

**Magdalena Smereczańska**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wpływ CacyBP/SIP na szlak MAPK w nadnerczach  
w doświadczalnym nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym**

Dziedzina nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Dyscyplina nauki farmaceutyczne



Praca została wykonana w Zakładzie Histologii i Cytofizjologii

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Promotor i Kierownik: **Prof. dr hab. Irena Kasacka**

**Białystok 2023**

## SPIS TREŚCI

|  |           |
|--|-----------|
| WYKAZ SKRÓTÓW .....  | 5         |
| <b>I. WSTĘP .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>1. NADCIŚNIENIE TĘTNICZE .....</b>  | <b>10</b> |
| 1.1. <i>Definicja nadciśnienia tętniczego .....</i>  | 11        |
| 1.2. <i>Rys historyczny nadciśnienia tętniczego .....</i>  | 11        |
| 1.3. <i>Epidemiologia nadciśnienia tętniczego .....</i>  | 13        |
| 1.4. <i>Etiologia i patogeneza nadciśnienia tętniczego .....</i>                                       | 15        |
| 1.4.1. <i>Samoistne nadciśnienie tętnicze – etiopatogeneza .....</i>                                   | 16        |
| 1.4.2. <i>Nadciśnienie wtórne – etiopatogeneza .....</i>   | 19        |
| 1.5. <i>Klasyfikacja ciśnienia tętniczego krwi .....</i>   | 20        |
| 1.6. <i>Modele zwierzęce do badania nadciśnienia tętniczego .....</i>                                  | 22        |
| 1.6.1. <i>Model nadciśnienia samoistnego .....</i>   | 24        |
| 1.6.2. <i>Model doświadczalny DOCA-salt (nadciśnienie endokrynologiczne) .....</i>                     | 24        |
| 1.7. <i>Powikłania narządowe w nadciśnieniu tętniczym .....</i>  | 25        |
| <b>2. NADNERCZA .....</b>  | <b>28</b> |
| 2.1. <i>Budowa anatomiczna nadnerczy .....</i>   | 28        |
| 2.2. <i>Budowa histologiczna nadnerczy .....</i>   | 28        |
| 2.3. <i>Zaburzenia w wydzielaniu hormonów nadnerczy w nadciśnieniu<br/>            tętniczym .....</i> | 31        |
| <b>3. BIAŁKO CACYBP/SIP .....</b>  | <b>32</b> |
| 3.1. <i>Odkrycie i właściwości białka CacyBP/SIP .....</i>   | 33        |
| 3.2. <i>Rola białka CacyBP/SIP jako fosfatazy .....</i>  | 36        |
| <b>4. KINAZA ERK1/2 .....</b>  | <b>37</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. KINAZA P38</b> .....  | 39        |
| <b>6. ODDZIAŁYWANIE CACYBP/SIP Z MAPK</b> .....                                       | 42        |
| 6.1. <i>CacyBP/SIP jako fosfataza dla ERK1/2</i> .....                                | 42        |
| 6.2. <i>CacyBP/SIP jako fosfataza dla p38</i> .....                                   | 44        |
| <b>II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY</b> .....  | <b>46</b> |
| <b>III. MATERIAŁ I METODY</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>1. MODEL DOŚWIADCZENIA</b> .....   | 47        |
| 1.1. <i>Wywołanie doświadczalnego nadciśnienia DOCA-salt</i> .....                    | 48        |
| 1.2. <i>Pomiar ciśnienia krwi metodą pośrednią u szczura czuwającego</i> .....        | 48        |
| <b>2. BADANIE HISTOLOGICZNE</b> .....   | 48        |
| 2.1. <i>Sposób pobierania i utrwalenie materiału do badań</i> .....                   | 48        |
| 2.2. <i>Stosowane barwienia immunohistochemiczne</i> .....                            | 49        |
| 2.3. <i>Procedura przeprowadzania reakcji immunohistochemicznej</i> .....             | 50        |
| <b>3. OCENA STOPNIA INTENSYWNOŚCI REAKCJI<br/>        IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ</b> ..... | 53        |
| <b>4. IZOLACJA RNA</b> .....  | 53        |
| 4.1. <i>Reakcja odwrotnej transkrypcji</i> .....                                      | 54        |
| 4.2. <i>Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)</i> .....          | 54        |
| <b>5. ANALIZA STATYSTYCZNA</b> .....  | 57        |
| <b>IV. WYNIKI BADAŃ</b> .....   | <b>58</b> |
| <b>1. WYNIKI ZASTOSOWANYCH BARWIEŃ<br/>        IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH</b> .....       | 58        |
| 1.1. <i>Immunodetekcja białka CacyBP/SIP</i> .....                                    | 58        |
| 1.2. <i>Immunodetekcja p-ERK1/2</i> .....   | 64        |
| 1.3. <i>Immunodetekcja p-p38</i> .....  | 70        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2. BADANIA MORFOMETRYCZNE .....</b>                                      | <b>75</b>  |
| <b>3. OCENA EKSPRESJI GENÓW METODĄ REAL-TIME PCR .....</b>                  | <b>77</b>  |
| 3.1. <i>Ocena ekspresji genów kodujących białko CacyBP/SIP, ERK1/2, p38</i> |            |
| <i>w nadnerczach szczurów z grupy kontrolnej i badanej .....</i>            | <b>77</b>  |
| 3.1.1. <i>Ekspresja genu Cacybp kodującego CacyBP/SIP.....</i>              | <b>78</b>  |
| 3.1.2. <i>Ekspresja genów: Mapk3 i Mapk1 kodujących ERK1/2 .....</i>        | <b>78</b>  |
| 3.1.3. <i>Ekspresja genu Mapk14 kodującego p38 .....</i>                    | <b>80</b>  |
| <b>V. DYSKUSJA .....</b>  | <b>82</b>  |
| <b>VI. WNIOSKI .....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>VII. STRESZCZENIE .....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>VIII. SUMMARY .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>IX. PIŚMIENNICTWO .....</b>  | <b>102</b> |
| <b>X. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII .....</b>                              | <b>123</b> |

## WYKAZ SKRÓTÓW

- 1K1C** – model służący do badania nadciśnienia wtórnego (*ang. one kidney one clip*)
- 2K1C** – model nadciśnienia naczyniowo- nerkowego (*ang. two-kidney, one-clip*)
- 2K2C** – zwierzęcy model do badania nadciśnienia wtórnego (*ang. two kidney two clip*)
- ACTH** – hormon adrenokortykotropowy (*ang. adrenocorticotropic hormone*)
- Ang II** – angiotensyna II (*ang. angiotensin II*)
- AP-1** – czynnik transkrypcyjny (*ang. activating protein-1*)
- ASK1** – kinaza regulująca czynnik apoptotyczny (*ang. apoptosis signal regulating kinase 1*)
- ATF2** – aktywujący czynnik transkrypcyjny (*ang. activating transcription factor 2*)
- ATPazy** – adenzynotryfosfatazy (*ang. ATPases*)
- BAX** – białko z rodziny białek Bcl-2 (*ang. BCL2 Associated X*)
- BMI** – wskaźnik masy ciała (*ang. Body Mass Index*)
- BP** – ciśnienie krwi (*ang. blood pressure*)
- CacyBP/SIP** – białko CacyBP/SIP (*ang. calcyclin binding protein/Siah-1 interacting protein*)
- CD42** – glikoproteina Ib (*ang. Cluster of differentiation 42*)
- cDNA** – komplementarny DNA (*ang. complementary DNA*)
- c-fos, c-myc** – geny związane z proliferacją (*ang. Fos Proto-Oncogene, MYC Proto-Oncogene*)
- CRP** – białko c-reaktywne (*ang. C reactive protein*)
- CS** – środkowa domena białka CacyBP/SIP (*ang. domain present in CHORD and Sgt1*)
- DAB** – chromogen 3,3'- dwuaminobenzydyny (*ang. 3,3'- Diaminobenzidine*)
- DMF** – dimetyloformamid (*ang. dimethylformamide*)

**DOCA-salt** – model nadciśnienia wtórnego, indukowany octanem deoksykortykosteronu (*ang. deoxycorticosterone acetate - salt rat*)

**Elk-1** – czynnik transkrypcyjny (*ang. ETS Transcription Factor ELK1*)

**EPC** – progenitorowe komórki śródbłonna (*ang. endothelial progenitor cells*)

**ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (*ang. extracellular signal regulated kinase*)

**ET-1** – endotelina 1 (*ang. endothelin 1*)

**Gapdh** – gen referencyjny (*ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

**GR** – receptor glikokortykoidów (*ang. glucocorticoid receptor*)

**GTP** – guanozyno-5'trifosforan (*ang. guanosine- 5'triphosphate*)

**HEp-2** – linia komórkowa (*ang. Human Epithelioma-2*)

**Hsp90** – białko szoku cieplnego (*ang. heat shock protein 90*)

**JNK** – kinaza c-Jun N-terminalna (*ang. c-Jun N-terminal kinase*)

**JNK/SAPK** – kinazy aktywowane stresem (*ang. c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinase*)

**KIM** – motyw pozwalający na oddziaływanie z kinazami (*ang. kinase interaction motif*)

**MAP, MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (*ang. mitogen activated kinases*)

**MAPKAPK 2** – białko aktywowane kinazą MAP 2 (*ang. MAP kinase activated protein 2*)

**MAPKAPK 3** – białko aktywowane kinazą MAP 3 (*ang. MAP kinase activated protein 3*)

**MAPKK (MAP2K)** – kinaza kinaz MAP (*ang. mitogen activated protein kinase kinase*)

**MAPKKK (MAP3K)** – kinaza kinaz kinaz MAP (*ang. mitogen activated protein kinase kinase kinase*)

**MEF2C** – specyficzny dla miocytów czynnik wzmacniający 2C (*ang. Myocyte Enhancer Factor 2C*)

**MEK** – aktywator kinazy ERK (*ang. ERK activator kinase*)

**MEKK 1-4** – kinazy MEK 1-4 (*ang. MEK kinase 1-4*)

**MKK** – kinaza MAPK (*ang. MAPK kinase*)

**MKK3** – aktywator p38 (*ang. mitogen activated protein kinase kinase 3*)

**MKK4** – kinaza aktywowana mitogenem o podwójnej specyficzności (*ang. mitogen-activated protein kinase kinase 4*)

**MKK6** – aktywator p38 (*ang. mitogen activated protein kinase kinase 6*)

**MKKK** – kinaza kinazy MAPK (*ang. MAPK kinase kinase*)

**MKP** – fosfataza MAPK (*ang. MAP kinases phosphatase*)

**MNK** – kinaza MNK (*ang. MAPK signal interacting kinase*)

**mRNA** – informacyjny RNA (*ang. messenger RNA*)

**MSK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogen i stres (*ang. mitogen and stress-activated protein kinase*)

**MTT** – test służący do analizy aktywności metabolicznej komórki (*ang. MTT assay*)

**NaCl** – chlorek sodu (*ang. sodium chloride*)

**NB2a** – komórki nerwiaka zarodkowego (*ang. neuroblastoma NB2a*)

**NF-κB** – czynnik jądrowy- κB (*ang. nuclear factor- κB*)

**NOS** – syntaza tlenku azotu (*ang. nitric oxide synthase*)

**NPM1** – nukleofosmina (*ang. nucleophosmin*)

**oxyLDL** – utlenione lipoproteiny o małej gęstości (*ang. oxidised low-density lipoprotein*)

**p38** – kinaza należąca do rodziny MAP

**p53** – białko o masie cząsteczkowej 53 kDa, supresor nowotworów (*ang. tumor protein p53*)

**PAN** – Polska Akademia Nauk

**pH** – ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych (*ang. potential of hydrogen*)

**RAA, RAAS** – układ renina–angiotensyna–aldosteron (*ang. renin–angiotensin–aldosterone system*)

**Rac1** – małe białko G z rodziny Rho (*ang. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

**RAF** – specyficzna kinaza serynowo - treoninowa (*ang. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

**RAS** – układ renina-angiotensyna (*ang. rennin-angiotensin system*)

**Rho** – białko należące do rodziny małych białek G (*ang. Ras homologous*)

**RNA** – kwasy rybonukleinowe (*ang. ribonucleic acid*)

**RNazy** – enzymy z klasy hydrolaz (*ang. RNase*)

**RSK** – kinaza rybosomalna (*ang. ribosomal S6 kinase*)

**RT-qPCR** – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang. quantitative reverse transcription PCR*)

**S100** – rodzina niskocząsteczkowych białek, które wykazują powinowactwo do jonów wapnia

**S100A6** – białko wiążące wapń, kalcyklina (*ang. S100 Calcium Binding Protein A6*)

**SBP** – ciśnienie skurczowe (*ang. systolic blood pressure*)

**SCF<sup>TBL1</sup>** – kompleks ligazy ubikwityny (*ang. Skp1-cullin-1-F-box*)

**SD** – odchylenie standardowe (*ang. standard deviation*)

**SE** – błąd standardowy (*ang. standard error*)

**SGS** – domena C-końcowa CacyBP/SIP (*ang. Sgt1 specific*)

**Sgt1** – białko zaangażowane w ubikwitynację (*ang. suppressor of the G2 allele of skp1*)

**SHR** – szczury ze spontanicznym nadciśnieniem (*ang. spontaneously hypertensive rats*)

**Siah-1** – składnik kompleksu ligazy ubikwityny E3 (*ang. seven in absentia homolog 1*)

**Skp1** – białko, składnik kompleksu ligazy ubikwityny (*ang. S-phase kinase associated protein 1*)

**SNP** – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang. Single Nucleotide Polymorphism*)

**SSRP** - białko rozpoznające specyficzne struktury (*ang. SSRP-DNA Structure-Specific Recognition Protein*)



**TAK 1** – kinaza aktywowana transformującym czynnikiem wzrostowym (*ang. transforming growth factor-activated kinase 1*)

**TNF- $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów (*ang. tumor necrosis factor  $\alpha$* )

**TXY** – motyw Thr-X-Tyr, który zawierają wszystkie kianyzy MAP

**UNX** – szczury Wistar poddane uninefrektomii (*ang. uninephrectomised rats*)

**UV** – promieniowanie nadfioletowe (*ang. ultraviolet*)

**VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*)

**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)

**WKY** – szczurzy model do badań, grupa kontrolna szczurów SHR, (*Wistar Kyoto*)

**WNT** – szlak sygnałowy biorący udział w embriogenezie, procesach fizjologicznych i karcynogenezie

## **I. WSTĘP**

### **1. NADCIŚNIENIE TĘTNICZE**

Istotnym problemem i zagrożeniem społeczeństw rozwiniętych i rozwijających się są choroby cywilizacyjne, które występują powszechnie, często nazywane epidemią XXI wieku i są skutkiem ubocznym postępu oraz rozwoju cywilizacyjnego. Są to choroby, które głównie występują w państwach wysoko zurbanizowanych i tych, w których nie ma właściwej profilaktyki chroniącej przed ich rozwojem. Choroby cywilizacyjne, szerzące się w skali całego świata, odpowiedzialne za 80% wszystkich zgonów, głównie wynikają z szybkiego i niezdrowego odżywiania, niskiej aktywności fizycznej, zanieczyszczenia środowiska oraz wzrostu napięcia nerwowego i stresu. Kluczowe miejsce na długiej liście chorób cywilizacyjnych zajmują choroby serca i naczyń krwionośnych, które powodują największą śmiertelność. Według danych Narodowego Funduszu Zdrowia 31,5% dorosłej populacji Polaków choruje na nadciśnienie tętnicze. Wielu pacjentów choruje na nadciśnienie nieświadomie i tym samym nie leczy choroby, ponieważ objawy kliniczne nadciśnienia są mało charakterystyczne i może ono przebiegać bezobjawowo, nie powodując uchwytnej dolegliwości. Poważne konsekwencje zdrowotne, rozwijające się w przebiegu nadciśnienia zwykle zależą od powikłań narządowych, będących następstwem negatywnego wpływu podwyższonego ciśnienia krwi na układ sercowo-naczyniowy. Powikłania narządowe mogą ujawniać się w różnym okresie trwania choroby. Dotyczą one przede wszystkim serca, nerek i mózgu. Zatem poznanie patomechanizmów warunkujących powstanie nadciśnienia i czynników wpływających na jego przebieg oraz funkcjonowanie organizmu w stanie podwyższonego ciśnienia ma istotne znaczenie dla opracowania lepszej strategii zapobiegania i zwalczania tej choroby.

### ***1.1. Definicja nadciśnienia tętniczego***

Jest to stan chorobowy, w którym stwierdza się podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi powyżej normy fizjologicznej. O nadciśnieniu tętniczym mówimy wówczas, gdy podczas kilkakrotnych pomiarów, dokonywanych w spoczynku, ciśnienie przekracza wartości graniczne uznane za prawidłowe. Za wartość graniczną uznaje się ciśnienie 140/90 mm Hg (milimetry słupa rtęci).

Terapia w nadciśnieniu wiąże się ze zmianą trybu życia polegającą na unikaniu używek, zdrowym odżywianiu i regularnej aktywności fizycznej. Uzupełnieniem zmian nawykowych jest leczenie farmakologiczne. Jednak największą przeszkodą w prawidłowej terapii tego schorzenia jest niestosowanie się chorych do zaleceń lekarza. Patogeneza nadciśnienia tętniczego ma wieloczynnikowy, złożony charakter i pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się dzięki wysiłkom wielu dyscyplin, zarówno klinicznych jak i nauk podstawowych, dotychczas nie udało się zidentyfikować wielu czynników i mechanizmów patofizjologicznych powiązanych z rozwojem nadciśnienia. Potwierdza się i wciąż jest aktualna teoria Irvine H. Page, o mozaikowej patogenezie nadciśnienia tętniczego, dlatego należy poszukiwać alternatywnych metod walki z tą chorobą [Staessen i wsp., 2003; Harrison, 2013; Rimoldi i wsp., 2014].

### ***1.2. Rys historyczny nadciśnienia tętniczego***

Początków wiedzy o ciśnieniu krwi można szukać w czasach starożytnych. Już wtedy, pomimo że nie znano metod pomiaru nadciśnienia tętniczego badano puls chorego. Pierwsza wzmianka o pulsie oraz metodzie jego starannego badania została zaczerpnięta ze starożytnego traktatu „The Yellow Emperor’s Classics of Internal Medicine” (jedno z najnowszych tłumaczeń), którego powstanie datuje się na około 2600 rok p.n.e. Już w starożytności dokonywano wielu odkryć, które były sumą

pomysłów i doświadczeń. Owe wielkie odkrycia jednocześnie otwierały drzwi do dalszych poszukiwań jak i całkowicie burzyły ówczesną wiedzę, przez co były trudne do zaakceptowania przez środowiska naukowe. Dzieła medyczne tamtych czasów przyczyniły się do odkrycia czym jest układ krwionośny, ciśnienie krwi i jakie mechanizmy pozwalają utrzymać prawidłowe jego wartości a jakie prowadzą do nadciśnienia. W miarę upływu czasu został opracowany precyzyjny i nieinwazyjny sposób pomiaru ciśnienia krwi. Historia nadciśnienia to historia ludzi, którzy przyczynili się do poszerzenia wiedzy o mechanizmach rządzących nadciśnieniem – choroby, która początkowo nie daje objawów, bądź kiedy jej objawy są niezauważalne przez pacjenta, który żyje w złudnym poczuciu dobrego zdrowia [Paszun & Stanisław, 2008].

W latach 50 ubiegłego wieku uważano, że tylko czynnik nerwowy i nerkowy czynnik presyjny są odpowiedzialne za rozwój nadciśnienia. Bardzo dynamiczne badania w następnych latach, pozwoliły na poznanie wielu czynników, które mogą regulować ciśnienie krwi. W tym czasie Irvine Page sformułował teorię mozaikowego charakteru nadciśnienia tętniczego, zwracając uwagę na wieloczynnikowy i złożony charakter choroby. Złożony mechanizm fizjologicznej regulacji ciśnienia krwi powoduje, że patofizjologia nadciśnienia tętniczego wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Ogromny postęp wiedzy w kolejnych latach przyczynił się do wykazania biologicznej aktywności śródbłonna wyściełającego ściany naczyń krwionośnych. Udało się wykryć i opisać właściwości substancji syntetyzowanych przez komórki śródbłonna, takie jak: tlenek azotu, prostacyklinę czy endotelinę. Badania kolejnych lat pozwoliły na poznanie nowych właściwości angiotensyny II i aldosteronu, wykazanie związku aktywności współczulnej z zaburzeniami metabolicznymi, które często współistnieją z nadciśnieniem tętniczym [Paszun & Stanisław, 2008].

### ***1.3. Epidemiologia nadciśnienia tętniczego***

Nadciśnienie jest jednym z głównych czynników ryzyka chorób serca i udaru mózgu, które są głównymi przyczynami zgonów na całym świecie. Ze względu na wciąż rosnącą liczbę osób cierpiących na nadciśnienie (prawie jedna czwarta dorosłej światowej populacji) można mówić o epidemii [Staessen i wsp., 2003, Rimoldi i wsp., 2014]. Nadciśnienie tętnicze stanowi obecnie poważny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny większości państw na świecie. Podobnie jak inne choroby układu krążenia należy do chorób cywilizacyjnych, których częstość występowania wciąż wzrasta, szczególnie w krajach o niskich i średnich dochodach. Nadciśnienie tętnicze najczęściej występuje w Afryce, ok. 46% populacji, najrzadziej w Ameryce, ok. 35% populacji (ostatnie dane WHO). Ze względu na promocję zdrowego stylu życia i dostęp do skutecznej terapii, liczba osób z podwyższonym ciśnieniem w krajach wysoko rozwiniętych spada. Stąd zasadne jest szerzenie profilaktyki, właściwa diagnostyka i skuteczne leczenie nadciśnienia tętniczego. W krajach o niskich i średnich dochodach, ze względu na niewystarczające działania prewencyjne, diagnostyczne i terapeutyczne, notuje się gwałtowny wzrost śmiertelności z powodu zawału i udaru mózgu.

Nadciśnienie tętnicze jest najczęstszą diagnozą stawianą w gabinecie lekarskim. Liczba osób z nadciśnieniem tętniczym, w roku 1980 wynosiła 600 milionów, a w 2008 wzrosła do około miliarda [WHO, 2013]. Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) powikłania nadciśnienia tętniczego stanowią przyczynę 12,8% wszystkich zgonów [WHO, 2014]. Prognozuje się, że występowanie nadciśnienia tętniczego w populacji całego globu będzie rosnąć i w 2025 roku osiągnie wartość 29,2%, wówczas choroba ta będzie dotyczyć około 1650 mln osób [Kearney i wsp., 2004].

Polska zaliczana jest do krajów o wysokim odsetku chorujących na nadciśnienie tętnicze [Mancia i wsp., 2013]. Badania epidemiologiczne przeprowadzane w Polsce w ostatnich latach wskazują, że od 1997 do 2017 roku, nadciśnienie tętnicze występowało u 45% dorosłych (WOBASZ II), a także u 75% osób w wieku 65+ (PolSenior) [NFZ, 2019]. W 2018 roku zrealizowano aż 55,2 mln recept na ok 128 mln opakowań leków, które są stosowane w leczeniu nadciśnienia [NFZ, 2019]. Jednym z ostatnich opracowań, które dotyczą nadciśnienia tętniczego w Polsce, jest praca z 2019 roku przeprowadzona na próbie około 6 tysięcy osób. Badanie to wykazało, że nadciśnienie tętnicze występowało u 35,2% badanej populacji po 18 roku życia [Małyszko i wsp., 2019]. Niepokojącym jest fakt, że nadciśnienie tętnicze pozostaje niezdiagnozowane u około 3 milionów mieszkańców naszego kraju. Niepokojące są również prognozy wskazujące, że częstość występowania tej choroby wzrośnie w najbliższych latach nawet do 50%, tym samym liczba chorych na nadciśnienie przekroczy 15 mln [Suligowska i wsp., 2014].

**Tabela 1.** Wybrane polskie badania epidemiologiczne dotyczące rozpowszechnienia nadciśnienia [Podolec i wsp., 2006; Zdrojewski i wsp., 2012; Baszczuk i wsp., 2014; Niklas i wsp., 2018; Małyszko i wsp., 2019].

| Badanie     | Rok         | Wielkość próby | Wiek    | Występowanie nadciśnienia |
|-------------|-------------|----------------|---------|---------------------------|
| NATPOL II   | 1997        | 1664           | 18 – 91 | 44%                       |
| NATPOL PLUS | 2002        | 3051           | 18-94   | 29 – 36%                  |
| WOBASZ      | 2003 – 2005 | 14755          | 20 – 74 | 37%                       |
| NATPOL 2011 | 2011        | 2413           | 18-79   | 33%                       |
| PolSenior   | 2012        | 4929           | 65+     | 76%                       |
| WOBASZ II   | 2013 – 2014 | 6163           | 19-99   | 45%                       |
| MMM2017     | 2017        | 5834           | 18+     | 35%                       |

#### ***1.4. Etiologia i patogeneza nadciśnienia tętniczego***

Regulacja właściwego ciśnienia krwi (ilości krwi pompowanej przez serce oraz szybkości jej przepływu przez drobne tętniczki) odbywa się za pośrednictwem bardzo wielu substancji (najczęściej hormonów), wytwarzanych w różnych narządach m.in. w naczyniach krwionośnych i sercu, mózgu, nerkach i nadnerczach. Część tych substancji powoduje podniesienie ciśnienia krwi, a niektóre z nich odwrotnie, rozszerzając tętniczki, obniżają ciśnienie tętnicze. Związki te wzajemnie na siebie wpływają i w warunkach fizjologicznych pozostają w równowadze. Nadciśnienie tętnicze pojawia się w warunkach zaburzenia tej równowagi, na korzyść pierwszej grupy substancji [Łącka & Czyżyk, 2008].

Na podstawie wykrywalności i odwracalności bezpośredniej przyczyny choroby rozróżnia się dwa typy nadciśnienia. Nadciśnienie pierwotne (samoistne) obserwuje się u około 85-90% pacjentów cierpiących na nadciśnienie. W tym typie nadciśnienia nie można zidentyfikować bezpośredniej przyczyny choroby. Nadciśnienie wtórne (objawowe) występuje u 5-10% pacjentów z nadciśnieniem, charakteryzuje się możliwością określenia bezpośredniej przyczyny nadciśnienia, ponadto przyczynę tę można odwrócić. Najczęstszymi postaciami nadciśnienia tętniczego typu wtórnego jest nadciśnienie naczyniowo-nerkowe i nadciśnienie mięszkowo-nerkowe. Ponadto, nadciśnienie objawowe występuje w przebiegu takich chorób jak: zespół Cohna, zespół Cushinga, reninoma, pierwotny hiperaldosteronizm, hiperkortycyzm lub guz chromochłonny rdzenia nadnerczy [Staessen i wsp., 2003, Rimoldi i wsp., 2014].

Nadciśnienie tętnicze często bywa nazwane „cichym zabójcą”, ponieważ rozwija się powoli i przez długi czas może nie dawać uchwytnych dolegliwości. Długotrwałe, nieleczone nadciśnienie tętnicze jest przyczyną zmian w układzie sercowo-naczyniowym, nerek, mózgu i innych narządów. Ze względu na wielonarządowe skutki

długotrwałego działania podwyższonego ciśnienia krwi, ostatnio często używa się określenia choroba nadciśnieniowa [Wang i wsp., 2005; Schmieder, 2010].

#### ***1.4.1. Samoistne nadciśnienie tętnicze – etiopatogeneza***

Jeżeli przeprowadzone odpowiednie badania diagnostyczne nie wskazały przyczyny, to takie nadciśnienie nazywamy pierwotnym lub samoistnym. Pomimo licznych badań klinicznych i doświadczalnych, geneza nadciśnienia tętniczego nadal nie została w pełni wyjaśniona. U 90% chorych na nadciśnienie diagnozuje się jego pierwotną postać, którą powodują zakłócenia złożonych mechanizmów regulujących ciśnienie krwi. Różne obserwacje przemawiają za mechanizmami dziedzicznymi nadciśnienia pierwotnego. Badania potwierdziły, że nadciśnienie samoistne występuje częściej u potomstwa rodziców cierpiących na chorobę nadciśnieniową. Badania wykazały również, że osoby obciążone rodzinnym występowaniem nadciśnienia reagują szybciej, większym wzrostem ciśnienia krwi na sytuacje życiowe (stres, wysiłek fizyczny) w odniesieniu do osób bez dziedzicznego obciążenia. Czynniki zewnętrzne (środowiskowe), takie jak: nadużywanie alkoholu, otyłość, niewłaściwa dieta, brak aktywności fizycznej czy napięcie psychiczne, w dużym stopniu mogą mieć wpływ na ujawnienie się choroby [Ciechanowicz & Czekalski, 2011].

Nadciśnienie pierwotne zwykle przez długi czas przebiega bezobjawowo, nie dając uchwytnych dolegliwości. Czasami dynamika procesów chorobowych ma szybki przebieg, prowadząc do poważnych objawów klinicznych, wynikających z powikłań narządowych. Ten typ nadciśnienia najczęściej ujawnia się między 30 a 40 r.ż. [Suvila i wsp., 2019].

Nadciśnienie samoistne ma poligeniczny charakter co oznacza, że każdy gen z nim związany bierze udział w wykształceniu ostatecznego fenotypu [Charchar i wsp., 2008]. W świetle współczesnej wiedzy opisano 29 polimorfizmów charakteryzujących



się zmianą nukleotydu SNP, których obecność wskazuje na powiązanie z nadciśnieniem. Polimorfizmy te zostały odnalezione w sekwencjach genów, które kodują angiotensynogen, receptory  $\beta$ -adrenergiczne, enzym konwertujący angiotensynę I, syntazę tlenku azotu czy cytochrom P450 [Ehret i wsp., 2011]. Można uznać, że wielogenowy charakter oraz niejednorodność nadciśnienia tętniczego generują trudności w rozpoznaniu genetycznych determinant tej jednostki chorobowej [Ciechanowicz & Czekalski, 2011].

Naukowcom japońskim udało się, kojarząc odpowiednio zwierzęta z podwyższonym ciśnieniem krwi, wyhodować szczepy szczurów z nadciśnieniem tętniczym [Lerman i wsp., 2019]. Ten model nadciśnienia nazywany nadciśnieniem spontanicznym jest najbardziej zbliżonym modelem doświadczalnym, odpowiadającym nadciśnieniu pierwotnemu u ludzi. Być może kolejne badania pozwolą na ustalenie, które z licznych czynników mają decydującą rolę w powstaniu i rozwoju nadciśnienia pierwotnego.

Czynnikiem środowiskowym, który ma duży wpływ na ujawnienie się nadciśnienia pierwotnego jest otyłość [Ram, 2014]. Dane wskazują, że 80% wszystkich przypadków nadciśnienia w naszym kraju charakteryzuje osoby z BMI wyższym niż 25 kg/m<sup>2</sup>, a procent dorosłych Polaków, którzy są otyli, ciągle rośnie [Chrostowska i wsp., 2007; Stepaniak i wsp., 2016]. Wykazano, że tkanka tłuszczowa bierze udział w aktywacji układu renina-angiotensyna i układu współczulnego, retencji sodu, zaburzeniach krzepnięcia, procesach zapalnych oraz upośledzeniu działania śródbłonna naczyń [Chrostowska i wsp., 2007].

Ostatnie badania sugerują, że w nadciśnieniu pierwotnym dochodzi do zmian transportu jonów w wyniku defektu błony komórkowej. U pacjentów z nadciśnieniem pierwotnym stwierdzono wzrost zawartości sodu wewnątrz komórki, co może

prowadzić do zaburzenia stężenia wapnia pociągając za sobą wzrost pobudliwości miocytów oraz zwiększenie uwalniania katecholamin.

Literatura ostatnich lat wskazuje na rolę hormonu natiuretycznego, wytwarzanego najprawdopodobniej w mózgu który, jak się sądzi, jest krążącym inhibitorem enzymu ATPazy sodowo-potasowej odpowiedzialnej za transport sodu przez błony komórkowe. Genetyczne uwarunkowania mogą zaburzać deaktywację i usuwanie tego hormonu. Warto zauważyć, że pomiędzy stężeniem sodu w moczu a ciśnieniem tętniczym istnieje istotna statystycznie korelacja [He & MacGregor, 2007]. W świetle współczesnej wiedzy zmniejszenie spożycia soli z 9-12 g dziennie do zalecanego poziomu poniżej 6 g na dzień gwarantuje obniżenie ciśnienia tętniczego oraz zmniejszenie ryzyka zgonu z powodu nadciśnienia [He & MacGregor, 2007]. Z kolei inni autorzy wskazują na negatywne skutki związane z ekstremalnie niskim spożyciem soli w diecie, które grozi śmiercią z powodu zaburzeń sercowo-naczyniowych [Ha, 2014]. Pewne znaczenie w regulacji ciśnienia krwi przypisuje się również zawartości potasu w diecie. Wykazano, że dieta bogata w potas może korzystnie wpływać na ciśnienie krwi [Buendia i wsp., 2015].

