

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU**

**WYDZIAŁ LEKARSKI**



**Konrad Boblewski**

**Wpływ czynności przytarczyc na ciśnienie  
tętnicze krwi**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

*Promotor:*

***dr hab. Apolonia Rybczyńska***

*Praca została wykonana w:*

*Katedrze i Zakładzie Fizjopatologii  
Akademii Medycznej w Gdańsku*

*Kierownik Katedry:*

*prof. dr hab. Anzelm Hoppe*

*Samodzielnej Pracowni Patofizjologii  
Akademii Medycznej w Gdańsku*

*Kierownik:*

*dr hab. Apolonia Rybczyńska*

*Gdańsk 2005*

*Profesorowi Anzelmowi Hoppe, który pewnego wrześniowego dnia z bezrobotnego  
lekarza postanowił zrobić naukowca, pracę tę poświęcam.*

*Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. Apolonii Rybczyńskiej za pomoc  
okazaną w trakcie realizacji i pisania pracy oraz olbrzymie zrozumienia przy  
problemach dnia codziennego.*

Przedstawione w rozprawie wyniki zostały częściowo opublikowane w pracach:

1. Boblewski K., Lehmann A., Rybczyńska A., Hoppe A.  
Calcimimetic and hypotensive effect of gentamycin in normo- and hypertensive rats. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 2003, 33 suppl. 1, 97-104
2. Rybczyńska A., Boblewski K., Lehmann A., Orlewska Cz., Foks H., Drewnowska K., Hoppe A. Calcimimetic NPS R-568 induces hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertension* 2005, 364-371.

**SPIS TREŚCI**

<b>1.</b>	<b>WSTĘP</b> .....	<b>7</b>
1.1.	Przytarczyczny czynnik hipertensyjny .....	7
1.2.	Receptor wapniowy .....	9
1.3.	Kalcymimetyki .....	12
1.4.	Regulacja sekrecji PHF? .....	13
<b>2.</b>	<b>CEL PRACY</b> .....	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>METODY I MATERIAŁ</b> .....	<b>18</b>
3.1.	Zwierzęta doświadczalne i przebieg doświadczenia .....	18
3.1.1.	Grupa 1: SHR/NPS (n=6) .....	20
3.1.2.	Grupa 2: SHR/kontrola (n=5) .....	20
3.1.3.	Grupa 3: SHR-TPTX/NPS (n=5) i Grupa 4: SHR-TPTX/kontrola (n=4) .....	20
3.1.4.	Grupa 5: WKY/NPS (n=4) i Grupa 6: WKY/kontrola (n=4) .....	21
3.1.5.	Grupa 7: WKY-TPTX/NPS (n=5) i Grupa 8: WKY-TPTX/kontrola (n=4) .....	21
3.1.6.	Grupa 9: SHR/NPS (n=6) .....	21
3.1.7.	Grupa 10: SHR/kontrola (n=4) .....	22
3.2.	Pomiary i obliczenia .....	22
3.2.1.	Średnie ciśnienie tętnicze .....	22
3.3.	Synteza kalcymimetyka NPS R-568 .....	23
<b>4.</b>	<b>OMÓWIENIE WYNIKÓW</b> .....	<b>26</b>
4.1.	Wpływ NPS R-568 na stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu i frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem u szczurów .....	26
4.2.	Wpływ podania NPS R-568 na stężenie parathormonu u szczurów SHR .....	29
4.3.	Inne oznaczenia .....	30
4.4.	Zmiany średniego ciśnienia tętniczego po podaniu NPS R-568 .....	32
<b>5.</b>	<b>DYSKUSJA</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>WNIOSKI</b> .....	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>STRESCZENIE</b> .....	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>PISMIENNICTWO</b> .....	<b>46</b>

**Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli**

- $^{13}\text{C}$  NMR - spektroskopia rezonansu jądrowego węgla-13
- $^1\text{H}$  NMR - spektroskopia protonowego rezonansu jądrowego
- CaR - receptor wapniowy
- CDX - cyklodekstryna
- DCC- dicykloheksylokarbodiimid
- DEAD - azodikarboksylan dietylowy
- DIBAL-H - wodorek diizobutyloglinu
- DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna
- FEPi - ang. Fractional Excretion of Phosphate; frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem
- MAP - ang. Mean Arterial Blood Pressure; średnie ciśnienie tętnicze krwi
- NPS R-568 - N-(3-[2-chlorofenylo]propylo)-(R)- $\alpha$ -metylo-3-metoksybenzylamina
- Ph<sub>3</sub>P - trifenylofosfina
- PHF - ang. Parathyroid Hypertensive Factor; przytarczyczny czynnik hipertensyjny
- PMSF - fluorek fenylometylosulfonowy
- PNN - przewlekła niewydolność nerek
- PTH - parathormon
- PTSA - kwas p-toluenosulfonowy
- SHR - ang. Spontaneously Hypertensive Rats; szczury z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym
- THF - tetrahydrofuran
- TPTX - tyreoparatyreoidektomia; usunięcie tarczycy z przytarczycami
- WKY - ang. Wistar-Kyoto Rats; linia szczurów o prawidłowym ciśnieniu tętniczym, z której wyhodowano szczury SHR

## 1. WSTĘP

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z najczęstszych chorób układu krążenia spotykanych u ludzi. W ponad 90% przypadków nie znamy przyczyny rozwoju tej patologii<sup>1</sup> i dla tego nazywamy ją pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Jakkolwiek żadna z aktualnie istniejących teorii nie zyskała powszechnej akceptacji<sup>2</sup>, patogenezę tego stanu wiąże się z zaburzeniami regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Szczególną uwagę zwraca się obecnie na choroby towarzyszące nadciśnieniu, których patomechanizm powstawania, sam z siebie, nie tłumaczy współwystępowania podwyższonego ciśnienia krwi.

Wśród wielu takich chorób, ważne miejsce zajmuje pierwotna nadczynność przytarczyc<sup>3</sup>. Pierwotna nadczynność przytarczyc to stan, w którym komórki gruczołów przytarczycznych produkują i wydzielają nadmierne ilości parathormonu (PTH) w stosunku do potrzeb organizmu pacjenta dotkniętego tą chorobą. Ponadto zaobserwowano, że usunięcie przytarczyc, pacjentom z pierwotną nadczynnością tego gruczołu i nadciśnieniem tętniczym, według różnych publikacji powoduje w 31% do 70% przypadków normalizację ciśnienia tętniczego krwi<sup>4,5</sup>. Obserwacja ta podkreśla współzależność między nadciśnieniem tętniczym a nadczynnością przytarczyc. Jak do tej pory nie znaleziono zadawalającego wyjaśnienia tej zależności.

### 1.1. *Przytarczyczny czynnik hipertensyjny*

Jedną z hipotez tłumaczących powiązanie nadciśnienia tętniczego i czynności przytarczyc zakłada istnienie dodatkowego czynnika wydzielanego przez przytarczycę, nazwanego przytarczycznym czynnikiem hipertensyjnym (ang. Parathyroid Hypertensive Factor – PHF)<sup>6</sup>. Hipoteza o istnieniu takiego czynnika powstała w pracowni P.K.T. Panga. Po pierwsze wykazano, że usuwanie przytarczyc

szczurom z wrodzonym nadciśnieniem szczepu SHR (ang. Spontaneous Hypertensive Rats) powoduje u tych zwierząt znaczne obniżenie ciśnienia już po 120 minutach od zabiegu<sup>6,7</sup>. Stwierdzono również, że przetoczenie osocza pochodzącego od szczurów SHR, odpowiadającym im genetycznie szczurom WKY (ang. Wistar-Kyoto Rats) powoduje u tych ostatnich wzrost ciśnienia tętniczego krwi<sup>8</sup>. Dla wykluczenia przypadkowego efektu związanego z działaniem znanych niskocząsteczkowych endogennych czynników presyjnych (czynnik ouabaino - podobny, adrenalina i in.), osocze zwierząt przed przetoczeniem poddano dializie tak by przetoczenie obejmowało tylko określoną frakcję białek osocza, o masie około 3kD<sup>9</sup>. Ponadto wykazano, że przetoczenie tak przygotowanego osocza od szczurów SHR, którym uprzednio usunięto przytarczycę, nie powoduje zmian ciśnienia tętniczego u szczurów normotensyjnych<sup>8</sup>. Tak więc usunięcie szczurom hipertensyjnym przytarczyc powoduje zanik właściwości presyjnych ich osocza.

Pośrednimi testami biologicznymi wykazano również występowanie PHF u ludzi z nadciśnieniem tętniczym. Badania te wykazały, że pacjenci z nadciśnieniem, u których stwierdzano PHF, byli podatni na hipotensyjne leczenie verapamilem - blokerem kanałów wapniowych w odróżnieniu od pacjentów z nadciśnieniem lecz PHF-ujemnych, u których stwierdzano brak wrażliwości na verapamil<sup>10</sup>.

Wzrost ciśnienia tętniczego krwi wiąże się ze wzrostem aktywności  $Ca^{2+}$  w cytozolu komórek mięśni gładkich, co prowadzi do ich skurczu<sup>11</sup>. Tym tłumaczy się skuteczność leków blokujących kanały wapniowe między innymi w błonie komórek mięśni gładkich tętnic, a tym samym obniżających ciśnienie tętnicze krwi.

Presyjne działanie PHF jest najprawdopodobniej związane ze wzrostem aktywności  $Ca^{2+}$  wewnątrzkomórkowego komórek mięśni gładkich tętnic, wykazano bowiem, że osocze szczurów SHR,



zawierające aktywność PHF, powoduje zwiększone pobieranie  $\text{Ca}^{2+}$  przez izolowane preparaty tętnic<sup>8</sup>.

Dotychczasowe próby uzyskania „czystego” PHF nie dały zadowalającego rezultatu. Wytworzono natomiast przeciwciała przeciwko PHF<sup>12</sup>, które powodują zmniejszenie hipertensyjnego działania PHF<sup>13</sup>.

### **1.2. Receptor wapniowy**

Prawidłowe stężenie wapnia ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania wielu komórek. Jony wapniowe biorą udział w generowaniu i przewodzeniu impulsów elektrycznych, podziałach komórkowych, sekrecji hormonów oraz kurczliwości mięśni. W warunkach fizjologicznych stężenie wapnia całkowitego w osoczu krwi wynosi 2,25 – 2,75 mmol/l, z czego 45–50% stanowi wapń zjonizowany a wahania jego stężenia nie przekraczają 0,05 – 0,1 mmol/l<sup>14</sup>. W związku z tym stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu krwi zwierząt podlega bardzo precyzyjnej kontroli. Jednym z elementów tej kontroli jest wydzielanie PTH przez przytarczycę. W odpowiedzi na rosnące stężenie wapnia w osoczu komórki przytarczyc zmniejszają sekrecję PTH, co powoduje ograniczenie uwalniania wapnia z kości, reabsorpcji tego jonu przez nerkę i zmniejszenie syntezy witaminy  $\text{D}_3$ , co z kolei powoduje zmniejszenie wchłaniania wapnia w przewodzie pokarmowym<sup>15</sup>. Spadek stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu powoduje natomiast sekwencje zdarzeń przeciwnych tj. wzrost sekrecji PTH, wzrost uwalniania wapnia z kości, zwiększenie reabsorpcji wapnia z moczu. Mechanizm „wyczuwania” stężenia wapnia przez komórki przytarczyc był niejasny. Przypuszczano, że zmiana stężenia  $[\text{Ca}^{2+}]$  zewnątrzkomórkowego powoduje na zasadzie równowagi stężeń zmianę stężenia  $[\text{Ca}^{2+}]$  wewnątrzkomórkowego co w zależności od kierunku zmian, miałyby pobudzać lub hamować sekrecję PTH<sup>16</sup>.

