

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



**Ewelina Kreft**

**Rola układu purynergicznego w patogenezie zaburzeń hemodynamiki  
nerek w doświadczalnie indukowanej cukrzycy**

Rozprawa doktorska

Praca wykonana  
w Zakładzie Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki Katedry Analityki Klinicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: Prof. dr hab. Mirosława Szczepańska-Konkel

Promotor:

Prof. dr hab. Mirosława Szczepańska-Konkel

Gdańsk 2014

Praca naukowa finansowana ze środków ze środków Narodowego Centrum Nauki  
przyznanych dla projektu nr N N405 024940 oraz środków statutowych GUMed ST-47

Składam serdeczne podziękowania  
Pani Profesor Mirosławie Szczepańskiej-Konkel  
za motywację i wszechstronną pomoc w realizacji niniejszej pracy

Za pomoc i wspaniałą atmosferę w pracy  
podziękowania składam również  
prof. dr hab. Maciejowi Jankowskiemu,  
dr Robertowi Kowalskiemu oraz mgr Małgorzacie Kasztan

Za wsparcie i cierpliwość dziękuję  
mojemu mężowi i rodzinie

Wykaz używanych skrótów:

Ado – adenozyzna

ADP – adenzyno-5'-difosforan

AMP – adenzyno-5'-monofosforan

Ap<sub>4</sub>A - diadenozyno 5',5"-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetrafosforan

ATP – adenzyno-5'-trójfosforan

β,γ-meATP – βγ-metyleno-adenozyno-5'-trójfosforan

BzATP - 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenozyno-5'-trójfosforan

cAMP – cykliczny adenzyno-5'-monofosforan

c.c. – ciężar ciała

cDNA – komplementarny DNA

COX – cyklooksygenaza

C<sub>x</sub> – klirens substancji X

DAG – diacyloglicerol

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DPCPX - 8-cyklopentyl-1,3-dipropylksantyna

EDHF – endotelium-derived hyperpolaryzing factor

ELISA – test immunoenzymatyczny

E-NPP1 – pirofosfataza/fosfodiesteraza ektonukleotydoma

E-NTPD1 – difosfohydrolaza tri fosforanów nukleozydowych

FEX – frakcyjne wydalenie składnika X z moczem

GFR – filtracja kłębuszkowa

GIS – objętość inulinowa kłębuszków nerkowych

Hipo - hipoksantyna

IP<sub>3</sub> – trójfosforan inozytolu

*iv* – podanie dożylna

*ip* – podanie dootrzewnowe

Ino – inozyna

MAP – średnie ciśnienie tętnicze

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy

NA – noradrenalina

NAD - dinukleotydom nikotynoamidoadeninowy

NADP – fosforan dinukleotydom nikotynoamidoadeninowego

NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego  
NGAL – lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii  
NO – tlenek azotu  
NO<sub>x</sub> – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
NOS – syntaza tlenku azotu  
NZ – nadmiar/niedobór zasad  
PBS – roztwór wieloelektrolitowy zbuforowany fosforanami  
RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą  
pCO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla  
pO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjalne tlenu  
PGI<sub>2</sub> - prostacyklina  
PGE<sub>2</sub> - prostaglandyna E<sub>2</sub>  
PKA – kinaza białkowa A  
PKC – kinaza białkowa C  
PLC – fosfolipaza C  
PPADS – 6-azofenilo-2',4'-disulfonowy fosforan pirydoksalu  
RBF – przepływ krwi przez nerki  
RPF – przepływ osocza przez nerki  
ROS – reaktywne formy tlenu  
STZ – streptozotocyna  
S<sub>x</sub> – stężenie składnika w surowicy  
UA – kwas moczowy  
UACR – wydalanie albuminy w przeliczeniu na 1 g kreatyniny w przygodnej zbiórce  
moczu  
U<sub>x</sub> – stężenie składnika w moczu  
U<sub>x</sub>V – wydalanie składnika X z moczem  
V – diureza  
VSMC – komórki mięśniówki gładkiej naczyń  
X – ksantyna  
z ang. – z angielskiego

## Spis treści

1. Streszczenie .....	5
2. Wstęp .....	7
2.1. Laboratoryjne wskaźniki zaburzeń funkcji nerek w cukrzycy .....	7
2.2. Zaburzenia hemodynamiki nerek w cukrzycy .....	8
2.3. Zaburzenia układu purynergicznego w cukrzycy .....	12
3. Cel pracy .....	14
4. Materiały i metody .....	15
4.1. Zwierzęta doświadczalne .....	15
4.2. Indukcja cukrzycy .....	15
4.3. Doświadczenia w klatkach metabolicznych .....	16
4.4. Mikrodializa kory nerek in vivo .....	17
4.5. Oznaczanie aktywności hydrolitycznej nerek względem związków purynowych .....	19
4.6. Doświadczenia klirensowe .....	21
4.7. Pomiar objętości inulinowej kłębuszków (GIS) .....	25
4.8. Odczynniki .....	27
4.9. Analiza statystyczna .....	28
5. Wyniki .....	29
5.1. Ocena stanu równowagi metabolicznej wody i elektrolitów oraz funkcji nerek szczurów z cukrzycą; doświadczenia w klatkach metabolicznych .....	29
5.2. Stężenie ATP i adenozyiny w płynie śródmiąższowym nerek szczurów z cukrzycą i kontrolnych; <i>mikrodializa kory nerek</i> .....	31
5.3. Aktywność hydrolityczna względem związków purynowych w nerkach szczurów z cukrzycą .....	32
5.4. Ocena aktywności układu purynergicznego – zależnego od ATP w regulacji hemodynamiki i funkcji nerek szczurów z cukrzycą; <i>doświadczenia klirensowe</i> .....	35
5.4.1. Podstawowe parametry hemodynamiki i funkcji nerek szczurów z cukrzycą .....	35
5.4.2. Działanie PPADS – antagonisty receptorów P2 na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą .....	38

5.4.3. Działanie pochodnych ATP – agonistów receptor P2X na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą .....	41
5.4.4. Działanie di-adenozyno-tetrafosforanu (Ap <sub>4</sub> A) – naturalnego agonisty receptorów P2 na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą.....	46
5.4.5. Działanie Ap <sub>4</sub> A na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów cukrzycowych w czasie dożylniej infuzji antagonisty receptorów P1 – DPCPX .....	50
5.5. Wpływ analogów ATP i Ap <sub>4</sub> A na objętość inulinową kłębuszków nerkowych (GIS) szczurów z cukrzycą .....	56
6. Dyskusja .....	58
7. Wnioski .....	63
8. Piśmiennictwo.....	64



## 1. Streszczenie

rozprawy doktorskiej pt.: „Rola układu purynergicznego w patogenezie zaburzeń hemodynamiki nerek w doświadczalnie indukowanej cukrzycy”

Badania prowadzono w kierunku oceny zaangażowania układu purynergicznego, zależnego od ATP, w rozwój zaburzeń wewnątrznerkowej hemodynamiki i funkcji nerek w doświadczalnie wywołanej cukrzycy typu 1. Przeprowadzono cykl doświadczeń na znieczulonych szczurach Wistar, samcach ważących 200–280 g, z kilkunastodniową hiperglikemią - indukowaną streptozotocyną (STZ; 60 mg/kg *i.p.*); stężenie glukozy we krwi - w trzecim i dwunastym dniu po STZ mieściło się w zakresie 350 - 500 mg/dl. Grupę kontrolną stanowiły szczury z prawidłową glikemią (<120 mg/dl), wiekiem odpowiadające szczurom cukrzycowym.

1. Wykazano podwyższoną aktywność hydrolityczną względem ATP, ADP i AMP homogenatu kory nerek oraz izolowanych błon komórkowych nerek szczurów z cukrzycą. Jednocześnie dowiedziono, przy użyciu sondy mikrodializacyjnej obniżone stężenie ATP, a podwyższone stężenie w płynie śródmiąższowym nerek.

2. PPADS – nieselektywny inhibitor receptorów P2 – podany do krążenia ogólnego zahamował korowy przepływ krwi i tempo filtracji kłębuszkowej zarówno u szczurów z cukrzycą, jak i kontrolnych. Świadczy to o podobnym zaangażowaniu receptorów, wrażliwych na PPADS (prawdopodobnie P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> i/lub P2Y<sub>2</sub>) w utrzymaniu na odpowiednim poziomie napięcia mięśniówki naczyń wewnątrznerkowych i tempa filtracji kłębuszkowej w cukrzycy.

3. Nerki szczurów z cukrzycą były niewrażliwe na podany do krążenia ogólnego  $\beta\gamma$ -meATP (agonista o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>1</sub>), który u szczurów kontrolnych stymuluje korowy przepływ krwi i obniża filtrację kłębuszkową oraz działa diuretycznie. Z kolei inny analog ATP – BzATP (o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>7</sub>) podany do krążenia ogólnego szczurom z cukrzycą, spowodował wyraźny wzrost korowego przepływu krwi oraz obniżył tempo filtracji kłębuszkowej, a nie zmieniał w istotny sposób parametrów hemodynamiki i funkcji nerek u szczurów kontrolnych. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że w nerkach szczurów z cukrzycą dochodzi do zmian w obrębie układu purynergicznego – zależnego od ATP: maleje udział receptorów P2X<sub>1</sub> w inicjowaniu zmian hemodynamiki wewnątrznerkowej, a wzrasta udział receptorów P2X<sub>7</sub>.

4. Nieselektywny, naturalny agonista receptorów P2 (P2X i P2Y) – Ap<sub>4</sub>A – podany do krążenia ogólnego szczurom z cukrzycą również nie wywołał istotnych zmian hemodynamiki i funkcji nerek. Jednakże Ap<sub>4</sub>A podany w czasie dożylniej infuzji DPCPX – antagonisty receptorów adenozyne A<sub>1</sub> – podwyższył przepływ krwi i obniżył tempo filtracji kłębuszkowej w stopniu podobnym do zmian wywołanych infuzją tylko Ap<sub>4</sub>A szczurom kontrolnym. Z doświadczeń tych wynika, że endogenna adenozyne – poprzez receptory A<sub>1</sub> modyfikuje działanie Ap<sub>4</sub>A na hemodynamikę i funkcję nerek.

## Abstract

of the thesis: “The role of the purinergic system in the pathogenesis of impairment of renal hemodynamic in experimental diabetes mellitus”

The aim of the study was to establish the potential role of purinergic system in the pathophysiology of the diabetic nephropathy. The experiments were performed on the male Wistar streptozotocin diabetic rats (body weight 200-280 g, blood glucose concentration 350-500 mg/dl).

1. ATP, ADP and AMP hydrolysis (measured as Pi released from nucleotides incubated with renal homogenate) were raised in renal cortex and isolated cortical cell membranes in diabetic compared to control rats. Since renal cortical ATP interstitial concentration measured in microdialysate was lower and adenosine was greater in diabetic compared to control group.

2. PPADS (nonselective P2 receptor antagonist) injected *iv* decreased cortical blood flow (CBF) and glomerular filtration rate (GFR) in diabetic and control group. These findings evidence of similar contribution of PPADS-sensitive receptors (probably P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> i/lub P2Y<sub>2</sub>) in regulation of renal vascular smooth muscle cells tone and glomerular filtration rate in diabetic and control group.

3.  $\beta,\gamma$ -meATP (agonist with a high affinity to P2X<sub>1</sub> receptor) *iv* infusion did not change CBF or GFR in diabetic group, but caused a marked increase in the CBF and reduction of GFR in the control group. Furthermore, another ATP analogue – BzATP (agonist with a high affinity to P2X<sub>7</sub> receptors), administrated *iv* increased CBF and decreased GFR only in the diabetic group, but did not change renal hemodynamic parameters in the control group. These data establish that ATP-mediated purinergic system in diabetic kidney is altered: contribution of P2X<sub>7</sub> receptors in regulation of intrarenal hemodynamic is enhanced, since P2X<sub>1</sub> role is diminished.

4. Infusion of Ap<sub>4</sub>A (nonselective, natural P2X and P2Y receptor agonist) also did not change significantly any measured parameters in diabetic kidney. Furthermore, pretreatment with DPCPX (A<sub>1</sub> receptor antagonist) changed the effects of Ap<sub>4</sub>A in the diabetic rats. Ap<sub>4</sub>A in DPCPX-pretreated diabetic group increased CBF and decreased GFR to the same degree as Ap<sub>4</sub>A without DPCPX in control rats. In conclusion, endogenous adenosine via A<sub>1</sub> receptors modulate hemodynamic effects of Ap<sub>4</sub>A.

## 2. Wstęp

Nerki odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy środowiska wewnętrznego organizmu. Przez obie nerki człowieka przepływa około 1200 ml krwi w ciągu minuty, tj. 20–25 % frakcji wyrzutowej serca. Około 90% krwi wpływającej tętnicą do nerki przepływa przez korę, a pozostałe 10 % przez rdzeń nerki [31]. Przepływ krwi w poszczególnych częściach nerek jest zróżnicowany i wynosi: w zewnętrznej części kory około 700 ml/min/100g tkanki, w części sąsiadującej z rdzeniem nerki – około 300 ml/min/100 g, a w brodawce nerkowej około 50 ml/min/100 g tkanki [31].

Zarówno odpowiednia dystrybucja przepływu krwi jak i dynamika mikrokrazenia wewnątrznerkowego determinują prawidłową funkcję nerek, tj. filtrację kłębuszkową, kanalikowy transport jonów i wody oraz wydalanie końcowych produktów przemian [31]. Jak wynika z licznych doniesień, zaburzenie przepływu krwi przez nerki jest częstym powikłaniem w cukrzycy i jedną z głównych przyczyn rozwoju choroby cukrzycowej nerek [6, 21].

### 2.1. Laboratoryjne wskaźniki zaburzeń funkcji nerek w cukrzycy

Przewlekła choroba nerek jest jednym z głównych powikłań cukrzycy (stąd nazwa cukrzycowa choroba nerek) i najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek [26, 36]. Według wytycznych *Narodowej Fundacji Nerkowej* (National Kidney Disease, USA) oraz KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) przewlekłą chorobę nerek definiuje się jako uszkodzenie nerek, utrzymujące się powyżej trzech miesięcy, z objawami zmian strukturalnych nerek, z prawidłową lub obniżoną filtracją kłębuszkową ( $GFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ) i obecnością w wydalonym moczu markerów uszkodzenia nerek [12].

Wydalanie albuminy z moczem uznawane jest za bardzo dobry wskaźnik uszkodzenia kłębuszków nerkowych między innymi w przebiegu cukrzycy [1]. Wzmożona albuminuria jest konsekwencją przesączania albuminy przez nadmiernie przepuszczalną błonę filtracyjną kłębuszków nerkowych [8]. Retrospektywne badania

wykazały, że u 80% chorych z cukrzycą typu 1, u których występowała mikroalbuminuria, w ciągu 10 – 15 lat nastąpił rozwój jawnej cukrzycowej choroby nerek [9]. W cukrzycy oprócz zmian w kłębuszkach obserwujemy również zaburzenia funkcji kanalików nerkowych.

Z kolei, markerem uszkodzenia kanalików nerkowych w cukrzycy jest białko – lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii (NGAL) [1]. Zaobserwowano bowiem, zależność pomiędzy ilością NGAL wydalanego z moczem a progresją przewlekłej choroby nerek [33]. Ponadto, wykazano, że u pacjentów z cukrzycą może dochodzić do zwiększenia stężenia NGAL we krwi i w moczu oraz do zwiększenia frakcyjnego wydalania NGAL, pomimo, że wydalanie albuminy u tych pacjentów było w granicach normoalbuminurii [2]. Również w warunkach doświadczalnych – u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną – obserwowano zwiększone wydalania NGAL zanim pojawiła się zwiększona ilość albuminy w moczu [1]. Zwiększone wydalania NGAL z moczem jest głównie wynikiem zaburzonej reabsorpcji tego białka w cewce proksymalnej [27], co sugeruje, że ten odcinek nefronu jest również narażony na dysfunkcyjne działanie hiperglikemii.

## **2.2. Zaburzenia hemodynamiki nerek w cukrzycy**

Oporność naczyń mikrokrążenia i związana z tym hemodynamika w nerkach jest regulowana przez szereg czynników endokrynnych i parakrynnych, które zmieniają napięcie mięśniówki gładkiej naczyń. Komórki epitelialne struktur kanalikowych, komórki śródbłonka naczyń i komórki mięśniówki gładkiej (VSMC, z ang. vascular smooth muscle cells) uwalniają szeroką gamę substancji sygnałowych, które wywierają wpływ na aktywność struktur kurczliwych ścian naczyń wewnątrznerkowych i kłębuszka [32]. Napięcie ścian nerkowych naczyń krwionośnych jest stanem dynamicznej równowagi pomiędzy oddziaływaniem substancji o działaniu rozkurczającym naczynia a działaniem obkurczającym naczynia. Czynniki takie jak ATP, adenozylna, endotelina, bradykinina z jednej strony mediują wazorelaksację poprzez stymulację wytwarzania tlenu azotu (NO) przez komórki śródbłonka, z drugiej strony inicjują obkurczenie poprzez receptory zlokalizowane bezpośrednio na mięśniówce gładkiej naczyń [31]. NO uwalniany z komórek śródbłonka dyfunduje do

VSMC i uaktywnia cytozolową cyklazę guanylową, która katalizuje wytwarzanie cyklicznego AMP (cAMP), co w konsekwencji inicjuje relaksację VSMC. Donerkowa infuzja endoteliny w niskich dawkach powoduje przejściową wazodylatację unaczynienia nerek, przechodzącą w utrwalony skurcz bez istotnych zmian GFR. Natomiast wysokie dawki endoteliny mediują skurcz i powodują zmniejszenie przepływu krwi przez nerki (RBF) i GFR [31]. Infuzja angiotensyny – hormonu odpowiedzialnego za regulację ciśnienia krwi – w dużych dawkach powoduje znaczny spadek RBF i nieco mniejszy spadek GFR. W mniejszych dawkach prowadzi do obniżenia RBF, nie zmieniając przy tym GFR. Natomiast prostaglandyna E2 (PGE2) i prostacyklina (PGI2) – metabolity cyklooksygenazy (COX) w nerkach – podane do tętnicy nerkowej inicjują wazodylatację, która ma swoje odzwierciedlenie w zwiększeniu RBF i GFR [22, 31].

Ważnym czynnikiem posiadającym właściwości naczynioruchowe i regulującym funkcję nerek jest adenozyne. Wykazano, że receptory purynowe P1 podtypu: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub> występują na strukturach odpowiedzialnych za utrzymanie napięcia ścian naczyń tętniczych i kłębuszka na odpowiednim poziomie. Wielokrotnie udokumentowano, że adenozyne indukują skurcz izolowanych kłębuszków nerkowych i mezangiocytów poprzez aktywację receptorów A<sub>1</sub>, oraz rozkurcza naczynia krwionośne nerek poprzez aktywację receptorów A<sub>2a</sub> i A<sub>2b</sub> [18, 19, 31]. Natomiast podanie adenozyne do krążenia nerkowego inicjuje dwufazowe zmiany hemodynamiki. W pierwszym etapie dochodzi do przejściowego obkurczenia naczyń nerkowych i tym samym zmniejszenia RBF przy udziale receptorów A<sub>1</sub>. W drugim etapie następuje trwała naczyniorelaksacja i zwiększenie RBF w wyniku aktywacji receptorów A<sub>2</sub> [34]. Dwukierunkowe działanie naczynioruchowe względem mikrokrążenia nerkowego wykazuje również ATP. Zaobserwowano bowiem, że ATP w zależności od typu i lokalizacji pobudzanego receptora (P2X<sub>1-7</sub> lub P2Y<sub>1-12</sub>) może inicjować obkurczenie lub relaksację naczyń wewnątrznerkowych. Receptory P2X są kanałami jonowymi, które po połączeniu się z ATP umożliwiają napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do cytoplazmy komórek. Receptory P2Y są związane z białkami G i poprzez stymulację aktywności fosfolipazy C powodują wzrost syntezy inozytolo(1,4,5)-trifosforanu, który uwalnia Ca<sup>2+</sup> z magazynów wewnątrzkomórkowych. Powodowany przez receptory P2X i P2Y wzrost stężenia cytozolowego Ca<sup>2+</sup> stymuluje produkcję i uwalnianie przez komórki śródbłonna czynników naczyniorelaksujących takich jak: NO, PGI<sub>2</sub>, EETs [28].

