



**UNIVERSITÀ DI PARMA**

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE

CICLO XXXI

BILANCIO DELL'ACQUA E SVILUPPO E MANTENIMENTO DELL'IPERTENSIONE  
ARTERIOSA: EVIDENZE IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI IPERTENSIONE  
POLIGENICA

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Carlo Ferrari

Tutori:  
Chiar.mo Prof. Riccardo Volpi  
Chiar.mo Prof. Aderville Cabassi

Dottorando: Dott Alessandro Vignali

Anni 2015/2018

*“La donna? Solo il diavolo sa cos’è”*  
*Fedor Dovstoevskij*

A mia moglie Michela

<b>1.IPERTENSIONE ARTERIOSA</b>	<b>6</b>
<b>2.IL RUOLO DEL RENE NEL CONTROLLO DELLA PRESSIONE ARTERIOSA</b>	<b>9</b>
2.1.ATTIVITA' SIMPATICA RENALE	10
2.SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE	15
2.3.VASOPRESSINA	18
<b>3.OSSIDO NITRICO ED IPERTENSIONE ARTRIOSA</b>	<b>21</b>
<b>4.MODELLI ANIMALI DI RATTO NELLO STUDIO DELL'IPERTENSIONE</b>	<b>26</b>
<b>5.MATERIALI E METODI</b>	<b>29</b>
5.1. SCOPO DELLO STUDIO	29
5.2.STORIA NATURALE NEL RATTO SHR E WKY DALLA FASE PRE-IPERTENSIVA ALLA FASE IPERTENSIVA CON SVILUPPO DI DANNO D'ORGANO	29
5.3.TRATTAMENTO ATTIVO CON ANTAGONISTI RECETTORIALI V2	30
5.4.STUDIO DELL' INTERAZIONE TRA NO E ADH	31
<b>6.RISULTATI</b>	<b>33</b>
6.1. STORIA NATURALE NEL RATTO SHR E WKY DALLA FASE PRE-IPERTENSIVA ALLA FASE IPERTENSIVA CON SVILUPPO DI DANNO D'ORGANO	33
6.2. TRATTAMENTO ATTIVO CON ANTAGONISTI RECETTORIALI V1 E V2	33
6.3. STUDIO DELL' INTERAZIONE TRA NO E ADH	34
<b>7.DISCUSSIONE</b>	<b>47</b>
<b>8.BIBLIOGRAFIA</b>	<b>50</b>

## RIASSUNTO

Il bilancio del sodio, includendo sia l'introito che l'escrezione renale, rappresentano un elemento fondamentale nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa nell'uomo ed in modelli sperimentali. Unitamente al bilancio del sodio che regola notoriamente il volume cellulare e la pressione arteriosa, risultano disregolazioni del bilancio dell'acqua nel corso dello sviluppo e del mantenimento dell'ipertensione arteriosa. Il rene rappresenta l'organo di controllo della pressione arteriosa a lungo termine attraverso il bilancio idroelettrolitico. L'incrementato riassorbimento sodico da parte del rene sembrerebbe costituire un elemento precoce dello sviluppo dell'ipertensione. Anche il bilancio dell'acqua sembra essere coinvolto. Lo studio sviluppato fa riferimento alle alterazioni a livello renale della sensibilità all'ADH e conseguentemente all'espressione dei canali dell'acqua (aquaporine) quale elemento precoce coinvolto nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa. Il nostro studio mostra come, in un modello sperimentale di ipertensione arteriosa essenziale, quindi poligenico, l'incrementato riassorbimento di acqua sembrerebbe precedere, o comunque accompagnare, un bilancio sodico positivo. La sensibilità incrementata all'ADH risulta evidente all'età di 4-5 settimane del modello di ratti spontaneamente ipertesi che risultano in questa fase ancora normotesi. Un'aumentata sensibilità all'ADH si esplica in un'aumentata espressione tissutale (tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle) di un trasportatore di osmoli organiche quali il BGT-1 (trasportatore per la betaina). Tali alterazioni non sono più rilevabili in ratti SHR di 28-30 settimane, una fase dell'ipertensione arteriosa nella quale è presente anche il danno d'organo renale. Nella fase precedente lo sviluppo dell'ipertensione arteriosa del modello SHR il trattamento, per un breve periodo, dalla 25° alla 49° giornata di vita, con un antagonista dei recettori V2 dell'ADH comporta un ritardo nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa in questo modello sperimentale. I valori di NOx plasmatici ed urinari negli SHR in fase pre-ipertensiva risultano essere aumentati rispetto al gruppo di controllo di ratto WKY della stessa età.