Ten schemat współzależności dość dobrze opisywał zmiany sekrecji PTH zachodzące fizjologicznie, jak i te obserwowane w częstych patologiach przytarczyc, na przykład w pierwotnej nadczynności przytarczyc. Nie nadawał się natomiast do wyjaśnienia zmian opisywanych w rodzinnej hiperkalcemii z hipokalcurią<sup>17</sup>. Patologia ta wydaje się być początkowo, bardzo podobna do pierwotnej nadczynności przytarczyc. Jednak rodzinnej hiperkalcemii z hipokalcurią nie towarzyszy podwyższone stężenie PTH i co najistotniejsze, nie występuje w tym zespole zwiększone wydalanie wapnia z moczem, tak typowe dla pierwotnej nadczynności przytarczyc<sup>18</sup>. Stwierdzono zatem, że w zaburzeniu tym występuje stan obniżonego progu wrażliwości komórek przytarczyc na  $[Ca^{2+}]$ , w którym przy wyższym niż zazwyczaj  $[Ca^{2+}]$  występuje normalna sekrecja PTH<sup>19</sup>. Dodatkowym przykładem, potwierdzającym istnienie stanów zmienionej wrażliwości komórek na stężenie wapnia w osoczu jest rodzinna hipokalcemia z hiperkalcurią. W chorobie tej, w odróżnieniu od pierwotnej niedoczynności przytarczyc, utrzymuje się wzmożone wydalanie wapnia z moczem, pomimo niskich stężeń tego jonu w osoczu. W tym wypadku można powiedzieć, że komórki przytarczyc mają podwyższony próg wrażliwości na  $[Ca^{2+}]$  i „wyczuwają” obniżony poziom wapnia jako normalny<sup>20</sup>. Obserwacje te stworzyły podstawy koncepcji istnienia receptora na powierzchni komórek przytarczyc, wrażliwego na zmiany  $[Ca^{2+}]$  zewnątrzkomórkowego. I tak, doświadczenia przeprowadzone na izolowanych komórkach przytarczyc zmierzały do określenia wewnątrzkomórkowych mechanizmów pobudzanych przez zmianę stężenia wapnia w środowisku zewnętrznym komórek przytarczyc. Wykazały one, że wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  w środowisku zewnętrznym prowadzi do mobilizacji wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych a także zwiększonego pobierania przez komórki  $Ca^{2+}$  ze środowiska<sup>21</sup>

Ostatecznym potwierdzeniem istnienia receptora wapniowego (CaR) były doświadczenia z zastosowaniem technik biologii molekularnej<sup>22</sup>. W dużym uproszczeniu doświadczenia te przeprowadzono następująco. Do komórki jajowej *Xenopus laevis* wprowadzono mRNA uzyskane z komórek przytarczyc wołowych. Następnie, po podaniu agonistów tego receptora, pośrednio oceniono jego ekspresję mierząc zmiany polaryzacji oocyta spowodowane zmianami stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego. Stosowanie fragmentów tego RNA pozwoliło zidentyfikować frakcję mRNA kodującą cząsteczkę receptora. Wprowadzenie tej frakcji do komórki oocyta powodowało pojawienie się na jej powierzchni receptora. Poznanie mRNA umożliwiło wyznaczenie sekwencji aminokwasów CaR. Białko receptora składa się z trzech głównych domen strukturalnych: zewnątrzkomórkowej, aminoterminalnej - wiążącej wapń i inne ligandy, liczącej 613 aminokwasów; błonowej, zbudowanej z 250 aminokwasów, podzielonej na 7 segmentów, co jest charakterystyczne dla białek z rodziny G; oraz karboksyterminalnej domeny wewnątrzkomórkowej liczącej 222 aminokwasy<sup>22</sup>.

Nawet niewielkie zmiany  $[Ca^{2+}]$  w osoczu wpływają na zmianę pobudzenia receptora wapniowego na powierzchni komórek przytarczyc. Wzrost stężenia wapnia aktywując receptor wapniowy prowadzi do wzrostu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego w komórkach przytarczyc. To z kolei powoduje zahamowanie sekrecji PTH. Taka sekwencja zdarzeń została potwierdzona doświadczalnie na izolowanych komórkach przytarczyc („ex vivo”)<sup>23,24,25</sup>. Natomiast obniżenie  $[Ca^{2+}]$  w osoczu, a co za tym idzie zmniejszenie pobudzenia CaR, prowadzi do zmniejszenia stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego, co powoduje zwiększa sekrecję PTH. Wzrost stężenia PTH powoduje normalizację  $[Ca^{2+}]$  w osoczu<sup>26</sup>.

Dalsze badania doprowadziły do wykrycia innych niż komórki przytarczyc lokalizacji receptora wapniowego.

Stwierdzono występowanie CaR w różnych narządach nie zawsze powiązanych bezpośrednio z gospodarką wapniowo-fosforanową. I tak ekspresja mRNA receptora wapniowego zachodzi w komórkach cewek nerkowych szczególnie wstępującej części pętli Henle'go i cewki dystalnej (komórki odpowiedzialne za zależną od PTH reabsorpcję wapnia)<sup>27</sup>, osteoblastach<sup>28</sup>, osteoklastach<sup>29</sup>, przewodzie pokarmowym<sup>30</sup>, ośrodkowym układzie nerwowym<sup>31,32</sup> i tarczycy.

Odkrycie receptora wapniowego ma olbrzymie znaczenie nie tylko dla zrozumienia mechanizmów kontroli sekrecji PTH, ale również stworzyło zupełnie nowe możliwości dla prób leczenia zaburzeń gospodarki wapniowej<sup>33</sup>.

### **1.3. Kalcymimetyki**

Kolejnym etapem badań było poszukiwanie innych aniżeli  $\text{Ca}^{2+}$  substancji, będących antagonistami bądź agonistami opisanego receptora. Potrzeba stworzenia leków obniżających sekrecję PTH z przytarczyc istniała od dawna i była związana nie tyle z pierwotną nadczynnością bądź dość rzadkimi przypadkami nowotworów tego narządu, co ze stanami wtórnej nadczynności przytarczyc związanymi z niewydolnością nerek<sup>34</sup>. Postępująca niewydolność nerek prowadzi do wzrostu stężenia fosforanów we krwi (wskutek nieskutecznej ich eliminacji), co z kolei powoduje wzrost sekrecji PTH z przytarczyc. Zmniejsza się wytwarzanie witaminy  $\text{D}_3$ . Procesten, poprzez spadek wchłaniania wapnia w jelicie prowadzi do hipokalcemii, która jest dodatkowym impulsem pobudzającym uwalnianie PTH z przytarczyc<sup>25</sup>. Ostatecznie hipokalcemia i hiperfosfatemia, towarzyszące przewlekłej niewydolności nerek nasilają kalcyfikację tkanek miękkich i ścian naczyń krwionośnych oraz mogą współdziałać w rozwoju chorób układu krążenia<sup>35</sup>.

Już wstępne badania nad CaR, prowadzone na izolowanych komórkach przytarczyc wykazały, że wapń nie jest jedynym kationem pobudzającym ten receptor. Okazało się, że takie

właściwości posiadają jony takie jak  $Mg^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  oraz związki o charakterze polikationów – poliaminy takie jak spermina, spermidyna, aminoglikozydy takie jak streptomycyna, bekanamycyna, gentamycyna, peptydy takie jak polilizyna, poliarginina<sup>36</sup>. Praktycznie nie nadają się one do leczenia stanów chorobowych przebiegających z podwyższonym stężeniem PTH, ponieważ ich określone „in vitro”, skuteczne do pobudzenia CaR stężenia, wymagałyby zastosowania dawek potencjalnie toksycznych „in vivo”<sup>36</sup>. Tą grupę związków, konkurujących z wapniem o miejsce wiążące receptora, nazwano kalcymimetykami typu I. Dalsze badania doprowadziły do odkrycia grupy związków nie pobudzających wprost receptora wapniowego, ale zmieniających jego próg pobudliwości na zmiany  $[Ca^{2+}]$ . Związki te powodują nasilenie impulsu hamującego sekrecję PTH przy danym stężeniu wapnia<sup>37</sup>. Odmiennie od kalcymimetyków typu I wiążą się one z domeną błonową CaR i działają jako tzw. modyfikatory allosteryczne. Związki te zostały nazwane kalcymimetykami typu II<sup>37</sup>. Są to jednowartościowe kationy organiczne. Najlepiej poznanymi kalcymimetykami typu II są fenyloalkilaminy, takie jak: NPS R-467, NPS S-467, NPS R-568<sup>36</sup> należące do pierwszej generacji kalcymimetyków typu II oraz nowszy, zaliczany do drugiej generacji – AMG 073<sup>34</sup>. Pierwowzorem dla kalcymimetyków NPS była toksyna pająka *Diguetia Canities*<sup>38</sup>.

Zastosowanie kalcymimetyków działających bezpośrednio na mechanizm regulacji wydzielania PTH, umożliwiło przeprowadzenie tzw. „farmakologicznej paratyreoidektomii” prowadzącej najpierw do spadku wydzielania PTH a następnie do obniżenia stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu.

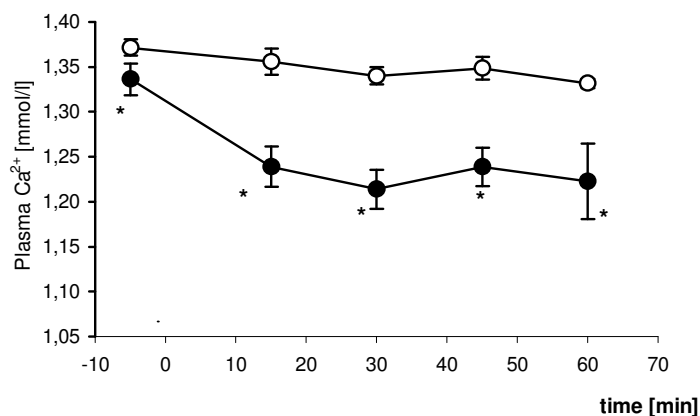
#### **1.4. Regulacja sekrecji PTH?**

Odkrycie receptora wapniowego<sup>20</sup> oraz kalcymimetyków<sup>37</sup>, związków które poprzez aktywację receptora wapniowego komórek przytarczyc obniżają sekrecję PTH, stworzyło

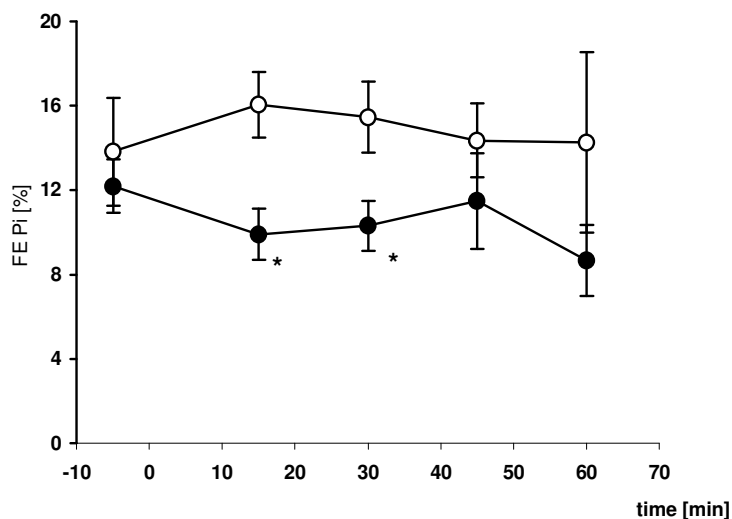
możliwości przeprowadzenia „farmakologicznej paratyreoidektomii” u szczurów<sup>39</sup> oraz u ludzi<sup>40</sup>.

Wydało się zatem bardzo prawdopodobne, że receptor wapniowy może również pośredniczyć w mechanizmie sekrecji czynnika hipertensyjnego (PHF) przez komórki przytarczyc, co nie zostało do tej pory wykazane. Możliwe jest wobec tego, że podanie zwierzętom kalcymimetyka może doprowadzić do zahamowania sekrecji PHF, co powinno objawiać się spadkiem ciśnienia krwi u szczurów, szczególnie zaś u szczurów hipertensyjnych SHR, u których wykazano obecność PHF<sup>8</sup>. W zgodzie z taką hipotezą pozostają nasze wcześniejsze doświadczenia, w których podano normotensyjnym szczurom kalcymimetyk typu I, gentamycynę<sup>36</sup>.

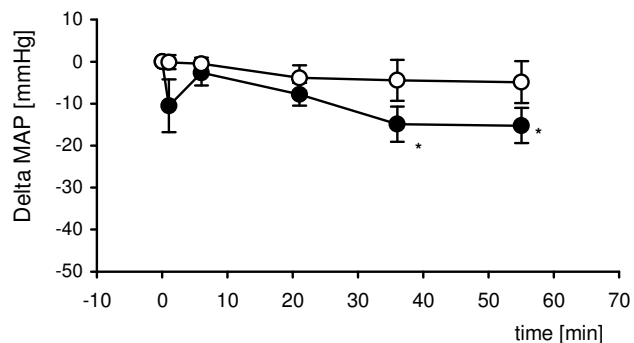
Doświadczenia te wykazały, że podanie gentamycyny wywołuje skutki „farmakologicznej paratyreoidektomii”, tzn. obniża stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w osoczu krwi (Rys. 1) oraz wydalanie fosforanów z moczem u szczurów (Rys. 2). Jednocześnie stwierdzono, że podanie gentamycyny istotnie obniża ciśnienie tętnicze krwi u tych szczurów (Rys. 3). Natomiast usunięcie przytarczyc przez wykonanie zabiegu paratyreoidektomii zapobiega wystąpieniu tego efektu. Najczęściej stosowanym w pracach eksperymentalnych kalcymimetykiem jest NPS R-568, kalcymimetyk typu II, należący do fenyloalkoloamin. Podany doustnie skutecznie obniża sekrecję PTH oraz stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  zarówno u zwierząt doświadczalnych<sup>39</sup> jak i u pacjentów z pierwotną nadczynnością przytarczyc<sup>41</sup>.



**Rysunek 1** Zmniejszenie stężenia  $[Ca^{2+}]$  w osoczu po podaniu dożylnym gentamycyny w czasie 0 szczurom Wistar. Symbole zaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym u szczurów traktowanych gentamycyną; niezaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym w grupie kontrolnej; (\*) odpowiada statystycznie znamiennej różnicom pomiędzy grupami, wykazanym w teście t-Studenta. Zaadaptowano z Boblewski K. i in. Ann. Acad. Med. Gedan., 2003,33 suppl. 1,97-104.