Rozwojowi nadciśnienia sprzyja również palenie tytoniu. Nawet jednorazowa ekspozycja na dym papierosowy podnosi ciśnienie krwi, a efekt takiej ekspozycji utrzymuje się przez 20 minut po każdym zapaleniu papierosa [Viridis i wsp., 2010].

Czynnikiem behawioralnym, który również pełni ważną rolę w patogenezie nadciśnienia jest stres psychogeny. Czynniki stresogenne aktywują układ współczulny i prowadzą do zwężenia naczyń. Jednakże przedstawiono przekonywujące dowody, że istotne są tylko zależności pomiędzy nadciśnieniem a stresem przewlekłym [Sparrenberger i wsp., 2009].

#### ***1.4.2. Nadciśnienie wtórne – etiopatogeneza***

Jeżeli badania diagnostyczne ujawnią nieprawidłowości w budowie lub funkcji narządów biorących udział w regulacji ciśnienia tętniczego, wówczas mówimy o nadciśnieniu wtórnym lub objawowym. Ten typ nadciśnienia występuje w przebiegu takich chorób jak: pierwotny hiperaldosteronizm, choroby nerek, guz chromochłonny, choroba Cushing'a, zespół Cohna, reninoma, zwężenie tętnicy nerkowej, choroby neurologiczne i wielu innych. Z innych przyczyn nadciśnienia należy wymienić substancje narkotyczne, a także niektóre leki, nadużywanie alkoholu i bezdech senny [Ram, 2014].

Nadciśnienie tętnicze jest niewątpliwie chorobą, która wymaga od serca dodatkowej pracy, aby pokonać zwiększone obciążenie. Podwyższone ciśnienie prowadzi do zaburzeń wielu narządów, niezależnie od wieku czy płci chorego. Pacjenci chorujący na nadciśnienie tętnicze wykazują mniejszą tolerancję wysiłkową, duszność i obrzęki kończyn dolnych, które są wynikiem niewydolności serca. Objawy zgłaszane przez pacjentów z nadciśnieniem takie jak: bóle głowy, szum w uszach, uczucie kołatania i bóle w okolicy serca, zmęczenie i senność nie są specyficzne dla tej choroby, dlatego chorzy nie są świadomi istniejącego zagrożenia. Zatem bardzo ważne jest potwierdzenie lub wykluczenie nadciśnienia (przynajmniej trzema niezależnymi pomiarami) i stwierdzenie ewentualnych powikłań narządowych oraz identyfikacja wtórnych przyczyn nadciśnienia [Wang i wsp., 2005; Schmieder, 2010; Williams i wsp., 2018].

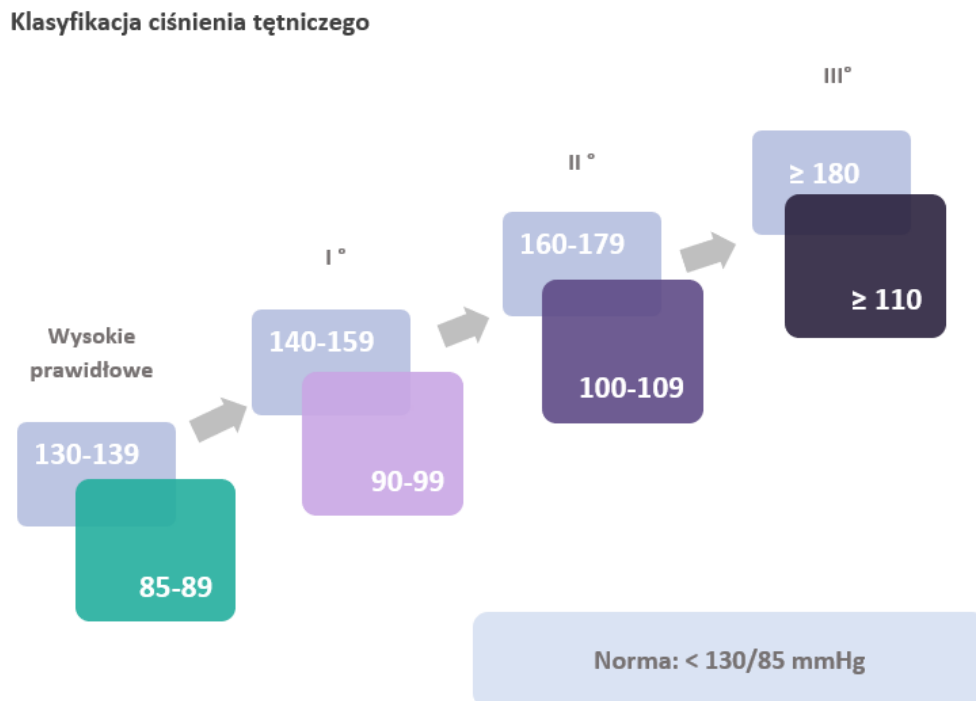
Aktualne możliwości oddziaływania medycyny na czynniki genetyczne, środowiskowe i psychogenne są bardzo ograniczone, dlatego istotne jest coraz lepsze poznawanie patomechanizmów choroby. Leczenie hipotensyjne polega przede wszystkim na zabezpieczeniu pacjentów przed powikłaniami sercowo-naczyniowymi

prowadzącymi do przedwczesnych zgonów oraz inwalidztwa. Badania kliniczne wykazały, że samodzielna forma terapii polegająca na modyfikacji trybu życia nie tylko obniża ciśnienie, ale również zmniejsza ryzyko powikłań, szczególnie w przypadku łagodnego nadciśnienia. W przypadku nadciśnienia bardziej zaawansowanego konieczne jest połączenie leczenia nefarmakologicznego z farmakoterapią [Mancia i wsp., 2013].

### ***1.5. Klasyfikacja ciśnienia tętniczego krwi***

Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego z 2015 roku, zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i Europejskiego Towarzystwa Hipertensjologii z 2018 roku podają następującą klasyfikację ciśnienia krwi:

**Ryc. 1.** Schemat przedstawiający aktualną klasyfikację ciśnienia tętniczego (opracowanie własne).



Zgodnie z charakterystyką stopni nadciśnienia, wg WHO nadciśnienie 1 stopnia (łagodne), często zdiagnozowane przypadkowo, przebiega bez zmian narządowych. Nadciśnienie 2 stopnia (umiarkowane) charakteryzują współistniejące zmiany w naczyniach gałki ocznej oraz przerost lewej komory serca. Natomiast w nadciśnieniu 3 stopnia stwierdza się współistniejącą niewydolność serca, głębokie zmiany w obrębie naczyń dna oka objawiające się krwawieniem i obrzękiem siatkówki.

Ponadto, wyodrębnia się tzw. izolowane nadciśnienie skurczowe, które występuje, gdy wysokość ciśnienia skurczowego jest równa lub wyższa niż 140 mm Hg i niższa niż 90 mm Hg dla ciśnienia rozkurczowego.

W zależności od wartości ciśnienia skurczowego, medycyna wyróżnia 3 stopnie izolowanego nadciśnienia skurczowego:

- stopień 1 – 140-159 mm Hg,
- stopień 2 – 160-179 mm Hg,
- stopień 3 – powyżej 180 mm Hg,

Ten typ nadciśnienia charakteryzuje niska (60-70 mm Hg) wartość ciśnienia rozkurczowego, co stanowi dodatkowy czynnik ryzyka. Wyróżnia się dwie główne grupy przyczyn tego rodzaju nadciśnienia. Pierwszą stanowią chorzy z nadczynnością tarczycy, cukrzycą, niedomykalnością zastawki aorty. Drugą grupę przyczyn stanowią czynniki takie jak: otyłość, palenie papierosów czy nadużywanie alkoholu. Szczególnie narażeni na izolowane nadciśnienie skurczowe są pacjenci genetycznie obciążeni chorobami układu krążenia i osoby, u których odnotowuje się dwie przyczyny zachorowania np. cukrzycę i chorobę nerek. Objawy izolowanego nadciśnienia skurczowego, takie jak: duszności, bóle głowy, długotrwałe zmęczenie, ucisk w okolicy serca, częste krwawienie z nosa, nie są charakterystyczne tylko dla tej choroby, dlatego

rozpoznanie izolowanego nadciśnienia skurczowego jest trudne [Tykarski i wsp., 2015; Williams i wsp., 2018].

### ***1.6. Modele zwierzęce do badania nadciśnienia tętniczego***

*„Każdy większy postęp w medycynie można przypisać eksperymentom na zwierzętach”.*

Złożony, wieloczynnikowy patomechanizm nadciśnienia tętniczego, który wiąże się z wieloma szlakami sygnałowymi, jest przyczyną braku terapii, która mogłaby odwrócić zmiany patomorfologiczne i hemodynamiczne. Wciąż poszukuje się nowych metod terapeutycznych, które poprawiłyby jakość życia pacjentów i wydłużyły czas przeżycia. Służą temu badania na modelach zwierzęcych.

Badania przedkliniczne na modelach zwierzęcych przyczyniły się do zrozumienia patogenezы wielu chorób cywilizacyjnych, ustawienia skutecznego leczenia i profilaktyki różnych stanów patologicznych organizmu. Modele te są również wykorzystywane w celu uzyskania informacji na temat etiopatogenezy nadciśnienia. Bardzo często badania eksperymentalne w temacie nadciśnienia prowadzone są na szczurach, ze względu na fakt całkowitego zmapowania genomu tych zwierząt, który w 99% wykazuje homologię sekwencji z ludzkim genomem [Twigger i wsp., 2002]. Poza tym, patomechanizm i wiele czynników etiologicznych odpowiedzialnych za nadciśnienie tętnicze u ludzi, takie jak nadmierne spożycie soli, zaburzenie aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) oraz czynniki genetyczne, są podobne u szczurów [Trippodo & Frohlich, 1981; Lin i wsp., 2016].

Modele doświadczalne chorób człowieka są wykorzystywane do badania czynników patofizjologicznych związanych z nadciśnieniem i oceny preparatów obniżających ciśnienie krwi. Należy jednak pamiętać, że na podstawie wyników badań na zwierzętach można jedynie przewidywać reakcje ludzi. Podstawowe badania

naukowe na modelach zwierzęcych pomagają również w uniknięciu błędów w praktyce klinicznej [Lin i wsp., 2016].

Modele zwierzęce do badania nadciśnienia można podzielić na kategorie według ich etiologii. Do badania nadciśnienia samoistnego często wykorzystuje się model szczurów SHR i szczury Dahl wrażliwe na NaCl. Inne modele molekularne, szczepy transgeniczne, kongeniczne i konsomiczne w połączeniu z techniką nokautu genów są wykorzystywane do badań mechanistycznych podstaw nadciśnienia pierwotnego.

Choroby nerek, w tym zwężenie tętnic nerkowych są głównymi przyczynami wtórnego nadciśnienia tętniczego. W modelu 2K1C (two kidney one clip) zwężenie tętnicy nerkowej otrzymuje się przez założenie wystandaryzowanego zacisku w jednej nerce, natomiast druga nerka pozostaje nietknięta. Model 1K1C (one kidney one clip) charakteryzuje założenie zacisku w jednej nerce i usunięcie drugiej nerki, natomiast w modelu 2K2C (two kidney two clip) stosuje się dwa zaciski w dwóch nerkach. Do badania patofizjologii niedokrwienia nerek, nadciśnienia mięszonego nerek oraz zwłóknienia okołonerkowego opracowano inne systemy. Natomiast model indukowany octanem deoksykortykosteronu (DOCA) naśladuje działanie nadciśnienia indukowanego mineralokortykoidami i glikokortykoidami. Nadciśnienie wywołuje się również poprzez metody farmakologiczne z zastosowaniem inhibitora syntazy tlenu azotu (NOS), aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) oraz wprowadzenie stresorów środowiskowych takich jak niska temperatura, dieta czy stres [Lin i wsp., 2016].

Poniżej szerzej opisano modele nadciśnienia pierwotnego (SHR) i wtórnego (DOCA- salt), które zostały zastosowane w badaniach własnych.

### ***1.6.1. Model nadciśnienia samoistnego***

Model SHR (spontaneously hypertensive rat), który ściśle symuluje nadciśnienie samoistne u ludzi został utworzony w 1963 r. poprzez skrzyżowanie niespokrewnionego samca Wistar Kyoto (o wysokim ciśnieniu krwi) z samicą (o nieznacznie podwyższonym ciśnieniu krwi) [Okamoto & Aoki, 1963]. Następnie przeprowadzono kojarzenie miotu pomiędzy braćmi a siostrami, co pozwoliło na wyselekcjonowanie potomstwa o najwyższym ciśnieniu krwi [Okamoto & Aoki, 1963]. W 4 tygodniu życia u szczurów SHR stwierdzono wzrost ciśnienia skurczowego do 180-200 mmHg, natomiast u szczurów Wistar-Kyoto (WKY) ciśnienie tętnicze było prawidłowe. Warto zauważyć, że szczepy WKY nie są wsobne, a zatem istnieje znaczna heterogeniczność genetyczna między tymi szczepami oraz między koloniami w obrębie każdego szczepu [Kurtz & Morris, 1987]. W związku z tym w kontrolnej grupie WKY z nadciśnieniem nie są związane żadne specyficzne komponenty genetyczne. SHR są dobrym modelem, który jest wykorzystywany do określenia genów odpowiedzialnych za nadciśnienie, do oceny powikłań narządowych oraz do badania potencjalnych środków farmakologicznych [Tobian i wsp., 1984].

### ***1.6.2. Model doświadczalny DOCA-salt (nadciśnienie endokrynologiczne)***

Liczne doniesienia literaturowe dotyczące badań klinicznych i doświadczalnych wskazują, że nadciśnienie często wynika z nadczynności współczulnego układu nerwowego i zaburzonej równowagi w układzie renina-angiotensyna (RAS) [Guyenet, 2006; Basting & Lazartigues, 2017]. Mineralokortykoidy lub ich syntetyczne pochodne, w tym DOCA powodują zatrzymanie sodu i wody w organizmie. Po raz pierwszy nadciśnienie tętnicze u szczurów wywołane podaniem octanu deoksykortykosteronu (DOCA) zostało wykazane przez Selye & Bois [1957]. Ten typ nadciśnienia wywołany jest, w głównej mierze, zwiększonym zwrotnym wchłanianiem sodu i wody, co



powoduje zwiększenie objętości krwi. Stwierdzono również zwiększoną sekrecję wazopresyny prowadzącą do retencji wody i zwężenia światła naczyń krwionośnych. Ponadto, dochodzi do zmiany aktywności RAAS i zwiększonej aktywności współczulnej. Model ten charakteryzuje się podaniem podskórnym octanu deoksykortykosteronu (DOCA) i 1% NaCl w wodzie do picia oraz nefrektomią jednej nerki u szczurów Wistar. Podwyższone ciśnienie u sodowrażliwych szczurów DOCA stwierdza się wyłącznie przy podaniu obu substancji – DOCA i 1% NaCl [Iyer i wsp., 2010; Lin i wsp., 2016]. Model DOCA-salt naśladuje większość zmian obserwowanych w przewlekłej przebudowie układu sercowo-naczyniowego u ludzi, łącznie z nadciśnieniem, zwłóknieniem, przerostem, nieprawidłowościami w przewodnictwie elektrycznym, dysfunkcji naczyń oraz przeroście prawej i lewej komory serca [Iyer i wsp., 2010].

### ***1.7. Powikłania narządowe w nadciśnieniu tętniczym***

Utrzymanie ciśnienia tętniczego, które zapewnia prawidłową perfuzję narządów, jest ważnym ogniwem wśród mechanizmów regulujących homeostazę ustroju. Czynniki regulujące ciśnienie krwi, takie jak czynniki hemodynamiczne, hormonalne czy nerwowe, tworzą wzajemnie powiązany układ, który w warunkach fizjologicznych utrzymuje odpowiednie ciśnienie tętnicze zapewniające prawidłową perfuzję tkanek. Zmiana, już w obrębie jednego czynnika powoduje zachwianie stanu równowagi i prowadzi do rozwoju nadciśnienia. Niewykryte odpowiednio wcześnie i nieleczone nadciśnienie tętnicze może doprowadzić do poważnych powikłań, groźnych dla życia, takich jak uszkodzenie nerek, przerost lewej komory serca i w efekcie niewydolność serca, retinopatię oraz powikłania ze strony układu nerwowego, w tym udar mózgu [Wang i wsp., 2005; Schmieder, 2010].

Istotną rolę w regulacji ciśnienia krwi pełni angiotensyna II. Efektem jej działania jest silny skurcz mięśniówki drobnych naczyń krwionośnych, konsekwencją czego jest wzrost ciśnienia tętniczego oraz zwiększenie częstotliwości pracy serca. Ponadto, angiotensyna II odpowiada za regulację homeostazy wodno-elektrolitowej w organizmie i sekrecję niektórych hormonów wytwarzanych w korze nadnerczy oraz aktywację współczulnego układu nerwowego [Łącka & Czyżyk, 2008]. Wzrastająca liczba dowodów wskazuje, że podwyższone stężenie angiotensyny II wzmacnia wytwarzanie czynników prozapalnych, preaktywuje krążące we krwi monocyty oraz wzmacnia adhezję leukocytów do śródbłonna naczyń. Ponadto, wywołuje nacieki podśródbłonkowe co prowadzi do powstania zmian miażdżycowych w naczyniach [Ruiz-Ortega i wsp., 2006; Ozawa i wsp., 2007].

Podwyższone ciśnienie krwi uszkadzając naczynia krwionośne ogranicza transport krwi do ważnych narządów w tym nerek. Nadciśnienie jest główną przyczyną przewlekłej choroby nerek. Na skutek uszkodzenia mikroskopijnych jednostek filtrujących, nerki z czasem przestają usuwać z organizmu nadmiar płynów i zbędne produkty przemiany materii. Mechanizmy te prowadzą do jeszcze większego wzrostu ciśnienia krwi, dlatego nadciśnienie może być nie tylko przyczyną ale i powikłaniem przewlekłej choroby nerek. Efektem nieprawidłowości związanych z funkcjonowaniem nerek jest niewydolność serca [Schmieder, 2010].

Nadciśnienie tętnicze prowadzi do niewydolności serca bezpośrednio jak i na skutek: obciążenia hemodynamicznego, zmniejszonej kurczliwości miokardium, przebudowy lewej komory i jej przerostu, upośledzeniu mikrokrażenia wieńcowego i zmian dotyczących wieńcowego przepływu krwi. Na skutek przewlekłego przeciążenia ciśnieniowego dochodzi do zwiększenia ilości sarkomerów oraz objętości miocytów czego efektem jest pogrubienie ściany i remodeling serca. Warto dodać,

że hormony, w tym angiotensyna II i aldosteron, oraz cytokiny wzmagają zwłóknienie śródmiąższowe. Zarówno naprawcze jak i zastępcze włóknienie czy też zwyrodnienie miocytów uszkadza miokardium nieodwracalnie. Nie należy zapominać, że nadciśnienie jest także czynnikiem rozwoju zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych oraz choroby wieńcowej prowadzącej do rozwoju niewydolności serca [Wang i wsp., 2005; Schmieder, 2010].

Chorzy na nadciśnienie borykają się również ze zmianami w naczyniach siatkówki oka, a zaawansowanie choroby można ocenić na podstawie badania dna oka. Podwyższone ciśnienie wywołuje sklerotyzację naczyń, prowadzi do poszerzenia naczyń żylnych i zwężenia naczyń tętniczych, a w zaawansowanej fazie choroby do ognisk degeneracji. Natomiast nagłe podniesienie ciśnienia krwi może doprowadzić do obrzęku tarczy nerwu wzrokowego [Wang i wsp., 2005; Wong & Mitchell, 2007; Schmieder, 2010].

Chorobie tej również towarzyszą silne bóle głowy. W przebiegu nadciśnienia tętniczego dochodzi do nadmiernej produkcji wolnych rodników tlenowych, które prowadzą do zamierania tkanki mózgowej bardzo wrażliwej na stres oksydacyjny. Efektem tego procesu są ubytki w istocie szarej i białej mózgu. Wysokie ciśnienie krwi prowadzi do udarów niedokrwiennych oraz wylewów wewnątrzczaszkowych [Poulet i wsp., 2006].

Wykazano również, że nadciśnieniu tętniczemu towarzyszą zaburzenia w pracy układu pokarmowego takie jak objawy ostrego zapalenia trzustki oraz stan zapalny i krwawienia z błony śluzowej żołądka [Burak i wsp., 2001; Bexelius i wsp., 2013; Li i wsp., 2013].

W przebiegu tej choroby dochodzi do zaburzeń funkcji wielu innych narządów, w tym nadnerczy. Nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy nieprawidłowe wydzielanie

zarówno mineralokortykosteroidów (biorących udział w regulacji gospodarki elektrolitowej), jak i katecholamin, które wpływają na homeostazę układu krążenia [Staessen i wsp., 2003; Rimoldi i wsp., 2014]. Co więcej, zwężenie naczyń skutkuje niedostatecznym dopływem krwi do narządów dokrewnych, co w istotny sposób wpływa na aktywność komórek endokrynowych, natomiast towarzyszący nadciśnieniu stres oksydacyjny może prowadzić do apoptozy tych komórek [Desole i wsp., 1997; Drews i wsp., 2010]. Mimo dużego postępu w diagnostyce i terapii, nadciśnienie tętnicze obarczone jest dużą śmiertelnością [Kearney i wsp., 2005].

## **2. NADNERCZA**

Nadnercza są parzystymi narządami należącymi do układu wydzielania wewnętrznego. Nazwa gruczołów wskazuje na ich lokalizację na górnym biegunie nerek. Nadnercza zbudowane są z części korowej i rdzennej, które różnią się pochodzeniem, budową i czynnością [Rosol i wsp., 2001].

### ***2.1. Budowa anatomiczna nadnerczy***

Nadnercza (łac. *glandulae suprarenalis*) charakteryzują się trójkątnym kształtem, mają około 5 cm długości i 3-4 cm szerokości. Lewe nadnercze ma większą szerokość i zajmuje przestrzeń pomiędzy górnym biegunem, a wnęką nerki. Jak wcześniej wspomniano nadnercza składają się z dwóch części: kory i rdzenia. Narząd na całej powierzchni pokryty jest torebką łącznotkankową [Junqueira & Carneiro, 2003].

### ***2.2. Budowa histologiczna nadnerczy***

Zewnętrznie położona kora pochodzi z mezodermy pośredniej i stanowi ok. 90% masy gruczołu dorosłych ludzi. Głębiej położony rdzeń pochodzi z komórek neuroektodermalnych, wydzielających katecholaminy. Podczas rozwoju kora nadnerczy przechodzi szereg zmian histologicznych i procesów różnicowania, które prowadzą do

powstania trzech koncentrycznie ułożonych warstw komórek o odrębnych właściwościach ultrastrukturalnych i funkcjonalnych. Najbardziej zewnętrzna warstwa, leżąca tuż pod torebką narządu, charakteryzuje się organizacją komórek podobną do kłębuszków. Komórki tej warstwy wytwarzają mineralokortykoidy, głównym jest aldosteron odpowiedzialny za długotrwałe utrzymanie ciśnienia krwi, poprzez promowanie reabsorpcji sodu i zwiększone wydzielanie jonów potasu i wodoru w dystalnych kanalikach krętych i przewodach zbiorczych nerek. Hormon ten kontrolowany przez potas i układ renina-angiotensyna może prowadzić do zmniejszenia objętości płynu pozakomórkowego i śmierci w wyniku wstrząsu hipowolemicznego. Ponadto, wewnętrzna część warstwy kłębuszkowatej kory nadnerczy służy jako nisza dla komórek progenitorowych, które utrzymują homeostazę komórkową gruczołu. Pod warstwą kłębuszkowatą leżą komórki układające się w dośrodkowo biegnące sznury, czy pasma. Pod kontrolą ACTH przysadki, wytwarzają one glikokortykoidy, głównie kortyzol, podnoszący poziom glukozy np. w sytuacjach stresowych. Rolą tego hormonu jest także uwalnianie aminokwasów, przyspieszenie glukoneogenezy czy zatrzymanie soli w organizmie. Wydzielanie hormonów warstwy pasmowatej pozostaje przede wszystkim pod kontrolą osi podwzgórze-przysadka-nadnercza i mechanizmu sprzężenia zwrotnego, w odpowiedzi następuje stymulacja wydzielania ACTH. Mineralokortykoidy i glikokortykoidy nadnerczy nie są magazynowane, ale bezpośrednio po syntezie są wydzielane do krwi. Najgłębiej położone komórki kory, kontaktujące się z rdzeniem, tworzą trzecią warstwę siatkowatą, wytwarzają hormony płciowe, głównie androgeny.

Rdzeń nadnerczy tworzą wielościennie komórki chromafinowe i komórki zwojowe (zmodyfikowane komórki autonomicznego układu nerwowego) wraz z bogatą siecią naczyń krwionośnych. Aktywność komórek gruczołowych pozostaje pod

bezpośrednią kontrolą autonomicznego układu nerwowego. Komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy są głównym miejscem przekształcania tyrozyny w katecholaminy, epinefrynę, norepinefrynę i dopaminę. Uwolnienie hormonów w odpowiedzi na stres może nastąpić bardzo szybko, tzw. reakcja walki lub ucieczki, a skutki obejmują zwiększoną częstość akcji serca i skurcz serca, reakcję na komórki mięśni gładkich naczyń oraz wzrost glikogenolizy i uwolnienie kwasów tłuszczowych z adipocytów [Rosol i wsp., 2001; Junqueira & Carneiro, 2003].

Strefa korowa zbudowana z trzech warstw charakteryzuje naczelnę. W przypadku gryzoni rozróżnia się dwie koncentryczne warstwy komórek o różnych właściwościach funkcjonalnych. Zewnętrzna warstwa kłębkowata kory nadnerczy u gryzoni znajduje się pod torebką nadnerczy oraz wytwarza mineralokortykoidy pod kontrolą angiotensyny II. Może służyć również jako nisza dla progenitorów kory nadnerczy [Walczak & Hammer, 2015]. Warstwa pasmowata w nadnerczach gryzoni, tak jak u naczelnych, jest zlokalizowana bezpośrednio pod strefą kłębkowatą. Komórki tej warstwy u naczelnych produkują kortyzol, natomiast u gryzoni kortykosteron. Warstwę siatkowatą, która jest położona w bliskim kontakcie z rdzeniem nadnerczy wyróżnia się tylko u naczelnych [Yates i wsp., 2013].

**Tabela 2.** Zróżnicowanie czynnościowe i morfologiczne kory nadnerczy.

| Warstwa kory nadnerczy    | Produkowane steroidy | Przedstawiciel grupy steroidów                   |
|---------------------------|----------------------|--|
| <b>Warstwa kłębkowata</b> | mineralokortykoidy   | aldosteron                                       |
| <b>Warstwa pasmowata</b>  | glikokortykoidy      | kortyzon (człowiek),<br>kortykosteron (gryzonie) |
| <b>Warstwa siatkowata</b> | androgeny            | dehydropiandrosteron                             |

### ***2.3. Zaburzenia w wydzielaniu hormonów nadnerczy w nadciśnieniu tętniczym***

Dane literaturowe dowodzą, że nadciśnieniu tętniczemu towarzyszą zarówno nieprawidłowe wydzielanie mineralokortykoidów, odpowiedzialnych za regulację gospodarki wodno-mineralnej, jak i katecholamin, wpływających na funkcjonowanie układu sercowo- naczyniowego [Bankova i wsp., 1980; Hashimoto i wsp.,1989;].

Zasadnicze znaczenie w rozwoju nadciśnienia tętniczego odgrywa również kortykosteron. W jednym z badań naukowych wykazano, że zwiększona aktywność korowonadnerczowa u szczurów SHR zmniejsza odpowiedź ACTH na stres oraz poziom egzogennej kortykoliberyny. Może to być przyczyną zwiększonego osoczowego stężenia kortykosteronu, który jest kluczowy w rozwoju nadciśnienia u szczurów SHR [Hashimoto i wsp.,1989].

Bankova i współautorzy wykazali, że ostry stres u szczurów normotensyjnych aktywował funkcję glikokortykoidów kory nadnerczy bez podwyższania syntezy aldosteronu bądź jego zawartości we krwi. Natomiast u szczurów z nadciśnieniem ten sam stres prowadził do aktywacji funkcji mineralokortykoidów kory nadnerczy oraz do istotnego zwiększenia poziomu aldosteronu. U szczurów normotensyjnych stres prowadzi do obniżenia aktywności reniny i podniesienia zawartości angiotensyny I, zaś u szczurów nadciśnieniowych aktywność układu renina-angiotensyna pozostaje niezmienną [Bankova i wsp., 1980]. Wzrost stężenia mineralokortykoidów u szczurów z nadciśnieniem samoistnym może pełnić istotną funkcję w podnoszeniu ciśnienia tętniczego [Bankova i wsp., 1980].

W jednym z badań skupiających się na zmianach histologicznych w warstwie korowej nadnerczy szczurów z różnym rodzajem eksperymentalnego nadciśnienia dowiedziono, że podanie octanu dezoksykortykosteronu wywołało atrofię i ubytek lipidów strefy kłębkowatej kory nadnerczy. Największą uwagę poświęcono tej

warstwie, ponieważ jest to strefa wydzielająca mineralokortykoidy [Deane & Masson, 1951]. Ta atrofia może być efektem podwyższonego stosunku sodu do potasu we krwi, a zapotrzebowanie na hormon regulujący poziom soli może być zmniejszone, tak aby strefa kłębkowata uległa involucji [Deane i wsp., 1948].

### **3. BIAŁKO CACYBP/SIP**

Białka stanowią około 20% masy ciała człowieka i są najważniejszymi składnikami komórek odpowiedzialnymi za prawidłowy przebieg wszystkich procesów biologicznych. Są to związki wielkocząsteczkowe, utworzone z 20 aminokwasów, podlegające różnym modyfikacjom chemicznym warunkującym ich aktywność biologiczną. Określone funkcje białek są uwarunkowane wzajemnymi oddziaływaniami między określonymi białkami i tworzeniem bardziej złożonych kompleksów. Są to związki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, ze względu na pełnione rozliczne funkcje m.in. budulcową, regeneracyjną, regulacyjną, katalityczną czy transportową. Ponadto, są ważnym elementem wymiany informacji między komórkami.

Każda komórka posiada zdolność odbierania sygnałów ze środowiska zewnętrznego i odpowiedzi na te bodźce. Odbywa się to za pomocą receptorów, z którymi łączą się właściwe ligandy uruchamiając kaskadę wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału. Biologiczna odpowiedź komórki odbywa się poprzez aktywację istotnych procesów.

Aktywność niektórych białek zależy od kowalencyjnego przyłączenia grupy fosforanowej, za który to proces odpowiedzialne są białka enzymatyczne zwane kinazami. Inne enzymy, zwane fosfatazami, odpowiadają za defosforylację, a zatem



deaktywację danego białka. Badania ostatnich lat wykazały nową aktywność fosfotazową białka CacyBP/SIP (ang. calcyclin binding protein/Siah-1 interacting protein), które wchodząc w interakcje z kinazami, np. ERK1/2 czy p38, powodują ich defosforylację [Topolska-Woś i wsp., 2017].

CacyBP/SIP jest wielofunkcyjnym białkiem o masie cząsteczkowej 30 kDa, występującym w różnych komórkach i tkankach nie tylko ssaków, ale również w organizmach niższych. Cząsteczka CacyBP/SIP charakteryzuje się obecnością trzech domen: N-końcowej oraz środkowej CS (ang. domain present in CHORD and Sgt1) o charakterze globularnym, a także nieustrukturyzowanej domeny C-końcowej SGS (ang. Sgt1 specific). Sekwencja aminokwasów domeny C-końcowej białka CacyBP/SIP, wykazuje duże podobieństwo do sekwencji aminokwasowej domeny SGS białka Sgt1 [Kitagawa i wsp., 1999; Bhattacharya i wsp., 2005]. Połączenie tej domeny z białkiem S100A6 przekształca jej konformację co prowadzi do powstania dwóch  $\alpha$ -helis [Lee i wsp., 2008].

