili świadomą zgodę na udział w projekcie i spełniali wszystkie kryteria wymienione powyżej. Od każdego normotensyjnego pacjenta materiał biologiczny pobierany był dwukrotnie: podczas pierwszej wizyty rekrutacyjnej (badanie A) oraz w piątą dobę, po czterech dniach przyjmowania ASA (75mg/24h) (badanie B). Natomiast od osób z nadciśnieniem tętniczym czterokrotnie – A i B jak wyżej oraz dodatkowo po dwóch tygodniach terapii walsartanem (80 mg/24h) – (badanie C), a następnie po czterech dniach przyjmowania ASA (75 mg/24h) z walsartanem jednocześnie (badanie D) (Ryc. 3). U wszystkich badanych przeprowadzono stratyfikację ryzyka sercowo-naczyniowego dokonując oznaczeń konwencjonalnych markerów biochemicznych, zgodnie z obowiązującymi w okresie rekrutacji wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC).

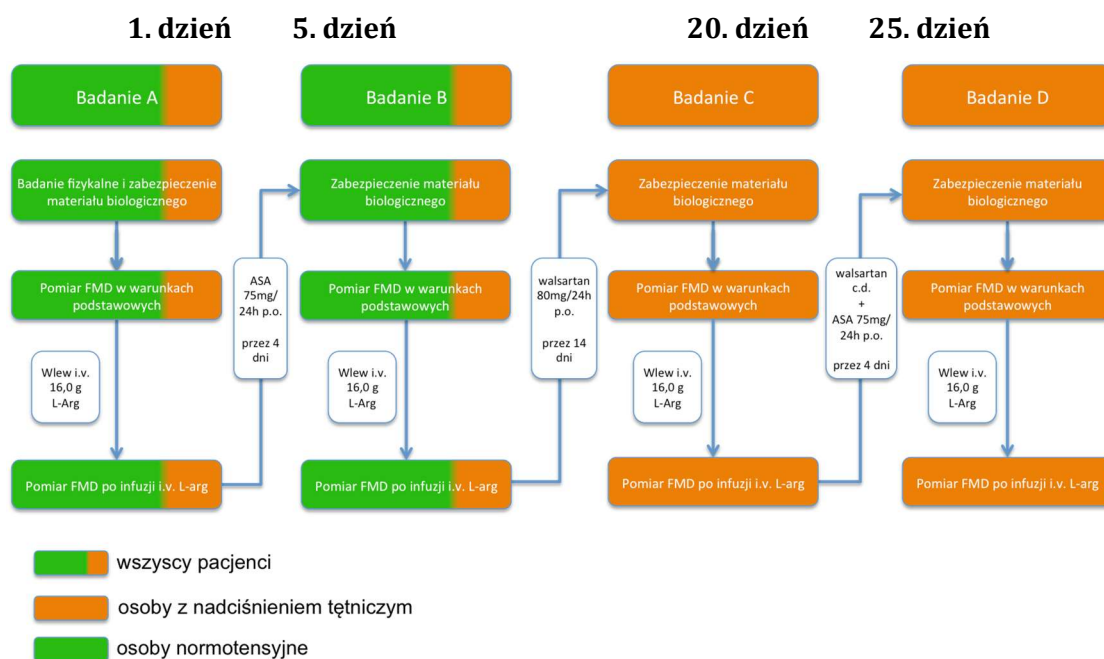
Z krwi pełnej wykonano morfologię, osocze wykorzystano do zbadania parametrów krzepnięcia, a surowicę do oznaczenia stężenia kreatyniny, glukozy, mocznika, kwasu moczowego, sodu, potasu, hsCRP oraz lipidogramu. Oznaczenia wykonano za pomocą rutynowo stosowanych metod w akredytowanym laboratorium szpitalnym, przy użyciu analizatorów: Sysmex® (XT-4000i), Siemens® (The Dimension® EXL™), Thermo Fisher Scientific® (Konelab 20 Clinical Chemistry Analyzer) oraz Werfen® (ACL TOP 550 CTS).

Na podstawie stężenia kreatyniny, płci i wieku oszacowany został współczynnik filtracji kłębuszkowej (eGFR; ang. estimated Glomerular Filtration Rate,) metodą CKD-EPI (zebrane dane epidemiologiczne dotyczące przewlekłej choroby nerek, ang. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, 2009). Dodatkowo, u każdego z uczestników przeprowadzono badanie funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna, zgodnie z opublikowanym protokołem²⁷⁶. Każda grupa podczas wszystkich wizyt miała wykonane badanie FMD wyjściowo (baseline) oraz po dożylnym podaniu 16,0 g L-Arg w bolusie, co powoduje wyparcie inhibitora kompetycyjnego z centrum aktywnego syntazy tlenku azotu i, wskutek nadmiaru substratu, powoduje osiągnięcie syntezy tlenku azotu zgodnie z zasadami kinetyki zerowego rzędu. Badanie FMD bezpośrednio po wlewie L-Arg oznaczono symbolem „prim” (').



Ryc. 2. Schemat klasyfikacji pacjentów

Osoby normotensyjne zostały podzielone na terylnie wyodrębnione w oparciu o wartości wskaźnika aldosteronowo-reninowego (Grupy N I, N II, N III). Analizy statystyczne prowadzono wewnątrz każdej wyodrębnionej grupy na poszczególnych etapach badania (szeregi czasowe, p. kolejna rycina), a także pomiędzy wszystkimi grupami na tym samym etapie protokołu badawczego.



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie protokołu badania z uwzględnieniem uczestnictwa poszczególnych grup na określonych jego etapach (A-D)

ASA – kwas acetylosalicylowy; L-Arg – L-Arginina; FMD - wazodylatacja zależna od przepływu

2. ZABEZPIECZENIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Materiał do badań był pobierany przez personel medyczny po nakłuciu żyły przedramienia, na czczo, w warunkach atraumatycznych (bez użycia stazy), z zastosowaniem zestawu aspiracyjno-próżniowego S-Monovette firmy Sarstedt®.

Osocze wersenianowe wykorzystano celem przeprowadzenia analizy stężeń metabolitów szlaku tlenu azotu, tj. asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA; ang. asymmetric dimethylarginine), symetrycznej dimetyloargininy (SDMA; ang. symmetric dimethylarginine), enancjomeru L-Arg, selektyny P, inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), dialdehydu malonowego (MDA; ang. malondialdehyde). Otrzymano je po odwirowaniu krwi pełnej (15 minut z przyspieszeniem 1000 x g w ciągu 30 minut od pobrania). Na wersenian pobrano również krew pełną celem oznaczenia morfologii krwi obwodowej (oznaczenie *ad hoc*) oraz do identyfikacji współczynnika tiolowego (GSH/GSSH, glutation w formie zredukowanej/glutation w formie utlenionej). Następnie materiał został zabezpieczony w probówkach typu Eppendorf® i do czasu wykonania oznaczeń przechowywany w temperaturze -80°C.

Do oznaczenia podstawowych parametrów biochemicznych (za pomocą rutynowo stosowanych metod w akredytowanym laboratorium szpitalnym) oraz selektyny E, czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), wewnątrzkomórkowej molekule adhezyjnej, forma rozpuszczalna (sICAM-1, ang. soluble intercellular adhesion molecule-1, CD54), cząsteczki adhezyjnej 1 komórek naczynia, forma

rozpuszczalna (sVCAM-1, ang. soluble vascular cell adhesion molecule) pozyskano surowicę. Krew została pobrana do probówek z aktywatorem krzepnięcia, a następnie wirowano przez 15 minut z przyspieszeniem 1000 x g, w temperaturze +4°C, w ciągu 45 minut od pobrania. Materiał został zabezpieczony w probówkach typu Eppendorf® i do czasu wykonania oznaczeń przechowywany w temperaturze -80°C.

W celu zbadania stężeń końcowych produktów kaskady kwasu arachidonowego (6-keto-PGF_{1α} i TxB₂) uzyskano osocze cytrynianowe. Krew pobrano do probówko-strzykawk cytrynianowych (3,2% cytrynianu sodu w stosunku 1:10) suplementowanych uprzednio 5mM roztworem ASA w 0,9% NaCl celem uniknięcia aktywacji płytek i fałszywego zawyżenia stężenia tromboksanu. Następnie przeprowadzono wirowanie (15 minut z przyspieszeniem 1000 x g w ciągu 30 minut od pobrania); materiał został zabezpieczony w probówkach typu Eppendorf® i do czasu wykonania oznaczeń przechowywany w temperaturze -80°C.

3. BADANIE FUNKCJI WAZODYLATACYJNEJ ŚRÓDBŁONKA METODĄ DOPLEROWSKĄ (FMD)

U osób badanych oceniano funkcję śródbłonna naczyniowego metodą FMD, polegającą na pomiarze zmian średnicy tętnicy ramiennej w spoczynku i po wywołaniu reaktywnego wzrostu przepływu poprzedzonego jatrogennym niedokrwieniem przedramienia za pośrednictwem sfigmomanometru. W związku z faktem, iż na FMD wpływ mają czynniki zewnętrzne, tj. temperatura otoczenia, pokarmy, używki, leki i aktywność układu współczulnego, uczestnicy nie spożywali posiłków przez co najmniej 8 godzin przed badaniem, nie wykonywali ćwiczeń fizycznych, nie przyjmowali kofeiny, witaminy C czy nikotyny przez 4 do 6 godzin przed badaniem, a FMD wykonywano u nich w wyciszonym pomieszczeniu o temperaturze pokojowej po 15 minutowym odpoczynku. Pomiarów średnicy naczynia dokonywano przy użyciu aparatu ultrasonograficznego ALOKA Prosound c3cv - w prezentacji B z użyciem Dopplera kolorowego i z częstotliwością ultradźwięków przekraczającą 7 MHz. Pomiarów wykonywano w czterech seriach. W celu zminimalizowania błędów w każdej z serii dokonywano czterech pomiarów, z których liczonego średnią arytmetyczną. Pierwszy pomiar obejmował średnicę naczynia w warunkach podstawowych. Następnie zaciskano mankiety do pomiaru ciśnienia tętniczego do wartości przekraczającej o 50 mmHg wartość ciśnienia skurczowego badanego na czas pięciu minut. Rozszerzenie tętnicy obliczano jako procentową zmianę średnicy naczynia wywołaną niedokrwieniem-reperfuzją w odniesieniu do średnicy w warunkach wyjściowych. Następnie dokonywano wlewu dożylnego roztworu L-Argininy do żyły obwodowej kończyny górnej niepoddanej badaniu po czym powtarzano algorytm.

$$\text{FMD \%} = (A-B)/B \times 100\%$$

gdzie A – średnica naczyń po niedokrwieniu i reperfuzji B – średnica naczyń w warunkach podstawowych

4. SZTYWNOŚĆ TĘTNIC – BADANIE SZYBKOŚCI PROPAGACJI FALI TĘTNA – PWV (ang. pulse wave velocity)

Ocena szybkości propagacji fali tętna jest nieinwazyjną metodą uznaną przez ESH i ESC za jeden z parametrów służących ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego¹⁴⁸. Pomiar ten określa stopień sztywności ścian naczyń tętniczych. W prawidłowych warunkach wartość szybkości fali tętna charakteryzuje się niskimi wartościami, a punkty odbicia znajdują się w początkowych odcinkach obwodowych tętnic oporowych. Wartość ta rośnie z wiekiem i ciśnieniem tętniczym. Wyniki dla młodych dorosłych (20-50 r.ż.) powinny być niższe niż 10 m/s^{277 278}, zaś prędkość aortalna powyżej 12 m/s istotnie zwiększa ryzyko zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych^{279 280}. U badanych do pomiaru szybkości propagacji fali tętna zastosowano aparat Complior® (Francja). Szybkość rozchodzenia się fali mierzona była przy użyciu mechanoprzeźkaźników (przetworników piezoelektrycznych) umieszczonych nad naczyńmi tętniczymi łatwo dostępnymi badaniu. Pomiaru dokonywano pomiędzy dwoma punktami, nad tętnicą szyjną wspólną (układ odniesienia) i tętnicą udową. Po akwizycji optymalnego sygnału dedykowane oprogramowanie dokonywało obliczeń szybkości propagacji fali tętna przy użyciu wzoru:

$$\text{PWV} = D/T,$$

gdzie: D – odległość między dwoma punktami pomiaru na tętnicach, T – opóźnienie czasowe między początkiem rejestracji fali na wyznaczonych dwóch punktach.

Z modułem Younga (E) PWV wiąże równanie: $\text{PWV} = Eh/2\rho R$,

gdzie h to grubość ściany tętnicy, R — promień wewnętrzny, a ρ — gęstość krwi.

Przed badaniem dla każdego pacjenta istnieje możliwość obliczenia wartości referencyjnych.

5. OZNACZANE PARAMETRY LABORATORYJNE

METABOLITY SZLAKU TLENKU AZOTU - ADMA, SDMA, L-ARGININA

L-Arginina jest substratem dla syntazy tlenku azotu (NOS; ang. nitric-oxide synthase)²⁸¹. Metylowe pochodne L-Argininy (ADMA i SDMA), powstające w wyniku nasilonej proteolizy (głównie białek jądrowych-histonów), są endogennymi, kompetycyjnymi inhibitorami śródbłonkowej izoformy NOS. Siła hamująca SDMA jest zdecydowanie słabsza niż ADMA i jest ona uważana raczej za marker wczesnego uszkodzenia nerek niż dysfunkcji śródbłonka^{282 283 284}.

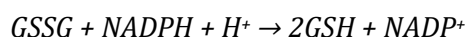
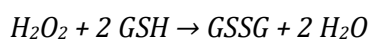
Biodostępność tlenu azotu można określić współczynnikiem będącym ilorazem stężenia L-Argininy do ADMA (L-Arg/ADMA)²⁸⁵. Wyższe wartości tego współczynnika korelują z niższą częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych u osób z wysokim ryzykiem²⁸⁶. Obserwacje sugerują istotny udział ADMA w rozwoju dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i przede wszystkim w tym mechanizmie wiążą ją ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych oraz gorszym rokowaniem w ich przebiegu^{287 288 289 290 291}. Blokowanie syntezy NO przez ADMA może dodatkowo nasilać produkcję reaktywnych form tlenu. Stężenia wyżej wymienionych metabolitów były określane za pomocą analizy HPLC z detekcją spektrofluorescencyjną. W badaniu użyto chromatografu firmy Varian®, składającego się z pompy Pro Star 240, automatycznego podajnika próbek z funkcją mieszania reagentów Pro Star 410, detektora spektrofluorescencyjnego Pro Star 363 oraz oprogramowania Star Chromatography Workstation, wersja 6.3 (sterowanie pracą urządzeń, akwizycja i obróbka danych). Pomiary ilościowe wykonano w oparciu o metodę wzorca wewnętrznego; do każdej próbki i standardu dodano 10µl/l L-homoargininy. W kolejnym etapie procedury, po rozcieńczeniu, odbiałczaniu i odwirowaniu, przeprowadzono oczyszczenie techniką ekstrakcji do fazy stałej na kationicie, stosując kolumnienki SCX-50 firmy Varian Inc®. Otrzymane eluaty poddano reakcji derywatywacji z użyciem odczynnika OPA (5,4 mg/ml o-ftaldialdehydu w buforze boranowym o pH 8,4 i dodatkiem 0,4% objętości 2-merkaptoetanolu) i następnie naniesiono na kolumnę chromatograficzną firmy Waters® (Symmetry C-18, 150 x 4,6 mm, 5µ) umieszczoną w piecu i podgrzaną do temp. 35°C. Fazę ruchomą, którą stanowił 50 Mm bufor K-fosforanowy (pH=6,6) z acetonitrylem (12% v/v) podawano w systemie izokratycznym przy przepływie 1,1 ml/min. Detekcja fluorescencyjna była rejestrowana przy długości fal wzbudzenia 340 nm i emisji 450 nm. W końcowym etapie, przez porównanie współczynników: L-Argininy/L-homoargininy, ADMA/L-homoargininy i SDMA/L-homoargininy ze współczynnikami dla roztworów standardowych, wyliczono stężenia badanych parametrów.

Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV; ang. coefficient of variation intra and inter assay) wynosiły odpowiednio dla ADMA 2,8 i 3,0 , dla SDMA 3,1 i 3,5, dla L-Argininy 1,3 i 2,5.

MARKERY STRESU OKSYDACYJNEGO

WSPÓŁCZYNNIK TIOLOWY (GSH/GSSG)

Formy utlenione (GSSG) i zredukowane (GSH) glutationu powstają w przebiegu poniższych reakcji:



Ryc. 4. Podstawowe reakcje przemian enzymatycznych z udziałem glutationu.

H₂O₂, nadtlenek wodoru; GSH, glutation w formie zredukowanej; GSSG, glutation w formie utlenionej; H₂O, woda; NADPH, forma zredukowana estru fosforanowego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; H⁺ proton, NADP⁺, ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego.

GSH jest jednym z głównych antyoksydantów w organizmie człowieka. Redukując inne związki, GSH przechodzi w formę utlenioną (GSSG) przy udziale peroksydazy glutationowej (Ryc. 4). Glutation może ulegać ponownej elektronacji za pomocą reduktazy glutationowej z jednoczesnym utlenianiem NADPH (ryc. 4). Forma zredukowana glutationu hamuje peroksydację lipidów oraz „zmiata” wolne rodniki²⁹². Stres oksydacyjny indukuje szybkie utlenianie glutationu, dlatego też nasilenie tej przemiany dobrze odzwierciedla stan oksydacyjno-redukcyjny w organizmie człowieka. Ocenianym zwykle współczynnikiem jest iloraz stężeń formy zredukowanej do formy utlenionej glutationu (GSH/GSSG), tj. indeks tiolowy. Ponieważ jedna cząsteczka GSSG powstaje z dwóch cząsteczek GSH, potencjał Nernsta powinien lepiej wyrażać potencjał redoks niż prosty stosunek GSH do GSSG²⁹³. Fizjologicznie forma zredukowana stanowi ponad 95% całkowitego zasobu glutationu w organizmie^{294 295}. Naturalnie stosunek GSH/GSSG zmniejsza się stopniowo w wyniku starzenia się organizmu, ale zmiana ta może również zachodzić bardziej gwałtownie jako skutek procesów patologicznych zachodzących na przykład w toku progresji schorzeń układu sercowo-naczyniowego, czy też w toku progresji chorób nowotworowych²⁹⁶.

$$\text{Indeks tiolowy} = \frac{GSH - 2GSSG}{GSSG}$$

Ryc. 5. Obliczenie indeksu tiolowego;

GSH, stężenie formy zredukowanej glutationu; GSSG, stężenie formy utlenionej glutationu.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[GSSG]}{[GSH]^2}$$

Ryc. 6. Równanie Nernsta dla glutationu

E- potencjał redoks w danym pH; E⁰- potencjał standardowy elektrody; R- stała gazowa = 8,314 J·K⁻¹ mol⁻¹; T, temperatura [K]; n- liczba elektronów wymienianych w reakcji połówkowej; F- stała Faradaya równa 96485 C·mol⁻¹; GSH- stężenie formy zredukowanej glutationu; GSSG- stężenie formy utlenionej glutationu.

Do badania użyto komercyjnego testu GSH/GSSG-412™ (nr kat. 21040) firmy Bioxytech® stosując się do instrukcji producenta. W metodzie kolorymetrycznej wykorzystuje się prędkość konwersji koloru zachodzącej w czasie reakcji, gdyż jest ona współmierna do stężenia GSH oraz GSSH. Związkiem chromogennym jest reagent Ellmana (kwas 5'5-ditiobis-2-nitrobenzoesowego, DTNB), który z GSH tworzy barwny produkt wychwytywany przez spektrofotometr przy fali o długości $\lambda = 412$ nm. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej dla indeksu tiolowego (%CV) wynosiły odpowiednio 5,1 i 7,5.

DIALDEHYD MALONOWY (MDA)

Dialdehyd malonowy (MDA) jest wytwarzany w czasie peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Uznawany jest za marker stresu oksydacyjnego i może powstawać w trakcie nieenzymatycznej autooksydacji lub jako produkt uboczny utleniania enzymatycznego szlaku eikozanoidów. Charakteryzuje go duża reaktywność (tworzy wiązania kowalencyjne z cząsteczkami, zmieniając ich budowę). Odgrywa rolę w patogenezie chorób nowotworowych, miażdżycy czy cukrzycy²⁹⁷.

MDA bierze także pośrednio udział w rozwoju miażdżycy poprzez modyfikowanie budowy cząsteczek LDL²⁹⁸. MDA jest więc toksycznym produktem końcowym peroksydacji lipidów, wykładnikiem stresu oksydacyjnego, a dodatkowo dezintegracji błon komórkowych^{299 300}.

Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem testu LPO-586™ (nr kat. 21012) firmy Bioxytech® w oparciu o instrukcję dostarczoną przez producenta. W metodzie kolorymetrycznej został użyty trwały związek o maksimum absorpcji przy $\lambda_{\max} = 586$ nm, który powstał w wyniku reakcji chromogennego N-metylo-2-fenylindol z MDA. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 4,6 i 6,2.

MARKERY AKTYWACJI ŚRÓDBŁONKA

sICAM-1

sICAM-1 jest przezbłonową cząsteczką uczestniczącą w aktywacji i przemieszczaniu się leukocytów (najczęściej eksponowaną na powierzchni komórek układu odpornościowego i śródbłonna). Do określenia jej stężenia użyto immunoenzymatycznego testu komercyjnego Quantikine ELISA Human sICAM-1/CD54 (nr kat. DCD540) firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano test kanapkowy w którym do dołków z fazą stałą opłaszczonymi monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu sICAM-1 dodano 100 μ l koniugatu (monoklonalne przeciwciało przeciwko sICAM-1 skoniugowane z peroksydazą chrzanową), a następnie po 100 μ l odpowiednich roztworów

standardowych i badanych próbek. Przeprowadzono 90 minutową inkubację w temperaturze pokojowej z użyciem wytrząsarki mikroplątek (450 rpm), następnie dołki czterokrotnie przemyto z wykorzystaniem automatycznej płuczki mikroplątek ELx50 firmy BioTek Instruments®, a w kolejnym etapie dodano 200 µl roztworu chromogenu (TMB, tetrametylobenzodyny) i H₂O₂. Reakcja została przerwana po 30 minutach przez dodanie 50 µl 2N kwasu siarkowego. Przy pomocy czytnika mikroplątek ELx 800 UV firmy BioTek® Instruments odczytano gęstość optyczną przy $\lambda = 450$ nm, stosując filtr korekcyjny $\lambda = 570$ nm. Do wykreślenia krzywej standardowej i określenia stężenia sICAM-1 wykorzystano specjalistyczne oprogramowanie KC4 BioTek Instruments®. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 4,7 i 6,9.

sVCAM-1

sVCAM-1 jest przezbłonową glikoproteiną uczestniczącą w adhezji monocytów, bazofili, eozynofili oraz limfocytów do śródbłonka naczyniowego, przenoszącą sygnały pomiędzy leukocytami, a śródbłonkiem, uznawaną za marker odpowiedzi zapalnej. sVCAM-1 odpowiada za upośledzanie rozkurczu naczyń, zależnego od prawidłowej funkcji śródbłonka (przekłada się to na zwiększone ryzyko chorób sercowo naczyniowych w tym udaru mózgu³⁰¹³⁰²). Do oznaczenia jej stężenia wykorzystano immunoenzymatyczny test komercyjny Quantikine Human sVCAM-1/CD106 (nr kat. DVC00) firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano test kanapkowy w którym 100 µl koniugatu (monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko sVCAM-1 skoniugowane z peroksydazą chrzanową) dodano do dołków z fazą stałą opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiemu sVCAM-1, a następnie po 100 µl odpowiednich roztworów standardowych i próbek badanych. Przeprowadzono 90 minutową inkubację w temperaturze pokojowej z użyciem wytrząsarki mikroplątek (450 rpm). Dołki przemyto czterokrotnie 400 µl buforu płuczającego z wykorzystaniem automatycznej płuczki mikroplątek ELx50 firmy BioTek Instruments®. Dodano 200 µl roztworu chromogenu TMB i H₂O₂. Reakcję przerwano po 30 minutach przez dodanie 50µl 2N kwasu siarkowego i odczytano gęstość optyczną przy $\lambda = 450$ nm, stosując filtr korekcyjny $\lambda = 570$ nm z wykorzystaniem czytnika mikroplątek ELx 800UV firmy BioTek Instruments®. Do wykreślenia krzywej standardowej i określenia stężenia sVCAM-1 zastosowano specjalistyczne oprogramowanie KC4BioTek Instruments®. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 3,9 i 8,4.

VEGF

VEGF jest swoistą dla śródbłonna, angiogenną i mitogenną glikoproteiną, która zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych. Indukuje ona powstawanie nowych naczyń po incydencie niedokrwienia oraz pośredniczy w angiogenezie indukowanej tlenkiem azotu^{303 304}. Dodatkowo w pojedynczym badaniu zaobserwowano polimorfizm genu VEGF może być jest czynnikiem ryzyka udaru mózgu lub wystąpienia zwężenia tętnicy szyjnej wewnętrznej (na jej wewnątrzczaszkowym odcinku)³⁰⁵.

Do badania jego stężenia użyto VEGF immunoenzymatycznego testu komercyjnego Quantikine Human VEGF (nr kat. DVE00) firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano test kanapkowy w którym do odpowiednich dołków, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko VEGF, dodano po 200 μ l odpowiednich roztworów standardowych i badanych próbek badanych. Przeprowadzono dwugodzinną inkubację w temperaturze pokojowej, a następnie dołki przemyto trzykrotnie 400 μ l buforu płuczącego z wykorzystaniem automatycznej płuczki mikropłytek ELx50 firmy BioTek Instruments®. Dodano następnie 200 μ l koniugatu przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko VEGF z peroksydazą chrzanową i po raz kolejny inkubowano przez 2 godziny w tych samych warunkach. Po kolejnym przemyciu dodano 200 μ l roztworu TMB i H₂O₂. Reakcję przerwano po 25 minutach przez dodanie 50 μ l 2N kwasu siarkowego. Przy pomocy czytnika mikropłytek ELx 800 UV firmy BioTek Instruments® odczytano gęstość optyczną przy $\lambda = 450$ nm, stosując filtr korekcyjny $\lambda = 570$ nm. Do wykreślenia krzywej standardowej i określenia stężenia VEGF wykorzystano specjalistyczne oprogramowanie KC4 BioTek Instruments®. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 5,9 i 7,3.

PROSTACYKLINA

Prostacyklina powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych, zmniejsza przepuszczalność mikrokrążenia oraz silnie hamuje agregację płytek krwi³⁰⁶. W większości jest syntezowana w komórkach śródbłonna³⁰⁷. Stężenie PGI₂ określano pośrednio, gdyż PGI₂ jest związkiem szczególnie niestabilnym (jej czas połowicznego rozpadu wynosi 3 minuty w warunkach *in vitro*, a 60 minut w stanie *in vivo*). Oceniono zatem stężenie trwałego metabolitu, produktu nieenzymatycznej hydratacji PGI₂ – prostacyklinę 6-keto-PGF_{1 α} . Do jego określenia w osoczu cytrynianowym (podczas pobrania suplementowanego uprzednio 5mM roztworem aspiryny lizylowej w 0,9% NaCl) użyto immunoenzymatycznego testu komercyjnego 6-keto-PGF_{1 α} EIA Kit (nr kat. 900-004) firmy Enzo Life Sciences®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano test kompetycyjny. Do dołków z fazą stałą opłaszczonych specyficznym przeciwciałem osła anty-owca IgG, dodano odpowiednio po 100 μ l roztworów

standardowych i próbek badanych w odpowiednich rozcieńczeniach, a następnie po 50 μ l koniugatu (fosfataza alkaliczna skoniugowana z 6-keto-PGF_{1 α}) i 50 μ l roztworu owczego przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko 6-keto-PGF_{1 α} . Przeprowadzono inkubację w temperaturze pokojowej trwającą 120 minut z użyciem wytrząsarki mikropłytek (450 rpm), następnie 3 razy przemyto i po usunięciu resztek buforu płuczającego dodano po 200 μ l roztworu fosforanu p-nitrofenylu, substratu dla fosfatazy alkalicznej. Reakcja barwna została przerwana przez dodanie fosforanu trójsodowego po 45 minutach inkubacji. Do określenia gęstości optycznej przy 405 nm zastosowano monochromatyczny filtr korekcyjny 570 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek ELx 800 UV firmy BioTek Instruments® razem z dedykowanym oprogramowaniem KC4 do wykreślenia krzywej standardowej i oznaczenia stężenia 6-keto-PGF_{1 α} . Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (% CV) wynosiły odpowiednio 8,1 i 11,4.