Natomiast aktywacja receptorów P2 zlokalizowanych na VSMC inicjuje obkurczenie ścian naczyń krwionośnych [16, 17, 31]. Podtyp receptorów purynowych – P2X<sub>7</sub> wykazuje podwójną odpowiedź na zewnątrzkomórkowy ATP. Jedną z odpowiedzi jest, tak jak w przypadku pozostałych receptorów P2X, szybkie otwarcie kanałów jonowych. Natomiast długotrwała stymulacja receptorów P2X<sub>7</sub> powoduje powstawanie dużych cytoplazmatycznych por przepuszczalnych dla cząsteczek od 600 do 900 Da. Ponadto pozakomórkowy ATP, łącząc się z receptorem P2X<sub>7</sub>, może spowodować śmierć komórek na drodze apoptozy lub nekrozy [46, 52].

Patomechanizm rozwoju cukrzycowej choroby nerek jest złożony i pomimo wieloletnich, intensywnych badań, nadal nie jest w pełni poznany. Zaburzenia hemodynamiki wewnątrznerkowej są ściśle powiązane z zaburzeniami metabolicznymi [11]. W warunkach hiperglikemii nasileniu ulegają procesy, w produkowane są reaktywne formy tlenu (ROS). Dochodzi bowiem do intensyfikacji przemiany glukozy do ATP w procesie glikolizy, w którym powstaje NADH. Ponadto glukoza ulega intensywnym przemianom do sorbitolu. W reakcji tej zużywany jest NAPPH – substrat biorący udział w odtwarzaniu glutationu. Dodatkowo produkt pośredni szlaku sorbitolowego – 3-deoksyglukozon – jest cząsteczką wysoce reaktywną i uczestniczy w powstawaniu końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE, ang. advanced glycation end-products). Ponadto w cukrzycy dochodzi do zwiększenia stężenia diacyloglicerolu (DAG) w kłębuszkach nerkowych, co aktywuje kinazę białkową C (PKC), inicjującą m.in. skurcz mięśniówki gładkiej naczyń, mezangium oraz podocytów [44]. Następstwem zmian w sygnałowaniu wewnątrzkomórkowym związanym z PKC są między innymi: zaburzenia w produkcji prostaglandyn, biorących udział w regulacji napięcia mięśniówki gładkiej naczyń nerkowych oraz zmiany w aktywności ATP-azy sodowo-potasowej, uczestniczącej w procesie reabsorpcji sodu i wody w kanalikach [44]. Utrzymujące się wysokie stężenie glukozy prowadzi do nieenzymatycznej glikacji białek i tworzenia AGE. Zmodyfikowane w tym procesie białka m.in. kolagen, ulegają wolniejszej degradacji i tworzą wiązania krzyżowe. Skutkuje to zmianami strukturalnymi naczyń kapilarnych, zwiększeniem objętości mezangium i przerostu kłębuszka, co zaburza hemodynamikę mikrokrążenia nerkowego i zmienia przepuszczalność naczyń, prowadząc do rozwoju późnych powikłań w cukrzycy [44].



Na szybkość rozwoju i nasilenie nefropatii cukrzycowej wpływa prawdopodobnie wielkość hiperglikemii. Wykazano bowiem, że u szczurów z cukrzycą wywołaną sterptozotocyną (STZ), u których rozwinęła się ostra hiperglikemia, filtracja kłębuszkowa uległa obniżeniu już w pierwszych tygodniach po podaniu STZ [21]. Obniżenie filtracji kłębuszkowej w ostrej hiperglikemii było wynikiem wzrostu oporności zarówno tętniczek doprowadzających, jak i odprowadzających i spadku przepływu krwi przez sieć naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego. Z kolei u szczurów z umiarkowaną hiperglikemią, obserwowano hiperfiltrację. Wykazano, że u tych zwierząt dochodziło do zmniejszenia oporności tętniczek doprowadzających, bez istotnych zmian w oporności tętniczek odprowadzających, co skutkowało wzrostem przepływu krwi przez nerki i gradientu ciśnienia hydrostatycznego, a w konsekwencji podwyższeniem GFR [21, 35].

Postulowany jest pogląd, że zaburzenia w sygnałowaniu parakrynnym i endokrynnym mogą być przyczyną zaburzeń hemodynamiki wewnątrznerkowej. Wśród czynników wpływających na zmiany wewnątrznerkowego krążenia w cukrzycy wymienia się takie obkurczające czynniki jak: angiotensyna i endotelina. Wykazano bowiem, że u zwierząt z cukrzycą dochodzi do wzrostu stężenia angiotensyny II we krwi i w nerkach w porównaniu do zwierząt zdrowych [44, 54]. Natomiast doniesienia na temat zaangażowania endoteliny-1 (ET-1) – naczynioaktywnego czynnika produkowanego przez komórki śródbłonka – wskazują na związek pomiędzy zwiększoną ekspresją ET-1 w kłębuszkach i komórkach epitelialnych kanalików nerkowych a progresją cukrzycowej choroby nerek. Ponadto udokumentowano zależność pomiędzy wzrostem stężenia ET-1 w nerkach i ekspansją komórek mezangialnych i akumulacją kolagenu w kłębuszkach myszy z cukrzycą [23, 30].

Z licznych doniesień wynika, że w warunkach przewlekłej hiperglikemii dochodzi do zaburzeń w sygnałowaniu związanym z relaksującym mięśniówkę gładką naczyń NO. W badaniach *in vivo* obserwuje się również mniejszy stopień NO-zależnej wazodylatacji nerek zarówno u pacjentów chorych na cukrzycę typu 1, jak i na modelu zwierzęcym cukrzycy [7, 44]. Jednakże doniesienia na temat wydalania  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$  – stabilnych metabolitów NO – w cukrzycy są sprzeczne. Część doniesień wskazuje bowiem na zwiększone, a część na zmniejszone wydalanie  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_x$ ) z moczem szczurów z cukrzycą w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych [44, 50].

### 2.3. Zaburzenia układu purynergicznego w cukrzycy

Z wcześniej przeprowadzonych badań wynika, że pozakomórkowe nukleotydy i nukleozydy są ważnymi czynnikami regulującymi motorykę naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego, filtrację kłębuszkową i czynność wydalniczą nerek. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzone A. C. Pflueger i wsp. wykazały zwiększoną wrażliwość nerek szczurów z cukrzycą na obkurczające działanie adenozyiny podanej do tętnicy nerkowej. Zaobserwowany spadek przepływu krwi przez nerki po podaniu adenozyiny wiązano z aktywacją receptorów  $A_1$  [40]. Doniesienia te potwierdzają badania przeprowadzone przez M. Szczepańską-Konkel i wsp., w których NAD – prekursor adenozyiny – podany do krążenia ogólnego szczurom z cukrzycą, w dawce, która u szczurów kontrolnych nie wywołała efektu, spowodowała spadek GFR i RPF. Natomiast w doświadczeniach *in vitro* na izolowanych kłębuszkach nerkowych wykazano zwiększoną – u szczurów z ciężką hiperglikemią i zmniejszoną – u szczurów z umiarkowaną hiperglikemią – kurczliwość kłębuszków w odpowiedzi na adenozyinę [47]. Dodatkowych danych sugerujących, że w cukrzycy może dochodzić do zaburzenia metabolizmu i sygnałowania w układzie purynergicznym dostarczają badania stężenia adenozyiny we krwi pacjentów chorych na cukrzycę. Wykazano bowiem, że dochodzi do wzrostu stężenia adenozyiny w osoczu pacjentów z cukrzycową chorobą nerek w porównaniu do pacjentów chorych na cukrzycę, ale z prawidłową funkcją nerek [53]. Fakt, że zastosowanie agonistów receptorów adenozynowych zmniejszyło glukozurię i białkomocz u szczurów z cukrzycą [37], oraz że brak receptorów  $A_1$  nasilał hiperfiltrację i uszkodzenie kłębuszków w cukrzycy [10] może wskazywać na nefroprotekcyjne działanie adenozyiny.

Stężenie ATP, adenozyiny i innych nukleotydów w płynie pozakomórkowym jest wypadkową uwalniania tych związków z komórek i aktywności enzymów: ekto-hydrolaz katalizujących rozpad enzymów oraz ekto-kinaz przeprowadzających reakcję powstawania nukleotydów adeninowych w płynie pozakomórkowym. Prace badawcze dowodzą, że zmiany aktywności ekto-enzymów i powiązane z tym zaburzenia metabolizmu pozakomórkowych nukleotydów mogą być czynnikami wpływającymi na rozwój nefropatii. Stwierdzono bowiem, że aktywność hydrolityczna nukleotydyz względem ATP, ADP, AMP we krwi szczurów z cukrzycą jest podwyższona [42]. Ponadto wykazano, że polimorfizm w genie kodującym E-NPP1 – jednej z ekto-



hydrolaz, prowadzi do rozwoju nefropatii cukrzycowej w krótszym okresie czasu [5]. Co więcej zablokowanie ekspresji genu dla ekto-hydrolazy E-NTPD1 u zwierząt z cukrzycą, potęgowało wystąpienie nefropatii cukrzycowej, objawiającej się albuminurią i szkliwieniem kłębuszków nerkowych [14].

Kolejne badania dostarczają przesłanek, że do zmian w sygnałowaniu purynergicznym może zachodzić również w zakresie aktywności i biodostępności receptorów P2. Bowiem w badaniach *in vivo* przeprowadzonych u pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazano, że naczyniorozkurczający efekt infuzji ATP, UTP i ADO do tętnicy udowej pacjentów z cukrzycą był o 50% niższy niż w grupie zdrowych pacjentów [49]. Ponadto w doświadczeniach *in vitro* udokumentowano zwiększoną ekspresję receptorów P2X<sub>7</sub> w podocytach, kłębuszkach oraz endotelium tętniczek nerkowych szczurów z cukrzycą [52].

Mimo, iż prace badawcze dotyczące zaburzeń hemodynamiki w cukrzycowej chorobie nerek trwają od lat, nie jest w pełni poznana patogeneza nerkowych powikłań cukrzycy. Biorąc pod uwagę dużą rolę układu purynergicznego w hemodynamice nerek oraz wstępne doniesienia o zmianach stężenia nukleotydów, aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie ATP oraz ekspresji receptorów P2 w cukrzycy wydaje się prawdopodobne, że układ purynergiczny, przynajmniej w części, może być zaangażowany w patomechanizm zmian w nerkach cukrzycowych. Dlatego w obecnej pracy podjęto próbę oceny udziału pozakomórkowych nukleotydów i ich receptorów w regulacji nerkowej hemodynamiki w cukrzycy.

### 3. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy jest ocena aktywności układu purynergicznego – zależnego od ATP w nerkach szczurów z doświadczalną cukrzycą typu 1.

Cele etapowe:

1. Ocena aktywności hydrolitycznej nerek względem nukleotydów adeninowych oraz pomiar stężenia ATP i adenozyiny w płynie śródmiąższowym nerek.
2. Ocena roli układu purynergicznego – zależnego od ATP – w regulacji wewnątrznerkowej dynamiki przepływu krwi, filtracji kłębuszkowej i produkcji moczu w cukrzycy.
3. Ocena kurczliwości kłębuszków nerkowych pod wpływem agonistów receptorów purynowych.

## **4. Materiały i metody**

### **4.1. Zwierzęta doświadczalne**

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach samcach Wistar ważących od 200 do 250 g. Zwierzęta pochodziły z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta przed kwalifikacją do doświadczeń przechodziły okres adaptacyjny (około 7 dni). Bytowały w pomieszczeniu o stałej temperaturze  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$  i cyklu świetlnym dzień/noc (12 godzin/12 godzin). Przez cały okres zarówno adaptacyjny, jak i doświadczalny szczury miały swobodny dostęp do paszy bytowej (Labofeed B, Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia) i wody wodociągowej. Wszystkie procedury badawcze przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Doświadczenia przeprowadzono na dwóch grupach szczurów:

1. grupa badana – szczury z cukrzycą wywołaną podaniem streptozotocyny (STZ),
2. grupa kontrolna – szczury zdrowe, wiekiem odpowiadające szczurom z cukrzycą.

### **4.2. Indukcja cukrzycy**

Cukrzycę wywoływano podając STZ dootrzewnowo w dawce 65 mg/kg c.c. (roztwór STZ w buforze cytrynianowym: 0,1 M cytrynian sodu, 0,1 M kwas cytrynowy, pH 4,2). Trzeciego i dwunastego dnia po podaniu STZ pobrano krew z ogona i oznaczono stężenie glukozy (glukometr Accu Check Go, Roche Diagnostics Polska). Do grupy szczurów z hiperglikemią włączano te zwierzęta, u których stężenie glukozy było wyższe niż 300 mg/dl. Doświadczenia przeprowadzono 12 – 14 dnia po podaniu STZ. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta zdrowe, którym podano dootrzewnowo bufor cytrynianowy.

### **4.3. Doświadczenia w kłatkach metabolicznych**

Dwunastego dnia po podaniu STZ (grupa badana) lub buforu cytrynianowego (grupa kontrolna) przeprowadzono doświadczenia w kłatkach metabolicznych. W tym celu szczury umieszczono w indywidualnych kłatkach metabolicznych (Tecniplast, Włochy) na 48 godzin, zapewniając swobodny dostęp do wody i paszy. Po 24 godzinach adaptacji, rozpoczynano dobową zbiórkę moczu. Mierzono ilość pobranej wody i paszy. Ilościowo zebrany mocz odwirowano (5000g, 10 min). W supernatancie oznaczono stężenie  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  (metoda fotometrii płomieniowej, Effox 5054, Eppendorf), albuminy i lipokaliny neutrofilowej związanej z żelatynazą (NGAL).

#### **Oznaczanie stężenia albuminy w moczu**

Stężenie albuminy oznaczono za pomocą pośredniego testu immunoenzymatycznego (AssayPro, USA). Metoda polega na reakcji albuminy z natywnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko szczurzej albuminie. W drugim etapie kompleks przeciwciało – albumina reaguje z przeciwciałami znakowanymi enzymem – peroksydazą. Aktywność enzymu jest wprost proporcjonalna do stężenia albuminy.

Statystyczne cechy metody: precyzja metody określana współczynnikiem zmienności wynosi <5 % w serii jednoczesnej, 7,2 % w serii niejednoczesnej; dokładność metody określona jako odzysk dla stężeń w zakresie 3 – 30 ng/ml wynosi 96%; minimalne stężenie wykrywane testem to 0,7 ng/ml; specyficzność metody: w reakcji krzyżowej z przeciwciałami mysimi 5 %, wołowymi 0,2 %.

#### **Oznaczenie stężenia lipokaliny neutrofilowej związanej z żelatynazą (NGAL) w moczu**

Stężenie NGAL oznaczono za pomocą pośredniego testu immunoenzymatycznego (BioPorto Diagnostics, Dania). Metoda oparta jest na reakcji NGAL z natywnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko szczurzej NGAL. W pierwszym etapie inkubacji próbek moczu z przeciwciałami powstaje kompleks NGAL – przeciwciało. W drugim etapie zachodzi reakcja kompleksu z przeciwciałami

znakowanymi enzymem-peroksydazą. Aktywność enzymu jest wprost proporcjonalna do stężenia NGAL w moczu.

Statystyczne cechy metody: precyzja metody określana współczynnikiem zmienności wynosi <3% w serii jednoczesnej, 10% w serii niejednoczesnej; minimalne stężenie wykrywane testem 0,5 pg/ml; odzysk – 105,8 % dla zakresu stężeń 55 – 346 ng/ml.

#### **4.4. Mikrodializa kory nerek in vivo**

Mikrodializę kory nerek przeprowadzono w celu określenia stężenia ATP i adenozyiny (Ado) w płynie śródmiąższowym. Proces mikrodializy narządowej oparty jest na zrównoważonym przepływie netto.

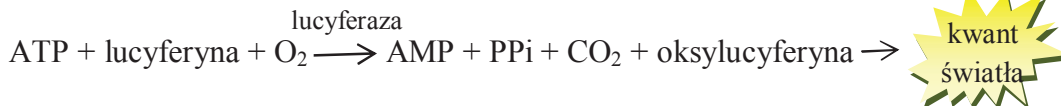
##### **Schemat postępowania:**

Szczura, znieczulonego tiopentalem (65 mg/kg c.c., *i.p.*), umieszczono na termostatowanym stoliku o temp. 36°C, a następnie, poprzez nacięcie skóry w okolicy grzbietowej, odsłaniano nerkę. Do kory nerki, przy pomocy mandrynu, wprowadzano liniową sondę dializacyjną – długość błony mikrodializacyjnej wynosiła 5 mm (Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA). Do sondy podawano ze stałą prędkością (2  $\mu$ l/min) płyn perfuzyjny – wieloelektrolitowy płyn izotoniczny (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), który zawierał różne stężenia Ado: 0; 50; 100; 150; 200; 300 i 400 nM. W zebranych próbkach dializacyjnych (po ~ 80  $\mu$ l) oznaczano stężenie adenozyiny metodą luminometryczną. Przykładowe zmiany stężenia Ado w zebranym płynie dializacyjnym ( $\Delta$  Ado) w zależności od stężenia Ado w płynie perfuzyjnym (Ado<sub>PBS</sub>) przedstawia Rycina 1.

Celem oceny stężenia ATP w płynie śródmiąższowym kory nerki do sondy podawano płyn perfuzyjny zawierający ATP o stężeniu 0; 5; 10; 15 nM i w zebranych próbkach oznaczano stężenie ATP metodą luminometryczną.

## Oznaczanie ATP i adenozyiny w płynie dializacyjnym metodą luminescencyjną

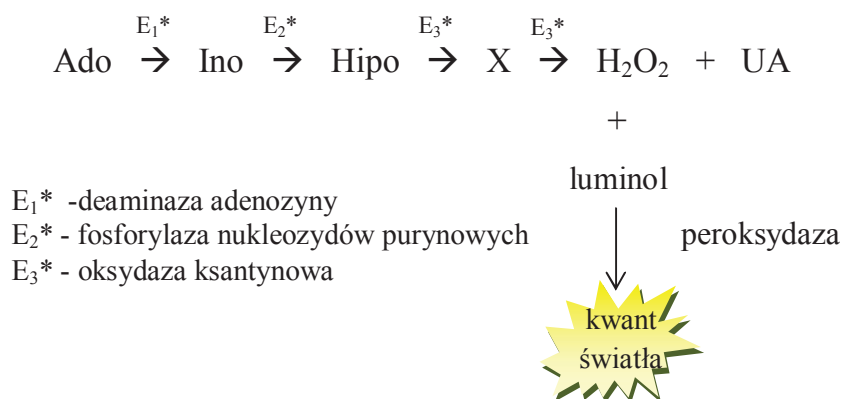
Schemat reakcji oznaczania ATP:



Lucyferyna w obecności ATP, tlenu i lucyferazy ulega utlenieniu do oksylucyferyny, która następnie emituje kwant światła. Ilość emitowanego światła jest proporcjonalna do ilości powstałej oksylucyferyny i stężenia ATP.