### ***3.1. Odkrycie i właściwości białka CacyBP/SIP***

CacyBP/SIP jest niewielkim, wielodomenowym białkiem odkrytym w latach 90-tych ubiegłego wieku w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha [Filipek & Wojda, 1996; Filipek & Kuźnicki, 1998]. Szczególnie wysoki poziom CacyBP/SIP wykazano w mózgu i śledzionie, umiarkowany w sercu, wątrobie i mięśni gładkim żołądka, natomiast niższy w nerkach, odbytnicy i węzłach chłonnych [Filipek & Kuźnicki, 1998; Zhai i wsp., 2008]. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że CacyBP/SIP jest białkiem zasadowym o stosunkowo krótkim okresie półtrwania i nie wykazuje podobieństwa do żadnego znanego białka. Potwierdziły to badania sekwencji nukleotydowej genu kodującego CacyBP/SIP, które nie wykazały podobieństwa do sekwencji genów dostępnych w różnych bazach danych (m. in. w GenBank) [Filipek &

Kuźnicki, 1998]. Natomiast, wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydów genów kodujących to białko do genów kodujących białka z rodziny SSRP (SSRP-DNA Structure-Specific Recognition Protein) sugeruje, że CacyBP/SIP może brać udział w regulacji ekspresji genów. Dzięki interakcji z różnymi białkami CacyBP/SIP bierze udział w wielu procesach komórkowych. Może wpływać na procesy defosforylacji, proliferacji i różnicowania się komórek, reorganizacji cytoszkieletu, ubikwitynacji oraz odpowiedzi na stres. Mimo licznych badań nie wyjaśniono dokładnie roli CacyBP/SIP w omawianych procesach.

Badania z wykorzystaniem komórek neuroblastoma NB2a wykazały, iż CacyBP/SIP jest głównie białkiem cytozolowym, jednak w pewnych warunkach, np. stres oksydacyjny czy wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  może przemieścić się do jądra komórkowego [Filipek i wsp., 2002; Topolska-Woś i wsp., 2015]. Wysoki poziom CacyBP/SIP obserwowano również w jądrach zróżnicowanych komórek neuroblastoma oraz w jądrach innych komórek nowotworowych [Wu i wsp., 2003; Zhai i wsp., 2008; Kilańczyk i wsp., 2009]. Okazuje się, że CacyBP/SIP defosforyluje odpowiedzialne za proliferację białko NPM1, które jest nowym i obiecującym celem w terapiach przeciwnowotworowych, dlatego dalsze badania w tej dziedzinie mogą rzucić nowe światło na rolę CacyBP/SIP w regulacji aktywności NPM1 lub innych białek [Rosińska & Filipek, 2018].

Wyniki dotychczasowych badań wykazały kilka białek wchodzących w interakcję z CacyBP/SIP. Wśród nich można wyróżnić białka z rodziny S100, składniki kompleksu ligazy ubikwityny E3: Skp1 i Siah-1, białko Hsp90, białka cytoszkieletowe: aktyna, tropomiozyna, tubulina, białko tau, oraz kinazy z rodziny MAP: ERK1/2 i p38 [Filipek & Leśniak, 2018].

Już pierwsze badania wykazały, że CacyBP/SIP wiąże się z białkiem S100A6, jednak rola tego kompleksu nadal nie została w pełni wyjaśniona. Przypuszcza się, że kompleks CacyBP/SIP-S100A6 może hamować aktywność ligazy ubikwityny Siah-1-CacyBP/SIP-Skp1-TBL1 ( $SCF_{TBL1}$ ), jednocześnie wpływając na poziom protoonkogenu  $\beta$ -kateniny [Ning i wsp., 2012]. Szczegółowe badania wykazały, że związanie C-końcowej domeny CacyBP/SIP z S100A6 tłumi aktywność fosfatazową białka CacyBP/SIP wobec białka tau [Wasik i wsp., 2013].

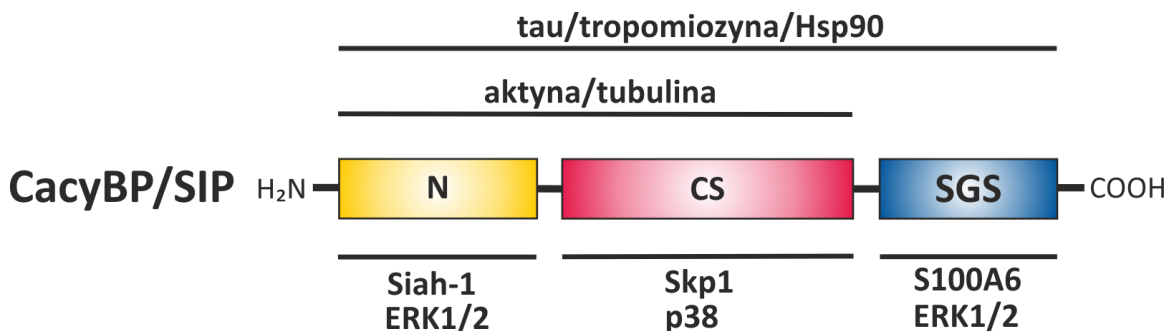
CacyBP/SIP oraz Siah-1, Skp1 i białko TBL1 tworzą kompleks ligazy ubikwityny tak zwany  $SCF_{TBL1}$  identyfikujący nieufosforylowaną  $\beta$ -kateninę [Matsuzawa & Reed, 2001]. Aktywność  $SCF_{TBL1}$  nie została w pełni potwierdzona, przypuszcza się jednak, że CacyBP/SIP przyłączając inne białka aktywuje tę ligazę [Bhattacharya i wsp., 2005; Dimitrova i wsp., 2010]. Biorąc pod uwagę udział  $\beta$ -kateniny w procesach proliferacji i nowotworzenia można wnioskować, że CacyBP/SIP za pomocą ligazy ubikwityny  $SCF_{TBL1}$  hamuje namnażanie komórek nowotworowych [Jiang i wsp., 2015]. Potwierdzają to wyniki badań wykazujące, że białko CacyBP/SIP obniżając poziom  $\beta$ -kateniny jednocześnie zmniejsza proliferację komórek w raku nerki i żołądka [Ning i wsp., 2007; Sun i wsp., 2007].

CacyBP/SIP bierze udział w ochronie komórek przed działaniem czynników stresowych oraz charakteryzuje się właściwościami opiekuńczymi wobec innych białek. Dowiedziono, że CacyBP/SIP tak jak Hsp90 zmniejsza termicznie indukowaną agregację syntazy cytrynianowej oraz zabezpiecza lucyferazę przed denaturacją. Potwierdzono, że inhibitory Hsp90, szok cieplny, nowobiocyna czy radicikol nie obniżają poziomu CacyBP/SIP w komórkach HEp-2. Okazuje się, że CacyBP/SIP nie jest substratem, a białkiem współopiekuńczym wobec Hsp90. Natomiast po przeprowadzeniu testu MTT stwierdzono, że komórki HEp-2, które charakteryzują się

nadprodukcją CacyBP/SIP i które były narażone na działanie stresu, wykazują większą przeżywalność niż komórki z grupy kontrolnej [Filipek & Góral, 2018].

Odziaływanie CacyBP/SIP z białkami cytoszkieletu takimi jak aktyna, tubulina, tropomiozyna czy tau oraz kinazami ERK1/2 i p38 wskazują na pośredni lub bezpośredni udział CacyBP/SIP w reorganizacji cytoszkieletu w stanie fizjologicznym jak i nowotworzeniu, podczas proliferacji, migracji i różnicowania komórek oraz w chorobach neurodegeneracyjnych i w starzeniu się [Au i wsp., 2006; Filipek i wsp., 2008].

**Ryc.2.** Schemat prezentujący domenę N-końcową, środkową CS oraz C-końcową SGS białka CacyBP/SIP wraz z miejscami wiązania białek efektorowych. Białko tau, Hsp90 i tropomiozyna zostały uwzględnione na schemacie jednak jak dotąd miejsce ich wiązania nie zostało zidentyfikowane [Filipek & Góral, 2018].



### 3.2. Rola białka CacyBP/SIP jako fosfatazy

Istotną rolę w komórkowych szlakach sygnałowych odgrywają kinazy białkowe aktywowane mitogenami MAP (ang. mitogen activated protein kinases). Stanowią klasę kinaz serynowo–treoninowych, do aktywacji których niezbędna jest fosforylacja motywu Thr-X-Tyr (TXY) w obrębie pętli aktywacyjnej. Wyróżniamy trzy podstawowe

rodziny kinaz MAP: ERK1/2 (ang. extracellular signal-regulated kinase), JNK/SAPK (ang. c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinase) oraz kinazy p38 [Kleina, 2002]. Niedawno wykazano, że CacyBP/SIP wiąże i defosforyluje kinazę ERK1/2 [Kilańczyk i wsp., 2009; 2011]. Aktywność fosfatazy CacyBP/SIP w kierunku ERK1/2 zaobserwowano w komórkach neuroblastoma NB2a, a nadekspresja CacyBP/SIP była skorelowana z redukcją ilości fosforylowanej ERK1/2 we frakcji jądrowej [Kilańczyk i wsp., 2012; Rosińska i wsp., 2016; Topolska-Woś i wsp., 2017]. Badania na komórkach NB2a wykazały, iż nie tylko ERK1/2 ale również p38 oraz białko tau są ligandami fosfatazy CacyBP/SIP. Badania na komórkach neuroblastoma NB2a, wykazały znacznie skuteczniejszą fosfatazową aktywność CacyBP/SIP w stosunku do białka p38 w obecności nadtlenu wodoru [Topolska-Woś i wsp., 2017].

#### **4. KINAZA ERK1/2**

Kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK) to rodzina wysoce konserwatywnych kinaz białkowych seryny/treoniny, których regulacja aktywności odbywa się przez odwracalną fosforylację w odpowiedzi na działanie wiele różnych sygnałów. Biologiczną odpowiedzią komórki na bodźce zewnętrzne są kaskady sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, w których biorą udział MAPK. Kinazy te, do których należą ERK1/2 (kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym), JNK (kinaza c-Jun N-końcowa) i p38 MAPK, mają szerokie spektrum działania, ponieważ wpływają na aktywność wielu enzymów, białek i czynników transkrypcyjnych.

ERK1/2 jest pierwszą zidentyfikowaną kinazą z rodziny MAPK [Cuschieri & Maier, 2005; Rubinfeld & Seger, 2005]. Składa się ona z izoformy ERK1 oraz izoformy ERK2 i jest aktywowana na drodze szlaku Raf:MEK:ERK w odpowiedzi na działanie wielu sygnałów pozakomórkowych. Aktywowana ERK1/2 kontroluje różne jądrowe

czynniki transkrypcyjne poprzez fosforylację np.: c-myc, c-fos, Elk-1 oraz kinaz białkowych MNK (MAPK signal interacting kinase), kinaz rybosomalnych (RSK) i MSK (mitogen and stress-activated protein kinase). Sygnalizacja kinazą regulowaną sygnałem pozakomórkowym (ERK1/2) pośredniczy w komunikacji między receptorami czynnika wzrostu a jądrem komórkowym i została powiązana z kluczowymi wydarzeniami w procesie transformacji i proliferacji [Cuschieri & Maier, 2005; Rubinfeld & Seger, 2005].

Wiadomym jest, że układ renina-angiotensyna–aldosteron (RAA) poprzez regulację homeostazy wodno-elektrolitowej i kwasowo-zasadowej jest zaangażowany w patogenezę nadciśnienia [Kokot & Ficek, 2001]. Wykazano, że 90% całkowitej reniny, która krąży we krwi stanowi jej prekursor – prorenina [Derks i wsp., 1987; Toffelmire i wsp., 1989]. Spośród niewielu narządów, które mają zdolność produkowania proreniny i reniny wyróżnia się nadnercza [Müller i wsp., 1998; Nguyen, 2006; Oliver, 2006]. Prorenina i renina oddziałując na swoiste dla nich receptory aktywują nie tylko szlak angiotensynowy ale i szlak ERK1/2 [Danser & Deinum, 2006; Nabi i wsp., 2006]. Efektem zwiększonej ekspresji receptora proreninowego jest wzrost ciśnienia krwi i tętna, aldosteronemia, a także zwiększona ekspresja cyklooksygenazy 2 w korze nerek [Burckle i wsp., 2006; Kaneshiro i wsp., 2006]. Coraz częściej mówi się o rozszerzaniu klasycznego układu RAA, poza komponentami klasycznymi obecnie do układu zaliczane są również cząsteczki zgrupowane w trzy odmienne osie takie jak ACE-2/Ang(1-7)/receptor Mas; prorenina/PRR/kinaza ERK1/2 oraz Ang-4/AGTR-4/IRAP [Zhuo i wsp., 2013].

Kinazy MAP regulują odpowiedź komórek na zmiany warunków środowiska, na przykład w ich adaptacji do ischemii lub hipoksji. Biorą również udział w procesach

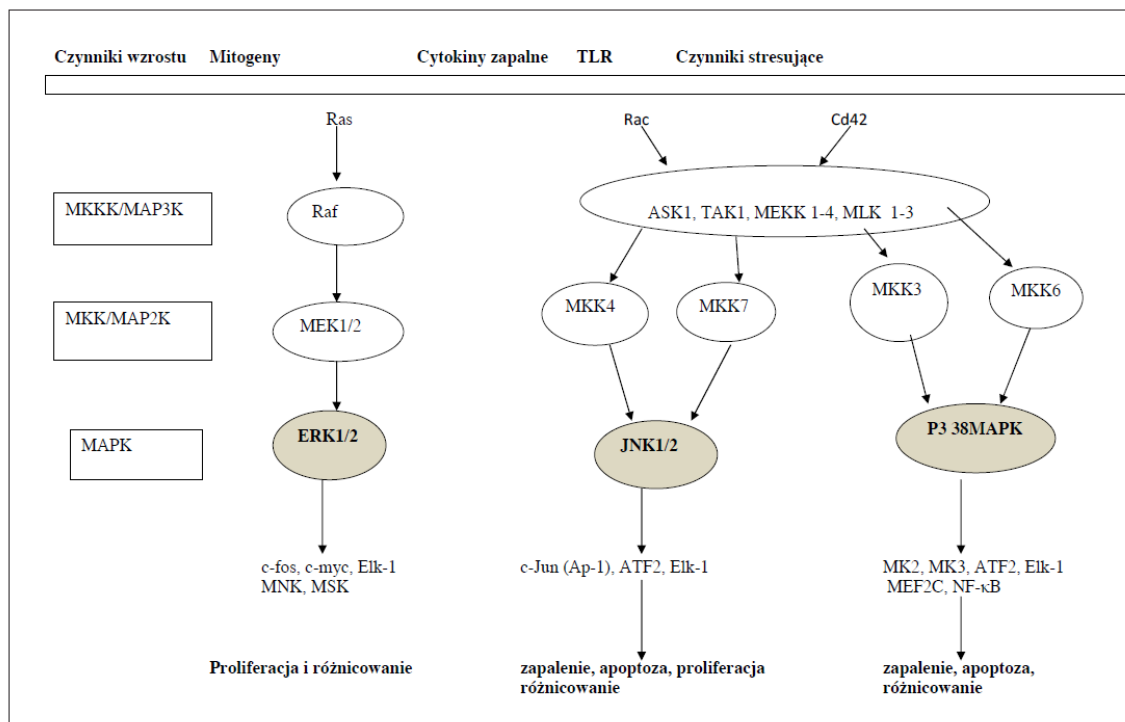
przerostu i rozwoju niewydolności serca. Szczególnie dobrze udokumentowane w tym zakresie jest działanie kinazy ERK1/2 [Petrich & Wang, 2004].

## 5. KINAZA P38

Dotychczas zidentyfikowano u ssaków cztery izoformy białka p38 (alfa, beta, gamma i delta), każda z nich posiada inne wzory ekspresji tkankowej [Saba-El-Leil i wsp., 2016]. Izoformy p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  występują w większości różnych typów komórek, natomiast izoformy p38 $\gamma$  i p38 $\delta$  ulegają ekspresji w specyficznych komórkach i tkankach. Po aktywacji działaniem stresu środowiskowego lub cytokin zapalnych, kinaza p38 $\alpha$  stymuluje, adekwatną do sygnału odpowiedź biologiczną komórki [Cai i wsp., 2006; Cuenda & Rousseau, 2007; Harada i wsp., 2014]. Aktywacja kinazy p38 wymaga fosforylacji, która indukuje zmiany konformacyjne pozwalające na interakcję z substratem. Udział różnych aktywatorów p38 $\alpha$  zależy od stresu/bodźca, jak również od typu komórki. Na określone wyniki działania p38, podobnie jak innych kinaz, ma wpływ nie tylko aktywacja, ale także ważną rolę odgrywa dezaktywacja. Za najważniejsze aktywatory p38 MAPK uznaje się MKK3 oraz MKK6 i MKK4, które z kolei są aktywowane przez MKKK takie jak TAK1, MEKK 1-4 i ASK1. Kinaza p38, podobnie jak wszystkie kinazy MAP, uczestniczy w szlaku sygnalizacyjnym przebiegającym w trójpoziomowej aktywacji kolejnych enzymów [Raman i wsp., 2007]. Bodziec zewnętrzny powoduje fosforylację kinazy MKKK/MAP3K, która aktywuje kinazy MAPKK lub MAP2K czy MKK, aktywujące MAPK i następuje regulacja fizjologii komórki. Kinazami kinaz aktywujących p38 MAPK mogą być białka MEKK 1-4 – kinazy MEK1-4 (MEK kinase 1-4), TAK 1 (transforming growth factor-activated kinase 1) czy ASK 1 (apoptosis signal regulating kinase). Głównymi MKK dla białka p38 są kinazy MKK3 i MKK6. Inna kaskada reakcji prowadząca do

aktywacji kinazy p38 wiąże się z białkami GTP z rodziny Rho (Cd42 i Rac1). Zaktywowany enzym p38 fosforyluje, a tym samym aktywuje inne kinazy, jak MAPKAPK 2 i 3 (MAP kinase activated protein kinase), zwane również MK2 i MK3 czy też MNK i MSK i wiele czynników transkrypcyjnych, włączając w to ATF2, MEF2C (monocyte enhancer factor 2 C), Elk-1, p53, NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) i inne. Funkcjonalną konsekwencją aktywacji kaskady kinazy p38 jest regulacja cyklu komórkowego, apoptozy i różnicowania oraz procesu zapalnego [Cuschieri & Maier, 2005; Zarubin & Han, 2005].

**Ryc. 3.** Schemat przedstawiający kaskadę przekazywania sygnału przez kinazy MAP [Bryk i wsp., 2014].



Niektóre aktywatory szczególnie silnie aktywują szlak p38 MAPK, który odgrywa istotną rolę w regulacji przeżycia i różnicowania komórek, czy też w procesach reakcji immunologicznych. Dotychczasowe badania dostarczyły ważnych



informacji związanych z regulacją aktywności białka p38 $\alpha$  i jego funkcji w organizmie. Wykazano, że ta kinaza może uczestniczyć w utrzymaniu homeostazy tkanek, oraz w niektórych stanach patologicznych, w tym w chorobach naczyniowo-sercowych, nowotworach czy procesach zapalnych [Cuenda i Rousseau 2007]. Liczne doniesienia wskazują, że kinaza MAP p38 jest aktywowana przez szereg cytokin prozapalnych, i że jej aktywacja skutkuje rekrutacją i uwolnieniem dodatkowych cytokin prozapalnych. Na tej podstawie uważa się, że p38 odgrywa kluczową rolę w licznych szlakach sygnalizacyjnych zaangażowanych w inicjację i utrzymanie stanu zapalnego w wielu stanach patologicznych [Chung, 2011]. Tę hipotezę potwierdzają dane kliniczne pokazujące redukcję różnych czynników stanu zapalnego u pacjentów leczonych za pomocą inhibitorów kinazy p38 MAP [Lee & Dominguez, 2005; Smith i wsp., 2006], a także wyniki badań doświadczalnych [Underwood i wsp., 2000; Nath i wsp., 2006].

Sugeruje się również możliwość udziału p38 MAPK w braku wrażliwości komórek na kortykosteroidy poprzez obniżenie powinowactwa receptora glukokortykoidów (GR) w jądrze [Irusen i wsp., 2002; Mercado i wsp., 2011].

Doniesienia dotyczące kinaz MAP wskazują, że mogą one odgrywać ważną rolę w patogenezie chorób układu krążenia. Kinazy te mogą być zaangażowane w aktywację procesów zapalnych i komórek śródbłonna, proliferację komórek mięśni gładkich, rekrutację makrofagów i monocytów [Libby, 2006; Libby i wsp., 2011].

Kinaza p38 MAPK pośredniczy w upośledzaniu, zależnej od tlenku azotu, wazodylatoryjnej funkcji śródbłonna. Dowiedziono również, że na skutek aktywacji p38 MAPK, CRP hamuje tę funkcję śródbłonna [Qamirani i wsp., 2005]. Natomiast, hamowanie tej kinazy, skutkuje przywróceniem, zależnej od tlenku azotu, relaksacji ścian naczyń u szczurów z nadciśnieniem [Ju i wsp., 2003].

Badania przeprowadzone przez zespół Nakagami dowiodły, że kinaza p38 poprzez aktywację kaspazy 3 i białka bax odpowiada za apoptozę komórek śródbłonka [Nakagami i wsp., 2001]. Ponadto udokumentowano, że związek homocysteiny z kinazą p38 może indukować apoptozę komórek śródbłonka. Zgodnie z treścią tych badań, homocysteina wzmacnia wytwarzanie reaktywnych form tlenu aktywujących kinazę p38 [Bao i wsp., 2009].

Pacjentów borykających się z chorobami sercowo-naczyniowymi charakteryzuje zredukowana ilość progenitorowych komórek śródbłonka (endothelial progenitor cells - EPC), które pełnią ważną rolę w angiogenezie i naprawie uszkodzonego naczynia [Hill i wsp., 2003; Seeger i wsp., 2010]. Progenitorowe komórki śródbłonka od osób borykających się z chorobami sercowo-naczyniowymi charakteryzują się wyższymi poziomami fosforylacji kinazy p38 niż EPC od osób zdrowych [Seeger i wsp., 2010].

Dane z niektórych badań klinicznych pokazują korzystne zmiany w przebiegu i aktywności choroby u pacjentów leczonych inhibitorami kinazy p38 MAP, co może wiązać się z zahamowaniem rekrutacji i uwalniania cytokin prozapalnych [Kumar i wsp., 2003].

## **6. ODDZIAŁYWANIE CACYBP/SIP Z MAPK**

### **6.1. CacyBP/SIP jako fosfataza dla ERK1/2**

Niedawno odkryto, że kinaza ERK1/2 jest ligandem białka CacyBP/SIP, które poprzez defosforylację tej kinazy moduluje aktywność transkrypcyjną Elk-1 [Kilańczyk i wsp., 2009, 2011]. Okazuje się, że ERK1/2 i białko S100A6 konkurują o interakcję z CacyBP/SIP, ponieważ mają wspólne miejsce wiązania, zlokalizowane w obrębie C-końcowej domeny CacyBP/SIP. Badania wykazały, że modyfikacja kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 217 CacyBP/SIP, wysoce zmniejsza możliwość

wiązania się tego białka z kinazą ERK1/2, co może wskazywać na elektrostatyczną specyfikę oddziaływania CacyBP/SIP-ERK1/2 [Kilańczyk i wsp., 2015; Rosińska i wsp., 2016]. Białko CacyBP/SIP wykazuje dużą zgodność w strukturze pierwszorzędowej do fosfataz z rodziny MKP (ang. MAP kinase phosphatases). Sekwencja CacyBP/SIP charakteryzuje się dwoma motywami KIM (ang. kinase interaction motif), które oddziałują z kinazami. Jeden z nich jest usytuowany w obrębie domeny C-końcowej, natomiast drugi w obrębie N-końcowej. Badania dowodzą, że do pełnej aktywności fosfatazowej CacyBP/SIP konieczne są oba motywy [Topolska-Woś i wsp., 2015]. Interesującym wydaje się całkowity zanik aktywności białka CacyBP/SIP jako fosfatazy względem ERK1/2, na skutek zamiany lizyny w pozycji 25 oraz argininy w pozycji 26 wchodzących w skład N-końcowego motywu KIM. W obrębie tego samego motywu KIM zlokalizowane są reszty, które odpowiadają za tworzenie dimeru CacyBP/SIP, co wskazuje na związek pomiędzy dimeryzacją a aktywnością fosfatazową tego białka [Topolska-Woś i wsp., 2015]. Natomiast motyw KIM znajdujący się w obrębie C-końcowej domeny CacyBP/SIP, jest zbieżny z miejscem wiązania białek S100, co tłumaczy współzawodnictwo pomiędzy ERK1/2 a S100A6 o wiązanie się z CacyBP/SIP [Kilańczyk i wsp., 2009; 2011]. Warto podkreślić, że oprócz S100A6 również modyfikacje potranslacyjne, a w szczególności fosforylacja, pełnią istotną funkcję w regulowaniu aktywności fosfatazowej białka CacyBP/SIP. Pozytywny wpływ na aktywność fosfatazową CacyBP/SIP ma fosforylacja reszt seryny w pozycji 22 i treoniny w pozycji 23 przez kinazę białkową C [Kilańczyk i wsp., 2012]. Antagonistyczny efekt ma fosforylacja reszty treoniny w pozycji 184 przez kinazę kazeinową II. Co ciekawe, mutant białka CacyBP/SIP, który naśladował fosforylację w tej pozycji (CacyBP/SIP-T184E) charakteryzował się niższą aktywnością fosfatazową wobec ERK1/2 aniżeli CacyBP/SIP typu dzikiego [Wasik

i wsp., 2016]. Ostatnie wyniki badań wskazują, że CacyBP/SIP może uczestniczyć w procesach odpowiedzi na stres oksydacyjny, a także w szlakach sygnałowych zaangażowanych w rozwój wielu nowotworów, co może być związane z defosforylacją ERK1/2 [Kilańczyk i wsp., 2011, 2012].

### **6.2. CacyBP/SIP jako fosfataza dla p38**

Z najnowszych doniesień literaturowych wynika, że środkowa domena CS CacyBP/SIP jest odpowiedzialna za defosforylację kinazy p38. Wiązanie i defosforylacja tej kinazy przez CacyBP/SIP wykazuje dużą specyficzność i dokładność, ze względu na defosforylację w pętli aktywacyjnej, związanej z główną aktywnością kinazy p38 [Topolska-Woś i wsp., 2017]. Badania przeprowadzone na komórkach NB2a narażonych na działanie stresu oksydacyjnego dowiodły, że defosforylacja kinazy p38 przez białko CacyBP/SIP jest bardziej skuteczna niż w komórkach grupy kontrolnej. Szlak sygnałowy z udziałem kinazy p38 bierze udział w ścieżkach przesyłania sygnału, które odpowiadają za przeżywalność i śmierć komórek. Wobec tego białko CacyBP/SIP, wiążąc i defosforylując kinazy ERK1/2 i p38, reguluje ścieżki przekazywania sygnału odpowiadające za różnicowanie, proliferację lub śmierć komórki. Dotychczasowe badania dostarczyły wyników potwierdzających bezpośredni lub chociażby pośredni udział CacyBP/SIP w organizacji cytoszkieletu w warunkach fizjologicznych, jak również w stanach różnych patologii. Dane literaturowe wskazują na bezpośrednią interakcję CacyBP/SIP z podstawowymi białkami cytoszkieletu, takimi jak tubulina, aktyna czy tropomiozyna. Warta uwagi jest również możliwość wiązania jednocześnie dwóch tego typu białek, co sugeruje rolę CacyBP/SIP jako łącznika poszczególnych struktur cytoszkieletu. Regulując aktywność białka tau i kinazy ERK1/2 oraz p38, CacyBP/SIP pełni pośrednią funkcję w reorganizacji cytoszkieletu [Pullikuth & Catling, 2007]. Poprzez udział CacyBP/SIP

jako fosfatazy regulującej kinazy ERK1/2 i p38 staje się to białko istotnym elementem szlaków sygnałowych związanych z przeżyciem komórek lub ich apoptozą [Filipek & Leśniak, 2018].

## II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

CacyBP/SIP jest niedawno odkrytym, w laboratorium Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, wielofunkcyjnym białkiem, a ostatnie badania tego Zespołu pokazały, że wykazuje ono również aktywność fosfatazową. Oddziaływanie CacyBP/SIP z ERK1/2 i p38, a zatem regulacja aktywności i wewnątrzkomórkowej lokalizacji tych kinaz może mieć istotny udział w szlakach sygnałowych związanych z patogenezą nadciśnienia.

Celem zaplanowanych badań było wykazanie działania białka CacyBP/SIP w roli fosfatazy dla kinazy ERK1/2 i p38 w różnym typie nadciśnienia. Jako model nadciśnienia samoistnego wykorzystano szczury SHR, a nadciśnienia wtórnego model DOCA-salt.

Założony cel realizowano poprzez:

1. Immunohistochemiczną identyfikację i lokalizację CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym oraz odpowiadającym im grupom kontrolnym.
2. Ocenę porównawczą immunoreaktywności CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach badanych grup szczurów.
3. Ocenę ekspresji genów *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1* i *Mapk14* za pomocą metody RT-qPCR u szczurów normotensyjnych i nadciśnieniowych.

### III. MATERIAŁ I METODY

#### 1. MODEL DOŚWIADCZENIA

Założenia, cel i plan badania oraz podejście do zwierząt zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku.

Materiał biologiczny stanowiły nadnercza pobrane od szczurów pochodzących z Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Uchwała nr 73/2015).

Doświadczenia przeprowadzono na 24 szczurach, samcach rasy Wistar, normotensyjnych oraz z doświadczalnym nadciśnieniem spontanicznym i wtórnym. Masa ciała szczurów na początku eksperymentu wynosiła 170-200 g. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) i wilgotności ( $60 \pm 5\%$ ) z zachowaniem rytmu snu i czuwania (12 godzin światła i 12 godzin ciemności) i miały stały dostęp do standardowej paszy granulowanej oraz wody pitnej. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono o tej samej porze dnia.

Zwierzęta podzielono na dwie grupy kontrolne i dwie grupy doświadczalne z wywołanym nadciśnieniem tętniczym:

- |                  |  |
|------------------|--|
| <b>WKY</b>       | pięć normotensyjnych szczurów Wistar, stanowiących grupę kontrolną, dla szczurów SHR   |
| <b>SHR</b>       | siedem szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem układowym, szczep wsobny wyhodowany ze szczurów rasy Wistar wyselekcjonowanych pod kątem wysokiego ciśnienia krwi. |
| <b>UNX</b>       | pięć szczurów Wistar poddanych uninefektomii, grupa kontrolna dla szczurów z nadciśnieniem DOCA-salt.  |
| <b>DOCA-salt</b> | siedem szczurów rasy Wistar, z doświadczalnie wywołanym nadciśnieniem wtórnym  |

### ***1.1. Wywołanie doświadczalnego nadciśnienia DOCA-salt***

Zwierzęta znieczulano przez dootrzewnowe wstrzyknięcie pentobarbitalu sodu (300  $\mu\text{mol}$  lub  $\sim 70$  mg/kg masy ciała). Przez prawe boczne nacięcie brzucha szczurom usunięto prawą nerkę. Po jednotygodniowym okresie rekonwalescencji indukowano nadciśnienie poprzez iniekcje DOCA (67  $\mu\text{mol}$  lub  $\sim 25$  mg/kg w 0,4 ml/kg dimetyloformamidu; DMF) dwa razy w tygodniu przez okres miesiąca oraz zastąpienie wody pitnej 1% roztworem NaCl.

### ***1.2. Pomiar ciśnienia krwi metodą pośrednią u szczura czuwającego***

Po 6 tygodniach eksperymentu u wszystkich zwierząt mierzono skurczowe ciśnienie tętnicze za pomocą nieinwazyjnej metody z mankietem na ogon (przy użyciu ciśnieniomierza Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Niemcy). Pomiar ciśnienia krwi uznano za ważne tylko wtedy, gdy trzy kolejne odczyty nie różniły się o więcej niż 5 mmHg. Następnie z trzech otrzymanych odczytów wyciągnięto średnią wartość. Pomiar ciśnienia krwi wykazały nadciśnienie skurczowe u szczurów SHR i DOCA-salt (zwierzęta te miały wartości SBP równe lub wyższe niż 150 mmHg).