TROMBOKSAN

Tromboksan A₂ jest biologicznie czynną substancją należąca do eikozanoidów, wytwarzaną przez płytki krwi z kwasu arachidonowego w wyniku działania cyklooksygenazy i syntazy tromboksanu. Stanowi jeden z najsilniejszych endogennych aktywatorów trombocytów oraz wywołuje skurcz naczyń krwionośnych. Jego stężenie określano pośrednio, gdyż TxA₂ jest substancją niezwykle labilną, a czas jego połowicznego rozpadu wynosi 37 sekund w warunkach *in vivo*. Oceniono zatem stężenie jego metabolitu, produktu nieenzymatycznej hydratacji-TxB₂. Do badania jego stężenia w osoczu cytrynianowym użyto immunoenzymatycznego testu komercyjnego Thromboxane B2 EIA Kit (nr kat. ADI-900-002) firmy Enzo Life Sciences®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Do dołków z fazą stałą opłaszczonych przeciwciałem kozim swoistym dla fragmentu Fc króliczej IgG, dodano odpowiednio po 100 μ l roztworów standardowych i próbek badanych w odpowiednich rozcieńczeniach, a następnie po 50 μ l koniugatu (fosfataza alkaliczna skoniugowana z TxB₂ i 50 μ l roztworu króliczego przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko TxB₂. Przeprowadzono inkubację w temperaturze pokojowej trwającą 120 minut z użyciem wytrząsarki mikropłytek (450 rpm), następnie 3 razy przemyto i dodano po 200 μ l roztworu fosforanu p-nitrofenylu jako substratu dla fosfatazy alkalicznej. Po 45 minutach inkubacji reakcja została przerwana przez dodanie fosforanu trójsodowego. Wykorzystując czytnik mikropłytek ELx800 UV firmy BioTek Instruments® określono gęstość optyczną przy 405 nm i filtrze korekcyjnym 570 nm, a następnie stosując specjalistyczne oprogramowanie KC4 wykreślono krzywą standardową i odczytano stężenie TxB₂ w badanych próbkach. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (% CV) wynosiły odpowiednio 7,7 i 10,8.

sE-SELEKTYNA

E-selektyna jest transbłonową glikoproteiną, która po aktywacji przez cytokiny prozapalne uczestniczy w przyleganiu leukocytów do naczyń krwionośnych, wykazując wówczas zwiększoną ekspresję na komórkach śródbłonka naczyniowego, co jest swoistym wykładnikiem jego uszkodzenia. Wspólnie z ICAM-1 i VCAM-1, E-selektyna zaburza prawidłowe funkcjonowanie śródbłonka (umożliwiając diapedezę komórek zapalnych) oraz stymuluje proces zapalny. Do badania stężenia jej rozpuszczalnej formy użyto komercyjnego testu immunoenzymatycznego Quantikine ELISA, Human sE-Selectin/CD62E (nr kat. DSLE00), firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano metodę kanapkową w której dodano po 100 µl roztworów standardowych i próbek badanych w odpowiednich rozcieńczeniach do właściwych dołków wyścielonych mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko sE-selektynie. Przeprowadzono inkubację trwającą 2 godziny, a następnie wszystkie dołki przemyto 3 razy wykorzystując automatyczną płuczkę mikropłytek ELx50 firmy BioTek Instruments®, po czym zaaplikowano po 200 µl koniugatu (przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko sE-selektynie skoniugowane z peroksydazą chrzanową). Po raz kolejny dokonano inkubacji w temperaturze pokojowej trwającej 2 godziny, ponownie przepłukano w tych samych warunkach, a następnie dodano po 200 µl roztworu będącego mieszaniną nadtlenu wodoru (H₂O₂) i roztworu TMB. Reakcję barwną przerwano po upływie 30 minut inkubacji, dodając 50 µl 2N kwasu siarkowego. Do określenia gęstości optycznej przy 450 nm, zastosowano filtr korekcyjny 570 nm wykorzystując czytnik mikropłytek ELx 800 UV i specjalistyczne oprogramowanie KC4 BioTek Instruments®. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (% CV) wynosiły odpowiednio 6,8 i 10,0.

sP-SELEKTYNA

P-selektyna jest powierzchniową glikoproteiną, która uczestniczy w przemieszczaniu się limfocytów do tkanek. Jest zlokalizowana w ziarnistościach alfa płytek krwi, jak również w ciałkach Weibla-Palade'a komórek śródbłonka naczyniowego a wydzielana jest w czasie krzepnięcia lub odpowiedzi na czynniki zapalne^{308 309 310}. W stanie fizjologicznym rozpuszczalna forma P-selektyny pochodzi głównie płytek krwi, a jej stężenie odzwierciedla przede wszystkim stan aktywności płytek krwi a w drugiej kolejności śródbłonka naczyniowego^{311 312}. Do badania stężenia jej rozpuszczalnej formy użyto komercyjnego testu immunoenzymatycznego Human sP-Selectin/CD62P (nr kat. BBE6), firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji producenta. Zastosowano test kanapkowy w którym do właściwych dołków opłaszczonych przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko sP-selektynie dodano po 100 µl roztworów standardowych, kontrolnych i materiału badanego w odpowiednich rozcieńczeniach.

W następnej kolejności dodano po 100 μ l koniugatu (przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko sP-selektynie skoniugowane z peroksydazą chrzanową) i po 60 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dołki przemyto 3 razy stosując automatyczną płuczkę mikropłytek ELx50 firmy BioTek Instruments®. Następnie dodano po 100 μ l roztworu TMB. Reakcję barwną przerwano po 15 minutach inkubacji 1N roztworem kwasu chlorowodorowego. Do określenia gęstości optycznej przy $\lambda = 450$ nm zastosowano filtr korekcyjny 620 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek Epoch firmy BioTek Instruments®. Aby wykreślić krzywą standardową i oznaczyć stężenie sP-selektyny zastosowano specjalistyczne oprogramowanie Gen5 BioTek Instruments®. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (% CV) wynosiły odpowiednio 5,1 i 7,4.

PAI-1

Inhibitor aktywatora plazminogenu inaczej serpina E1, należy do inhibitorów proteaz serynowych i jest wiodącym inhibitorem tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA; ang. tissue plasminogen activator), który przekształca plazminogen do plazminy w czasie fibrynolizy. Zdecydowana większość PAI-1 we krwi występuje w trombocytach, a ich liczba koreluje ze stężeniem tego inhibitora w osoczu³¹³. Do badania stężenia użyto immunoenzymatycznego testu komercyjnego Quantikine ELISA, Human Serpin E1/PAI-1 (nr kat. DSE100) firmy R&D Systems®, stosując się do instrukcji opracowanej przez producenta. Zastosowano test kanapkowy w którym dodano po 50 μ l roztworów standardowych i próbek badanych w odpowiednich rozcieńczeniach do właściwych dołków wyścielonych monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko serpinie E1. Przeprowadzono dwugodzinną inkubację po czym trzy razy przemywano buforem płuczającym, wykorzystując automatyczną płuczkę mikropłytek ELx50 firmy BioTek Instruments®. Następnie dodano po 200 μ l koniugatu (poliklonalne przeciwciało przeciwko serpinie E1 skoniugowane z peroksydazą chrzanową) i po raz kolejny wykonano inkubację (2 godziny) i przemywanie (3 razy), a następnie dodano 200 μ l roztworu będącego mieszaniną TMB i H₂O₂. Reakcja barwna została przerwana po 30 minutach inkubacji dodaniem 50 μ l 2N kwasu siarkowego. Do określenia gęstości optycznej przy $\lambda = 450$ nm zastosowano filtr korekcyjny (570 nm) wykorzystując czytnik mikropłytek ELx 800 UV firmy BioTek Instruments® razem z przeznaczonym oprogramowaniem KC4 do wykreślenia krzywej standardowej i oznaczenia stężenia serpiny E1 w poszczególnych próbkach. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (% CV) wynosiły odpowiednio 6,8 i 8,2.

ALDOSTERON

Stężenie aldosteronu oznaczano przy pomocy testu komercyjnego RIA Aldosterone o numerze katalogowym IM 1664 firmy IMMUNOTECH zgodnie z instrukcją producenta

z zastosowaniem ilościowej metody radioimmunologicznej. Technika ta należy do metod kompetycyjnych, gdzie do próbek pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko aldosteronowi dodawano po 50 µl kalibratora o określonym stężeniu aldosteronu, kontroli oraz próbek badanych a także 500 µl wskaźnika znakowanego izotopem promieniotwórczym J¹²⁵. Aldosteron zawarty w surowicy konkurował z aldosteronem promieniotwórczym o ograniczoną liczbę miejsc wiążących na cząsteczkach przeciwciał. Po trzygodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej nadmiar niezwiązanej frakcji usunięto poprzez aspirację a następnie dokonano pomiaru radioaktywności antygenu związanego w kompleksie z przeciwciałem. Radioaktywność jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia badanego hormonu. Stężenie aldosteronu odczytywano z krzywej standardowej. Pomiaru radioaktywności dokonano przy użyciu automatycznego licznika gamma firmy Perkin Elmer – model WIZARD 2470. Stężenia aldosteronu mierzone były w zakresie od 6-2000 pg/ml przy normie dla osób dorosłych: Pozycja stojąca 34-273 pg/ml; pozycja leżąca 10-105 pg/ml. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 12,6 i 17,2.

ARO – aktywność reninowa osocza

Oznaczenie ARO pozwala na ocenę aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron. Oznaczeń dokonano z użyciem zestawu komercyjnego Renin Plasma Activity o numerze katalogowym R-EX-125 firmy ZENTECH zgodnie z instrukcją producenta z wykorzystaniem metody radioimmunoenzymatycznego oznaczenia angiotensyny I, gdzie inkubowano próbki osocza z inhibitorem enzymatycznym w temperaturze 4°C oraz w temperaturze 37°C przez półtorej godziny w środowisku pH = 6,0. Do próbek następnie dodawano znakowaną izotopem angiotensynę J¹²⁵ i przeciwciało, po czym inkubowano przez 18-20 godzin, aby doszło do konkurencyjnego związania się antygenu ze standardu, próbek badanych i znacznika radioaktywnego z miejscami antygenowymi przeciwciała. Próbki w dalszej kolejności umieszczono w separatorze magnetycznym i zmierzono radioaktywność przy pomocy licznika gamma typu WIZARD firmy Perkin Elmer. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 11,3 i 20,1.

ARR – wskaźnik aldosteronowo-reninowy

Wyliczony został pośrednio jako iloraz stężenia aldosteronu i aktywności reninowej osocza. Na jego podstawie dokonano podziału osób normotensyjnych na tercyle, w oparciu o co dokonywano następnie analiz w podgrupach.

$$\text{ARR} = \frac{\text{aldosteron}}{\text{aktywność reninowa osocza}}$$

Nitrotyrozyna

Nitrotyrozyna jest markerem biodegradacji tlenku azotu, powstającym w wyniku gwałtownej reakcji jego utleniania z następczym utworzeniem nadtlenoazotynów (ONOO⁻). Są one silnymi oksydantami i czynnikami nitrującymi, a w związku ze swoją labilnością reagują z tyrozyną zlokalizowaną w białkach, co skutkuje dezaktywacją wielu ważnych enzymów (m.in. katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa). Nitrotyrozyna jest ważnym wyznacznikiem nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach, a reakcja nitrowania tyrozyny nasiloną jest zwłaszcza w miażdżycy czy przewlekłej dysfunkcji mięśnia sercowego. Do oznaczenia 3'-nitrotyrozyny wykorzystano test 3-Nitrotyrosine ELISA Kit o numerze katalogowym ABIN1113213 firmy Oxis, zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując immunoenzymatyczną technikę kanapkową ELISA z zastosowaniem przeciwciał anty 3'-nitrotyrozynowych jako fazy stałej, do której dodawano 100 µl próbki kontrolnej i materiału badanego. Następnie do każdego dołka dodawano biotynowane przeciwciało wykrywające i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37 st. W dalszej kolejności trzykrotnie przemywano dołki celem usunięcia niezwiązanych przeciwciał i dodawano peroksydazę chrzanową. Reakcję barwną przerywano przy użyciu kwasu siarkowego, a gęstość optyczną proporcjonalną do koncentracji antygeny badano przy długości fali $\lambda=450\text{nm}$. Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej (%CV) wynosiły odpowiednio 7,3 i 9,5.

6. OCENA AGREGACJI PŁYTEK W KRWI PEŁNEJ

Do badania funkcji płytek zastosowano wielokanałowy analizator typu Multiplate (firmy Dynabyte), który wykorzystuje metodę agregometrii impedancyjnej we krwi pełnej (MEA) bazując na tzw. wielokrotnej agregacji elektrodowej (podczas każdego pomiaru oznaczenie wykonywane jest podwójnie). W czasie procesu agregacji płytki krwi gromadzą się na dwóch elektrodach zanurzonych w próbce krwi, czego efektem jest zmiana impedancji (oporu elektrycznego). Ocena funkcji płytek krwi możliwa jest przy zastosowaniu odpowiednich agonistów płytkowych (kwasu arachidonowego, kolagenu, białka aktywującego receptor dla trombiny TRP-6, ristocetyny, ADP). W niniejszym badaniu wykorzystano trzy testy

- ASPI test: agregacja zależna od cyklooksygenazy z wykorzystaniem kwasu arachidonowego,
- ADP test: aktywacja płytek przez ADP,
- RISTO test: agregacja zależna od czynnika von Willebranda, z wykorzystaniem ristocetyny jako aktywatora

Wykonanie testów:

300 µl 0,9% ogrzanego do temperatury 37°C oraz po 300 µl krwi pełnej poddano inkubacji w specjalnych komorach testowych jednorazowego użytku z mieszadłem

magnetycznym umieszczonych w stanowiskach pomiarowych i podłączonych do urządzenia. Następnie, po 3 min inkubacji, dodawano po 20 μ l odpowiedniego odczynnika – ADP (ADP test; stężenie końcowe 6,5 μ M), kwasu arachidonowego (ASPI test; stężenie końcowe 0,5 mM), ristocetyny (RISTO TEST; stężenie końcowe 0.77 mg/ml). Wyniki agregacji uzyskano po kolejnych 6 min, dla każdego testu jako średnia dwóch pomiarów. Wartości agregacji wyrażone w omach były konwertowane na jednostki arbitralne agregacji [AU], zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta, wyliczone w oparciu o przebieg krzywych agregacji z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania.

7. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z użyciem programu Statistica 13.0 StatSoft®. Dane zostały wyrażone jako średnia \pm SEM. Różnice między średnimi oceniano za pomocą testu T-studenta lub U Manna-Whitneya w zależności od rozkładu zmiennych i różnorodności wariancji. Testy MANOVA/ANOVA zastosowane zostały w porównaniu większej ilości grup niż dwie, przy czym zależnie od charakteru zmiennych (normalność rozkładu, jednorodność wariancji, homoscedastyczność, dobierano testy parametryczne bądź nieparametryczne, odpowiednio dla zmiennych zależnych lub niepowiązanych zależnie od jednorodności wariancji i charakteru rozkładu).

W przypadku stwierdzenia statystycznie istotnych różnic w ocenie wariancji, przeprowadzano następczą analizę *post hoc* testami Newmana-Keulsa. Badania korelacji zmiennych w próbach przeprowadzono za pomocą testu Pearsona i nieparametrycznego testu rang Spearmana (również w zależności od rozkładu zmiennych).

Za istotne statystycznie przyjmowano wyniki na poziomie $p < 0,05$.

IV. WYNIKI

1. Charakterystyka demograficzna, stratyfikacja ryzyka sercowo-naczyniowego

Badane grupy, powstałe wskutek wyodrębnienia osób z samoistnym nadciśnieniem tętniczym i następczym podziałem osób normotensyjnych na tercyle w zależności od wartości współczynnika aldosteronowo-reninowego, nie różniły się statystycznie istotnie między sobą wiekiem, średnią częstością akcji serca, rozkurczowego ciśnienia tętniczego, średnią wartością BMI oraz jego składowymi, wskaźnikiem talia-biodro i sztywnością naczyń wyrażoną jako szybkość propagacji fali tętna w odcinku szyjno-udowym. W zakresie biochemicznych parametrów stratyfikujących ryzyko sercowo-naczyniowe, znamiennej różnic nie odnotowano w zakresie stężeń trójglicerydów, całkowitego cholesterolu, kreatyniny, kwasu moczowego, mocznika i potasu w surowicy (Tabela 1).

Istotne różnice odnotowano natomiast w zakresie wartości skurczowego i średniego ciśnienia tętniczego. W analizach *post hoc* wykazano, że dotyczą one wyłącznie grupy nadciśnieniowej w stosunku do pozostałych grup.

W zakresie wartości rozkurczowego i średniego ciśnienia tętniczego zaobserwowano jedynie wraz ze wzrostem wartości ARR nieistotny statystycznie trend wzrostowy w grupach NI, NII i NIII. Rozkurczowe nadciśnienie tętnicze nie było czynnikiem różnicującym grupę osób z nadciśnieniem tętniczym od grup normotensyjnych, niezależnie od wartości ARR (Tabela 1).

Wartości ciśnienia tętna, podobnie jak ciśnienia skurczowego, były najwyższe w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym i były istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do pozostałych grup. Różnice statystycznie istotne były obserwowane także pomiędzy podgrupami osób normotensyjnych – najwyższe było u pacjentów będących w pierwszym tercylu ARR.

Mimo braku różnic w zakresie średnich stężeń całkowitego cholesterolu, wartości frakcji HDL i LDL w poszczególnych podgrupach różniły się znamienne. Stężenie HDL rosło, a LDL spadało wraz ze wzrostem wartości ARR w grupach osób normotensyjnych. Najwyższe wartości frakcji LDL cholesterolu zanotowano w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Były one istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą NII i NIII osób normotensyjnych (Tabela 1).

Średnie wartości CRP, szacowanej filtracji kłębuszkowej, mocznika oraz natremii i kaliemii, podobnie jak stężenie glukozy mieściły się w zakresie wartości fizjologicznych. Wartości CRP, GFR i sodu były najniższe w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i różniły się istotnie statystycznie w porównaniu z wartościami w grupach NII i NIII osób normotensyjnych (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna oraz biochemiczna stratyfikacja ryzyka sercowo-naczyniowego w porównywanych grupach.

	I tercyl ARR (NI)	II tercyl ARR (NII)	III tercyl ARR (NIII)	Nadciśnienie tętnicze (H)	P
	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	
N	23	23	24	31	
Wiek (lata)	28,2 ± 1,21	26,83 ± 1,16	25,13 ± 0,87	27,37 ± 0,75	ns
HR (min ⁻¹)	70,5 ± 2,88	71,47 ± 2,26	70,78 ± 2,5	77,0 ± 3,0	ns
SBP (mmHg)	132,14 ± 4,59	127,78 ± 3,11	129,52 ± 2,51	145,85 ± 4,12	0,0009 *# \$
DBP (mmHg)	80,71 ± 2,51	83,61 ± 2,09	84,04 ± 1,83	88,60 ± 2,65	ns
MAP (mmHg)	97,86 ± 3,14	98,33 ± 2,15	99,2 ± 1,85	107,68 ± 2,82	0,0106 *# \$
PP (mmHg)	51,43 ± 2,48	44,17 ± 2,63	45,48 ± 2,04	57,25 ± 3,26	0,0044 # \$ & %
Wzrost (cm)	179 ± 1,94	180,68 ± 1,51	181,7 ± 1,17	180,61 ± 1,17	ns
Waga (kg)	82,88 ± 4,05	86,5 ± 1,99	85,39 ± 1,7	83,61 ± 2,88	ns
BMI (kg/m ²)	25,76 ± 0,95	26,56 ± 0,64	25,88 ± 0,51	25,57 ± 0,77	ns
WHR	0,95 ± 0,02	0,94 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,95 ± 0,03	ns
PWV C-F (m/s)	9,64 ± 0,34	9,83 ± 0,34	9,79 ± 0,31	10,58 ± 0,37	ns
TC (mg/dl)	186,18 ± 7,93	177,29 ± 11,38	174,16 ± 6,7	191,41 ± 7,47	ns
HDL (mg/dl)	47,09 ± 1,67	52,29 ± 2,13	56,26 ± 2,83	50,00 ± 2,03	0,0417 &
LDL (mg/dl)	108,71 ± 7,6	97,89 ± 9,78	91,05 ± 6,99	116,90 ± 6,31	0,0485 # \$
TG (mg/dl)	154,62 ± 21,96	144,67 ± 15,98	134,53 ± 16,31	122,62 ± 13,32	ns
hs-CRP (mg/l)	2,57 ± 0,49	2,94 ± 0,36	3,2 ± 0,28	2,00 ± 0,60	0,0081 # \$
Glukoza (mg/dl)	81,05 ± 1,68	86,09 ± 1,87	84,58 ± 2,75	91,61 ± 1,48	0,0012 *# %
Kreatynina (mg/dl)	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,03	0,99 ± 0,03	1,05 ± 0,02	ns
GFR (ml/min/1,73m ²)	128,83 ± 11,03	141,3 ± 5,55	137,5 ± 5,39	111,44 ± 7,54	0,0049 # \$
Kw. moczowy (mg/dl)	6,08 ± 0,25	6,24 ± 0,28	5,94 ± 0,31	6,02 ± 0,22	ns
Mocznik (mmol/l)	31,57 ± 1,59	34,3 ± 1,85	32,5 ± 1,56	30,18 ± 1,23	ns
Sód (mmol/l)	140,86 ± 0,57	141,91 ± 0,38	141,37 ± 0,41	139,93 ± 0,43	0,0121 # \$
Potas (mmol/l)	4,01 ± 0,06	4,1 ± 0,07	4,0 ± 0,07	4,21 ± 0,06	ns

Skróty: HR-tętno, SBP-ciśnienie skurczowe, DBP-ciśnienie rozkurczowe, MAP- średnie ciśnienie tętnicze, PP-ciśnienie tętna, BMI-wskaźnik masy ciała, WHR-wskaźnik talia biodro, PWV C-F-szybkość propagacji fali tętna pomiędzy tętnicą szyjną a udową, TC-cholesterol całkowity, HDL-frakcja lipoprotein o dużej gęstości, LDL-frakcja lipoprotein o niskiej gęstości, TG-trójglicerydy, hsCRP-białko C reaktywne, GFR-wskaźnik filtracji kłębuszkowej

wyniki analiz post hoc dla grup niepowiązanych parami:

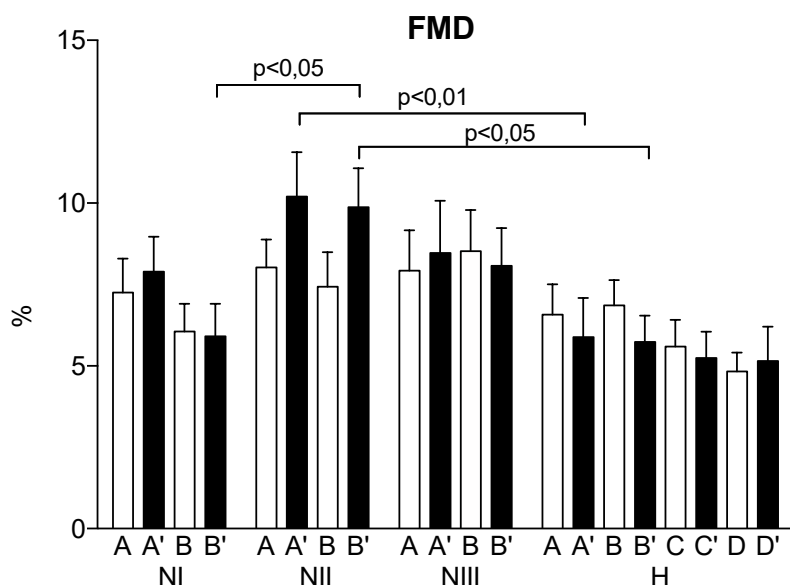
* - $p < 0,05$ dla porównania grup H vs NI; # - $p < 0,05$ dla porównania grup H vs. NII; \$ - $p < 0,05$ dla porównania grup H vs. NIII; & - $p < 0,05$ dla porównania grup NIII vs. NI; % - $p < 0,05$ dla porównania grup NII vs. NI

2. FMD

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami wazodylatacji indukowanej przepływem (FMD) przed i po podaniu L-Argininy ani w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym (H), ani w grupach pacjentów normotensyjnych (NI, NII, NIII).

Porównując wartości FMD między grupami normotensyjnymi wykazano istotnie wyższe wartości FMD po zastosowaniu ASA i L-Arg u pacjentów z grupy NII w porównaniu do pacjentów należących do grupy NI.

Istotnie wyższe wartości FMD obserwowano także wśród pacjentów normotensyjnych (NII) niż u osób z nadciśnieniem tętniczym (H) po zastosowaniu zarówno samej L-Arg jak i w połączeniu z ASA. W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym podanie walsartanu i ASA nie wpływało istotnie na wartość FMD (Ryc. 7).



Ryc. 7. FMD.

Wartości FMD wyjściowe (etap A, B, C, D) oraz po podaniu L-Arg (etap A', B', C', D')

3. Porównanie wybranych parametrów biodostępności tlenu azotu i stresu nitrozacyjnego pomiędzy grupami

Osoby z nadciśnieniem tętniczym (H) cechowały się znamienne niższymi wartościami średnimi stężeń L-Argininy – substratu dla syntazy NO oraz współczynnika L-Arginina/ADMA, odzwierciedlającego biodostępność L-Argininy, w porównaniu do osób z grup normotensyjnych. Nie wykazano także wpływu ASA na wartości tego parametru w żadnej z badanych grup (Tabela 2). Nie zaobserwowano także znamienych różnic po zastosowaniu ASA i walsartanu u osób z nadciśnieniem tętniczym (Tabela 3).

Tabela 2. Porównanie parametrów biodostępności NO w zależności od etapu badania wewnątrz grup (A vs B) oraz między grupami (analiza wariancji i testy *post hoc*).

	I tercyl ARR (NI) średnia ± SEM	II tercyl ARR (NII) średnia ± SEM	III tercyl ARR (NIII) średnia ± SEM	Nadciśnienie tętnicze (H) średnia ± SEM	p
L-Arg A (μmol/l)	63,06 ± 3,34	65,45 ± 3,34	60,70 ± 3,46	50,46 ± 3,70	0,0103 *# \$
	vs	vs	vs	vs	
L-Arg B (μmol/l)	63,28 ± 3,94	69,12 ± 4,91	63,15 ± 3,31	51,83 ± 3,80	0,0101 *# \$
	p=ns	p=ns	p=ns	p=ns	
ADMA A (μmol/l)	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,0009 *# \$ %
	vs	vs	vs	vs	
ADMA B (μmol/l)	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,0034 *# \$ @
	p=ns	p=ns	p=ns	p=ns	
L-Arg/AMDA A	161,76 ± 12,77	147,49 ± 9,40	149,35 ± 9,06	102,81 ± 8,17	0,0004 *# \$
	vs	vs	vs	vs	
L-Arg/AMDA B	152,48 ± 10,47	158,85 ± 13,84	166,71 ± 10,89	105,93 ± 8,46	0,0002 *# \$
	p=ns	p=ns	p=ns	p=ns	
SDMA A (μmol/l)	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,02	ns
	vs	vs	vs	vs	
SDMA B (μmol/l)	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,50 ± 0,03	ns
	p=ns	p=ns	p=ns	p=ns	
N-Tyr A (nmol/l)	48,90 ± 15,88	51,69 ± 20,17	50,68 ± 24,85	35,37 ± 5,94	ns
	vs	vs	vs	vs	
N-Tyr B (nmol/l)	60,66 ± 22,98	46,35 ± 14,80	86,58 ± 26,50	35,48 ± 7,31	ns
	p=ns	p=ns	p=ns	p=ns	

Etap A – wyjściowo; Etap B – po ASA

Skróty: L-Arg – L-Arginina; ADMA – asymetryczna dimetyloarginina; SDMA – symetryczna dimetyloarginina;

N-Tyr – nitrotyrozyna

wyniki analiz post hoc parami dla grup niepowiązanych:

** - p<0,05 dla porównania grup samoistne NT (H) vs NI; # - p<0,05 dla porównania grup samoistne NT (H) vs NII;*

\$ - p<0,05 dla porównania grup samoistne NT (H) vs NIII; @ - p<0,05 dla porównania grup NIII vs NII

% - p<0,05 dla porównania grup NII vs NI

Tabela 3. Porównanie parametrów biodostępności tlenu azotu w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym (Grupa H)

	A		B		C		D		p
	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM	średnia ± SEM		
L-Arg (μmol/l)	50,46	3,7	51,83	3,8	45,97	3,57	48,84	3,44	ns
ADMA (μmol/l)	0,51	0,02	0,52	0,03	0,51	0,03	0,50	0,03	ns
L-Arg/ADMA	102,81	8,17	105,93	8,46	97,02	9,79	103,17	9,68	ns
SDMA (μmol/l)	0,46	0,02	0,50	0,03	0,52	0,03	0,50	0,03	p<0,05
N-Tyr (nmol/l)	35,37	5,94	35,48	7,31	Brak danych		Brak danych		ns

A – Grupa H wyjściowo; B – Grupa H po podaniu ASA; C – Grupa H po podaniu walsartanu;

D – Grupa H po podaniu walsartanu i ASA; p – wartość p dla całości efektu w analizie wariancji

Skróty: L-Arg – L-Arginina; ADMA – asymetryczna dimetyloarginina; SDMA – symetryczna dimetyloarginina;

N-Tyr – nitrotyrozyny

Wyjściowo znamienne wyższe wartości ADMA obserwowane były w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym względem grup normotensyjnych, jak również w grupie NII w porównaniu do grupy NI. Po podaniu ASA zaobserwowano podobnie istotne różnice pomiędzy grupą z nadciśnieniem tętniczym a grupami normotensyjnymi (NI i NIII) oraz między grupami NIII i NII (Tabela 2). Po zastosowaniu zarówno ASA, jak i walsartanu nie odnotowano istotnych różnic w stężeniu ADMA w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym (Tabela 3).