**Rysunek 2** Zmniejszenie frakcyjnego wydalania fosforanów (FEPI%) po podaniu dożylnym gentamycyny w czasie 0 szczurom Wistar. Symbole zaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym u szczurów traktowanych gentamycyną; niezaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym u szczurów w grupie kontrolnej; (\*) odpowiada statystycznie znamiennej różnicom pomiędzy grupami, wykazanym w teście t-Studenta. Zaadaptowano z Boblewski K. i in. Ann. Acad. Med. Gedan., 2003,33 suppl. 1,97-104



**Rysunek 3** Obniżenie średniego ciśnienia tętniczego (MAP) wyrażone w postaci  $\Delta$ MAP, to jest różnicy między wartością w danym czasie eksperymentu a wartością w czasie 0 po podaniu dożylnym gentamycyny w czasie 0 szczurom Wistar. Symbole zaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym u szczurów traktowanych gentamycyną; niezaciemnione odpowiadają wartościom uzyskanym u szczurów w grupie kontrolnej; (\*) odpowiada statystycznie znaczącym różnicom pomiędzy grupami wykazanym w teście t-Studenta. Zaadaptowano z Boblewski K. i in. Ann. Acad. Med. Gedan., 2003,33 suppl. 1,97-104

Dotychczas nie ukazały się prace, w których badano wpływ kalcymimetyków na ciśnienie tętnicze krwi u zwierząt hipertensyjnych lub u pacjentów z pierwotną nadczynnością przytarczyc i nadciśnieniem, a więc w stanach, którym towarzyszy wzmożona sekrecja PHF.



## **2. CEL PRACY**

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu kalcymimetyka NPS R-568 oraz zabiegu tyreoparatyreoidektomii (TPTX) na ciśnienie tętnicze krwi szczurów hipertensyjnych (SHR) w porównaniu do ich normotensyjnej kontroli, szczurów Wistar Kyoto (WKY).

### **3. METODY I MATERIAŁ**

#### **3.1. Zwierzęta doświadczalne i przebieg doświadczenia**

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów linii SHR i oraz normotensyjnych WKY. Waga szczurów wynosiła 200–280 gramów. Zwierzęta były karmione standardową paszą LABOFEET (zezwoleń nr 38/2003, PIW Nakło n/Notecią). Szczury przebywały w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej temp. 21°C, bez dostępu światła dziennego. Automatyczne oświetlenie pomieszczenia zapewniało 12 godzin światła sztucznego i 12 godzin ciemności. Zwierzęta miały ciągły dostęp do jedzenia i wody. Zgodę na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano od Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Akademii Medycznej w Gdańsku (opinia nr 10 z dn. 11 lutego 2002).

Zwierzęta wprowadzono w znieczulenie ogólne Thiopentalem (BIOCHEMIE, Austria) podawanym dootrzewnowo w dawce 40 mg/kg m.c.

Po znieczuleniu przymocowywano szczura do stolika preparacyjnego firmy JWE Electronic, utrzymującego stałą temperaturę 37°C. Następnie przeprowadzano tracheostomię, umieszczając w tchawicy szczelnie dopasowaną rurkę polietylenową umożliwiającą zwierzęciu swobodne oddychanie. Do żyły szyjnej zewnętrznej wprowadzano dren polietylenowy, przez który podawano płyn infuzyjny jednocześnie z dwóch strzykawk przy użyciu pompy infuzyjnej firmy Sage, typu Orion M 361. Szybkość infuzji wynosiła 80ml/min z obu strzykawk (40ml/min z jednej strzykawki).

Do tętnicy szyjnej wprowadzano dren polietylenowy do pobierania krwi i pomiaru średniego ciśnienia tętniczego krwi (ang. Mean Arterial Pressure – MAP). Dren łączono z przetwornikiem ciśnienia, urządzenia do zbierania danych biologicznych, MP100 firmy BIOPAC (BIOPAC Systems Inc., Goleta USA). Z cięcia nadłonowego odsłaniano pęcherz

moczowy, do którego po nacięciu szczytu wprowadzano dren polietylenowy i podwiązywano pęcherz na drenie. Zabieg ten umożliwiał swobodne pobieranie moczu.

Jako pierwszy w infuzji był podawany płyn o składzie: 4% roztwór albuminy (Sigma-Aldrich, Niemcy) w 0,9% roztworze NaCl (Fresenius Kabi, Polska) w objętości 3 ml z jednej strzykawki; z drugiej taką samą objętość 0,9% roztworu NaCl. Należy zaznaczyć, że ilekroć stosowano w niniejszych doświadczeniach 0,9% roztwór NaCl, to zawsze był to roztwór z dodatkiem heparyny, w ilości 1 IU/ml. Po zakończeniu infuzji roztworu albuminy zmieniano skład płynu infuzyjnego: obie strzykawki wypełniano 0,9% roztworem NaCl w objętości około 3 ml w każdej. Po ustaleniu się diurezy podawano inulinę (<sup>3</sup>H Inulin, Amersham Biosciences, Wielka Brytania) w jednorazowej, dożylniej dawce 7  $\mu$ Ci/szczura rozpuszczonej w 300  $\mu$ l soli fizjologicznej. Po podaniu inuliny zmieniano również skład płynów podawanych w infuzji: w pierwszej strzykawce pozostawał 0,9% roztwór NaCl, w drugiej - roztwór znakowanej inuliny (<sup>3</sup>H Inulin) w 0,9% NaCl podawany w dawce 0,028  $\mu$ Ci/min. Końcowe objętości płynu infuzyjnego wynosiły około 9 ml w każdej ze strzykawek.

Po 20 minutach od podania jednorazowej dawki <sup>3</sup>H inuliny prowadzono pierwszą, trwającą 10 minut, zbiórkę moczu. W połowie tego czasu pobierano z tętnicy około 250ml krwi do próbówki typu Eppendorf oraz do kapilary o objętości 150  $\mu$ l (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA, USA), upuszczając uprzednio 2-3 krople w celu pozbycia się płynu infuzyjnego z drenu. Probówki z pobraną krwią wirowano w wirówce Centrifuge 5417C (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Niemcy) przez 10 min (10 000 obrotów/min). Po wirowaniu oddzielano surowicę do badań. W ten sposób uzyskane osocze przeznaczono do oznaczenia stężenia fosforanów oraz pomiaru ilości cpm (counts per minutes) <sup>3</sup>H.

We krwi pobranej do kapilar oznaczano wapnia zjonizowanego  $\{Ca^{2+}\}$  oraz stężenie sodu  $[Na^+]$ . W próbkach pobranego moczu oznaczano stężenie fosforanów oraz mierzono ilość cpm.

Bezpośrednio po zakończeniu pierwszej zbiórki moczu podawano w pojedynczej iniekcji dożylniej substancję badaną (NPS R-568) lub kontrolną (cyklodekstrynę). Moment zakończenia pierwszej zbiórki moczu i podania substancji badanej przyjmowano za „czas 0”.

### **3.1.1. Grupa 1: SHR/NPS (n=6)**

W czasie 0 szczurom podawano dożylnie NPS R-568 (NPS), w dawce 1mg/kg c.c rozpuszczony w roztworze 15% cyklodekstryny (Sigma), objętość podanego roztworu wynosiła 300  $\mu$ l. Dziesięciominutowe zbiórki moczu rozpoczynano 10 minut przed oraz w 25, 55, 85 i 115 minucie po podaniu substancji badanej. W połowie każdej zbiórki moczu pobierano krew.

### **3.1.2. Grupa 2: SHR/kontrola (n=5)**

W czasie 0 szczurom podawano dożylnie wyłącznie 15% roztwór cyklodekstryny (Sigma). Objętość roztworu była taka sama, jak w przypadku grupy 1. Zbiórki moczu i pobrania krwi przeprowadzano w tym samym czasie co w grupie 1.

### **3.1.3. Grupa 3: SHR-TPTX/NPS (n=5) i Grupa 4: SHR-TPTX/kontrola (n=4)**

Przed wykonaniem tracheostomii, każdego szczura poddawano tyreoparatyreoidektomii (TPTX). Zabieg polegał na usunięciu tarczycy z przytarczycami metodą elektrokoagulacji. Wykonywano go po odsłonięciu tchawicy, a przed wykonaniem tracheotomii. Zwierzętom w grupie 3 podawano NPS, w sposób opisany dla grupy 1, natomiast szczurom w grupie 4 - 15% roztwór cyklodekstryny (jak w przypadku zwierząt z grupy 2). Zbiórki moczu i pobrania krwi przeprowadzano w tym samym czasie co w grupie 1.

#### **3.1.4. Grupa 5: WKY/NPS (n=4) i Grupa 6: WKY/kontrola (n=4)**

Doświadczenia na szczurach normotensyjnych szczepu WKY wykonano w ten sam sposób jak opisano dla szczurów szczepu SHR. Grupa 5 odpowiada 1, natomiast 6 - 2.

#### **3.1.5. Grupa 7: WKY-TPTX/NPS (n=5) i Grupa 8: WKY-TPTX/kontrola (n=4)**

Doświadczenia na szczurach normotensyjnych szczepu WKY wykonano w ten sam sposób jak opisano dla szczurów szczepu SHR. Grupa 7 odpowiada 3, natomiast 8 - 4.

W celu oceny wpływu NPS na stężenie parathormonu (PTH), dodatkowo przeprowadzono doświadczenia na dwóch grupach szczurów SHR.

#### **3.1.6. Grupa 9: SHR/NPS (n=6)**

Protokół doświadczenia podobny do zastosowanego w grupie 1, różniący się tym, że zwierzęta nie otrzymywały <sup>3</sup>H inuliny oraz próbki krwi pobierano na 10 minut przed podaniem substancji badanej, a następnie 15, 30 i 60 minucie po podaniu NPS, w ilości 1,5 ml. Krew pobierano do wychłodzonych w lodzie próbek Ependorfa, zawierających 10 µl 10% roztworu wersenianu sodu (SIGMA) oraz 2,8 µl 200 mM roztworu PMSF (fluorek fenylometylosulfonowy, SIGMA). Następnie próbki wirowano w temperaturze 4 °C, a oddzielone osocze zamrażano w temperaturze -70 °C do czasu wykonania oznaczenia PTH. W celu przeciwdziałania skutkom utraty dużej ilości krwi, spowodowanej pobieraniem krwi, natychmiast po oddzieleniu osocza komórki płukano dwukrotnie w 0,9% NaCl, po czym zawieszano w soli fizjologicznej i podawano dożylnie szczurowi jako koncentrat erytrocytów.

### **3.1.7. Grupa 10: SHR/kontrola (n=4)**

Postępowanie w tej grupie było analogiczne do opisanego dla szczurów z grupy 9, z tym, że zwierzęta otrzymywały dożylnie, jednorazowo 15% roztwór cyklodekstryny.

### **3.2. Pomiary i obliczenia**

Całkowitą radioaktywność próbek krwi i moczu mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego Wallac 1409. Stężenie fosforanów w osoczu krwi oraz w moczu mierzono zmodyfikowaną metodą według Fiske i SubbaRow<sup>42</sup>. Stężenie sodu [Na<sup>+</sup>] oraz stężenie wapnia zjonizowanego [Ca<sup>2+</sup>] mierzono za pomocą analizatora AVL 988-4. Stężenie PTH określano za pomocą testu radioimmunologicznego do oznaczania stężenia rPTH (Pennisula Laboratories, Inc.).

Wartości przedstawiono jako średnie z poszczególnych eksperymentów  $\pm$  błąd standardowy średniej (SE). Ocenę istotności statystycznej dokonano testem t-Studenta porównując wartości po podaniu substancji badanej z wartościami uzyskanymi przed podaniem NPS w obrębie tej samej grupy, bądź porównując wartości uzyskane w grupie traktowanej substancją badaną w porównaniu do grupy kontrolnej. Za graniczny poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ .

#### **3.2.1. Średnie ciśnienie tętnicze.**

Wartości chwilowe ciśnienia tętniczego krwi mierzono i zapisywano z częstotliwością 100 Hz na twardym dysku komputera, z zastosowaniem urządzenia do zapisu danych biologicznych firmy BIOPAC Systems Inc. (Goleta, USA), model MP 100. Wartości zapisane przetworzono usuwając artefakty i obliczając średnie ciśnienie tętnicze dla każdej minuty eksperymentu, za pomocą programu ACQKnowledge (BIOPAC Systems, Inc., Goleta, USA). Tak uzyskane wartości wygładzono i przedstawiono na wykresach w postaci wielomianów 16-tego stopnia, stosując program Matlab

Code (MathWorks, Inc., Natick, USA). Uzyskane w ten sposób wartości oznaczono jako MAP (ang. Mean Arterial Pressure).

Ze względu na różnice w ciśnieniu tętniczym obserwowanym pomiędzy szczurami przed podaniem substancji badanej, dodatkowo wyznaczono  $\Delta$ MAP. Wartość  $\Delta$ MAP, przyporządkowaną każdej minucie eksperymentu, obliczono dla każdego eksperymentu osobno odejmując od wartości średniej MAP dla danej minuty wartość średnią MAP dla minuty 0. Postępowanie takie pozwoliło na bezpośrednie porównania badanego efektu pomiędzy grupami doświadczalnymi, pomimo różnych wartości wyjściowych ciśnienia.

Obliczone wartości  $\Delta$ MAP poddano analizie statystycznej w następujący sposób:

- Wartości  $\Delta$ MAP poddano analizie ANOVA dla powtarzalnych pomiarów za pomocą programu Statistica 6,0 (StatSoft Inc., Tulusa, USA).
- W przypadku uzyskania różnic statystycznie znamiennej przeprowadzono dodatkowo porównania post-hoc w postaci testów Bonferroniego i Duncana.

Wartość  $p < 0,05$  uznano za statystycznie znamiennej.