## **2. BADANIA HISTOLOGICZNE**

### ***2.1. Sposób pobierania i utrwalenie materiału do badań***

Po sześciu tygodniach trwania doświadczenia, w głębokim znieczuleniu pentobarbitalem (50 mg/kg masy ciała) od badanych zwierząt pobrano nadnercza i umieszczono w 10% zbuforowanej formalinie. Po utrwaleniu przeprowadzono do bloczków parafinowych w rutynowy sposób. Za pomocą mikrotomu saneczkowego MICROM 440 E Zeiss bloczki krojono na 4  $\mu\text{m}$  grubości skrawki i naklejano na adhezyjne szkiełka podstawowe.



## **2.2. Stosowane barwienia immunohistochemiczne**

Na skrawkach parafinowych wykonano reakcje immunohistochemiczne mające na celu wykrycie określonych antygenów w nadnerczach badanych szczurów. W badaniach zostały zastosowane swoiste przeciwciała skierowane przeciwko CacyBP/SIP, p-ERK1/2 oraz p-p38. Równocześnie przeprowadzano reakcje kontrolne. W kontroli negatywnej pominięto specyficzne przeciwciało i zastąpiono je buforem do rozcieńczeń Antibody Diluent (S 0809 Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark). Kontrola pozytywna polegała na przeprowadzeniu reakcji z przeciwciałem pierwotnym na odpowiednim materiale tkankowym zalecanym przez producenta (Tabela 3).

Zastosowane przeciwciała:

- Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciw białku CacyBP/SIP (Nr kat. ab190950; Abcam, Discovery Drive, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, UK)
- Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciw p-ERK1/2 (Nr kat. 44-680G; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451)
- Królicze poliklonalne przeciwciało skierowane przeciw p-p38 (Nr kat. 44-684G; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451)

Wszystkie przeciwciała dają reakcję krzyżową u szczura.

**Tabela 3.** Odczynniki wykorzystane w reakcjach immunohistochemicznych oraz warunki przeprowadzania reakcji.

| Lp. | p/ciało    | Rozcieńczenie | inkubacja czas/ temp. | Bufor odsłaniający antygen / nr katalogowy              | Zestaw detekcyjny   | Czas inkubacji z polimerem | Kontrola dodatnia |
|-----|------------|---------------|-----------------------|---|---|----------------------------|-------------------|
| 1.  | CacyBP/SIP | 1 : 600       | 24 h / +4°C           | Target Retrieval Solution Citrate pH=6,0 (S 2369; Dako) | Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (K50071; Dako) | 1 godz.                    | Wątroba szczurza  |
| 2.  | p-ERK1/2   | 1 : 50        |                       |   |   |                            | Mysi żołądek      |
| 3.  | p-p38      | 1 : 50        |                       |   |   |                            | Serce szczurze    |

### **2.3. Procedura przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznej**

1. Skrawki parafinowe, które zostały wcześniej naklejone na adhezyjne szkiełka podstawowe (Menzel Gläser Ultra Plus MZ-J3800AMNZ; Braunschweig, Germany) umieszczono w cieplarni nagrzanej do temperatury 37°C na 20 godzin. Następnie przed odparafinowaniem na 1 godzinę w temperaturze 58 °C.
2. Skrawki parafinowe poddano odparafinowaniu i uwodnieniu zgodnie ze standardową procedurą:
  - Ksylen I, II, III - po 10 minut każdy
  - Ksylen + alkohol etylowy 99,8% (1:1) - 5 minut
  - Alkohol etylowy 99,8% I i II - po 4 minuty każdy
  - Alkohol etylowy 95% I i II - po 4 minuty każdy
  - Alkohol etylowy 70% - 10 minut
  - Woda destylowana - 3 x 5 minut
3. W celu odsłonięcia determinant antygenowych, przygotowane preparaty przeniesiono do odpowiedniego buforu (Tabela 3) i umieszczono w komorze ciśnieniowej Pascal. Antygeny odmaskowywano w 125 °C, pod ciśnieniem

137,9 kPa w czasie 1 minuty. Kolejnym etapem było schłodzenie preparatów do temperatury pokojowej i kilkukrotne przepłukanie wodą destylowaną.

4. Skrawki obrysowano DakoPenem, tworzącym hydrofobową barierę dla wykorzystanych odczynników czyli blokera peroksydazy, chromogenu oraz przeciwciał I- i II-rzędowych. Pozwoliło to na utrzymanie użytych odczynników w odpowiednim miejscu na szkiełku.
5. Preparaty inkubowano przez 10 minut w REAL Peroxide Blocking Reagent Solution (S2023 Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark) w celu zablokowania peroksydazy tkankowej.
6. Płukano w wodzie destylowanej - 3 x 5 minut.
7. Następnie preparaty płukano w dziesięciokrotnie rozcieńczonym buforze Wash Buffer (S3006 Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark) - 3 x 5 minut.
8. Preparaty osuszono, a następnie inkubowano w komorze wilgotnej z przeciwciałami I-rzędowymi, postępując zgodnie z warunkami przedstawionymi w Tabeli 3. Przeciwciała rozcieńczono w Antibody Diluent (S 0809 Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark).
9. Płukano w Wash Buffer - 3 x 5 minut.
10. Inkubowano z przeciwciałem II- rzędowym – polimerem znakowanym peroksydazą chrzanową, związanym z kozimi immunoglobulinami przeciw króliczymi i przeciw mysimi (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse; K50071; Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark) – Tabela 3.
11. Płukano w Wash Buffer - 3 x 5 minut.

12. W celu wizualizacji powstałego kompleksu inkubowano przez 1 minutę w roztworze chromogenu 3,3'-dwuaminobenzydyny (DAB). Reakcję kontrolowano pod mikroskopem.
13. W celu zatrzymania barwnej reakcji kilkakrotnie płukano w wodzie destylowanej.
14. Skrawki wybarwiono hematoksyliną QS (H - 3404 Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) aby skontrastować obraz.
15. Płukano w wodzie destylowanej - 3 x 2 minuty.
16. Odwodnienie i prześwietlenie skrawków:
  - Alkohol etylowy 70% - 3 minuty
  - Alkohol etylowy 95% I i II - po 3 minuty każdy
  - Alkohol etylowy 99,8% I i II - po 2 minuty każdy
  - Alkohol etylowy 99,8% i ksylene (1:1) - 5 minut
  - Ksylen I, II i III - po 10 minut każdy
17. Preparaty zamknięto w balsamie Entellan firmy Merck.

Wyniki reakcji immunohistochemicznych oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus BX43, zwracając szczególną uwagę na komórki wykazujące pozytywną reakcję immunohistochemiczną i ich lokalizację w poszczególnych częściach nadnerczy.

### **3. OCENA STOPNIA INTENSYWNOŚCI REAKCJI**

#### **IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ**

Ocena rezultatów przeprowadzonych reakcji immunohistochemicznych oraz dokumentacja fotograficzna zostały wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX43, sprzężonego z kamerą cyfrową, połączonego z komputerem wyposażonym w program do analizy obrazu NIKON NIS-Elements Advanced Research.

Przy użyciu mikroskopu świetlnego wyposażonego w tor wizyjny i program morfometryczny wykonano, w jednakowych warunkach (powiększenie x200 oraz jednakowa intensywność oświetlenia), dokumentację fotograficzną. W celu określenia stopnia intensywności reakcji, w komórkach z pozytywnym wynikiem reakcji, mierzono średnią gęstość optyczną badanych obiektów. Pomiarów dokonano w skali szarości od 0 do 256, gdzie wartość 0 oznacza piksel całkowicie biały, natomiast 256 całkowicie czarny.

### **4. IZOLACJA RNA**

Pobrane od badanych szczurów nadnercza umieszczono w roztworze RNA-later (AM7024 Thermo Fischer 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451) i zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Całkowite RNA izolowano wykorzystując komorę z laminarnym przepływem powietrza. Przestrzegając czasu i temperatury inkubacji, postępowano zgodnie z procedurą izolacji RNA dołączoną do zestawu firmy Macherey – Nagel. Całkowite RNA eluowano 35  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz, wykorzystując do tego nową sterylną probówkę typu eppendorf. Następnie w badaniu wykorzystano spektrofotometr Thermo Scientific NanoDrop 2000, który pozwolił na sprawdzenie stężenia i jakości wyizolowanego całkowitego RNA, nanosząc 1  $\mu\text{l}$  wyeluowanego RNA, sprawdzano

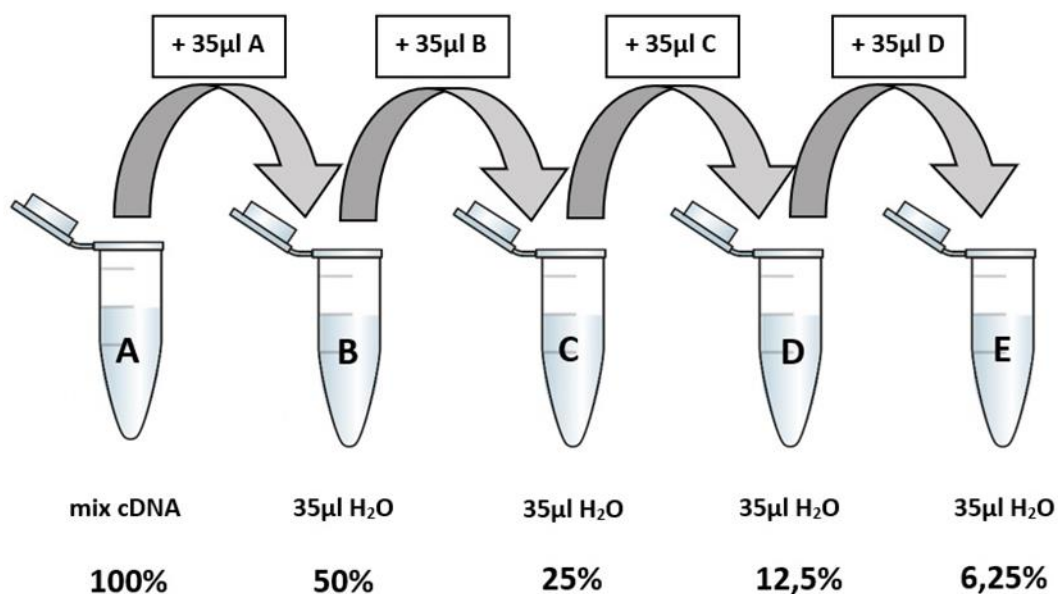
absorbancję zarówno przy długości fali 260nm jak i 280nm. Jako próby ślepej użyto wolnej od nukleotydów wody dejonizowanej. Próbkami zakwalifikowanymi do dalszej analizy były te, których stosunek absorbancji przy dł. fali 260nm do absorbancji przy dł. fali 280nm (260/280Ratio) znajdował się w przedziale 1,8 – 2,1.

#### ***4.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji***

Równowartość 1 µg całkowitego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przepisano na cDNA używając iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BIO-RAD), w całkowitej objętości 20µl, zgodnie z dołączoną metodyką. Przeprowadzając reakcję odwrotnej transkrypcji, mieszaninę inkubowano przez 20 minut w 46°C, a następnie przez 1 minutę w 95°C.

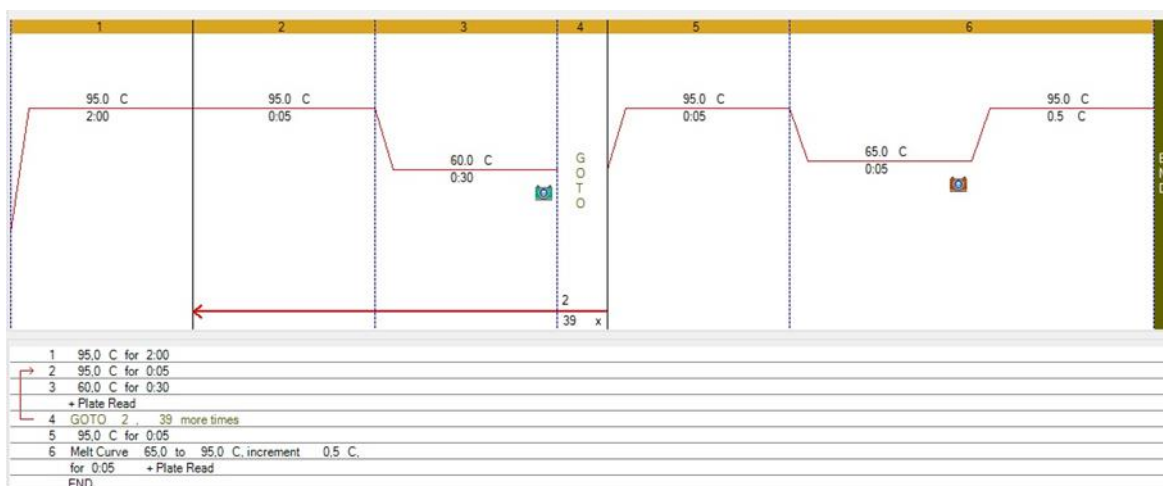
#### ***4.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)***

Reakcję qPCR przeprowadzano w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Wykorzystując qPCR określono względną ilość transkryptów badanych genów w odniesieniu do krzywej standardowej. Jako matrycę do przeprowadzenia reakcji zastosowano cDNA, które uzyskano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Przed przystąpieniem do procedury związanej z przeprowadzeniem reakcji, sporządzono niezależne dla każdego genu krzywe standardowe. W tym celu przygotowano mieszaninę matryc cDNA. Zmieszano 1 µl cDNA każdego ze szczurów, po czym wykonano rozcieńczenia, uzyskując stężenia: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Sposób przygotowania serii rozcieńczeń został zobrazowany na Ryc. 4.



**Ryc. 4.** Przygotowanie matrycy do krzywych wzorcowych (Archiwum Zakładu Histologii i Cytofizjologii).

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym została przeprowadzona z wykorzystaniem CFX96 Real-Time System (BIO-RAD Laboratories, Inc.; 1000 Alfred Nobel Drive; Hercules, California 94547 USA) oraz zestawu komercyjnego SsoAdvanced™ Universal SYBER® Green Supermix (BIO-RAD Laboratories, Inc.; 1000 Alfred Nobel Drive; Hercules, California 94547 USA). Reakcję przeprowadzono w 20 µl objętości reakcyjnej w dwóch powtórzeniach dla każdego szczura. Profil termiczny reakcji oraz czas zostały przedstawione na Ryc. 5.



**Ryc. 5.** Profil termiczny. W krokach od 1 do 4 została zobrazowana amplifikacja w czasie rzeczywistym; w 5 i 6 krzywa topnienia produktów PCR (Archiwum Zakładu Histologii i Cytofizjologii).

W badaniu użyto specyficzne primery zaprojektowane przez firmę BIO-RAD Laboratories, Inc.; 1000 Alfred Nobel Drive; Hercules, California 94547 USA. Genem referencyjnym był *Gapdh* (qRnoCID0057018, BIO-RAD), natomiast genami badanymi były: *Cacybp* (qRnoCED0006717, BIO-RAD), *Mapk3* (qRnoCID0002469, BIO-RAD), *Mapk1* (qRnoCID0003206, BIO-RAD) i *Mapk14* (qRnoCID0005775, BIO-RAD).

Aby wykluczyć sygnały fluorescencji pochodzące ze źródeł innych niż produkty reakcji, sporządzono analizę krzywej topnienia reakcji. Polega ona na stopniowym podwyższaniu temperatury mieszaniny i pomiarze fluorescencji co 0,5°C, aż do denaturacji powstałego produktu. W chwili osiągnięcia przez produkt temperatury topnienia dochodzi do denaturacji oraz gwałtownego spadku fluorescencji.

O prawidłowo przeprowadzonej reakcji PCR świadczy wykres krzywej topnienia występujący w postaci jednego pików, przy temperaturze specyficznej dla konkretnego produktu reakcji. Ponadto, aby sprawdzić specyficzność używanych primerów i odczynników do każdej krzywej standardowej dołączono próbę ślepą,



w której matrycę cDNA zastąpiono wodą. Względną ocenę ilościową ekspresji genów określono porównując wartości Ct metodą  $\Delta\Delta Ct$ .

## **5. ANALIZA STATYSTYCZNA**

Wszystkie zebrane dane dotyczące poszczególnych szczurów zgromadzono i przypisano do dwóch grup kontrolnych (WKY, UNX) oraz dwóch badanych (SHR, DOCA-salt). Dla cech mierzalnych wyliczono średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ) i błąd standardowy (SE), a następnie wykorzystując pakiet komputerowy STATISTICA 13.3., wykonano analizę statystyczną przy użyciu jednoczynnikowego testu ANOVA. W celu przeprowadzenia analizy post-hoc użyto testu Najmniejszych Istotnych Różnic Fishera. Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p < 0,05$ .

#### IV. WYNIKI BADAŃ

Nadciśnienie skurczowe stwierdzono u wszystkich szczurów z grup badanych (SHR i DOCA-salt). Średnie wartości BP dla każdej grupy szczurów przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Średnie wartości skurczowego ciśnienia krwi (mmHg) szczurów w grupach kontrolnych i z nadciśnieniem (średnia  $\pm$  SD).

| Model nadciśnienia | Grupa kontrolna | Grupa nadciśnieniowa |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| SHR                | 122.3 $\pm$ 2.3 | 160.8 $\pm$ 3.3*     |
| DOCA-salt          | 126.0 $\pm$ 4.0 | 180.0 $\pm$ 13.0*    |

\*  $p < 0,05$  grupa kontrolna vs. grupa nadciśnieniowa

SHR: model nadciśnienia pierwotnego; DOCA-salt: model nadciśnienia wtórnego

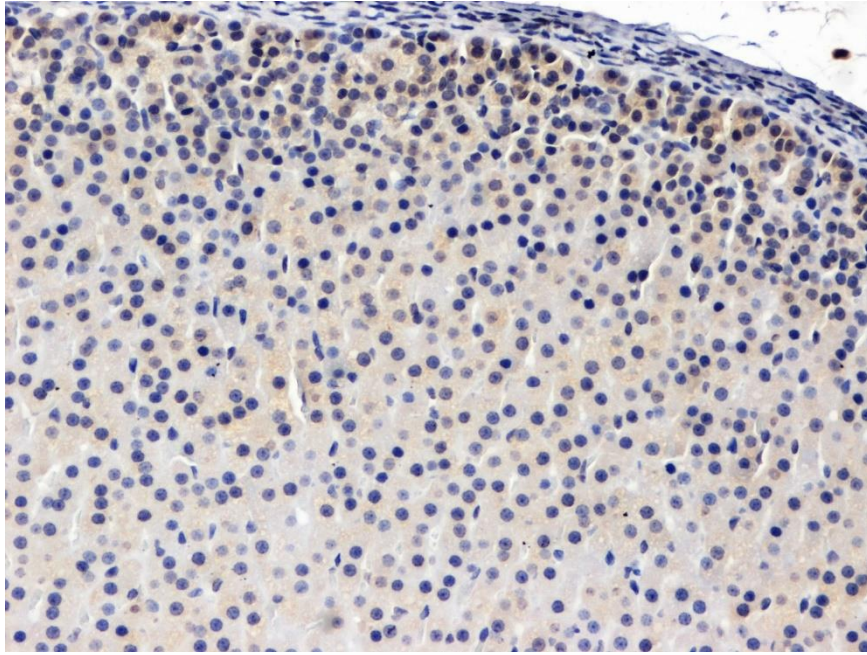
### 1. WYNIKI ZASTOSOWANYCH BARWIEŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

#### 1.1. Immunodetekcja białka CacyBP/SIP

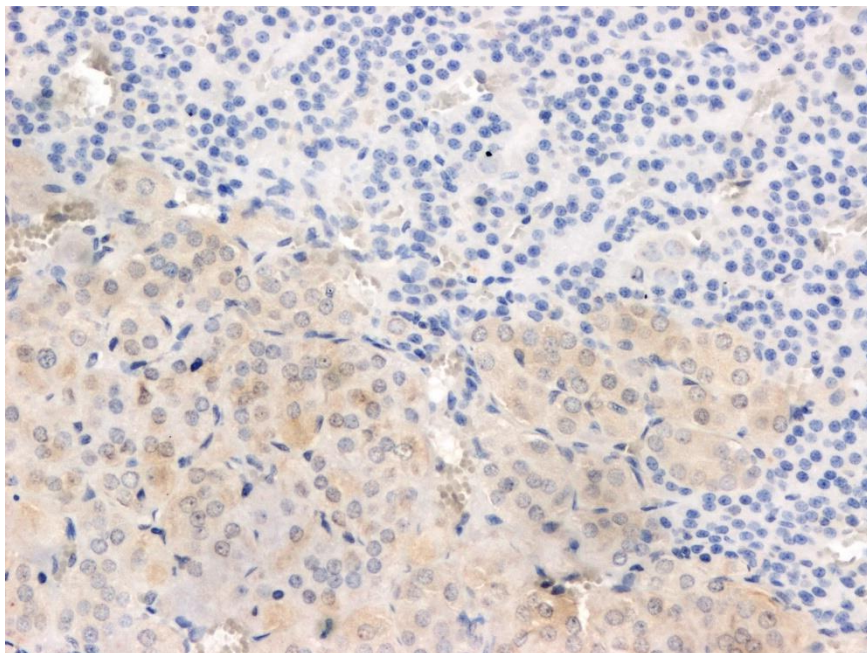
Badania immunohistochemiczne wykazały obecność białka CacyBP/SIP w nadnerczach wszystkich szczurów użytych w doświadczeniu. Natomiast intensywność immunoreaktywności oraz rozmieszczenie struktur zawierających CacyBP/SIP były różne w poszczególnych grupach zwierząt. O pozytywnym wyniku reakcji świadczyło zabarwienie struktur na kolor brązowy, o różnym nasileniu barwy.

#### **Grupa kontrolna WKY**

W nadnerczach szczurów kontrolnych WKY obserwowano pozytywny wynik reakcji z użyciem przeciwciała anti-CacyBP/SIP w całym narządzie. O umiarkowanym nasileniu w korze i nieco słabszym w części rdzennej (Fot. 1 i 2).



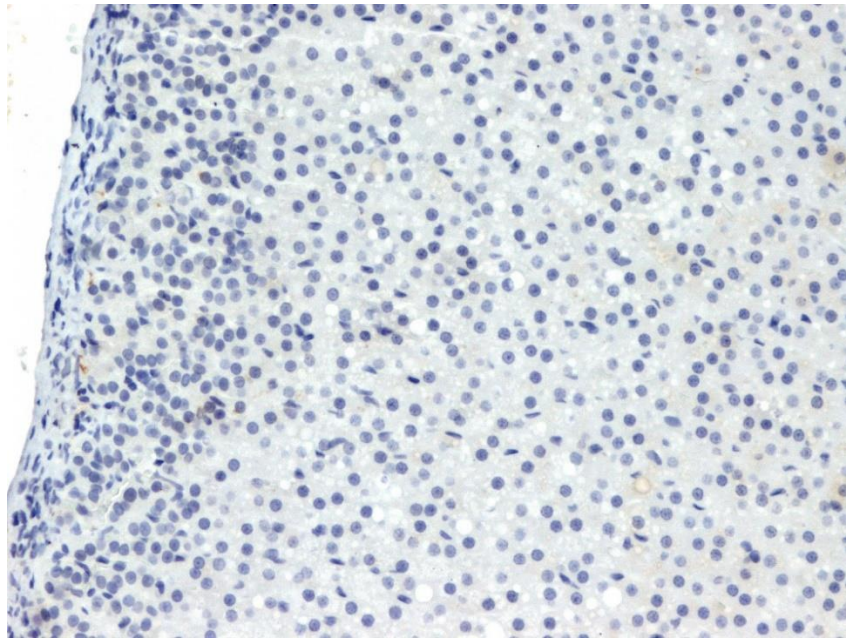
**Fot. 1.** Pozytywny wynik reakcji wykazującej białko CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x200.



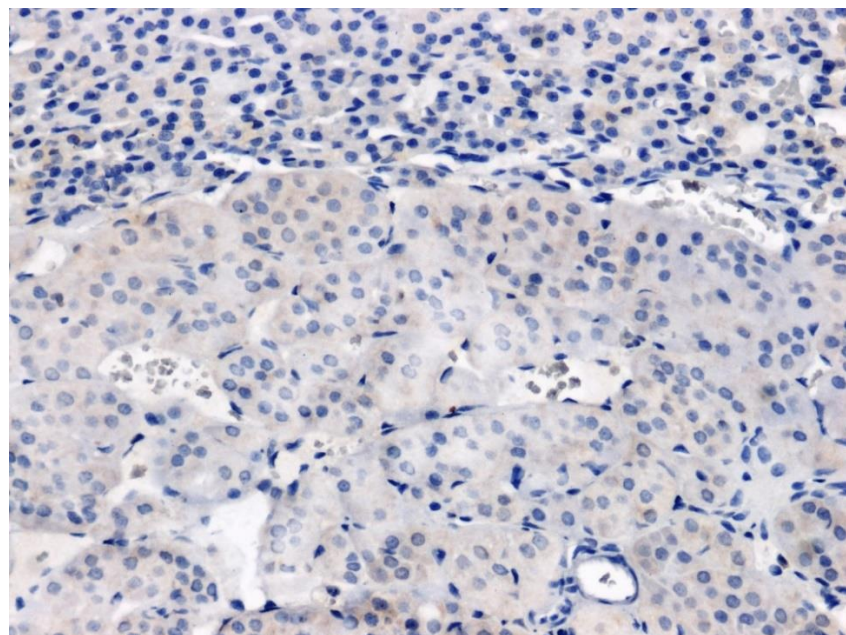
**Fot. 2.** Immunoreaktywność CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x200.

### **Grupa badana SHR**

U szczurów z nadciśnieniem samoistnym stwierdzono znaczne osłabienie immunoreaktywności CacyBP/SIP, zarówno w części korowej jak i rdzennej nadnercza (Fot. 3 i 4), w porównaniu do WKY (Fot. 1 i 2).



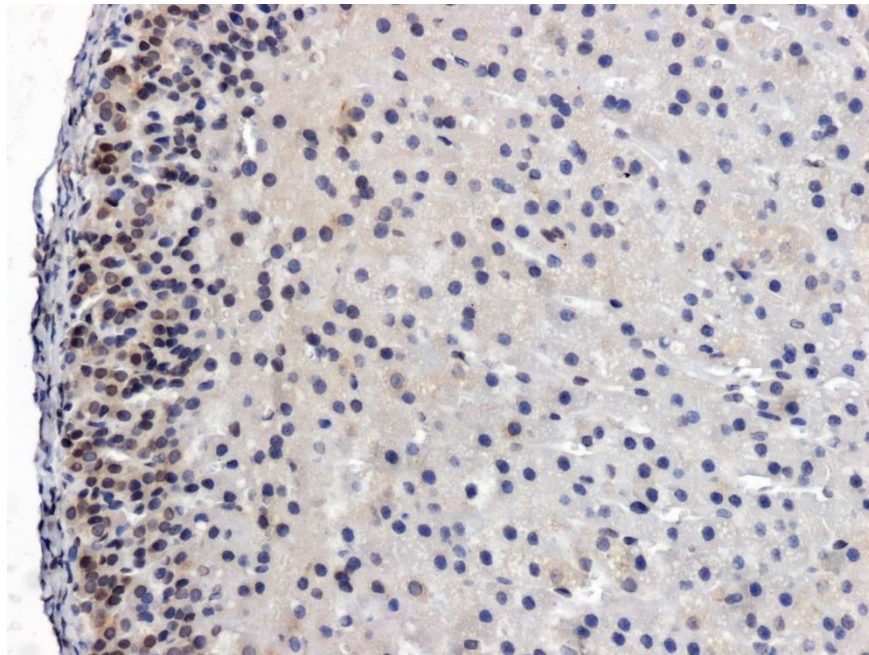
**Fot. 3.** Śladowa immunoreaktywność białka CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem SHR. Pow. x200.



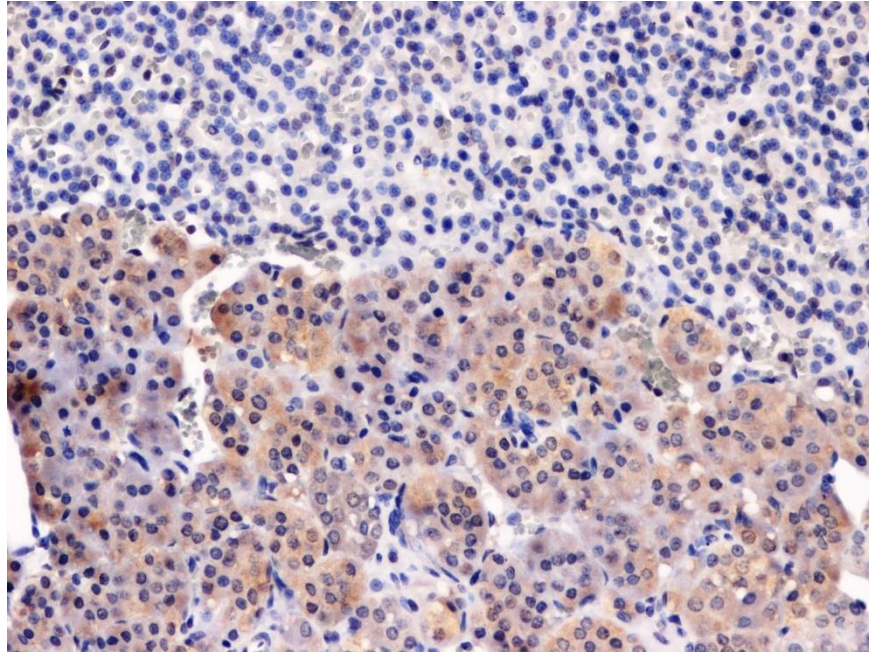
**Fot. 4.** Słabsza immunoreaktywność CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Pow. x200.

### **Grupa kontrolna UNX**

Immunodetekcja CacyBP/SIP wykazała dość silną intensywność reakcji w warstwie kłębuszkowej i słabą w pozostałych warstwach kory nadnerczy szczurów grupy kontrolnej UNX (Fot. 5). Natomiast w rdzeniu tych zwierząt stwierdzono najsilniejszą reakcję (Fot. 6), w odniesieniu do wszystkich badanych szczurów.



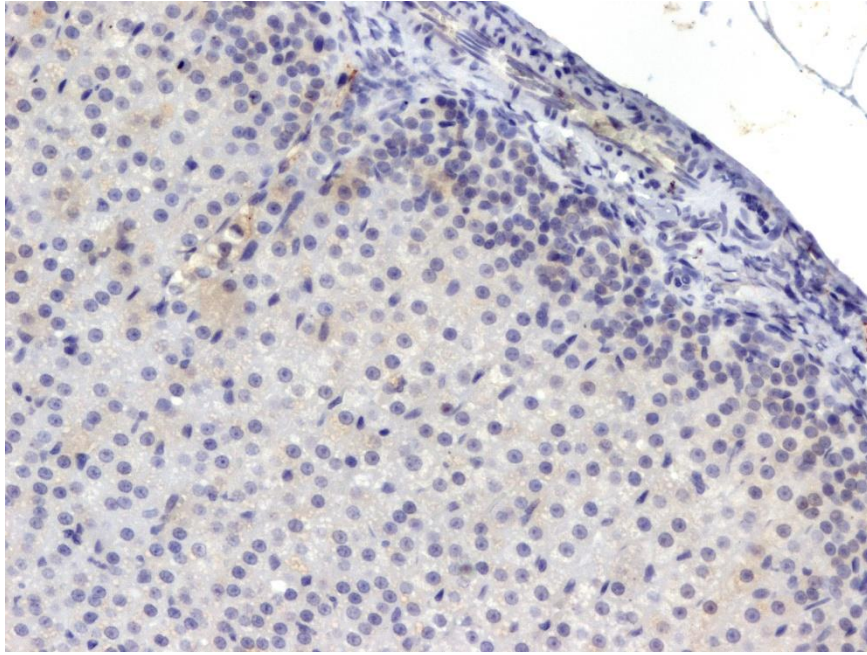
**Fot. 5.** Fragment nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pozytywna reakcja immunohistochemiczna wykazująca białko CacyBP/SIP w korze narządu. Pow. x200.