Stężenie SDMA, związku uważanego obecnie za marker wczesnej dysfunkcji nerek, nie różniło się między grupami (Tabela 2). Wykazywało za to znamienne wzrost po zastosowaniu walsartanu w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (Tabela 3).

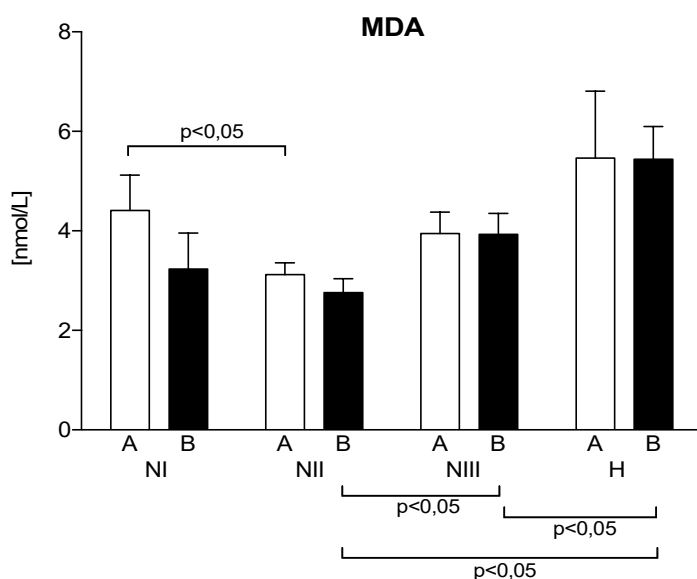
Analizując grupę z nadciśnieniem tętniczym na wszystkich czterech etapach protokołu nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach parametrów odpowiedzialnych za biosyntezę NO: L-Arg, ADMA i L-Arg/ADMA (Tabela 3).

Uwzględniając biodegradację tlenu azotu, jako drugą składową jego biodostępności – nie stwierdzono znamienych różnic w nasileniu stresu nitrozacyjnego ocenianego przy użyciu nitrotyrozyny (Tabela 2).

4. Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego

W badaniu oceniano nasilenie peroksydacji lipidów analizując stężenie malonyldialdehydu (hydroksyalkenali). W warunkach wyjściowych zaobserwowano znamienne różnice stężeń malonyldialdehydu pomiędzy grupami pacjentów z najniższym (NI) i środkowym (NII) tercylem ARR. Średnie stężenie MDA u osób z nadciśnieniem tętniczym było najwyższe spośród wszystkich grup, jednak różnice były nieistotne statystycznie. Farmakologiczna blokada cyklooksygenazy przez kwas acetylosalicylowy nie spowodowała znamienych spadków poziomu MDA w poszczególnych grupach. Zaobserwowano za to istotne

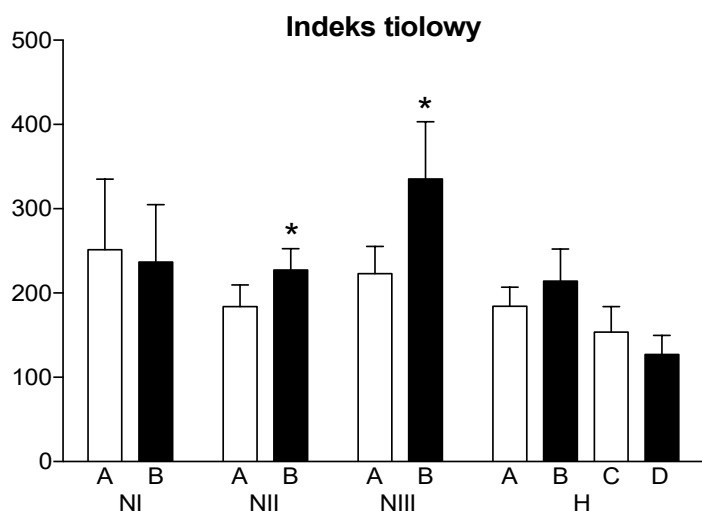
różnice pomiędzy grupą pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (H), a grupami normotensyjnymi NII i NIII. Istotna różnica poziomu MDA obecna była także pomiędzy tymi grupami (NII i NIII) (Ryc. 8).



Ryc. 8. Malonyldialdehyd

A - wyjściowo; B - po ASA

Zastosowanie ASA spowodowało statystycznie znamiennej wzrost indeksu tiolowego, odzwierciedlającego pojemność oksydacyjną, wewnątrz grup pacjentów normotensyjnych NII i NIII. Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w zakresie średnich wartości współczynnika tiolowego pomiędzy grupami ocenianego zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po blokadzie cyklooksygenazy. W grupach otrzymujących walsartan i ASA wartości tego parametru były najniższe, nie wykazano jednak żadnych znamienych różnic w porównaniu z innymi grupami (Ryc. 9).

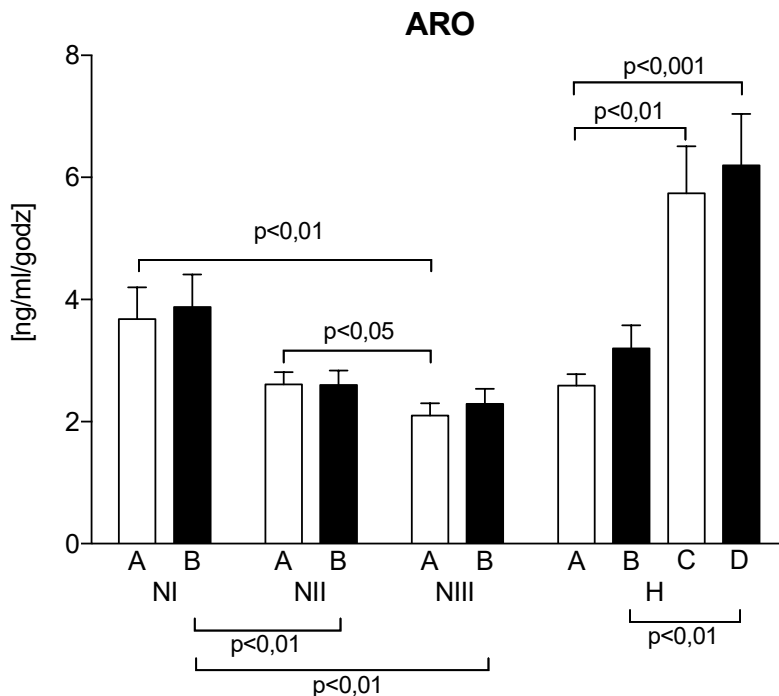


Ryc. 9. Indeks tiolowy

A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA; * $p < 0,05$ A vs B

5. Ocena wybranych elementów układu RAA

Kategoryzację grup normotensyjnych przeprowadzono w oparciu o wartości współczynnika aldosteronowo-reninowego. Aktywność reninowa osocza (ARO), będąca jedną ze składowych ARR w grupach pacjentów normotensyjnych wykazywała tendencję spadkową w kolejnych tercylach od NI do NIII osiągając różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupami NIII i NII oraz NIII i NI. Nie wykazano jednak istotnych różnic pomiędzy grupami normotensyjnymi a grupą pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Zastosowanie ASA spowodowało jedynie nieznaczny wzrost ARO w badanych grupach. Terapia walsartanem osób z nadciśnieniem tętniczym powodowała znamienny wzrost wartości ARO. Zastosowanie ASA u tych osób nie miało istotnego wpływu na aktywność reninową osocza (Ryc. 10).

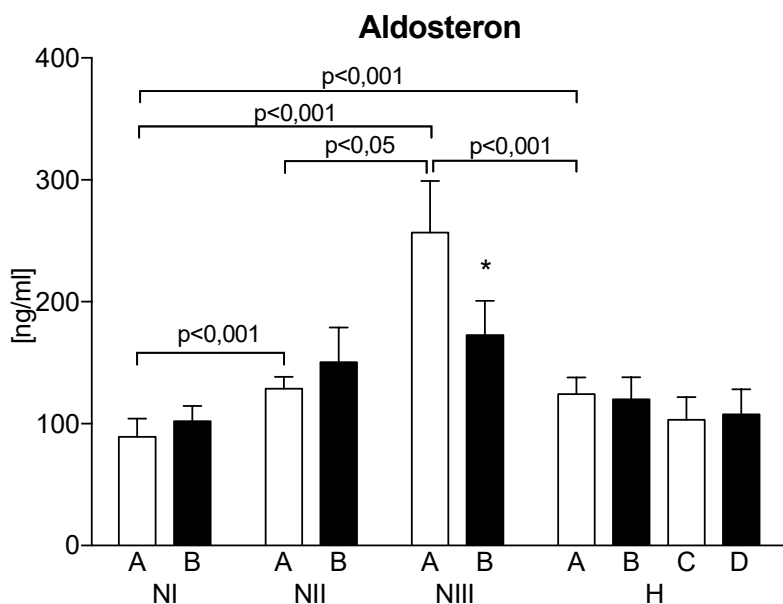


Ryc. 10. Aktywność reninowa osocza

A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA

Wartości ARR wskutek kategoryzacji na tercyle wykazywały tendencje wzrostowe w grupach od NI do NIII osób normotensyjnych osiągając różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupami NI i NII, NI i NIII oraz NII i NIII przed podaniem ASA. Zastosowanie kwasu acetylosalicylowego spowodowało zatarcie istniejących uprzednio istotnych różnic pomiędzy grupami NII i NIII.

Wartości współczynnika ARR w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym były znamienne niższe niż w grupie NIII i zbliżone do wartości otrzymanych w grupie NII.



Ryc. 12. Aldosteron

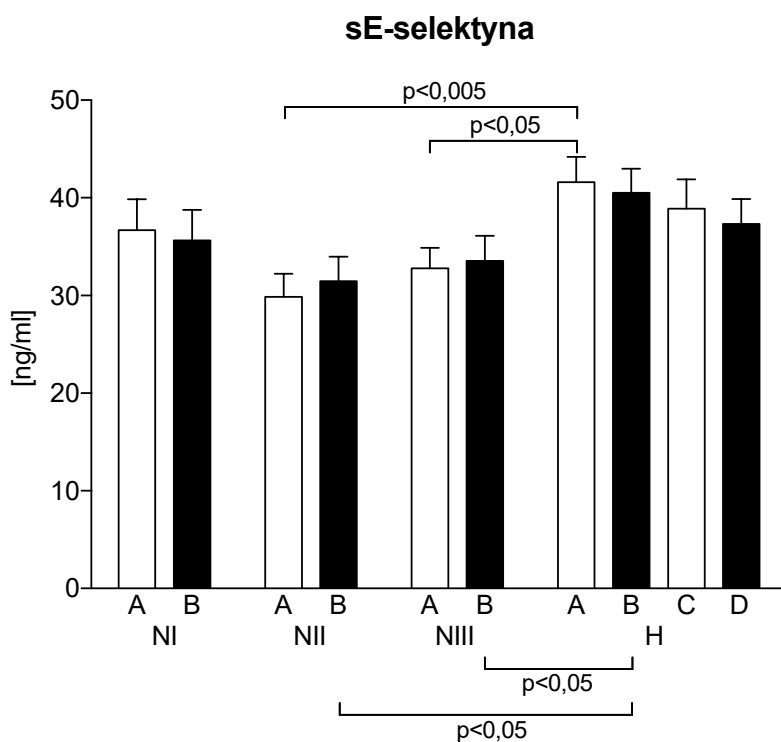
A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

* $p < 0,05$ A vs B w Grupie NIII

6. Ocena wybranych markerów funkcji zapalnej i angiogennej śródbłónka

Zaobserwowano istotnie wyższe wartości sE-selektyny u osób w grupie z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z osobami normotensyjnymi z grup NII i NIII zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po zastosowaniu kwasu acetylosalicylowego.

W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym (H) zastosowanie samego kwasu acetylosalicylowego spowodowało jedynie nieistotny spadek stężenia sE-selektyny. Wartość tego parametru nadal była istotnie wyższa niż w grupie osób normotensyjnych z II i III tercyla (NII, NIII). Zastosowanie zarówno samego walsartanu jak i obu substancji (ASA i walsartanu) spowodowało dalszy spadek sE-selektyny, powodując zatracie różnicy pomiędzy grupą z nadciśnieniem tętniczym (H) a grupami NII i NIII (Ryc. 13).

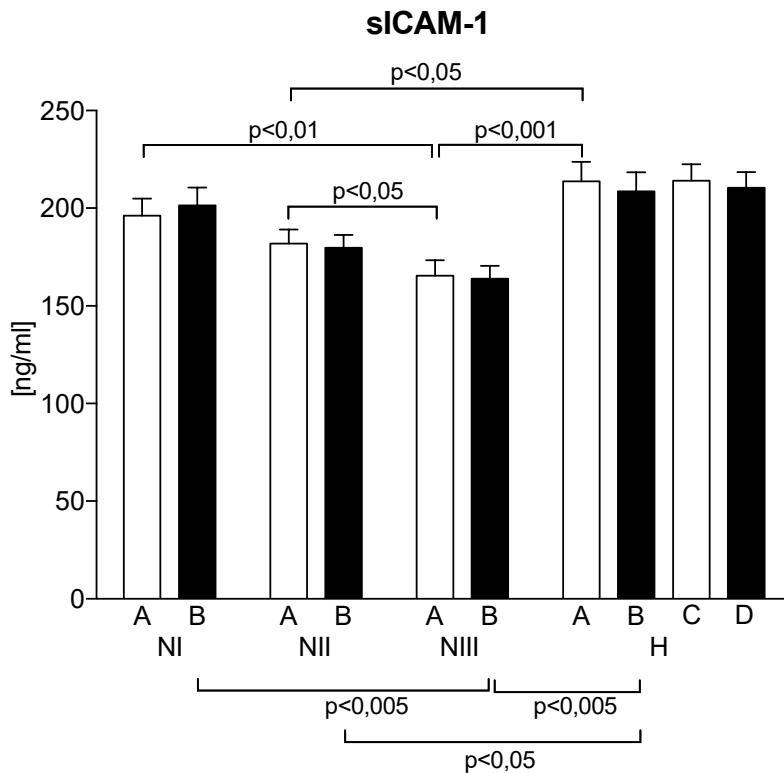


Ryc. 13. sE-selektyna

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

Stężenie sICAM-1, podobnie jak stężenia sP-selektyny, wykazywało tendencję spadkową wraz ze wzrostem wartości ARR, osiągając znamienne różnice pomiędzy grupami NIII i NI oraz NIII i NII. Po zastosowaniu ASA zaobserwowano różnice jedynie pomiędzy grupami NIII i NI.

W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym stężenie sICAM-1 było znamienne wyższe w porównaniu do grup normotensyjnych NIII i NII zarówno przed, jak i po zastosowaniu ASA. Analogicznie do sP-selektyny, stężenie sICAM-1 w grupie H pozostawało niezmiennie niezależne od rodzaju zastosowanej interwencji farmakologicznej (Ryc. 14).

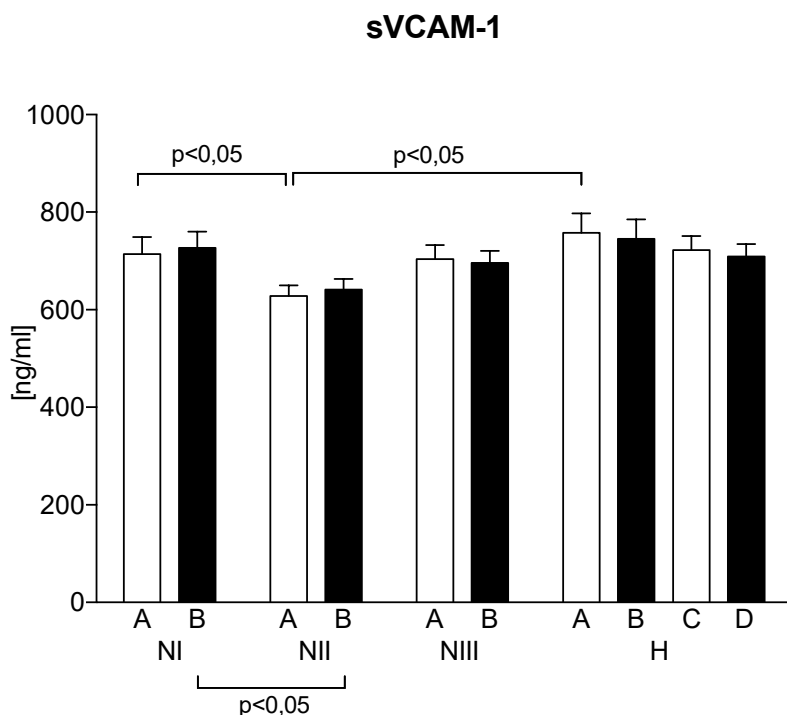


Ryc. 14. sICAM-1

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

Zaobserwowano istotnie wyższe wartości sVCAM-1 w grupie normotensyjnej z najmniej aktywowanym układem RAA (NI) oraz w grupie z nadciśnieniem tętniczym (H) w porównaniu do grupy NII. Po podaniu ASA istotna statystycznie różnica utrzymywała się pomiędzy grupą NI i NII.

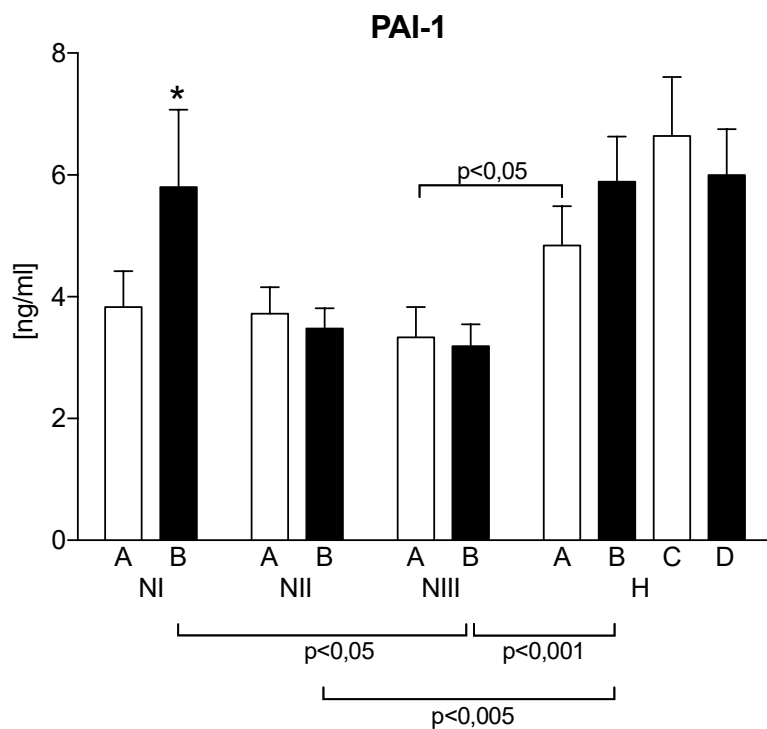
W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym nie zauważono, aby jakkolwiek interwencja terapeutyczna, stosowana w ramach protokołu badawczego, powodowała wystąpienie istotnych zmian w zakresie omawianej adhezyny (Ryc. 15).



Ryc. 15. sVCAM-1

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

W grupach osób normotensyjnych stężenie PAI-1 nie różniło się znacząco. W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wyjściowe wartości tego parametru były znacząco wyższe w porównaniu do grupy NIII. Zastosowanie ASA spowodowało istotny wzrost stężenia PAI-1 w grupie NI. Zaobserwowano także znaczące różnice pomiędzy grupą z nadciśnieniem tętniczym a grupami normotensyjnymi NIII i NII. W wyniku wzrostu stężenia PAI-1 w grupie NI po podaniu ASA uwidoczniła się znacząca różnica w stężeniu tego parametru pomiędzy grupami NIII i NI. W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym, podobnie jak w przypadku sVCAM-1, sICAM-1 i sP-selektyny, nie zauważono, aby jakakolwiek interwencja terapeutyczna spowodowała wystąpienie istotnych zmian stężenia PAI-1 (Ryc. 16).

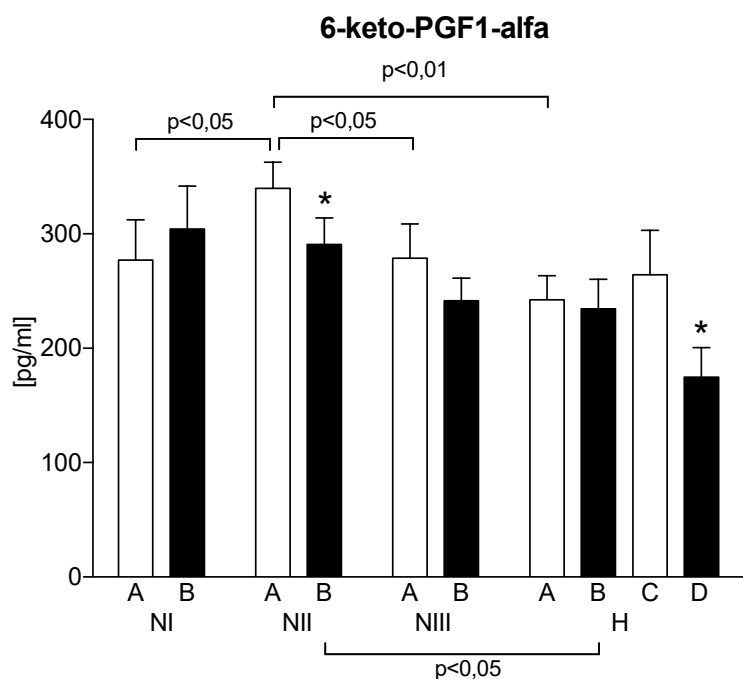


Ryc. 16. Inhibitor aktywatora plazminogenu 1

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

* $p < 0,05$ A vs B w grupie NI

Wyjściowe stężenie metabolitu PGI₂ – 6-keto-PGF₁-alfa było najwyższe w grupie normotensyjnej NII, i było ono statystycznie wyższe w porównaniu do pozostałych grup normotensyjnych (NI i NIII) oraz do grupy pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Zastosowanie ASA w wyniku zahamowania syntezy prostacykliny spowodowało statystycznie niższe stężenie jej metabolitu w grupach NII oraz w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym leczonych walsartanem. Pomimo spadku stężenia 6-keto-PGF₁-alfa w grupie NII po podaniu ASA, nadal widoczna była istotna statystycznie różnica pomiędzy tą grupą a grupą pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (Ryc. 17).

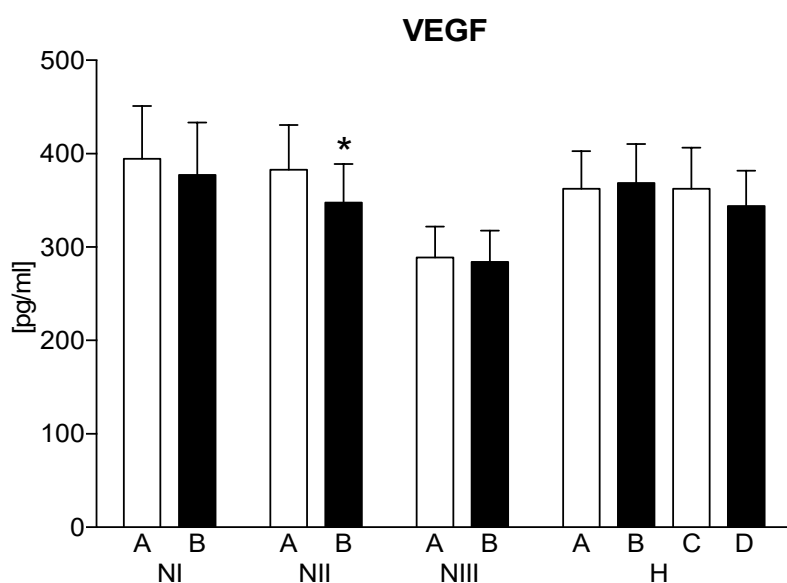


Ryc. 17. 6-keto-PGF1-alfa

A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA

* p<0,05 A vs B i C vs D w poszczególnych grupach

Stężenie VEGF zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po zastosowaniu ASA nie różniło się między grupami. Zastosowanie ASA powodowało znamienny spadek stężenia tego parametru w II teryclu ARR (NII). Monoterapia walsartanem, jak i łączne zastosowanie walsartanu z ASA w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym nie miało wpływu na stężenie VEGF (Ryc. 18).



Ryc. 18. VEGF

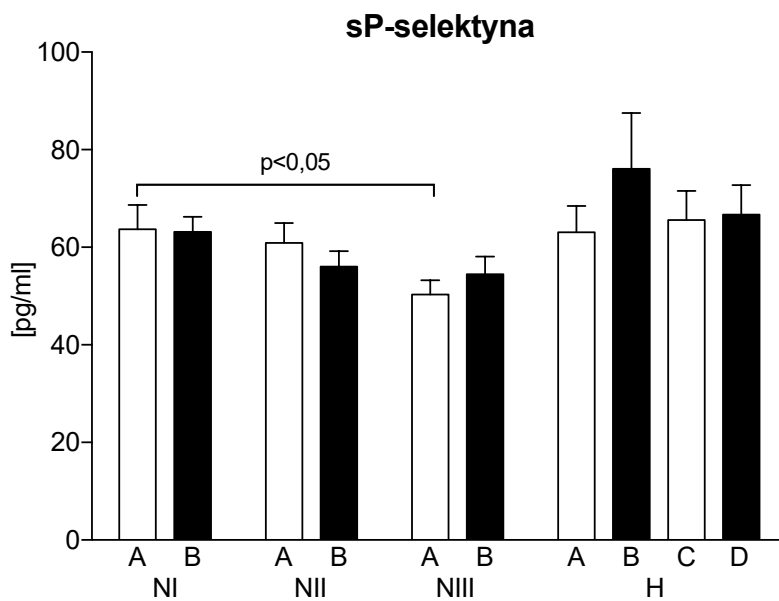
A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA

* p<0,05 A vs B w grupie NII

7. Ocena wybranych markerów aktywacji oraz testów agregacji płytek krwi

A. Markery aktywacji płytek krwi

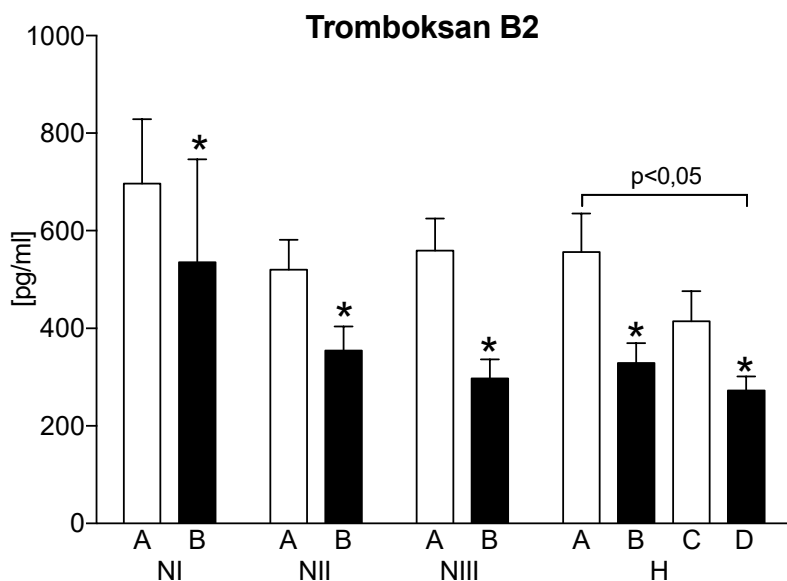
W grupie NIII stężenie sP-selektyny było najniższe. Różnica ta była znamienna w porównaniu do grupy NI. W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym (H) wyjściowe wartości tego parametru nie różniły się znamiennie w porównaniu do grup normotensyjnych. Nie wykazano wpływu walsartanu na stężenie tego parametru (Ryc. 19).