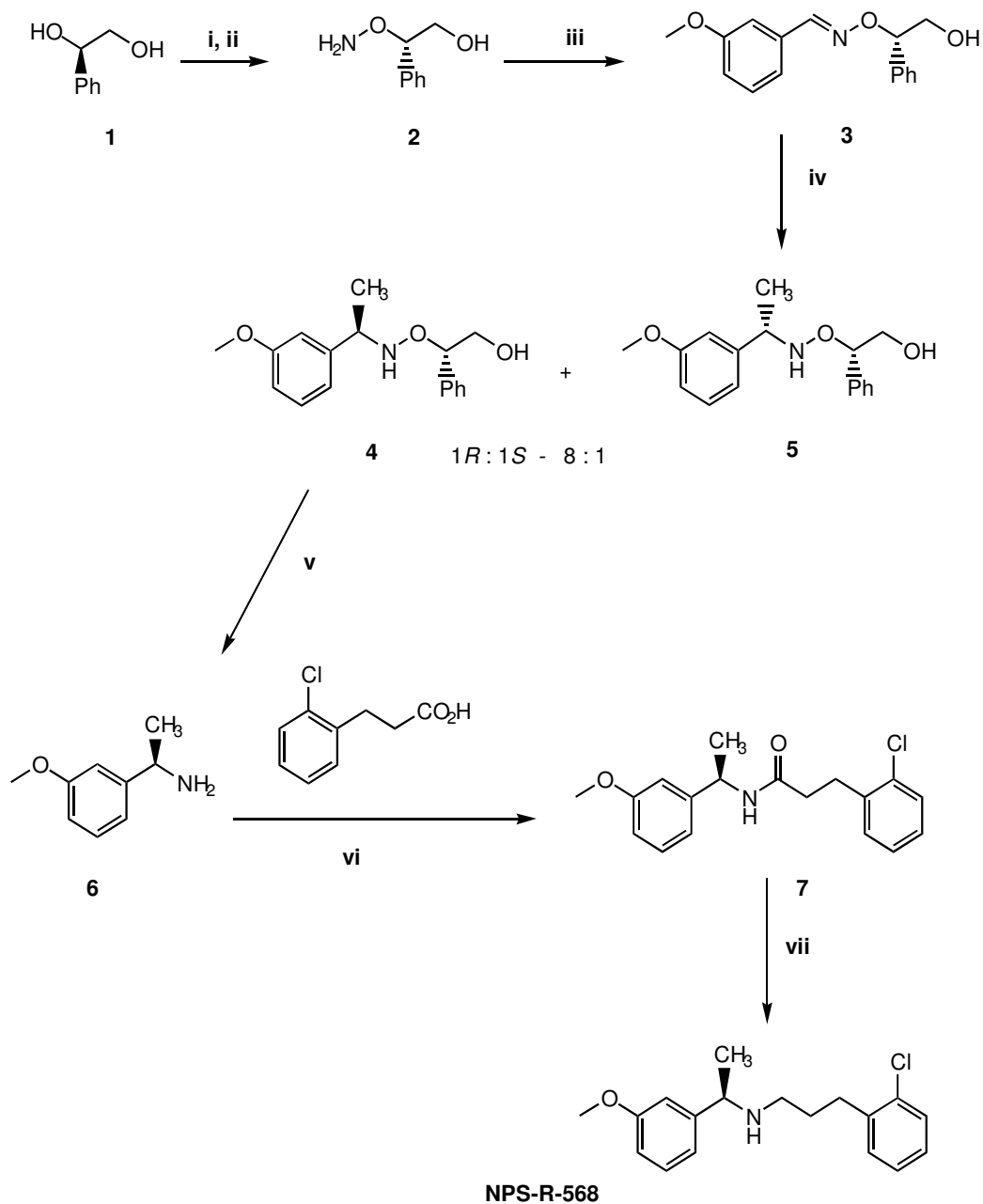
### **3.3. Synteza kalcymimetyka NPS R-568**

Tytułowy związek został otrzymany w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Gdańsku. Syntezę przeprowadzono w siedmiu etapach metodą opisaną uprzednio przez Yamazaki<sup>43</sup>. W stereoselektywnej syntezie wykorzystano jako pomocnik dostępny komercyjnie (R)-1-fenyl-1,2-etanodiol (**1** Rys. 4), który poddano reakcji Mitsunobu z N-hydroksyftalimidem. Hydrazynoliza otrzymanego alkoksyftalimidu, a następnie kondensacja powstałej hydroksyloaminy **2** (Rys. 4) z 3-metoksybenzaldehydem prowadziła do eteru oksymu **3** (Rys. 4). Przyłączenie metylolitu do związku **3** przebiegało z wysoką diastereoselektywnością. Po rozdziale chromatograficznym

(chromatografia kolumnowa) diastereoizomerycznych produktów, uzyskano czysty 1R diastereoizomer hydroksyloaminy **4** (Rys. 4). W kolejnym etapie przeprowadzono redukcję wiązania N-O za pomocą cynku w kwasie octowym, na łaźni ultradźwiękowej<sup>44</sup>, po czym otrzymaną (R)-1-(3-metoksyfenylo)etyloaminę **6** (Rys. 4) sprzęgnięto z kwasem (2-chlorofenylo)propionowym w obecności DCC-DMAP uzyskując amid **7** (Rys. 4). Ten ostatni związek przekształcono w pożądaną aminę (NPS R-568) poprzez redukcję za pomocą DIBAL-H. Do badań farmakologicznych używano chlorowodoru aminy, otrzymanego w typowy sposób. Dane spektralne NPS R-568 (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR) oraz temperatura topnienia były w pełni zgodne z literaturowymi<sup>45</sup>, a określona na podstawie dokładnej analizy widma <sup>1</sup>H NMR oraz wyników analizy elementarnej czystość związku wynosiła >98,5%.

Czystość enancjomeryczną uzyskanej aminy sprawdzono metodą <sup>1</sup>H NMR z wykorzystaniem kwasu (S)-O-acetylmigdałowego jako chiralnego czynnika solwującego. W widmach <sup>1</sup>H NMR tworzących się diastereoizomerycznych soli obserwuje się istotne różnice przesunięć chemicznych dla protonów grupy metylowej związanej bezpośrednio z asymetrycznym atomem węgla. W widmie protonowym otrzymanej aminy w roztworze deuterio-chloroformu, w temperaturze pokojowej, w obecności różnych ilości kwasu (S)-O-acetylmigdałowego występował tylko jeden sygnał protonów grupy metylowej (CH<sub>3</sub>-C), podczas gdy w zarejestrowanym w analogicznych warunkach widmie mieszaniny racemicznej aminy obecne były dwa wyraźnie rozróżnialne sygnały tej grupy, co wskazuje, że nadmiar enancjomeryczny (ee) w przypadku zsyntetyzowanej aminy wynosił >95%.





**Rysunek 4 Synteza NPS R-568.**

Warunki reakcji: **(i)** N-hydroksyftalimid, DEAD,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , THF,  $50^\circ\text{C}$ , 3 dni  
**(ii)**  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , EtOH,  $80^\circ\text{C}$  do temp. pok., 30 min. **(iii)** 3-metoksybenzaldehyd, PTSA, toluen,  $70^\circ\text{C}$ , 30 min. **(iv)** MeLi w eterze etylowym, toluen,  $-15^\circ\text{C}$  do  $0^\circ\text{C}$ , 25 min. **(v)** Zn, AcOH- $\text{H}_2\text{O}$ ,  $55^\circ\text{C}$ , ultradźwięki, 10 godz. **(vi)** DCC, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , temp. pok., 5 godz. **(vii)** DIBAL-H,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , temp. pok., 7 godz. Skróty: DCC - dicykloheksylokarbodiimid; DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna; DIBAL-H - wodorek diizobutyloglinu;  $^1\text{H}$  NMR - spektroskopia protonowego rezonansu jądrowego;  $^{13}\text{C}$  NMR - spektroskopia rezonansu jądrowego węgla-13; DEAD - azodikarboksylan dietylowy;  $\text{Ph}_3\text{P}$  - trifenylfosfina; THF - tetrahydrofuran; PTSA - kwas *p*-toluenosulfonowy.

## 4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

### **4.1. Wpływ NPS R-568 na stężenie wapnia zjonizowanego w osoczu i frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem u szczurów**

Podanie NPS R-568 powodowało przejściowe obniżenie stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu krwi, zarówno u szczurów SHR jak i WKY (Tab. 1). Najniższe stężenie notowano w 60 minucie po podaniu NPS, to jest  $0,97 \pm 0,03$  mmol/l u SHR a  $0,89 \pm 0,02$  mmol/l u WKY. Od 60 minuty po podaniu NPS stężenie wapnia powracało do wartości wyjściowych, nie osiągając ich jednak w czasie objętym doświadczeniem u obu szczepów szczurów (Tab. 1). W grupach kontrolnych stężenie wapnia zjonizowanego nie ulegało zmianie, jakkolwiek w grupie kontrolnej SHR było nieco wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej WKY (Tab. 1).

Podanie NPS obniżało istotnie wydalanie fosforanów z moczem, przedstawione w postaci frakcyjnego wydalania fosforanów (FE Pi). Działanie to zaznaczyło się najsilniej w 60 minucie po podaniu NPS u szczurów SHR i WKY. FE Pi% w 60 minucie po podaniu NPS wynosiło  $7,1 \pm 1,4\%$  u szczurów SHR a u WKY  $3,0 \pm 0,2\%$  (Tab. 1). Natomiast w grupach kontrolnych, zarówno u WKY jak i SHR nie tylko nie zaobserwowano spadku FE Pi%, ale występował trwały wzrost frakcyjnego wydalania fosforanów z moczem. FE Pi u szczurów SHR było wyższe w porównaniu do wartości uzyskanych u WKY, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej.

Nie wykazano istotnych różnic w filtracji kłębkowej pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Obserwowano jednak, nieznaczny wzrost tej filtracji u zwierząt traktowanych NPS.

**Tabela 1**

Wpływ NPS R-568 na stężenie Ca<sup>2+</sup> w osoczu (A) i frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem (B) oraz wartości filtracji kłębkowej (C) u szczurów SHR i WKY.

A	Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]							
	SHR				WKY			
	CDX (n=5)		NPS (n= 6)		CDX (n= 5)		NPS (n= 4)	
Czas [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE
-5	1,24	0,03	1,18	0,01	1,15	0,05	1,15	0,05
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola							
30	1,22 \$	0,03	1,04 * #	0,02	1,12	0,10	0,96 *	0,03
60	1,26	0,02	0,97 * #	0,03	1,15	0,05	0,89 * #	0,02
90	1,28 \$	0,02	1,01 * #	0,03	1,16	0,05	0,95 * #	0,04

B	FEPi (%)							
	SHR				WKY			
	CDX (n= 5)		NPS (n= 6)		CDX (n= 5)		NPS (n= 5)	
Czas [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE
-5	17,50	3,40	14,00	1,18	10,50	2,70	7,03	0,90
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola							
30	26,00 \$	4,20	10,80 # \$	2,40	13,20	2,20	4,00 * #	0,40
60	27,40 \$	3,60	7,10 * # \$	1,40	18,30 *	1,80	3,00 * #	0,20
90	27,20 \$	3,30	14,30 \$	2,10	17,50	2,40	11,70 *	1,20

C	GFR [ml/min]							
	SHR				WKY			
	CDX (n= 5)		NPS (n= 6)		CDX (n=5)		NPS (n= 5)	
Czas [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE
-5	2,06	0,20	2,77	0,16	2,98 &	0,25	3,00	0,25
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola							
30	2,38	0,09	2,15 *	0,16	3,02 &	0,23	3,05	0,18
60	2,20	0,09	2,01 *	0,18	2,44	0,32	2,37	0,15
90	2,13	0,21	2,06 *	0,19	2,61	0,25	2,20 *	0,03

Dane przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SE. Zaznaczono znamienne różnice, obliczone testem t-Studenta; \* p<0,05 względem -5 minuty doświadczenia; # p<0,05 względem kontroli; \$ p<0,05 względem WKY; & p<0,05 względem kontroli SHR.

Wyniki uzyskane w grupach poddanych TPTX przedstawiono w Tabeli 2. Usunięcie przytarczyc powodowało istotny spadek stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu krwi o około 15% w porównaniu do zwierząt nie poddanych zabiegowi (Tab. 2) i praktycznie całkowicie hamowało wydalanie fosforanów z moczem. Obserwowane u zwierząt po TPTX obniżenie stężenia wapnia zjonizowanego jak i zmniejszenie wydalania fosforanów z moczem utrzymywało się do końca eksperymentu.

U zwierząt poddanych TPTX podanie NPS nie miało wpływu ani na stężenie wapnia zjonizowanego ani na frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem (brak istotnych różnic pomiędzy grupami traktowanymi NPS a traktowanych samą cyklodekstryną). Filtracja kłębkowa ulegała niewielkim zmianom u zwierząt traktowanych NPS po TPTX. Jednak tylko obniżenie filtracji kłębkowej u WKY traktowanych NPS osiągnęło próg znamienności statystycznej (Tab. 2).

**Tabela 2**

Wpływ NPS R-568 na stężenie Ca<sup>2+</sup> w osoczu (A) i frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem (B) oraz wartości filtracji kłębkowej (C) u szczurów SHR i WKY poddanych tyteoparatyreoidektomii.