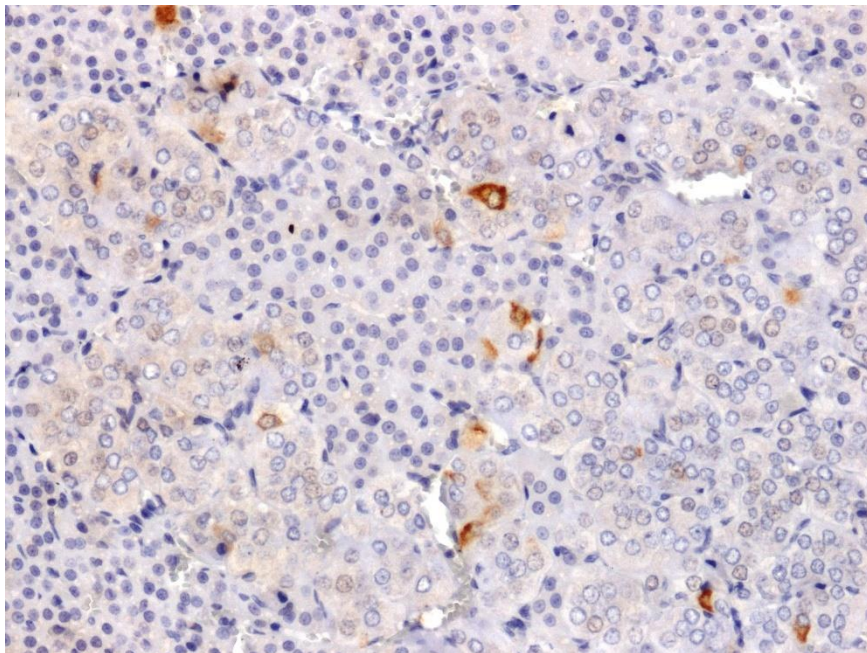
**Fot. 6.** Reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała wykazującego CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x200.

### **Grupa badana DOCA-salt**

W nadnerczach szczurów z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt, CacyBP/SIP-immunododatnie komórki, o słabym do umiarkowanego nasileniu, obserwowano w warstwie kłębuszkowej i pasmowej kory (Fot. 7). Natomiast w części rdzennej narządu tylko w pojedynczych komórkach wykazano obecność CacyBP/SIP. Nasilenie reakcji immunohistochemicznej dla CacyBP/SIP w tych komórkach było dość duże (Fot. 8).



**Fot. 7.** Reakcja immunohistochemiczna przeciwko CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem DOCA-salt. Pow. x200.



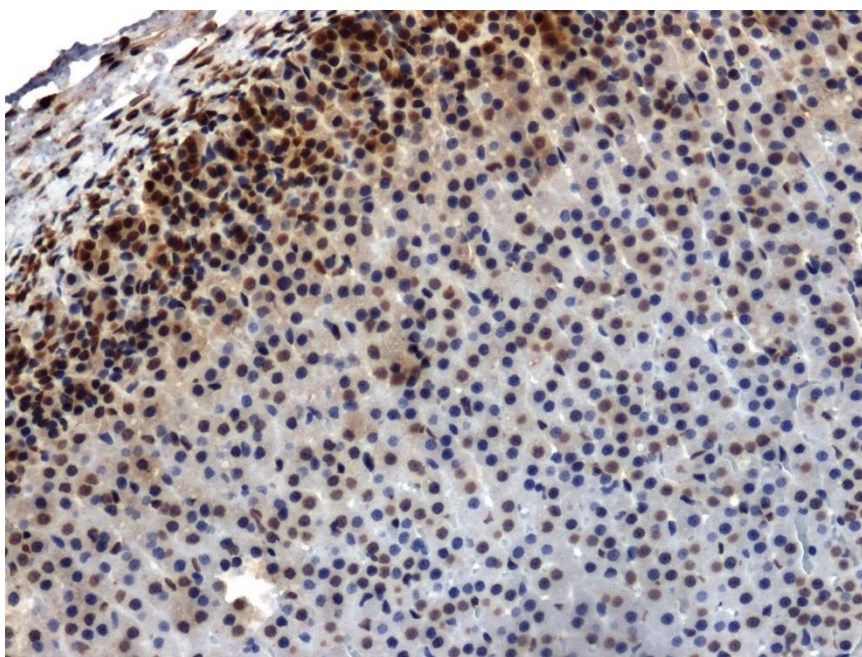
**Fot. 8.** Widoczny pozytywny immunosygnal wykazujący białko CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura z nadciśnieniem DOCA-salt. Pow. x200.

## **1.2. Immunodetekcja p-ERK1/2**

Barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko p-ERK1/2, wykazało obecność tej kinazy w korze i rdzeniu nadnerczy wszystkich badanych zwierząt. Reaktywność immunohistochemiczną dla p-ERK1/2 wykryto głównie w jądrach komórek endokrynowych nadnerczy.

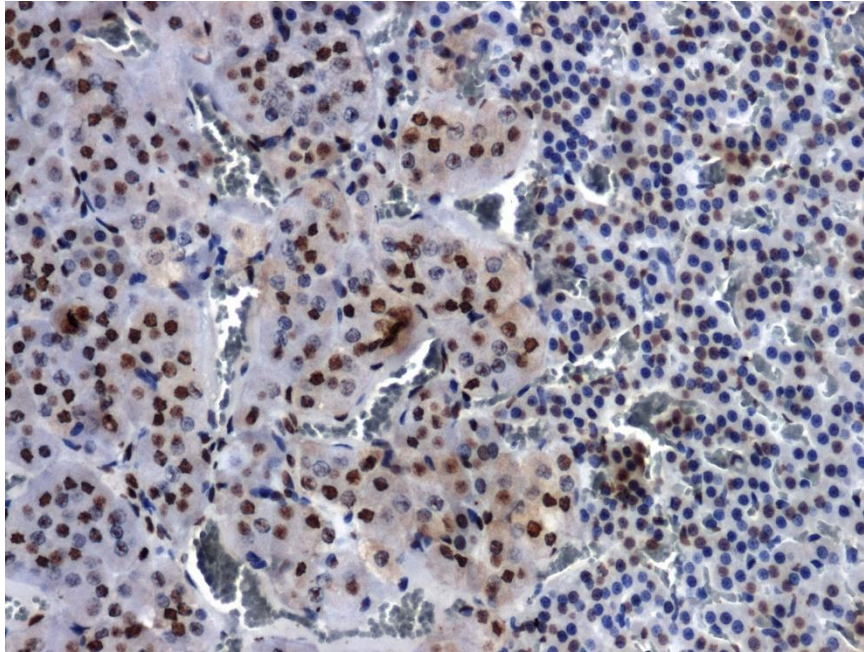
### **Grupa kontrolna WKY**

W korze nadnerczy szczurów normotensyjnych WKY stwierdzono silną jądrową i umiarkowaną cytoplazmatyczną immunoreaktywność p-ERK1/2, szczególnie w warstwie kłębuszkowej oraz jądrową o umiarkowanym nasileniu w części rdzennej (Fot. 9 i 10).



**Fot. 9.** Immunoreaktywność p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x200.

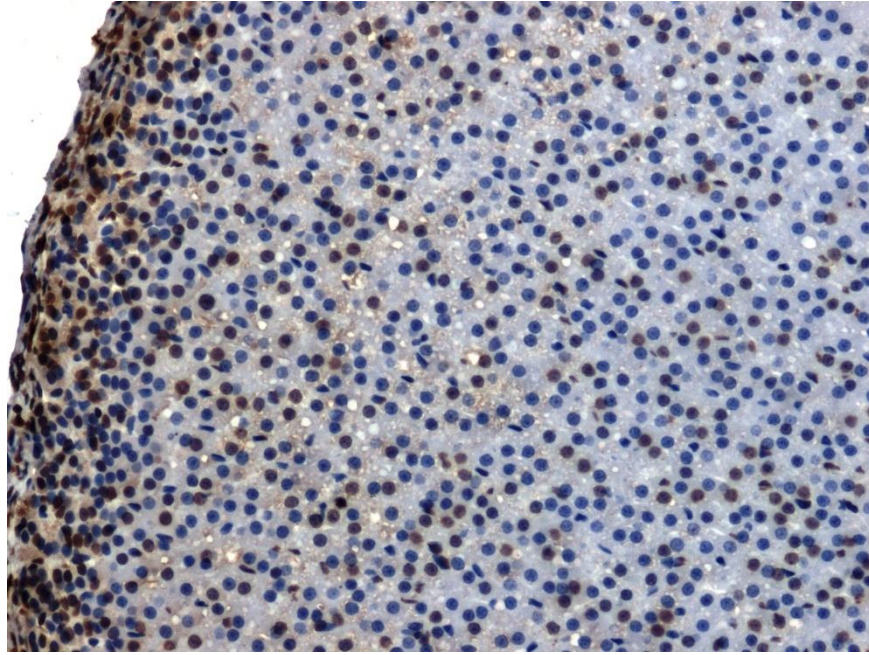




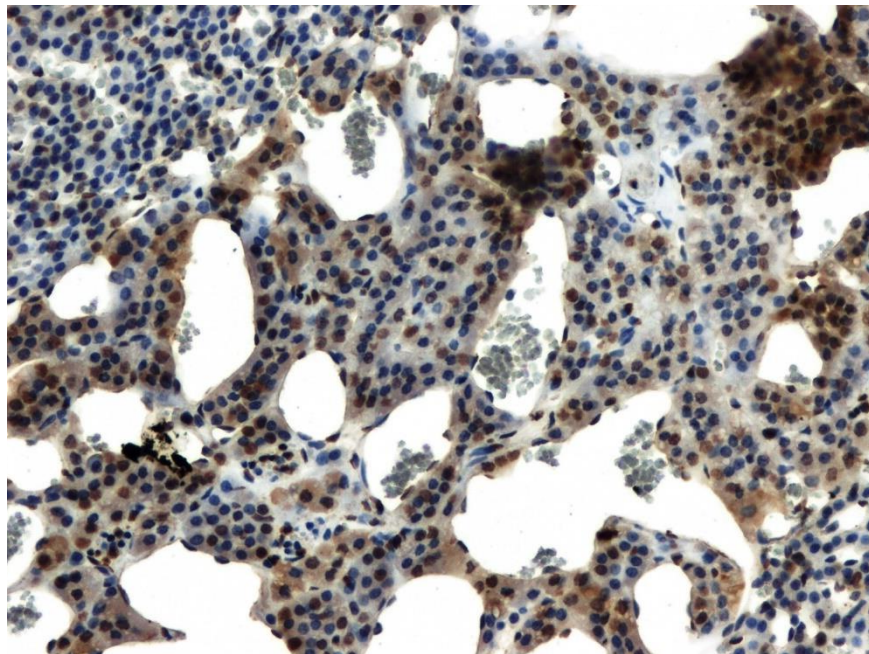
**Fot. 10.** Umiarkowana reaktywność p-ERK1/2 obserwowana w rdzeniu nadnercza szczura normotensyjnego WKY. Pow. x200.

### **Grupa badana SHR**

Poziom reaktywności immunohistochemicznej dla p-ERK1/2 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem spontanicznym był nieznacznie osłabiony w korze i nasilony w rdzeniu (Fot. 11 i 12) w porównaniu do WKY. Wykryto silną jądrową lokalizację tej kinazy w komórkach zarówno kory jak i rdzenia nadnerczy szczurów SHR (Fot. 11 i 12). W warstwie kłębuszkowej kory tych zwierząt i w grupie komórek rdzenia wykazano dość silną p-ERK1/2-immunoreaktywność również w cytoplazmie komórek (Fot. 11 i 12).



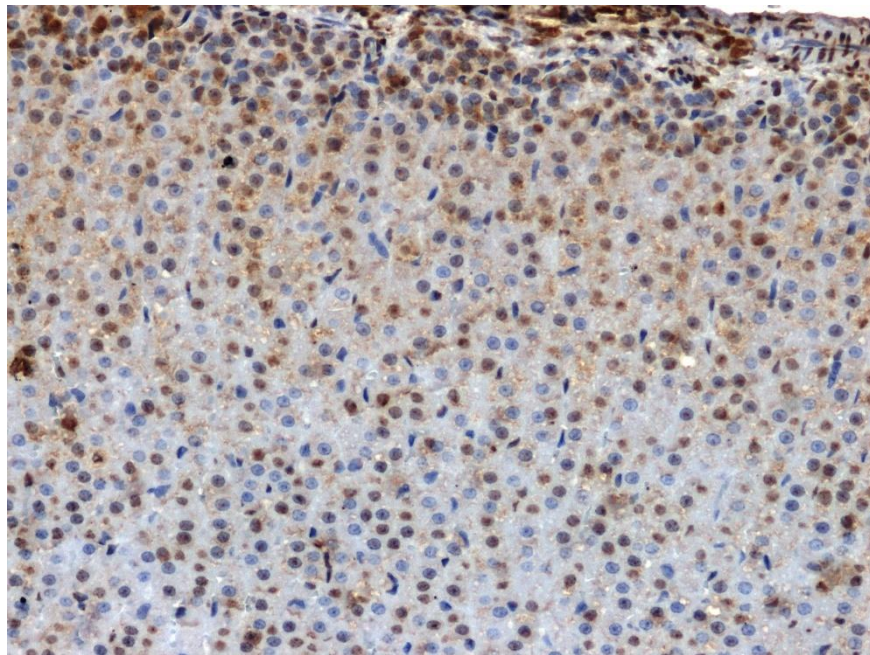
**Fot. 11.** Reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała wykazującego p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura SHR. Pow. x200.



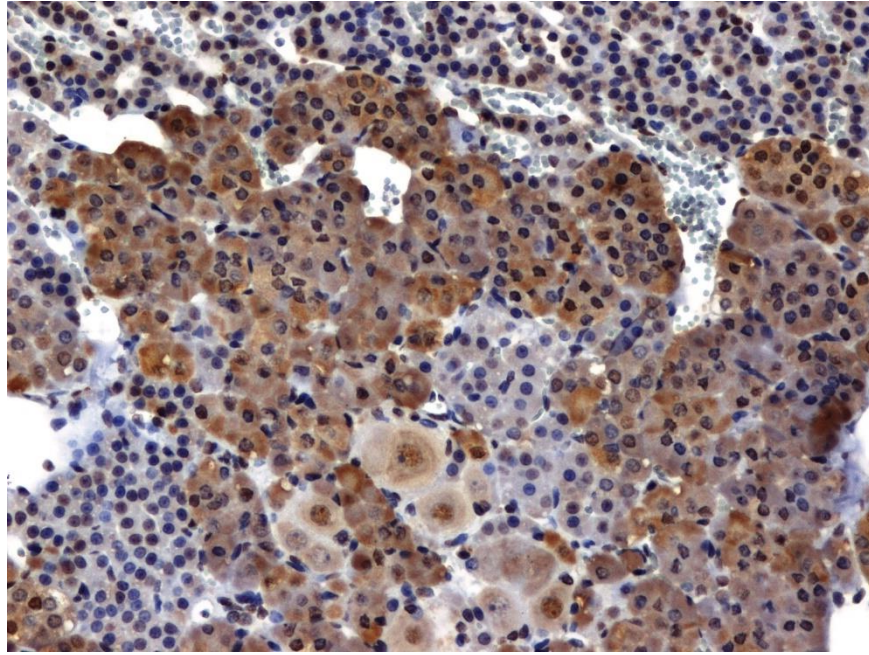
**Fot. 12.** Fragment nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Widoczny pozytywny immunosygnal wykazujący p-ERK1/2 w rdzeniu narządu. Pow. x200.

### **Grupa kontrolna UNX**

W korze nadnerczy szczurów UNX, reaktywność p-ERK1/2 była nieco słabsza (Fot. 13) niż w grupie kontrolnej dla SHR (Fot. 9). Umiarkowany poziom p-ERK1/2-immunoreaktywności obserwowano w warstwie kłębuszkowej kory tych zwierząt (Fot. 13). Immunohistochemiczna detekcja wykryła obecność p-ERK1/2, głównie w lokalizacji cytoplazmatycznej zarówno w korze, jak i rdzeniu nadnerczy (Fot. 13 i 14).



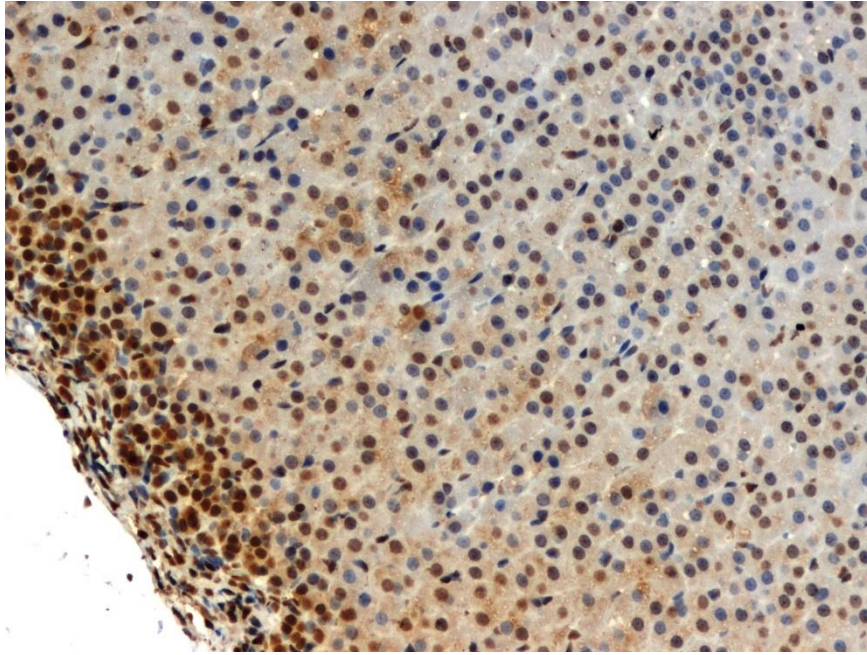
**Fot. 13.** Immunoreaktywność p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x200.



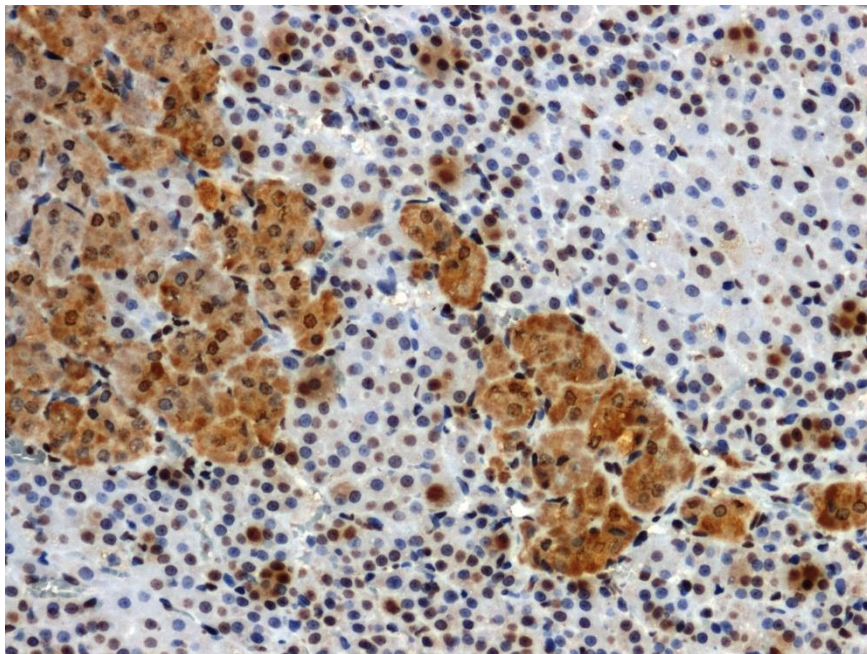
**Fot. 14.** Widoczna pozytywna reakcja wykazująca p-ERK1/2 w komórkach rdzenia nadnercza szczura z grupy UNX. Pow. x200.

#### **Grupa badana DOCA-salt**

Poziom reaktywności immunohistochemicznej dla p-ERK1/2 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem wtórnym był znacznie nasilony w części korowej i wyraźnie osłabiony w rdzeniu (Fot. 15 i 16) w porównaniu do szczurów UNX (Fot. 13 i 14).



**Fot. 15.** Pozytywny odczyn immunohistochemiczny po zastosowaniu przeciwciała wykazującego p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura nadciśnieniowego DOCA-salt. Pow. x200.



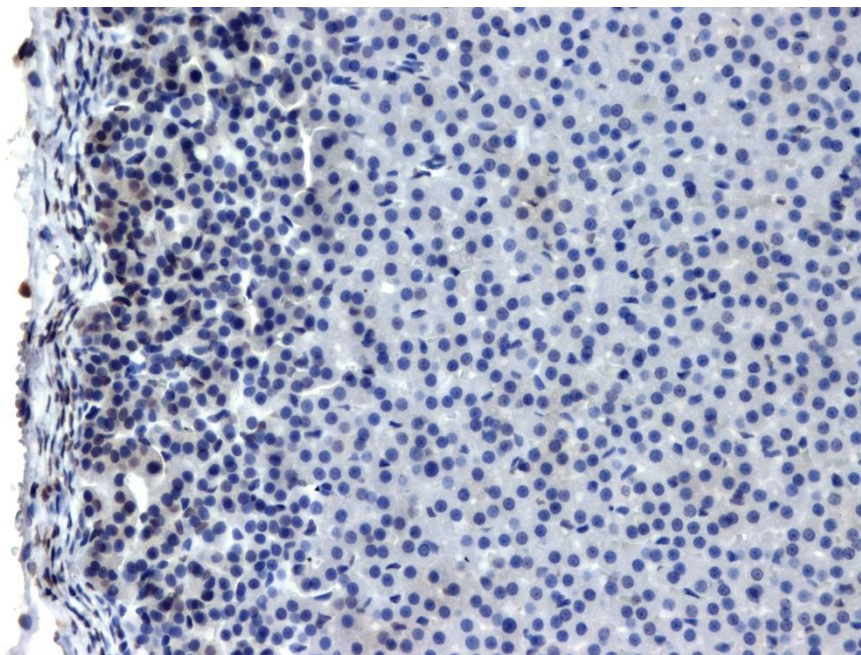
**Fot. 16.** Immunoreaktywność p-ERK1/2 w rdzeniu nadnercza z nadciśnieniem eksperymentalnym DOCA-salt. Pow. x200.

### **1.3. Immunodetekcja p-p38**

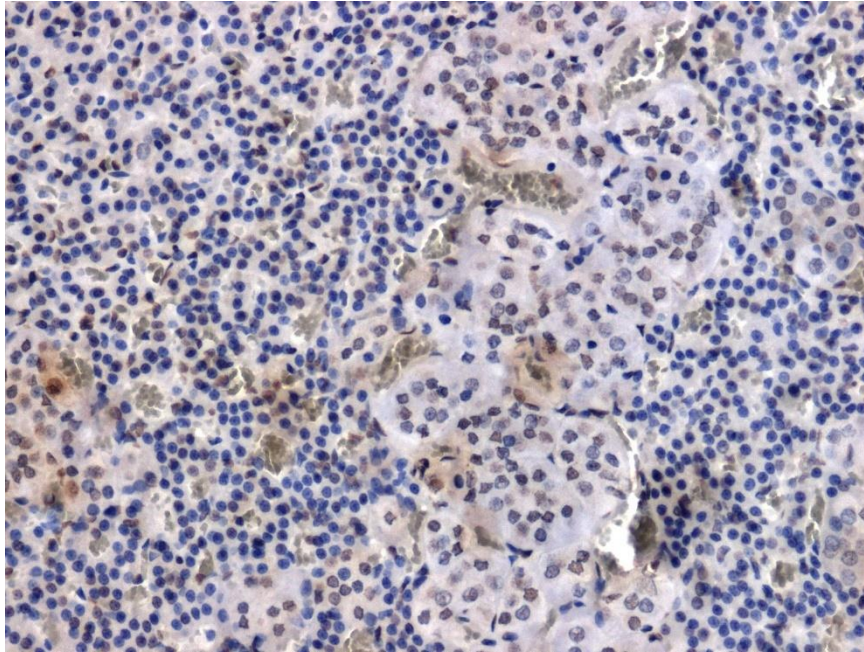
Reakcja immunohistochemiczna wykazująca białko p-p38, dała pozytywny wynik w nadnerczach wszystkich szczurów użytych w doświadczeniu. Przy czym rozmieszczenie struktur p-p38-immunopozytywnych, a także nasilenie reakcji były różne u szczurów poszczególnych grup.

#### **Grupa kontrolna WKY**

Zarówno w korze jak i rdzeniu nadnerczy zwierząt normotensyjnych WKY, wykazano bardzo niski poziom immunoreaktywności p-p38 (Fot. 17 i 18). Silniejszą p-p38-immunoreaktywność obserwowano w jądrach komórek warstwy kłębuszkowatej kory (Fot. 17), natomiast w części rdzennej immunohistochemiczna detekcja ujawniła obecność tej kinazy, głównie w przedziale cytoplazmatycznym (Fot. 18).



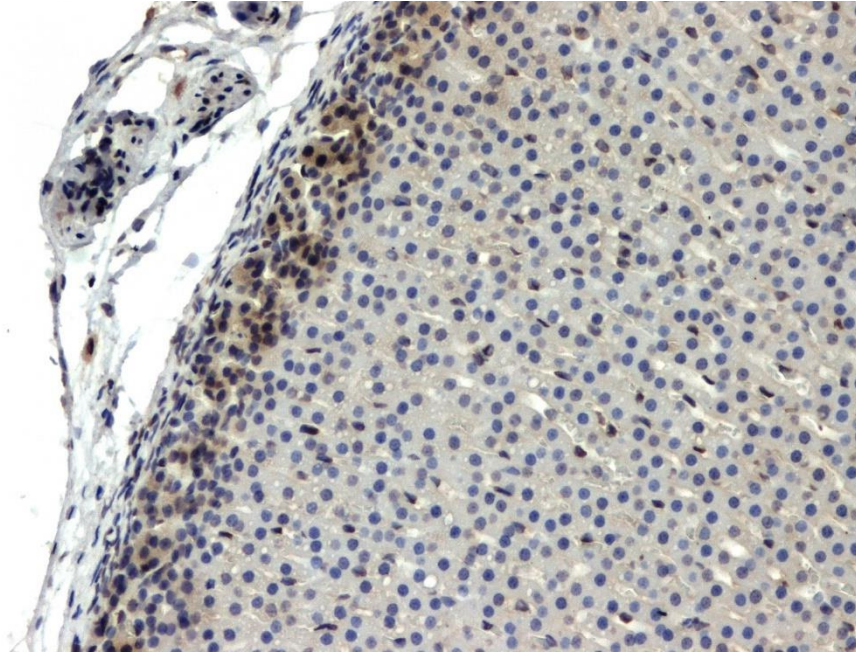
**Fot. 17.** Fragment nadnercza szczura normotensyjnego WKY.  
Słaba reakcja immunohistochemiczna wykazująca p-p38 w korze.  
Pow. x200.



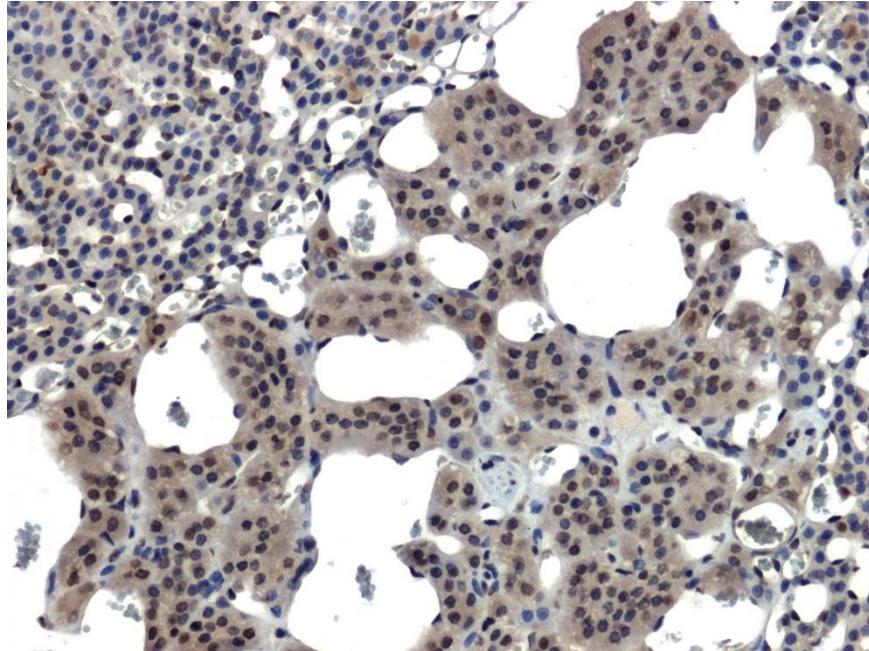
**Fot. 18.** Umiarkowana reaktywność p-p38 w rdzeniu nadnercza szczura normotensyjnego WKY. Pow. x200.

### **Grupa badana SHR**

Badania immunohistochemiczne wykazały znaczne nasilenie poziomu immunoreaktywności dla p-p38 w nadnerczach zwierząt z grupy nadciśnieniowej SHR (Fot. 19 i 20). Szczególne wzmożenie immunoreaktywności p-p38 wykazano w warstwie kłębuszkowatej kory, zarówno w lokalizacji jądrowej, jak i cytoplazmatycznej (Fot. 19) oraz w części rdzennej (Fot. 20).



**Fot. 19.** Reakcja immunohistochemiczna wykazująca p-p38 w korze nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Pow. x200.

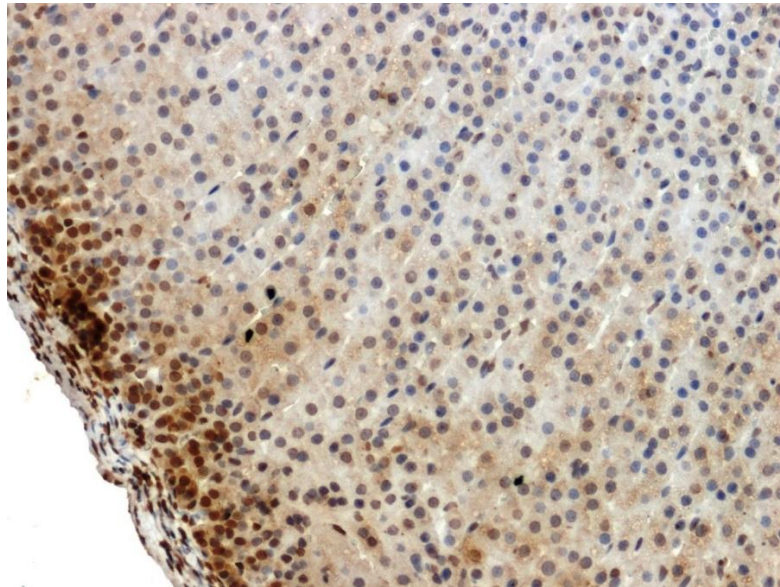


**Fot. 20.** Pozytywny wynik reakcji wykazującej p-p38 w komórkach rdzenia nadnercza szczura z nadciśnieniem pierwotnym. Pow. x200.

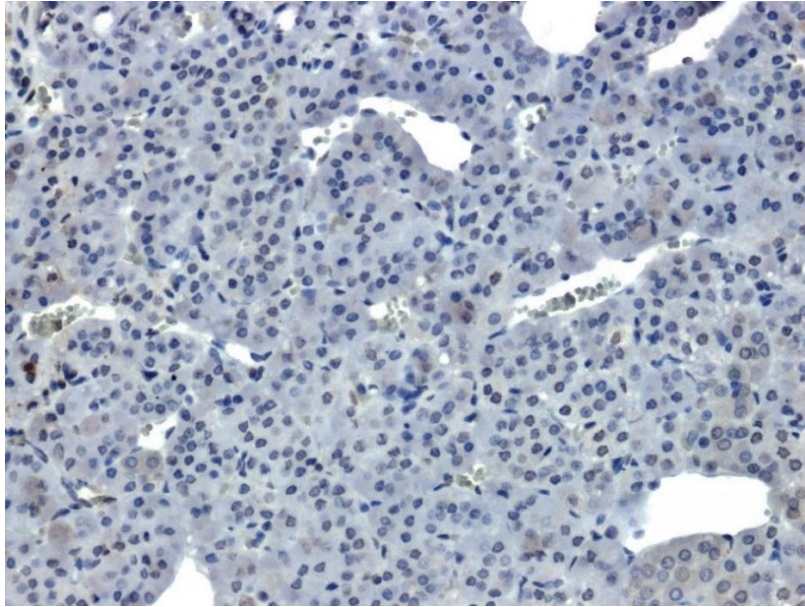


### **Grupa kontrolna UNX**

Immunodetekcja p-p38 w nadnerczach szczurów UNX wykazała silną reaktywność, zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną w warstwie kłębuszkowatej i umiarkowaną, głównie w przedziale cytoplazmatycznym w pozostałych warstwach kory (Fot. 21). W części rdzennej nadnerczy tych zwierząt wykazano bardzo niski poziom p-p38-immunoreaktywności, tylko w nielicznych komórkach (Fot. 22).