Ryc. 19. sP-selektyna

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

Wyjściowe stężenie tromboksanu B2 nie różniło się statystycznie pomiędzy grupami. Zastosowanie kwasu acetylosalicylowego spowodowało istotny spadek stężenia tromboksanu B2 w każdej z badanych grup. Terapia walsartanem wpływała na obserwowany trend spadkowy stężenia TxB2 (Ryc. 20).



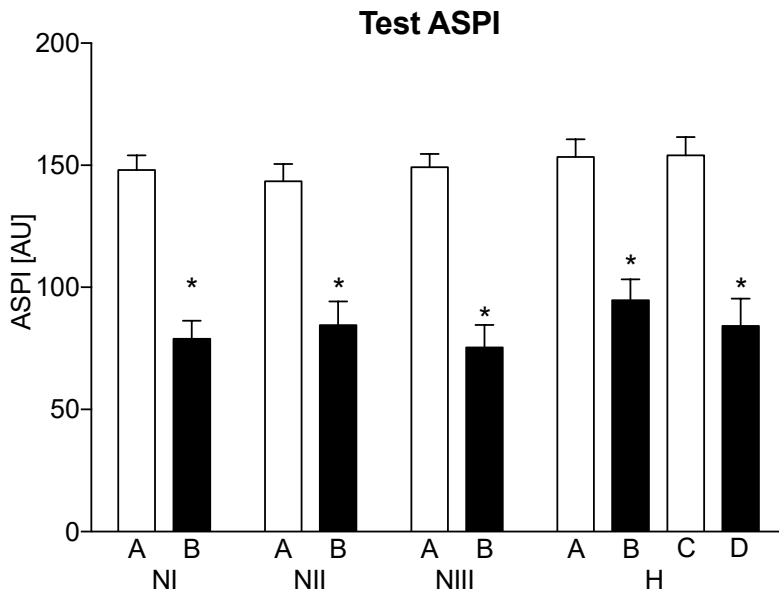
Ryc. 20. Tromboksan B2

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

* $p < 0,05$ A vs B i C vs D w poszczególnych grupach

B. Testy agregacji płytek krwi

Nie wykazano znamienych różnic w agregacji płytek zależnej od cyklooksygenazy (ASPI test) pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi w zależności od aktywności układu RAA. Wartości agregacji nie różniły się również pomiędzy grupą osób z nadciśnieniem tętniczym a poszczególnymi podgrupami osób normotensyjnych. Zastosowanie kardioprotekcyjnej dawki ASA w każdej z grup spowodowało zahamowanie agregacji płytek w podobnym stopniu. Zastosowanie walsartanu w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym nie miało istotnego wpływu na agregację zależną od cyklooksygenazy ani wyjściowo, ani po jednoczesnym podaniu ASA (Ryc. 21).

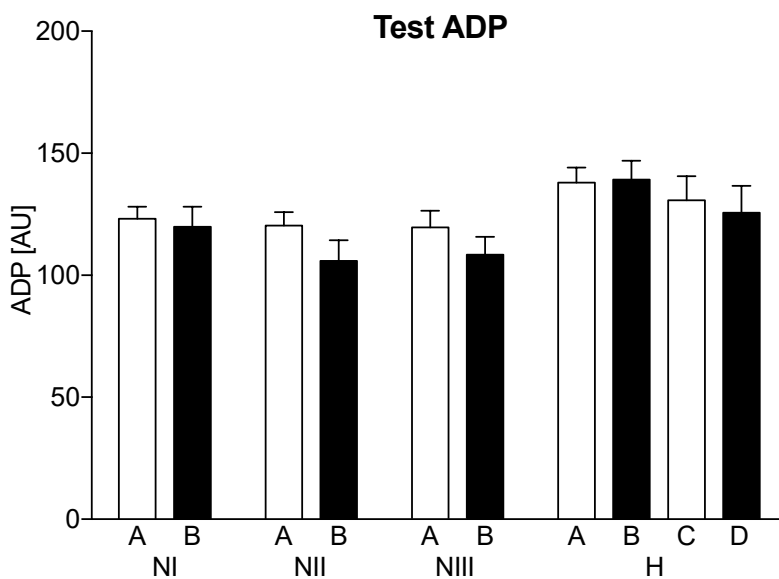


Ryc. 21. Test ASPI

A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA

*- $p < 0.05$; po zastosowaniu ASA vs. przed ASA

Nie wykazano istnienia znamienych różnic w agregacji płytek krwi zależnej od ADP pomiędzy tercylami osób normotensyjnych wyodrębnionymi w oparciu o wartości ARR. Podobnie, nie uwidoczniło różnic pomiędzy ww. grupami a grupą pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Zastosowanie ASA spowodowało nieistotny spadek agregacji zależnej od ADP w grupach osób normotensyjnych, natomiast terapia walsartanem nie wpłynęła na agregację zależną od ADP u osób z nadciśnieniem tętniczym (Ryc. 22).

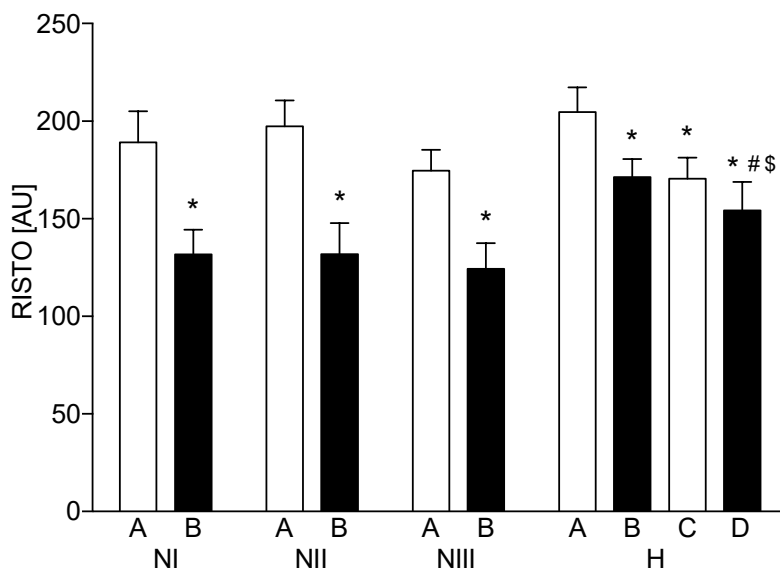


Ryc. 22. Test ADP

A - wyjściowo; B - po ASA; C - po walsartanie; D - po walsartanie + ASA

Nie wykazano znamiennej różnicy w agregacji płytek zależnej od czynnika von Willebranda w teście z ristocetyną jako aktywatorem (RISTO test) pomiędzy poszczególnymi tercylami osób normotensyjnych pogrupowanych w zależności od stopnia aktywacji układu RAA. Nie wykazano także, by osoby z nadciśnieniem tętniczym charakteryzowały się znamienne silniejszą odpowiedzią agregacyjną płytek na zadanego agonistę. Kardioprotekcyjna dawka ASA w podobnym stopniu hamowała odpowiedź agregacyjną płytek w podgrupach osób normotensyjnych. Mniejszy, choć nadal istotny, spadek agregacji obserwowano w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym. Zastosowany w tej grupie walsartan wykazał hamujący wpływ na agregację płytek zależną od czynnika von Willebranda, a także potęgował odpowiedź agregacyjną płytek na ASA. Jednak nasilenie agregacji po łącznym zastosowaniu ASA i walsartanu u osób z nadciśnieniem tętniczym nadal utrzymywało się na poziomie wyższym niż w grupie osób normotensyjnych po zastosowaniu wyłącznie ASA.

Test RISTO



Ryc. 23. Test RISTO

A – wyjściowo; B – po ASA; C – po walsartanie; D – po walsartanie + ASA

*- $p < 0.05$; po zastosowaniu ASA vs. przed ASA (vs. A)

#- $p < 0.05$; D vs B

\$ - $p < 0.05$; D vs C

V. DYSKUSJA

W niniejszej pracy zbadano wpływ walsartanu na funkcję śródbłonna u osób z nadciśnieniem tętniczym, a także przeanalizowano zależności pomiędzy aktywnością i reaktywnością układu RAA a czynnością śródbłonna – zarówno u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, jak i z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Poznanie i udokumentowanie tych powiązań, zwłaszcza u osób z nadciśnieniem tętniczym, gdzie aktywacja układu RAA jest jednym z kluczowych elementów jego patogenezy, pozwala nie tylko na pogłębienie naszej wiedzy, ale prowadzi także do optymalizacji farmakoterapii.

Aktywność układu RAA oceniono oznaczając wartość współczynnika aldosteronowo-reninowego, a następnie w oparciu o niego podzielono osoby normotensyjne na tercyle. Podział taki w metodologii badań stosuje się celem wyznaczenia rozkładu normalnego wartości zmiennej. W otrzymanych tercylach (grupach normotensyjnych) dokonywano porównań z osobami z nadciśnieniem tętniczym.

W niniejszej pracy aktywność reniny oceniono wykorzystując ARO. Obecnie częściej oznacza się osoczowe stężenie reniny (PRC; ang. plasma renin concentration). W czasie wykonywania badań ARO była jednak rutynowym parametrem wykorzystywanym w praktyce klinicznej i taką wystandaryzowaną metodą radioimmunometryczną dysponowało laboratorium szpitalne.

Ustalony protokół badawczy zakładał zatem porównanie tak wyodrębnionych grup w warunkach wyjściowych, bez jakiegokolwiek farmakoterapii. Następnie, zastosowanie dożylniej infuzji nasycającej dawki L-Argininy miało za zadanie zapewnić maksymalne wyparcie inhibitora kompetycyjnego z centrum aktywnego syntazy tlenu azotu, dając w efekcie wzrost jego produkcji zgodnie z zasadami kinetyki zerowego rzędu, uzyskując tym samym maksymalny możliwy pułap syntezy NO u danego pacjenta. Oczywiście nie determinowało to biodostępności tlenu azotu ani też - w efekcie - nie musiało skutkować maksymalizacją wazodylatacyjnej zdolności śródbłonna, ocenionej jako FMD, bowiem wciąż możliwa była degradacja tlenu azotu, m.in. przez reaktywne formy tlenu.

W związku z tym, aby ocenić, na ile cykliczne nadtlarki o relatywnie wysokim potencjalne redoks, powstające w wyniku aktywacji kaskady kwasu arachidonowego, są źródłem stresu oksydacyjnego³¹⁴, dokonano próby farmakologicznego zablokowania cyklooksygenazy-1 (COX-1) poprzez zastosowanie kardioprotekcyjnej dawki kwasu acetylosalicylowego. Wybór ASA podyktowany był m.in jego powszechnym stosowaniem w profilaktyce zdarzeń sercowo-naczyniowych. Protokół ten został zaadoptowany z pracy³¹⁵, gdzie badano również ww. zależności. Nie zastosowano tutaj indometacyny, opisywanej w pierwotnej wersji protokołu²⁷⁶ ze względu na zamysł badania funkcji płytek krwi oraz brak

jednoznacznych zestawień literaturowych dotyczących wpływu poszczególnych inhibitorów cyklooksygenazy na ich aktywację i zdolności agregacyjne. Kolejnym krokiem w niniejszej pracy była ocena wpływu farmakologicznej blokady receptora 1 dla angiotensyny II (AT1R) w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym i ocena jej wpływu na wspomniane wyżej zależności. Po dwóch tygodniach leczenia walsartanem powtórzono omówiony powyżej protokół. Uzyskane wyniki porównano następnie w szeregach czasowych (w 1., 5., 20. i 25. dniu doświadczenia) jako zmienne zależne w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym. W ten sposób dokonano oceny zmian aktywacji płytek, a także zmian fenotypu funkcji śródbłonna. Badania śródbłonna, podobnie jak w pierwszej fazie eksperymentu porównującej grupę osób z nadciśnieniem do osób normotensyjnych, obejmowały parametry biotransformacji tlenu azotu, a także wybrane elementy jego aktywacji zapalnej, angiogennej oraz markery stresu oksydacyjnego wywodzące się z kaskady kwasu arachidonowego i oceniające peroksydację lipidów oraz cytozolowy potencjał antyoksydacyjny. Uzyskany schemat eksperymentalny został stworzony na potrzeby niniejszego projektu i jest dziełem autorskim zespołu badawczego. Umożliwia on ocenę *in vivo* zależności między ww. parametrami (interakcje płytki-śródbłonek oraz ich modyfikacja poprzez powszechnie stosowaną farmakoterapię, zgodnie z aktualnymi standardami postępowania). Daje to możliwość wyciągania wniosków mających bezpośrednie implikacje kliniczne, opartych na dowodach pochodzących z zakresu nauk podstawowych, w tym patofizjologii i farmakologii eksperymentalnej, co stanowi przykład wykorzystania medycyny translacyjnej w terapii kardiologicznej.

Dalsze etapy niniejszej dyskusji prowadzone będą zgodnie z poszczególnymi podrozdziałami zaprezentowanych wyników, w celu zapewnienia ich spójnej interpretacji.

1. Charakterystyka demograficzna

Grupy badane – pacjenci z nadciśnieniem tętniczym oraz osoby normotensyjne przypisane do poszczególnych tercylów, nie różniły się między sobą w zakresie wieku, wszyscy byli płci męskiej, nie odnotowano różnic w zakresie częstości spoczynkowej akcji serca.

Różnice w zakresie średnich wartości skurczowego i średniego ciśnienia tętniczego oraz ciśnienia tętna były wtórne do kategoryzacji pacjentów (osoby z nowo rozpoznany nieleczony nadciśnieniem vs osoby normotensyjne w poszczególnych tercylach wyodrębnionych wg aktywności układu RAA). Warto zwrócić uwagę na brak różnic w zakresie rozkurczowego ciśnienia tętniczego, co pośrednio świadczyć może o zbliżonych wartościach obwodowego oporu naczyniowego. W grupie osób normotensyjnych widoczny był trend wzrostowy wartości DBP w miarę wzrostu wartości ARR, choć nie uzyskał on znamienności statystycznej, co może wynikać z niedużej liczebności poszczególnych grup. Wiadomo bowiem, że aktywacja układu RAA prowadzi do wzrostu napięcia ściany naczyń (oporu obwodowego),

a tym samym powinna przełożyć się na wzrost wartości DBP³¹⁶. Wyniki pracy potwierdzają także obserwacje Lieb i wsp.³¹⁷ wykazujące zależność pomiędzy wzrostem oporu naczyniowego a wartością rozkurczowego ciśnienia tętniczego w warunkach normotensji, natomiast w przypadku rozwinięcia nadciśnienia tętniczego zależność ta staje się mniej istotna, co tłumaczone jest aktywacją różnych mechanizmów kompensacyjnych determinujących autoregulację oporu naczyniowego. Wyniki badań Lieb i wsp. przeprowadzone były na modelu zwierzęcym (owca), a obecna praca potwierdza występowania podobnych zależności u ludzi.

Pacjenci w poszczególnych grupach nie różnili się między sobą wartościami wskaźnika masy ciała (BMI) oraz współczynnika talia-biodro (WHR), co pozwala na wyeliminowanie wpływu zmian dystrybucji tkanki tłuszczowej, występowania otyłości i nadwagi jako zmiennej zakłócającej oceniane zależności.

Szybkość propagacji fali tętna na odcinku szyjno-udowym, uznana przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC) i Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (ESH)^{148 279} za jeden z elementów oceny ryzyka sercowo-naczyniowego, który można rozważyć jako narzędzie doprecyzowujące, nie różniły się między analizowanymi grupami. Pozwala to na stwierdzenie, że osoby te nie różniły się między sobą sztywnością naczyń, a zatem i zaawansowaniem procesu miażdżycowego. Ocena szybkości propagacji fali tętna jest jedną z wielu metod wykrywania miażdżycy w jej subklinicznym stadium. Będąc obciążoną ryzykiem błędów pomiaru, pozostaje nadal przedmiotem krytyki³¹⁸. Co ciekawe, nowsze prace sugerują, że szybkość propagacji fali tętna odzwierciedlać może nie tylko sztywność naczyń powstającą wskutek odkładania soli wapnia w ich ścianie, ale też spadek elastyczności/podatności na odkształcanie pod wpływem ciśnienia wskutek zachodzącego skurczu mięśniówki gładkiej ściany naczyń (wzrost tzw. tonusu naczynia)³¹⁹. Obserwacje te dotyczą jednak mikrokrążenia i badań reaktywności drobnych naczyń oporowych zbudowanych z reaktywnej mięśniówki gładkiej i dlatego prawdopodobnie nie znalazły one odzwierciedlenia w wynikach badań sztywności dużych naczyń sprężystych przeprowadzonych w omawianej pracy. Warto byłoby zatem w dalszych etapach ocenić sztywność naczyń innymi metodami, takimi jak kardiografia impedancyjna, mogąca dodatkowo estymować wartości ciśnienia centralnego, a także obwodowa tonometria tętnicza (PAT; ang. peripheral arterial tonometry) oceniająca funkcję wazodylatacyjną śródbłonna na poziomie mikrokrążenia.

Kolejnym analizowanym aspektem w stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego w omawianych grupach była ocena wybranych parametrów biochemicznych, rutynowo stosowanych w tym celu w praktyce klinicznej. Stwierdzono tu znamienne statystycznie różnice w zakresie wartości średnich stężeń w surowicy frakcji LDL i HDL cholesterolu przy braku różnic w zakresie cholesterolu całkowitego i trójglicerydów. Pierwszym spostrzeżeniem, jakie

nasuwa się przy interpretacji tych wyników, jest fakt małej przydatności oceny stężenia tylko cholesterolu całkowitego, bez jego frakcji, w precyzyjnej ocenie ryzyka.

Wiadomo, że stężenie trójglicerydów i obwód brzucha są najprostszymi klinicznymi metodami identyfikacji pacjentów z tzw. zespołem metabolicznym. Istnienie zespołu metabolicznego, jako jednostki chorobowej, jest przedmiotem nieustających sporów i dyskusji. Brak różnic w stężeniach trójglicerydów i średnich współczynników WHR i BMI pozwala na stwierdzenie, że zespół metaboliczny nie jest tu zmienną zakłócającą przeprowadzone analizy.

Zaskakujący jest stwierdzony wzrostowy trend wartości średnich stężeń frakcji HDL cholesterolu i spadek LDL wraz ze wzrostem współczynnika aldosteronowo-reninowego (ARR). Jest to obserwacja o tyle ciekawa, że aktywacji układu RAA atrybuowane są negatywne skutki w zakresie wielu dotychczas znanych czynników ryzyka. Tymczasem, jak już wspomniano, w tej pracy, wraz ze wzrostem aktywności układu RAA wyrażonego poprzez ARR stwierdzono spadek stężenia frakcji LDL cholesterolu u osób normotensyjnych. Prawdopodobnie można to powiązać z wpływem Ang II na zwiększoną ekspresję receptora LRP1 w obrębie mięśni gładkich naczyń, co prowadzi do wewnątrzkomórkowego nagromadzenia cząsteczek LDL cholesterolu³²⁰.

Ciekawa jest również obserwacja, że najwyższe wartości LDL obecne były u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, co sugeruje istnienie powiązań pomiędzy wartościami ciśnienia tętniczego a metabolizmem lipidów. W niedawno opublikowanej pracy Pizonia i wsp.³²¹ oceniającej profil lipidowy u osób z nadciśnieniem tętniczym, wykazano wyższe wartości cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL u osób z wysokorenionowym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób z niskoreninowym nadciśnieniem tętniczym, co korelowałoby z wspomnianymi obserwacjami zależności stężenia LDL od wartości ARR. W innym badaniu także przeanalizowano zależność między hipercholesterolemią a układem RAA. Wykazano, że zmniejszenie stężenia cholesterolu całkowitego, jak i jego frakcji LDL przy użyciu statyn koreluje ze spadkiem aktywności układu RAA³²², jednakże dokładniejsze poznanie wzajemnych powiązań wymaga dalszych badań.

Kolejnym godnym uwagi aspektem jest wzrost wartości średnich hsCRP wraz ze wzrostem ARR. Wprawdzie mieściły się one w normie, jednakże w wielu opracowaniach wartości hsCRP z punktem odcięcia ponad 3,0 uznawane są za czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego^{323 324 325}. Obserwacja ta wskazywać może zatem na prozapalne działanie aldosteronu, odnotowywane także w pracach innych badaczy³²⁶. Chcąc dalej zgłębić tę zależność, warto byłoby oznaczyć stężenie Il-6, jako bardziej czułego markera zapalnego bezpośrednio powiązanego z CRP, a także wykonać próbę profilowania rodzaju reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej poprzez ocenę stężeń rozpuszczalnych form Il-1, TNF-alfa lub Il-4, Il-5 i Il-10. Osoby z samoistnym nadciśnieniem tętniczym nie cechowały się wysokimi wartościami CRP. W dostępnej literaturze opisano wiele możliwych zależności pomiędzy

wartością CRP a pierwotnym nadciśnieniem tętniczym^{327 328}, jednakże analiza badania przeprowadzonego na dużej grupie pacjentów nie wykazała istotnego powiązania³²⁹. Pierwotny hiperaldosteronizm w pracy van der Heijden i wsp. wiązał się z nasileniem reakcji zapalnej ściany naczyń, ocenionej badaniem PET-CT, co jednakże nie znalazło odzwierciedlenia w stężeniu cytokin prozapalnych w surowicy, w tym hsCRP, IL-6, sVCAM-1, sE-selektyny. Wykazano natomiast aktywację prozapalną *ex vivo* komórek immunokompetentnych³³⁰. Zależności te będą szerzej omówione w dalszej części dyskusji dotyczącej aktywacji zapalnej śródbłonna.

Odnotowano także niewielkie różnice w stężeniach glukozy na czczo między grupami, ale w żadnej z grup stężenie nie przekraczało punktu odcięcia dla normy, co wskazuje na podobną gospodarkę węglowodanową w badanych grupach. Oczywiście pełna ocena metabolizmu glukozy powinna objąć ocenę doustnego testu obciążenia glukozą, z oceną insulinemii, wyliczenia wskaźników insulinooporności i hiperinsulinizmu, jednakże nie stanowiło to celu niniejszej pracy.

Podobna obserwacja dotyczy parametrów funkcji nerek – obserwowane różnice w stężeniach kreatyniny i mocznika w surowicy oraz wartościach średnich eGFR były niewielkie i we wszystkich grupach mieściły się w zakresie norm fizjologicznych. Dzięki temu można stwierdzić, że dysfunkcja nerek nie stanowiła zmiennej zakłócającej prowadzonych analiz. Potwierdzeniem tego jest brak różnic między grupami w stężeniu symetrycznej dimetyloargininy (SDMA). Jest to uznany, czuły marker wczesnej dysfunkcji nerek, wykazujący tendencję wzrostową przy nawet niewielkim spadku filtracji kłębuszkowej³³¹.

Mimo zdywersyfikowania osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego w zależności od aktywacji układu RAA, nie odnotowano różnic w stężeniach elektrolitów. Stężenie potasu nie różniło się między podgrupami, wskazując tym samym na małą czułość tego parametru w diagnostyce subklinicznego hiperaldosteronizmu. Taka obserwacja została potwierdzona także w innych opublikowanych doniesieniach^{332 333}.

2. Funkcja wazodylatacyjna śródbłonna – FMD

Wyjściowy brak różnic w wartościach FMD między wszystkimi czterema omawianymi grupami wskazuje na porównywalną biodostępność tlenu azotu w każdej z nich. Warto zauważyć, że w drugim tercylu (NII) podanie L-Arg niezależnie od ASA powoduje nieistotny wzrost wazodylatacji indukowanej przepływem (FMD), co może sugerować, że biodostępność tlenu azotu w tej grupie ograniczona była przede wszystkim przez jego zmniejszoną syntezę i nie zależy od degradacji wynikającej z działania reaktywnych form tlenu pochodzących z kaskady kwasu arachidonowego. Wydaje się, że ASA blokując COX hamuje syntezę ROS, a tym samym zmniejsza stopień degradacji NO.

W dostępnej literaturze opisano, że zarówno podwyższony poziom aldosteronu, jak i wyższe wartości ARR, są związane z upośledzeniem funkcji śródbłonna naczyniowego mierzonej metodą FMD^{334 335}. Wyniki cytowanego badania Nishizaka i wsp. wskazują, że przewlekły hiperaldosteronizm powoduje dysfunkcję śródbłonna naczyniowego niezależnie od wartości ciśnienia tętniczego. W niniejszej pracy badano pacjentów młodych (poniżej 40 roku życia), z krótkim wywiadem chorobowym, u których raczej niewidoczne są jeszcze zmiany o charakterze włóknienia, które mogą być jedną z przyczyn zafałszowanych wyników oceny funkcji śródbłonna metodą FMD u osób starszych.

Warto zauważyć, że u osób z nadciśnieniem tętniczym nieleczonych hipotensyjnie (oznaczonych jako A i B) nie zaobserwowano dynamicznych zmian FMD w odpowiedzi na zastosowane interwencje farmakologiczne, czyli podanie L-Arg, a następnie ASA łącznie z L-Arg. Powyższe obserwacje nie potwierdzają wyników badań²⁷⁶, gdzie wzrost FMD po zastosowaniu L-Arg w warunkach wyjściowych, jak i po wcześniejszym zastosowaniu indometacyny sugerował, że biodostępność tlenu azotu oceniana metodą FMD u osób z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym jest zmniejszona zarówno wskutek zmniejszonej syntezy, jak i nasilonej degradacji NO. Warto jednak zauważyć, że obserwowane w tamtej pracy różnice dotyczyły przede wszystkim podgrupy chorych, u których wyjściowo upośledzona była wazodylatacja indukowana przepływem. Jako kolejne potencjalne wyjaśnienie tych różnic można też próbować przyjąć zastosowanie jako inhibitora cyklooksygenazy – indometacyny, wykazującej inny profil farmakodynamiczny niż zastosowany w bieżącym badaniu kwas acetylosalicylowy.

Zaskakującą obserwacją jest brak wpływu walsartanu na obserwowane zależności. Wyniki pomiarów FMD na poszczególnych etapach protokołu badawczego z L-Arginą i ASA nie różniły się w zależności od zastosowania terapii hipotensyjnej. Obserwacja ta zdaje się przeczyć istnieniu plejotropowego działania walsartanu na śródbłonek poprzez poprawę biodostępności NO, postulowanej przez niektórych badaczy³³⁶. W pracy Su KH i wsp. wykazano, że walsartan nasila syntezę tlenu azotu w komórkach śródbłonna poprzez aktywację jednego ze szlaków transdukcji sygnału poprzez kinazy aktywowanych mitogenem (MAPK; ang. mitogen-activated protein kinases) – Src/PI3K, Akt³³⁷. Dlatego też wydaje się, że w kolejnych etapach należałoby porównać poszczególne sartany (ARB) między sobą, a być może także porównać sartany z wybranymi inhibitorami konwertazy (ACEI). Wykazanie innych zależności dla ACEI mogłoby stanowić ciekawą propozycję wyjaśnienia obserwowanych w badaniach prospektywnych różnic w zakresie wpływu tych dwóch grup leków na redukcję śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, wskazując np. na istnienie plejotropowego działania wyłącznie ACEI. Obecnie atrybuowane są one m.in. do korzystnego efektu działania bradykininy, która na drodze aktywacji receptorów dla bradykininy (BK1 i BK2; ang. bradykinin receptor 1 and 2) zwiększa syntezę śródbłonkową tlenu azotu i prostacykliny.