A		Ca <sup>2+</sup> [mmol/l]							
		SHR				WKY			
Czas [min]	CDX (n=5)		NPS (n= 6)		CDX (n= 5)		NPS (n= 4)		
	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	1,08	0,04	1,01	0,03	1,03	0,05	1,04	0,04	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	1,03	0,08	1,03	0,02	0,99	0,04	1,05	0,01	
60	1,05	0,04	1,02	0,03	1,01	0,04	1,09	0,03	
90	1,02	0,05	1,04	0,04	0,99	0,06	1,11	0,04	

B		FEPi (%)							
		SHR				WKY			
Czas [min]	CDX (n= 5)		NPS (n= 6)		CDX (n= 5)		NPS (n= 5)		
	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	2,79 #	0,87	1,94 #	0,28	0,16	0,03	0,20	0,20	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	2,29	0,13	2,31 #	0,34	0,20	0,04	0,24	0,02	
60	2,02 #	0,29	2,21 #	0,30	0,14	0,02	0,16	0,01	
90	2,55 #	0,47	2,54 #	0,56	0,14	0,01	0,16	0,01	

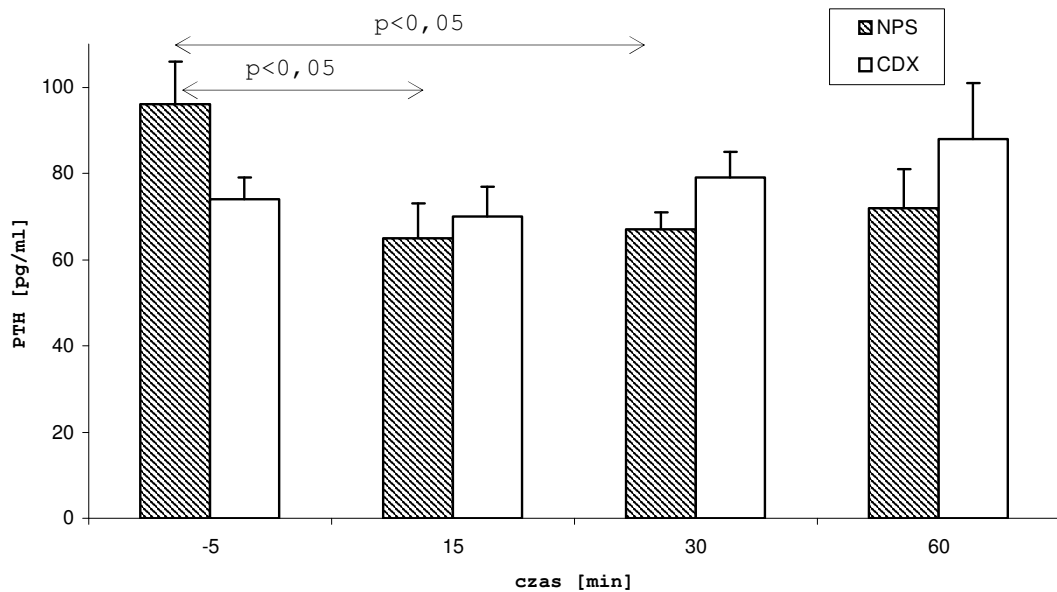
  

C		GFR [ml/min]							
		SHR				WKY			
Czas [min]	CDX (n= 5)		NPS (n= 6)		CDX (n=5)		NPS (n= 5)		
	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	2,49	0,10	3,08	0,09	2,82	0,14	2,97	0,15	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	1,83	0,28	3,06	0,43	2,47	0,44	2,76	0,38	
60	2,11	0,18	2,61	0,31	2,22	0,45	2,30 *	0,16	
90	2,36	0,59	2,70	0,40	2,36	0,50	1,97 *	0,17	

Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SE. Zaznaczono znamienne różnice, obliczone testem t-Studenta; \* p < 0,05 względem wyników z 5 min. doświadczenia; # p < 0,05 względem WKY.

#### 4.2. Wpływ podania NPS R-568 na stężenie parathormonu u szczurów SHR

Stężenie PTH zmniejszało się u szczurów SHR po podaniu NPS z  $96 \pm 9$  pg/ml do  $65 \pm 7$  pg/ml ( $p < 0,02$ ),  $67 \pm 3$  pg/ml ( $p < 0,01$ ) i  $72 \pm 8$  pg/ml odpowiednio w 15, 30 i 60 minucie po podaniu NPS (Rys. 5). W grupie kontrolnej SHR, nie stwierdzono istotnych zmian stężenia PTH w czasie trwania doświadczenia. W próbce krwi pobranej w czasie 0 stężenie PTH wynosiło  $74 \pm 4$  pg/ml, w porównaniu do  $70 \pm 6$ ;  $79 \pm 5$  i  $88 \pm 12$  pg/ml odpowiednio w próbkach pobranych w 15, 30 i 60 minucie doświadczenia.



**Rysunek 5** Wpływ NPS R-568 na stężenie parathormonu u szczurów SHR. Dane przedstawiono w postaci średnich  $\pm$  błąd standardowy (SE). Porównań dokonano za pomocą testu t-Studenta.

#### **4.3. Inne oznaczenia**

Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach sodu pomiędzy wszystkimi grupami (Tab. 3A i B). Jakkolwiek nie stwierdzono wpływu podania NPS bądź cyklodekstryny na wielkość diurezy w żadnej grupie zwierząt, to obserwowano jej zmniejszanie się w czasie (Tab. 3C i D). Ponadto stwierdzono niższą wartość diurezy w pierwszej zbiorce moczu w dwóch grupach szczurów po TPTX. Szczury SHR poddane TPTX i traktowane cyklodekstryną oraz szczury WKY traktowane NPS miały w tej zbiorce znamienne niższą diurezę niż odpowiadające im zwierzęta niepoddane TPTX (Tab. 3C i D).

**Tabela 3**

Wpływ NPS R-568 na stężenie sodu (mmol/l) i diurezę (ml/min) u szczurów SHR i WKY niepoddanych (A i C) i poddanych TPTX (B i D).

A		Na <sup>+</sup> mmol/l							
		SHR				WKY			
		CDX (n=5)		NPS (n=6)		CDX (n=5)		NPS (n=4)	
CZAS [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	143	1	142	1	142	2	144	1	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	142	1	140	1	143	1	144	1	
60	141	1	139	1	145	1	145	1	
90	141	1	139	1	144	1	143	2	

B		Na <sup>+</sup> mmol/l							
		SHR/TPTX				WKY/TPTX			
		CDX (n=4)		NPS (n=5)		CDX (N=4)		NPS (n=4)	
CZAS [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	143	1	141	1	139	3	137	4	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	141	1	141	1	140	2	140	1	
60	142	1	142	1	144	1	143	1	
90	141	1	143	1	144	2	145	1	

C		V ml/min							
		SHR				WKY			
		CDX (n=5)		NPS (n=6)		CDX (N=5)		NPS (n=4)	
CZAS [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	0,13 #	0,01	0,12	0,02	0,11	0,02	0,12	0,01	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	0,1 * #	0,01	0,07 *	0,01	0,09 *	0,02	0,09 * #	0,01	
60	0,06 *	0,01	0,05 *	0,01	0,06 *	0,02	0,05 *	0,01	
90	0,04 *	0,01	0,03 *	0,01	0,03 *	0,01	0,05 *	0,01	

D		V ml/min							
		SHR/TPTX				WKY/TPTX			
		CDX (n=4)		NPS (n=5)		CDX (N=4)		NPS (n=4)	
CZAS [min]	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	
-5	0,08	0,01	0,09	0,01	0,07	0,01	0,1	0,02	
0	NPS R-568 1 mg/kg c.c. lub kontrola								
30	0,04 *	0,01	0,07	0,01	0,04	0,01	0,05	0,01	
60	0,04 *	0,01	0,04 *	0,01	0,03 *	0,01	0,03 *	0,01	
90	0,05 *	0,01	0,03 *	0,01	0,03 *	0,01	0,02 *	0,01	

V = diureza; TPTX = tyreoparatyreoidektomia. Dane przedstawiono jako wartości średnie ± SE. Zaznaczono znamienne różnice obliczone testem t-Studenta. \* p<0,05 względem -5 minuty doświadczenia; # p<0,05 względem grup poddanych TPTX.

#### **4.4. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego po podaniu NPS R-568**

Działanie NPS na średnie ciśnienie tętnicze (MAP) szczurów z wysokim ciśnieniem tętniczym SHR przedstawiono na Rysunku 6 i w Tabeli 4. W tej grupie szczurów różnica przebiegu zmienności MAP w czasie, pomiędzy zwierzętami traktowanymi NPS a kontrolnymi, zaczyna się zaznaczać już po 20 minucie od podania kalcymimetyka. Wpływ NPS u szczurów SHR najsilniej zaznacza się w 50 minucie doświadczenia (Tab. 4, Rys. 6 i Rys 8). W ciągu tego czasu podanie NPS szczurom SHR spowodowało obniżenie MAP o 17 mmHg, podczas gdy w grupie kontrolnej szczurów hipertensyjnych MAP zmniejszyło się jedynie o 3 mmHg (Tab. 4). Obserwację tą potwierdza wykres  $\Delta$ MAP, przedstawionej jako różnica pomiędzy wartością MAP w danej chwili doświadczenia a wartością MAP w czasie 0 (podanie NPS lub cyklodekstryny) (Rys. 6B). W grupie mormotensyjnych szczurów WKY nie stwierdzono żadnych, statystycznie znamienych zmian MAP, ani różnic pomiędzy grupami badanymi a kontrolnymi szczurów nie poddanych TPTX (Rys. 7A i B, Tab. 4)

Przeprowadzenie zabiegu TPTX powodowało obniżenie MAP w czasie doświadczenia we wszystkich grupach szczurów SHR i WKY, zarówno traktowanych NPS jak i kontrolnych (spadek o 9 mmHg u szczurów SHR po TPTX traktowanych NPS i o 10 mmHg u szczurów SHR po TPTX traktowanych cyklodekstryną; u szczurów WKY po TPTX traktowanych NPS i cyklodekstryną - 11 mmHg; Tab. 4). Podanie NPS nie powodowało nasilenia obserwowanego po TPTX obniżenia MAP (Rys. 6 i 7, Tab. 4). W grupach SHR i WKY poddanych TPTX i traktowanych NPS zaobserwowano wyższe wartości MAP niż u szczurów kontrolnych po TPTX (Rys. 6 i 7, Tab. 4).