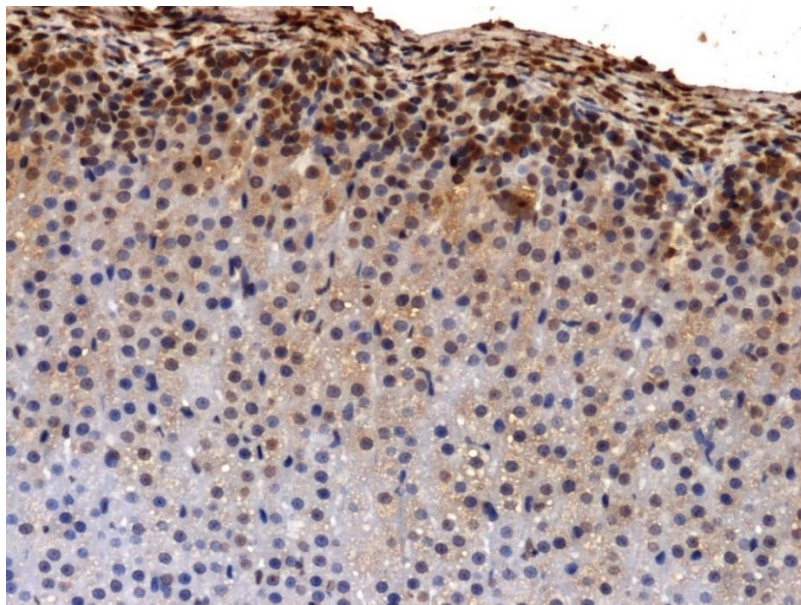
**Fot. 21.** Pozytywny wynik reakcji wykazującej p-p38 w korze nadnercza szczura UNX. Pow. x200.



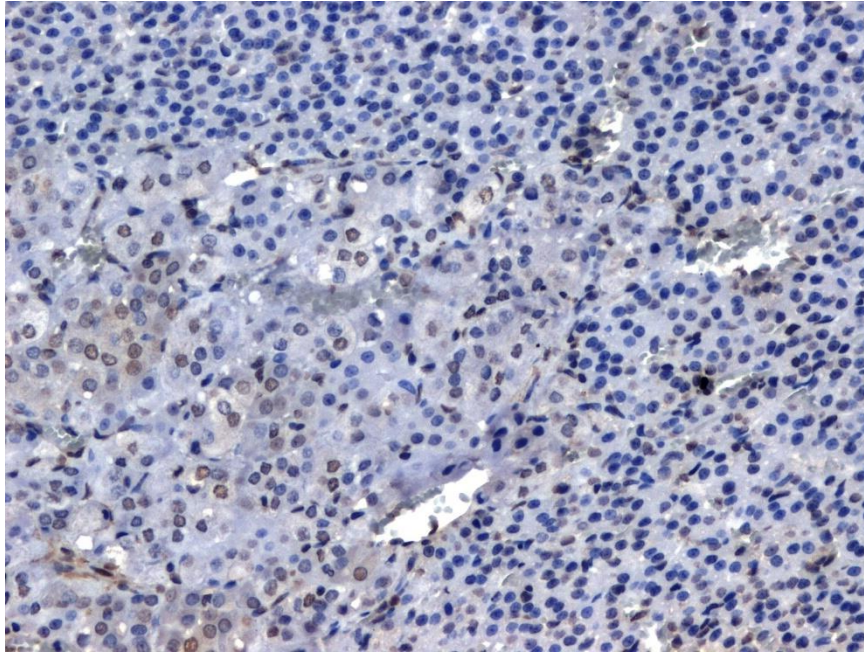
**Fot. 22.** Pojedyncze komórki p-p38-immunoreaktywne w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x200.

### **Grupa badana DOCA-salt**

Znaczne nasilenie immunoreaktywności p-p38, w odniesieniu do zwierząt grupy kontrolnej, obserwowano w korze nadnerczy szczurów DOCA-salt (Fot. 23). Natomiast w rdzeniu nadnerczy tych zwierząt reakcja nasiliła się nieznacznie (Fot. 24).



**Fot. 23.** Detekcja p-p38 w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt. Pow. x200.



**Fot. 24.** Słaba immunoreaktywność p-p38 w rdzeniu nadnercza szczura nadciśnieniowego DOCA-salt. Pow. x200.

## **2. BADANIA MORFOMETRYCZNE**

W celu obiektywizacji oceny intensywności reakcji immunohistochemicznej, przeprowadzono analizę densytometryczną obrazów mikroskopowych nadnerczy szczurów kontrolnych oraz z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Badania morfometryczne wykazały znamienne spadki intensywności reakcji wykazujących białko CacyBP/SIP w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem spontanicznym i wtórnym w porównaniu do zwierząt z grup kontrolnych. Porównując parametry morfometryczne komórek zawierających p-ERK1/2 wykazano, że w warstwie kłębuszkowatej kory nadnerczy szczurów SHR oraz w rdzeniu zwierząt DOCA-salt nastąpił spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej. W pozostałych warstwach kory nadnerczy szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym oraz rdzeniu SHR stwierdzono znamienne statystycznie wzrost immunoreaktywności tej kinazy. W badaniach densytometrycznych p-p38, wykazano istotny statystycznie wzrost

immunoreaktywności p-p38 u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym w odniesieniu do szczurów normotensyjnych (Tabela 5).

**Tabela 5.** Intensywność reakcji immunohistochemicznej wykazującej białko CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych (średnia  $\pm$  SE;  $p < 0,05$ ).

|                   |   | Intensywność reakcji immunohistochemicznej w skali 0 – 256<br>(0 – biały piksel, 256 – czarny piksel) |                        |                  |                        |
|-------------------|---|---|------------------------|------------------|------------------------|
|                   |   | WKY   | SHR                    | UNX              | DOCA-salt              |
| <b>CacyBP/SIP</b> | warstwa kłębuszkowata kory nadnerczy          | 67.2 $\pm$ 3.06   | 43.5 $\pm$ 3.80<br>*↓  | 93.8 $\pm$ 3.80  | 75.1 $\pm$ 5.76<br>*↓  |
|                   | warstwa pasmowata i siatkowata kory nadnerczy | 51.3 $\pm$ 1.58   | 33.9 $\pm$ 1.27<br>*↓  | 67.5 $\pm$ 1.47  | 53.6 $\pm$ 1.89<br>*↓  |
|                   | rdzeń nadnerczy                               | 83.8 $\pm$ 2.82   | 65.7 $\pm$ 3.00<br>*↓  | 129.3 $\pm$ 5.49 | 83.9 $\pm$ 5.50<br>*↓  |
| <b>p-ERK1/2</b>   | warstwa kłębuszkowata kory nadnerczy          | 145.7 $\pm$ 5.01  | 143.9 $\pm$ 4.84<br>↓  | 116.9 $\pm$ 3.15 | 183.4 $\pm$ 3.57<br>*↑ |
|                   | warstwa pasmowata i siatkowata kory nadnerczy | 84.4 $\pm$ 3.30   | 100.6 $\pm$ 3.27<br>*↑ | 92.3 $\pm$ 3.75  | 119.6 $\pm$ 4.44<br>*↑ |
|                   | rdzeń nadnerczy                               | 110.5 $\pm$ 6.05  | 169.5 $\pm$ 4.78<br>*↑ | 197.2 $\pm$ 2.86 | 178.7 $\pm$ 4.22<br>*↓ |
| <b>p-p38</b>      | warstwa kłębuszkowata kory nadnerczy          | 84.1 $\pm$ 3.93   | 143.8 $\pm$ 6.90<br>*↑ | 133.6 $\pm$ 4.10 | 186.4 $\pm$ 3.84<br>*↑ |
|                   | warstwa pasmowata i siatkowata kory nadnerczy | 64.1 $\pm$ 1.92   | 108.2 $\pm$ 4.05<br>*↑ | 77.8 $\pm$ 3.36  | 116.0 $\pm$ 6.15<br>*↑ |
|                   | rdzeń nadnerczy                               | 96.7 $\pm$ 6.65   | 148.4 $\pm$ 3.62<br>*↑ | 86.4 $\pm$ 2.41  | 138.7 $\pm$ 3.75<br>*↑ |

\*  $p < 0,05$  nadciśnienie vs kontrola

↑ - wzrost intensywności reakcji immunohistochemicznej

↓ - spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej

### 3. OCENA EKSPRESJI GENÓW METODĄ REAL-TIME PCR

#### 3.1. Ocena ekspresji genów kodujących białko CacyBP/SIP, ERK1/2, p38 w nadnerczach szczurów z grupy kontrolnej i badanej

Aby porównać profil ekspresji genów w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych wykorzystano metodę RT-qPCR, która pozwala na analizę ilości produktu w czasie rzeczywistym. Istotne różnice w ekspresji badanych genów: *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1* i *Mapk14* wykazane w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych zostały przedstawione w Tabeli 6.

**Tabela 6.** Ekspresja genów kodujących CacyBP/SIP (*Cacybp*), ERK1/2 (*Mapk3*, *Mapk1*), p38 (*Mapk14*) w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych.

| GRUPA     | Ekspresja genów   |                   |                   |                   |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|           | <i>Cacybp</i>     | <i>Mapk3</i>      | <i>Mapk1</i>      | <i>Mapk14</i>     |
| WKY       | 1,19 ± 0,1        | 1,21 ± 0,14       | 1,11 ± 0,16       | 1,18 ± 0,21       |
| SHR       | 0,76 ± 0,09<br>↓* | 1,45 ± 0,26<br>↑* | 1,49 ± 0,19<br>↑* | 1,69 ± 0,16<br>↑* |
| UNX       | 1,49 ± 0,14       | 1,37 ± 0,18       | 1,40 ± 0,15       | 1,30 ± 0,17       |
| DOCA-salt | 1,3 ± 0,15<br>↓*  | 1,81 ± 0,15<br>↑* | 1,80 ± 0,12<br>↑* | 2,08 ± 0,14<br>↑* |

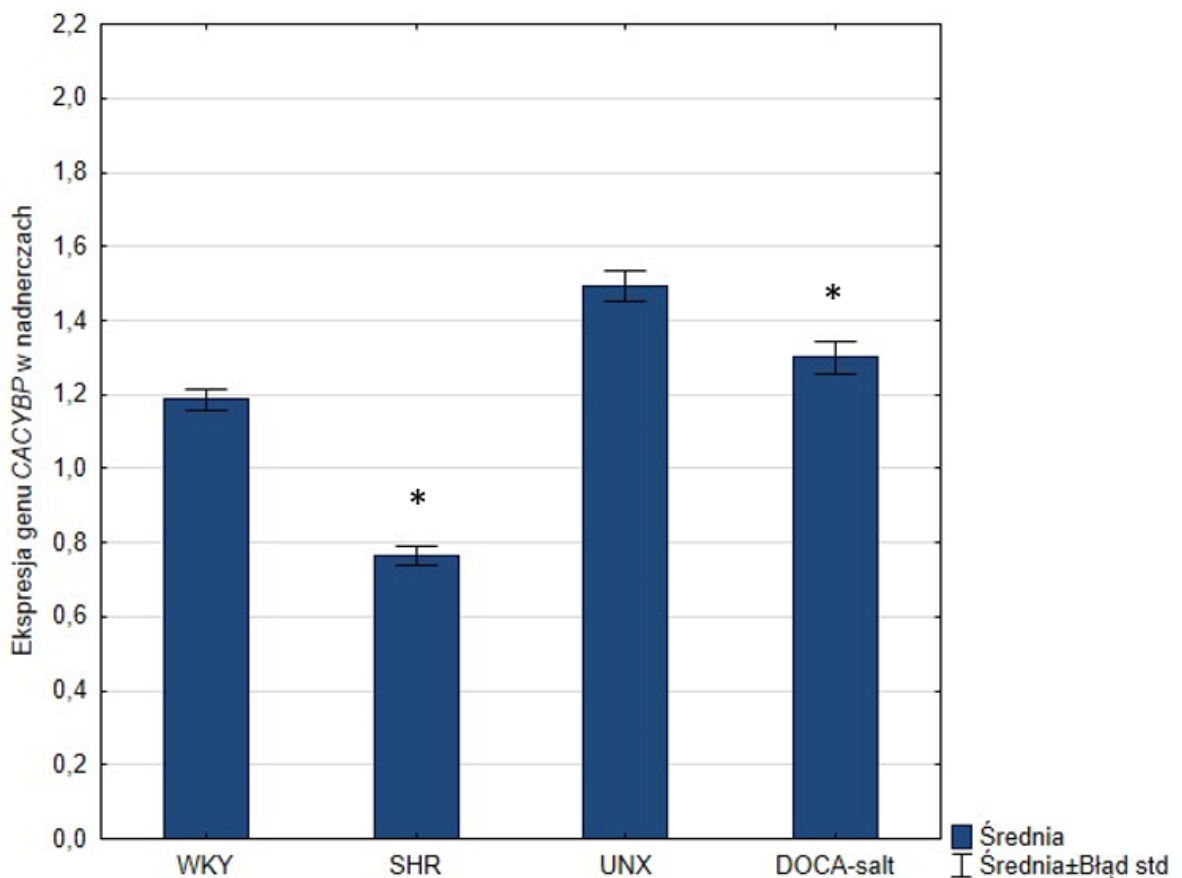
\* p < 0,05 nadciśnienie vs kontrola

↑ - nasilenie ekspresji genu

↓ - osłabienie ekspresji genu

### 3.1.1. Ekspresja genu *Cacybp* kodującego CacyBP/SIP

Wykazano, że ekspresja genu kodującego białko CacyBP/SIP w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem jest znacznie obniżona (szczególnie u SHR) w porównaniu do zwierząt normotensyjnych. Szczególnie wysoki poziom ekspresji genu *Cacybp* stwierdzono w nadnerczach szczurów grupy kontrolnej UNX (Tabela 6, Ryc. 6).

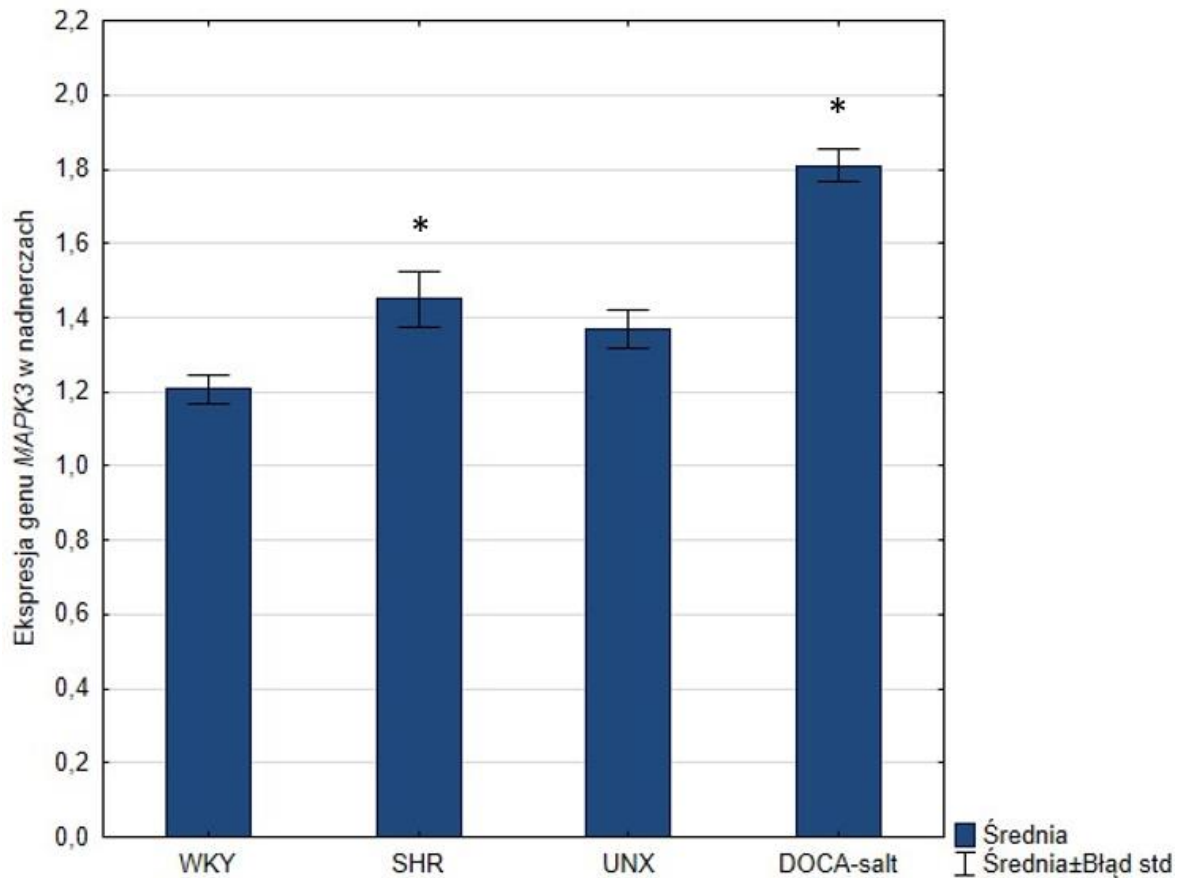


**Ryc. 6.** Ekspresja genu *Cacybp* w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych

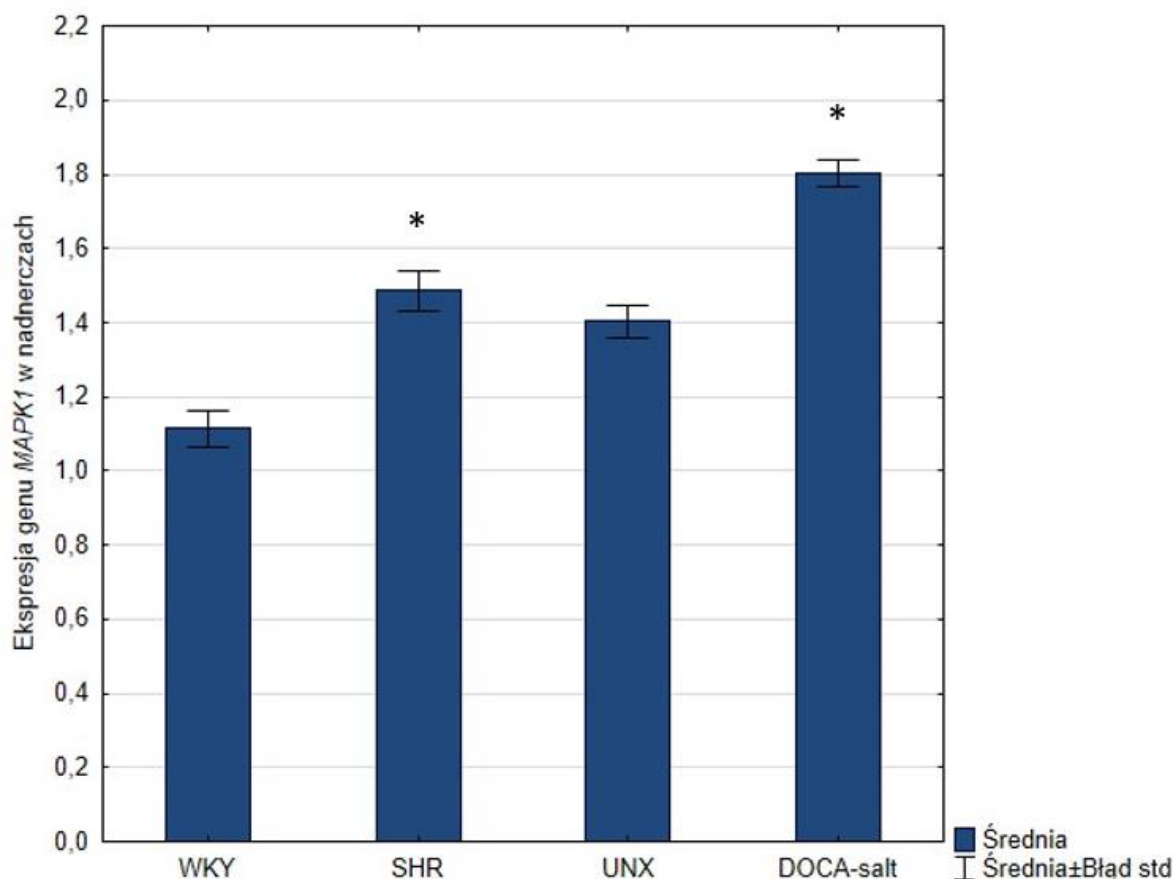
### 3.1.2. Ekspresja genów: *Mapk3* i *Mapk1* kodujących ERK1/2

W przypadku genu *Mapk3* i *Mapk1*, czułą metodą Real Time PCR wykryto znamienne wyższą ekspresję, o podobnym profilu dla obu genów, w nadnerczach

szczurów nadciśnieniowych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Zdecydowanie najwyższy poziom ekspresji genów kodujących ERK1/2 stwierdzono w nadnerczach szczurów DOCA-salt (Tabela 6, Ryc. 7 i Ryc. 8).



**Ryc. 7.** Ekspresja genu *Mapk3* kodującego ERK1 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych

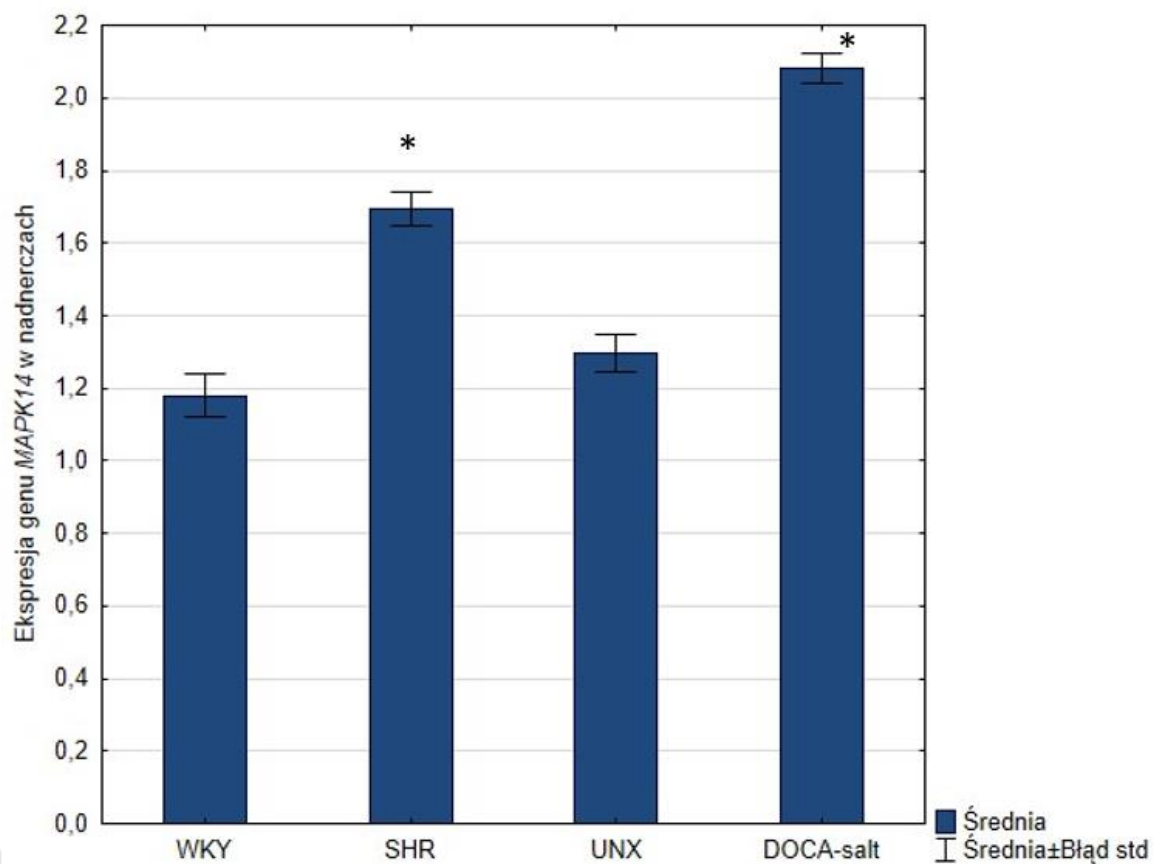


**Ryc. 8.** Ekspresja genu *Mapk1* kodującego ERK2 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych

### 3.1.3. Ekspresja genu *Mapk14* kodującego p38

W przypadku genu *Mapk14* kodującego białko p38, wyniki otrzymane techniką PCR czasu rzeczywistego wykazały znamienne wyższą ekspresję w nadnerczach szczurów nadciśnieniowych w stosunku do szczurów grup kontrolnych. Zdecydowanie najwyższy poziom ekspresji genu *Mapk14* stwierdzono w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt (Tabela 6, Ryc. 9).





**Ryc. 9.** Ekspresja genu *Mapk14* kodującego p38 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych

## V. DYSKUSJA

Zmiany demograficzno-epidemiologiczne, następujące w wyniku przemian cywilizacyjnych, prowadzą do masowego problemu zdrowotnego przejawiającego się różnorodnymi symptomami nazwanymi chorobami cywilizacyjnymi, których lista jest dość przygnębiająca. Pomimo wielkich nadziei, pokładanych w postępie naukowych metod leczenia tych chorób, do dziś nie udało się wyleczyć ani jednej choroby cywilizacyjnej. Niestety zachorowalność, szczególnie na choroby serca i układu krążenia, wciąż rośnie i w opinii specjalistów tendencja wzrostowa utrzyma się. Tymczasem, niezależnie czy etiologia jest określona, niejasna czy nieznana, likwiduje się tylko objawy, które ratują życie. Ważną kwestią w przypadku chorób cywilizacyjnych jest to, że dotyczą one wszystkich niezależnie od wieku, co więcej rozprzestrzeniają się bardzo szybko. Zachorowanie na jedną z nich powoduje podwyższone zagrożenie nabycia innej jednostki chorobowej.

Choroby układu sercowo-naczyniowego, do których należy między innymi nadciśnienie tętnicze, są jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów w Polsce i w Europie. Dlatego, wciąż podejmowane są wysiłki klinicystów i naukowców, aby uzyskać lepsze i skuteczniejsze wyniki strategii farmakologicznej.

Zaburzenie równowagi złożonego układu wzajemnie powiązanych czynników regulujących ciśnienie krwi, prowadzi do rozwoju nadciśnienia i nieprawidłowej perfuzji tkanek. Złożony, wieloczynnikowy mechanizm fizjologicznej regulacji ciśnienia krwi, obejmujący wiele szlaków sygnałowych sprawia, że patofizjologia nadciśnienia tętniczego wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniona.

Szlaki transdukcji sygnału wewnątrz komórki przekazywane są szeregiem cząstek, zwanych wewnątrzkomórkowymi szlakami przekazywania sygnału. Ścieżkę sygnalizacyjną inicjuje związanie receptora ze swoistym ligandem. Powoduje to zmianę

receptora, która wywołuje szereg zdarzeń sygnalizacyjnych. Cząsteczki przekazujące sygnał, często są białkami, które mogą być aktywowane lub dezaktywowane. Jedną z metod zmiany aktywności białka jest proces fosforylacji katalizowany przez enzymy zwane kinazami. W zależności od białka fosforylacja może powodować wzrost aktywności białka lub przeciwnie inaktywować białko. Aby przywrócić stan białka przed fosforylacją, komórki posiadają enzymy zwane fosfatazami, które usuwają grupę fosforanową. Szeroko rozpowszechnione w biologii są szlaki sygnałowe kinazy MAP. Aktywna kinaza Raf fosforyluje i aktywuje kinazę MEK, która fosforyluje i aktywuje kinazę ERK. Kinazy ERK fosforylują i aktywują wiele docelowych cząsteczek. Razem kinazy Raf, MEK i ERK tworzą trzypoziomowy szlak sygnałowy zwany kaskadą kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Szlak ERK przyczynia się do kontroli wielu procesów komórkowych, ponieważ ERK po aktywacji mogą fosforylować dużą liczbę białek. Istnieje wiele sposobów regulacji szlaku sygnalizacyjnego ERK przez fosfatazę czy inhibitory szlaku.

Wpisując się w nurt badań poszukujących nowych mechanizmów zaangażowanych w patogenezę nadciśnienia tętniczego, w niniejszym badaniu dokonano oceny białka CacyBP/SIP w nowej roli fosfatazy i oddziaływania z kinazami ERK1/2 i p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, to badanie jest pierwszym, w którym zbadano związek między ekspresją CacyBP/SIP i ufosforylowanych kinaz ERK1/2 i p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem tętniczym.

W niniejszej pracy przeanalizowano lokalizację i immunoreaktywność CacyBP/SIP oraz ekspresję genu *Cacybp* w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem spontanicznym i wtórnym. Analiza uzyskanych wyników wykazała obniżoną immunoreaktywność i ekspresję genu *Cacybp* u szczurów nadciśnieniowych.

Mimo wieloletnich, wnikliwych badań nie udało się poznać dokładnej roli CacyBP/SIP w różnych zaburzeniach organizmu. Poprzez swoje interakcje białko to wpływa na procesy komórkowe w różny sposób, zależny od typu tkanki, w której jest zlokalizowane.

Dotychczasowe badania wykazały udział białka CacyBP/SIP w wielu procesach, jak reorganizacja szkieletu, ubikwitynacja, odpowiedź na stres oksydacyjny, defosforylację i inne. Ostatnie wyniki wskazują, że rola CacyBP/SIP w różnych szlakach sygnałowych może być związana z defosforylacją kinaz z rodziny MAP [Filipek & Kuźmicki, 1998; Schneider i wsp., 2007; Kilańczyk i wsp., 2009; Kilańczyk i wsp., 2011; Topolska-Woś i wsp., 2016].

Wyniki dotychczasowych badań wykazały istotną rolę CacyBP/SIP w procesie różnicowania kardiomiocytów i rozwoju serca. Sugeruje się również, że podwyższony poziom CacyBP/SIP może pełnić funkcję ochronną kardiomiocytów podczas zawału [Au, 2006]. Doniesienia Kasackiej i wsp. [2018], wykazały zmiany ekspresji białka CacyBP/SIP w sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Autorzy przypuszczają, że różnice biosyntezy białka w badanych typach nadciśnienia tętniczego mogą być podyktowane różnymi mechanizmami zaangażowanymi w rozwój lub utrzymanie nadciśnienia i różnymi mechanizmami uszkodzenia narządu. Może to sugerować inne zaangażowanie CacyBP/SIP w patogenezę nadciśnienia pierwotnego i wtórnego.

Badania przeprowadzone na różnych liniach komórkowych wykazały istotny wzrost ekspresji genu białka CacyBP/SIP na skutek indukcji stresu oksydacyjnego [Leśniak i wsp., 2005; Orre i wsp., 2007; Topolska-Woś i wsp., 2015].

Stres oksydacyjny jest głównym czynnikiem odpowiadającym za starzenie się komórek i apoptozę [Mallat i wsp., 2001]. Potwierdzeniem tego poglądu mogą być

wyniki badań Piotrowskiej i wsp. [2018], którzy wykazali wzrost ekspresji CacyBP/SIP w sercach mężczyzn powyżej 45 roku życia w porównaniu do osób młodszych, co może być skutkiem zaburzenia równowagi oksydacyjnej w starzejących się kardiomiocytach. Ostatnie badania wykazały, że CacyBP/SIP wykazuje właściwości opiekuńcze/kochaperonowe i może brać udział w komórkowej odpowiedzi na stres [Góral i wsp., 2016].

Oprócz powyżej wymienionych nielicznych publikacji nie przebadano roli białka CacyBP/SIP w układzie sercowo-naczyniowym.

Poszukiwania funkcji CacyBP/SIP wykazały udział tego białka w innych stanach patologicznych, w tym w nowotworach [Zhai i wsp., 2008; Ning i wsp., 2016].

Zespół kierowany przez Sun i wsp., [2007] wykazał niską ekspresję białka CacyBP/SIP w raku nerki i linii komórek raka nerki. Przeciwnie wyniki uzyskali Piotrowska i wsp. [2020], którzy wykazali wzrost immunoreaktywności CacyBP/SIP oraz podwyższoną ekspresję genu tego białka w ludzkiej tkance raka nerkowokomórkowego w porównaniu do nienowotworowej nerki. Badania pierwszej grupy badaczy wykazały, że CacyBP/SIP hamuje proliferację i onkogenezę komórek raka nerki, na skutek obniżenia poziomu cykliny D1 poprzez redukcję białka  $\beta$ -kateniny.