In relazione all'osservazione di un'incrementata generazione di metaboliti dell'NO nel plasma e nelle urine degli SHR in fase pre-ipertesi e dell'effetto dell'antagonista dei recettori V2 dell'ADH, abbiamo trattato un gruppo di ratti WKY con inibitore della NOS a basso dosaggio tale da non indurre rialzo

pressorio. Questo modello animale presenta una lieve riduzione del volume di diuresi ed un incremento della sensibilità all'ADH espressa da un incremento della concentrazione urinaria di acquaporine<sup>2</sup>. I livelli di nitriti e nitrati nel plasma e nelle urine risultano ridotti. Il trattamento con antagonista V<sub>2</sub> in questo modello trattato contemporaneamente con L-NAME, induce poliuria nel ratto senza modificare le concentrazioni urinarie di nitriti e nitrati. Queste ultime osservazioni non sembrano di facile interpretazione e confrontando i due set di esperimenti è possibile osservare come sia i valori di nitrati elevati che bassi valori di nitrati potrebbero associarsi ad aumentata sensibilità all'ADH o comunque ad incremento delle concentrazioni urinarie di acquaporine<sup>2</sup>.

Ciò che è possibile trarre dal primo set di esperimenti è che un precoce bilancio positivo di acqua anticipi le alterazioni del bilancio del sodio, indicando quindi una incrementata sensibilità all'azione dell'ADH nella fase precoce di sviluppo di ipertensione in questo modello sperimentale di ipertensione essenziale.

## 1. IPERTENSIONE ARTERIOSA

L'ipertensione arteriosa è una condizione clinica cronica caratterizzata da un aumento dei valori tensivi a livello del letto vascolare arterioso ed associata ad un incrementato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari e insufficienza renale cronica (1).

Sulla base di dati epidemiologici, nel 2015 è stata stimata una prevalenza globale di circa 1,13 miliardi soggetti ipertesi, di cui 150 milioni di casi concentrata nell'Europa centrale e orientale, con una leggera prevalenza per quanto riguarda i soggetti di sesso maschile (24%) rispetto le femmine (20%) (1). La prevalenza complessiva dell'ipertensione nei soggetti adulti è compresa tra il 30-45% (2).

I valori soglia con la quale si definisce un soggetto iperteso sono di fatto arbitrari essendo i valori tensivi una variabile normalmente distribuita nella popolazione generale; si può quindi definire l'ipertensione come il livello di pressione al quale i benefici del trattamento, inteso sia in termini di modificazione degli stili di vita che in termini di trattamento farmacologico, ne superano inequivocabilmente i rischi (3).

Tuttavia, non vi è un consenso unanime nel definire i valori di pressione soglia con la quale considerare un soggetto iperteso o normoteso. Difatti, se si prendono in considerazione le linee guida dell'European Society of Cardiology and European Society of Hypertension (ESC/ESH), si definisce iperteso quel paziente che presenta valori di pressione sistolica  $\geq 140$  mmHg o valori di pressione diastolica  $\geq 90$  mmHg (3), mentre l'American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) definiscono iperteso il soggetto che presenta valori di pressione sistolica  $\geq 130$  mmHg o valori di pressione diastolica  $\geq 80$  mmHg (4).