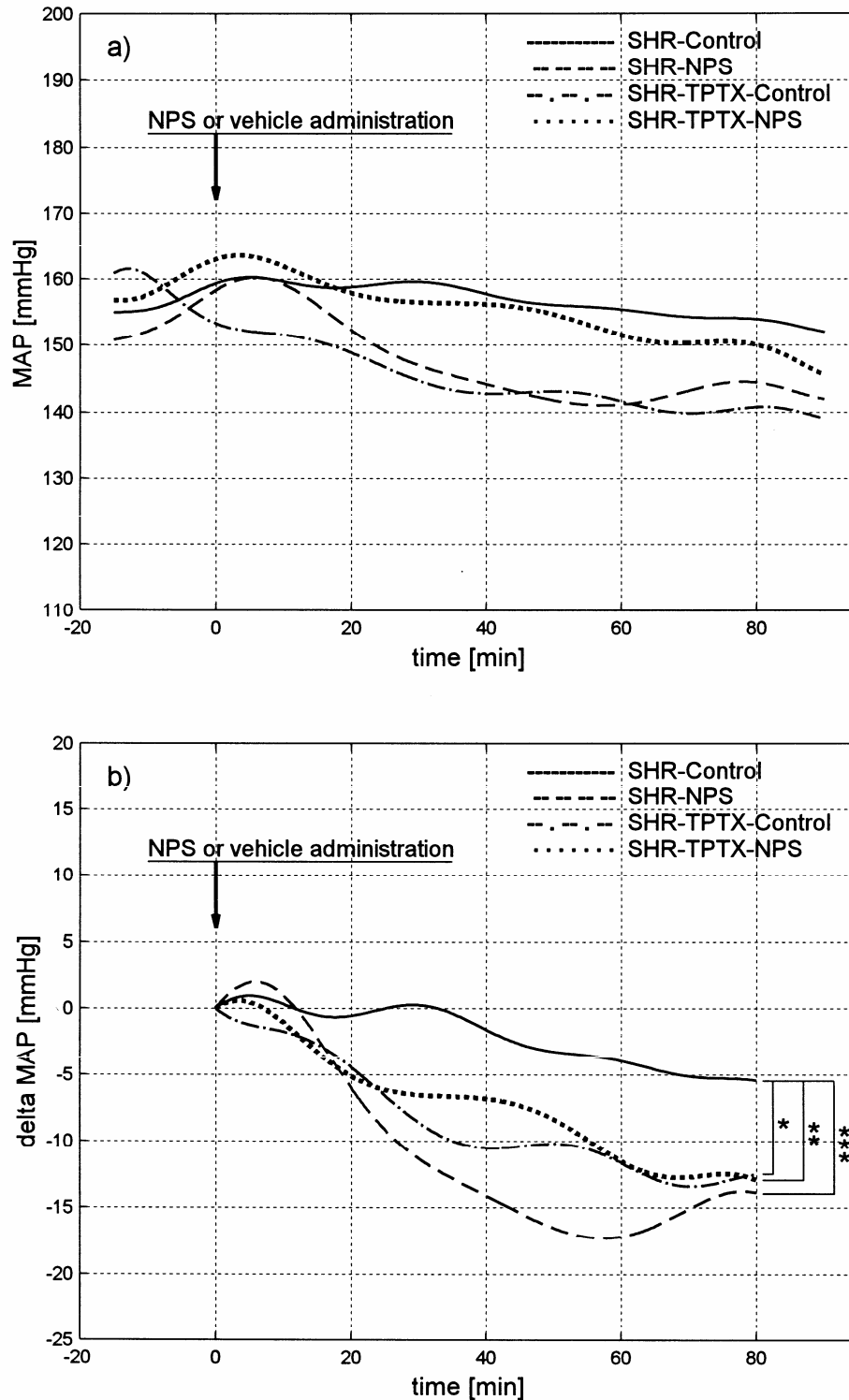


**Tabela 4**

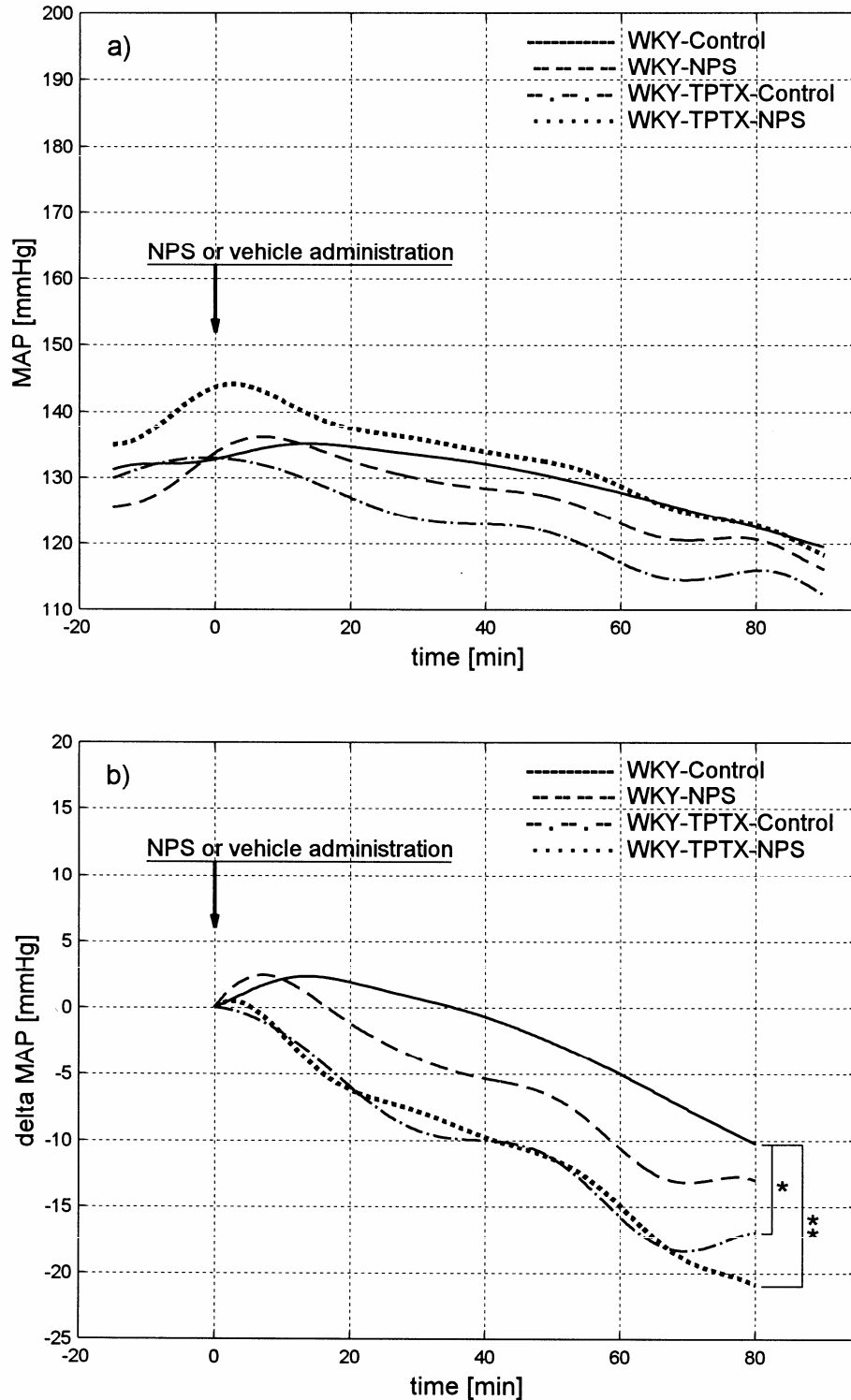
Wpływ NPS R-568 na średnie ciśnienie tętnicze (MAP) szczurów SHR i WKY, poddanych i niepoddanych TPTX.

Czas [min]	MAP [mmHg]							
	CDX		NPS		TPTX/NPS		TPTX/CDX	
SHR	n= 5		n=6		n= 5		n= 4	
	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE
0	159	4,26	158	3,45	163	4,38	153	7,7
50	156	5,43	141 * #	3,37	154 * &	2,11	143 * #	6,36
WKY	n= 5		n= 5		n= 4		n= 4	
	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE	ŚREDNIA	SE
0	132	7,46	133	1,99	143	2,87	134	5,06
50	130	9,77	127	3,09	132 *	4,85	123 *	5,33

Dane przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SE. Zaznaczono znamienne różnice, obliczone testem t-Studenta; \*  $p < 0,05$  względem czasu 0; #  $p < 0,05$  względem kontroli; &  $p < 0,05$  względem kontroli TPTX.



**Rysunek 6** Wpływ podania NPS R-568 (NPS) lub cyklodekstryny (kontrola) na MAP (A) i  $\Delta$ MAP (obliczoną jako różnica pomiędzy daną wartością chwilową a wartością MAP w czasie zero) (B) szczurów SHR; poddanych i niepoddanych tyreoparatyreoidektomii (TPTX). Porównania dokonano za pomocą ANOVA dla powtarzanych pomiarów, testów Bonferoniego i Duncana. Znamienne różnice wykazano dla: kontroli względem NPS(\*\*\*); kontroli względem kontroli po TPTX (\*\*); kontroli względem TPTX-NPS (\*).



**Rysunek 7** Wpływ podania NPS R-568 (NPS) lub cyklodekstryny (kontrola) na MAP (A) i  $\Delta$ MAP (obliczoną jako różnica pomiędzy daną wartością chwilową a wartością MAP w czasie zero) (B) szczurów WKY; poddanych i niepoddanych tyreoparatyreoidektomii (TPTX). Porównania dokonano za pomocą ANOVA dla powtarzanych pomiarów, testów Bonferoniego i Duncana. Znamienne różnice wykazano dla: kontroli względem kontroli po TPTX (\*); kontroli względem TPTX-NPS (\*\*).

## 5. DYSKUSJA

W tej pracy wykazano, że kalcymimetyk NPS R-568 obniża ciśnienie tętnicze krwi u szczurów z wrodzonym nadciśnieniem tętniczym (Rys. 6 i 7, Tab. 4).

Do badań zastosowano kalcymimetyk NPS R-568, zsyntetyzowany w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Akademii Medycznej w Gdańsku. Wybrano enancjomer R ponieważ jest on 10 krotnie silniejszy od S enancjomera<sup>37</sup>. Podanie doustne kalcymimetyków NPS R lub S 568 skutkuje obniżeniem stężenia PTH w osoczu, zależnym od czasu trwania ekspozycji oraz zależnym od dawki<sup>46</sup>. Formy NPS R wywołują połowę maksymalnego wzrostu wapnia wewnątrzkomórkowego przy stężeniach kilku nmol/l, natomiast NPS S przy stężeniach dziesięciokrotnie wyższych. Nawet takie stężenia NPS S nie mają wpływu na działanie innych receptorów należących do rodziny białek G, na przykład receptorów metabotropowych<sup>37</sup>.

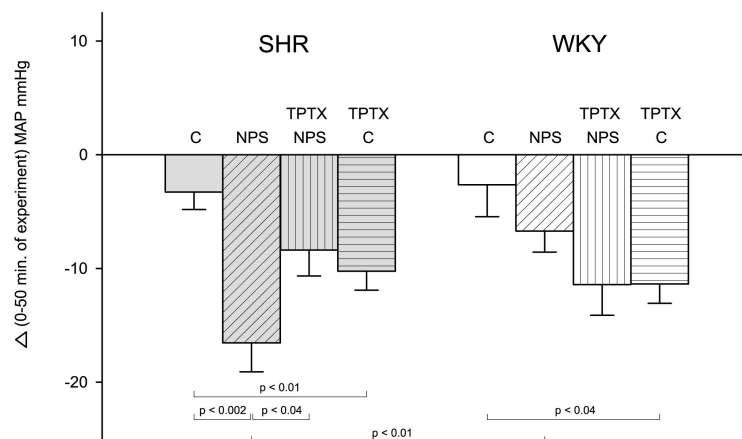
Właściwości kalcymimetyczne związku potwierdzono pośrednio poprzez zbadanie zmian stężenia wapnia i frakcyjnego wydalania fosforanów oraz bezpośrednio, mierząc zmiany stężenia PTH w osoczu. Obniżenie stężenia PTH w osoczu prowadzi do zwiększenia reabsorpcji fosforanów w nerce, a zatem czynnik hamujący sekrecję PTH prowadzi do obniżenia wydalania fosforanów z moczem. Statystycznie istotne obniżenie stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu krwi oraz frakcyjnego wydalania fosforanów obserwowano we wszystkich grupach traktowanych NPS (Tab. 1). Obserwowane nieco wyższe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w osoczu i FEPi szczurów SHR w grupie kontrolnej w porównaniu ze szczurami WKY również z grupy kontrolnej, wynikało prawdopodobnie z opisywanej u SHR większej aktywności przytarczyc i występujących u tych zwierząt wyższych stężeń PTH<sup>47,48</sup>. Stwierdzono również statystycznie istotne zmniejszenie stężenia PTH po podaniu

NPS u szczurów hipertensyjnych (Rys. 6). Tak więc doświadczenia te potwierdziły, że zsyntetyzowany NPS R-568 posiada właściwości charakterystyczne dla kalcymimetyków.

Działanie NPS (farmakologiczną paratyreoidektomię), porównano z chirurgicznym usunięciem przytarczyc, czyli stanem po „fizycznym” usunięciu źródła PTH. Usunięcie przytarczyc powodowało trwałe, statystycznie znamienne obniżenie stężenia wapnia oraz praktycznie wyłączało wydalanie fosforanów z moczem. Efekt ten był wyraźnie widoczny zarówno u SHR jak i WKY poddanych tyreoparatyreoidektomii (Tab. 2), w porównaniu do zwierząt kontrolnych niepoddanych tyreoparatyreoidektomii (Tab. 1). Podawanie NPS nie miało dodatkowego wpływu na przebieg zmian stężenia wapnia zjonizowanego i zanik wydalania fosforanów z moczem u zwierząt poddanych usunięciu tarczycy z przytarczycami (Tab. 2). Podsumowując, w oparciu o porównanie wyników uzyskanych u zwierząt poddanych tyreoparatyreoidektomii i u zwierząt traktowanych zsyntetyzowanym kalcymimetykiem, można powiedzieć, że podanie dożylnie NPS R-568 w dawce 1 mg/kg c.c. spełnia kryteria farmakologicznej paratyreoidektomii.

Jest prawdopodobne, że procesy prowadzące do zablokowania wydzielania PTH z przytarczyc, takie jak na przykład pobudzenie receptora wapniowego na powierzchni komórek przytarczyc, mogą również prowadzić do zablokowania wydzielania przytarczycznego czynnika hipertensyjnego (PHF). W takim przypadku, podanie kalcymimetyka, a więc pobudzenie receptora wapniowego, oprócz skutków typowych dla obniżonej sekrecji PTH (spadku stężenia wapnia zjonizowanego w osoczu, obniżenia stężenia parathormonu we krwi oraz zaniku wydalania fosforanów z moczem) mogłoby wywoływać również zmniejszenie średniego ciśnienia tętniczego. Dane uzyskane w opisanych w niniejszej pracy doświadczeniach potwierdzają taką możliwość. Podanie NPS w

dawce jednorazowej wywoływało u szczurów SHR znamienne obniżenie MAP oraz  $\Delta$ MAP względem wartości przed podaniem jak i względem wartości zmierzonych u zwierząt kontrolnych (Rys. 6, Tab. 4).



**Rysunek 8** Wpływ hipotensyjny kalcymimetyka NPS R-568 (NPS) na ciśnienie tętnicze krwi wyrażony jako różnica pomiędzy średnim ciśnieniem tętniczym krwi (MAP) w czasie 0 i MAP w 50 minucie doświadczenia u szczurów hipertensyjnych (SHR) i normotensyjnych (WKY) poddanych i niepoddanych TPTX. Dane są przedstawione w postaci wartości średnich  $\pm$  SE. Porównań dokonano za pomocą testu t-Studenta.

Natomiast podanie kalcymimetyka NPS szczurom normotensyjnym WKY nie powodowało znamiennych zmian wartości MAP oraz  $\Delta$ MAP w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Rys. 7).