Statystyczne cechy metody: zakres oznaczalności od  $10^{-6}$  do  $10^{-11}$  M ATP, współczynnik zmienności w serii jednoczesnej <5%, w serii niejednoczesnej

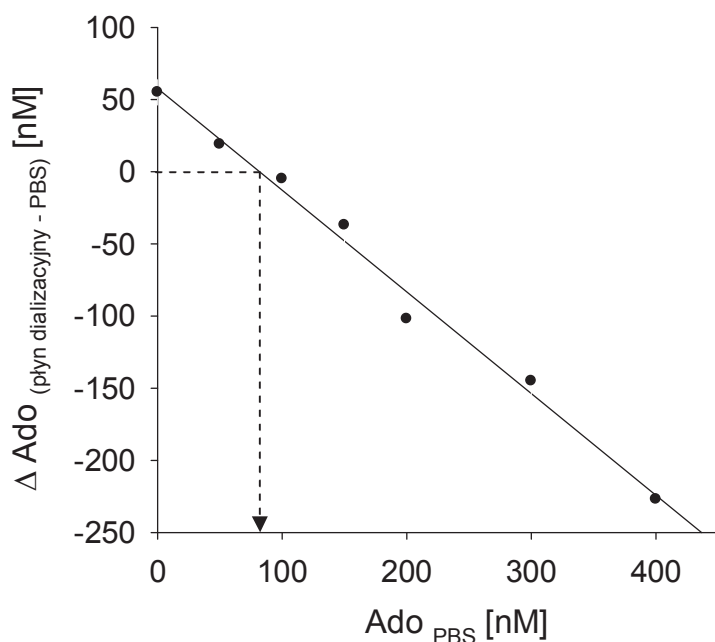
Schemat reakcji oznaczania adenozyiny (metoda chemiluminescencyjna):



Adenozyina (Ado) w obecności deaminazy adenozyiny jest przekształcana do inozyiny (Ino), następnie w obecności fosforylasy nukleozydów purynowych do hipoksantyny (Hipo). Z kolei hipoksantyna w obecności oksydazy ksantynowej ulega przekształceniu do ksantyny (X) i do kwasu moczowego (UA) i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uwolniony  $\text{H}_2\text{O}_2$  – w ilości ekwimolarnej do adenozyiny – w obecności peroksydazy utlenienia luminol, który emituje kwant światła.

Do rejestracji światła emitowanego w reakcji lucyferazy, jak i peroksydazy użyto aparatu TD 20/20, Turner Systems.

Statystyczne cechy metody: zakres oznaczalności od 40-500 nmol/l adenozyiny, współczynnik zmienności w serii jednoczesnej <20%.



**Rycina 1. Zmiany stężenia adenozyzny (Ado) w płynie dializacyjnym w zależności od stężenia Ado w płynie perfuzyjnym.**

*Objaśnienia:* Stężenie adenozyzny po obu stronach błony dializacyjnej osiągnęło stan równowagi ( $\Delta \text{Ado} = 0$ ) przy stężeniu Ado 92 nM.

#### **4.5. Oznaczanie aktywności hydrolitycznej nerek względem związków purynowych**

Aktywność hydrolityczną kory nerek oznaczano w warunkach opisanych przez Vieira V.P. i wsp. [51]. Metoda opiera się na pomiarze ilości fosforanu uwolnionego z nukleotydów adeninowych: ATP, ADP lub AMP podczas inkubacji z materiałem badanym tj. homogenatem kory nerek lub izolowanymi błonami komórkowymi nerek.

##### **Przygotowanie homogenatu kory nerek**

Po znieczuleniu i dekapitacji szczura nerki wyjęto, przepłukano lodowatym roztworem NaCl (150 mM), oddzielono część korową od rdzenia. Korę nerki homogenizowano przez 3 minuty 24 000 obr/min (Ultra-Turrax T25, Ika, Labortechnik Staufen, Niemcy) w buforze (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4). Uzyskany homogenat poddano wirowaniu przy 1 000 g w temperaturze 4°C, przez 10 minut. Do pomiaru aktywności hydrolitycznej posłużył supernatant.

## **Izolacja błon komórkowych**

Błony komórkowe izolowano metodą wirowania homogenatu kory nerek w gradiencie Percollu (12000g, 20 min, 4°C) [51]. W tym celu homogenat kory nerek wirowano (12000g, 20 min, 4°C), a uzyskany osad błon komórkowych zawieszano w buforze (sacharoza 320 mM, HEPES 5mM, EDTA 0,1 mM, NaOH q.s., pH7,5) zawierającym 8,5% Percollu. Zawiesinę błon komórkowych wirowano w gradiencie Percollu (16% i 10%) przez 20 min (15000 g, 4°C). Następnie, frakcję błon komórkowych pobraną z warstwy znajdującej się na granicy faz Percollu, płukano dwukrotnie buforem i rozcieńczano do stężenia końcowego białka ~ 1 mg/ml. Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda [3].

## **Procedura oznaczania aktywności hydrolitycznej**

Aktywność hydrolityczną oznaczano inkubując homogenat kory nerek lub frakcję błon komórkowych w odpowiednim buforze reakcyjnym w łaźni wodnej w temperaturze 37°C z roztworem poszczególnych nukleotydów o stężeniu dla ATP – 1mM, ADP – 1mM, AMP – 2 mM. Po 10 minutach inkubacji, reakcję hydrolizy nukleotydów zatrzymano przez dodanie 30% kwasu trichlorooctowego. Po odwirowaniu próbek (10 000 g, 10 min), w supernatancie oznaczano stężenie fosforanów zmodyfikowaną metodą Gomoriego [45]. Dodatkowo oznaczano stężenie białka metodą Lowry [29].

*Bufor reakcyjny dla ATP i ADP:*

sacharoza 225 mM, Tris-HCl 50 mM, glukoza 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0;

*Bufor reakcyjny dla AMP:*

Tris-HCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,5.

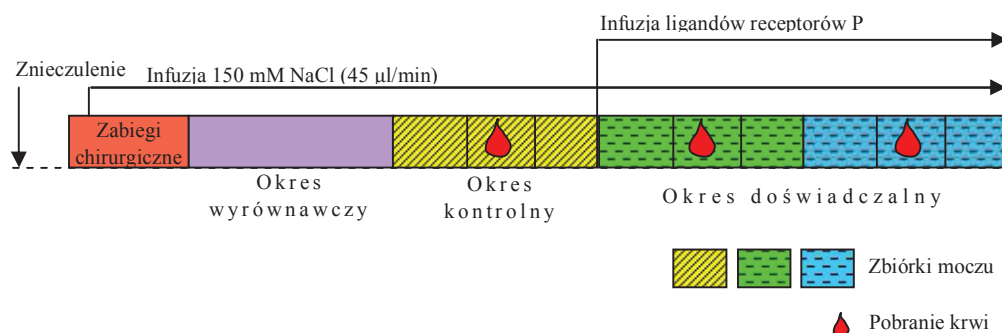


#### 4.6. Doświadczenia klirensowe

Doświadczenia klirensowe przeprowadzono na szczurach znieczulonych tiopentalem (65 mg/kg c.c. *ip*). Znieczulonego szczura umieszczano na termostatowanym blacie operacyjnym o temperaturze 36°C (JW Electronic). Wykonywano tracheotomię wprowadzając do tchawicy dren polietylenowy PE 240 (Becton Dickinson, USA). Do prawej żyły udowej wprowadzono dren PE 50 (Becton Dickinson, USA), poprzez który podawano 150 mM roztwór NaCl z dodatkiem albuminy (5%) z prędkością 45  $\mu$ l/min (pompa infuzyjna World Precision Instruments, USA) przez około pół godziny. W tym czasie przeprowadzono kolejne zabiegi: do prawej tętnicy udowej wprowadzono drugi dren PE 50 (Becton Dickinson, USA) wypełniony 150 mM NaCl z heparyną (5 U/ml) połączony z aparatem do pomiaru średniego ciśnienia tętniczego (MAP) (Stoelting, USA). Następnie poprzez nacięcie powłok brzusznych odsłaniano pęcherz moczowy, nacinano go na szczycie i umieszczano w nim dren PE 60 w taki sposób, aby mocz swobodnie spływał do próbki typu Eppendorf. Celem pomiaru nerkowego przepływu krwi metodą laser-Doppler odsłonięto lewą nerkę poprzez nacięcie grzbietowe oraz odseparowano od otaczających tkanek. Nerkę ustabilizowano na uchwycie i zapewniono odpowiednią wilgotność. W celu pomiaru rdzeniowego przepływu, sondę igłowa (407-1, PerifFux System 5000, Perimed, Sweden) implantowano poprzez dojście od strony grzbietowej na głębokości około 4 mm (w zależności od wielkości nerki). Umieszczeniu sondy w nerce rzadko towarzyszyło niewielkie krwawienie, które ustępowało po około 1 minucie. Drugą sondę (402, PerifFux System 5000, Perimed, Szwecja) umieszczono powierzchownie na grzbietowej części nerki celem pomiaru przepływu korowego. Przepływy krwi rejestrowane były w sposób ciągły za pomocą oprogramowania komputerowego Perisoft PSW 2.5 (Perimed, Szwecja).

Wielkość przepływu jest proporcjonalna do prędkości i ilości przepływających krwinek czerwonych w niewielkiej objętości tkanki ( $<1\text{mm}^3$ ) [41] i wyrażana jest w jednostkach względnych PU (Perfusion Unit). Kalibrację aparatu przeprowadzano w lateksowym roztworze koloidowym dostarczonym przez producenta aparatu. Ponadto dokonywano pomiaru perfuzji w tkance nerkowej po zatrzymaniu przepływu w tętnicy nerkowej klemem naczyniowym (wartości przepływu w tych warunkach wynosiły  $4\pm 3$  PU).

Po przeprowadzeniu wszystkich zabiegów chirurgicznych, dożylną infuzję 150 mM roztworu NaCl z 5% albuminą zastępowano roztworem 150 mM NaCl z dodatkiem [<sup>3</sup>H]-inuliny (5 μCi/ml) i para-aminohipuranu sodu (PAH; 1mg/ml). Po ustabilizowaniu się ciśnienia krwi, przepływu krwi i diurezy, czyli po około 60 minutach od włączenia dożylnej infuzji 150 mM NaCl, przeprowadzano trzy 10 – minutowe zbiórki moczu (okres kontrolny) i pobierano próbkę krwi (około 50 μl). Po 30 minutach okresu kontrolnego, włączono infuzję testowanych związków (okres doświadczalny) zgodnie z protokołem doświadczalnym przedstawionym poniżej i kontynuowano zbiórki moczu oraz pobierano próbki krwi (Rycina 2). W pobranym materiale oznaczano radioaktywność [<sup>3</sup>H]-inuliny, stężenie PAH, Na<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Po zakończeniu doświadczenia wycinano lewą nerkę, odsączano na ligninie i ważono. Następnie dokonywano oceny miejsca implantacji sondy dordzeniowej. Jeśli stwierdzano nieprawidłową lokalizację sondy lub uszkodzenie tkanki nerki, wyniki z tych doświadczeń odrzucano.



**Rycina 2. Schemat doświadczeń klirensowych**

### **Metody analityczne, symbole i obliczenia stosowane w doświadczeniach klirensowych**

Diurezę (V) wyrażoną w μl/min określano metodą grawimetryczną. W próbkach moczu i surowicy krwi określano radioaktywność [<sup>3</sup>H]-inuliny metodą płynnej scyntylacji (Wallac 1409, Perkin Elmer), stężenie PAH metodą Brattona i Marshala [4], stężenie Na w moczu (U<sub>Na</sub>) i surowicy (S<sub>Na</sub>) metodą fotometrii płomieniowej (Effox 5054, Eppendorf). Stężenie NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oznaczano za pomocą zestawu (Thermo Scientific Nitric Oxide Assay Kit) opartego na metodzie Griessa'a.

W oparciu o uzyskane wyniki obliczono:

Klirens inuliny ( $C_{in}$ ; wskaźnik filtracji kłębuszkowej, GFR)

$$C_{in} \text{ (ml/min)} = \frac{U_{in} \cdot V}{S_{in}},$$

gdzie:  $U_{in}$  – radioaktywność inuliny w moczu (cpm)

$S_{in}$  – radioaktywność inuliny w surowicy (cpm)

Frakcyjne wydalanie wody ( $FE_V$ )

$$FE_V \text{ (ml/min)} = \frac{V}{C_{in}} \cdot 100\%,$$

Klirens PAH-u ( $C_{PAH}$  – wskaźnik przepływu osocza przez nerki, RPF)

$$C_{PAH} \text{ (ml/min)} = \frac{U_{PAH} \cdot V}{S_{PAH}},$$

gdzie:  $U_{PAH}$  – stężenie PAH-u w moczu (nmol/l)

$S_{PAH}$  – stężenie PAH-u w surowicy (nmol/l)

Wydalenie jonów sodu z moczem ( $U_{Na}V$ )

$$U_{Na}V \text{ (}\mu\text{mol/min)} = U_{Na} \cdot V$$

gdzie:  $U_{Na}$  – stężenie Na w moczu

Frakcyjne wydalanie sodu ( $FE_{Na}$ )

$$FE_{Na} \text{ (%) } = \frac{C_{Na}}{C_{in}} \cdot 100\%$$

$$\text{gdzie: } C_{Na} \text{ (ml/min)} = \frac{U_{Na}V}{S_{Na}} \cdot 100\%$$

gdzie:  $U_{Na}$  – stężenie Na w moczu

$S_{Na}$  – stężenie Na w surowicy

## **Protokół doświadczeń klirensowych**

W doświadczeniach klirensowych badano wpływ antagonisty receptorów purynowych P2 – PPADS (6-azofenylo-2',4'-disulfonowy fosforan pirydoksalu), agonistów receptorów P2X –  $\beta,\gamma$ -meATP ( $\beta\gamma$ -metyleno-adenozyno-5'-trójfosforan) i BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenozyno-5'-trójfosforan), agonisty receptorów P2X i P2Y – Ap<sub>4</sub>A (diadenozyno 5',5''-P1,P4-tetrafosforan) oraz antagonisty receptorów A<sub>1</sub> – DPCPX (8-cyklopentyl-1,3-dipropylksantyna) na filtrację kłębuszkową, przepływ krwi przez nerkę, diurezę i natriurezę u szczurów z cukrzycą i dla porównania szczurów kontrolnych.

Grupy doświadczalne:

### *Działanie PPADS na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek*

Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały PPADS w dwóch dawkach:

I dawka 2,5  $\mu\text{mol/kg}$  jednorazowo

II dawka 25  $\mu\text{mol/kg}$  jednorazowo

### *Działanie $\beta\gamma$ -MeATP na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek*

Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały  $\beta\gamma$ -meATP w dawce jednorazowej 2  $\mu\text{mol/kg}$  oraz 20 nmol/kg w dawce podtrzymującej

### *Działanie BzATP na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek*

Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały BzATP w dawce jednorazowej 0,2  $\mu\text{mol/kg}$  oraz 2 nmol/kg w dawce podtrzymującej

### *Działanie Ap<sub>4</sub>A na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek*

Bezpośrednio po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały Ap<sub>4</sub>A w dawce jednorazowej 2  $\mu\text{mol/kg}$  oraz 20 nmol/kg w dawce podtrzymującej

### *Działanie $Ap_4A$ na hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek w obecności antagonisty receptorów $A_1$ – DPCPX*

Po okresie kontrolnym zwierzęta otrzymywały DPCPX w dawce jednorazowej 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  oraz 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  w dawce podtrzymującej. Po 30 minutach dodatkowo włączano  $Ap_4A$  w dawce jednorazowej 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  oraz 20  $\text{nmol}/\text{kg}$  w dawce podtrzymującej

#### **4.7. Pomiar objętości inulinowej kłębuszków (GIS)**

Objętość inulinowa izolowanych kłębuszków nerkowych jest wyznacznikiem objętości wewnątrzkapilarnej kłębuszka. Pomiaru dokonano metodą opisaną przez Fujiwarę i wsp. [15] przy użyciu radioaktywnej inuliny i znacznie zmodyfikowaną przez zespół M. Szczepańskiej – Konkel [48].

#### **Izolacja kłębuszków nerkowych**

Po znieczuleniu zwierząt tiopentalem (65  $\text{mg}/\text{kg}$ ) i dekapitacji, pobierano nerki, usuwano torebkę łącznotkankową i umieszczano w lodowato – zimnym wieloelektrolitowym buforze PBS o  $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$  i składzie (mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 0,49  $\text{MgCl}_2$ ; 8,1  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,9  $\text{CaCl}_2$ ; 5,6 glukozy. Wszystkie czynności związane z izolacją kłębuszków, a następnie inkubacją z testowanymi związkami przeprowadzono w środowisku tego buforu (PBS). Następnie nerki przecinano w płaszczyźnie strzałkowej i wycinano rdzeń nerkowy. Kłębuszki nerkowe izolowano techniką przesiewową [48] stosując metalowe sita o średnicy oczek ( $\emptyset$ ): 250, 125, 75  $\mu\text{m}$ . Korę nerek, po rozdrobnieniu przy użyciu ostrego nożyka, przenoszono na sito o  $\emptyset$  250 $\mu\text{m}$  i przecierano za pomocą plastikowego tłoka od strzykawki. Otrzymany homogenat przeniesiono na sito o  $\emptyset$  125 $\mu\text{m}$ , i przepłukano silnym strumieniem lodowato – zimnego roztworu PBS. Przesącz zawierający kłębuszki i komórki nanoszono na sito o  $\emptyset$  75  $\mu\text{m}$ . Pozostające na sicie  $\emptyset$  75 $\mu\text{m}$  kłębuszki, przepłukiwano roztworem PBS w celu usunięcia komórek, a następnie przeniesiono je do naczynia zawierającego PBS z dodatkiem 1% albuminy. Wszystkie czynności związane z izolacją kłębuszków prowadzono w temp. 0–4°C, w plastikowych naczyniach umieszczonych w pojemniku z lodem w czasie nieprzekraczającym 90 minut.

## Ocena jakościowa i ilościowa otrzymanego preparatu

Czystość zawiesiny kłębków nerkowych oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Zanieczyszczenie elementami morfotycznymi (kanaliki, komórki) wynosiło nie więcej niż 5 %. Ocenę ilościową kłębuszków nerkowych w otrzymanym preparacie dokonano metodą liczenia kłębuszków w komorze Fuchs-Rosenthal'a. Średnio z jednej nerki otrzymywano około 10 tysięcy kłębuszków. Doświadczenia prowadzono na znanej liczbie kłębuszków nerkowych.

## Inkubacja kłębuszków nerkowych z testowanymi związkami

Do 200  $\mu$ l zawiesiny zawierającej  $2000 \pm 150$  kłębuszków nerkowych zawieszonych w buforze PBS z albuminą wołową (1%) dodawano 0,2  $\mu$ Ci [ $^3$ H]-inuliny. Próbkę preinkubowano 30 minut w temp. 36°C w łaźni wodnej z ciągłym mieszaniem (40obrotów/min). Inkubację kontynuowano po dodaniu testowanych związków. Próbkę kontrolną inkubowano z PBS. W ściśle określonym czasie, inkubację przerywano przenosząc 200  $\mu$ l mieszaniny inkubacyjnej do próbki wirowniczej zawierającej 100  $\mu$ l oleju silikonowego AR-200 (Wacker – Chemie, München), schłodzonego do temperatury około 4°C, i natychmiast wirowano przez 5 sekund (5000 g, Beckman, Microfuge TM11). Powstały na dnie próbki osad kłębuszkowy oraz supernatant znajdujący się nad warstwą oleju poddano pomiarom radioaktywności.