Classificazione del grado di ipertensione secondo linee guida ESC/ESH			
GRADO	PRESSIONE SISTOLICA		PRESSIONE DIASTOLICA
Ottimale	<120	e	<80
Normale	120-129	e/o	80-84
Normale-alto	130-139	e/o	85-89
Ipertensione di Grado 1	140-159	e/o	90-99
Ipertensione di grado 2	160-179	e/o	100-109
Ipertensione di grado 3	$\geq 180$	e/o	$\geq 110$
Ipertensione sistolica isolata	$\geq 140$	e	<90

Tabella 1: Classificazione del grado di ipertensione secondo le linee guida EC/ESH. Valori di pressione sistolica e diastolica espressi in mmHg (3)

Classificazione del grado di ipertensione secondo linee guida ACC/AHA			
GRADO	PRESSIONE SISTOLICA		PRESSIONE DIASTOLICA
Normale	<120	e	<80
Elevata	120-129	e	<80
Ipertensione Stadio 1	130-139	o	80-89
Ipertensione Stadio 2	140-159	e/o	90-99

Tabella 2: Classificazione del grado di ipertensione secondo le linee guida ACC/AHA. Valori di pressione sistolica e diastolica espressi in mmHg (4).

Nei soggetti ipertesi, circa il 90% presenta un quadro di ipertensione idiopatica o primitiva, definita ipertensione essenziale; nel restante 10% dei casi invece l'ipertensione arteriosa viene definita secondaria, nel momento in cui sono identificabili le cause sottostanti dei valori tensivi (5).

Nonostante i progressi nella diagnosi e nel trattamento, l'ipertensione arteriosa rimane ancora un importante problema di salute pubblica.

L'ipertensione arteriosa risulta essere uno dei principali fattori di rischio, a livello mondiale, per quanto riguarda la morte prematura (6); Inoltre, il maggior numero di decessi correlati all'ipertensione arteriosa risulta rappresentato dalla cardiopatia ischemica, ictus emorragico ed ictus ischemico (6). Studi hanno inoltre documentato come l'incremento della pressione arteriosa sia associata ad un aumentato rischio di sviluppare di deterioramento cognitivo e demenza (7) (8).

L'ipertensione arteriosa si è inoltre dimostrata essere un fattore di rischio cardiovascolare, indipendentemente dal gruppo etnico di appartenenza (9) (10) e indipendentemente dall'età (11). Per quanto riguarda i valori tensivi e rischio cardiovascolare, diversa risulta essere l'importanza che assumono i valori di pressione diastolica (DBP) e sistolica (SBP) in considerazione dell'età, risulta avere una significativa rilevanza. In soggetti con un'età inferiore ai 50 anni l'elevazione della DBP si associa ad un incremento rischio cardiovascolare rispetto i soggetti anziani, mentre, nei soggetti con un'età superiore ai 50 anni i valori SPB sono migliori predittori di rischio cardiovascolare rispetto i valori di DBP (11) (12) (13).

Data la necessità del trattamento nel paziente iperteso, a quale target pressorio fare riferimento?

Un recente studio pubblicato nel 2015, il Systolic Blood Pressure Intervention Trial (SPRINT) (14), in cui 9361 pazienti ipertesi di età superiore ai 50, sono stati randomizzati in due braccia di trattamento dei quali, uno a ricevere un trattamento intensivo volto a ridurre i valori tensivi al di sotto di 120 mmHg, l'altro a

ricevere invece un trattamento intensivo volto a mantenere i valori di pressione sistolica al di sotto dei 140 mmHg, ha messo in evidenza una significativa riduzione degli eventi cardiovascolari e della mortalità nei pazienti il cui target pressorio era inferiore a 120 mmHg (14).

Secondo le nuove linee guida ESC/ESH 2018, tuttavia, i nuovi valori target da raggiungere sono stati leggermente modificati: 120-129 mmHg per i pazienti con meno di 65 anni, 130-139 mmHg per i soggetti al di sopra dei 65 anni (3).

Nel caso di un paziente con più di 80 anni, mai trattato con terapia antiipertensiva, il trattamento dovrà essere avviato per valori di pressione sistolica pari o superiori a 160 mmHg (3).