Brak poprawy funkcji śródbłonka po zastosowaniu walsartanu obserwowany w obecnej pracy koresponduje z wynikami uzyskanymi przez M. Kosch i wsp., gdzie również nie wykazano korzystnego wpływu tego leku na funkcję śródbłonka u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym leczonych walsartanem lub metoprololem³³⁸. Podobnie w badaniu Klingbeil i wsp. nie stwierdzono poprawy funkcji śródbłonka ocenianego m.in. przez pomiar napływu tętniczego w zakresie przedramienia (metoda FBF – ang. forearm blood flow) w wyniku zastosowania walsartanu³³⁹. Podobne wyniki otrzymano w pracy oceniającej m.in. wpływ losartanu, gdzie nie potwierdzono jego korzystnej roli tego leku na funkcję śródbłonka wykorzystując metodę FMD³⁴⁰. Z drugiej strony, w literaturze można znaleźć dość liczne doniesienia o korzystnym wpływie ARB, w tym walsartanu, na śródbłonek^{336 341 342}. Wykazano w nich zwiększenie wazodylatacji zależnej od śródbłonka szczególnie w przebudowanych naczyniach tętniczych osób z nadciśnieniem tętniczym. W tym kontekście warto byłoby zwrócić uwagę na wyniki cytowanej wyżej pracy Su KH³³⁷, gdzie zaangażowanie kinaz aktywowanych mitogenem z jednej strony jest uznane za czynnik determinujący biodostępność tlenu azotu, z drugiej zaś szlak ten jest jednym z kluczowych w przekazywaniu sygnałów indukujących przerost mięśnia sercowego, mięśniówki gładkiej ścian naczyń i jej włóknienie. Poprawę funkcji śródbłonka naczyniowego ocenianego metodą FMD u pacjentów w nadciśnieniu tętniczym wykazano także dla nowszego antagonisty receptora angiotensyny – olmesartanu, co wiązano w tym przypadku ze zmniejszeniem natężenia stresu oksydacyjnego³⁴³. Warto zwrócić uwagę na to, że metodyka FMD służąca do oceny funkcji wazodylatacyjnej śródbłonka jest wprawdzie uznanym standardem, ale nie odzwierciedla reaktywności mikrokrążenia – w tym celu należałoby przeprowadzić badania innymi metodami, m.in. z pomocą obwodowej tonometrii tętniczej.

W przeciwieństwie do pacjentów z miażdżycą i hiperlipidemią, poprawa funkcji śródbłonka u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, wymaga prawdopodobnie dłuższego czasu leczenia i jest powiązana ze zmianami zachodzącymi w ścianie naczyń tętniczych jak np. przerost mięśni gładkich czy zmiana organizacji włókien kolagenu i elastyny³⁴⁴. Dlatego brak spodziewanego korzystnego działania walsartanu na śródbłonek w obecnej pracy może się wiązać z kilkoma czynnikami. Dość krótki, 14-dniowy czas stosowania walsartanu, może być niewystarczający do wykazania istotnych statycznie różnic. Ponadto, stosowana niewielka dawka walsartanu 80 mg/dobę może być zbyt niska w porównaniu do większych dawek 160-320mg/dobę stosowanych w innych badaniach. Dodatkowo, osoby biorące udział w obecnym badaniu były w młodszym wieku i bez istotnych chorób współistniejących, poza stwierdzonym nadciśnieniem tętniczym. Wyraźny korzystny efekt walsartanu w przeprowadzonych badaniach był opisywany najczęściej u osób z istotnymi chorobami układu sercowo-naczyniowego i zaawansowaną dysfunkcją śródbłonka.

3. Parametry metabolizmu NO i stresu nitrozacyjnego

Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) jest uznana za marker dysfunkcji śródbłonna. Jej podwyższony poziom opisano m.in. w pierwotnym hiperaldosteronizmie³⁴⁵. W omawianej pracy obserwowano istotnie wyższe wyjściowe wartości ADMA u osób normotensyjnych w II tercylu ARR w porównaniu do pierwszego. Różnice te są wyraźne pomiędzy pacjentami z grup normotensyjnych a pacjentami z nadciśnieniem tętniczym. Podobnie jak w obecnej pracy, wyższe stężenia ADMA w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym obserwowane były także w kilku innych pracach^{346, 347}.

Podobnie do ADMA, godne odnotowania jest występowanie znamienne niższych wartości stężeń L-Argininy i współczynnika L-Arginina/ADMA u osób z nadciśnieniem tętniczym, w porównaniu do normotensyjnych. Spadek stężenia L-Argininy i współczynnika L-Arginina/ADMA oraz wzrost ADMA przy jednocześnie zachowanym FMD u osób z nadciśnieniem tętniczym świadczyć może o mniej nasilonej degradacji tlenku azotu. Takie wnioski potwierdza niższe stężenie nitrotyrozyny w tej grupie.

Nitrotyrozyna powstaje głównie przy udziale wolnych rodników: tlenku azotu (NO^{*}) oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{*-}), które po połączeniu tworzą nadtlenooazotyn (ONOO⁻) będący silnym czynnikiem utleniającym i nitrującym. Dzięki temu nitrotyrozinę oznacza się jako marker stresu oksydacyjnego (nitrozacyjnego) oraz degradacji tlenku azotu³⁴⁸. Dlatego, spadek jej stężenia jest dość zaskakujący, gdyż u osób z nadciśnieniem tętniczym, z uwagi na potencjalny stres oksydacyjny, należało by raczej spodziewać się wyższych wartości tego parametru niż u osób normotensyjnych.

Wyniki obecnej pracy wskazują, że ani farmakologiczna blokada cyklooksygenazy, ani blokada receptora AT1 nie wpływają na wartości ADMA. Dlatego też, wydaje się, że zarówno układ RAA, jak i szlak cyklooksygenazy nie wpływają na biodostępność NO. Być może należałoby ocenić wpływ ASA i walsartanu na aktywność metylotransferazy argininowej (PRMT; ang. protein arginine methyltransferase) i dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAH; ang. dimethylarginine dimethylaminohydrolase) (enzymów odpowiedzialnych odpowiednio za syntezę i degradację ADMA), co może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań.

Warto zaznaczyć, że w dostępnej literaturze dane na temat wpływu ACEI jak i ARB na składowe metabolizmu tlenku azotu są sprzeczne i niepełne. W badaniach z wykorzystaniem enalaprilu, eprosartanu³⁴⁹, perindoprilu i losartanu³⁵⁰, a także zofenoprilu, któremu z uwagi na obecność grupy -SH przypisuje się dodatkowe właściwości przeciwutleniające³⁵¹, wykazano zmniejszenie stężenia ADMA w wyniku stosowanej terapii, natomiast w badaniu z wykorzystaniem olmesartanu³³¹ nie wykazano wpływu na wartość ADMA. Brak

spodziewanego efektu walsartanu i ASA na zmniejszenie poziomu ADMA w tej pracy może się wiązać m.in. z dość krótkim czasem terapii, jak również z niewielką zastosowaną dawką.

Ciekawe wyniki zaprezentowano w pracy Chen GF i wsp.³⁵², w której blokada receptora AT1 odpowiada za wzrost współczynnika L-Arg/ADMA poprzez ograniczenie aktywacji nerkowej i osoczowej arginazy. Dodatkowo, antagoniści receptora AT1 powodują spadek ekspresji DDAH2, wzrost DDHA1 i wzrost całkowitego DDAH w nerkach bez wpływu na osoczowe stężenie ADMA. Wydaje się, że może to być dodatkowy mechanizm nefroprotekcynnego działania sartanów, niezależny od wpływu na funkcję śródbłonna, co stanowić może dalszy kierunek badań, zwłaszcza, że wyniki tej pracy potwierdzają brak wpływu walsartanu na stężenie ADMA.

W niedawno opublikowanej analizie wykazano, że zarówno ADMA, jak SDMA są niezależnymi czynnikami ryzyka zgonu z dowolnej przyczyny oraz zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek wykazano podwyższone wartości tych parametrów. Co więcej, SDMA okazało się być czułym markerem wczesnej dysfunkcji nerek i być może okaże się lepszym jej wskaźnikiem niż dotychczas stosowane wzory CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) oraz MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)³³¹.

Warto zwrócić uwagę na istotny wzrost stężenia SDMA w odpowiedzi na zastosowanie walsartanu. Jak wiadomo, podczas stosowania ACEI i ARB dochodzi do spadku filtracji kłębuszkowej spowodowanego obniżeniem ciśnienia filtracji w kłębuszkach nerkowych wskutek rozszerzenia tętniczki odprowadzającej nefronu. Można by zatem uznać, że ten mechanizm jest odpowiedzialny za wzrost SDMA w grupie chorych leczonych walsartanem.

Z drugiej strony wykazano, że u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz w końcowym stadium przewlekłej choroby nerek poddanych hemodializie krótkotrwała terapia walsartanem w dawce 320 mg/d przez 6 tygodni spowodowała obniżenie stężenia wybranych parametrów stresu oksydacyjnego oraz ADMA i SDMA³⁵³. Podobnie w pracy Yilmaz MI i wsp. wykazano, że 3 miesięczna terapia walsartanem w dawce 160 mg/d istotnie obniżała m.in. poziom ADMA, SDMA, hsCRP podwyższa wskaźnik L-Arginina/ADMA i jednocześnie poprawiała funkcję śródbłonna zwiększając FMD³⁵⁴. Porównując do obecnego doświadczenia, w obu cytowanych powyżej pracach leczenie walsartanem trwało znacznie dłużej, lek podawany był w odpowiednio dwu- i czterokrotnie większej dawce, a u badanych pacjentów w obu doświadczeniach współwystępowała przewlekła choroba nerek.

4. Stres oksydacyjny

Obserwowano wyższe wartości MDA u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do II i III tercyla ARR po wcześniejszej blokadzie cyklooksygenazy. Taka

obserwacja sugeruje wpływ reaktywnych form tlenu pochodzących z innych źródeł niż kaskada kwasu arachidonowego, jak np. proces fosforylacji oksydacyjnej, „wybuch oddechowy” fagocytów³⁵⁵. Jest to częściowo zbieżne z pracami innych autorów, wykazującymi nasilenie peroksydacji lipidów u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób normotensyjnych^{356 357}.

Zastosowanie ASA nie spowodowało znamiennych spadków MDA w poszczególnych grupach pacjentów, sugerując brak znaczącej roli szlaku COX jako źródła reaktywnych form tlenu dla reakcji utleniania lipidów. Brak wyjściowo różnic w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym, w porównaniu do normotensyjnych, mimo wyższej średniej, wynika z odnotowanego dużego odchylenia standardowego. Parametr ten jest ponadto dość labilny, dlatego znaczące zwiększenie liczebności grup mogłoby wpłynąć korzystnie na niwelację odchyżeń standardowych. W pracy badającej pacjentów z nadciśnieniem tętniczym z lub bez współwystępującej dysfunkcji śródbłonna wykazano, że farmakologiczna blokada cykloksygenazy indometacyną powodowała spadek peroksydacji lipidów, wyrażony jako MDA we wszystkich grupach, jednak istotność statystyczna obserwowana była wyłącznie w grupach z dysfunkcją śródbłonna²⁷⁶. W obecnej pracy kryterium różnicującym było wyłącznie rozpoznanie nadciśnienie tętnicze, bez wyodrębnienia w obu grupach podgrup w oparciu o fenotyp funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna. Biorąc pod uwagę założony pierwotnie podział osób normotensyjnych na tercyle w oparciu o wartości ARR, analiza mocy testu nie pozwoliłaby na uzyskanie wiarygodnych wyników badań w dodatkowych podgrupach nawet przy podwojeniu liczby osób zrekrutowanych do projektu. Należy jednak podkreślić, że taka analiza stanowiłaby cenne uzupełnienie badań. Warto też zwrócić uwagę na fakt, że ASA i indometacyna posiadają odrębny profil działania farmakodynamicznego, wyrażający się m.in. różnym hamowaniem kaskady kwasu arachidonowego w płytkach i śródbłonnku naczyńnym.

Pomimo braku istotnych różnic w stężeniu MDA w odpowiedzi na zastosowanie ASA, o wpływie COX na układ oksydo-redukcyjny może jednak świadczyć obserwowany w dwóch wyższych tercylach wzrost indeksu tiolowego. Aktywacja COX, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu, m.in. przez peroksydację lipidów^{358 359}, może prowadzić do zmiatania glutationu, czyli tworzenia jego formy utlenionej. Dlatego, blokada tego enzymu może powodować wzrost indeksu tiolowego. Brak takiej zależności w grupie z najniższymi wartościami ARR sugeruje z kolei istnienie mechanizmu kompensacyjnego u osób z subklinicznym hiperaldosteronizmem, czyli nasilenie syntezy zredukowanego glutationu w odpowiedzi na wzrost jego utleniania, celem zachowania stałego potencjału oksydo-redukcyjnego.

Porównywalne wartości indeksu tiolowego w warunkach wyjściowych, a ich znaczący wzrost jedynie w dwóch wyższych tercylach ARR po zastosowaniu wcześniejszej blokady COX

może sugerować synergizm w działaniu pro-oksydacyjnym układu RAA i szlaku cyklooksigenazy. Wydaje się, że jest to kolejny ciekawy kierunek dalszych badań, szczególnie wobec dostępności metod interwencji farmakologicznych w oba te układy.

5. Układ RAA

Wartości stężenia aldosteronu, ARO i współczynnika ARR, stanowiły podstawy kategoryzacji pacjentów normotensyjnych, zatem ich wartości w poszczególnych grupach różniły się w sposób zamierzony, zgodny z projektem badania.

Spadek współczynnika aldosteronowo-reninowego (ARR) może wynikać zarówno ze spadku stężenia aldosteronu, jak i ze wzrostu ARO. W tym doświadczeniu zaobserwowano zarówno spadek wskaźnika ARR jak i wzrost ARO. Takie zmiany wynikają z mechanizmu działania sartanów i pośrednio zależą od upośledzenia filtracji nerkowej, dlatego były oczekiwane w odpowiedzi na zastosowanie walsartanu. Opisana powyżej zależność znajduje także swoje potwierdzenie w obserwowanym wzroście stężenia SDMA w tej grupie chorych. SDMA jest bowiem uznana za bardzo czuły i dość dobrze przebadany marker wczesnej dysfunkcji nerek odzwierciedlający nawet niewielkie zmiany filtracji kłębuszkowej przy jeszcze fizjologicznych wartościach kreatyniny i szacowanego GFR w oparciu o jej stężenie.

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym terapia walsartanem spowodowała znamienny wzrost wartości ARO jednak bez spadku stężenia aldosteronu. Wskazywać to może na spadek ciśnienia filtracji aktywujący płamkę gęstą aparatu przykłębuszkowego do uwalniania reniny. Z drugiej strony, obserwacja ta może potwierdzać małą czułość i, w związku z tym, ograniczoną przydatność pojedynczych oznaczeń stężenia aldosteronu w surowicy w ocenie aktywacji układu RAA.

Zastosowanie ASA spowodowało zatarcie istniejących uprzednio istotnych różnic pomiędzy grupami wskutek wzrostu ARO w grupie z najwyższymi wartościami ARR. Niewielki wzrost ARO w odpowiedzi na ASA świadczyć może o nieznacznym pogorszeniu perfuzji nerek po zastosowaniu COX inhibitora. Zależność ta najbardziej widoczna była w grupie z najwyższymi wartościami współczynnika ARR oraz w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym, dlatego warto w dalszych badaniach przeanalizować wpływ wyjściowej aktywacji układu RAA na spadek filtracji oraz potencjalne nefrotoksyczne działanie COX inhibitorów³⁶⁰.

Warto też zauważyć, że starsze piśmiennictwo podkreśla hamujący wpływ nawet małych, kardioprotekcyjnych dawek ASA na syntezę prostaglandyny E2 (PGE2) w nerkach, co przekłada się na spadek nerkowej utraty sodu, a to z kolei wtórnie mogłoby się wiązać ze zmianami reaktywności układu RAA³⁶¹.

6. Markery funkcji zapalnej i angiogennej śródbłónka

Obserwowane wyższe stężenie sE-selektyny u osób z nadciśnieniem tętniczym wskazuje na aktywację zapalną śródbłónka w tej grupie chorych. Co ciekawe, w grupie pacjentów normotensyjnych nie obserwowano trendu wzrostowego tego parametru wraz ze wzrostem wartości ARR. Dlatego wydaje się, że raczej obecność nadciśnienia tętniczego i wtórnie zwiększone napięcie ściany naczynia niż reakcja zapalna zależna od aldosteronu odpowiadają za aktywację zapalną śródbłónka wyrażoną wzrostem sE-selektyny. Zgodnie z danymi literaturowymi, zwiększona ekspresja niektórych wariantów polimorficznych genów dla E-selektyny jest typowa dla nadciśnienia tętniczego^{362 363}. Podwyższone stężenie tej cząsteczki adhezyjnej, jako determinanty oporu naczyniowego, koreluje dodatnio z wartościami rozkurczowego ciśnienia tętniczego^{364 365}.

Zastosowanie walsartanu u chorych z nadciśnieniem tętniczym spowodowało jedynie nieznaczny spadek stężenia tego parametru, który pogłębił się po podaniu ASA, co może sugerować synergistyczny udział obu mechanizmów, zarówno szlaku COX, jak i układu RAA w aktywacji śródbłónka. Być może wspólnym mianownikiem tych interakcji jest zwiększone generowanie reaktywnych form tlenu, co omówione już zostało we wcześniejszych częściach tej dyskusji³⁶³.

W obecnym doświadczeniu zaobserwowano, że wraz ze wzrostem aktywacji RAA spadało stężenie innej cząsteczki adhezyjnej – sICAM-1, co jest sprzeczne z doniesieniami innych autorów³⁶⁶. Wyższe wartości sICAM-1 w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym, tak jak w przypadku sE-selektyny, wskazywać mogą na aktywację zapalną śródbłónka. Włączenie walsartanu nie spowodowało żadnych zmian w stężeniu tego parametru. Podobnie też, walsartan nie wpływał na stężenie kolejnej cząsteczki adhezyjnej – sVCAM-1. W przypadku tego markera nie zaobserwowano jego ścisłych powiązań z aktywacją układu RAA. Jest to sprzeczne z wynikami badania klinicznego Val_MARC³⁶⁷, gdzie wykazano, że zastosowanie walsartanu w nadciśnieniu tętniczym, niezależnie od braku wpływu na hsCRP prowadziło do spadku stężeń sICAM-1 i sVCAM 1 we krwi. Autorzy podkreślają jednak, że wartości bezwzględne stężeń były bardzo małe i niezależne od wartości ciśnienia tętniczego. Ponadto, w badaniu tym zastosowano maksymalną, czterokrotnie wyższą dawkę leku, co także mogło przyczynić się uzyskania odmiennych wyników.

Znamiennie wyższe stężenie PAI-1 u osób z nadciśnieniem tętniczym sugeruje aktywację prozakrzepową śródbłónka w tej grupie chorych i jest to zgodne z danymi literaturowymi³⁶⁸. W bieżącym badaniu nie zaobserwowano wpływu ani walsartanu ani ASA na stężenie tego parametru. W badaniu dotyczącym nefropatii cukrzycowej, wykazano, że stosowanie walsartanu zapobiega obserwowanemu w tej grupie wzrostowi ekspresji PAI-1³⁶⁹.

Wyniki u chorych z izolowanym nadciśnieniem tętniczym mogą być jednak odmienne. Dane na ten temat są sprzeczne, a przyczyny tego upatrywane są głównie w różnych modelach eksperymentalnych³⁷⁰. Istotny wzrost PAI-1 w grupie NI wynikać może najpewniej z labilności parametru i uzyskanego w grupie dużego odchylenia standardowego. Celem weryfikacji warto byłoby powtórzyć oznaczenie na większej grupie badanej.

Stężenie 6-keto-PGF1-alfa, markera aktywacji przeciwzakrzepowej i przeciwzapalnej, było niższe u osób z nadciśnieniem tętniczym, co pośrednio może, podobnie jak w przypadku PAI-1, wskazywać na aktywację prozakrzepową w tej grupie chorych i być może wyższe ryzyko zakrzepowo-zatorowe w tej subpopulacji^{276 371 372}. Warto zauważyć również, że brak zahamowania syntezy prostacykliny (ocenianej przez oznaczenie 6-keto-PGF1-alfa) przy obserwowanym spadku stężenia tromboksanu potwierdza prawidłowość doboru dawki 75 mg ASA jako kardioprotekcyjnej, nie hamującej jeszcze śródbłonkowej, a jedynie płytkową cyklooksygenazę (obserwowany w II tercylu spadek był niewielki w wartościach bezwzględnych i na granicy istotności statystycznej). Ciekawą obserwacją jest spadek 6-keto-PGF1-alfa, czyli hamowanie śródbłonkowej cyklooksygenazy po jednoczesnym zastosowaniu ASA i walsartanu. Znaczenie tej obserwacji wymaga dalszych badań. Jak dotąd w dostępnej literaturze wykazano raczej wzrost stężenia 6-keto-PGF1-alfa po zastosowaniu walsartanu³⁷³, a niektóre prace upatrują w tym korzystne naczynioprotekcyjne mechanizmy działania tego leku³⁷⁴, np. w eksperymentalnym uszkodzeniu tętnic szyjnych³⁷³. Wykazane w omawianej rozprawie działanie plejotropowe walsartanu przejawiające się spadkiem płytkowej syntezy tromboksanu, ale też śródbłonkowej produkcji prostacykliny wskazywać może na istnienie nieswoistego, pozareceptorowego wpływu walsartanu na aktywność obu izoform cyklooksygenazy, czego nie obserwowano w przypadku stosowania wyłącznie kardioprotekcyjnej dawki ASA. Praktyczne implikacje powyższej obserwacji wymagają jednak dalszych badań, gdyż mogą definiować opisywane w literaturze niwelowanie korzystnego wpływu sartanów na układ sercowo naczyniowy przy jednoczesnym stosowaniu ASA. Ponadto, jednoczesne stosowanie walsartanu i ASA w dawce kardioprotekcyjnej powoduje utratę selektywności inhibicji COX-1.

Stężenia VEGF nie różniły się między grupami, a obserwowany w II tercylu spadek VEGF w odpowiedzi na ASA był niewielki w wartościach bezwzględnych i na granicy istotności statystycznej. Wskazuje to na brak różnic w aktywności angiogennej śródbłonka niezależnie od aktywacji układu RAA. Nie wykazano też istotnych zmian po zastosowaniu walsartanu. Taka obserwacja jest zgodna z wynikami otrzymanymi w doświadczeniu na modelu zwierzęcym, gdzie stosowanie walsartanu również nie wpływało na zmianę angiogennego potencjału śródbłonka u myszy³⁷⁵. Co ciekawe, wykazano natomiast nefroprotektoryjne działanie walsartanu w obrębie kłębuszków nerkowych poprzez miejscowy, tkankowy wzrost ekspresji VEGF odpowiadającego za korzystne, naprawcze działanie monocytów i makrofagów³⁷⁶. Osoczowe

stężenia cytokin nie odzwierciedlają ekspresji tych parametrów w tkankach, dlatego brak różnic w stężeniu osoczowej VEGF w obecnej pracy nie wyklucza występowania zmian w tkankach obserwowanych w pracach innych autorów.

7. Ocena funkcji płytek krwi

Najniższe wartości sP-selektyny w najwyższym tercylu (NIII) aktywności układu RAA sugeruje najslabszą aktywację płytek krwi w tej grupie. Taka obserwacja jest sprzeczna z licznymi doniesieniami o aktywującym wpływie układu RAA na płytki krwi³⁷⁷. W wielu pracach wykazano jednak brak zależności pomiędzy aktywacją płytek krwi i aktywnością układu RAA, a zwłaszcza jego hamowaniem przez ACEI lub ARB³⁷⁸. W tej pracy zastosowanie walsartanu w grupie osób z nadciśnieniem nie wpływało znamienne na stężenie sP-selektyny, co sugeruje brak plejotropowego działania tego leku na płytki krwi³⁷⁹. W jednej z prac, zastosowanie walsartanu w dawce 160mg/24h prowadziło do normalizacji ciśnienia tętniczego i jednocześnie ograniczało indukowany wysiłkiem wyrzut sP-selektyny, który był typowy dla osób z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym³⁸⁰. W obecnej pracy nie badano dynamicznych zmian w stężeniu sP-selektyny, a jedynie wartości spoczynkowe, co częściowo może tłumaczyć odmienne wyniki. W innym badaniu klinicznym obserwowano z kolei przeciwpłytkowe działanie walsartanu o osób z łagodnym i umiarkowanym nadciśnieniem tętniczym, ale jedynie w przypadku współistnienia cukrzycy³⁷⁹. W bieżącej pracy współwystępowanie cukrzycy i zespołu metabolicznego stanowiło kryteria wyłączenia z badania. Intencją tego badania była ocena wpływu wyłącznie nadciśnienia tętniczego „niezakłóconego” współistnieniem innych schorzeń towarzyszących.

W każdej grupie, zgodnie z oczekiwaniami obserwowano spadek stężenia tromboksanu w odpowiedzi na podanie ASA. Zahamowanie COX-1 powoduje w konsekwencji spadek stężenia tego parametru, dlatego taki wynik potwierdza współpracę pacjentów w zakresie farmakoterapii.

Do oceny agregacji płytek krwi zastosowano trzy testy oparte na metodzie agregometrii impedancyjnej zaliczane do swoistych testów hemostazy pierwotnej. W niniejszym badaniu nie wykazano aby zdolność do agregacji płytek zależnej od ADP, cyklooksygenazy i czynnika von Willebranda różniła się pomiędzy tercylami w podgrupach osób normotensyjnych, nie zależała więc od stopnia aktywacji układu RAA. Nie wykazano także, by obecność nadciśnienia tętniczego wpływała na siłę agregacji płytek krwi. Jest to sprzeczne z doniesieniami o zwiększonej aktywacji płytek i tym samym ryzyku zakrzepicy u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym^{381 382}.

Wykazano m.in., że w porównaniu z osobami zdrowymi, pacjenci z nadciśnieniem tętniczym wykazują zwiększoną aktywność czynnika płytkowego 3 oraz niższą aktywność

alfa2-antyplazminy i antytrombiny III, co wiąże się ze zwiększoną aktywnością płytek krwi i ze zmniejszoną aktywnością fibrynolityczną osocza³⁸³.

Zastosowanie ASA w grupach normotensyjnych spowodowało istotny spadek agregacji zależnej od cyklooksygenazy oraz od czynnika von Willebranda (vWF; ang. von Willebrand factor). W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym ASA spowodował zahamowanie agregacji zależnej od cyklooksygenazy w podobnym stopniu jak w podgrupach normotensyjnych. Uwidoczniono natomiast słabsze, ale nadal istotne, hamowanie agregacji zależnej od vWF. Wpływ ASA na agregację zależną od ADP był nieistotny. Zahamowanie agregacji zależnej od COX jest zgodne z powszechnie znanym mechanizmem działania ASA^{384 385}.

Działanie ASA na agregację zależną od vWF uwidoczniono też w innych pracach. Pokazano, że siła hamowania znacząco różni się pomiędzy poszczególnymi osobami a stabilizuje się dopiero po dłuższym stosowaniu ASA^{386 387}.

W niniejszej pracy wykazano hamujące działanie walsartanu jedynie na agregację płytek zależną od vWF. Lek ten nasilał również działanie antyagregacyjne zastosowanego równocześnie ASA. Warto jednak zauważyć, że nasilenie agregacji w tej grupie pacjentów było nadal większe niż w grupie osób normotensyjnych po zastosowaniu jedynie ASA. W badaniu Wu i wsp. walsartan u pacjentów powyżej 60 r.ż. z nadciśnieniem zmniejszał aktywność płytek krwi hamując ekspresję COX-2 i TxA2 poprzez szlak p38MAPK i NF-kB, a tym samym zmniejszał częstość występowania ostrych incydentów niedokrwienych mózgowych i sercowych³⁸⁸. Być może takie działanie walsartanu wynika z faktu, że w grupie pacjentów starszych obserwowano wyjściowo nasiloną agregację płytek krwi z podwyższonymi poziomami COX-2 i TxA2.

OGRANICZENIA PRACY

Badanie zostało przeprowadzone z udziałem młodych pacjentów, u których zmiany w fenotypie śródbłonna wyjściowo były niewielkie w porównaniu do osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego. Krótki wywiad chorobowy może nie odzwierciedlać w pełni całego spektrum zmian, jakie może pojawić się w śródbłonku naczyń krwionośnych w trakcie dłuższego okresu trwania choroby nadciśnieniowej.

Warto zauważyć, że u pacjentów biorących udział w badaniu nie występowały inne przewlekłe choroby takie, jak np. przewlekła choroba nerek, cukrzyca czy inne które mogłyby upośledzać funkcję śródbłonna, a które często spotykane są w praktyce klinicznej. Z drugiej strony, zapewniło to „czystość” interpretacji wyników – gdzie różnice mogły być atrybuowane wyłącznie do nadciśnienia tętniczego, bez konieczności dalszego przeprowadzania analiz statystycznych takich jak „propensity matching”, eliminując zakłócający wpływ schorzeń współwystępujących.

Zastosowana dawka walsartanu 80 mg/dobę była 2- lub 4-krotnie niższa a czas leczenia walsartanem był stosunkowo krótki w porównaniu do innych badań przedstawionych w literaturze. Rozpoczynanie leczenia małą dawką walsartanu nie jest już postępowaniem zgodnym z obowiązującymi obecnie standardami leczenia nadciśnienia tętniczego. Jednakże badania te prowadzone były zgodnie z ówczesnie obowiązującymi wytycznymi, które pozwalały na rozpoczynanie terapii jednym lekiem w małej dawce. W badaniu stosowano wyłącznie walsartan jako przedstawiciela grupy – w związku z tym ekstrapolowanie wszystkich obserwacji na całą grupę leków jest uproszczeniem, zakładającym istnienie efektu klasy. Jednakże przebadanie większej ilości leków w sposób wiarygodny w ramach niniejszego projektu byłoby znacznie utrudnione ze względu na konieczność znacznego zwiększenia liczby badanych osób, a dodatkowo konieczność skrzyżowania grup leczonych poszczególnymi sartanami celem uzyskania obiektywnych wyników.