## Pomiar objętości inulinowej kłębuszka nerkowego

Do naczynia scyntylicyjnego przeniesiono 20  $\mu$ l supernatantu, a do kolejnego – odcięty koniec próbki wraz z osadem kłębuszków. Osad rozpuszczono w 0,3% roztworze Tritonu X-100 mieszając każdą próbkę przy pomocy vortexu (GenieTM2). Następnie do naczyń scyntylicyjnych dodano po 2 ml scyntyлятора tritonowo-ksylenowego (Ultima Gold – Sigma) i pozostawiono na 30 minut w zaciemnionym miejscu. Po tym czasie dokonano pomiaru radioaktywności próbek (Wallac 1409).

Objętość inulinową izolowanych kłębuszków (GIS), wyrażoną w pikolitrach (pl), wyliczono w oparciu o radioaktywność (CPM) osadu kłębuszkowego i supernatantu oraz liczbę kłębuszków nerkowych w osadzie, wg wzoru:

$$GIS = \frac{\text{radioaktywność osadu (CPM)}}{\text{radioaktywność 1 } \mu\text{l supernatantu (CPM)} \cdot \text{liczba kłębuszków w osadzie}}$$

Zmiany objętości inulinowej kłębuszków pod wpływem testowanych związków wyrażono jako procent zmian GIS ( $\Delta$  GIS) w odniesieniu do objętości kłębuszków inkubowanych tylko z PBS.

#### **4.8. Odczynniki**

##### **Sigma Aldrich:**

PPADS, cytrynian sodowy, kwas cytrynowy, streptozotocyna, PAH, koktajl scyntylacyjny, Ap<sub>4</sub>A, BzATP,  $\beta\gamma$ -meATP, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tris, adenozyzna, inozyna, hipoksantyna, fosforylaza nukleozydów purynowych, oksydaza ksantynowa, urykaza, luminal, albumina wołowa, EDTA-Na<sub>2</sub>, ATP, ADP, AMP, Percoll, HEPES, EDTA, Triton X-100

##### **Sandoz:**

Tiopental

##### **Assay Pro:**

Zestaw do oznaczania albuminy – AssayMax Rat Albumin ELISA Kit

##### **BioPorto Diagnostics:**

Rat NGAL ELISA Kit

##### **Perkin Elmer:**

[<sup>3</sup>H]-inulina

##### **Polfa, Warszawa:**

Heparyna

##### **Polskie Odczynniki Chemiczne:**

NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glukoza, KCl, Tris, kwas trichlorooctowy, sacharoza, NaOH, glukoza, HCl

##### **Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia:**

Pasza Labofeed B

##### **Roche Diagnostics:**

deaminaza adenozyzny, oksydaza ksantynowa, peroksydaza chrzanowa, odczynnik CLS II – lucyferaza z lucyferyną

##### **Thermo Scientific:**

Nitric Oxide Assay Kit

**Wacker – Chemie:**  
olej silikonowy AR-200

#### **4.9. Analiza statystyczna**

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano oprogramowanie statystyczne Sigma Plot 11 (Systat Software, Inc., USA). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej (SE). Weryfikację statystycznej istotności różnic między poszczególnymi zmiennymi, przeprowadzano za pomocą testu t-studenta dla zmiennych zależnych lub zmiennych niezależnych, gdy dane posiadały rozkład normalny lub testu sumy rang U Manna–Whitneya, w przypadku rozkładu nieparametrycznego. Przeprowadzone analizy uznawano za istotne statystycznie, jeśli  $p < 0,05$ . W celu zwiększenia mocy badanych zależności wprowadzono dodatkowe kryteria: wysoce istotne (dla  $p < 0,01$ ) oraz bardzo wysoce istotne (dla  $p \leq 0,001$ ).



## 5. Wyniki

### 5.1. Ocena stanu równowagi metabolicznej wody i elektrolitów oraz funkcji nerek szczurów z cukrzycą; doświadczenia w klatkach metabolicznych

Wstępnym etapem badań była ocena równowagi wodno – elektrolitowej i kwasowo – zasadowej oraz funkcji nerek u szczurów w 12 dniu po podaniu STZ, u których stężenie glukozy w osoczu wynosiło:  $378 \pm 25$  mg/dl. Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym dootrzewnowo podano tylko bufor cytrynianowy, a stężenie glukozy w osoczu wynosiło:  $107 \pm 8$  mg/dl. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zawarte w Tabeli 1 wykazały, że u szczurów z hiperglikemią zarówno objętość pobieranej wody ( $V_{H_2O}$ :  $120 \pm 12$  ml/24 godz.), jak i objętość wydalanego moczu ( $V_U$ :  $93 \pm 9$  ml/24 godz.) były około 3 krotnie większe niż u zwierząt kontrolnych ( $p < 0,001$ ). Wzmoczonej diurezie towarzyszyła zwiększona utrata jonów sodu z moczem oraz tendencja do zwiększonego wydalania jonów potasu. Ponadto, analiza próbek moczu, prowadzona w kierunku oceny stanu funkcjonalnego nerek, wykazała około 2 – krotny wzrost wydalania z moczem albuminy i około 12-krotny wzrost wydalania NGAL

u szczurów z hiperglikemią – wywołaną podaniem STZ – w porównaniu do wydalania tych białek z moczem szczurów kontrolnych. Wyniki te świadczą o rozwijającej się nefropatii już w pierwszym kilkunastodniowym okresie cukrzycy niewyrównanej.

Parametry równowagi kwasowo-zasadowej krwi tętniczej (Tabela 2), pobranej po uprzednim znieczuleniu zwierząt, w grupie szczurów cukrzycowych wynosiły średnio: pH  $7,40 \pm 0,01$ ;  $pCO_2$   $47,3 \pm 1,5$  mmHg;  $HCO_3^-$   $28,2 \pm 0,3$  mM; NZ  $4,1 \pm 0,3$ . Wartości te w porównaniu do grupy kontrolnej nie różniły się w statystycznie znamiennej sposób. Również stężenie jonów sodu, potasu i wapnia w osoczu mieściło się w zakresie wartości referencyjnych i było porównywalne w obu grupach zwierząt.

**Tabela 1. Bilans wody i wydalanie elektrolitów oraz białek z moczem u szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

	Grupa kontrolna (n=15)	Grupa z cukrzycą (n=16)
Głukoza (mg/dl)	107 ± 8	378 ± 25 <sup>#</sup>
Ciężar ciała (g)	219 ± 10	229 ± 8
Podaż wody (ml/24 godz)	26 ± 2	121 ± 12 <sup>#</sup>
Diureza (ml/24 godz)	8,9 ± 2,2	92,8 ± 8,6
Wydalanie Na <sup>+</sup> (mmol/24 godz)	1,55 ± 0,23	2,18 ± 0,24*
Wydalanie K <sup>+</sup> (mmol/24 godz)	2,89 ± 0,49	4,07 ± 0,50
Albumina (µg/24 godz)	90,6 ± 12	191 ± 30*
NGAL (µg/24 godz)	7,4 ± 0,9	88,7 ± 28,1 <sup>#</sup>

Objaśnienia: NGAL – lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą. Badanie przeprowadzono w 12 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c *ip*) lub buforu cytrynianowego. Każdy wynik jest wartością średnią ± SE. <sup>#</sup>P≤0,001,\*P<0,05 obliczono względem grupy kontrolnej.

**Tabela 2. Parametry równowagi kwasowo – zasadowej i stężenie elektrolitów we krwi tętniczej u szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

	Grupa kontrolna (n=15)	Grupa z cukrzycą (n=16)
Glukoza (mg/dl)	108 ± 6	380 ± 26 <sup>#</sup>
pH	7,42 ± 0,01	7,40 ± 0,01
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l)	27,6 ± 0,4	28,2 ± 0,3
NZ (mmol/l)	3,9 ± 0,2	4,1 ± 0,3
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	45,5 ± 1,4	47,3 ± 1,5
pO <sub>2</sub> (mmHg)	84,7 ± 33	79,6 ± 2,9
K <sup>+</sup> (mmol/l)	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	142 ± 0,5	139 ± 0,6
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	104 ± 0,7	103 ± 0,6
Ca <sup>2+</sup> (mmol/l)	1,29 ± 0,05	1,35 ± 0,02

*Objaśnienia:* NZ – nadmiar/niedobór zasad; pCO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjale dwutlenku węgla, pO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjale tlenu. Badanie przeprowadzono w 12 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c ip) . Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SE. <sup>#</sup>P≤0,001 obliczono względem grupy kontrolnej

### **5.2. Stężenie ATP i adenozyiny w płynie śródmiąższowym nerek szczurów z cukrzycą i kontrolnych; mikrodializa kory nerek**

Badania, z wykorzystaniem mikrodializy narządowej, prowadzono w kierunku oceny stężenia naturalnego agonisty receptorów P2, tj. ATP i jego naczynioaktywnego metabolitu – adenozyiny, agonisty receptorów P1 – w płynie śródmiąższowym kory nerek szczurów z cukrzycą i, dla porównania, w grupie szczurów kontrolnych. Otrzymane wyniki – zawarte w Tabeli 3. – znacznie różniły się w obu grupach, bowiem w nerkach szczurów z hiperglikemią (w dwunastym dniu po podaniu STZ), w porównaniu do szczurów kontrolnych, stężenie ATP było niespełna dwukrotnie niższe (p < 0,05), natomiast stężenie adenozyiny ponad dwukrotnie wyższe (p < 0,05).

Obniżony poziom ATP w płynie śródmiąższowym nerek szczurów cukrzycowych mógł być wynikiem zwiększonej degradacji pozakomórkowego ATP do AMP a następnie do adenozy, i w konsekwencji zwiększonej akumulacji tego nukleozydu w płynie śródmiąższowym.

**Tabela 3. Stężenie ATP i adenozy w płynie śródmiąższowym nerek u szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

	ATP (nmol/l)	Ado (nmol/l)
Grupa kontrolna Glu 119±10 (mg/dl)	2,19±0,18	98±28
Grupa z cukrzycą Glu 393±26 (mg/dl)	1,34±0,21*	237±40*

Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego. Glu – stężenie glukozy we krwi pełnej.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SE. \*P<0,05 obliczono względem grupy kontrolnej.

### **5.3. Aktywność hydrolityczna względem związków purynowych w nerkach szczurów z cukrzycą**

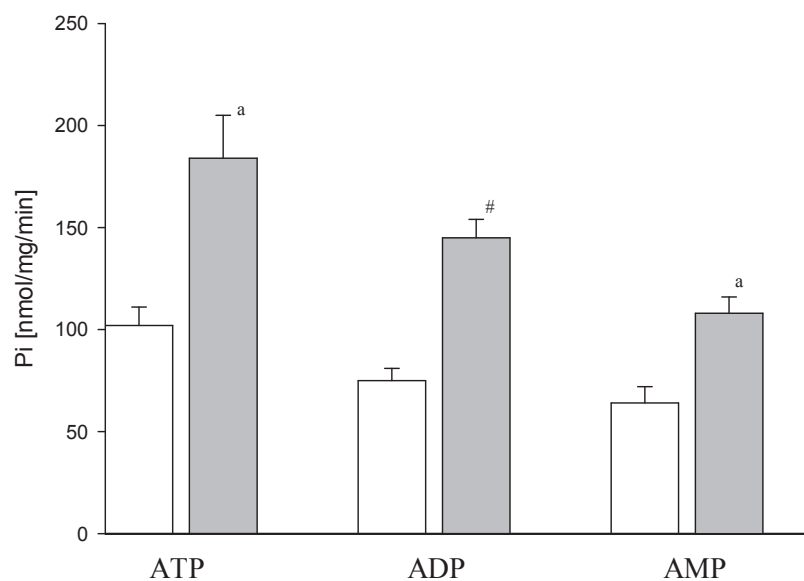
Z wcześniej publikowanych doniesień [42] wynika, że w surowicy krwi szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą, aktywność hydrolityczna względem nukleotydów adeninowych jest wyższa niż w surowicy krwi szczurów kontrolnych, a stężenie nukleotydów koreluje z aktywnością ekto – enzymów zaangażowanych w ich metabolizm. W celu sprawdzenia, czy również w nerkach szczurów z cukrzycą w dwunastym dniu po podaniu STZ dochodzi do wzrostu aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację ATP, oznaczano aktywność hydrolityczną homogenatu kory nerek oraz izolowanych błon komórkowych nerek zarówno szczurów cukrzycowych, jak i kontrolnych.

Wyniki pomiaru aktywności hydrolitycznej nerek – przedstawione na Rycinie 3 – obrazują aktywność hydrolityczną – wyrażoną prędkością uwalniania fosforanu po dodaniu substratu – kolejno ATP, ADP i AMP, do homogenatu kory nerek oraz

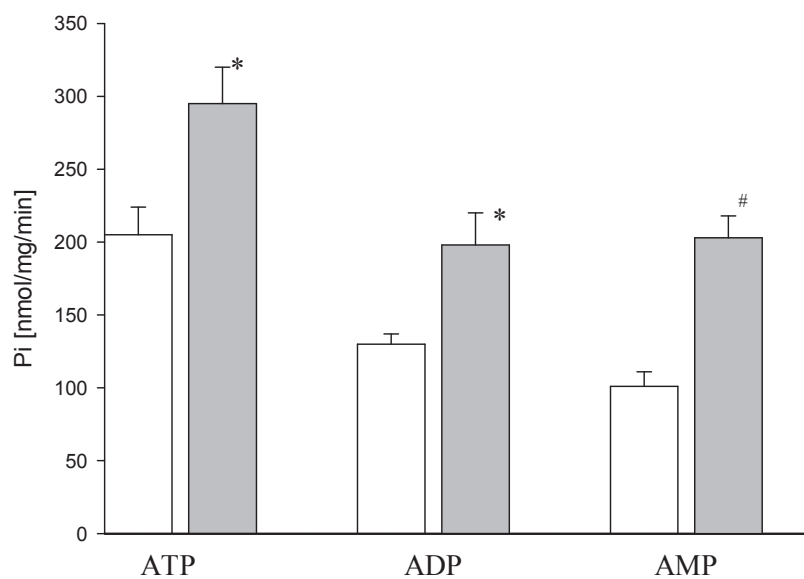
zawiesiny izolowanych błon komórkowych kory nerek. Wyniki tych doświadczeń wykazały wyraźnie ( $p < 0,01$ ) zwiększoną aktywność hydrolityczną dla ATP, ADP i AMP homogenatu (odpowiednio o 80%, 90%, 70%) oraz izolowanych błon nerek cukrzycowych (odpowiednio o 40, 50 i 100%) w porównaniu do nerek kontrolnych

Z obserwacji tych wynika, że w nerkach szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycy metabolizm pozakomórkowych nukleotydów ulega zasadniczym zmianom. Podwyższona aktywność ekto-nukleotydaz w nerkach szczurów z kilkunastodniową hiperglikemią prowadzi, prawdopodobnie, do zmiany stosunku stężeń ATP/adenozyna w płynie pozakomórkowym na rzecz adenozyne kosztem ATP. Konsekwencją tych zmian może być osłabienie, w nerkach szczurów cukrzycowych, procesów ATP-zależnych a uaktywnienie procesów zależnych od adenozyne – m.in. aktywacja mechanizmu protekcyjnego względem mikrokrążenia wewnątrznerkowego.

A.



B.



**Rycina 3. Aktywność hydrolityczna dla ATP, ADP, AMP homogenatu kory nerek (A) i błon komórkowych izolowanych z kory nerek (B) szczurów z cukrzycą (szare słupki) i kontrolnych (białe słupki).**

Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

Wyniki wyrażono jako średnia  $\pm$ SE dla  $n = 5$ .<sup>#</sup>  $p \leq 0,001$ , <sup>a</sup> $p < 0,01$ ,  $*$  $p < 0,05$  obliczono względem grupy kontrolnej.

#### **5.4. Ocena aktywności układu purynergicznego – zależnego od ATP w regulacji hemodynamiki i funkcji nerek szczurów z cukrzycą; doświadczenia klirensowe**

W modelu doświadczeń klirensowych badano - w oparciu o pomiar parametrów hemodynamiki wewnątrznerkowej i filtracji kłębuszkowej, diurezy i natriurezy – odpowiedź nerek szczurów cukrzycowych na podane do krążenia ogólnego ligandy receptorów purynowych o działaniu stymulującym receptory P2:  $\beta\gamma$ -metyleno-adenozyno-5'-trójfosforan ( $\beta\gamma$ -me-ATP), diadenozyno 5',5''-P1,P4-tetrafosforan ( $Ap_4A$ ) i 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenozyno-5'-trójfosforan (BzATP) oraz o działaniu hamującym receptory P1 8-cyklopentyl-1,3-dipropylksantyna (DPCPX) i receptory P2 6-azofenylo-2',4'-disulfonowy fosforan pirydoksalu (PPADS).

##### **5.4.1. Podstawowe parametry hemodynamiki i funkcji nerek szczurów z cukrzycą**

Skumulowane wyniki doświadczeń z okresu wstępnego (kontrolnego), zawarte w Tabeli 4, dokumentują parametry hemodynamiki oraz funkcji nerek szczurów z cukrzycą (Glu  $396 \pm 14$  mg/dl) w 12 – 14 dniu po STZ i, dla porównania, szczurów zdrowych - kontrolnych (Glu  $120 \pm 19$  mg/dl). Z danych tych wynika, że u szczurów z hiperglikemią, w czasie dożylnego wlewu 150 mM roztworu chlorku sodu (45  $\mu$ l/min), podstawowy korowy przepływ krwi (CBF) oraz prędkość przesączania kłębuszkowego (GFR) były niższe ( $p < 0,05$ ) niż w grupie szczurów z prawidłową glikemią, odpowiednio o około 18 i 25%. Podczas, gdy średnie ciśnienie krwi tętniczej (MAP) nie różniło się istotnie, i wynosiło  $115 \pm 4$  mmHg w cukrzycy i  $120 \pm 3$  mmHg w grupie kontrolnej. Natomiast, całkowity przepływ krwi (RBF) w grupie cukrzycowej, w przeliczeniu na 1 g nerki, wykazywał jedynie tendencje spadkowe. Z kolei wyliczona oporność naczyń nerkowych (RVR) była znamienne wyższa u szczurów z cukrzycą – o około 20% w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Pozostałe mierzone parametry funkcji nerek, jak MBF, diureza i natriureza w grupie szczurów cukrzycowych były w niewielkim stopniu niższe niż w grupie kontrolnej, ale nie były statystycznie znamienne. Ponadto obserwowano znamienne niższe, w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ), wydalanie azotanów/azotynów z moczem – o około 36%.

Z obserwacji tych wynika, że u szczurów z doświadczalnie wywołaną ostrą cukrzycą dochodzi do zaburzenia wewnątrznerkowej hemodynamiki, czego objawem jest wyraźnie obniżony korowy przepływ krwi i filtracja kłębuszkowa. Jedną z przyczyn obserwowanych zmian wewnątrznerkowej hemodynamiki w cukrzycy może być zwiększony opór naczyń mikrokrążenia wewnątrznerkowego, z powodu zachwiania równowagi między czynnikami wywołującymi skurcz i relaksację naczyń. Przyczyną tych zaburzeń mogą być zmiany aktywności w obrębie układu purynergicznego – zależnego od ATP, biorącego udział w regulacji mikrokrążenia wewnątrznerkowego i produkcji moczu.