Przypuszcza się, że białko CacyBP/SIP, poprzez przyłączenie innych białek aktywuje kompleks ligazy ubikwityny SCF<sup>TBL1</sup>, rozpoznający nieufosforyzowaną formę  $\beta$ -kateniny [Matsuzawa i wsp., 2003; Santelli i wsp., 2005]. Mając na uwadze fakt, że  $\beta$ -katenina jest zaangażowana w bardzo różne procesy komórkowe i jest kluczowym elementem kanonicznego szlaku sygnalizacyjnego Wnt, można przypuszczać, że CacyBP/SIP poprzez wpływ na poziom  $\beta$ -kateniny uczestniczy w patogenezie nadciśnienia. Dokładniejsza analiza wykazała, że CacyBP/SIP może powodować

zaburzenia degradacji  $\beta$ -kateniny, poprzez wpływ na ligazę ubikwityny [Matsuzawa & Reed, 2001; Bhattacharya i wsp., 2005; Dimitrova i wsp., 2010]. Chociaż szczegółowy mechanizm pozostaje do zbadania, można jedynie spekulować, że obniżona aktywność białka CacyBP/SIP, stwierdzona w niniejszym badaniu, wiąże się ze szlakiem ubikwityny. Jednak dotychczas nie ustalono jednoznacznie czy CacyBP/SIP jest zaangażowany w sygnalizację  $\beta$ -kateniny i jakie są jej inne potencjalne funkcje.

Kilka lat temu ukazały się doniesienia wykazujące nową rolę CacyBP/SIP w szlakach sygnalizacyjnych, związaną z defosforylacją kinaz z rodziny MAPK. Ze względu na kluczową rolę w czynnościach komórkowych, szlaki sygnalizacyjne MAPK biorą udział w patogenezie wielu chorób.

Mając na uwadze fakt, że w nadciśnieniu tętniczym dochodzi do szeregu zdarzeń molekularnych, w niniejszej pracy skupiliśmy się na ocenie białka CacyBP/SIP i jego interakcji z kinazami ERK1/2 oraz p38.

Strategie terapeutyczne, opierające się na ingerencji w szlaki sygnalizacyjne podlegające kinazom p-ERK1/2 oraz p-p38, mogą być istotnym celem w terapii chorób serowo-naczyniowych. Kinazy MAPK odpowiadają za regulację aktywności enzymów, białek oraz czynników transkrypcyjnych. Zakres ich biologicznego działania jest bardzo szeroki [Bryk i wsp., 2014].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej wykazującej p-ERK1/2 w warstwie kłębuszkowatej kory nadnerczy szczurów SHR i w rdzeniu zwierząt DOCA-salt oraz istotny statystycznie wzrost immunoreaktywności tej kinazy w pozostałych warstwach kory nadnerczy szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym oraz rdzeniu SHR. Jednocześnie stwierdzono istotny wzrost ekspresji genów kodujących ERK1 i ERK2 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Ta niespójność

pomiędzy wynikami badań immunohistochemicznych i biologii molekularnej może być spowodowana faktem, że immunohistochemicznie oceniana jest ekspresja badanych parametrów w komórkach nadnerczy, natomiast metodą qRT-PCR badana jest ekspresja we fragmentach tkanek, zawierających różne, nie tylko endokrynowe komórki, które mogą wykazywać ekspresję badanych białek.

Rola kinazy ERK1/2 i p38 w patologii wielu chorób została szeroko przedstawiona w literaturze naukowej [Irusen i wsp., 2002; Nath i wsp., 2006; Komers i wsp., 2007; Cuenda & Rousseau, 2007; Chung, 2011; Mercado i wsp., 2011; Gaffey i wsp., 2013; Dai i wsp., 2016; Li i wsp., 2016; Gao i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2017]. Aktywacja tych kinaz następuje w odpowiedzi na różnego rodzaju stresy komórkowe, między innymi na hiperosmolarność, reaktywne formy tlenu, czy cytokiny zapalne. Coraz częściej mówi się, że nadciśnienie tętnicze jest przewlekłą chorobą zapalną [Sesso i wsp., 2003; Głuszek & Kosicka, 2011]. A zatem, powikłania narządowe mogą być związane nie tylko z czynnikami hemodynamicznymi, lecz także z podwyższonym stężeniem wykładników stanu zapalnego.

W dotychczasowych badaniach, co wynika z przeglądu piśmiennictwa, rolę kinazy ERK1/2 w nadciśnieniu badano głównie na modelu SHR. W niniejszym badaniu reaktywności immunohistochemicznej dla ERK1/2 wykazano nasilenie reakcji w większości warstw kory nadnerczy i wzrost ekspresji genu tej kinazy u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, w porównaniu do zwierząt normotensyjnych. Podobne obserwacje uzyskali Wei i wsp. [2014] oraz Xiao i wsp. [2021], którzy stwierdzili istotny wzrost ekspresji p-ERK1/2 w nerkach, a Mao i wsp. [2010] w ciałach jamistych szczurów z nadciśnieniem pierwotnym. Wysoka ekspresja p-ERK1/2 w raportowanych badaniach oraz w niniejszym badaniu może odzwierciedlać obecność cytokin prozapalnych lub innych czynników stresu komórkowego, które aktywują szlak

ERK1/2 MAPK w warunkach nadciśnienia tętniczego. W kilku innych badaniach opisano również wzrost ekspresji p-ERK1/2 w ścianie tętnic płucnych w stanie nadciśnienia płucnego [Gao i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2017; Fan i wsp., 2020].

Sugeruje się, że aktywacja ERK1/2 przyczynia się do przerostu i hiperplazji komórek mięśni gładkich naczyń, co prowadzi do wzrostu oporu obwodowego i podniesienia ciśnienia tętniczego.

Na podstawie analizy przedstawionych danych można więc postawić hipotezę, że szlak sygnałowy ERK1/2 MAPK aktywnie uczestniczy w patogenezie zarówno nadciśnienia pierwotnego, jak i wtórnego.

Kinaza białkowa p38 tworzy wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnału zaangażowany w wytwarzanie mediatorów zapalnych. Po ufosforylowaniu p38 przemieszcza się do jądra i wpływa na transkrypcję genów i wytwarzanie mediatorów procesu zapalnego. Wykazano bez wątpienia, że zastosowanie inhibitorów p38 MAPK hamuje szereg stanów zapalnych [Kumar i wsp., 2003; Renda i wsp., 2008; Gaffey i wsp., 2013].

W badaniach własnych stwierdzono istotnie wyższą ekspresję białka p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem tętniczym, szczególnie zaznaczoną u szczurów z nadciśnieniem wtórnym. Być może wiąże się to z tym, że pierwotne nadciśnienie tętnicze jest chorobą zapalną o mniejszym natężeniu, na co wskazują dane doświadczalne i kliniczne [Sesso i wsp., 2003]. Zasugerowano nawet, aby kinazę p38 traktować jako potencjalny cel terapeutyczny dla dysfunkcji związanych z nadciśnieniem tętniczym. Sugerowaną hipotezę mogą wspierać wyniki badań przeprowadzone na modelu nadciśnienia zależnego od angiotensyny II, gdzie wykazano poprawę plastyczności synaptycznej i pamięci po zastosowaniu inhibitora kinazy p38 [Dai i wsp., 2016].



Wykorzystując model nadciśnienia pierwotnego, Ju i wsp. [2003] oraz Willette i wsp. [2009] wykazali, że zastosowanie inhibitora kinazy p38 wiązało się z relaksacją śródbłonna oraz obniżeniem ciśnienia krwi. W innych badaniach wykazano, że inhibitory p38 obniżają CRP w chorobie niedokrwiennej serca [Dodeller & Schulze-Koops, 2006]. Dane niektórych badań klinicznych dokumentują korzystne zmiany w postępie leczenia choroby u pacjentów po zastosowaniu inhibitorów kinazy p38 MAP [Irusen i wsp., 2002; Lee & Dominguez, 2005]. Cytowani autorzy wykazali, że zastosowanie inhibitorów kinaz MAPK jest interesującym celem terapeutycznym w procesie zapalnym.

Wzrost ekspresji p-p38 stwierdzono również w nerkach szczurów cukrzycowych [Komers i wsp., 2007] i płucach szczurów z nadciśnieniem płucnym [Ying i wsp., 2017].

Ścieżki sygnałowe ERK i p38 zarówno niezależnie, jak i wspólnie przyczyniają się do powstawania wielu chorób. Badania pokazują kluczową rolę tych kinaz w chorobach sercowo-naczyniowych [Costanzo i wsp., 2003; Ju i wsp., 2003; Petrich & Wang, 2004; Willette i wsp., 2009; Bryk i wsp., 2014], a także efekty stosowania substancji/leków ukierunkowanych na szlaki sygnalizacyjne MAPK w celu zapewnienia skuteczniejszego leczenia [Ju i wsp., 2003; Kumar i wsp., 2003; Lee & Dominguez, 2005; Bao i wsp., 2010; Kyotani i wsp., 2010; Seeger i wsp., 2010; Tian i wsp., 2011; Dai i wsp., 2016; Lee i wsp., 2016 oraz Liu i wsp., 2019].

Badania zespołu Fu i wsp. [2018] wykazały, że zastosowanie antagonisty p38 zapobiega dysfunkcji śródbłonna naczyń u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym.

W literaturze opisano wyniki badań doświadczalnych, które wykazały zmniejszenie ekspresji ERK1/2 i p38 w różnych stanach chorobowych, w patogenezie

których kluczową rolę odgrywa stres oksydacyjny [Bao i wsp., 2010; Kyotani i wsp., 2010; Tian i wsp., 2011; Lee i wsp., 2016 oraz Liu i wsp., 2019].

Wysoką ekspresję p-ERK1/2 oraz p-p38 wykazano w płucach w stanie nadciśnienia płucnego [Li i wsp., 2016]. Według Li i wsp., [2016] ścieżka sygnałowa ERK1/2 jest szczególnie zaangażowana w rozwój nadciśnienia płucnego oraz przebudowę tętnic wywołaną wysokim przepływem krwi w płucach.

Poza rozlicznymi, potwierdzonymi funkcjami białka CacyBP/SIP, badania ostatnich lat wskazują na nową fosfatazową rolę CacyBP/SIP w stosunku do kinaz MAPK. Interakcje CacyBP/SIP z kinazami ERK1/2 i p38 są ważne z punktu widzenia roli obu białek w szlakach sygnalizacyjnych związanych z różnymi procesami komórkowymi [Kilańczyk i wsp., 2012; Rosińska i wsp., 2016].

Białko CacyBP/SIP w roli fosfatazy zostało dotychczas przedstawione w zaledwie kilku publikacjach naukowych.

Obserwowany w niniejszych badaniach spadek ekspresji białka CacyBP/SIP oraz wzrost kinazy p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach szczurów nadciśnieniowych zgodny jest z wynikami doniesienia Jurewicz i wsp. [2020]. Wyniki badań tego zespołu wykazały również spadek poziomu CacyBP/SIP oraz wzrost p-ERK1/2 i p-p38 we fragmentach rdzenia kręgowego wyciętych po 1 i 3 miesiącach po jego przecięciu. Autorzy badania sugerują, że odwrotna korelacja pomiędzy poziomami CacyBP/SIP a p-ERK1/2 i p-p38 świadczy o roli CacyBP/SIP w defosforylacji kinaz MAPK.

Dane literaturowe oraz wyniki przedstawione w niniejszej pracy, dokumentujące wzrost ekspresji kinazy p-ERK1/2 i p-p38 mogą potwierdzać udział CacyBP/SIP w defosforylacji kinaz MAPK i wpływ na aktywność szlaków sygnałowych z udziałem tych kinaz, zaangażowanych w procesy zachodzące w nadnerczach szczurów w warunkach podwyższonego ciśnienia tętniczego.

Zarówno w badaniach własnych jak i zespołu prowadzonego przez Jurewicz [2020], dowiedziono, że bardziej znaczące różnice między grupą kontrolną a badaną były widoczne dla p-p38 niż dla p-ERK1/2. Podobne wyniki dotyczące fosfatazowej aktywności CacyBP/SIP uzyskano dla innej fosfatazy – MKP-1 [Hong i wsp., 2008]. W tym badaniu eksperymentalnym wykazano, że w uszkodzonym rdzeniu kręgowym poziom fosfatazy MKP-1 został obniżony, a p-ERK1/2 podwyższony.

Aktywność CacyBP/SIP jako fosfatazy wykazano również w komórkach nerwiaka niedojrzałego NB2a [Kilańczyk i wsp., 2012; Rosińska i wsp., 2016]. Stwierdzono, że nadekspresja CacyBP/SIP była skorelowana ze zmniejszeniem ilości fosforylowanej ERK1/2 we frakcji jądrowej.

Potwierdzeniem, że białko p38 jest również ligandem fosfatazy CacyBP/SIP mogą być wyniki badań na komórkach NB2a [Topolska-Woś i wsp., 2017]. Uzyskane dane mogą świadczyć o defosforylacji kinaz MAPK lub ich udziale w komórkowej odpowiedzi na stres oksydacyjny [Topolska-Woś i wsp., 2015].

Poziom CacyBP/SIP jest zmieniony w przypadku kilku nowotworów, co podkreśla jego udział w utrzymaniu homeostazy komórkowej. Chen i wsp. [2018] przedstawili dowody na to, że CacyBP/SIP hamuje onkogenezę raka żołądka poprzez defosforylację kinazy ERK1/2 i degradację  $\beta$ -kateniny w komórkach nowotworowych. Ostatnio Tang i wsp. [2016] wykazali, że efektem akumulacji CacyBP/SIP w jądrze oraz aktywacji sygnalizacji ERK1/2 jest ochrona komórek glejaka przed apoptozą. Wyniki przedstawione przez tych autorów mogą mieć istotne znaczenie w terapii leczenia glejaka.

Wyniki badań własnych sugerują, że na poziomie komórkowym nadciśnieniu tętniczemu towarzyszą istotne zdarzenia molekularne takie jak aktywacja kinaz ERK1/2 oraz p38, a w konsekwencji ekspresja genów pośredniczących w odpowiedzi zapalanej

[Luo i wsp., 2015]. Uznaje się, że nadciśnienie tętnicze jest chorobą zapalną, zaś kinazy aktywowane mitogenami MAPK odgrywają ważną rolę w regulacji stanu zapalnego. Aktywacja tej rodziny kinaz ma miejsce w odpowiedzi na stres komórkowy, działanie reaktywnych form tlenu bądź cytokin zapalnych. Aktywacja ERK1/2 w nadciśnieniu tętniczym może być związana z obecnością cytokin prozapalnych aktywujących ten szlak, natomiast kinaza p38 po ufosforylowaniu reguluje transkrypcję genów i produkcję mediatorów zapalnych [Kumar i wsp., 2003; Petrich & Wang, 2004; Bryk i wsp., 2014].

Procesy fosforylacji i defosforylacji odgrywają kluczową rolę w większości szlaków sygnałowych bezpośrednio regulując funkcje białek. Te dwa przeciwstawne procesy biorą udział w stabilizacji i degradacji białek, jak również mają wpływ na ich lokalizację komórkową. Fosforylacja nie jest procesem służącym wyłącznie przełączeniu aktywności białek, lecz mechanizmem regulującym wiele istotnych procesów zachodzących w organizmie [Taracha i wsp., 2017].

Na podstawie wyników własnych badań oraz przytoczonych danych literaturowych można wnioskować, że oddziaływania pomiędzy CacyBP/SIP oraz ERK1/2 i p38 stanowią istotny element mechanizmu regulującego ciśnienie krwi. Odwrotna korelacja między poziomem CacyBP/SIP a ekspresją badanych kinaz sugeruje, że w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem tętniczym CacyBP/SIP może przyczyniać się do defosforylacji kinaz p-ERK1/2 i p-p38 i modulować ich funkcje w różnych procesach komórkowych. Wzrost poziomu p-ERK1/2 i p-p38 może być spowodowany zwiększeniem aktywności kinaz lub obniżeniem poziomu fosfataz, w tym CacyBP/SIP, co może mieć znaczenie w patologii nadciśnienia tętniczego. Hamowanie szlaków sygnalizacyjnych związanych z kinazami MAPK może

potencjalnie wpływać na różne etapy rozwoju i utrzymania wysokiego ciśnienia krwi, a ich blokada może stać się ważną opcją leczenia nadciśnienia tętniczego.

Niezbędna jest kontynuacja badań w tym zakresie ze względu na unikalne cechy białka CacyBP/SIP i brak wiedzy na temat jego specyficzności substratowej, a także z uwagi na kinazy MAPK, które mogą aktywować wiele czynników transkrypcyjnych oraz fosforylować nieswoiste substraty, co może wywołać nieoczekiwane efekty biologiczne.

## VI. WNIOSKI

1. Poziom białka CacyBP/SIP jest znamienne obniżony w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem w porównaniu do szczurów normotensyjnych.
2. Ekspresja genów kinazy ERK1/2 i p38 jest istotnie statystycznie wyższa w nadnerczach szczurów nadciśnieniowych w porównaniu do zwierząt grup kontrolnych.
3. Bardziej znaczące zmiany intensywności reakcji immunohistochemicznej i ekspresji genów między szczurami kontrolnymi i z nadciśnieniem tętniczym były widoczne dla kinazy p-p38.
4. Odwrotna korelacja między poziomami CacyBP/SIP, a p-ERK1/2 i p-p38 może sugerować, że białko CacyBP/SIP defosforyluje kinazy p-ERK1/2 i p-p38 oraz jest zaangażowane w procesy zachodzące w nadnerczach w stanie podwyższonego ciśnienia krwi.

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że w nadciśnieniu dochodzi do zaburzeń funkcji nadnerczy oraz istotnych zmian w ekspresji białka CacyBP/SIP oraz jego substratów ufosforylowanych kinaz p-ERK1/2 i p-p38. Niezbędne jest kontynuowanie dalszych badań, które mogą umożliwić zrozumienie mechanizmów prowadzących do zmian ekspresji CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym.

## VII. STRESZCZENIE

Nadciśnienie tętnicze to choroba cywilizacyjna występująca w globalnym i powszechnym wymiarze oraz jedna z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Nadciśnienie bardzo często pozostaje niezdiagnozowane, ponieważ chorobę tę charakteryzuje utajony i podstępny przebieg. Dlatego tak istotne jest wczesne rozpoznanie, odpowiednia kontrola oraz leczenie farmakologiczne, jak i niefarmakologiczne. Poważne konsekwencje zdrowotne, rozwijające się w przebiegu nadciśnienia, zależą zwykle od powikłań narządowych, będących następstwem negatywnego wpływu podwyższonego ciśnienia krwi na układ sercowo-naczyniowy. Dotyczą one przede wszystkim serca, nerek i mózgu, ale mogą również obejmować nadnercza. Nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy nieprawidłowe wydzielanie zarówno mineralokortykosteroidów jak i katecholamin, które wpływają na homeostazę układu krążenia. Co więcej, zwężenie naczyń skutkuje niedostatecznym dopływem krwi do narządów dokrewnych, co w istotny sposób wpływa na aktywność komórek endokrynowych, natomiast towarzyszący nadciśnieniu stres oksydacyjny może prowadzić do aktywacji szlaków sygnałowych regulujących transkrypcję genów i produkcję mediatorów zapalnych.

CacyBP/SIP jest wielofunkcyjnym białkiem, które bierze udział w wielu ważnych procesach komórkowych. Ostatnie dane literaturowe sugerują, że rola tego białka w różnych szlakach sygnałowych może być związana z defosforylacją kinaz MAPK. Kinazy MAPK regulują aktywność białek, enzymów oraz czynników transkrypcyjnych. Zakres biologicznego działania tych kinaz jest bardzo szeroki, co wskazuje na ich udział w patogenezie wielu chorób. Mając na uwadze fakt, że w nadciśnieniu tętniczym dochodzi do szeregu zdarzeń molekularnych, strategie

terapeutyczne opierające się na ingerencji w szlaki sygnalizacyjne podlegające kinazom p-ERK1/2 oraz p-p38 mogą być istotnym celem w terapii tej choroby.

W celu poszerzenia wiedzy o patogenezie zaburzeń nadnerczy w nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym oraz ze względu na brak doniesień na temat nowej, fosfatazowej funkcji białka CacyBP/SIP w chorobach sercowo-naczyniowych postanowiono przeprowadzić badania, które miały na celu analizę immunohistochemiczną, morfometryczną i ocenę ekspresji genów CacyBP/SIP oraz ERK1/2 i p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem o różnej etiologii.

Badania przeprowadzono na nadnerczach pobranych od 24 szczurów: pięciu szczurów normotensyjnych (WKY), siedmiu szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem układowym (SHR), pięciu szczurów Wistar poddanych uninefektomii (UNX) i siedmiu szczurów z doświadczalnie wywołanym nadciśnieniem wtórnym (DOCA-salt). Po utrwaleniu w zbuforowanej formalinie materiał przeprowadzono do bloczków parafinowych w rutynowy sposób. W celu immunohistochemicznej identyfikacji białka CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko badanym parametrom. Wyniki reakcji immunohistochemicznych oceniano w mikroskopie świetlnym sprzężonym z komputerem i wyposażonym w program morfometryczny NIS-Elements Advanced Research firmy Nikon. Aby porównać profil ekspresji genów *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1* i *Mapk14* w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych wykorzystano metodę Real time PCR. Uzyskane w reakcji PCR wyniki zostały znormalizowane do genu referencyjnego *Gapdh*, natomiast ekspresję genów wyliczono za pomocą metody  $\Delta\Delta Ct$ .

Dane dotyczące intensywności reakcji immunohistochemicznej poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu statystycznego STATISTICA 13.3. PL.



We wszystkich uzyskanych wynikach wyliczono średnią arytmetyczną i błąd standardowy oraz wykonano analizę porównawczą za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA. W celu przeprowadzenia analizy post-hoc użyto testu Najmniejszych Istotnych Różnic Fishera. Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p < 0,05$ .

Analiza densytometryczna wykazała znamienne spadki intensywności reakcji wykazującej białko CacyBP/SIP w nadnerczach szczurów nadciśnieniowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Porównując parametry morfometryczne komórek zawierających p-ERK1/2 wykazano, że w warstwie kłębuszkowatej kory nadnerczy szczurów SHR oraz w rdzeniu zwierząt DOCA-salt nastąpił spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej. W pozostałych warstwach kory nadnerczy szczurów z nadciśnieniem oraz rdzeniu SHR stwierdzono znamienne wzrost immunoreaktywności tej kinazy. Natomiast w przypadku p-p38, wykazano istotny statystycznie wzrost immunoreaktywności tego parametru u szczurów z nadciśnieniem w odniesieniu do szczurów normotensyjnych.

Badania PCR czasu rzeczywistego wykazały istotny statystycznie spadek ekspresji genu kodującego CacyBP/SIP w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Natomiast w przypadku kinaz ERK1/2 i p38 wykazano znamienne statystycznie wzrost ekspresji badanych genów w nadnerczach szczurów nadciśnieniowych w porównaniu do grup kontrolnych.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały zmiany w immunoreaktywności i ekspresji genów kodujących CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem o różnej etiologii. Odwrotna korelacja pomiędzy ekspresją CacyBP/SIP a poziomem p-ERK1/2 i p-p38 sugeruje, że w nadnerczach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym CacyBP/SIP przyczynia się do defosforylacji kinaz MAPK

i regulacji ich funkcji w różnych procesach komórkowych, co może mieć znaczenie w patologii nadciśnienia tętniczego.

## VIII. SUMMARY

Hypertension is a global disease of civilization and one of the most common causes of death in the world. As hypertension is characterized by a latent and insidious course, very often the disease remains undiagnosed. That is why early diagnosis, appropriate control, pharmacological and non-pharmacological treatment are important. The serious health consequences that develop in the course of hypertension usually depend on organ complications. They arise as a result of elevated blood pressure on the cardiovascular system. They mainly affect the heart, kidneys and brain, but they can also include the adrenal glands. Hypertension is accompanied by abnormal secretion of both mineralocorticosteroids and catecholamines which affect cardiovascular homeostasis. Moreover, vasoconstriction results in insufficient blood supply to the endocrine organs, which significantly affects the activity of endocrine cells, while the oxidative stress accompanying hypertension may lead to the activation of signaling pathways regulating gene transcription and the production of inflammatory mediators.

CacyBP/SIP is a multifunctional protein that is involved in many important cellular processes. Recent literature data suggests that the role of this protein in various signaling pathways may be related to dephosphorylation of MAPK kinases. MAPK kinases regulate the activity of proteins, enzymes and transcription factors. The range of biological activity of these kinases is very wide, which indicates their participation in the pathogenesis of many diseases. Considering the fact that a number of molecular events occurs in arterial hypertension, therapeutic strategies based on interfering with the signaling pathways under the p-ERK1/2 and p-p38 kinases may be an important target in the treatment of this disease.

In order to broaden the knowledge about the pathogenesis of adrenal disorders in primary and secondary hypertension, and due to the lack of reports on the new

phosphatase function of the CacyBP/SIP protein in cardiovascular diseases, it was decided to conduct the research aimed at immunohistochemical and morphometric analysis and evaluation of expressing genes such as CacyBP/SIP, ERK1/2 and p38 in rat adrenal glands with hypertension of various etiologies.

The studies were conducted on adrenal glands of 24 rats: five normotensive (WKY) rats, seven genetically determined systemic hypertension (SHR) rats, five uninephrectomized Wistar rats (UNX) and seven rats with experimentally induced secondary hypertension (DOCA-salt). After fixation in buffered formalin, the material was transferred to paraffin blocks in the routine manner. In order to immunohistochemically identify the CacyBP/SIP, p-ERK1/2 and p-p38, reactions were carried out with the use of antibodies against the tested parameters. The results of immunohistochemical reactions were assessed in a computer-coupled light microscope equipped with the Nikon NIS-Elements Advanced Research morphometric program. The Real time PCR method was used to compare the expression profile of the *Cacybp*, *Mapk3*, *Mapk1* and *Mapk14* genes in the adrenal glands of control and hypertensive rats. The results obtained in the PCR reaction were normalized to the *Gapdh* reference gene, while the gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

The data of the intensity of the immunohistochemical reaction was statistically analyzed using the STATISTICA 13.3 package. In all the obtained results, the arithmetic mean and standard error were calculated, and the comparative analysis was performed using the one-way ANOVA test. Fisher's Least Significant Differences test was used in order to perform the post-hoc analysis.

Densitometric analysis demonstrated a decrease in the intensity of the reaction showing the CacyBP/SIP protein in the adrenal glands of the hypertensive rats

compared to the control group. By comparing the morphometric parameters of cells containing p-ERK1/2 it was shown that in the glomerular layer of the adrenal cortex of SHR rats there was a decrease in the intensity of the immunohistochemical reaction in the medulla of the DOCA-salt animals. In the remaining layers of the rat adrenal cortex with hypertension and the SHR medulla, it was found a significant increase in the immunoreactivity of this kinase. However, in the case of p-p38, a statistically significant increase in the immunoreactivity of this parameter was demonstrated in rats with hypertension compared to normotensive rats.

Real-time PCR studies showed a statistically significant decrease in the expression of the gene encoding CacyBP/SIP in the adrenal glands of rats with essential and secondary hypertension. On the other hand, in the case of ERK1/2 and p38 kinases, a statistically significant increase in the expression of the studied genes in the adrenal glands of hypertensive rats was demonstrated as compared to the control groups.

The results of the conducted research showed changes in immunoreactivity and expression of the genes encoding CacyBP/SIP, p-ERK1/2 and p-p38 in the adrenal glands of hypertensive rats of various etiologies. Negative correlation between CacyBP/SIP expression, and the level of p-ERK1/2 and p-p38 suggests that in the adrenal glands of rats with primary and secondary hypertension, CacyBP/SIP contributes to the dephosphorylation of MAPK kinases and regulation of their functions in various cellular processes, which may be important in the pathology of arterial hypertension.

## IX. PIŚMIENNICTWO

1. Aoki K, Tankawa H, Fujinami T, Miyazaki A, Hashimoto Y. Pathological studies on the endocrine organs of the spontaneously hypertensive rats. *Jpn Heart J.* 1963; 4: 426.
2. Au KW, Kou CY, Woo AY, Chim SS, Fung KP, Cheng CH, Waye MM, Tsui SK. Calcyclin binding protein promotes DNA synthesis and differentiation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Cell Biochem.* 2006; 98: 555–566.
3. Bankova VV, Kucherenko AG, Markov KhM. Reactivity of the adrenal cortex and the renin-angiotensin system in young rats with spontaneous hypertension. *Probl Endokrinol (Mosk).* 1980; 26: 62–66.
4. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30: 1392–1398.
5. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38MAPK. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 114-121.
6. Basting T, Lazartigues E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr Hypertens Rep.* 2017; 19: 32.
7. Baszczuk A, Kopczynski Z, Musialik K. Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego na świecie i w Polsce. *Forum Zaburzeń Metabolicznych.* 2014; 5: 141–147.
8. Bexelius TS, Ljung R, Mattsson F, Lagergren J. Cardiovascular disease and risk of acute pancreatitis in a population-based study. *Pancreas.* 2013; 42: 1011–1015.

9. Bhattacharya S, Lee YT, Michowski W, Jastrzębska B, Filipek A, Kuznicki J, Chazin WJ. The modular structure of SIP facilitates its role in stabilizing multiprotein assemblies. *Biochemistry*. 2005; 44: 9462–9471.
10. Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D. Kinazy aktywowane mitogenami i ich znaczenie w patogenezie miażdżycy. *Postępy Hig Med Dośw*. 2014; 16: 10–22.
11. Buendia JR, Bradlee ML, Daniels SR, Singer MR, Moore LL. Longitudinal effects of dietary sodium and potassium on blood pressure in adolescent girls. *JAMA Pediatr*. 2015; 169: 560–568.
12. Burak KW, Lee SS, Beck PL. Portal hypertensive gastropathy and gastric antral vascular ectasia (GAVE) syndrome. *Gut*. 2001; 49: 866–872.
13. Burckle CA, Danser AHJ, Müller DN, Garrelds IM, Gasc JM, Popova E, Plehm R, Peters J, Bader M, Nguyen G. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension*. 2006; 47: 552–556.
14. Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*. 2006; 281: 25215–25222.
15. Charchar F, Zimmerli L, Tomaszewski M. The pressure of finding human hypertension genes: new tools, old dilemmas. *J Hum Hypertens*. 2008; 22: 821–828.
16. Chen Y, Zhang K, Wang X, Li Q, Wu Q, Ning X. Cell cycle-dependent translocation and regulatory mechanism of CacyBP/SIP in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2018; 29: 19-28.
17. Chrostowska M, Szczęch R, Narkiewicz K. Nadciśnienie tętnicze związane z otyłością. *Kardiologia na co dzień*. 2007; 3: 106–112.

18. Chung KF. p38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD. *Chest*. 2011; 139: 1470–1479.
19. Ciechanowicz A, Czekalski S. Aspekty genetyczne nadciśnienia tętniczego. *Postępy Nauk Medycznych*. 2011; 3: 18–30.
20. Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL. Endothelial activation by angiotensin II through NFκB and p38 pathways: involvement of NFκB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol*. 2003; 195: 402-410.
21. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773: 1358–1375.
22. Cuschieri J, Maier RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med*. 2005; 33: 417–419.
23. Dai HL, Hu WY, Jiang LH, Li L, Gaung XF, Xiao ZC. p38 MAPK Inhibition Improves Synaptic Plasticity and Memory in Angiotensin II-dependent Hypertensive Mice. *Sci Rep*. 2016; 6: 27600.
24. Danser AHJ, Deinum J. Renina, prorenina i domniemany receptor (pro) reniny. *Nadciśnienie tętnicze*. 2006; 2: 22–29.
25. Deane HW, Masson GM. Adrenal cortical changes in rats with various types of experimental hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 1951; 11: 193–208.
26. Deane HW, Shaw JH, Greep RO. The effect of altered sodium or potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex. *Endocrinology*. 1948; 43: 133–153.
27. Derks FH, Schalekamp MP, Schalekamp MA. Two step prorenin-renin-conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *J Biol Chem*. 1987; 262: 2472–2477.