Kolejnym ograniczeniem niniejszej pracy jest badanie jedynie poszczególnych elementów determinujących biodostępność tlenu azotu. Szczegółowa analiza osi PRMT-ADMA-DDAH z uwzględnieniem aktywności i stężeń enzymów dostarczyłaby bez wątplenia wielu dalszych ciekawych obserwacji na temat powiązań układu RAA z tlenkiem azotu, jednakże tak szeroki zakres badań nie był możliwy przy ustalonym zakresie rzeczowym projektu. Jest to na pewno zagadnienie wymagające przeprowadzenia dalszych badań, które uzupełnią naszą wiedzę w tym aspekcie.

Dodatkowo, jak wspomniano w dyskusji, ocena funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna oparta została wyłącznie na metodzie FMD, uznanej wprawdzie za złoty standard, ale nie odzwierciedlającej pełnego spektrum reaktywności naczyń, zwłaszcza na poziomie mikrokrążenia. Dlatego też w przyszłości należałoby zaprojektować i przeprowadzić badanie z zastosowaniem innych metod oceniających funkcję wazodylatacyjną śródbłonna w mikrokrążeniu i małych tętniczkach oporowych z wykorzystaniem techniki obwodowej tonometrii i/lub badania przepływowymierzem laserowym.

Podobnie w przypadku oceny funkcji płytek, oznaczenie większej liczby markerów ich aktywacji, czy też wykonanie większej liczby testów uwzględniających ekspresję antygenów powierzchniowych metodą cytometrii przepływowej oraz badanie ich właściwości reologicznych metodami Q-ballance, pozwoliłoby uzyskać pełniejszą charakterystykę czynności płytek zależną od aktywacji układu RAA, a także poszerzyłoby naszą wiedzę o potencjalne dodatkowe właściwości plejotropowe badanego leku.

VI. WNIOSKI

1. Zastosowany protokół badawczy z uwzględnieniem podaży L-Argininy, blokady cyklooksygenazy i zahamowania układu RAA nie powodował znacznych zmian w biodostępności tlenu azotu. Biorąc pod uwagę zaobserwowane jedynie różnice dostępności substratowej oraz ocenę markerów degradacji, całokształt obserwacji tłumaczyć może nasilona degradacja tlenu azotu, ale bez wzrostu stresu nitrozacyjnego u osób z nadciśnieniem tętniczym. Stosowanie walsartanu nie zaburzyło wyjściowych zależności, co nie pozwala na odrzucenie pierwszej hipotezy zero, a tym samym przeczy plejotropowemu działaniu walsartanu na biodostępność NO.

2. Wykazano działanie plejotropowe walsartanu przejawiające się zarówno spadkiem płytkowej syntezy tromboksanu, jak i produkcji śródbłonkowej prostacykliny, co pozwala na odrzucenie drugiej hipotezy zero niniejszej pracy. Wskazuje to na nieswoiste, pozareceptorowe działanie sartanu na obie izoformy cyklooksygenazy, co nie jest obserwowane w przypadku stosowania wyłącznie kardioprotekcyjnej dawki ASA. Kliniczne znaczenie tej obserwacji wymaga dalszych badań i może częściowo, na poziomie molekularnym, wyjaśniać opisywane w literaturze niwelowanie korzystnego wpływu sartanów na układ sercowo-naczyniowy przy jednoczesnym stosowaniu ASA. Z drugiej strony, dołączenie walsartanu do wcześniej stosowanego ASA powoduje utratę selektywności tego leku w hamowaniu COX-1, a to z kolei mogłoby potencjalnie niwelować jego korzystne kardioprotekcyjne działanie.

3. Wskutek terapii walsartanem u osób z samoistnym nadciśnieniem tętniczym nie zmieniły się istotnie markery stanu zapalnego. Podobnie, nie zmieniła się aktywność prozakrzepowa i angiogenna śródbłonka, co nie potwierdza plejotropowego działania leku w krótkoterminowej obserwacji na poziomie molekularnym, nie dając tym samym podstaw do odrzucenia trzeciej hipotezy zero zdefiniowanej w celach.

4. W obecnej pracy nie wykazano korzystnego działania walsartanu na aktywność wazodylatacyjną śródbłonka, nie dając tym samym podstaw do odrzucenia hipotezy zero sformułowanej w celu 4 niniejszej rozprawy. U osób normotensyjnych obserwowana większa dostępność substratowa dla eNOS nie przełożyła się na poprawę funkcji śródbłonka w ocenie czynnościowej. Ujawniono jedynie nieistotny wzrost wazodylatacji po podaniu L-Arg oraz istotnie wyższe stężenia ADMA w drugim tercylu, co może świadczyć o zaburzonej syntezie NO w tej grupie.

5. Zastosowany w badaniu walsartan hamował agregację zależną od czynnika vW i potęgował hamujące działanie podanego jednocześnie kwasu acetylosalicylowego. Powyższe obserwację pozwalają na odrzucenie hipotezy zero sformułowanej w celu 5, a tym samym na potwierdzenie modulującego działania walsartanu na agregację płytek. W niniejszej pracy nie wykazano znamiennego działania terapii walsartanem na aktywację płytek krwi, ocenioną za pomocą stężeń wybranych markerów we krwi.

Podsumowując, praca ta jest obszerną analizą potencjalnego plejotropowego działania jednego z najlepiej przebadanych w badaniach klinicznych antagonisty receptora angiotensyny AT1 w aspekcie szeroko rozumianego fenotypu funkcji śródbłonna i płytek krwi. Dokonano szczegółowej analizy powiązań czynnościowych układu RAA, szlaku cyklooksygenazy i wybranych elementów szlaku biotransformacji tlenu azotu między sobą w warunkach fizjologicznych jak i w przebiegu niepowikłanego samoistnego nadciśnienia tętniczego. Wyniki tej pracy pozwalają na wytyczenie kilku ciekawych kierunków dalszych badań. Zastosowany protokół badawczy mógłby być wykorzystany do celów badania innych leków z grupy sartanów w celu weryfikacji istnienia efektu klasy oraz dla leków hamujących układ RAA na innych piętach aktywacji celem bardziej precyzyjnego zdefiniowania zależności wykazanych w tej rozprawie. Praca ta stanowi zatem studium z zakresu medycyny translacyjnej, definiując dość precyzyjnie molekularne mechanizmy działania leku dość szeroko stosowanego w praktyce klinicznej.

VII. STRESZCZENIE

Wstęp. Układ RAA, poprzez swoją wielokierunkową aktywność, kontroluje czynność m.in. układu sercowo-naczyniowego, nerek oraz nadnerczy. Udowodniono, że klasyczny pogląd na przekazywanie sygnału za jego pośrednictwem nie odzwierciedla w pełni jego aktywności ze względu na obecność tkankowego układu RAA w licznych narządach. Na jego aktywność wpływają liczne powszechnie stosowane leki m.in. ACEI, ARB, MRA, a interakcje te mogą dalece wykraczać poza typowe spektrum ich profilu farmakodynamicznego, determinując tym samym ich plejotropowe działanie na poziomie śródbłonna naczyniowego i płytek krwi.

Cel. Zasadniczym celem niniejszej rozprawy jest ocena wpływu ARB badanych na przykładzie walsartanu (jednego z najczęściej stosowanych w praktyce klinicznej i wnikliwie przebadanych przedstawicieli tej grupy) na fenotyp funkcji śródbłonna u osób z izolowanym pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (NT). Dodatkowo, dokonano analizy powiązań pomiędzy aktywnością i reaktywnością układu RAA a profilem funkcji śródbłonna – zarówno u osób normotensyjnych, jak i chorych z NT. Oceniono także wpływ walsartanu na wybrane parametry funkcji płytek krwi w warunkach wyjściowych oraz po farmakologicznej blokadzie cyklooksygenazy przez kardioprotekcyjną dawkę kwasu acetylosalicylowego.

Materiał i metody. Do badania włączono 101 osób – 31 pacjentów między 18 a 40 rokiem życia, z rozpoznaniem izolowanym pierwotnym NT oraz 70 normotensyjnych ochotników. Osoby normotensyjne zostały podzielone na tercyle wyodrębnione w oparciu o wartości wskaźnika aldosteronowo-reninowego (ARR) na grupy N I (n: 23), N II (n: 23), N III (n: 24). Wykluczono osoby z rozpoznaną cukrzycą, wtórnym nadciśnieniem tętniczym, chorobami przebiegającymi z towarzyszącym przewlekłym procesem zapalnym, stosujące niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSAIDs) lub na nie uczulonych. Po zbadaniu pacjentów porównano stężenia podstawowych markerów (biochemicznych, stresu oksydacyjnego, aktywacji śródbłonna, aktywności prozapalnej i angiogennej), parametrów szlaku tlenu azotu oraz funkcję wazodylatacyjną śródbłonna (metodą FMD). Wyjściowo oceniono także szybkość propagacji fali tętna (PWV; ang. pulse wave velocity) jako element uzupełniający stratyfikację ryzyka sercowo-naczyniowego.

Wybrane parametry biochemiczne, aktywności układu RAA, płytek krwi i funkcji śródbłonna oceniano wyjściowo, następnie po wlewie L-Argininy, kolejno po zastosowaniu ASA, dalej – po kolejnym wlewie L-Argininy, a następnie protokół został powtórzony po 2 tygodniach terapii walsartanem – wyłącznie u chorych z NT. Uzyskane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu wykorzystując program Statistica 13.0 StatSoft®.

Wyniki. Badane grupy były zbliżone pod względem danych demograficznych. Nie wykazano istotnego wpływu stosowanego walsartanu i ASA na funkcję wazodylatacyjną śródbłonna oraz

parametry biodostępności tlenu azotu u osób z NT. W grupie pacjentów z NT terapia walsartanem spowodowała wzrost wartości ARO jednak bez spadku stężenia aldosteronu. Zastosowanie ASA skutkowało zatarciem istniejących uprzednio istotnych różnic pomiędzy grupami wskutek wzrostu ARO w grupie z najwyższymi wartościami ARR.

Wyższe wartości sICAM-1 w grupie osób z NT, tak jak przypadku sE-selektyny, wskazywać mogą na aktywację zapalną śródbłonna. Włączenie walsartanu nie spowodowało żadnych zmian w stężeniu tego parametru, podobnie jak sVCAM-1. Wyższe stężenie PAI-1 u osób z nadciśnieniem tętniczym sugeruje aktywację prozakrzepową śródbłonna, nie zaobserwowano wpływu walsartanu ani ASA na stężenie tego parametru. Stężenie 6-keto-PGF1-alfa, było niższe u osób z NT, co pośrednio może wskazywać na aktywację prozakrzepową, dodatkowo stwierdzono z wielokrotnionym spadkiem 6-keto-PGF1-alfa po jednoczesnym zastosowaniu ASA i walsartanu. Stężenia VEGF nie różniły się między grupami. W każdej grupie, zgodnie z oczekiwaniami obserwowano spadek stężenia tromboksanu w odpowiedzi na podanie ASA. Zastosowanie ASA spowodowało istotny spadek agregacji zależnej od cyklooksygenazy oraz od czynnika von Willebranda. W niniejszym badaniu nie wykazano, aby zdolność do agregacji płytek zależnej od ADP, cyklooksygenazy i czynnika von Willebranda różniła się pomiędzy tercylami w podgrupach osób normotensyjnych, nie zależała więc od stopnia aktywacji układu RAA. Nie wykazano także, by obecność NT wpływała na nasilenie agregacji płytek krwi.

Wnioski. Zastosowany protokół badawczy z uwzględnieniem podaży L-Argininy, blokady cyklooksygenazy i zahamowania układu RAA nie powodował znacznych zmian w biodostępności tlenu azotu. Biorąc pod uwagę zaobserwowane jedynie różnice dostępności substratowej oraz ocenę markerów degradacji, całokształt obserwacji tłumaczyć może nasiloną degradacją tlenu azotu, ale bez wzrostu stresu nitrozacyjnego u osób z NT. Stosowanie walsartanu nie zaburzyło wyjściowych zależności, co nie pozwala na odrzucenie pierwszej hipotezy zero, a tym samym przeczy plejotropowemu działaniu walsartanu na biodostępność NO.

Wykazano działanie plejotropowe walsartanu przejawiające się zarówno spadkiem płytkowej syntezy tromboksanu, jak i produkcji śródbłonkowej prostacykliny. Wskazuje to na nieswoiste, pozareceptorowe działanie sartanu na obie izoformy cyklooksygenazy, co nie jest obserwowane w przypadku stosowania wyłącznie kardioprotekcyjnej dawki ASA. Kliniczne znaczenie tej obserwacji wymaga dalszych badań i może częściowo, na poziomie molekularnym wyjaśniać, opisywane w literaturze niwelowanie korzystnego wpływu sartanów na układ sercowo-naczyniowy przy jednoczesnym stosowaniu ASA. Z drugiej strony, dołączenie walsartanu do wcześniej stosowanego ASA powoduje utratę selektywności tego leku w hamowaniu COX-1, a to z kolei mogłoby potencjalnie niwelować jego korzystne kardioprotekcyjne działanie.

Wskutek terapii walsartanem u osób z samoistnym NT nie zmieniły się istotnie markery stanu zapalnego. Podobnie, nie zmieniła się aktywność prozakrzepowa i angiogenna śródbłonna, co nie potwierdza plejotropowego działania leku w krótkoterminowej obserwacji na poziomie molekularnym.

Nie wykazano korzystnego działania walsartanu na aktywność wazodylatacyjną śródbłonna. U osób normotensyjnych obserwowana większa dostępność substratowa dla eNOS nie przełożyła się na poprawę funkcji śródbłonna w ocenie czynnościowej. Ujawniono jedynie nieistotny wzrost wazodylatacji po podaniu L-Arg oraz istotnie wyższe stężenia ADMA w drugim tercylu, co może świadczyć o zaburzonej syntezie NO w tej grupie.

Zastosowany w badaniu walsartan hamował agregację zależną od czynnika vW i potęgował hamujące działanie podanego jednocześnie kwasu acetylosalicylowego. Powyższe obserwacje pozwalają na potwierdzenie modulującego działania walsartanu na agregację płytek. Nie wykazano działania walsartanu na aktywację płytek krwi, ocenioną za pomocą stężeń wybranych markerów we krwi.

VIII. SUMMARY

Background. The RAA system, through its extensive activity, controls the function of e.g. cardiovascular system, kidneys and adrenal glands. As far as the literature is concerned, it has been demonstrated that the classical idea of signaling pathway does not reflect fully its action due to the expression of the tissue RAA system in multiple organs. Its action is influenced by numerous drugs commonly used in clinical practice, including ACEI, ARB, MRA, and these interactions may exceed widely the typical spectrum of their pharmacodynamic profile, thus determining their pleiotropic action at the level of vascular endothelium and platelets.

Aim. The main aim of this study was to assess the effect of ARB, tested on the example of valsartan, on endothelial function in subjects with isolated primary arterial hypertension. In addition, a relationship between the activity and reactivity of the RAA system and the endothelial function profile was analyzed in normotensive and hypertensive patients. The effect of ARB on selected parameters of platelet function at baseline and after pharmacological inhibiting of cyclooxygenase by acetylsalicylic acid was also investigated.

Material and methods. The study included 101 patients at age of 18 - 40 years, 31 subjects with diagnosed isolated primary hypertension and 70 normotensive volunteers.

Subjects with diagnosed diabetes mellitus, secondary arterial hypertension, disorders characterized by chronic inflammatory process, using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or allergic to them were excluded from this study. After physical examination, concentrations of basic markers (including biochemical, oxidative stress, endothelial activation, proinflammatory and angiogenic activity), nitric oxide metabolic pathway parameters and endothelial vasodilatory function (FMD method) were analyzed. Additionally, the pulse wave velocity (PWV) was also assessed as a complementary element to the cardiovascular risk stratification. Selected biochemical parameters of the RAA activity, platelet activity and endothelial function were evaluated at baseline, which was followed by the L-Arginine i.v. infusion. Afterwards the measurements were repeated after ASA (75mg/24h for 4 days), and then the protocol was repeated after 2 weeks of valsartan therapy - only in hypertensive subjects. Statistical analysis was performed using the Statistica 13.0 StatSoft®.

Results. The study groups were similar in terms of demographic data. There was no significant effect of valsartan and ASA on the vasodilatory endothelial function nor on the parameters of nitric oxide bioavailability in hypertensive subjects.

In the hypertensive group, treatment with valsartan increased plasma renin activity (PRA) but without a decrease in aldosterone levels. The use of ASA resulted in the blurring of the previously existing significant differences between the groups due to the increase in PRA in the group with the highest ARR values.

Higher levels of sICAM-1 in the hypertensives, and similarly of sE-selectin, may indicate inflammatory activation of the endothelium. The administration of valsartan did not result in any changes in the concentration of this parameter, as did sVCAM-1. Higher concentration of PAI-1 in hypertensive group suggests prothrombotic activation of the endothelium. No effect of valsartan or ASA on the concentration of this parameter was observed. The concentration of 6-keto-PGF1-alpha was lower in hypertensives, which may indicate prothrombotic activation; additionally, a multiple decrease of 6-keto-PGF1-alpha was found after simultaneous application of ASA and valsartan. VEGF concentration did not differ between groups. In each group, as expected, a decrease in thromboxane concentration in response to ASA was observed. The use of ASA resulted in a significant decrease in aggregation dependent on cyclooxygenase and von Willebrand factor. In this study, the ability of platelet aggregation dependent on ADP, cyclooxygenase and von Willebrand factor has not been shown to differ between tercyls in normotensive groups, so it does not depend on the degree of RAA activation. Hypertension also had no effect on platelet aggregation.

Conclusions. The pharmacological interventions conducted according to the study protocol, did not cause significant changes in the bioavailability of nitric oxide. Taking into account only the observed differences in substrate availability and the assessment of degradation markers, the overall observation may be explained by the increased degradation of nitric oxide, but without the increase in nitrosative stress in hypertensives. The use of sartan did not disturb the baseline relationship, which does not allow to reject the first hypothesis and thus contradicts the pleiotropic effect of valsartan on the NO bioavailability.

Pleiotropic action of valsartan has been shown by a decrease in the platelet thromboxane synthesis and production of endothelial prostacyclin. This indicates a non-specific and non-receptor-related action of sartan on both cyclooxygenase isoforms, which is not observed when only cardioprotective dose of ASA was used. Clinical significance of this observation requires further studies and may partially, at the molecular level, explain the elimination of the beneficial effects of sartans on the cardiovascular system with simultaneous use of ASA. On the other hand, addition of valsartan to the previously used ASA resulted in a loss of selectivity of this drug in COX-1inhibiting, and this in turn could potentially reduce its beneficial cardioprotective effects.

As a result of valsartan therapy in hypertensives, the markers of inflammation have not changed significantly. Similarly, the prothrombotic and angiogenic activity of the endothelium was stable, which does not confirm the pleiotropic action of drug in the short-term observation. No beneficial effect of valsartan on endothelial function was demonstrated. In normotensive subjects, higher substrate availability for eNOS did not improve endothelial function. Only insignificant increase in vasodilation after L-Arg administration and significantly higher ADMA

concentrations in the second tercyl were revealed, which may indicate impaired NO synthesis in this group.

The sartan used in this study inhibited vWF-dependent aggregation and increased the inhibitory effect of acetylsalicylic acid administered simultaneously. This observations allow to confirm the modulating action of valsartan on platelet aggregation. No significant effect of sartan therapy on platelet activation markers was demonstrated.

IX. ZGODA KOMISJI BIOETYKI

1

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
Uniwersytecie Medycznym
we Wrocławiu
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 212/2019

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami) w składzie:

dr hab. Jacek Daroszewski, prof. nadzw. (endokrynologia, diabetologia)
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)
mgr Luiza Müller (prawo)
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)
dr hab. Leszek Szenborn, prof. nadzw (pediatria, choroby zakaźne)
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem
prof. dr hab. Jana Kornafela (ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej,
po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.:

„Wpływ układu RAA na wybrane aspekty funkcji śródbłonka
i płytek krwi u osób zdrowych oraz z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym”

zgłoszonym przez **lek. Jakuba Jasiczka** zatrudnionego w Oddziale Kardiologicznym z Pododdziałem Intensywnego Nadzoru Kardiologicznego, Pododdziałem Leczenia Zaburzeń Rytmu Serca i Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu- Ośrodku Badawczo-Rozwojowym oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na przeprowadzenie badania w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych, Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod nadzorem dr hab. Małgorzaty Trocha **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych**.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej.

Wrocław, dnia 8 marca 2019 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KOMISJA BIOETYCZNA
przewodniczący
prof. dr hab. Jan Kornafel

X. OŚWIADCZENIE KIEROWNIKA PROJEKTU

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I KLINIKA CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH,
ZAWODOWYCH, NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO
I ONKOLOGII KLINICZNEJ
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
tel. 71 736 40 00, faks: 71 736 40 09

Wrocław, 20 października 2020 r.

Oświadczenie

Jako współautor i główny badacz zadania 19 w projekcie *Wrovasc – Zintegrowane Centrum Badań Sercowo-Naczyniowych finansowany ze środków Unii Europejskiej*, zatytułowanego „*Ocena aktywności i reaktywności układu RAA a wrażliwość na kwas acetylosalicylowy*” oświadczam, że dr hab. Małgorzata Trocha oraz lek. Jakub Jasiczek czynnie uczestniczyli w realizacji zadania na jego poszczególnych etapach, a kontrybucja intelektualna Jakuba Jasiczka w ww. zakresie rzeczowym jest w pełni wystarczająca by część wyników niniejszego zadania mogła stanowić jego monografię doktorską, opublikowaną później jako praca(e) oryginalna(e) z jego pierwszym autorstwem.

Z wyrazami szacunku,

Adrian Doroszek **dr hab. Adrian Doroszek, prof.nadzw.**
specjalista chorób wewnętrznych
kardiolog
2006310

XI. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Układ renina-angiotensyna aldosteron	7
Ryc. 2. Schemat kategoryzacji pacjentów	42
Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie protokołu badań z uwzględnieniem uczestnictwa poszczególnych grup na określonych jego etapach (A-D)	43
Ryc. 4. Podstawowe reakcje przemian enzymatycznych z udziałem glutationu	47
Ryc. 5. Obliczenie indeksu tiolowego	47
Ryc. 6. Równanie Nernsta dla glutationu	47
Ryc. 7. FMD	59
Ryc. 8. Malonylodialdehyd	62
Ryc. 9. Indeks tiolowy	62
Ryc. 10. Aktywność reninowa osocza	63
Ryc. 11. Wskaźnik aldosteronowo-reninowy	64
Ryc. 12. Aldosteron	65
Ryc. 13. sE-selektyna	66
Ryc. 14. sICAM-1	67
Ryc. 15. sVCAM-1	68
Ryc. 16. Inhibitor aktywatora plazminogenu1	69
Ryc. 17. 6-keto-PGF1-alfa	70
Ryc. 18. VEGF	70
Ryc. 19. sP-selektyna	71
Ryc. 20. Tromboksan B2	72
Ryc. 21. Test ASPI	73
Ryc. 22. Test ADP	73
Ryc. 23. Test RISTO	74

XII. SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna oraz biochemiczna stratyfikacja ryzyka sercowo-naczyniowego w porównywanych grupach.	58
Tabela 2. Porównanie parametrów biodostępności NO w zależności od etapu badania wewnątrz grup (A vs B) oraz między grupami (analiza wariancji i testy <i>post hoc</i>).	60
Tabela 3. Porównanie parametrów biodostępności tlenku azotu w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym(Grupa H).	61

XIII. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney RF, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):1092-9.
- ² Sayer G, Bhat G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin.* 2014 Feb;32(1):21-32, vii.
- ³ Stroth U, Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33 Suppl 1:S21-8; discussion S41-3.
- ⁴ Gambaryan S, Butt E, Tas P, Smolenski A, Allolio B, Walter U. Regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells by ANG II and cAMP: evidence for PKA-independent activation of CaMK by cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Mar;290(3):E423-33.
- ⁵ Carpenter CCJ, Davis JO, Ayers CR. Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion. *J Clin Invest.* 1961 Nov;40(11):2026-42.
- ⁶ Lubran MM. Role of the lung in angiotensin metabolism. *Ann Clin Lab Sci.* 1973 Jul-Aug;3(4):235-41.
- ⁷ Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Feb;34(2):355-64.
- ⁸ Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2001 Dec 6;345(23):1689-97.
- ⁹ Zhang J, Qu HY, Song J, Wei J, Jiang S, Wang L, Wang L, Buggs J, Liu R. Enhanced hemodynamic responses to angiotensin II in diabetes are associated with increased expression and activity of AT1 receptors in the afferent arteriole. *Physiol Genomics.* 2017 Oct 1;49(10):531-540.
- ¹⁰ Miura S. Angiotensin II receptor research. *Curr Pharm Des.* 2013;19(17):2979-80
- ¹¹ Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747–803.
- ¹² Cuadra AE, Shan Z, Summers C, Raizada MK. A current view of brain renin-angiotensin system: Is the (pro)renin receptor the missing link? *Pharmacol Ther.* 2010 Jan;125(1):27-38.
- ¹³ Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res.* 2015 Mar 13;116(6):960-75.
- ¹⁴ Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8258-63.
- ¹⁵ Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation.* 2003 Oct 7;108(14):1707-12.
- ¹⁶ Castrop H, Hoehnerl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C (2010) Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 90:607–673.
- ¹⁷ Kurtz A. Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:377-99.
- ¹⁸ Morales R, Watier Y, Boćskei Z. Human prorenin structure sheds light on a novel mechanism of its autoinhibition and on its nonproteolytic activation by the (pro)renin receptor. *J Mol Biol* 2012; 421:100–111.
- ¹⁹ Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx FHM, Hop WC, Schalekamp MADH (1999) Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1006–1010.
- ²⁰ Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M (1985) Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med* 312:1412–1417.
- ²¹ Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109:1417–1427.
- ²² Martini AG, Krop M, Saleh L, Garrelts IM, Danser AH. Do prorenin-synthesizing cells release active, 'open' prorenin? *J Hypertens.* 2017 Feb;35(2):330-337.
- ²³ Krop M, Lu X, Danser AH, Meima ME. The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned? *Pflugers Arch.* 2013 Jan;465(1):87-97.
- ²⁴ Lu H, Cassis LA, Kooi CW, Daugherty A. Structure and functions of angiotensinogen. *Hypertension Research.* 2016;39(7):492-500.
- ²⁵ Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res.* 1988 Jun;62(6):1259-62.
- ²⁶ Cassis LA, Saye J, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension.* 1988 Jun;11(6 Pt 2):591-6.

-
- ²⁷ Saye JA, Cassis LA, Sturgill TW, Lynch KR, Peach MJ. Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol*. 1989 Feb;256(2 Pt 1):C448-51.
- ²⁸ Phillips MI, Speakman EA, Kimura B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept*. 1993 Jan 22;43(1-2):1-20.
- ²⁹ Satou R, Gonzalez-Villalobos RA, Miyata K, Ohashi N, Katsurada A, Navar LG, Kobori H. Costimulation with angiotensin II and interleukin 6 augments angiotensinogen expression in cultured human renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jul;295(1):F283-9.
- ³⁰ Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR. Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1444-6.
- ³¹ Lu H, Wu C, Howatt DA, Balakrishnan A, Moorlegheh JJ, Chen X, Zhao M, Graham MJ, Mullick AE, Crooke RM, Feldman DL, Cassis LA, Vander Kooi CW, Daugherty A. Angiotensinogen Exerts Effects Independent of Angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Feb;36(2):256-65.
- ³² Bayes-Genis A, Barallat J, Richards AM. A Test in Context: Nephrylsin: Function, Inhibition, and Biomarker. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Aug 9;68(6):639-53.
- ³³ Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol*. 2003;4(8):225.
- ³⁴ Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem*. 1991 May 15;266(14):9002-8.
- ³⁵ Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9496-503.
- ³⁶ Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*. 1991 Aug 15;266(23):15377-83.
- ³⁷ Danilov S, Jaspard E, Churakova T, Towbin H, Savoie F, Wei L, Alhenc-Gelas F. Structure-function analysis of angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. Selective inhibition of the amino-terminal active site. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):26806-14.
- ³⁸ Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun;35(6):769-73.
- ³⁹ Nash DT. Comparative properties of angiotensin-converting enzyme inhibitors: relations with inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme and potential clinical implications. *Am J Cardiol*. 1992 Apr 2;69(10):26C-32C.
- ⁴⁰ Krassnigg F, Niederhauser H, Fink E, Frick J, Schill WB. Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. *Int J Androl*. 1989 Feb;12(1):22-8.
- ⁴¹ Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002 Mar;16(2):149-60.
- ⁴² Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):3067-75.
- ⁴³ Rogerson FM, Chai SY, Schlawe I, Murray WK, Marley PD, Mendelsohn FA. Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J Hypertens*. 1992 Jul;10(7):615-20.
- ⁴⁴ Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
- ⁴⁵ Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33238-43.
- ⁴⁶ Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Apr;23(4):177-83.
- ⁴⁷ Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):14838-43.
- ⁴⁸ Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI.