**Tabela 4. Parametry hemodynamiki oraz funkcji nerek w czasie infuzji 150 mM NaCl u szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

	Grupa kontrolna (n=32)	Grupa z cukrzycą (n=35)
Glukoza (mg/dl)	120 ± 9	396 ± 14 <sup>#</sup>
Ciężar szczura (g)	231 ± 10	221 ± 11
Ciężar lewej nerki (mg)	835 ± 20	977 ± 21 <sup>#</sup>
MAP (mmHg)	120 ± 3	115 ± 4
Klirens PAH (ml/min)	6,7 ± 0,6	6,5 ± 0,6
Hematokryt (%)	40 ± 3	40 ± 2
RBF (ml/min/g nerki)	5,8 ± 0,3	4,6 ± 0,4
RVR (mmHg/ml/min/g nerki)	20,7 ± 1,3	25,0 ± 1,5*
GFR (ml/min)	1,32 ± 0,11	0,99 ± 0,05 <sup>a</sup>
CBF (PU)	627 ± 18	515 ± 25 <sup>#</sup>
MBF (PU)	189 ± 9	166 ± 9
Diureza (μl/min)	24,0 ± 2,4	19,5 ± 0,6
U <sub>Na</sub> V (μmol /min)	2,53 ± 0,21	2,57 ± 0,26

Tabela przedstawia skumulowane dane z okresu wstępnego doświadczeń klirensowych przeprowadzonych w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; RBF – przepływ krwi przez nerki; RVR – oporność naczyń nerkowych; GFR – filtracja kłębuszkowa; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; U<sub>Na</sub>V – wydalanie sodu.

Każdy wynik jest wartością średnią ± SE z 30-minutowego przedziału czasowego. <sup>#</sup>P ≤ 0,001, <sup>a</sup>P < 0,01 \*P < 0,05 obliczono względem grupy kontrolnej.

#### **5.4.2. Działanie PPADS – antagonisty receptorów P2 na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą**

Pierwszym etapem badań w kierunku oceny aktywności układu purynergicznego w nerkach szczurów z cukrzycą były doświadczenia, w których szczurom podano do krążenia ogólnego antagonistę receptorów P2 - PPADS w dawce 2,5  $\mu\text{mol/kg}$  c.c. oraz w dawce 25  $\mu\text{mol/kg}$  c.c. Działanie PPADS na hemodynamikę i funkcję nerek u szczurów z hiperglikemią porównano z jego działaniem u szczurów zdrowych. Jak przedstawiono w Tabeli 6., infuzja PPADS w dawce 2,5  $\mu\text{mol/kg}$  c.c. nie wywołała istotnych zmian hemodynamiki ani też funkcji nerek w obu grupach – badanej i kontrolnej. Jednakże infuzja PPADS w dawce 10-krotnie większej, w okresie pierwszych 30 minut po jej włączeniu szczurom cukrzycowym, spowodowała obniżenie GFR (średnio o około 28%,  $p < 0,01$ ) oraz CBF (średnio o 15%;  $p < 0,01$ ) wywołując jedynie tendencję spadkową MBF. Zmianom tym towarzyszył około 2-krotny wzrost frakcyjnego wydalanie jonów sodu i objętości moczu. Podobne zmiany hemodynamiki i funkcji wydalniczej nerek obserwowano, gdy PPADS podano zdrowym szczurom (Tabela 5, Rycina 4 i 5). Należy podkreślić, że w obu grupach zwierząt ciśnienie tętnicze (MAP) w przebiegu tych doświadczeń utrzymywało się na w miarę stałym poziomie.

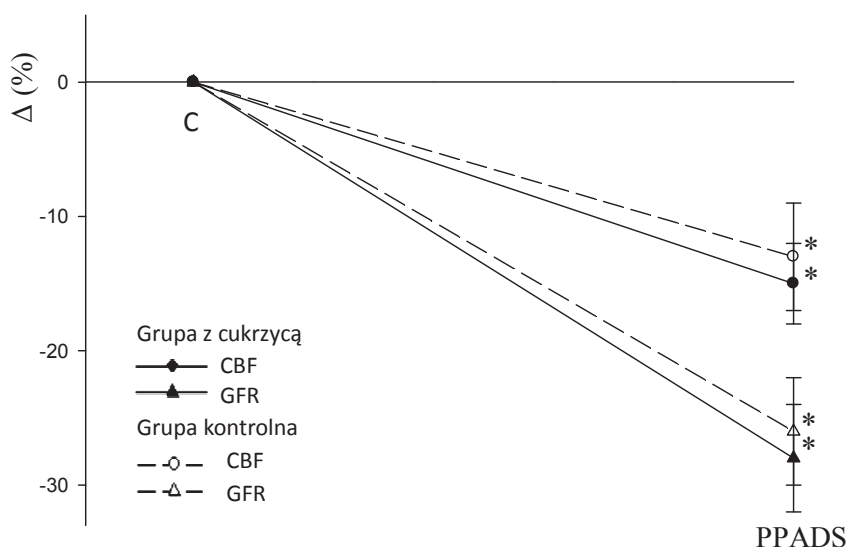
Z doświadczeń tych wynika, że w kilkunastodniowej, doświadczalnie wywołanej cukrzycy, podobnie jak u zwierząt zdrowych, PPADS – nieselektywny inhibitor receptorów P2 – hamuje wewnątrznerkowy przepływ krwi – głównie w części korowej – oraz tempo filtracji kłębuszkowej, prawdopodobnie poprzez zwiększenie oporu naczyń mikrokrążenia wewnątrznerkowego. Ponadto, PPADS hamuje wchłanianie zwrotne sodu i wody w takim samym stopniu w nerkach szczurów z cukrzycą, jak i szczurów zdrowych.

**Tabela 5. Wpływ antagonisty receptorów P2 – PPADS na hemodynamikę i funkcje nerek szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

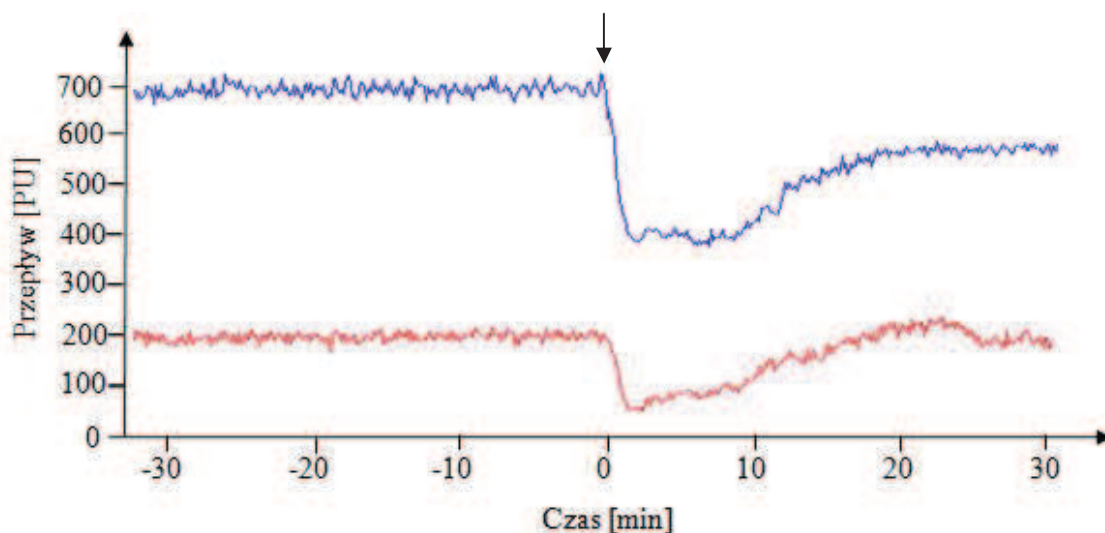
PPADS ( $\mu\text{mol/kg}$ c.c)		MAP (mmHg)	CBF (PU)	MBF (PU)	GFR (ml/min)	V ( $\mu\text{l/min}$ )	$U_{\text{NaV}}$ ( $\mu\text{mol/min}$ )
<b>Grupa kontrolna (Glu 105<math>\pm</math>7 mg/dl)</b>							
0	C	116 $\pm$ 3	688 $\pm$ 15	195 $\pm$ 13	1,23 $\pm$ 0,08	30,5 $\pm$ 5,2	2,55 $\pm$ 0,35
	E	115 $\pm$ 4	695 $\pm$ 19	189 $\pm$ 16	1,30 $\pm$ 0,08	32,5 $\pm$ 6,0	2,33 $\pm$ 0,29
2,5	C	129 $\pm$ 4	700 $\pm$ 26	193 $\pm$ 14	1,17 $\pm$ 0,09	29,6 $\pm$ 4,9	2,72 $\pm$ 0,31
	E	127 $\pm$ 3	712 $\pm$ 28	201 $\pm$ 16	1,12 $\pm$ 0,07	30,7 $\pm$ 5,0	3,21 $\pm$ 0,30
25	C	113 $\pm$ 3	685 $\pm$ 20	216 $\pm$ 15	1,26 $\pm$ 0,06	33,3 $\pm$ 5,2	2,09 $\pm$ 0,28
	E	110 $\pm$ 4	599 $\pm$ 20*	208 $\pm$ 18	0,93 $\pm$ 0,07*	44,5 $\pm$ 6,7	3,98 $\pm$ 0,59*
<b>Grupa z cukrzycą (Glu 399<math>\pm</math>18)</b>							
0	C	105 $\pm$ 4	565 $\pm$ 21	145 $\pm$ 17	1,19 $\pm$ 0,09	19,6 $\pm$ 2,0	2,55 $\pm$ 0,49
	E	108 $\pm$ 3	575 $\pm$ 22	149 $\pm$ 18	1,17 $\pm$ 0,08	20,3 $\pm$ 3,3	2,63 $\pm$ 0,55
2,5	C	116 $\pm$ 4	580 $\pm$ 20	136 $\pm$ 16	1,13 $\pm$ 0,16	21,6 $\pm$ 5,2	1,99 $\pm$ 0,48
	E	117 $\pm$ 4	607 $\pm$ 21	140 $\pm$ 17	1,01 $\pm$ 0,08	22,5 $\pm$ 6,0	2,86 $\pm$ 0,80
25	C	103 $\pm$ 3	552 $\pm$ 28	144 $\pm$ 12	1,04 $\pm$ 0,04	20,3 $\pm$ 3,6	3,64 $\pm$ 0,55
	E	107 $\pm$ 4	468 $\pm$ 26*	136 $\pm$ 11	0,75 $\pm$ 0,08*	30,9 $\pm$ 5,6	5,64 $\pm$ 0,64*

Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; RPF – przepływ osocza przez nerki; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; GFR – filtracja kłębuszkowa; V – objętość wydalonego moczu;  $U_{\text{NaV}}$  – wydalanie sodu; Glu – stężenie glukozy we krwi pełnej. Każdy wynik jest wartością średnią  $\pm$  SE dla  $n = 6$  z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C) oraz po podaniu PPADS (E) w dawce 0; 2,5; 25  $\mu\text{mol/kg}^{-1}$  c.c. \* $P < 0,05$  obliczono względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



**Rycina 4. Zmiany korowego przepływu krwi (CBF) i filtracji kłębuszkowej (GFR) po podaniu PPADS (25  $\mu\text{mol/kg}$  c.c. *iv*) u szczurów z cukrzycą i kontrolnych. Wyniki wyrażono w procentach zmian w odniesieniu do wartości wyjściowych (C). Każdy punkt jest wartością średnią  $\pm$  SE dla  $n = 6$  z 30-minutowego przedziału czasowego. \* $p < 0,05$  obliczone względem odpowiednich wartości wyjściowych.**



**Rycina 5. Oryginalne zapisy korowego (niebieska linia) i rdzeniowego przepływu krwi przez nerkę (czerwona linia) w czasie doświadczenia klirensowego przeprowadzonego na szczurze z cukrzycą przed i po podaniu ( $\downarrow$ ) PPADS w dawce 25  $\mu\text{mol/kg}$  c.c.**

### 5.4.3. Działanie pochodnych ATP – agonistów receptor P2X na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą

Kolejnym etapem badań była ocena wrażliwości nerek szczurów cukrzycowych, w porównaniu do zdrowych (kontrolnych), na działanie egzogennych agonistów receptorów P2. Jak przedstawiono w Tabeli 6., agonista receptorów P2X, o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>1</sub>  $\beta\gamma$ -meATP w dawce 2  $\mu$ mol + 20 nmol/min/kg u zwierząt kontrolnych podwyższył CBF, średnio o 11 % ( $p < 0,01$ ) nie zmieniając w istotny sposób MAP, zredukował GFR, średnio o około 14 % ( $p < 0,01$ ) jednocześnie zwiększył ponad 2-krotnie diurezę ( $p < 0,05$ ) oraz wydalanie sodu z moczem ( $p < 0,05$ ). Natomiast,  $\beta\gamma$ -meATP podany w dawce jw. szczurom z cukrzycą nie spowodował żadnych statystycznie istotnych zmian w zakresie mierzonych parametrów (Tabela 6, Rycina 6).

Z kolei inny analog ATP – BzATP – agonista receptorów o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>7</sub>, podany do krążenia ogólnego szczurom z cukrzycą w dawce 0,2  $\mu$ mol/kg + 2 nmol/kg/min, nie zmieniając MAP podwyższył CBF, średnio o 12% ( $p < 0,05$ ), oraz obniżył GFR, o około 17% ( $p < 0,05$ ). Jednakże, związek ten podany szczurom zdrowym, w tej samej dawce co szczurom z cukrzycą, nie zmienił w istotny sposób przepływu krwi i tempa filtracji kłębuszkowej (Tabela 7, Rycina 7).

Wyniki tych doświadczeń wskazują, że w nerkach szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą dochodzi do zmian w obrębie układu purynergicznego – zależnego od ATP: maleje udział receptorów P2X<sub>1</sub> w inicjowaniu zmian hemodynamiki wewnątrznerkowej a wzrasta udział receptorów P2X<sub>7</sub>.

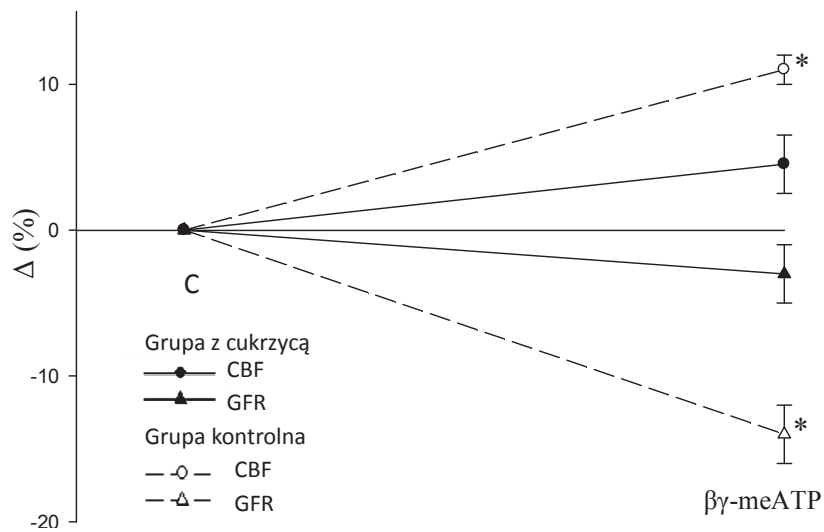
**Tabela 6. Wpływ agonisty receptorów P2X<sub>1</sub> – βγ-metylenoATP na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

		MAP (mmHg)	CBF (PU)	MBF (PU)	GFR (ml/min)	V (μl/min)	U <sub>Na</sub> V (μmol/min)
<b>Grupa kontrolna (Glu 106±8)</b>							
NaCl 150mM	C	115±4	565±21	145±17	1,19±0,09	16,5±1,6	2,55±0,49
	E	111±3	575±22	149±18	1,17±0,08	14,3±1,9	2,63±0,55
βγmeATP	C	124±3	580±10	206±5	1,30±0,05	13,4±1,7	1,20±0,11
	E	118±4	644±16*	202±4	1,12±0,06*	28,6±3,7*	1,99±0,21*
<b>Grupa z cukrzycą (Glu 381±20)</b>							
NaCl 150mM	C	115±4	556±19	187±16	0,86±0,09	19,5±2,7	2,73±0,35
	E	116±3	569±21	175±15	0,79±0,08	17,1±2,1	2,79±0,29
βγmeATP	C	120±3	598±22	191±16	0,73±0,07	18,4±3,1	2,58±0,32
	E	112±5	625±22	194±16	0,71±0,08	18,9±1,9	2,59±0,31

Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; GFR – filtracja kłębuszkowa; V – objętość wydalonego moczu; U<sub>Na</sub>V – wydalanie sodu.

Każdy wynik jest wartością średnią ± SE dla n = 6 z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C) oraz po podaniu βγ-metylenoATP (E) w dawce 2 μmol/kg c.c. + 20 nmol/kg/min. \*p < 0,05 obliczono względem odpowiedniego okresu kontrolnego.



**Rycina 6. Zmiany korowego przepływu krwi przez nerkę (CBF) i filtracji kłębuszkowej (GFR) po podaniu  $\beta\gamma$ -metylenoATP ( $2 \mu\text{mol/kg c.c.} + 20 \text{ nmol/kg/min iv}$ ) u szczurów z cukrzycą i kontrolnych.** Wyniki wyrażono jako procent zmian w odniesieniu do wartości wyjściowych (C). Każdy punkt jest wartością średnią  $\pm$  SE dla  $n = 6$  z 30-minutowego przedziału czasowego. \* $p < 0,05$  obliczone względem odpowiednich wartości wyjściowych.