28. Desole MS, Sciola L, Delogu MR, Sircana S, Migheli R, Miele E. Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochem Int.* 1997; 31: 169–176.
29. Dimitrova YN, Li J, Lee YT, Rios-Esteves J, Friedman DB, Choi HJ, Weis WI, Wang CY, Chazin WJ. Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. *J Biol Chem.* 2010; 285: 13507–13516.
30. Dodeller F, Schulze-Koops H. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8: 205.
31. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch.* 2010; 460: 703–718.
32. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, Pihur V, Vollenweider P, O'Reilly PF, Amin N, Bragg-Gresham JL, Teumer A, Glazer NL, Launer L, Zhao JH, Aulchenko Y, Heath S, Söber S, Parsa A, Luan J, Arora P, Dehghan A, Zhang F, Lucas G, Hicks AA, Jackson AU, Peden JF, Tanaka T, Wild SH, Rudan I, Igl W, Milaneschi Y, Parker AN, Fava C, Chambers JC, Fox ER, Kumari M, Go MJ, van der Harst P, Kao WH, Sjögren M, Vinay DG, Alexander M, Tabara Y, Shaw-Hawkins S, Whincup PH, Liu Y, Shi G, Kuusisto J, Tayo B, Seielstad M, Sim X, Nguyen KD, Lehtimäki T, Matullo G, Wu Y, Gaunt TR, Onland-Moret NC, Cooper MN, Platou CG, Org E, Hardy R, Dahgam S, Palmen J, Vitart V, Braund PS, Kuznetsova T, Uitterwaal CS, Adeyemo A, Palmas W, Campbell H, Ludwig B, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Palmer ND. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature.* 2011; 478: 103–109.

33. Fan F, He J, Su H, Zhang H, Wang H, Dong Q, Zeng M, Xing W, Sun X. Tribbles Homolog 3-Mediated Vascular Insulin Resistance Contributes to Hypoxic Pulmonary Hypertension in Intermittent Hypoxia Rat Model. *Front Physiol.* 2020; 11: 542146.
34. Filipek A, Góral A. Białko CacyBP/SIP i jego rola w organizacji cytoszkieletu. *Kosmos.* 2018; 67: 131–137.
35. Filipek A, Jastrzębska B, Nowotny M, Kwiatkowska K, Hetman M, Surmacz L, Wyroba E, Kuźnicki J. Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation of the calcyclin-binding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 21103–21109.
36. Filipek A, Kuźnicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin. *J Neurochem.* 1998; 70: 1793–1798.
37. Filipek A, Leśniak W. Current view on cellular function of S100A6 and its ligands, CacyBP/SIP and Sgt1. *Postepy Biochem.* 2018; 64: 242–252.
38. Filipek A, Schneider G, Mietelska A, Figiel I, Niewiadomska G. Age-dependent changes in neuronal distribution of CacyBP/SIP: comparison to tubulin and the tau protein. *J Neural Transm.* 2008; 115: 1257–1264.
39. Filipek A, Wojda U. p30, a novel protein target of mouse calcyclin (S100A6). *Biochem J.* 1996; 320: 585–587.
40. Fu C, Li N, Yuan Y, Wang R, Chen J, Yang J, Guo Z, Wang S, Zhang Y, Liu Y, Dong J. Chronic intermittent hypobaric hypoxia provides vascular protection in the aorta of the 2-kidney, 1-clip rat model of hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018; 96: 807-814.
41. Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase in COPD lungs. *Eur Respir J.* 2013; 42: 28-41.

42. Gao H, Cheng Y, Zong L, Huang L, Qiao C, Li W, Gong B, Hu J, Liu H, Wang X, Zhao C. Aspirin attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by suppressing the ERK/MAPK pathway. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2017; 39: 34-41.
43. Głuszek J, Kosicka T. Czy nadciśnienie tętnicze jest przewlekłą chorobą zapalną? *Via Medica*. 2011; 15: 363-370.
44. Góral A, Bieganowski P, Prus W, Krzemień-Ojak Ł, Kądziołka B, Fabczak H, Filippek A. Calyculin Binding Protein/Siah-1 Interacting Protein Is a Hsp90 Binding Chaperone. *PLoS One*. 2016; 11: e0156507.
45. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 335–346.
46. Ha SK. Dietary salt intake and hypertension. *Electrolyte Blood Press*. 2014; 12: 7–18.
47. Harada G, Neng Q, Fujiki T, Katakura Y. Molecular mechanisms for the p38-induced cellular senescence in normal human fibroblast. *J Biochem*. 2014; 156: 283–290.
48. Harrison DG. The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2013; 7: 68–74.
49. Hashimoto K, Makino S, Hirasawa R, Takao T, Sugawara M, Murakami K, Ono K, Ota Z. Abnormalities in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats during development of hypertension. *Endocrinology*. 1989; 125: 1161–1167.
50. He FJ, MacGregor GA. Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2007; 22: 298–305.

51. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348: 593–600.
52. Hong ZH, Chen HX, Hong HX, Lin L, Wang ZF. Study on expression of mkp-1 and p-ERK in acute contusive spinal cord injury rat's model. *J Mol Cell Biol.* 2008; 41: 207–212.
53. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109: 649–657.
54. Iyer A, Chan V, Brown L. The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Curr Cardiol Rev.* 2010; 6: 291–297.
55. Jiang HL, Jiang LM, Han WD. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in lung cancer stem cells is a potential target for the development of novel anticancer drugs. *J BUON.* 2015; 20: 1094–1100.
56. Ju H, Behm DJ, Nerurkar S, Eybye ME, Haimbach RE, Olzinski AR, Douglas SA, Willette RN. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 1. p38 MAPK-dependent endothelial dysfunction and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307: 932–938.
57. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology, Tenth Edition. *Appleton & Lange.* 2003: 413–420.
58. Jurewicz E, Miazga K, Fabczak H, Sławińska U, Filipek A. CacyBP/SIP in the rat spinal cord in norm and after transection - Influence on the phosphorylation state of ERK1/2 and p38 kinases. *Neurochem Int.* 2020; 138: 104757.

59. Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Hayashi M, Inagami T. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int.* 2006; 70: 641–646.
60. Kasacka I, Piotrowska Ż, Weresa J, Filipek A. Comparative evaluation of CacyBP/SIP protein,  $\beta$ -catenin, and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of rats with hypertension of different etiology. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018; 243: 1199-1206.
61. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365: 217-223.
62. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK, He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *J Hypertens.* 2004; 22: 11–19.
63. Kilańczyk E, Filipek S, Filipek A. ERK1/2 is dephosphorylated by a novel phosphatase CacyBP/SIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 404: 179–183.
64. Kilańczyk E, Filipek A, Hetman M. Calcyclin-binding protein/ Siah-1-interacting protein as a regulator of transcriptional responses in brain cells. *J Neurosci Res.* 2015; 93: 75–81.
65. Kilańczyk E, Filipek S, Jastrzebska B, Filipek A. CacyBP/SIP binds ERK1/2 and affects transcriptional activity of Elk-1. *Biochem Biophys Res Comm.* 2009; 380: 54–59.
66. Kilańczyk E, Wasik U, Filipek A. CacyBP/SIP phosphatase activity in neuroblastoma NB2a and colon cancer HCT116 cells. *Biochem Cell Biol.* 2012; 90: 558–564.

67. Kitagawa K, Skowrya D, Elledge SJ, Harper JW, Hieter P. SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell*. 1999; 4: 21–33.
68. Kleina A. Molekularne podstawy regulacji hormonalnej. *Wyd UJ*. 2002: 1–232.
69. Kokot F, Ficek R. Patogenetyczne aspekty układu reninowo-angiotensynowo-aldosteronowego -wczoraj i dziś. *Kardiologia Polska*. 2001; 54: 295–301.
70. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Cohen DM, Anderson S. Renal p38 MAP kinase activity in experimental diabetes. *Lab Invest*. 2007; 87: 548-558.
71. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 717–726.
72. Kurtz TW, Morris RC Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987; 10: 127–131.
73. Kyotani Y, Zhao J, Tomita S, Nakayama H, Isosaki M, Uno M, Yoshizumi M. Olmesartan inhibits angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Pharmacol Sci*. 2010; 113: 161-168.
74. Lee YT, Dimitrova YN, Schneider G, Ridenour WB, Bhattacharya S, Soss SE, Caprioli RM, Filipek A, Chazin WJ. Structure of the S100A6 complex with a fragment from the C-terminal domain of Siah-1 interacting protein: a novel mode of S100 protein target recognition. *Biochemistry*. 2008; 47: 10921–10932.
75. Lee MR, Dominguez C. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem*. 2005; 12: 2979–2994.

76. Lee SH, Kwak CH, Lee SK, Ha SH, Park J, Chung TW, Ha KT, Suh SJ, Chang YC, Chang HW, Lee YC, Kang BS, Magae J, Kim CH. Anti-Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells Is Accompanied With the Down-Regulation of iNOS, COX-2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- $\kappa$ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway. *J Cell Biochem.* 2016; 117: 978-987.
77. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension.* 2019; 73: 87–120.
78. Leśniak W, Szczepańska A, Kuźnicki J. Calcyclin (S100A6) expression is stimulated by agents evoking oxidative stress via the antioxidant response element. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1744: 29–37.
79. Li W, Guo A, Wang L, Kong Q, Wang R, Han L, Zhao C. Expression of peptide fragments from proADM and involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in pulmonary remodeling induced by high pulmonary blood flow. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016; 56: 28-34.
80. Li ZY, Li B, Wu YL, Xie QP. Acute pancreatitis associated left-sided portal hypertension with severe gastrointestinal bleeding treated by transcatheter splenic artery embolization: a case report and literature review. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013; 14: 549–554.
81. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 456–460.
82. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011; 473: 317–325.

83. Lin HY, Lee YT, Chan YW, Tse G. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans. *Biomed Rep.* 2016; 5: 653–659.
84. Liu X, Chen K, Zhuang Y, Huang Y, Sui Y, Zhang Y, Lv L, Zhang G. Paeoniflorin improves pressure overload-induced cardiac remodeling by modulating the MAPK signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Biomed Pharmacother.* 2019; 111: 695-704.
85. Luo Y, Fu C, Wang Z, Zhang Z, Wang H, Liu Y. Asiaticoside attenuates the effects of spinal cord injury through antioxidant and anti-inflammatory effects, and inhibition of the p38-MAPK mechanism. *Mol Med Rep.* 2015; 12: 8294-8300.
86. Łącka K, Czyżyk A. Hormony a układ sercowo-naczyniowy. *Endokrynol Pol.* 2008; 59: 420–432.
87. Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, Esposito B, Belmin J, Lecomte D, Tedgui A. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001; 56: 719-723.
88. Małyшко J, Mastej M, Banach M, Tykarski A, Narkiewicz K, Hoffman P, Jankowski P, Nowicki MP, Tomasik T, Windak A, Olszanecka A, Motyl A, Nowak D, Skowron Ł, Tomaszewski M, Beaney T, Xia X, Nillson P, Poulter NR, Józwiak J. Do we know more about hypertension in Poland after the May Measurement Month 2017? - Europe. *Eur Heart J Suppl.* 2019; 21: 97–100.
89. Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. Wytyczne ESH/ESC dotyczące postępowania w nadciśnieniu tętniczym w 2013 roku. Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa



- Nadciśnienia Tętniczego (ESH) i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) do spraw postępowania w nadciśnieniu tętniczym. *Kardiologia Pol.* 2013; 71: 27–118.
90. Mao JB, Xu CX, Jiang R. Expressions of phospho-Erk1/2 and phospho-Akt1 in the corpus cavernosum of spontaneous hypertensive rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010; 16: 24-28.
  91. Matsuzawa S, Li C, Ni CZ, Takayama S, Reed JC, Ely KR. Structural analysis of Siah1 and its interactions with Siah-interacting protein (SIP). *J Biol Chem.* 2003; 278: 1837-1840.
  92. Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell.* 2001; 7: 915–926.
  93. Mercado N, To Y, Kobayashi Y, Adcock IM, Barnes PJ, Ito K. p38 mitogen-activated protein kinase- $\gamma$  inhibition by long-acting  $\beta$ 2 adrenergic agonists reversed steroid insensitivity in severe asthma. *Mol Pharmacol.* 2011; 80: 1128–1135.
  94. Müller DN, Fischli W, Clozel JP, Hilgers KF, Bohlender J, Ménard J, Busjahn A, Ganten D, Luft FC. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res.* 1998; 82: 13–20.
  95. Nabi AH, Kageshima A, Uddin MN, Nakagawa T, Park EY, Suzuki F. Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. *Int J Mol Med.* 2006; 18: 483–488.
  96. Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Yoshimura SI, Taniyama Y, Aoki M, Matsubara H, Kim S, Kaneda Y, Ogihara T. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase downstream of bax-caspase-3 pathway leads to cell death

- induced by high D-glucose in human endothelial cells. *Diabetes*. 2001; 50: 1472–1481.
97. Nath P, Leung SY, Williams A, Noble A, Chakravarty SD, Luedtke GR, Medicherla S, Higgins LS, Protter A, Chung KF. Importance of p38 mitogen-activated protein kinase pathway in allergic airway remodelling and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol*. 2006; 544: 160–167.
98. NFZ o zdrowiu. Nadciśnienie tętnicze. Warszawa. 2019: 5–46.
99. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int*. 2006; 69: 1503–1506.
100. Niklas A, Flotyńska A, Puch-Walczak A, Polakowska M, Topór-Mądry R, Polak M, Piotrowski W, Kwaśniewska M, Nadrowski P, Pająk A, Bielecki W, Kozakiewicz K, Drygas W, Zdrojewski T, Tykarski A. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the adult Polish population – Multicenter National Population Health Examination Surveys – WOBASZ studies. *Archiv Med Sci*. 2018; 14: 951–961.
101. Ning X, Chen Y, Wang X, Li Q, Sun S. The potential role of CacyBP/SIP in tumorigenesis. *Tumour Biol*. 2016; 37: 10785-10791.
102. Ning X, Sun S, Hong L, Liang J, Liu L, Han S, Liu Z, Shi Y, Li Y, Gong W, Zhang S, Chen Y, Guo X, Cheng Y, Wu K, Fan D. Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer. *Mol Cancer Res*. 2007; 5: 1254–1262.
103. Ning X, Sun S, Zhang K, Liang J, Chuai Y, Li Y, Wang X. S100A6 protein negatively regulates CacyBP/SIP-mediated inhibition of gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis. *PLoS One*. 2012; 7: e30185.
104. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27: 282–293.

105. Oliver JA. Receptor-mediated actions of renin and prorenin. *Kidney Int.* 2006; 69: 13–15.
106. Orre LM, Pernemalm M, Lengqvist J, Lewensohn R, Lehtiö J. Up-regulation, modification, and translocation of S100A6 induced by exposure to ionizing radiation revealed by proteomics profiling. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6: 2122–2131.
107. Ozawa Y, Kobori H, Suzuki Y, Navar LG. Sustained renal interstitial macrophage infiltration following chronic angiotensin II infusions. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292: 330–339.
108. Paszun S, Stanisław B. Rys historyczny – nadciśnienie tętnicze, układ renina-angiotensyna i synteza pierwszego inhibitora enzymu konwertującego angiotensynę. *Nowiny Lekarskie.* 2008; 77: 392–398.
109. Petrich BG, Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 2: 50–55.
110. Piotrowska Ż, Niezgoda M, Łebkowski W, Filipek A, Domian N, Kasacka I. Sex differences in distribution of cannabinoid receptors (CB1 and CB2), S100A6 and CacyBP/SIP in human ageing hearts. *Biol Sex Differ.* 2018; 9: 50.
111. Piotrowska Ż, Niezgoda M, Młynarczyk G, Acewicz M, Kasacka I. Comparative Assessment of the WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway, CacyBP/SIP, and the Immunoproteasome Subunit LMP7 in Various Histological Types of Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2020; 10: 566637.
112. Podolec P, Karch I, Pająk A, Kopec G, Broda G, Drygas W, Rynkiewicz A, Zdrojewski T, Cieśliński A. Przegląd polskich badań epidemiologicznych w kardiologii. *Kardiologia Pol.* 2006; 64: 1031–1037.

113. Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, Russo G, Echart C, Maffei A, De Simoni MG, Lembo G. Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26: 253–262.
114. Pullikuth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: A perspective. *Cell Signal.* 2007; 19: 1621–1632.
115. Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 995–1001.
116. Ram CVS. Hypertension: A Clinical Guide. *CRC Press.* 2014: 1–140.
117. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007; 26: 3100–3112.
118. Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Saetta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J.* 2008; 31: 62-69.
119. Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J.* 2014; 35: 1245–1254.
120. Rosińska S, Filipek A. Interaction of CacyBP/SIP with NPM1 and its influence on NPM1 localization and function in oxidative stress. *J Cell Physiol.* 2018; 233: 8826–8838.
121. Rosińska S, Leśniak W, Filipek A. Distinct effect of CacyBP/SIP on the ERK1/2-CREB BDNF pathway in undifferentiated and differentiated neuroblastoma NB2a cells. *Neurochem Int.* 2016; 97: 65–72.
122. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol.* 2001; 29: 41–48.

123. Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* 2005; 31: 151–174.
124. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 16–20.
125. Saba-El-Leil MK, Frémin C, Meloche S. Redundancy in the World of MAP Kinases: all for One. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 67.
126. Santelli E, Leone M, Li C, Fukushima T, Preece NE, Olson AJ, Ely KR, Reed JC, Pellecchia M, Liddington RC, Matsuzawa S. Structural analysis of Siah1-Siah-interacting protein interactions and insights into the assembly of an E3 ligase multiprotein complex. *J Biol Chem.* 2005; 280: 34278-34287.
127. Schmieder RE. End organ damage in hypertension. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107: 866–873.
128. Schneider G, Nieznanski K, Kilanczyk E, Bieganowski P, Kuznicki J, Filipek A. CacyBP/SIP interacts with tubulin in neuroblastoma NB2a cells and induces formation of globular tubulin assemblies. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773: 1628-1636.
129. Seeger FH, Sedding D, Langheinrich AC, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibition of the p38 MAP kinase in vivo improves number and functional activity of vasculogenic cells and reduces atherosclerotic disease progression. *Basic Res Cardiol.* 2010; 105: 389–397.
130. Selye H, Bois P. The hormonal production of nephrosclerosis and periarteritis nodosa in the primate. *Br Med J.* 1957; 26: 183–186.
131. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA.* 2003; 290: 2945-2951.

132. Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, Kirschenbaum F, Finney-Hayward TK, Higgins LS, Giembycz MA, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol.* 2006; 149: 393–404.
133. Sparrenberger F, Cichelero F, Ascoli A, Fonseca F, Weiss G, Berwanger O, Fuchs S, Moreira L, Fuchs F. Does psychosocial stress cause hypertension? A systematic review of observational studies. *J Hum Hypertens.* 2009; 23: 12–19.
134. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhäger WH. Essential hypertension. *Lancet.* 2003; 361: 1629-1641.
135. Stepaniak U, Micek A, Waśkiewicz A, Bielecki W, Drygas W, Janion M, Kozakiewicz K, Niklas A, Puch-Walczak A, Pająk A. Prevalence of general and abdominal obesity and overweight among adults in Poland. Results of the WOBASZ II study (2013–2014) and comparison with the WOBASZ study (2003-2005). *Pol Arch Med Wewn.* 2016; 126: 662–671.
136. Suligowska K, Gajewska M, Stokwiszewski J, Gaciong Z, Bandosz P, Wojtyniak B, Rutkowski M, Cianciara D, Wyrzykowski B, Zdrojewski T. Niedostateczna wiedza Polaków na temat kryteriów nadciśnienia tętniczego i jego powikłań – wyniki badania NATPOL 2011. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2014; 18: 9–18.
137. Sun S, Ning X, Liu J, Liu L, Chen Y, Han S, Zhang Y, Liang J, Wu K, Fan D. Overexpressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356: 864–871.
138. Suvila K, McCabe EL, Lehtonen A, Ebinger JE, Lima JAC, Cheng S, Niiranen TJ. Early On-set Hypertension Is Associated With Hypertensive End-Organ Damage Already by MidLife. *Hypertension.* 2019; 74: 305-312.

139. Tang Y, Zhan W, Cao T, Tang T, Gao Y, Qiu Z, Fu C, Qian F, Yu R, Shi H. CacyBP/SIP inhibits Doxorubicin-induced apoptosis of glioma cells due to activation of ERK1/2. *IUBMB Life*. 2016; 68: 211-219.
140. Taracha A, Kotarba G, Wilanowski T. Metody analizy fosforylacji białek. *Postępy Biochemii*. 2017; 63: 137-142.
141. Tian XY, Wong WT, Xu A, Chen ZY, Lu Y, Liu LM, Lee VW, Lau CW, Yao X, Huang Y. Rosuvastatin improves endothelial function in db/db mice: role of angiotensin II type 1 receptors and oxidative stress. *Br J Pharmacol*. 2011; 164: 598-606.
142. Tobian L, Lange JM, Ulm KM, Wold LJ, Iwai J. Potassium prevents death from strokes in hypertensive rats without lowering blood pressure. *J Hypertens Suppl*. 1984; 2: 363–366.
143. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, Menard J, Schambelan M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. *J Clin Invest*. 1989; 83: 673–687.
144. Topolska-Woś AM, Chazin WJ, Filipek A. CacyBP/SIP- Structure and variety of functions. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1860: 79-85.
145. Topolska-Woś AM, Rosińska S, Filipek A. MAP kinase p38 is a novel target of CacyBP/SIP phosphatase. *Amino Acids*. 2017; 49: 1069–1076.
146. Topolska-Woś AM, Shell SM, Szczepanowski RH, Kilańczyk E, Chazin WJ, Filipek A. Dimerization and phosphatase activity of CacyBP/SIP: the influence of oxidative stress. *FASEB J*. 2015; 29: 1711–1724.
147. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981; 48: 309–319.

148. Twigger S, Lu J, Shimoyama M, Chen D, Pasko D, Long H, Ginster J, Chen CF, Nigam R, Kwitek A, Eppig J, Maltais L, Maglott D, Schuler G, Jacob H, Tonellato PJ. Rat Genome Database (RGD): mapping disease onto the genome. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 125–128.
149. Tykarski A, Narkiewicz K, Gaciong Z, Januszewicz A, Litwin M, Kostka-Jeziorny K. Zasady postepowania w nadciśnieniu tętniczym – 2015 rok. *Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce.* 2015; 1: 1–70.
150. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW, Griswold DE. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: 895–902.
151. Viridis A, Giannarelli C, Neves MF, Taddei S, Ghiadoni L. Cigarette smoking and hypertension. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 2518–2525.
152. Walczak EM, Hammer GD. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11: 14–28.
153. Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, Su DF. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32: 545–552.
154. Wasik U, Kadziolka B, Kilańczyk E, Filipek A. Influence of S100A6 on CacyBP/SIP phosphorylation and Elk-1 transcriptional activity in neuroblastoma NB2a cells. *J Cell Biochem.* 2016; 117: 126–131.
155. Wasik U, Schneider G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M, Fabczak H, Weis S, Zabke C, Harrington CR, Filipek A, Niewiadomska G. Calcyclin binding protein and Siah-1 interacting protein in Alzheimer’s disease pathology: neuronal localization and possible function. *Neurobiol Aging.* 2013; 34: 1380–1388.



156. Wei S, Zhang J, Yang L, Chang Y, Guo F, Jing L. Effect of adrenomedullin on renal arteriole remodeling in spontaneous hypertensive rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2014; 34: 1140-1144.
157. WHO, 2013. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2013.2\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf) (07.07.2022)
158. WHO, 2014. <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3155> (07.07.2022)
159. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, De Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018; 39: 3021–3104.
160. Willette RN, Eybye ME, Olzinski AR, Behm DJ, Aiyar N, Maniscalco K, Bentley RG, Coatney RW, Zhao S, Westfall TD, Doe CP. Differential effects of p38 mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase 2 inhibitors in a model of cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 330: 964-970.
161. Wong TY, Mitchell P. The eye in hypertension. *Lancet*. 2007; 369: 425–435.
162. Wu J, Tan X, Peng X, Yuan J, Qiang B. Translocation and phosphorylation of calcyclin binding protein during retinoic acid-induced neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5 cells. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36: 354–358.
163. Xiao B, Liu F, Jin YH, Jin YQ, Wang L, Lu JC, Yang XC. Renal sympathetic denervation attenuates left ventricle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by suppressing the Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Clin Exp Hypertens*. 2021; 43: 142-150.

164. Yates R, Katugampola H, Cavlan D, Cogger K, Meimaridou E, Hughes C, Metherell L, Guasti L, King P. Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2013; 106: 239–312.
165. Ying Xu, Qin Gu, Chen Qu. Capsaicin pretreatment reversed pulmonary arterial hypertension by alleviating inflammation via p38MAPK pathway. *Experimental Lung Research.* 2017; 43: 8-18.
166. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005; 15: 11–18.
167. Zdrojewski T, Więcek A, Grodzicki T, Broda G, Bandosz P, Mossakowska M, Ślusarczyk P, Chudek J, Wizner B, Wyrzykowski B. Rozpowszechnienie, świadomość i skuteczność leczenia nadciśnienia tętniczego u osób powyżej 65. roku życia w Polsce, w: Mossakowska A, Więcek A, Błedowski P. PolSenior. Aspekty medyczne, psychologiczne, socjologiczne i ekonomiczne starzenia się ludzi w Polsce. *Termedia.* 2012: 155–168.
168. Zhai H, Shi Y, Jin H, Li Y, Lu Y, Chen X, Wang J, Ding L, Wang X, Fan D. Expression of calcyclin-binding protein/Siah- 1 interacting protein in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56: 765–772.
169. Zhang Y, Luo X, Zhou Y, Wu H, Chen J, Wang Y, Chen D, Xu Z, Yan S, Wei W. 2K1C-activated Angiotensin II (Ang II) exacerbates vascular damage in a rat model of arthritis through the ATR/ERK1/2 signaling pathway. *Inflamm Res.* 2017; 66: 881-890.
170. Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC. New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol.* 2013; 4: 166.

## X. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

|                  |  | strona |
|------------------|--|--------|
|                  | <b>Tabele:</b>   |        |
| <b>Tabela 1.</b> | Wybrane polskie badania epidemiologiczne dotyczące rozpowszechnienia nadciśnienia.   | 14     |
| <b>Tabela 2.</b> | Zróżnicowanie czynnościowe i morfologiczne kory nadnerczy.   | 30     |
| <b>Tabela 3.</b> | Odczynniki wykorzystane w reakcjach immunohistochemicznych oraz warunki przeprowadzania reakcji.   | 50     |
| <b>Tabela 4.</b> | Średnie wartości skurczowego ciśnienia krwi (mmHg) szczurów w grupach kontrolnych i z nadciśnieniem (średnia $\pm$ SD).  | 58     |
| <b>Tabela 5.</b> | Intensywność reakcji immunohistochemicznej wykazującej białko CacyBP/SIP, p-ERK1/2 i p-p38 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych (średnia $\pm$ SE; $p < 0,05$ ).  | 76     |
| <b>Tabela 6.</b> | Ekspresja genów kodujących CacyBP/SIP ( <i>Cacybp</i> ), ERK1/2 ( <i>Mapk3</i> , <i>Mapk1</i> ), p38 ( <i>Mapk14</i> ) w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych.  | 77     |
|                  | <b>Ryciny:</b>   |        |
| <b>Ryc. 1.</b>   | Schemat przedstawiający aktualną klasyfikację ciśnienia tętniczego (opracowanie własne).   | 20     |
| <b>Ryc. 2.</b>   | Schemat prezentujący domenę N-końcową, środkową CS oraz C-końcową SGS białka CacyBP/SIP wraz z miejscami wiązania białek efektorowych. Białko tau, Hsp90 i tropomiozyna zostały uwzględnione na schemacie jednak jak dotąd miejsce ich wiązania nie zostało zidentyfikowane. | 36     |
| <b>Ryc. 3.</b>   | Schemat przedstawiający kaskadę przekazywania sygnału przez kinazy MAP.  | 40     |
| <b>Ryc. 4.</b>   | Przygotowanie matrycy do krzywych wzorcowych.  | 55     |
| <b>Ryc. 5.</b>   | Profil termiczny. W krokach od 1 do 4 została zobrazowana amplifikacja w czasie rzeczywistym; w 5 i 6 krzywa topnienia produktów PCR.  | 56     |
| <b>Ryc. 6.</b>   | Ekspresja genu <i>Cacybp</i> w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych.  | 78     |
| <b>Ryc. 7.</b>   | Ekspresja genu <i>Mapk3</i> kodującego ERK1 w nadnerczach szczurów   | 79     |

kontrolnych i nadciśnieniowych.

- Ryc. 8.** Ekspresja genu *Mapk1* kodującego ERK2 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych. 80
- Ryc. 9.** Ekspresja genu *Mapk14* kodującego p38 w nadnerczach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych. 81

**Fotografie:**

- Fot. 1.** Pozytywny wynik reakcji wykazującej białko CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x 200. 59
- Fot. 2.** Immunoreaktywność CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x 200. 59
- Fot. 3.** Śladowa immunoreaktywność białka CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem SHR. Pow. x 200. 60
- Fot. 4.** Słabsza immunoreaktywność CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Pow. x 200. 60
- Fot. 5.** Fragment nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pozytywna reakcja immunohistochemiczna wykazująca białko CacyBP/SIP w korze narządu. Pow. x 200. 61
- Fot. 6.** Reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała wykazującego CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x 200. 62
- Fot. 7.** Reakcja immunohistochemiczna przeciwko CacyBP/SIP w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem DOCA-salt. Pow. x 200. 63
- Fot. 8.** Widoczny pozytywny immunosygnal wykazujący białko CacyBP/SIP w rdzeniu nadnercza szczura z nadciśnieniem DOCA-salt. Pow. x 200. 63
- Fot. 9.** Immunoreaktywność p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura kontrolnego WKY. Pow. x 200. 64
- Fot. 10.** Umiarkowana reaktywność p-ERK1/2 obserwowana w rdzeniu nadnercza szczura normotensyjnego WKY. Pow. x 200. 65
- Fot. 11.** Reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała wykazującego p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura SHR. Pow. x 200. 66

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Fot. 12.</b> | Fragment nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Widoczny pozytywny immunosygnal wykazujący p-ERK1/2 w rdzeniu narządu. Pow. x 200.                        | 66 |
| <b>Fot. 13.</b> | Immunoreaktywność p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x 200.  | 67 |
| <b>Fot. 14.</b> | Widoczna pozytywna reakcja wykazująca p-ERK1/2 w komórkach rdzenia nadnercza szczura z grupy UNX. Pow. x 200.  | 68 |
| <b>Fot. 15.</b> | Pozytywny odczyn immunohistochemiczny po zastosowaniu przeciwciała wykazującego p-ERK1/2 w korze nadnercza szczura nadciśnieniowego DOCA-salt. Pow. x 200. | 69 |
| <b>Fot. 16.</b> | Immunoreaktywność p-ERK1/2 w rdzeniu nadnercza z nadciśnieniem eksperymentalnym DOCA-salt. Pow. x 200.   | 69 |
| <b>Fot. 17.</b> | Fragment nadnercza szczura normotensyjnego WKY. Słaba reakcja immunohistochemiczna wykazująca p-p38 w korze. Pow. x 200.                                   | 70 |
| <b>Fot. 18.</b> | Umiarkowana reaktywność p-p38 w rdzeniu nadnercza szczura normotensyjnego WKY. Pow. x 200.   | 71 |
| <b>Fot. 19.</b> | Reakcja immunohistochemiczna wykazująca p-p38 w korze nadnercza szczura nadciśnieniowego SHR. Pow. x 200.  | 72 |
| <b>Fot. 20.</b> | Pozytywny wynik reakcji wykazującej p-p38 w komórkach rdzenia nadnercza szczura z nadciśnieniem pierwotnym. Pow. x 200.                                    | 72 |
| <b>Fot. 21.</b> | Pozytywny wynik reakcji wykazującej p-p38 w korze nadnercza szczura UNX. Pow. x 200.   | 73 |
| <b>Fot. 22.</b> | Pojedyncze komórki p-p38-immunoreaktywne w rdzeniu nadnercza szczura kontrolnego UNX. Pow. x 200.  | 74 |
| <b>Fot. 23.</b> | Detekcja p-p38 w korze nadnercza szczura z nadciśnieniem wtórnym DOCA-salt. Pow. x 200.  | 74 |
| <b>Fot. 24.</b> | Słaba immunoreaktywność p-p38 w rdzeniu nadnercza szczura nadciśnieniowego DOCA-salt. Pow. x 200.  | 75 |