-
- Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*. 2005 Feb;26(4):369-75; discussion 322-4.
- ⁴⁹ Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6669-73.
- ⁵⁰ Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4177-85.
- ⁵¹ Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822-8.
- ⁵² Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2218-25.
- ⁵³ Garabelli PJ, Modrall JG, Penninger JM, Ferrario CM, Chappell MC. Distinct roles for angiotensin-converting enzyme 2 and carboxypeptidase A in the processing of angiotensins within the murine heart. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):613-21.
- ⁵⁴ Wang W, Patel VB, Parajuli N, Fan D, Basu R, Wang Z, Ramprasath T, Kassiri Z, Penninger JM, Oudit GY. Heterozygote loss of ACE2 is sufficient to increase the susceptibility to heart disease. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Aug;92(8):847-58.
- ⁵⁵ Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Dec;295(6):H2373-9.
- ⁵⁶ Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*. 2004 May;43(5):970-6.
- ⁵⁷ Myers BD, Deen WM, Brenner BM. Effects of norepinephrine and angiotensin II on the determinants of glomerular ultrafiltration and proximal tubule fluid reabsorption in the rat. *Circ Res*. 1975 Jul;37(1):101-10.
- ⁵⁸ Yuan BH, Robinette JB, Conger JD. Effect of angiotensin II and norepinephrine on isolated rat afferent and efferent arterioles. *Am J Physiol*. 1990 Mar;258(3 Pt 2):F741-50.
- ⁵⁹ Heyeraas KJ, Aukland K. Interlobular arterial resistance: influence of renal arterial pressure and angiotensin II. *Kidney Int*. 1987 Jun;31(6):1291-8.
- ⁶⁰ Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000 Mar;52(1):11-34.
- ⁶¹ Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010 Mar;11(1):19-31.
- ⁶² Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M. Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res*. 1986 Nov;59(5):551-5.
- ⁶³ Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. 1993 Sep;73(3):413-23.
- ⁶⁴ Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jul;29(7):1947-58.
- ⁶⁵ Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2372-8.
- ⁶⁶ Iwami K, Ashizawa N, Do YS, Graf K, Hsueh WA. Comparison of ANG II with other growth factors on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*. 1996 Jun;270(6 Pt 2):H2100-7.
- ⁶⁷ Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Mar;195(3):321-38.
- ⁶⁸ Gu J, Liu X, Wang QX, Tan HW, Guo M, Jiang WF, Zhou L. Angiotensin II increases CTGF expression via MAPKs/TGF- β 1/TRAF6 pathway in atrial fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2012 Oct 1;318(16):2105-15.
- ⁶⁹ Nakashima H, Kumagai K. Reverse-remodeling effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a canine atrial fibrillation model. *Circ J*. 2007 Dec;71(12):1977-82.
- ⁷⁰ Huang G, Xu JB, Liu JX, He Y, Nie XL, Li Q, Hu YM, Zhao SQ, Wang M, Zhang WY, Liu XR, Wu T, Arkin A, Zhang TJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers decrease the incidence of atrial fibrillation: a meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2011 Jul;41(7):719-33.
- ⁷¹ Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease: cart, horse, or both? *Circulation*. 1998 May 26;97(20):2000-2.

-
- ⁷² Toutouzas K, Colombo A, Stefanadis C. Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2004 Oct;25(19):1679-87.
- ⁷³ Krejci J, Mlejnek D, Sochorova D, Nemecek P. Inflammatory Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4087632.
- ⁷⁴ Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kübler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jul;19(7):1623-9.
- ⁷⁵ Hahn AW, Jonas U, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett*. 1994 Jun 27;347(2-3):178-80.
- ⁷⁶ Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999 Sep 14;100(11):1223-9.
- ⁷⁷ Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A. Angiotensin II and oxidative stress. *Curr Opin Cardiol*. 2007 Jul;22(4):311-5. Review.
- ⁷⁸ Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000 Jun 23;86(12):1266-72.
- ⁷⁹ Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
- ⁸⁰ Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):402-8.
- ⁸¹ Muñoz-Durango N, Vecchiola A, Gonzalez-Gomez LM, Simon F, Riedel CA, Fardella CE, Kalergis AM. Modulation of Immunity and Inflammation by the Mineralocorticoid Receptor and Aldosterone. *Biomed Res Int*. 2015;2015:652738.
- ⁸² Sola S, Mir MQ, Cheema FA, Khan-Merchant N, Menon RG, Parthasarathy S, Khan BV. Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):343-8.
- ⁸³ Dasu MR, Riosvelasco AC, Jialal I. Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*. 2009 Jan;202(1):76-83.
- ⁸⁴ Dandona P, Kumar V, Aljada A, Ghanim H, Syed T, Hofmayer D, Mohanty P, Tripathy D, Garg R. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Sep;88(9):4496-501.
- ⁸⁵ Kittana N. Angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin 1-7/1-9 system: novel promising targets for heart failure treatment. *Fundam Clin Pharmacol*. 2018 Feb;32(1):14-25.
- ⁸⁶ Tao X, Fan J, Kao G, Zhang X, Su L, Yin Y, Zrenner B. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signalling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts. *Biol Cell*. 2014 Jun;106(6):182-92.
- ⁸⁷ Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008 Sep;52(3):542-8.
- ⁸⁸ Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, Bader M, Santos RA, Guatimosim S. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension*. 2010 Jan;55(1):153-60.
- ⁸⁹ Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*. 2002 Dec;40(6):847-52.
- ⁹⁰ Ferreira AJ, Jacoby BA, Araújo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, Caliri MV, Santos RA. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb;292(2):H1113-9.
- ⁹¹ Benter IF, Yousif MH, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H666-72.
- ⁹² Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss HP, Tschöpe C, Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2008 Aug 20;590(1-3):276-80.
- ⁹³ Ma Y, Huang H, Jiang J, Wu L, Lin C, Tang A, Dai G, He J, Chen Y. AVE 0991 attenuates cardiac hypertrophy through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 10;474(4):621-625.

-
- ⁹⁴ Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, de Carvalho MH, Campagnole-Santos MJ, Souza dos Santos RA. Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 May;43(5):685-91.
- ⁹⁵ Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. Role of PGI₂ and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regul Pept*. 2005 Apr 15;127(1-3):183-9
- ⁹⁶ Simões E Silva AC, Teixeira MM. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacol Res*. 2016 May;107:154-162.
- ⁹⁷ Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 2004 Oct 1;383(Pt 1):45-51.
- ⁹⁸ Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Dec;57(4):529-39.
- ⁹⁹ Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, Apablaza F, Gonzalez L, Hernandez C, Varas M, Lopez R, Godoy I, Verdejo H, Chiong M. Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*. 2010 May;28(5):1054-64.
- ¹⁰⁰ Flores-Muñoz M, Smith NJ, Haggerty C, Milligan G, Nicklin SA. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol*. 2011 Feb 15;589(Pt 4):939-51.
- ¹⁰¹ Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, et al. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*. 2014;32(4):771-83.
- ¹⁰² Yugandhar VG, Clark MA. Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. *Peptides*. 2013 Aug;46:26-32.
- ¹⁰³ Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 May-Jun;12(4):157-62.
- ¹⁰⁴ Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11968-73.
- ¹⁰⁵ Huang BS, Ahmad M, White RA, Marc Y, Llorens-Cortes C, Leenen FH. Inhibition of brain angiotensin III attenuates sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2013 Mar 1;97(3):424-31.
- ¹⁰⁶ Park BM, Gao S, Cha SA, Park BH, Kim SH. Cardioprotective effects of angiotensin III against ischemic injury via the AT₂ receptor and K_{ATP} channels. *Physiol Rep*. 2013 Nov;1(6):e00151.
- ¹⁰⁷ Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):48623-6.
- ¹⁰⁸ Albiston AL, Fernando RN, Yeatman HR, Burns P, Ng L, Daswani D, Diwakarla S, Pham V, Chai SY. Gene knockout of insulin-regulated aminopeptidase: loss of the specific binding site for angiotensin IV and age-related deficit in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010 Jan;93(1):19-30.
- ¹⁰⁹ Stragier B, Demaegdt H, De Bundel D, Smolders I, Sarre S, Vauquelin G, Ebinger G, Michotte Y, Vanderheyden P. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Brain Res*. 2007 Feb 2;1131(1):97-105.
- ¹¹⁰ Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₄ and their functions. *Regul Pept*. 1995 Nov 10;59(3):269-95.
- ¹¹¹ Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Oct;293(4):E1092-102.
- ¹¹² Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*. 2007 Jan;17(1):19-25.
- ¹¹³ Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2515-20.
- ¹¹⁴ Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):965-73.

-
- ¹¹⁵ Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K. Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 1;350(4):1026-31.
- ¹¹⁶ Ahmad S, Wei CC, Tallaj J, Dell'Italia LJ, Moniwa N, Varagic J, Ferrario CM. Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts. *J Am Soc Hypertens*. 2013 Mar-Apr;7(2):128-36.
- ¹¹⁷ Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14:958-72.
- ¹¹⁸ Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. *New concepts. Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):366-73.
- ¹¹⁹ Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. 2017 Nov;125(Pt A):4-13.
- ¹²⁰ Hallberg M, Sumners C, Steckelings UM, Hallberg A. Small-molecule AT2 receptor agonists. *Med Res Rev*. 2018 Mar;38(2):602-624.
- ¹²¹ Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, Gaspari TA, Widdop RE. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2008 Dec;120(3):292-316.
- ¹²² Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 2004 May 18;109(19):2296-301.
- ¹²³ Li XC, Widdop RE. AT2 receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT1 receptor blockade in conscious SHR. *Br J Pharmacol*. 2004 Jul;142(5):821-30.
- ¹²⁴ Savoia C, Ebrahimian T, He Y, Gratton JP, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens*. 2006 Dec;24(12):2417-22. Erratum in: *J Hypertens*. 2007 Mar;25(3):729.
- ¹²⁵ Wang Y, Del Borgo M, Lee HW, Baraldi D, Hirmiz B, Gaspari TA, Denton KM, Aguilar MI, Samuel CS, Widdop RE. Anti-fibrotic Potential of AT(2) Receptor Agonists. *Front Pharmacol*. 2017 Aug 31;8:564.
- ¹²⁶ Auchus RJ. Classics in Cardiovascular Endocrinology: Aldosterone Action Beyond Electrolytes. *Endocrinology*. 2016 Feb;157(2):429-31.
- ¹²⁷ Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol*. 1988;50:409-26.
- ¹²⁸ Gustafsson F, Azizi M, Bauersachs J, Jaisser F, Rossignol P. Targeting the aldosterone pathway in cardiovascular disease. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 Feb;26(1):135-45.
- ¹²⁹ Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am*. 2004 Jan;88(1):19-38.
- ¹³⁰ De Mello WC. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. *Med Clin North Am*. 2017 Jan;101(1):117-127.
- ¹³¹ Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):978-84.
- ¹³² Epstein M, Oster JR, Hollenberg NK. Beta-blockers and the kidney: implications for renal function and renin release. *Physiologist*. 1985 Feb;28(1):53-63.
- ¹³³ Peskar B, Meyer DK, Tauchmann U, Hertting G. Influence of isoproterenol, hydralazine and phentolamine on the renin activity of plasma and renal cortex of rats. *Eur J Pharmacol*. 1970 Mar;9(3):394-6.
- ¹³⁴ Stocker SD, Sved AF, Stricker EM. Role of renin-angiotensin system in hypotension-evoked thirst: studies with hydralazine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Aug;279(2):R576-85.
- ¹³⁵ Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998 Apr 14;97(14):1411-20.
- ¹³⁶ Piepho RW. Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am J Health Syst Pharm*. 2000 Oct 1;57 Suppl 1:S3-7.
- ¹³⁷ Bucci M, Vellecco V, Cantalupo A, Brancaleone V, Zhou Z, Evangelista S, Calderone V, Papapetropoulos A, Cirino G. Hydrogen sulfide accounts for the peripheral vascular effects of zofenopril independently of ACE inhibition. *Cardiovasc Res*. 2014 Apr 1;102(1):138-47.
- ¹³⁸ Kitamura K, Aihara M, Osawa J, Naito S, Ikezawa Z. Sulfhydryl drug-induced eruption: a clinical and histological study. *J Dermatol*. 1990 Jan;17(1):44-51.
- ¹³⁹ Taddei S, Bortolotto L. Unraveling the Pivotal Role of Bradykinin in ACE Inhibitor Activity. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016 Oct;16(5):309-21.

-
- ¹⁴⁰ Gauthier KM, Cepura CJ, Campbell WB. ACE inhibition enhances bradykinin relaxations through nitric oxide and B1 receptor activation in bovine coronary arteries. *Biol Chem.* 2013 Sep;394(9):1205-12.
- ¹⁴¹ Izzo JL Jr, Weir MR. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011 Sep;13(9):667-75.
- ¹⁴² Flather MD, Yusuf S, Køber L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moyé L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet.* 2000 May 6;355(9215):1575-81.
- ¹⁴³ Packer M, Poole-Wilson PA, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Rydén L, Thygesen K, Uretsky BF. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation.* 1999 Dec 7;100(23):2312-8.
- ¹⁴⁴ Ljungman S, Kjekshus J, Swedberg K. Renal function in severe congestive heart failure during treatment with enalapril (the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study [CONSENSUS] Trial). *Am J Cardiol.* 1992 Aug 15;70(4):479-87.
- ¹⁴⁵ Bowling CB, Sanders PW, Allman RM, Rogers WJ, Patel K, Aban IB, Rich MW, Pitt B, White M, Bakris GC, Fonarow GC, Ahmed A. Effects of enalapril in systolic heart failure patients with and without chronic kidney disease: insights from the SOLVD Treatment trial. *Int J Cardiol.* 2013 Jul 15;167(1):151-6.
- ¹⁴⁶ Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, Garini G, Zoccali C, Salvadori M, Scolari F, Schena FP, Remuzzi G. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet.* 1999 Jul 31;354(9176):359-64.
- ¹⁴⁷ Andrzej Tykarski, Krzysztof J. Filipiak, Andrzej Januszewicz, Mieczysław Litwin, Krzysztof Narkiewicz, Aleksander Prejbisz, Danuta Ostalska-Nowicka, Krystyna Widecka, Katarzyna Kostka-Jeziorny. *Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym — 2019 rok. Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce* 2019;5(1):1-86.
- ¹⁴⁸ Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. Wytyczne ESC/ESH dotyczące postępowania w nadciśnieniu tętniczym (2018). *Kardiologia Pol.* 2019; 77(2): 71-159
- ¹⁴⁹ Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, et al. Wytyczne ESC dotyczące rozpoznawania i leczenia chorób tętnic obwodowych w 2017 roku, przygotowane we współpracy z ESVS. *Kardiologia Pol.* 2017; 75(11): 1065–1160
- ¹⁵⁰ Evans KL, Tuttle KR, Folt DA, Dawson T, Haller ST, Brewster PS, He W, Jamerson K, Dworkin LD, Cutlip DE, Murphy TP, D'Agostino RB Sr, Henrich W, Cooper CJ. Use of renin-angiotensin inhibitors in people with renal artery stenosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014 Jul;9(7):1199-206.
- ¹⁵¹ Chrysochou C, Foley RN, Young JF, Khavandi K, Cheung CM, Kalra PA. Dispelling the myth: the use of renin-angiotensin blockade in atheromatous renovascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Apr;27(4):1403-9.
- ¹⁵² Miura S, Karnik SS, Saku K. Review: angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011 Mar;12(1):1-7.
- ¹⁵³ Michel MC, Foster C, Brunner HR, Liu L. A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 2013 Mar 13;65(2):809-48.
- ¹⁵⁴ Weber MA. Interrupting the renin-angiotensin system: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in the treatment of hypertension. *Am J Hypertens.* 1999 Dec;12(12 Pt 3):189S-194S
- ¹⁵⁵ Miyazaki M, Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):391-7.
- ¹⁵⁶ Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, Wang X, Maggioni A, Budaj A, Chaitiraphan S, Dickstein K, Keltai M, Metsärinne K, Oto A, Parkhomenko A, Piegas LS, Svendsen TL, Teo KK, Yusuf S; ONTARGET investigators. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2008 Aug 16;372(9638):547-53.
- ¹⁵⁷ Julius S, Kjeldsen SE, Brunner H, Hansson L, Platt F, Ekman S, Laragh JH, McInnes G, Schork AM, Smith B, Weber M, Zanchetti A; VALUE Trial. VALUE trial: Long-term blood pressure trends in 13,449 patients with hypertension and high cardiovascular risk. *Am J Hypertens.* 2003 Jul;16(7):544-8.
- ¹⁵⁸ Cohn JN, Tognoni G; Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001 Dec 6;345(23):1667-75.
- ¹⁵⁹ Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM; Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* 2003 Nov 13;349(20):1893-906.

-
- ¹⁶⁰ Rogers JK, Pocock SJ, McMurray JJ, Granger CB, Michelson EL, Östergren J, Pfeffer MA, Solomon SD, Swedberg K, Yusuf S. Analysing recurrent hospitalizations in heart failure: a review of statistical methodology, with application to CHARM-Preserved. *Eur J Heart Fail.* 2014 Jan;16(1):33-40.
- ¹⁶¹ Cuspidi C, Muiesan ML, Valagussa L, Salvetti M, Di Biagio C, Agabiti-Rosei E, Magnani B, Zanchetti A; CATCH investigators. Comparative effects of candesartan and enalapril on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension: the candesartan assessment in the treatment of cardiac hypertrophy (CATCH) study. *J Hypertens.* 2002 Nov;20(11):2293-300.
- ¹⁶² Abraham HM, White CM, White WB. The comparative efficacy and safety of the angiotensin receptor blockers in the management of hypertension and other cardiovascular diseases. *Drug Saf.* 2015 Jan;38(1):33-54.
- ¹⁶³ Barnett AH. Preventing renal complications in diabetic patients: the Diabetics Exposed to Telmisartan And enalapril (DETAIL) study. *Acta Diabetol.* 2005 Apr;42 Suppl 1:S42-9.
- ¹⁶⁴ NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, Haffner SM, i wsp. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2010 Apr 22;362(16):1477-90.
- ¹⁶⁵ McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR; PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):993-1004.
- ¹⁶⁶ Singh JSS, Burrell LM, Cherif M, Squire IB, Clark AL, Lang CC. Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart.* 2017 Oct;103(20):1569-1577.
- ¹⁶⁷ Talari G, Talari P, Sweigart J, Ahmed S. Rare case of losartan-induced cough complicated by rectus sheath haematoma: in a patient on rivaroxaban therapy. *BMJ Case Rep.* 2016 Dec 23;2016. pii: bcr2016217801.
- ¹⁶⁸ Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2):349-55.
- ¹⁶⁹ Tesch GH, Young MJ. Mineralocorticoid Receptor Signaling as a Therapeutic Target for Renal and Cardiac Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017 May 29;8:313.
- ¹⁷⁰ Corvol P, Michaud A, Menard J, Freifeld M, Mahoudeau J. Antiandrogenic effect of spiro lactones: mechanism of action. *Endocrinology.* 1975 Jul;97(1):52-8.
- ¹⁷¹ Lainscak M, Pelliccia F, Rosano G, Vitale C, Schiariti M, Greco C, Speziale G, Gaudio C. Safety profile of mineralocorticoid receptor antagonists: Spironolactone and eplerenone. *Int J Cardiol.* 2015 Dec 1;200:25-9.
- ¹⁷² Dasgupta A, Johnson MJ, Sengupta TK. Clinically insignificant negative interferences of spironolactone, potassium canrenoate, and their common metabolite canrenone in new dimension vista LOCI digoxin immunoassay. *J Clin Lab Anal.* 2012 May;26(3):143-7.
- ¹⁷³ Hu X, Li S, McMahan EG, Lala DS, Rudolph AE. Molecular mechanisms of mineralocorticoid receptor antagonism by eplerenone. *Mini Rev Med Chem.* 2005 Aug;5(8):709-18.
- ¹⁷⁴ Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol.* 2008 Apr;31(4):153-8.
- ¹⁷⁵ Fuller PJ, Yang J, Young MJ. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Coregulators as mediators of mineralocorticoid receptor signalling diversity. *J Endocrinol.* 2017 Jul;234(1):T23-T34.
- ¹⁷⁶ Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol.* 2010 May;6(5):261-73.
- ¹⁷⁷ Bianchi S, Batini V, Bigazzi R. The renal effects of mineralocorticoid receptor antagonists. *Int J Cardiol.* 2015 Dec 1;200:20-4.
- ¹⁷⁸ Pitt B. Heart failure: the role for mineralocorticoid receptor antagonists. *Swiss Med Wkly.* 2014 May 20;144:w13959.
- ¹⁷⁹ McMurray JJ, O'Connor C. Lessons from the TOPCAT trial. *N Engl J Med.* 2014 Apr 10;370(15):1453-4.
- ¹⁸⁰ Pandey A, Garg S, Matulevicius SA, Shah AM, Garg J, Drazner MH, Amin A, Berry JD, Marwick TH, Marso SP, de Lemos JA, Kumbhani DJ. Effect of Mineralocorticoid Receptor Antagonists on Cardiac Structure and Function in Patients With Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Am Heart Assoc.* 2015 Oct 12;4(10):e002137.
- ¹⁸¹ Ando K, Ohtsu H, Uchida S, Kaname S, Arakawa Y, Fujita T; EVALUATE Study Group. Anti-albuminuric effect of the aldosterone blocker eplerenone in non-diabetic hypertensive patients with albuminuria: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Dec;2(12):944-53.
- ¹⁸² Pei H, Wang W, Zhao D, Wang L, Su GH, Zhao Z. The use of a novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone for the treatment of chronic heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018 Apr;97(16):e0254.

- ¹⁸³ Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Salsbury J, Mackenzie I, Padmanabhan S, Brown MJ; British Hypertension Society's PATHWAY Studies Group. Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet*. 2015 Nov 21;386(10008):2059-2068.
- ¹⁸⁴ Calhoun DA, White WB. Effectiveness of the selective aldosterone blocker, eplerenone, in patients with resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2008 Nov-Dec;2(6):462-8.
- ¹⁸⁵ Pratt-Ubunama MN, Nishizaka MK, Boedefeld RL, Cofield SS, Harding SM, Calhoun DA. Plasma aldosterone is related to severity of obstructive sleep apnea in subjects with resistant hypertension. *Chest*. 2007 Feb;131(2):453-9.
- ¹⁸⁶ Hundemer GL, Curhan GC, Yozamp N, Wang M, Vaidya A. Cardiometabolic outcomes and mortality in medically treated primary aldosteronism: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018 Jan;6(1):51-59.
- ¹⁸⁷ Fisher ND, Hollenberg NK. Is there a future for renin inhibitors? *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 Mar;10(3):417-26.
- ¹⁸⁸ Bjerre HL, Christensen JB, Buus NH, Simonsen U, Su J. The role of aliskiren in the management of hypertension and major cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Hum Hypertens*. 2019 Nov;33(11):795-806.
- ¹⁸⁹ Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):1269-1324.
- ¹⁹⁰ Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987 Mar;18(3):234-9.
- ¹⁹¹ Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527-61.
- ¹⁹² Willms-Kretschmer K, Flax MH, Cotran RS. The fine structure of the vascular response in hapten-specific delayed hypersensitivity and contact dermatitis. *Lab Invest*. 1967; 17:334-49
- ¹⁹³ Cotran RS, Pober JS (1988) Endothelial activation: its role in inflammatory and immune reactions. In: Simionescu N, Simionescu M (eds) *Endothelial cell biology*. Plenum, New York, pp 335-347
- ¹⁹⁴ Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007 Mar 13;115(10):1285-95.
- ¹⁹⁵ Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Jun;90(6):713-38.
- ¹⁹⁶ Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):941-50.
- ¹⁹⁷ Fleissner F, Thum T. Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Aug 15;15(4):933-48.
- ¹⁹⁸ Pant S, Deshmukh A, Gurusurthy GS, Pothineni NV, Watts TE, Romeo F, Mehta JL. Inflammation and atherosclerosis--revisited. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014 Mar;19(2):170-8.
- ¹⁹⁹ Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int*. 2014;2014:406960.
- ²⁰⁰ Lubrano V, Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc Res*. 2016 May;105:132-40.
- ²⁰¹ Arjuman A, Chandra NC. Differential pro-inflammatory responses of TNF- α receptors (TNFR1 and TNFR2) on LOX-1 signalling. *Mol Biol Rep*. 2015 Jun;42(6):1039-47.
- ²⁰² Ni CW, Wang DL, Lien SC, Cheng JJ, Chao YJ, Hsieh HJ. Activation of PKC-epsilon and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide. *J Cell Physiol*. 2003 Jun;195(3):428-34.
- ²⁰³ Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology*. 2012 May;217(5):492-502.
- ²⁰⁴ Maroney SA, Mast AE. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfus Apher Sci*. 2008 Feb;38(1):9-14.
- ²⁰⁵ Bombeli T, Mueller M, Haerberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost*. 1997 Mar;77(3):408-23.

-
- ²⁰⁶ Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3765-77.
- ²⁰⁷ Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S36-41.
- ²⁰⁸ Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med (Berl)*. 2004 Oct;82(10):671-7.
- ²⁰⁹ Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Feb;25(1):1-19.
- ²¹⁰ Mac Gabhann F, Qutub AA, Annex BH, Popel AS. Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Nov-Dec;2(6):694-707.
- ²¹¹ Guyot M, Hilmi C, Ambrosetti D, Merlano M, Lo Nigro C, Durivault J, Grépin R, Pagès G. Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(6):9174-9188.
- ²¹² O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:471-82.
- ²¹³ Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19(1-2):97-107
- ²¹⁴ Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Söhndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinás M, Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29461-7.
- ²¹⁵ Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu SH, Laham RJ, Bianchi C, Sellke FW. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Feb;296(2):H428-34.
- ²¹⁶ Chang PC, Wu HL, Lin HC, Wang KC, Shi GY. Human plasminogen kringle 1-5 reduces atherosclerosis and neointima formation in mice by suppressing the inflammatory signaling pathway. *J Thromb Haemost*. 2010 Jan;8(1):194-201.
- ²¹⁷ Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Bardachenko NI, Grinenko TV, Kuryata OV. Statin treatment decreases serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. *Life Sci*. 2015 Aug 1;134:22-9.
- ²¹⁸ Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016 May;248:97-109.
- ²¹⁹ Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
- ²²⁰ Kubli S, Waeber B, Dalle-Ave A, Feihl F. Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 Nov;36(5):640-8.
- ²²¹ Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp*. 2010 Oct 15;(44). pii: 2167.
- ²²² Neves MF, Amiri F, Virdis A, Diep QN, Schiffrin EL; CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Nov;83(11):999-1006.
- ²²³ Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol*. 1995 Jul 18;290(2):69-73
- ²²⁴ Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, del Campo L, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 2008 Jul;154(6):1225-35.
- ²²⁵ Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005 Jul;46(1):107-12.
- ²²⁶ Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004 Sep;56(3):387-437.
- ²²⁷ Chiang N, Serhan CN. Aspirin triggers formation of anti-inflammatory mediators: New mechanism for an old drug. *Discov Med*. 2004 Dec;4(24):470-5.
- ²²⁸ Nüsing R, Fehr PM, Gudat F, Kemeny E, Mihatsch MJ, Ullrich V. The localization of thromboxane synthase in normal and pathological human kidney tissue using a monoclonal antibody Tü 300. *Virchows Arch*. 1994;424(1):69-74.
- ²²⁹ Coccheri S. Antiplatelet drugs--do we need new options? With a reappraisal of direct thromboxane inhibitors. *Drugs*. 2010 May 7;70(7):887-908.