**Tabela 7. Wpływ agonisty receptorów P2X<sub>7</sub>– benzoilbenzoiloATP (BzATP) na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą**

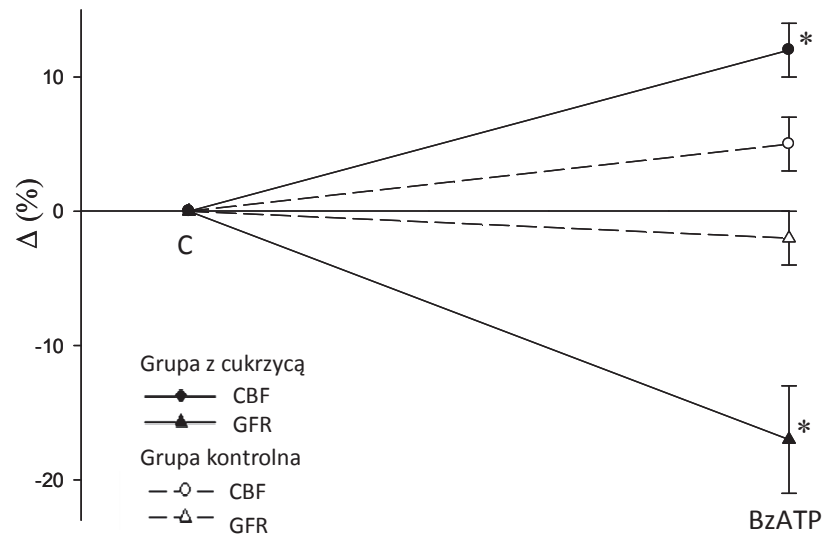
		MAP (mmHg)	CBF (PU)	MBF (PU)	GFR (ml/min)	V ( $\mu$ l/min)	U <sub>Na</sub> V ( $\mu$ mol/min)
<b>Grupa kontrolna (Glu 112<math>\pm</math>5)</b>							
NaCl	C	124 $\pm$ 3	623 $\pm$ 19	199 $\pm$ 9	1,09 $\pm$ 0,08	26,5 $\pm$ 1,9	2,56 $\pm$ 0,38
150mM	E	121 $\pm$ 4	609 $\pm$ 20	207 $\pm$ 14	1,12 $\pm$ 0,09	28,8 $\pm$ 1,5	2,66 $\pm$ 0,42
BzATP	C	133 $\pm$ 3	669 $\pm$ 23	212 $\pm$ 15	0,90 $\pm$ 0,06	22,2 $\pm$ 5,9	3,51 $\pm$ 0,59
	E	132 $\pm$ 3	698 $\pm$ 23	228 $\pm$ 12	0,88 $\pm$ 0,09	30,0 $\pm$ 4,1	4,61 $\pm$ 0,53
<b>Grupa z cukrzycą (Glu 394<math>\pm</math>19)</b>							
NaCl	C	119 $\pm$ 5	432 $\pm$ 29	178 $\pm$ 10	0,98 $\pm$ 0,06	18,2 $\pm$ 1,2	2,37 $\pm$ 0,33
150mM	E	122 $\pm$ 4	441 $\pm$ 26	183 $\pm$ 8	0,99 $\pm$ 0,08	19,6 $\pm$ 1,5	2,09 $\pm$ 0,49
BzATP	C	123 $\pm$ 2	374 $\pm$ 36	132 $\pm$ 5	1,12 $\pm$ 0,11	19,5 $\pm$ 1,4	1,65 $\pm$ 0,56
	E	123 $\pm$ 2	417 $\pm$ 30*	139 $\pm$ 7	0,93 $\pm$ 0,06*	19,5 $\pm$ 0,9	1,71 $\pm$ 0,53

Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; GFR – filtracja kłębuszkowa; V – objętość wydalonego moczu; U<sub>Na</sub>V – wydalanie sodu, Glu – stężenie glukozy we krwi.

Każdy wynik jest wartością średnią  $\pm$  SE dla n=6 z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C) oraz po podaniu BzATP (E) w dawce 0,2  $\mu$ mol/kg c.c.+ 2 nmol/kg/min. \*P < 0,05 obliczono względem odpowiedniego okresu kontrolnego.





**Rycina 7. Zmiany korowego przepływu krwi przez nerkę (CBF) i filtracji kłębuszkowej (GFR) po podaniu BzATP (0,2  $\mu\text{mol/kg}$  c.c. + 2 nmol/kg/min *iv*) u szczurów z cukrzycą i kontrolnych.** Wyniki wyrażono w procentach zmian w odniesieniu do wartości wyjściowych (C). Każdy punkt jest wartością średnią  $\pm$  SE dla  $n = 6$  z 30-minutowego przedziału czasowego; dla każdej z grup. \* $P < 0,05$  obliczone względem odpowiednich wartości wyjściowych.

#### **5.4.4. Działanie di-adenozyno-tetrafosforanu (Ap<sub>4</sub>A) – naturalnego agonisty receptorów P2 na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą**

Doświadczenia z użyciem stosunkowo dużej dawki PPADS wykazały, że podany do krążenia ogólnego nieselektywny inhibitor receptorów P2 (P2Y i P2X) spowalnia korowy przepływ krwi i tempo filtracji kłębuszkowej, i to zarówno w doświadczalnie wywołanej cukrzycy jak i u szczurów zdrowych. Zatem postawiono pytanie: Jaka będzie odpowiedź nerek szczurów z cukrzycą na podany do krążenia ogólnego nieselektywnego, naturalnego agonisty receptorów P2 – Ap<sub>4</sub>A?

Doświadczenia z użyciem Ap<sub>4</sub>A, w dawce 2 μmol/kg + 20 nmol/min/kg *iv*, wykazały (Tabela 8), znamienne wzrost CBF, w okresie pełnej stabilizacji – czyli po około 5 minutach, o około 11% bez istotnych zmian MAP, redukcję GFR – średnio o 27%, oraz zwiększenie, niespełna 2-krotnie, frakcyjnego wydalania sodu z moczem. Podczas gdy, u szczurów z cukrzycą podany Ap<sub>4</sub>A (w dawce jw.) – w okresie pełnej stabilizacji – nie wywołał istotnych zmian CBF, MBF, GFR ani też zmian diurezy i natriurezy (Tabela 8, Rycina 8).

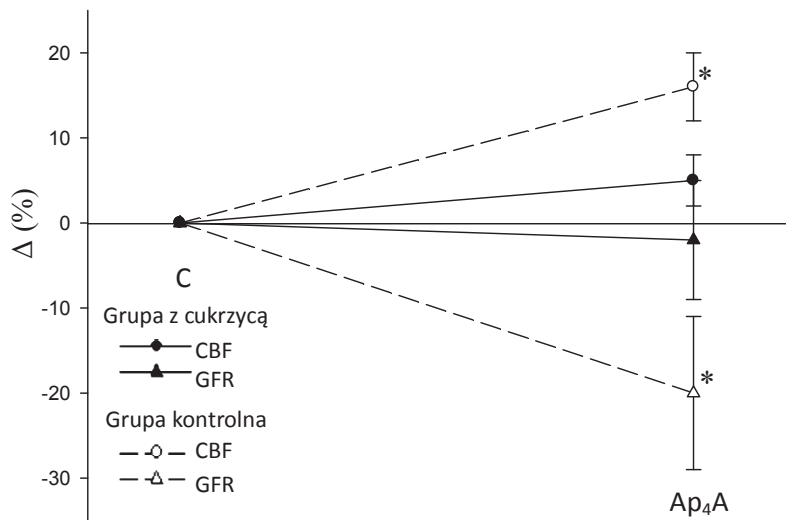
Z doświadczeń tych wynika, że nerki szczurów cukrzycowych, przeciwnie do szczurów zdrowych, są niewrażliwe na działanie Ap<sub>4</sub>A – naturalnego aktywatora receptorów P2 (P2X i P2Y). Jednakże, w doświadczeniach tych odnotowano różnice w przebiegu zmian hemodynamiki wewnątrznerkowej u szczurów z cukrzycą, w porównaniu do szczurów zdrowych, w okresie pierwszych kilku minut po włączeniu Ap<sub>4</sub>A. Analizując oryginalny zapis korowego i rdzeniowego przepływu krwi (Rycina 9) widać wyraźny spadek, a następnie wzrost przepływu do wartości wyjściowych – zarówno przez część korową jak i rdzeniową nerki, w pierwszych 5 minutach po włączeniu Ap<sub>4</sub>A. Przeciwnie do tych obserwacji, u szczurów kontrolnych przebieg krzywej zmian po podaniu Ap<sub>4</sub>A obrazuje głównie wzrost przepływu krwi przez korę nerki, bez istotnych zmian w części rdzeniowej nerki.

**Tabela 8. Wpływ agonisty receptorów P2 – Ap<sub>4</sub>A na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

		MAP (mmHg)	CBF (PU)	MBF (PU)	GFR (ml/min)	V ( $\mu$ l/min)	U <sub>Na</sub> V ( $\mu$ mol/min)
<b>Grupa kontrolna (Glu 106<math>\pm</math>8)</b>							
NaCl	C	115 $\pm$ 4	565 $\pm$ 21	145 $\pm$ 17	1,19 $\pm$ 0,09	16,5 $\pm$ 1,6	2,55 $\pm$ 0,49
150mM	E	111 $\pm$ 3	575 $\pm$ 22	149 $\pm$ 18	1,17 $\pm$ 0,08	14,3 $\pm$ 1,9	2,63 $\pm$ 0,55
	C	113 $\pm$ 4	615 $\pm$ 13	194 $\pm$ 20	1,84 $\pm$ 0,19	27,9 $\pm$ 3,9	3,02 $\pm$ 0,17
Ap <sub>4</sub> A	E	111 $\pm$ 4	711 $\pm$ 19*	209 $\pm$ 19	1,33 $\pm$ 0,14*	28,8 $\pm$ 3,0	3,65 $\pm$ 0,18*
<b>Grupa z cukrzycą (Glu 400<math>\pm</math>19)</b>							
NaCl	C	115 $\pm$ 4	506 $\pm$ 19	187 $\pm$ 16	0,86 $\pm$ 0,09	19,5 $\pm$ 2,7	2,73 $\pm$ 0,35
150mM	E	116 $\pm$ 3	511 $\pm$ 21	175 $\pm$ 15	0,79 $\pm$ 0,08	17,1 $\pm$ 2,1	2,79 $\pm$ 0,29
	C	117 $\pm$ 3	449 $\pm$ 16	196 $\pm$ 19	0,98 $\pm$ 0,04	18,9 $\pm$ 2,8	1,05 $\pm$ 0,44
Ap <sub>4</sub> A	E	115 $\pm$ 3	468 $\pm$ 18	202 $\pm$ 20	1,03 $\pm$ 0,07	24,6 $\pm$ 3,4	1,46 $\pm$ 0,58

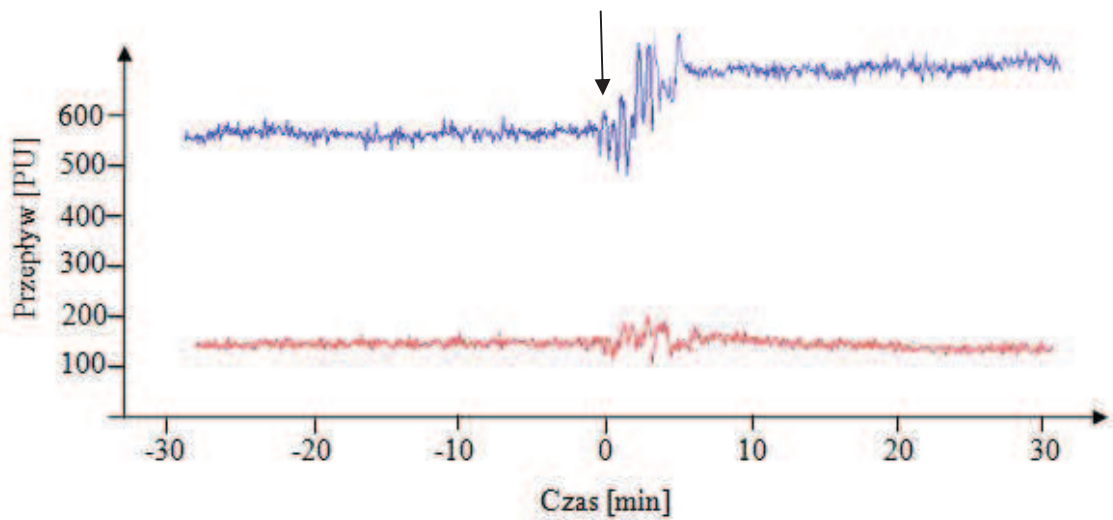
Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; GFR – filtracja kłębuszkowa; V – objętość wydalonego moczu; U<sub>Na</sub>V – wydalanie sodu. Każdy wynik jest wartością średnią  $\pm$  SE dla n = 6 z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C) oraz po podaniu Ap<sub>4</sub>A (E) w dawce 2  $\mu$ mol/kg c.c.+ 20 nmol/kg/min. \*p < 0,05 obliczono względem odpowiedniego okresu kontrolnego.

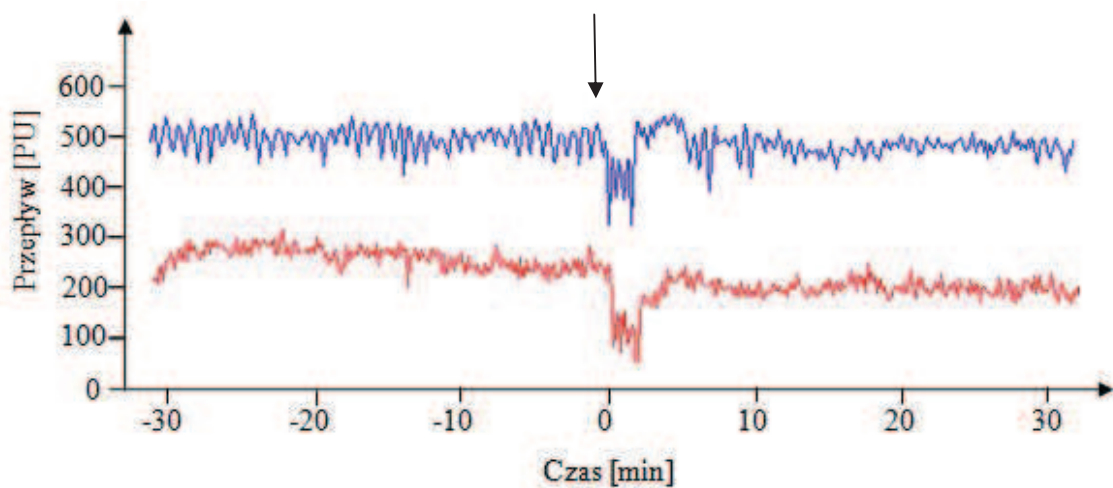


**Rycina 8. Zmiany korowego przepływu krwi przez nerkę (CBF) i filtracji kłębuszkowej (GFR) po podaniu Ap<sub>4</sub>A (2 μmol/kg c.c. + 20 nmol/kg/min *iv*) u szczurów z cukrzycą i kontrolnych.** Wyniki wyrażono w procentach zmian w odniesieniu do wartości wyjściowych (C). Każdy punkt jest wartością średnią ± SE dla n = 6 z 30-minutowego przedziału czasowego. \* p < 0,05 obliczone względem odpowiednich wartości wyjściowych.

A.



B.



**Rycina 9. Oryginalne zapisy korowego (niebieska linia) i rdzeniowego przepływu krwi przez nerkę (czerwona linia) w czasie doświadczenia klirensowego przeprowadzonego na szczurze zdrowym (A) i szczurze z cukrzycą (B) przed i po podaniu (↓) Ap<sub>4</sub>A w dawce 2 μmol/kg c.c.+ 20 nmol/kg/min.**

#### 5.4.5. Działanie Ap<sub>4</sub>A na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów cukrzycowych w czasie dożylniej infuzji antagonisty receptorów P1 – DPCPX

Podwyższony poziom endogennej adenozyiny w nerkach szczurów cukrzycowych (Tabela 3) oraz możliwa częściowa hydroliza Ap<sub>4</sub>A do adenozyiny – nukleozydu o silnych właściwościach naczynioruchowych i modyfikujących kanalikowy transport wody i jonów za pośrednictwem receptorów P1 (A<sub>1</sub> i/lub A<sub>2</sub>), może oddziaływać hamująco w stosunku do receptorów P2 – wrażliwych na Ap<sub>4</sub>A.

Aby odpowiedzieć na pytanie: Czy blokowanie receptorów P1– frakcji A<sub>1</sub> poprzez dożylny wlew DPCPX – zmieni odpowiedź nerek szczurów z cukrzycą na podawany im Ap<sub>4</sub>A – przeprowadzono serię doświadczeń, w których Ap<sub>4</sub>A (w dawce j.w.) podawano w czasie dożylniej infuzji DPCPX w dawce jednorazowej 100 µg/kg c.c. oraz w dawce podtrzymującej 10 µg/min/kg c.c. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zawarte w Tabeli 9 – stanowią wartości średnie z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C<sub>0</sub>), w czasie infuzji DPCPX (E<sub>1</sub>) oraz po podaniu Ap<sub>4</sub>A (E<sub>2</sub>). Dożylna infuzja DPCPX szczurom kontrolnym nie zmieniła w zamienny sposób przepływu krwi przez korę (CBF) i rdzeń nerki (MBF), nie zmienia też GFR, a podany w czasie tej infuzji Ap<sub>4</sub>A obniżył GFR – średnio aż o około 30% – w odniesieniu do wartości wyjściowych (Rycina 10). Podczas gdy u szczurów z cukrzycą infuzja DPCPX podwyższyła – średnio o 7% – CBF, a podany Ap<sub>4</sub>A wywołał dalszy wzrost – średnio o 10%. Jednocześnie, u tych zwierząt Ap<sub>4</sub>A podany w czasie infuzji DPCPX obniżył GFR o ponad 10% (Tabela 9; Rycina 10).

Ponadto, w czasie infuzji DPCPX obserwowano w obu grupach zwierząt znamienne podwyższenie objętości wydalanego moczu i ilości sodu z moczem. Jednakże wzrost diurezy był około 3-krotny w grupie kontrolnej i około 1,5-krotny w grupie cukrzycowej, a włączenie Ap<sub>4</sub>A wywołało redukcję diurezy i natriurezy do wartości wyjściowych, jednakże tylko w grupie szczurów kontrolnych.

Rycina 11 i 12 obrazują dynamikę zmian MAP, CBF i GFR oraz diurezę (V) i wydalanie sodu (U<sub>Na</sub>V) w dziesięcio-minutowych odstępach – przed włączeniem DPCPX (okres wstępny) w czasie infuzji DPCPX oraz po włączeniu Ap<sub>4</sub>A.

Z przebiegu krzywych widać wyraźnie, że u szczurów cukrzycowych po podaniu Ap<sub>4</sub>A w czasie infuzji DPCPX doszło do wzrostu przepływu krwi przez korę nerek (CBF). Podczas gdy u szczurów zdrowych ten efekt działania Ap<sub>4</sub>A został zniesiony przez

DPCPX. W obu grupach szczurów, bezpośrednio po podaniu  $Ap_4A$  obserwowano krótkotrwały spadek MAP i jednoczesny spadek CBF, bardziej zaznaczony w grupie szczurów kontrolnych.

Infuzja DPCPX u szczurów cukrzycowych wywołała krótkotrwały wzrost tempa filtracji kłębuszkowej, a podany  $Ap_4A$  wywołał niewielki, jednakże statystycznie znamienne spadek GFR. Podczas gdy u szczurów zdrowych spadek tempa filtracji kłębuszkowej po podaniu  $Ap_4A$  w czasie blokowania receptorów  $A_1$  był dużo większy niż, gdy  $Ap_4A$  podano w czasie infuzji 150 mM roztworu NaCl.

Z doświadczeń tych wynika, że endogenna adenozyina – poprzez receptory  $A_1$  – modyfikuje działanie  $Ap_4A$  – agonisty receptorów  $P_2$  – na hemodynamikę i funkcję nerek. U szczurów zdrowych adenozyina ogranicza hamujące działanie  $Ap_4A$  na prędkość przesączania kłębuszkowego. Podczas, gdy w cukrzycy endogenna adenozyina czyni nerki niewrażliwe na działanie  $Ap_4A$ , bowiem blokowanie receptorów  $A_1$  uwrażliwiło nerki na działanie  $Ap_4A$ , czego objawem był wzrost CBF i spadek GFR – porównywalny do zmian wywołanych infuzją  $Ap_4A$  u szczurów kontrolnych.

Endogenna adenozyina – poprzez receptory  $A_1$  – stymuluje wchłanianie zwrotne sodu i wody, jednakże w znacznie mniejszym stopniu u szczurów cukrzycowych niż u szczurów zdrowych.