Najsilniejsze działanie hipotensyjne NPS u szczurów SHR zaobserwowano w 50 minucie doświadczenia. Z tego powodu wyniki uzyskane z tego okresu wybrano do dodatkowych porównań przedstawionych na Rysunku 8 i wyrażonych jako  $\Delta$ MAP. Zindeksowanie pomiarów względem wartości uzyskanych tuż przed podaniem substancji badanej miało na celu usunięcie różnic w wyjściowych pomiarach MAP, a wynikających z różnic osobniczych pomiędzy szczurami. Hipotensyjne działanie NPS było znacznie silniejsze u SHR

( $p < 0,002$ ) niż u WKY ( $p$  nieznamiennie), przy porównaniu do odpowiadających im grup kontrolnych (Rys. 8). Przyjmując, że PHF pochodzi z przytarczyc, zabieg usunięcia przytarczyc powinien powodować obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, szczególnie u szczurów SHR. W niniejszych doświadczeniach tyreoparatyreoidektomia powodowała istotne obniżenie MAP, w podobnym zakresie u szczurów SHR i WKY. Zestawienie zmian  $\Delta$ MAP po usunięciu przytarczyc u SHR i WKY nie wykazała statystycznie istotnych różnic (Rys. 8). Ponadto podanie NPS zwierzętom po tyreoparatyreoidektomii nie nasilało hipotensyjnego efektu samego zabiegu (Rys. 6B, 7B i 8), jakkolwiek w „czasie 0” ciśnienie zaobserwowane u szczurów po TPTX i traktowanych NPS było wyższe niż u szczurów poddanych samej tyreoparatyreoidektomii (Rys. 6 i 7). W dalszym ciągu eksperymentu nie obserwowano już żadnych różnic pomiędzy grupami zwierząt poddanych tyreoparatyreoidektomii (Rys. 6 i 7). Obecność przytarczyc okazała się warunkiem koniecznym wystąpienia hipotensyjnego działania NPS. Niniejsze doświadczenia pokazują, że hipotensyjne działanie NPS u zwierząt hipertensyjnych z zachowanymi przytarczycami jest o 60% większe niż obniżenie MAP obserwowane u SHR po tyreoparatyreoidektomii (Rys. 8). Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że działanie hipotensyjne NPS ujawnia się u zwierząt hipertensyjnych z zachowanymi przytarczycami.

Zmiany wydzielania PTH po podaniu NPS R-568 i zmiany ciśnienia tętniczego krwi występują w innym czasie. Może to budzić wątpliwości w związku z proponowaną tu hipotezą wiążącą funkcje wydzielniczą przytarczyc i regulację ciśnienia tętniczego krwi. Wydaje się, że hipotensyjne działanie NPS, co potwierdzono w niniejszych doświadczeniach, prawdopodobnie nie zależy bezpośrednio od zmniejszonego wydzielania PTH, ponieważ wykazano, że jednorazowe podanie z zewnątrz PTH powoduje rozkurcz naczyń

i obniżenie ciśnienia tętniczego krwi<sup>49, 50</sup>. Stąd samo obniżenie sekrecji PTH powinno mieć wręcz przeciwny skutek do obserwowanego tj. spowodować wzrost ciśnienia tętniczego. Możliwe jest również, że sekrecja czynnika hipertensyjnego jest przesunięta w czasie w stosunku do sekrecji PTH, na co wskazywałyby wyniki niniejszych doświadczeń.

Receptor wapniowy jest obecny na powierzchni wielu komórek, w różnych narządach, między innymi w komórkach nefronu<sup>51</sup> i może wpływać na regulację równowagi wodno-sodowej<sup>52</sup>. Z tego powodu można wysunąć przypuszczenie, iż wpływ kalcymimetyków na wydalanie jonów sodowych bądź wody może manifestować się zmianami ciśnienia tętniczego krwi. W doświadczeniach przedstawionych w niniejszej pracy wpływ taki wydaje się mało prawdopodobny ponieważ zmiany diurezy w grupach zwierząt po podaniu NPS jak i w grupach kontrolnych, były niemal identyczne u SHR i u WKY, niezależnie od przeprowadzenia TPTX. Ponadto, nie stwierdzono istotnych zmian stężenia sodu w osoczu, we wszystkich grupach doświadczalnych podczas trwania eksperymentu. (Tab. 4).

Kalcymimetyki stworzyły nowe możliwości leczenia stanów nadczynności przytarczyc. Zwłaszcza spore nadzieje wzbudziło zastosowanie kalcymimetyków we wtórnej nadczynności przytarczyc towarzyszącej przewlekłej niewydolności nerek (PNN). Od pewnego czasu uważa się PTH za jedną z głównych toksyn mocznicowych, której działanie jest daleko rozleglejsze aniżeli wynikałoby to z zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej<sup>53</sup>. Obecnie uważa się, że PTH odpowiada za występującą w przebiegu mocznicy dysfunkcję mięśni, kardiomiopatię, zaburzenia funkcjonowania limfocytów T oraz zmiany w wydzielaniu insuliny przez trzustkę<sup>54</sup>. W badaniach na zwierzęcym modelu PNN - szczurach poddanych częściowej nefrektomii- wykazano,



że zmniejszenie stężenia PTH, za pomocą NPS R-568, powodowało nie tylko poprawę w zakresie gospodarki wapniowej, ale także ogólne spowolnienie progresji niewydolności nerek, wyrażone wolniejszym narastaniem stężenia kreatyniny, zmniejszenie utraty albuminy z moczem. Ponadto zaobserwowano korzystny wpływ tego czynnika na postęp zmian zachodzących w układzie krążenia, wyrażający się opóźnieniem rozwoju zmian wstecznych w naczyniach krwionośnych i w sercu, oraz mniejszymi wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego<sup>55</sup>. U szczurów z mocznicą podanie kalcymimetyka powodowało 50% wyrównanie stężenia PTH w osoczu i zmniejszenie proliferacji komórek przytarczyc oraz przyrost masy kości beleczkowanej<sup>24</sup>. Kalcymimetyki zapobiegały również kamicy nerkowej, wywołanej furosemidem, u młodych szczurów<sup>56</sup>. Pierwszy opis zastosowania NPS R-568 u ludzi nie był wprawdzie związany z PNN, ale dotyczył raka przytarczyc, który z powodu kilkakrotnej wznowy miejscowej nie nadawał się do leczenia chirurgicznego i był oporny na stosowane w tej sytuacji metody lecznicze polegające na podawaniu dożylnym furosemidu, płynów, pamidronianu oraz kalcytoniny<sup>57</sup>. Znaczna poprawa stanu ogólnego pacjenta w tym przypadku zachęciła badaczy do dalszych badań nad zastosowaniem NPS R-568. Jednak jego zastosowanie w badaniu klinicznym u ludzi przewlekłe dializowanych postawiło pod znakiem zapytania zastosowanie tego leku w praktyce klinicznej, ze względu na bardzo zmienną farmakokinetkę<sup>41</sup>. Niemniej jednak badania te potwierdziły korzystne działanie zmniejszenia sekrecji PTH przez kalcymimetyki<sup>46</sup> i stały się impulsem do dalszych poszukiwań. W wyniku tych poszukiwań wprowadzono do badań substancję oznaczoną jako AMG 037<sup>34</sup>. Korzystne wyniki badań farmakokinetyki tego związku spowodowały przeprowadzenie dalszych badań z różnymi dawkami tego związku<sup>58,59</sup> i ostatecznie zaowocowały jego

wprowadzeniem do praktyki klinicznej pod nazwą Cinacalcet<sup>60</sup>. Kalcymimetyki zyskały opinię bardzo korzystnych środków do leczenia nadczynności przytarczyc, tworzących alternatywę dla uważanych do tej pory za najskuteczniejsze metod chirurgicznych, nawet w tak „przynależnych do chirurgii” sytuacjach klinicznych, jak przypadki raka przytarczyc<sup>61</sup>.

Opisane obserwacje odnoszą się do korzystnego wpływu kalcymimetyków na wydzielanie PTH w różnych postaciach nadczynności przytarczyc. Natomiast istnieje niewiele prac łączących działanie kalcymimetyków lub inne sposoby pobudzania (bądź hamowania) receptora wapniowego ze zmianami ciśnienia tętniczego. Do tej pory oceniano zmiany ciśnienia tętniczego po podaniu kalcymimetyków jedynie jako element zmian w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek, bez prób analizy mechanizmu, który prowadzi do takich zmian<sup>55</sup>. W niedawno opublikowanej pracy Sutherland i Benishin<sup>13</sup> zasugerowali, że receptor wapniowy jest zaangażowany w sekrecję PTH, wykazując zwiększenie wydzielania PTH w hodowli komórek przytarczyc szczurów SHR w środowisku ubogim wapniowym. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Podsumowując, w badaniu niniejszym wykazano, że kalcymimetyk NPS R-568 może obniżać ciśnienie tętnicze krwi u szczurów SHR, nie u WKY, tylko w obecności przytarczyc. Sprawdzenie hipotezy, że obserwowane działanie NPS R-568 u szczurów SHR jest efektem obniżonej sekrecji czynnika hipertensyjnego przytarczyc wymaga dalszych doświadczeń.

## 6. WNIOSKI

1. NPS R-568 podawany dożylnie w dawce 1 mg/kg c.c. obniża średnie ciśnienie tętnicze u szczurów SHR.
2. Usunięcie przytarczyc u szczurów SHR prowadzi do obniżenia średniego ciśnienia tętniczego krwi.
3. Usunięcie przytarczyc zapobiega wystąpieniu hipotensyjnego działania NPS R-568 u szczurów SHR.
4. NPS R-568 podawany dożylnie w dawce 1 mg/kg c.c. nie wpływa w sposób znamieny na średnie ciśnienie tętnicze u szczurów WKY.
5. Usunięcie przytarczyc u szczurów WKY prowadzi do obniżenia średniego ciśnienia tętniczego krwi.
6. Podanie NPS R-568 szczurom WKY z usuniętymi przytarczycami nie powoduje dodatkowego obniżenia średniego ciśnienia tętniczego krwi.

## 7. STRESCZENIE

Nadciśnienie tętnicze jest jedną z najczęstszych chorób układu krążenia we współczesnym świecie. Zbadano do tej pory wiele mechanizmów kontroli ciśnienia tętniczego krwi, których zaburzenia mogłyby powodować nadciśnienie. Jednym z przykładów jest wykrycie PHF u szczurów SHR i u ludzi z pierwotną nadczynnością przytarczyc. Stwierdzono mianowicie, że usunięcie przytarczyc szczurom z wrodzonym nadciśnieniem powoduje u nich normalizację ciśnienia tętniczego w ciągu kilku godzin od zabiegu. Ponadto, przetoczenie frakcjonowanego osocza szczurów SHR ich odpowiednikom z normalnym ciśnieniem, szczurom WKY powoduje u tych ostatnich wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Podobnie u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, którym usunięto przytarczycę z powodu pierwotnej nadczynności tego narządu, zaobserwowano obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Na tej podstawie przyjęto, że przytarczycę są źródłem czynnika powodującego wzrost ciśnienia, nazwanego PHF.

Sekrecja PTH z przytarczyc podlega kontroli receptora wapniowego reagującego na zmiany stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego. Odkrycie kalcymimetyków stworzyło nowe możliwości regulacji wydzielania PTH.

Założeniem niniejszej pracy było wykazanie czy wydzielanie PHF podlega tym samym mechanizmom kontroli co sekrecja PTH. W takim przypadku podanie kalcymimetyków powinno skutkować obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi.

Doświadczenia polegały na podawaniu NPS R-568 w dawce 1 mg/kg c.c. szczurom SHR i WKY, z zachowanymi lub usuniętymi przytarczycami. Właściwości kalcymimetyczne zsyntetyzowanego NPS R-568 potwierdzono oznaczając stężenie PTH, wapnia zjonizowanego w osoczu i frakcyjne wydalanie fosforanów z moczem.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że kalcymimetyk NPS R-568 obniża średnie ciśnienie tętnicze u szczurów SHR, nie u WKY, tylko przy zachowanych przytarczycach. Można przypuszczać, że obserwowane obniżenie MAP jest następstwem zmniejszenia wydzielania PHF, wywołanego podaniem NPS, jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych doświadczeń.

## 8. PIŚMIENNICTWO

---

<sup>1</sup> Januszewicz W., Sznajderman M.:  
Nadciśnienie tętnicze pierwotne.  
W Nauka o chorobach wewnętrznych (Orłowski W. wyd. II PZWL  
1998).

<sup>2</sup> Lewanczuk R.Z, Pang P.K.T.:  
Expression of parathyroid hypertensive factor in  
hypertensive primary hyperparathyroid patients.  
Blood Press. 2(1):22-7, 1993.

<sup>3</sup> Lind L., Ljunghall S.:  
Hypertension, primary hyperparathyroidism and the  
parathyroid hypertensive factor.  
Blood Press, 2:4-5,1993

<sup>4</sup> Madhavan T., Frame B., Block M.A.:  
Influence of surgical correction of primary  
hyperparathyroidism on associated hypertension.  
Arch Surg. 100(2):212-4,1970

<sup>5</sup>Oseka T., Łachiński A., Sworczak K., Rybczyńska A., Hoppe  
A., Gruca Z.:  
Spadek ciśnienia tętniczego krwi u pacjentów z pierwotną  
nadczynnością przytarczyc (PHPT) po paratyroidektomii  
(PTX).  
X Symp. Chir. Endokr., Łódź, 2001

---

<sup>6</sup> Lewanczuk R.Z., Resnick L.M., Blumenfeld J.D., Laragh J.H., Pang P.K.T.:

A new circulating hypertensive factor in the plasma of essential hypertensive factor.

J Hypertens, 8: 105-8, 1990

<sup>7</sup> Onsgaard-Meyer M.J., Berndt T.J., Kharabi A.A., Knox F.G.:

Phosphaturic effect of parathyroids hormone in spontaneously hypertensive rats.

Am J Physiol 267:R78-R83, 1994.

<sup>8</sup> Lewanczuk R.Z., Wang J., Zhang Z.H., Pang P.K.T.:

Effects of spontaneously hypertensive rat plasma on blood pressure and tail artery calcium uptake in normotensive rats.