-
- ²³⁰ Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox KM, Hennerici MG, Mattle HP, Rothwell PM, de Cordoüe A, Fratacci MD; PERFORM Study Investigators. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*. 2011 Jun 11;377(9782):2013-22.
- ²³¹ Celestini A, Violi F. A review of picotamide in the reduction of cardiovascular events in diabetic patients. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(1):93-8.
- ²³² Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S, Naseem KM. cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood*. 2013 Nov 14;122(20):3533-45.
- ²³³ Davis K, Ginsburg R, Bristow MR, Harrison DC. Biphasic action of prostacyclin in the human coronary artery (Abstract). *Clin Res* 1980; 28(2); 165A.
- ²³⁴ Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 2005 Nov;146(6):834-45.
- ²³⁵ Zhao YJ, Wang J, Tod ML, Rubin LJ, Yuan XJ. Pulmonary vasoconstrictor effects of prostacyclin in rats: potential role of thromboxane receptors. *J Appl Physiol* (1985). 1996 Dec;81(6):2595-603.
- ²³⁶ Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):716-20
- ²³⁷ Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF Jr, Morrow JD, Vita JA. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2003 Sep;42(3):310-5.
- ²³⁸ Hermann M, Camici G, Fratton A, Hurlimann D, Tanner FC, Hellermann JP, Fiedler M, Thiery J, Neidhart M, Gay RE, Gay S, Lüscher TF, Ruschitzka F. Differential effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on endothelial function in salt-induced hypertension. *Circulation*. 2003 Nov 11;108(19):2308-11.
- ²³⁹ Verma S, Raj SR, Shewchuk L, Mather KJ, Anderson TJ. Cyclooxygenase-2 blockade does not impair endothelial vasodilator function in healthy volunteers: randomized evaluation of rofecoxib versus naproxen on endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2001 Dec 11;104(24):2879-82.
- ²⁴⁰ Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3579-94.
- ²⁴¹ Steven S, Münzel T, Daiber A. Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2015 Aug 5;16(8):18185-223.
- ²⁴² Becker L, Prado K, Foppa M, Martinelli N, Aguiar C, Furian T, Clausell N, Rohde LE. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. *J Crit Care*. 2012 Jun;27(3):316.e9-14.
- ²⁴³ Ridker PM. Closing the loop on inflammation and atherothrombosis: why perform the CIRT and CANTOS trials? *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2013;124:174-90.
- ²⁴⁴ Craige SM, Kant S, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in endothelial function - from disease to adaptation - *Circ J*. 2015;79(6):1145-55.
- ²⁴⁵ Salonen RM, Nyssönen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Lakka HM, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE; Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention Study. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation*. 2003 Feb 25;107(7):947-53.
- ²⁴⁶ McFadyen JD, Kaplan ZS. Platelets are not just for clots. *Transfus Med Rev*. 2015 Apr;29(2):110-9.
- ²⁴⁷ Linden MD. Platelet physiology. *Methods Mol Biol*. 2013;992:13-30. doi: 10.1007/978-1-62703-339-8_2.
- ²⁴⁸ Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA. Platelets, endothelium, and vessel injury. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1985;13:235-45.
- ²⁴⁹ Lograno MD, Mosconi C, Marangoni F, Medini L, Grassi G, Galli C. Vascular eicosanoids and platelet-aortic wall interactions in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1991 Sep 24;202(3):311-6.
- ²⁵⁰ Twarock S, Bagheri S, Bagheri S, Hohlfeld T. Platelet-vessel wall interactions and drug effects. *Pharmacol Ther*. 2016 Nov;167:74-84.
- ²⁵¹ Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul;9 Suppl 1:56-65.

-
- ²⁵² Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature*. 1969 Apr 5;222(5188):33-6.
- ²⁵³ Saba SR, Mason RG. Effects of platelets and certain platelet components on growth of cultured human endothelial cells. *Thromb Res*. 1975 Nov;7(5):807-12.
- ²⁵⁴ Maca RD, Fry GL, Hoak JC, Loh PT. The effects of intact platelets on cultured human endothelial cells. *Thromb Res*. 1977 Dec;11(6):715-27.
- ²⁵⁵ Haselton FR, Alexander JS. Platelets and a platelet-released factor enhance endothelial barrier. *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 1):L670-8.
- ²⁵⁶ Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):259-69.
- ²⁵⁷ Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880-5.
- ²⁵⁸ Grover SP, Mackman N. Neutrophils, NETs, and immunothrombosis. *Blood*. 2018 Sep 27;132(13):1360-1361.
- ²⁵⁹ Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):463-9.
- ²⁶⁰ Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012 Jul;122(7):2661-71.
- ²⁶¹ Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012 Jan;10(1):136-44.
- ²⁶² Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, Scadden DT, Wagner DD. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 7;109(32):13076-81.
- ²⁶³ Eisinger F, Patzelt J, Langer HF. The Platelet Response to Tissue Injury. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Nov 13;5:317.
- ²⁶⁴ Rossaint J, Margraf A, Zarbock A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Nov 20;9:2712.
- ²⁶⁵ Verheul HM, Hoekman K, Luyckx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec;3(12 Pt 1):2187-90.
- ²⁶⁶ Radziwon-Balicka A, Ramer C, Moncada de la Rosa C, Zielnik-Drabik B, Jurasz P. Angiostatin inhibits endothelial MMP-2 and MMP-14 expression: a hypoxia specific mechanism of action. *Vascul Pharmacol*. 2013 Apr;58(4):280-91.
- ²⁶⁷ Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet*. 1998 Nov 28;352(9142):1775-7.
- ²⁶⁸ Desjarlais M, Dussault S, Dhahri W, Mathieu R, Rivard A. Direct renin inhibition with aliskiren improves ischemia-induced neovascularization: blood pressure-independent effect. *Atherosclerosis*. 2015 Oct;242(2):450-60.
- ²⁶⁹ Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P, Rivard A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Aug;41(2):275-84.
- ²⁷⁰ Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation*. 1993 Jun;87(6):1969-73.
- ²⁷¹ Brown NJ, Bradford J, Wang Z, Lea W, Ma L, Ma J, Vaughan DE, Fogo AB. Modulation of angiotensin II and norepinephrine-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression by AT1a receptor deficiency. *Kidney Int*. 2007 Jul;72(1):72-81.
- ²⁷² Elokda H, Abou-Gharbia M, Hennan JK, McFarlane G, Mugford CP, Krishnamurthy G, Crandall DL. Tiplaxtinin, a novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: design, synthesis, and preclinical characterization. *J Med Chem*. 2004 Jul 1;47(14):3491-4.
- ²⁷³ Jung RG, Simard T, Labinaz A, Ramirez FD, Di Santo P, Motazedian P, Rochman R, Gaudet C, Faraz MA, Beanlands RSB, Hibbert B. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in coronary pathophysiology. *Thromb Res*. 2018 Apr;164:54-62.
- ²⁷⁴ Gebhard S, Steil L, Peters B, Gesell-Salazar M, Hammer E, Kuttler B, Clemetson KJ, Scharf C, Peters J, Völker U, Rettig R, Greinacher A. Angiotensin II-dependent hypertension causes reversible changes in the platelet proteome. *J Hypertens*. 2011 Nov;29(11):2126-37.

-
- ²⁷⁵ Schwemmer M, Sommer O, Bassenge E. Angiotensin receptor blocker losartan suppresses platelet activity by interfering with thromboxane signaling. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2001 Jul;15(4):301-7.
- ²⁷⁶ Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A. Role of the nitric oxide metabolic pathway and prostanoids in the pathogenesis of endothelial dysfunction and essential hypertension in young men. *Hypertens Res.* 2011 Jan;34(1):79-86.
- ²⁷⁷ Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FU, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T; Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens.* 2012 Mar;30(3):445-8.
- ²⁷⁸ Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglul L, Wiklund O; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-188.
- ²⁷⁹ Piepoli F, Hoes AW, Agewall S et al. Wtyczne ESC dotyczące prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego w praktyce klinicznej w 2016 roku. *Kardiol Pol.* 2016; 74: 821-936.
- ²⁸⁰ Blacher J, Asmar R, Djane S, London GM, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension.* 1999 May;33(5):1111-7.
- ²⁸¹ Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5159-62.
- ²⁸² Rola P, Doroszko A, Szahidewicz-Krupska E, Rola P, Dobrowolski P, Skomro R, Szymczyzyn A, Mazur G, Derkacz A. Low-Level Laser Irradiation Exerts Antiaggregative Effect on Human Platelets Independently on the Nitric Oxide Metabolism and Release of Platelet Activation Markers. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6201797.
- ²⁸³ Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):542-8.
- ²⁸⁴ Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998 Nov 3;98(18):1842-7.
- ²⁸⁵ Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W, Frölich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Feb 15;219(2):598-603.
- ²⁸⁶ Yu E, Ruiz-Canela M, Hu FB, Clish CB, Corella D, Salas-Salvadó J, Hruby A, Fitó M, Liang L, Toledo E, Ros E, Estruch R, Gómez-Gracia E, Lapetra J, Arós F, Romaguera D, Serra-Majem L, Guasch-Ferré M, Wang DD, Martínez-González MA. Plasma Arginine/Asymmetric Dimethylarginine Ratio and Incidence of Cardiovascular Events: A Case-Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Jun 1;102(6):1879-88.
- ²⁸⁷ Zhang Y, Fan D, Zhang N. The relationship between serum asymmetric dimethylarginine and ABCD2 score in transient ischemic attack patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2014 Nov;53(11):876-9.
- ²⁸⁸ Hsu CP, Hsu PF, Chung MY, Lin SJ, Lu TM. Asymmetric dimethylarginine and long-term adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes: relation with the glycemic control. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Dec 3;13:156.
- ²⁸⁹ Koch A, Weiskirchen R, Kunze J, Dücker H, Bruensing J, Buendgens L, Matthes M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Elevated asymmetric dimethylarginine levels predict short- and long-term mortality risk in critically ill patients. *J Crit Care.* 2013 Dec;28(6):947-53.
- ²⁹⁰ Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001 Dec 22-29;358(9299):2127-8.
- ²⁹¹ Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M, Fukami A, Kumagai S, Matsuoka H, Nanjo Y, Kakuma T, Imaizumi T. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: six-year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res.* 2008 Jun;31(6):1185-9.
- ²⁹² Janáky R, Cruz-Aguado R., Oja S.S., Shaw C.A. Glutathione in the nervous system: roles in neural function and health and implications for neurological disease. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology; Amino acids and peptides in the nervous system*, 3rd edn. Springer, New York. 2007; pp 349-418.
- ²⁹³ Fitzpatrick AM, Jones DP, Brown LA. Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Jul 15;17(2):375-408.
- ²⁹⁴ Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol.* 1978;54:109-60.

- ²⁹⁵ Slivka A, Spina MB, Cohen G. Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci Lett.* 1987 Feb 10;74(1):112-8.
- ²⁹⁶ Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 2012 Dec;4(6):1247-1253.
- ²⁹⁷ Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1125-71
- ²⁹⁸ Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Apr;77(4):2214-8.
- ²⁹⁹ Li Y, Liu S. The Effect of Dexmedetomidine on Oxidative Stress Response Following Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats and the Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and S100B. *Med Sci Monit.* 2017 Feb 17;23:867-873.
- ³⁰⁰ Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- ³⁰¹ Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001 Jun;14(6 Pt 2):44S-54S.
- ³⁰² Tchalla AE, Wellenius GA, Travison TG, Gagnon M, Iloputaife I, Dantoine T, Sorond FA, Lipsitz LA. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 is associated with cerebral blood flow dysregulation, mobility impairment, and falls in older adults. *Hypertension.* 2015 Aug;66(2):340-6.
- ³⁰³ Li N, Wang P, Ma XL, Wang J, Zhao LJ, Du L, Wang LY, Wang XR, Liu KD. Effect of bone marrow stromal cell transplantation on neurologic function and expression of VEGF in rats with focal cerebral ischemia. *Mol Med Rep.* 2014 Nov;10(5):2299-305.
- ³⁰⁴ Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, Chopp M. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res.* 2003 Feb 21;92(3):308-13
- ³⁰⁵ Yadav BK, Yadav R, Chang H, Choi K, Kim JT, Park MS, Kang HG, Choo I, Ahn SH, Oh DS, Ha YS, Kim I, Seo MW, Shin BS. Genetic Polymorphisms *rs699947*, *rs1570360*, and *rs3025039* on the VEGF Gene Are Correlated with Extracranial Internal Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke. *Ann Clin Lab Sci.* 2017 Mar;47(2):144-155.
- ³⁰⁶ Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan-Feb;60(1):3-11.
- ³⁰⁷ Siegle I, Klein T, Zou MH, Fritz P, Kömhoff M. Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain. *J Histochem Cytochem.* 2000 May;48(5):631-41.
- ³⁰⁸ Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003 Dec;24(24):2166-79.
- ³⁰⁹ Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993 Mar;7(1):52-62.
- ³¹⁰ Perumal R, Rajendran M, Krishnamurthy M, Ganji KK, Pendor SD. Modulation of P-selection and platelet aggregation in chronic periodontitis: A clinical study. *J Indian Soc Periodontol.* 2014 May;18(3):293-300.
- ³¹¹ Ferroni P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP. Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb Haemost.* 1999 Mar;81(3):472-3.
- ³¹² Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost.* 1997 Jun;77(6):1081-5.
- ³¹³ Birdane A, Haznedaroğlu IC, Bavbek N, Koşar A, Büyükaşık Y, Özcebe O, Dündar SV, Kirazli S. The plasma levels of prostanoids and plasminogen activator inhibitor-1 in primary and secondary thrombocytosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005 Apr;11(2):197-201.
- ³¹⁴ Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension.* 1997 Mar;29(3):736-43.
- ³¹⁵ Doroszko A, Szahidewicz-Krupska E, Janus A, Jakubowski M, Turek A, Ilnicka P, Szuba A, Mazur G, Derkacz A. Endothelial dysfunction in young healthy men is associated with aspirin resistance. *Vascul Pharmacol.* 2015 Apr-Jun;67-69:30-7.
- ³¹⁶ Jia G, Aroor AR, Hill MA, Sowers JR. Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Activation in Promoting Cardiovascular Fibrosis and Stiffness. *Hypertension.* 2018 Sep;72(3):537-48.
- ³¹⁷ Lieb SM, Cabalum T, Zugaib M, Erkkola R, Tabsh K, Ushioda E, Nuwayhid BS, Brinkman CR 3rd, Assali NS. Vascular reactivity to angiotensin II in the normotensive and hypertensive pregnant ewe. *Am J Physiol.* 1980 Feb;238(2):H209-13.
- ³¹⁸ Kim HL, Kim SH. Pulse Wave Velocity in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2019 Apr 9;6:41.
- ³¹⁹ Pan Q, Wang R, Reglin B, Fang L, Yan J, Cai G, Kuebler WM, Pries AR, Ning G. Pulse wave velocity in the microcirculation reflects both vascular compliance and resistance: Insights from computational approaches. *Microcirculation.* 2018 Jul;25(5):e12458.
- ³²⁰ Sendra J, Llorente-Cortés V, Costales P, Huesca-Gómez C, Badimon L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. *Cardiovasc Res.* 2008 Jun 1;78(3):581-9.

- ³²¹ Pizoń T, Rajzer M, Wojciechowska W, Wach-Pizoń M, Drożdż T, Wróbel K, Gruszka K, Rojek M, Kameczura T, Jurczyszyn A, Kąkol J, Czarnecka D. The relationship between plasma renin activity and serum lipid profiles in patients with primary arterial hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2018 Oct-Dec;19(4):1470320318810022.
- ³²² Long H, Wang L, Su H, Xu J, Li J, Peng Q, Dong Y, Cheng X. Increased circulatory RAS activity can be inhibited by statins in patients with hypercholesterolemia. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Mar;16(1):126-30.
- ³²³ Sara JDS, Prasad M, Zhang M, Lennon RJ, Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent marker of abnormal coronary vasoreactivity in patients with non-obstructive coronary artery disease. *Am Heart J.* 2017 Aug;190:1-11.
- ³²⁴ Koenig W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 15;168(6):5126-34.
- ³²⁵ Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):370-1.
- ³²⁶ Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010 Jun;17(3):199-204.
- ³²⁷ Viridis A, Ghiadoni L, Plantinga Y, Taddei S, Salvetti A. C-reactive protein and hypertension: is there a causal relationship? *Curr Pharm Des.* 2007;13(16):1693-8.
- ³²⁸ Tsounis D, Bouras G, Giannopoulos G, Papadimitriou C, Alexopoulos D, Devereux S. Inflammation markers in essential hypertension. *Med Chem.* 2014;10(7):672-681.
- ³²⁹ Jae SY, Kurl S, Laukkanen JA, Lee CD, Choi YH, Fernhall B, Franklin BA. Relation of C-reactive protein, fibrinogen, and cardiorespiratory fitness to risk of systemic hypertension in men. *Am J Cardiol.* 2015 Jun 15;115(12):1714-9.
- ³³⁰ van der Heijden CDCC, Smeets EMM, Aarntzen EHJG, Noz MP, Monajemi H, Kersten S, Kaffa C, Hoischen A, Deinum J, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. Arterial Wall Inflammation and Increased Hematopoietic Activity in Patients With Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 May 1;105(5):e1967-80.
- ³³¹ Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, Payan J, Baamonde-Laborda E, Gonzalez-Cabrera F, Santana-Estupiñan R, Rodriguez-Perez JC. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 26;20(15):3668.
- ³³² Ito Y, Takeda R, Karashima S, Yamamoto Y, Yoneda T, Takeda Y. Prevalence of primary aldosteronism among prehypertensive and stage 1 hypertensive subjects. *Hypertens Res.* 2011 Jan;34(1):98-102.
- ³³³ Stowasser M, Gordon RD. Familial hyperaldosteronism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Sep;78(3):215-29.
- ³³⁴ Hannemann A, Wallaschofski H, Lüdemann J, Völzke H, Markus MR, Rettig R, Lendeckel U, Reincke M, Felix SB, Empen K, Nauck M, Dörr M. Plasma aldosterone levels and aldosterone-to-renin ratios are associated with endothelial dysfunction in young to middle-aged subjects. *Atherosclerosis.* 2011 Dec;219(2):875-9.
- ³³⁵ Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation.* 2004 Jun 15;109(23):2857-61.
- ³³⁶ Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Valsartan improves endothelial dysfunction in hypertension: a randomized, double-blind study. *Cardiovasc Ther.* 2009 Fall;27(3):151-8.
- ³³⁷ Su KH, Tsai JY, Kou YR, Chiang AN, Hsiao SH, Wu YL, Hou HH, Pan CC, Shyue SK, Lee TS. Valsartan regulates the interaction of angiotensin II type 1 receptor and endothelial nitric oxide synthase via Src/PI3K/Akt signalling. *Cardiovasc Res.* 2009 Jun 1;82(3):468-75.
- ³³⁸ Kosch M, Levers A, Lang D, Bartels V, Rahn KH, Pavenstädt H, Hausberg M. A randomized, double-blind study of valsartan versus metoprolol on arterial distensibility and endothelial function in essential hypertension. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Jul;23(7):2280-5.
- ³³⁹ Klingbeil AU, John S, Schneider MP, Jacobi J, Handrock R, Schmieder RE. Effect of AT1 receptor blockade on endothelial function in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2003 Feb;16(2):123-8.
- ³⁴⁰ Anderson TJ, Elstein E, Haber H, Charbonneau F. Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study). *J Am Coll Cardiol.* 2000 Jan;35(1):60-6.
- ³⁴¹ Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Effects of valsartan or amlodipine on endothelial function and oxidative stress after one year follow-up in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2008 Apr;30(3):267-76.

- ³⁴² Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000 Apr 11;101(14):1653-9.
- ³⁴³ Takiguchi S, Ayaori M, Uto-Kondo H, Iizuka M, Sasaki M, Komatsu T, Takase B, Adachi T, Ohsuzu F, Ikewaki K. Olmesartan improves endothelial function in hypertensive patients: link with extracellular superoxide dismutase. *Hypertens Res*. 2011 Jun;34(6):686-92.
- ³⁴⁴ Park JB, Intengan HD, Schiffrin EL. Reduction of resistance artery stiffness by treatment with the AT(1)-receptor antagonist losartan in essential hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2000 Mar;1(1):40-5.
- ³⁴⁵ Matrozova J, Vasilev V, Vandeva S, Elenkova A, Kirilov G, Zaharieva S. Asymmetric Dimethylarginin (ADMA) as a Marker of Endothelial Dysfunction in Primary Aldosteronism. *Int J Endocrinol Metab*. 2016 Oct 21;14(4):e30324.
- ³⁴⁶ Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. *Vasc Med*. 2005 Jul;10 Suppl 1:S19-25.
- ³⁴⁷ Wang D, Strandgaard S, Iversen J, Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Feb;296(2):R195-200.
- ³⁴⁸ Knight AR, Taylor EL, Lukaszewski R, Jensen KT, Jones HE, Carré JE, Isupov MN, Littlechild JA, Bailey SJ, Brewer E, McDonald TJ, Pitt AR, Spickett CM, Winyard PG. A high-sensitivity electrochemiluminescence-based ELISA for the measurement of the oxidative stress biomarker, 3-nitrotyrosine, in human blood serum and cells. *Free Radic Biol Med*. 2018 May 20;120:246-254.
- ³⁴⁹ Delles C, Schneider MP, John S, Geke M, Schmieder RE. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2002 Jul;15(7 Pt 1):590-3.
- ³⁵⁰ Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J*. 2001 Sep;65(9):775-8.
- ³⁵¹ Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignalosa O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J*. 2004 Jul;148(1):e5.
- ³⁵² Chen GF, Wagner L, Sasser JM, Zharikov S, Moningka NC, Baylis C. Effects of angiotensin type 1 receptor blockade on arginine and ADMA synthesis and metabolic pathways in fawn-hooded hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Nov;25(11):3518-25.
- ³⁵³ Aslam S, Santha T, Leone A, Wilcox C. Effects of amlodipine and valsartan on oxidative stress and plasma methylarginines in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Kidney Int*. 2006 Dec;70(12):2109-15.
- ³⁵⁴ Yilmaz MI, Saglam M, Sonmez A, Caglar K, Cakir E, Kurt Y, Eyileten T, Tasar M, Acikel C, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M. Improving proteinuria, endothelial functions and asymmetric dimethylarginine levels in chronic kidney disease: ramipril versus valsartan. *Blood Purif*. 2007;25(4):327-35.
- ³⁵⁵ Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70(0):1150-1165. Published 2016 Nov 14.
- ³⁵⁶ Osunkalu VO, Taiwo IA, Makwe CC, Akinsola OJ, Quao RA. Methylenetetrahydrofolate Reductase Enzyme Level and Antioxidant Activity in Women with Gestational Hypertension and Pre-eclampsia in Lagos, Nigeria. *J Obstet Gynaecol India*. 2019 Aug;69(4):317-24.
- ³⁵⁷ Verma MK, Jaiswal A, Sharma P, Kumar P, Singh AN. Oxidative stress and biomarker of TNF- α , MDA and FRAP in hypertension. *J Med Life*. 2019 Jul-Sep;12(3):253-259.
- ³⁵⁸ Lagarde M, Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Calzada C, Véricel E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Jun;1863(6):651-656.
- ³⁵⁹ Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang YX, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Feb 15;16(4):363-73.
- ³⁶⁰ Gawrys J, Gawrys K, Szahidewicz-Krupska E, Derkacz A, Mochol J, Doroszko A. Interactions between the Cyclooxygenase Metabolic Pathway and the Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Their Effect on Cardiovascular Risk, from Theory to the Clinical Practice. *Biomed Res Int*. 2018 Oct 2;2018:7902081.
- ³⁶¹ Riegger GA, Kahles HW, Elsner D, Kromer EP, Kochsiek K. Effects of acetylsalicylic acid on renal function in patients with chronic heart failure. *Am J Med*. 1991 May;90(5):571-5.

- ³⁶² Srivastava K, Chandra S, Narang R, Bhatia J, Saluja D. E-selectin gene in essential hypertension: a case-control study. *Eur J Clin Invest.* 2018 Jan;48(1).
- ³⁶³ Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Effect of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res.* 2006;117(4):385-92.
- ³⁶⁴ Maggio AB, Farpour-Lambert NJ, Montecucco F, Pelli G, Marchand LM, Schwitzgebel V, Mach F, Aggoun Y, Beghetti M. Elevated E-selectin and diastolic blood pressure in diabetic children. *Eur J Clin Invest.* 2012 Mar;42(3):303-9.
- ³⁶⁵ de la Sierra A, Larrousse M. Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2010 Jun;24(6):373-9.
- ³⁶⁶ Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm.* 2014;2014:689360.
- ³⁶⁷ Conen D, Everett BM, Glynn RJ, Ridker PM. Effect of valsartan compared with valsartan/hydrochlorothiazide on plasma levels of cellular adhesion molecules: the Val-MARC trial. *Heart.* 2008 Mar;94(3):e13.
- ³⁶⁸ Wang W, Qiu L, Howard A, Solis N, Li C, Wang X, Kopp JB, Levi M. Protective effects of aliskiren and valsartan in mice with diabetic nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014 Dec;15(4):384-95.
- ³⁶⁹ Zhou G, Cheung AK, Liu X, Huang Y. Valsartan slows the progression of diabetic nephropathy in db/db mice via a reduction in podocyte injury, and renal oxidative stress and inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2014 May;126(10):707-20.
- ³⁷⁰ Fogari R, Zoppi A. Antihypertensive drugs and fibrinolytic function. *Am J Hypertens.* 2006 Dec;19(12):1293-9.
- ³⁷¹ Uehara Y, Ishii M, Ikeda T, Atarashi K, Takeda T, Murao S. Plasma levels of 6-keto-prostaglandin F1 alpha in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Med.* 1983 May;11(1):95-104.
- ³⁷² Frölich JC. Prostacyclin in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1990 Sep;8(4):S73-8.
- ³⁷³ Feng TC, Ying WY, Hua RJ, Ji YY, de Gasparo M. Effect of valsartan and captopril in rabbit carotid injury. Possible involvement of bradykinin in the antiproliferative action of the renin-angiotensin blockade. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001 Mar;2(1):19-24.
- ³⁷⁴ Kalinowski L, Matys T, Chabielska E, Buczko W, Malinski T. Angiotensin II AT1 receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release. *Hypertension.* 2002 Oct;40(4):521-7.
- ³⁷⁵ Erbaş B, Uresin Y, Ozek M, Dođru-Abbasođlu S. Effects of valsartan on stress-induced changes of serum vascular endothelial growth factor and nitric oxide in mice. *Int J Neurosci.* 2006 May;116(5):601-11.
- ³⁷⁶ Song SM, Wang CC, Qi SH, Xing L, Yang BF, Oite T, Li B. Angiotensin receptor blockade attenuates glomerulosclerosis progression by promoting VEGF expression and bone marrow-derived cells recruitment. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Jul;27(7):2712-9.
- ³⁷⁷ Galea V, Triantafyllidi H, Theodoridis T, Koutroumbi M, Christopoulou-Cokkinou V, Kremastinos D, Anastasiou-Nana M, Lekakis J. Long-term treatment with ramipril favourably modifies the haemostatic response to acute submaximal exercise in hypertensives. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2013 Dec;14(4):322-9.
- ³⁷⁸ Schwieler JH, Kahan T, Wallén NH, Nussberger J, Hjemdahl P. Inhibition of the renin-angiotensin system does not reduce platelet activity at rest or during stress in hypertension. *J Hypertens.* 2013 Aug;31(8):1676-82.
- ³⁷⁹ Serebruany VL, Pokov AN, Malinin AI, O'Connor C, Bhatt DL, Tanguay JF, Sane DC, Hennekens CH. Valsartan inhibits platelet activity at different doses in mild to moderate hypertensives: Valsartan Inhibits Platelets (VIP) trial. *Am Heart J.* 2006 Jan;151(1):92-9.
- ³⁸⁰ Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Yiannaki E, Markala D, Papadopoulos N, Triantafyllou A, Anyfanti P, Petidis K, Garypidou V, Doumas M, Ferro A, Douma S. Platelet activation in essential hypertension during exercise: pre- and post-treatment changes with an angiotensin II receptor blocker. *Am J Hypertens.* 2014 Apr;27(4):571-8.
- ³⁸¹ de Meirelles LR, Mendes-Ribeiro AC, Santoro MM, Mendes MA, da Silva MN, Mann GE, Brunini TM. Inhibitory effects of endogenous L-arginine analogues on nitric oxide synthesis in platelets: role in platelet hyperaggregability in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007 Dec;34(12):1267-71.
- ³⁸² Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, Ellory J, Soares de Moura R, Mendes-Ribeiro A. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 Oct;31(10):738-40.
- ³⁸³ Tomczykowska M, Bielak J, Bodys A. Evaluation of platelet activation, plasma antithrombin III and alpha2-antiplasmin activities in hypertensive patients. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 2003;58(1):15-20.

-
- ³⁸⁴ Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23(4):349-56.
- ³⁸⁵ Preston FE, Greaves M, Jackson CA, Stoddard CJ. Low-dose aspirin inhibits platelet and venous cyclo-oxygenase in man. *Thromb Res.* 1982 Aug 15;27(4):477-84.
- ³⁸⁶ Homoncik M, Jilma B, Eichelberger B, Panzer S. Inhibitory activity of aspirin on von Willebrand factor-induced platelet aggregation. *Thromb Res.* 2000 Sep 1;99(5):461-6.
- ³⁸⁷ Stewart MW, Etches WS, Boshkov LK, Mant MJ, Gordon PA, Shaw AR. Platelet activation by a novel solid-phase agonist: effects of VWF immobilized on polystyrene beads. *Br J Haematol.* 1997 May;97(2):321-9.
- ³⁸⁸ Wu F, Wang HY, Cai F, Wang LJ, Zhang FR, Chen XN, Yang Q, Jiang MH, Wang XF, Shen WF. Valsartan decreases platelet activity and arterial thrombotic events in elderly patients with hypertension. *Chin Med J (Engl).* 2015 Jan 20;128(2):153-8.