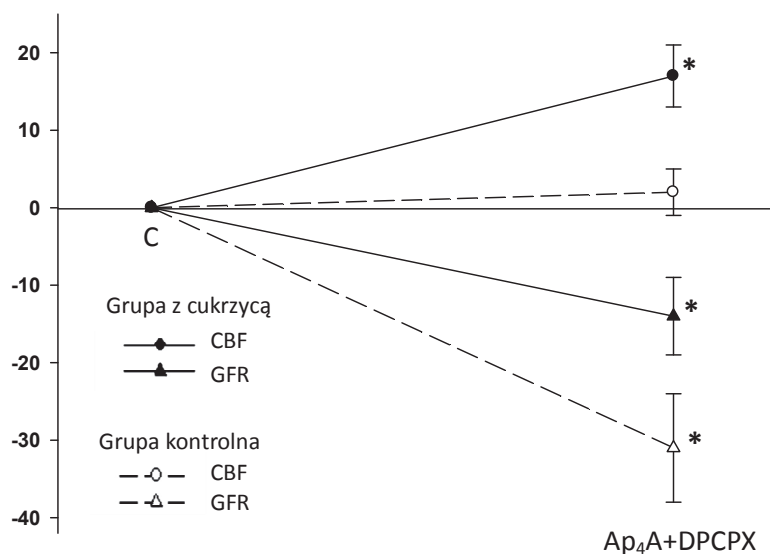
**Tabela 9. Wpływ DPCPX i Ap4A na hemodynamikę i funkcję nerek szczurów z hiperglikemią**

	MAP (mmHg)	CBF (PU)	MBF (PU)	GFR (ml/min)	V ( $\mu$ l/min)	$U_{Na}V$ ( $\mu$ mol/min)
<b>Grupa kontrolna (n=5)</b>						
C	114 $\pm$ 4	626 $\pm$ 19	162 $\pm$ 19	1,23 $\pm$ 0,08	51 $\pm$ 5	3,06 $\pm$ 0,22
E1	115 $\pm$ 4	614 $\pm$ 20	135 $\pm$ 15	1,16 $\pm$ 0,09	144 $\pm$ 15*	6,43 $\pm$ 0,84*
E2	117 $\pm$ 3	610 $\pm$ 21	140 $\pm$ 19	0,77 $\pm$ 0,10*	37 $\pm$ 8*	2,76 $\pm$ 0,76*
<b>Grupa z cukrzycą (n=5)</b>						
C	111 $\pm$ 4	424 $\pm$ 15	114 $\pm$ 16	1,07 $\pm$ 0,03	43 $\pm$ 4	1,63 $\pm$ 0,68
E1	110 $\pm$ 4	453 $\pm$ 19	113 $\pm$ 18	1,06 $\pm$ 0,05	68 $\pm$ 7*	3,89 $\pm$ 0,70*
E2	115 $\pm$ 3	497 $\pm$ 20*	118 $\pm$ 21	0,91 $\pm$ 0,04	57 $\pm$ 12	2,21 $\pm$ 0,76

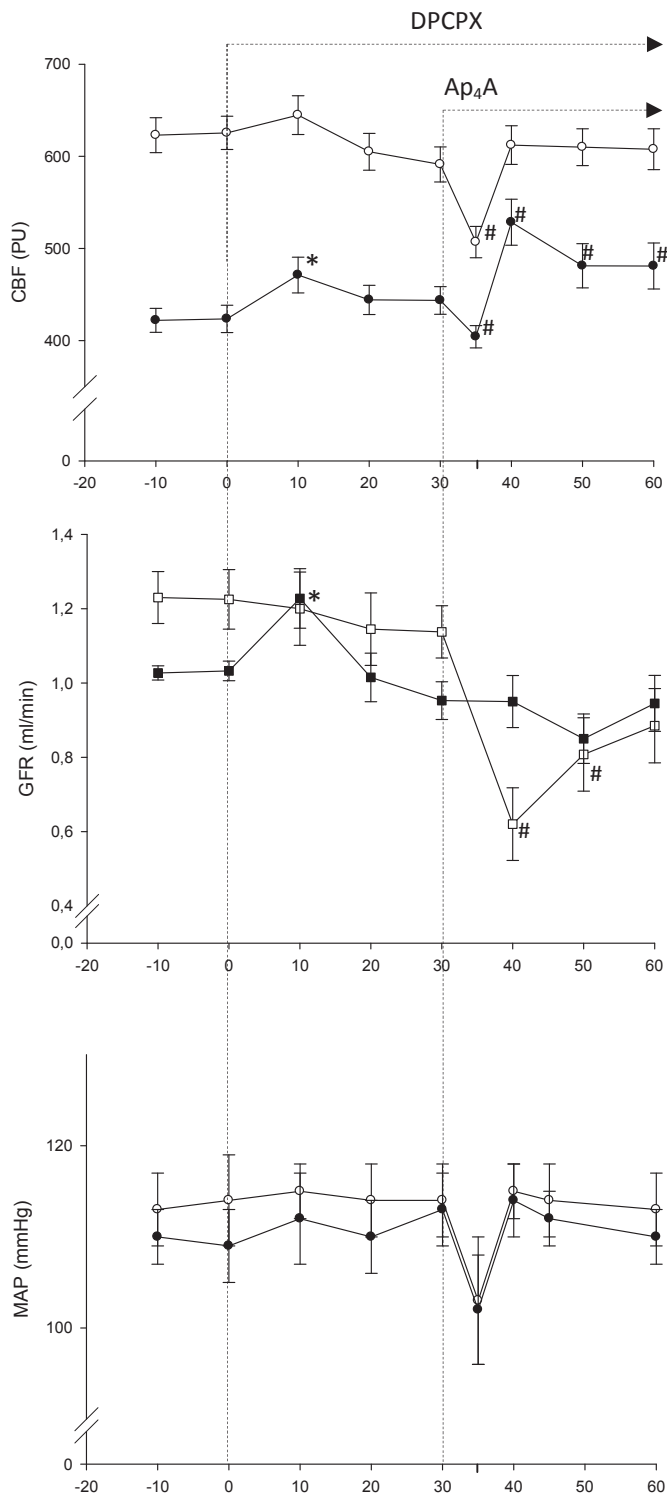
Badanie przeprowadzono w 12–14 dniu po podaniu streptozotocyny (65 mg/kg c.c.) lub buforu cytrynianowego.

*Objaśnienia:* MAP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; CBF – korowy przepływ krwi przez nerkę; MBF – rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę; GFR – filtracja kłębuszkowa; V – objętość wydalonego moczu w ciągu jednej minuty;  $U_{Na}V$  – wydalanie sodu. Każdy wynik jest wartością średnią  $\pm$  SE z 30-minutowych okresów: kontrolnego (C) oraz w czasie podawania DPCPX w dawce 100  $\mu$ g/kg + 10  $\mu$ g/kg/min (E1) i Ap<sub>4</sub>A w dawce 2  $\mu$ mol/kg c.c. + 20 nmol/kg/min razem z DPCPX w dawce 10  $\mu$ g/kg/min (E2). \*P < 0,05 obliczono względem okresu poprzedzającego.



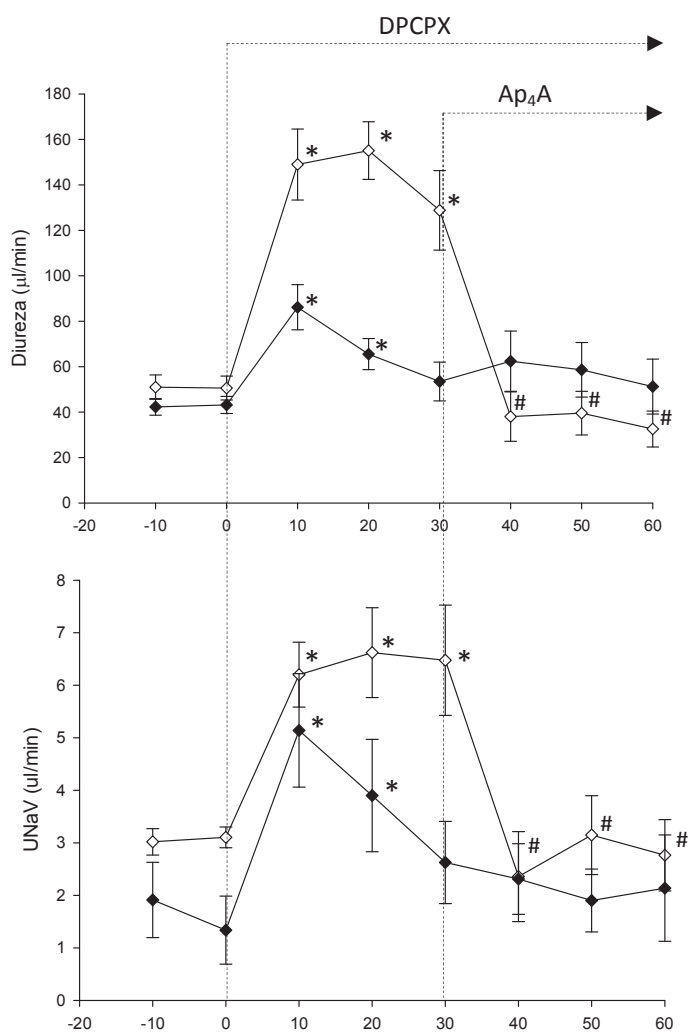


**Rycina 10. Zmiany korowego przepływu krwi przez nerkę (CBF) i filtracji kłębuszkowej (GFR) po podaniu Ap<sub>4</sub>A (2 μmol/kg c.c. + 20 nmol/kg/min *iv*) w czasie infuzji DPCPX (100 μg/kg + 10 μg/kg/min) u szczurów z cukrzycą i kontrolnych. Wyniki przedstawiają zmiany, wyrażone w procentach w odniesieniu do wartości wyjściowych (C). Każdy punkt jest wartością średnią ± SE z 30-minutowego przedziału czasowego; n = 5 dla każdej z grup. \*P < 0,05 obliczone względem odpowiednich wartości wyjściowych.**



**Rycina 11. Zmiany korowego przepływu krwi (CBF), filtracji kłębuszkowej (GFR) i średniego ciśnienia tętniczego (MAP) w czasie infuzji DPCPX i Ap<sub>4</sub>A.**

Po okresie kontrolnym podawano DPCPX w dawce 100  $\mu\text{g}/\text{kg} + 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . Dodatkowo w 30 minucie podawano Ap<sub>4</sub>A w dawce 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  c.c.+ 20  $\text{nmol}/\text{kg}/\text{min}$ . Każdy wynik jest wartością średnią  $\pm$  SE dla  $n = 5$  z 10-minutowych. \* $P < 0,05$  obliczono względem okresu kontrolnego. # $P < 0,05$  obliczono względem okresu, w którym podawano DPCX.



**Rycina 12. Zmiany diurezy i wydalenie sodu z moczem w czasie infuzji DPCPX i Ap<sub>4</sub>A.**

Po okresie kontrolnym podawano DPCPX w dawce 100 µg/kg + 10 µg/kg/min. Dodatkowo w 30 minucie podawano Ap<sub>4</sub>A w dawce 2 µmol/kg c.c. + 20 nmol/kg/min. Każdy wynik jest wartością średnią ± SE dla n = 5 z 10-minutowych okresów. \*P < 0,05 obliczono względem okresu kontrolnego. #P < 0,05 obliczono względem okresu, w którym podawano DPCPX.

### 5.5. Wpływ analogów ATP i Ap<sub>4</sub>A na objętość inulinową kłębuszków nerkowych (GIS) szczurów z cukrzycą

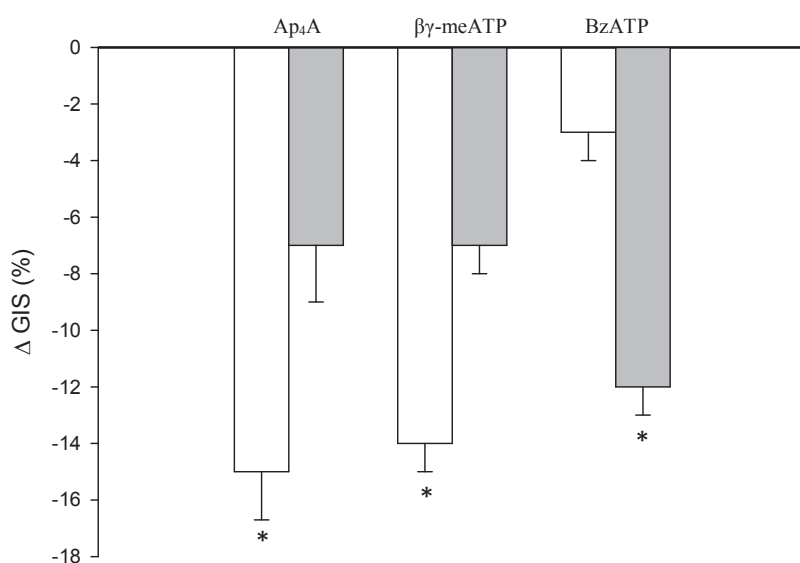
W oparciu o pomiar objętości przestrzeni inulinowej izolowanych kłębuszków nerkowych (GIS) oceniano stopień ich obkurczenia pod wpływem testowanych agonistów receptorów P2 dodanych do środowiska inkubacyjnego. Jak przedstawiono w Tabeli 10 i Rycinie 13 objętość inulinowa kłębuszków izolowanych z nerek szczurów kontrolnych uległa redukcji w obecności 1  $\mu$ M Ap<sub>4</sub>A oraz  $\beta,\gamma$ -meATP o odpowiednio 15 i 14%, podczas gdy 1  $\mu$ M BzATP nie zmienił GIS w istotny sposób. Przeciwnie do tych obserwacji, kłębuszki izolowane z nerek szczurów cukrzycowych, inkubowane z 1  $\mu$ M BzATP uległy obkurczeniu – średnio o 12 % ( $p < 0,05$ ). Z kolei działanie redukujące GIS zarówno w obecności Ap<sub>4</sub>A jak i  $\beta,\gamma$ meATP było znacznie osłabione, i wynosiło zaledwie 7%.

Na podstawie powyższych obserwacji można wnioskować, że kłębuszki izolowane z nerek szczurów cukrzycowych – w porównaniu do kontrolnych są mniej wrażliwe na obkurczające działanie zarówno agonisty o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>1</sub>, jak i nieselektywnego agonisty P2X i P2Y. Z kolei, kilkunastodniowa doświadczalnie wywołana cukrzyca uwrażliwia kłębuszki na działanie agonisty o dużym powinowactwie do receptorów P2X<sub>7</sub>.

**Tabela 10. Wpływ Ap<sub>4</sub>A,  $\beta,\gamma$ -meATP i BzATP na objętość inulinową izolowanych kłębuszków nerkowych (GIS) szczurów z cukrzycą i kontrolnych**

Środowisko inkubacyjne	Grupa kontrolna (Glu 120±9 mg/dl)		Grupa z cukrzycą (Glu 475±53 mg/dl)	
	GIS (pL)	$\Delta$ %	GIS (pL)	$\Delta$ %
PBS	566		490±45	
Ap <sub>4</sub> A 1 $\mu$ M	481±24*	-15±2*	455±42	-7±2
$\beta,\gamma$ -meATP 1 $\mu$ M	487±28*	-14±1*	455±39	-7±1
BzATP 1 $\mu$ M	551±24	-3±1	430±37	-12±1*

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią  $\pm$  SE dla n = 12. \*P < 0,05 obliczone względem PBS w danej grupie. *Objaśnienia:* Glu – glukoza we krwi pełnej



**Rycina 13. Zmiany objętości inulinowej kłębuszków nerkowych pod wpływem związków purynowych (1μM): Ap<sub>4</sub>A, βγ-meATP, BzATP**

Wyniki przedstawiają zmiany, wyrażone w procentach w odniesieniu kłębuszków inkubowanych w środowisku PBS. Białe słupki – grupa kontrolna, szare słupki – grupa z cukrzycą. Każdy słupek jest wartością średnią ± SE dla n = 12 dla każdej z grup. \*P < 0,05 obliczone względem PBS w danej grupie. wartości wyjściowych.

## 6. Dyskusja

Hiperglikemia u szczurów, wywołana dootrzewnowym podaniem streptozotocyny (STZ), stanowi dobrze scharakteryzowany doświadczalny model cukrzycy typu 1. Wyniki wstępnie przeprowadzonych doświadczeń w klatkach metabolicznych – jak zwielokrotniony pobór wody i wzmożona diureza oraz zwiększona utrata jonów sodu z moczem (Tabela 1) – stanowią typowe objawy cukrzycy niewyrównanej (stężenie glukozy we krwi  $> 350$  mg/dl). Z kolei, obserwowane – w drugim tygodniu po podaniu STZ – zwiększone wydalanie białek z moczem, tj. albuminy i NGAL, wskazuje na uszkodzenie nefronów na poziomie filtru kłębuszkowego – objawiające się zwiększoną przepuszczalnością dla albuminy, oraz na poziomie systemu transportowego w cewce bliższej [8, 27], bądź też uwalniania NGAL z komórek cewek nerkowych w wyniku zaburzenia ich integralności. Obecne białka w moczu wskazują na rozwijającą się nefropatię cukrzycową już w kilkunastodniowej doświadczalnie wywołanej hiperglikemii.

Wczesnym objawem rozwijającej się nefropatii cukrzycowej jest hiperfiltracja kłębuszkowa i mikroalbuminuria [9, 33]. Jednakże, wyniki obecnie przeprowadzonych doświadczeń na znieczulonych szczurach z cukrzycą, w drugim tygodniu po podaniu STZ, wykazały obniżone (średnio o ok 10%) – w porównaniu do grupy kontrolnej – wskaźnik filtracji kłębuszkowej oraz niewielki spadek przepływu krwi przez nerki, bez istotnych zmian średniego ciśnienia krwi tętniczej (MAP). Wyliczona, w oparciu o powyższe parametry hemodynamiki – z uwzględnieniem hematokrytu – oporność naczyń nerkowych (RVR) była wyższa niż w grupie kontrolnej. Obserwacje te są zgodne z wcześniej publikowanymi danymi [39], obrazującymi zmiany hemodynamiki wewnątrznerkowej u szczurów z ostrą, kilkunastodniową cukrzycą – indukowaną streptozotocyną. Zarówno obniżone tempo filtracji kłębuszkowej jak i pojawiające się w moczu zwiększone ilości markerów uszkodzenia nefronów (albumina, NGAL) są objawem rozwijającej się nefropatii cukrzycowej [1, 33].

Wiele ośrodków badawczych [7] dostarcza danych wskazujących, że utrzymująca się hiperglikemia zaburza funkcjonowanie komórek śródbłónka naczyń. W utrzymującej się hiperglikemii dochodzi do nadmiernej produkcji aktywnych form tlenu (ROS) oraz produktów glikacji białek (AGE), czynników zaburzających funkcje wielu komórek [11]. Między innymi wykazano zmniejszoną aktywność enzymu – syntazy tlenu azotu (eNOS) w komórkach śródbłónka naczyń i zmniejszoną produkcję NO –

wewnątrzkomórkowego mediatora relaksacji naczyń [25]. Objawem zmniejszonej produkcji NO jest zmniejszone wydalanie nitratów z moczem. W obecnych doświadczeniach obserwowaliśmy niższe wydalanie nitratów z moczem szczurów cukrzycowych niż kontrolnych, co może wskazywać na zaburzenie parakrynej funkcji komórek śródbłonna naczyń.

Od szeregu lat prowadzone badania nad patomechanizmem rozwijającej się nefropatii w cukrzycy wskazują, m.in., na zmiany aktywności purynergicznej osi sygnałowej w nerkach, czyli w obrębie auto/parakrynej regulacji dynamiki przepływu krwi i filtracji kłębuszkowej przez zewnątrzkomórkowe związki purynowe (adenozyna, mono- i di-nukleotydy adeninowe) i ich receptory P1 i P2.