AJH, 2: 26-31, 1989.

<sup>9</sup> Benishin C.G., Lewanczuk R.Z., Pang P.K.T.:

Purification and structural characterization of parathyroid hypertensive factor.

J Cardiovasc Pharmacol, 2: S9-13, 1994.

<sup>10</sup> Lewanczuk R.Z., Hamilton P.G.:

Parathyroid hypertensive factor predicts efficacy in the treatment of essential hypertension with verapamil.

Blood Press, 5: 98-104, 1996.

<sup>11</sup> Brown E.M.:

Homeostasis mechanism regulating extracellular and intracellular calcium metabolism.

W The Parathroids (Bilezikian J.P., Levine M.A. i Markus R.) str. 457-470, Raven Press 1994.

---

<sup>12</sup> Krylova S., Labedz T., Lewanczuk R.Z., Benishin C.G.:  
Generation, characterization, and use of monoclonal  
antibodies against parathyroid hypertensive factor.  
Clin Chem. 49(7):1204-6, 2003.

<sup>13</sup> Sutherland S.K., Benishin C.G.:  
Regulation of parathyroid hypertensive factor secretion by  
Ca<sup>2+</sup> in spontaneously hypertensive rat parathyroid cells.  
Am J Hypertens. 17(3):266-72, 2004.

<sup>14</sup> Kokot F. i Tatoń J.:  
Zaburzenia przemiany materii.  
W Choroby Wewnętrzne pod redakcją F. Kokota wyd. VII PZWL  
2003.

<sup>15</sup> Kurokawa K.:  
The kidney and calcium homeostasis.  
Kidney Int., 44, 97, 1994.

<sup>16</sup> Pietrobon D., Di Virgilio F., Pozzan T.:  
Structural and functional aspects of calcium homeostasis in  
eukaryotic cells.  
Eur J Biochem. 13;193(3):599-622, 1990.

<sup>17</sup> Jackson C.E., Boonstra C.E.:  
Hereditary hyperkalcemia and parathyroid hyperplasia  
without definite hyperparathyroidism.  
J. Lab. Clin. Med. 68, 883, 1966.



- 
- <sup>18</sup> Marx S.J., Spiegel A.M., Brown E.M., Koehler J.O., Gardner D.G., Brennan M.F., Aurbach G.D.:  
Divalent cation metabolism. Familial hypocalcemic hypercalcemia versus typical primary hyperparathyroidism.  
Am. J. Med. (2) 65, 235-42, 1978.
- <sup>19</sup> Jackson C.E., Boonstra C.E.:  
Hereditary hypercalcemia and parathyroid hyperplasia without definite hyperparathyroidism.  
J. Lab. Clin. Med. 68, 883, 1996.
- <sup>20</sup> Brown E.M., Hebert S.C.:  
A cloned extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing receptor: molecular mediator of the actions of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on parathyroid and kidney cells?  
Kidney Int. 49, 1042, 1996.
- <sup>21</sup> Nemeth E.F., Scarpa A.:  
Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and the regulation of secretion in parathyroid cells.  
FEBS Lett. 14; 203(1): 15-9, 1986.
- <sup>22</sup> Brown E.M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M.A., Lytton J., Hebert S.C.:  
Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing receptor from bovine parathyroid.  
Nature; 366: 575-580, 1993.
- <sup>23</sup> Brown E.M., Hebert S.C.:  
Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function.  
Bone 20, 303, 1997.

---

<sup>24</sup> Chin J., Miller S.C., Wada M., Nagano N., Nemeth E.F.,  
Fox J.:

Activation of the calcium receptor by a calcimimetic  
compound halts the progression of secondary  
hyperparathyroidism in uremic rats.  
J Am Soc Nephrol 11:903-911, 2000.

<sup>25</sup> Coburn J.W., Salusky I.B.:

Hyperparathyroidism in renal failure. Clinical features,  
diagnosis and management.  
W The Parathyroids (Bilezikian J.P., Levine M.A. i Markus  
R.) str. 457-470, Raven Press 1994.

<sup>26</sup> Brown E., Enyedi P., LeBoff M., Rotberg J., Preston J.,  
Chen C.:

High extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  stimulate accumulation of  
inositol phosphates in bovine parathyroid cells.  
FEBS Lett. 22;218(1):113-8, 1987.

<sup>27</sup> Riccardi D., Hall A.E., Chattopadhyay N., Xu J.Z., Brown  
E.M., Hebert S.C.:

Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /polyvalent cation-  
sensing protein in rat kidney.  
Am J Physiol. 274(3 Pt 2):F611-22, 1998.

<sup>28</sup> Yamaguchi T., Kifor O., Chattopadhyay N., Brown E.M.:

Expression of extracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-sensing receptor  
in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-  
2.  
Biochem Biophys Res Commun. 24;243(3):753-7, 1998.

---

<sup>29</sup> Kameda T., Mano H., Yamada Y., Takai H., Amizuka N., Kobori M., Izumi N., Kawashima H., Ozawa H., Ikeda K., Kameda A., Hakeda Y., Kumegawa M.:  
Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells.  
Biochem Biophys Res Commun. 17;245(2):419-22, 1998.

<sup>30</sup> Chattopadhyay N., Cheng I., Rogers K., Riccardi D., Hall A., Diaz R., Hebert S.C., Soybel D.I., Brown E.M.:  
Identification and localization of extracellular Ca(2+)-sensing receptor in rat intestine.  
Am J Physiol. 274(1 Pt 1):G122-30, 1998.

<sup>31</sup> Chattopadhyay N., Ye C.P., Yamaguchi T., Kifor O., Vassilev P.M., Nishimura R., Brown E.M.:  
Extracellular calcium-sensing receptor in rat oligodendrocytes: expression and potential role in regulation of cellular proliferation and an outward K<sup>+</sup> channel.  
Glia. 24(4):449-58, 1998.

<sup>32</sup> Rogers K.V., Dunn C.K., Hebert S.C., Brown E.M.:  
Localization of calcium receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization.  
Brain Res. 2;744(1):47-56, 1997.

<sup>33</sup> Hoppe A., Rybczyńska A.:  
Receptor wapniowy (CaR): nowe spojrzenie na regulację gospodarki wapniem.  
Przeg. Lek 57,2:77-82, 2000.

---

<sup>34</sup> Goodman W.G., Hladik G.A., Turner S.A., Blaisdell P.W., Goodkin D.A., Liu W., Barri Y.M., Cohen R.M., Coburn J.W.: The Calcimimetic agent AMG 073 lowers plasma parathyroid hormone levels in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism.  
J Am Soc Nephrol. 13(4):1017-24, 2002.

<sup>35</sup> Goodman W.G., Goldin J., Kuizon B.D., Yoon C., Gales B., Sider D., Wang Y., Chung J., Emerick A., Greaser L., Elashoff R.M., Salusky I.B.:  
Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis.  
N Engl J Med 342:1478-1483, 2000.

<sup>36</sup> Nemeth E., Fox J.:  
Calcimimetic compounds: a direct approach to controlling plasma levels of parathyroid hormone in hyperparathyroidism.  
Trends in Endocrinology and Metabolism, 10:66 - 71, 1999.

<sup>37</sup> Nemeth E.F., Steffey M.E., Hammerland L.G., Hung B.C., Van Wagenen B.C., DelMar E.G., Balandrin M.F.:  
Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor.  
Proc Natl Acad Sci USA 95: 4040-4045, 1998.

<sup>38</sup> Krapcho K.J., Kral R.M. Jr, Van Wagenen B.C., Eppler K.G., Morgan T.K.:  
Characterization and cloning of insecticidal peptides from the primitive weaving spider *Diguetia Canities*.  
Insect Bioch. Mol. Biol. 25,991, 1995.

---

<sup>39</sup> Fox J., Lowe S.H., Petty B.A., Nemeth E.F.:  
NPS R-568: a type II calcimimetic compound that acts on  
parathyroid cell calcium receptor of rats to reduce plasma  
levels of parathyroid hormone and calcium.  
J Pharmacol Exp Ther 290:473-479, 1999.

<sup>40</sup> Pecherstorfer M., Brenner K., Zojer N.:  
Current management strategies for hypercalcemia.  
Treat Endocrinol. 2(4):273-92, 2003.

<sup>41</sup> Goodman W.G., Frazao J.M., Goodkin D.A., Turner S.A.,  
Liu W., Coburn J.W.:  
A calcimimetic agent lowers plasma parathyroid hormone  
levels in patients with secondary hyperparathyroidism.  
Kidney Int. 58(1):436-45, 2000.

<sup>42</sup> Fiske C.H., Subbarow Y.:  
The colorimetric determination of phosphorus.  
J Biol Chem 66:375-400, 1925.

<sup>43</sup> Yamazaki N., Atobe M., Kibayashi C.:  
Nucleophilic addition of methylolithium to chiral oxime  
ethers: asymmetric preparation of 1-(aryl)ethylamines and  
application to synthesis of calcimimetics (+)-NPS R-568 and  
also thio analog.  
Tetrahedron Lett 42:5029-5032, 2001.

<sup>44</sup> Enders D., Kempen H.,  
Enantioselective Synthesis of Allylic Alcohols via  
Asymmetric [2,3]-Sigmatropic Meisenheimer Rearrangement.  
*Synlett* 969-971, 1994.

---

<sup>45</sup> Nemeth E.F., Van Wagenen B.C., Balandrin M.F., Delmar E.G., Moe S.T.:  
Calcium receptor-active molecules.  
US Patent 6,001, 884, 1999, *Chem. Abst.* 132, 35523 (2000).

<sup>46</sup> Antonsen J.E., Sherrard D.J., Andreas D.L.:  
A calcimimetic agent acutely suppresses parathyroid hormone levels in patients with chronic renal failure.  
*Kidney Int* 53:223-227, 1998.

<sup>47</sup> McCarron D.A.:  
Calcium, magnesium and phosphorus balance in human and experimental hypertension.  
*Hypertension* 4;III27-III33, 1982.

<sup>48</sup> McCarron D.A., Pingree P.A., Ribin R.J., Gaucher S.M., Molitch M., Krutzik S.:  
Enhanced parathyroid function in essential hypertension: a homeostatic response to a urinary calcium leak.  
*Hypertension* 2:162-168, 1980.

<sup>49</sup> Pang P.K.T., Tenner T.E. Jr, Yee Y.A., Yang C.M., Janssen H.P.:  
Hypotensive action of parathyroid hormone preparation on rats and dogs.  
*Proc Natl Acad Sci* 77:675-678, 1980.

<sup>50</sup> Rybczyńska A., Hoppe A.:  
Evidence that acute hypotensive effect of parathyroid hormone (1-34 bPTH) is not mediated by nitric oxide (NO) pathway.  
*Acta. Med. Lituanica Suppl.* 4, 132-135, 1999.

- 
- <sup>51</sup> Riccardi D., Lee K., Serge G., Brown E.M., Hebert S.C.:  
Localization of extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor I  
PTH/PTHrP receptor in rat kidney.  
Am J Physiol 271:F951-F956, 1996.
- <sup>52</sup> Brown E.M., Hebert S.C.:  
Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function.  
Bone 20:303-309, 1997.
- <sup>53</sup> Slatopolsky E., Martin K., Hruska K.:  
Parathyroid hormone metabolism and its potential as a  
uremic toxin.  
Am J Physiol. 239(1):F1-12, 1980.
- <sup>54</sup> Ritz E., Stefanski A., Rambausek M.:  
The role of the parathyroid glands in the uremic syndrome.  
Am J Kidney Dis. 26(5):808-13, 1995.
- <sup>55</sup> Ogata H., Ritz E., Odoni G., Amann K., Orth S.R.:  
Beneficial effects of calcimimetics on progression of renal  
failure and cardiovascular risk factors.  
J Am Soc Nephrol 14:959-967, 2003.
- <sup>56</sup> Pattagram A., Fox J., Alon U.S.:  
Effect of calcimimetic NPS R-467 on furosemide-induced  
nephrocalcinosis in the young rat.  
Kidney Int 65:1684-1689, 2004.
- <sup>57</sup> Collins M.T., Skarulis M.C., Bilezikian J.P., Silverberg  
S.J., Spiegel A.M., Marx S.J.:  
Treatment of hypercalcemia secondary to parathyroid  
carcinoma with a novel calcimimetic agent.  
J Clin Endocrinol Metab. 83(4):1083-8, 1998.

---

<sup>58</sup> Lindberg J.S., Culleton B., Wong G., Borah M.F., Clark R.V., Shapiro W.B., Roger S.D., Husserl F.E., Klassen P.S., Guo M.D., Albizem M.B., Coburn J.W.:

Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, multicenter study.

J Am Soc Nephrol. 16(3):800-7, 2005.

<sup>59</sup> Quarles L.D., Sherrard D.J., Adler S., Rosansky S.J., McCary L.C., Liu W., Turner S.A., Bushinsky D.A.:

The calcimimetic AMG 073 as a potential treatment for secondary hyperparathyroidism of end-stage renal disease.

J Am Soc Nephrol. 14(3):575-83, 2003.

<sup>60</sup> Iqbal J., Zaidi M., Schneider A.E.:

Cinacalcet hydrochloride (Amgen).

IDrugs. 6(6):587-92, 2003.

<sup>61</sup> Frazao J.M., Martins P., Coburn J.W.:

The calcimimetic agents: perspectives for treatment.

Kidney Int Suppl. (80):149-54, 2002.