Z wcześniej publikowanych doniesień wynika [40, 47], że ostra cukrzyca – indukowana STZ – zwiększa wrażliwość nerek na działanie egzogennej adenozy, wyrażoną zaburzeniem filtracji kłębkowej oraz spadkiem przepływu krwi przez nerki. Również w doświadczeniach *in vitro*, obserwowano zwiększoną – indukowaną adenozy – kurczliwość kłębuszków nerkowych, izolowanych z nerek szczurów cukrzycowych. Mając jednocześnie na uwadze ponad dwukrotny wzrost stężenia adenozy w płynie śródmiąższowym nerek szczurów cukrzycowych, jaki obserwowano w obecnych doświadczeniach (Tabela 3), z pewnym prawdopodobieństwem można przyjąć, że zwiększona oporność naczyń wewnątrznerkowych (RVR) i obniżony korowy przepływ krwi i przesączanie kłębuszkowe są efektem działania endogennej adenozy z zaangażowaniem receptorów A1 – tzw. hamujących, receptorów mediujących obkurczenie naczyń, a których zwiększona ekspresja w nerkach cukrzycowych wcześniej została udokumentowana [38].

Częściowym potwierdzeniem, przyjętej przez nas hipotezy są wyniki doświadczenia z antagonistą receptorów A1 – DPCPX, który podany do krążenia ogólnego szczurom cukrzycowych – bezpośrednio po okresie kontrolnym – podwyższył korowy przepływ krwi i przesączanie kłębuszkowe, przybliżając te wartości do tych, jakie obserwowano w grupie szczurów kontrolnych (Rycina 11).

Doświadczenia prowadzone w kierunku wyjaśnienia zależności pomiędzy aktywnością układu purynergicznego – zależnego od ATP a aktywnością układu zależnego od adenozy w regulacji wewnątrznerkowej hemodynamiki i funkcji nerek wykazały, że u szczurów zdrowych podany do krążenia nukleotyd – Ap<sub>4</sub>A stymuluje przepływ krwi przez nerki, hamując jednocześnie filtrację kłębuszkową i działa

natriuretycznie (Tabela 8, Rycina 8, Rycina 9). Natomiast działanie tego nukleotydu w czasie dożylniej infuzji DPCPX – antagonisty receptorów  $A_1$  – uległo wyraźnej modyfikacji:  $Ap_4A$  wywołał dwufazowe zmiany przepływu krwi przez nerki – wyraźny spadek a następnie wzrost do wartości wyjściowych oraz znacznie głębszy spadek filtracji kłębuszkowej (Tabela 9, Rycina 10, Rycina 11) niż w doświadczeniach, w których podano  $Ap_4A$  w czasie infuzji roztworu soli fizjologicznej. Wynika stąd, że w warunkach fizjologicznych – stymulujące działanie nukleotydu  $Ap_4A$  na wewnątrznerkowy przepływ krwi jest ograniczane przez endogenną adenozyne. Ograniczana jest również hipofiltracja indukowana infuzją  $Ap_4A$ .

Przeciwnie do tych obserwacji, u szczurów cukrzycowych, infuzja DPCPX – czynnika blokującego receptory  $A_1$  – uwrażliwiła nerki na działanie  $Ap_4A$ , wyrażone wyraźnym wzrostem przepływu krwi przez nerki i spadkiem, wprawdzie niewielkim, tempa filtracji kłębuszkowej (Tabela 9, Rycina 10, Rycina 11). Sugeruje to, że w warunkach zawyżonej aktywności pozakomórkowej adenozyne w cukrzycy, adenozyne czyni nerki niewrażliwe na stymulujące wewnątrznerkową hemodynamikę działanie  $Ap_4A$ .

Aby odpowiedzieć na pytanie, czy obserwowane zmiany hemodynamiki i funkcji nerek w cukrzycy mogą być wynikiem zmniejszonej, w warunkach podstawowych, aktywności układu purynergicznego – zależnego od ATP, biorącego udział w regulacji mikrokrążenia wewnątrznerkowego i produkcji moczu, przeprowadzono doświadczeń z użyciem nioselektywnego antagonisty receptorów  $P_2$  – PPADS, który podano do krążenia ogólnego. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie wykazały (Tabela 5, Rycina 4), że zarówno w cukrzycy jak i u zwierząt zdrowych, udział receptorów  $P_2$  – wrażliwych na PPADS, utrzymujących napięcie naczyń na odpowiednio niskim poziomie, jest podobny. Również udział wrażliwych na PPADS receptorów  $P_2$  – w regulacji kanalikowego systemu transportu sodu w cukrzycy prawdopodobnie nie uległ zaburzeniu. Zatem, blokowanie receptorów  $P_2$  – wrażliwych na PPADS – mediujących relaksację naczyń via receptory  $P_2X_1$ , czy też  $P_2X_4$  – podtypu związanego z syntezą NO [13, 17, 28, 31] – może skutkować zahamowaniem syntezy NO i/lub syntezy prostacyklin – mediatorów relaksacji naczyń krwionośnych. W konsekwencji może prowadzić to do zwiększenia oporu naczyń mikrokrążenia wewnątrznerkowego. W badaniach mikropuncyjnych naczyń kapilarnych kłębuszka [43] – wykazano, że PPADS u szczurów zdrowych obkurcza tętniczkę doprowadzającą kłębuszka, redukuje przepływ krwi przez sieć naczyń kapilarnych oraz redukuje



przesączanie kłębuszkowe. Można zatem przyjąć, że podobny mechanizm działania PPADS – inhibitora receptorów P2 – na wewnątrznerkową hemodynamikę i filtrację występuje również u szczurów z doświadczalnie wywołaną hiperglikemią.

Dożylny wlew agonisty receptorów P2X<sub>1</sub> – nie zmieniając MAP – stymuluje korowy przepływ krwi, prawdopodobnie poprzez aktywację mediatorów relaksacji naczyń mikrokrążenia wewnątrznerkowego w korze nerek szczurów zdrowych. Natomiast brak efektu działania agonisty receptorów P2X<sub>1</sub> w nerkach szczurów cukrzycowych może świadczyć o ograniczonej biodostępności receptorów P2 – z powodu zmian na poziomie receptorowym – zmian ilościowych (zmniejszona ekspresja receptorów) i/lub jakościowych (np. glikacji białek), czy też zmian postreceptorowych.

Wcześniejsze prace dokumentują [24, 52] zwiększoną znamienne ekspresję receptorów P2X<sub>7</sub> w nerkach szczurów z 4-tygodniową cukrzycą w porównaniu do śladowych ilości tych receptorów w nerkach szczurów zdrowych. Okazało się, że Bz-ATP podany do krążenia ogólnego już w drugim tygodniu cukrzycy indukowanej STZ w istotny sposób zmienia hemodynamikę wewnątrznerkową, podobnie jak czynił to agonista receptorów P2X<sub>1</sub>. Na tej podstawie można wnioskować, że w cukrzycy dochodzi do zmian w obrębie układu purynergicznego – zależnego od ATP: maleje udział receptorów P2X<sub>1</sub> w inicjowaniu zmian hemodynamiki wewnątrznerkowej a wzrasta udział receptorów P2X<sub>7</sub>. Zmiany te mogą wynikać, z jednej strony, z ograniczonej dostępności receptorów P2X<sub>1</sub> – z powodu zmian ilościowych, czy też zmian jakościowych (np. glikacji), a z drugiej strony – zwiększonej ekspresji receptorów P2X<sub>7</sub>.

Z wcześniejszych doniesień [20, 46] wynika, że długotrwała aktywacja receptorów P2X<sub>7</sub> (kanały jonowe bramkowane ATP) prowadzi do pęcznienia komórek, uwalniania cytokin i śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy. Wyniki przeprowadzonych przez nas doświadczeń po raz pierwszy wykazały, że receptory P2X<sub>7</sub>, we wczesnym okresie cukrzycy niewyrównanej są potencjalnymi mediatorami regulacji napięcia mięśniówki naczyń, i mogą być zaangażowane w regulację wewnątrznerkowej hemodynamiki i filtracji kłębuszkowej. Jaki byłby mechanizm? Stymulacja receptorów P2X<sub>7</sub> w cukrzycy, podobnie jak receptorów P2X<sub>1</sub> u szczurów zdrowych, wywołuje kaskadę zdarzeń prowadzących do obniżenia napięcia mięśniówki naczyń wewnątrznerkowych, w tym i tętniczek do- i odprowadzających kłębuszka,

czego objawem jest, oprócz zwiększonego przepływu krwi przez korę nerek, redukcja GFR.

Dodatkowym potwierdzeniem roli receptorów  $P2X_7$  w mediowaniu skurczu bądź relaksacji naczyń kapilarnych kłębuszka nerkowego są wyniki doświadczeń na izolowanych kłębuszkach nerkowych szczurów cukrzycowych i kontrolnych (Tabela 10, Rycina 13). Zaobserwowano bowiem, że kłębuszki nerek szczurów cukrzycowych – w porównaniu do grupy kontrolnej – są mniej wrażliwe na obkurczające działanie agonisty receptorów  $P2X_1$ . Podczas gdy, odwrotny efekt działania ujawnił agonista receptorów  $P2X_7$  – wyraźnie zredukował objętość wewnątrzkapilarną izolowanych kłębuszków z nerek szczurów cukrzycowych.

## 7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, których głównym celem było zbadanie aktywności układu purynergicznego – zależnego od ATP, w regulacji hemodynamiki i funkcji nerek szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą typu 1 – oraz w świetle dostępnej mi wiedzy wyciągam następujące wnioski:

1. W nerkach szczurów cukrzycowych zwiększona aktywność ekto-enzymów odpowiedzialnych za hydrolizę pozakomórkowego ATP do adenozyiny jest, prawdopodobnie, główną przyczyną obniżonego stężenia ATP a podwyższonego -adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej, i tym samym prowadzi do zmiany aktywności procesów zależnych od ATP. Nukleotyd ten, podobnie jak adenozyina, w przestrzeni pozakomórkowej pełni funkcje sygnałowe, i za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych receptorów purynowych reguluje m.in. napięcie ściany naczyń krwionośnych, tempo filtracji kłębuszkowej oraz kanalikowy transport sodu i wody. Jest więc możliwe, że w cukrzycy dochodzi do wyciszenia procesów zależnych od ATP a wzmożenia procesów zależnych od adenozyiny.
2. W nerkach szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą dochodzi do zmian w obrębie układu purynergicznego - zależnego od ATP: maleje udział receptorów P2X<sub>1</sub> w inicjowaniu zmian hemodynamiki wewnątrznerkowej a funkcję tę przejmują receptory P2X<sub>7</sub>.
3. Nerki szczurów cukrzycowych nie odpowiadają na podany do krążenia nukleotyd Ap<sub>4</sub>A – czynnik stymulujący - poprzez receptory P2 - przepływ krwi przez nerki oraz diurezę. Wynika to, prawdopodobnie, ze zwiększonej aktywności endogennej adenozyiny i jej receptorów A<sub>1</sub>.

Wydaje się prawdopodobne, że warunkach fizjologicznych – w stanie równowagi metabolicznej pozakomórkowych nukleotydów - działanie Ap<sub>4</sub>A i/lub ATP, ADP na wewnątrznerkową hemodynamikę i funkcję nerek jest ograniczane przez adenozyinę. Jednakże w warunkach zawyżonej aktywności pozakomórkowej adenozyiny, nieadekwatnie w stosunku do aktywności pozakomórkowych nukleotydów, adenozyina może być czynnikiem hamującym działanie ATP, i być może jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój cukrzycowej choroby nerek.

## 8. Piśmiennictwo

1. Alter ML, Kretschmer A, Von Websky K, Tsuprykov O, Reichetzedler C, Simon A, Stasch JP, Hoher B (2012) Early urinary and plasma biomarkers for experimental diabetic nephropathy. *Clin Lab* 58:659-671
2. Bolognani D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M (2009) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res* 32:91-98
3. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
4. Bratton AC, Marshall EK (1939) A new coupling component for sulfanilamide determination. *J Biol Chem* 28:537-540
5. Canani LH, Ng DP, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS (2002) Polymorphism in ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 gene (ENPP1/PC-1) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 51:1188-1193
6. Cherney DZ, Scholey JW, Miller JA (2008) Insights into the regulation of renal hemodynamic function in diabetic mellitus. *Curr Diabetes Rev* 4:280-290
7. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130:963-974
8. Donderski R, Bednarski K, Manitius J (2006) Białkomocz a postęp przewlekłej choroby nerek. Czy rodzaj wydalanych białek może wpływać na przebieg przewlekłej choroby nerek? *Diabetologia Praktyczna* 7:194-199
9. Evans T, Capell P (2000) Diabetic nephropathy. *Clinical Diabetes* 18:7-16
10. Faulhaber-Walter R, Chen L, Oppermann M, Kim SM, Huang Y, Hiramatsu N, Mizel D, Kajiyama H, Zerfas P, Briggs JP, Kopp JB, Schnermann J (2008) Lack of A1 adenosine receptors augments diabetic hyperfiltration and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 19:722-730
11. Forbes JM, Cooper ME (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93:137-188
12. Foundation NK (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 39:S1-266
13. Franco M, Bautista R, Tapia E, Soto V, Santamaría J, Osorio H, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG, Kobori H, Navar LG (2011) Contribution of renal purinergic receptors to renal vasoconstriction in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F1301-1309

14. Friedman DJ, Rennke HG, Csizmadia E, Enjyoji K, Robson SC (2007) The vascular ectonucleotidase ENTPD1 is a novel renoprotective factor in diabetic nephropathy. *Diabetes* 56:2371-2379
15. Fujiwara Y, Kitamura E, Ochi S, Shin SH, Fukunaga M, Yokoyama K, Fukuhara Y, Ueda N, Kamada T, Orita Y (1991) Isotopic measurement of glomerular intracapillary volume as a quantitative index for mesangial cell contractility. *Contrib Nephrol* 95:12-21
16. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW (2007) P2X receptors as regulators of the renal microvasculature. *Trends Pharmacol Sci* 28:646-652
17. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW (2007) Purinoceptors in the kidney. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:715-726
18. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, Huang Y, Briggs JP, Schnermann J (2005) Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A1 or A2 adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 315:1150-1157
19. Hansen PB, Schnermann J (2003) Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F590-599
20. Hillman KA, Burnstock G, Unwin RJ (2005) The P2X7 ATP receptor in the kidney: a matter of life or death? *Nephron Exp Nephrol* 101:e24-30
21. Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM (1981) Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 19:410-415
22. Imig JD (2000) Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F965-981
23. Itoh Y, Nakai A, Kakizawa H, Makino M, Fujiwara K, Kobayashi T, Kato T, Nagata M, Oda N, Katsumata H, Nagasaka A, Itoh M (2001) Alteration of endothelin-1 concentration in STZ-induced diabetic rat nephropathy. Effects of a PGI(2) derivative. *Horm Res* 56:165-171
24. Jankowski M, Szczepanska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S (2001) Cyclic GMP-dependent relaxation of isolated rat renal glomeruli induced by extracellular ATP. *J Physiol* 530:123-130
25. Komers R, Anderson S (2003) Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F1121-1137
26. Król E, Rutkowski B (2008) Przewlekła choroba nerek - klasyfikacja, epidemiologia i diagnostyka. *Forum Nefrologiczne* 1:1-6
27. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K (2009) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int* 75:285-294

28. Liu C, Mather S, Huang Y, Garland CJ, Yao X (2004) Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1688-1695
29. Lowry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
30. Mishra R, Emancipator SN, Kern TS, Simonson MS (2006) Association between endothelin-1 and collagen deposition in db/db diabetic mouse kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* 339:65-70
31. Navar LG, Arendshorst WJ, Pallone TL, Inscho EW, Imig JD, Bell PD (2011) The Renal Microcirculation. In: *Comprehensive Physiology*. pp 550-683
32. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD (1996) Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 76:425-536
33. Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, Tarnow L, Lajer M, Hansen PR, Parving HH, Rossing P (2010) Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril. *Diabet Med* 27:1144-1150
34. Nishiyama A, Inscho EW, Navar LG (2001) Interactions of adenosine A1 and A2a receptors on renal microvascular reactivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F406-414
35. O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF (1988) Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 2:2339-2347
36. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, Atkins R, de Zeeuw D, Cooper M, Shahinfar S, Lewis JB, Lambers Heerspink HJ (2012) Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database. *Am J Kidney Dis* 59:75-83
37. Patinha D, Afonso J, Sousa T, Morato M, Albino-Teixeira A (2014) Activation of adenosine receptors improves renal antioxidant status in diabetic Wistar but not SHR rats. *Ups J Med Sci* 119:10-18
38. Pawelczyk T, Grden M, Rzepko R, Sakowicz M, Szutowicz A (2005) Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat. *Am J Pathol* 167:315-325
39. Pflueger AC, Gross JM, Knox FG (1999) Adenosine-induced renal vasoconstriction in diabetes mellitus rats: role of prostaglandins. *Am J Physiol* 277:R1410-1417
40. Pflueger AC, Schenk F, Osswald H (1995) Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Am J Physiol* 269:F529-535

41. Roman R, Mattson D, Cowley A (2001) Measurement of Regional Blood Flow in the Kidney Using Laser–Doppler Flowmetry. In: Donna W (ed) *Methods in molecular medicine Angiotensin Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 407-426
42. Rücker B, Abreu-Vieira G, Bischoff LB, Harthmann AD, Sarkis JJ, Wink MR, Casali EA (2010) The nucleotide hydrolysis is altered in blood serum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 116:79-87
43. Schnermann J (2011) Maintained tubuloglomerular feedback responses during acute inhibition of P2 purinergic receptors in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F339-344
44. Schrijvers BF, De Vriese AS, Flyvbjerg A (2004) From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr Rev* 25:971-1010
45. Stiepanow-Trzeciak A (2005) Udział receptorów purynowych w działaniu nukleotydów – Ap<sub>4</sub>A i ATP – na nerkę – praca doktorska. In: *Akademia Medyczna w Gdańsku*, 27-28
46. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738
47. Szczepańska-Konkel M, Jankowski M, Stiepanow-Trzeciak A, Rudzik A, Pawełczyk T, Angielski S (2003) Responsiveness of renal glomeruli to adenosine in streptozotocin-induced diabetic rats dependent on hyperglycaemia level. *J Physiol Pharmacol* 54:109-120
48. Szczepańska-Konkel M, Redlak M, Angielski S (1991) Glibenclamid-sensitive K<sup>+</sup> channels are responsible for angiotensin II hypersensitive contraction and atrial natriuretic factor refractoriness of glomeruli in low-sodium rats. *Biochem Biophys Res Commun* 181:871-876
49. Thaning P, Bune LT, Hellsten Y, Pilegaard H, Saltin B, Rosenmeier JB (2010) Attenuated purinergic receptor function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:182-189
50. Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP, Sterzel RB (2000) Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11:71-79
51. Vieira VP, Rocha JB, Stefanello FM, Balz D, Morsch VM, Schetinger MR (2001) Heparin and chondroitin sulfate inhibit adenine nucleotide hydrolysis in liver and kidney membrane enriched fractions. *Int J Biochem Cell Biol* 33:1193-1201
52. Vonend O, Turner CM, Chan CM, Loesch A, Dell'Anna GC, Srani KS, Burnstock G, Unwin RJ (2004) Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int* 66:157-166

53. Xia JF, Hu P, Liang QL, Zou TT, Wang YM, Luo GA (2010) Correlations of creatine and six related pyrimidine metabolites and diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 43:957-962
54. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG, Burns KD (2000) Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int* 58:2320-2330