La task force di Esperti ha inoltre raccomandato di non abbassare la pressione sistolica al di sotto dei 120 mmHg perché i danni potrebbero essere superiori ai benefici .

La scelta del trattamento deve basarsi sin dall'inizio sull'associazione di due principi attivi evitando l'approccio terapeutico a "gradini" che non sembra coprire in maniera adeguata i pazienti; l'associazione di due principi attivi, di fatti, favorisce l'aderenza alla terapia garantendo un maggior numero di pazienti in target con un netto miglioramento della copertura anti-ipertensiva ed una considerevole riduzione del tasso di mortalità (3).

Fondamentale, inoltre, risulta la modifica degli stili di vita tra cui abolizione del fumo di sigaretta, incremento dell'attività fisica ed una dieta a basso contenuto di NaCl.

## 2.IL RUOLO DEL RENE NEL CONTROLLO DELLA PRESSIONE ARTERIOSA

Il livello della pressione arteriosa dipende da due variabili emodinamiche fondamentali, la gittata cardiaca e le resistenze periferiche (15) secondo la formula:

$$\text{Pressione Arteriosa} = \text{Gittata cardiaca} \times \text{Resistenze periferiche}$$

Pertanto, fattori che sono in grado di influenzare la gittata cardiaca e/o le resistenze periferiche, sono in grado di determinare modificazioni sia in senso positivo che in senso negativo sui valori tensivi a livello del sistema arterioso.

La regolazione del bilancio di sodio e acqua, in grado di influenzare la gittata cardiaca, il tono vasomotore, in grado di influenzare le resistenze periferiche, sono i capisaldi della regolazione della pressione arteriosa. Entrambi i fattori sono influenzati da fattori genetici ed ambientali e regolati mediante meccanismi a feedback ormonale e nervoso (16).

Il rene gioca un ruolo da protagonista nella regolazione della pressione arteriosa attraverso la regolazione del bilancio di acqua e sodio.

Dati sperimentali provenienti da studi su ratti hanno infatti documentato come il trapianto di rene (rene denervato) da animale normoteso in ricevente iperteso sia in grado di determinare una riduzione dei valori pressori (17) e come invece il trapianto di rene da un animale iperteso in un animale normoteso determini un significativo incremento pressorio (18). Tali osservazioni sono state successivamente confermate anche nell'uomo nell'uomo (19).

In condizioni normali, un incremento della pressione arteriosa determina un aumento della pressione di perfusione a livello renale. Questo aumento di pressione di perfusione renale si traduce in un'incrementata escrezione urinaria di acqua e sodio con conseguente riduzione del volume extracellulare a cui consegue una riduzione dei livelli tensivi (20).

E' attraverso la regolazione del bilancio di acqua e sodio il rene esplica la sua principale azione nel controllo a lungo termine della pressione arteriosa.

## 2.1. ATTIVITA' SIMPATICA RENALE

L'innervazione simpatica del rene gioca un ruolo fondamentale nel controllo della pressione arteriosa e, in seguito ad una sua aumentata attivazione risulta avere un ruolo cruciale nella patogenesi della ipertensione. E' stato infatti dimostrato che l'incremento dell'attività simpatica renale contribuisce all'incremento dei valori pressori attraverso almeno tre meccanismi che includono :

- 1) incremento a livello renale del riassorbimento urinario di acqua e sodio;
- 2) riduzione del flusso ematico renale e riduzione della velocità di filtrazione glomerulare;
- 3) rilascio da parte delle cellule juxtaglomerulari di renina cui consegue l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS).

La riduzione dell'attività simpatica a livello renale produce effetti opposti (21).

L'innervazione simpatica a livello renale è prevalentemente di natura adrenergica e pertanto il principale neurotrasmettitore risulta essere la noradrenalina, la quale esplica la sua azione per il tramite di diversi tipi di recettori adrenergici. I recettori adrenergici primariamente identificati, si suddividono in recettori  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenergici, a livello dei quali si distinguono dei sottotipi recettoriali quali gli  $\alpha$ 1- (A1R) e  $\alpha$ 2-adrenorecettori (A2R) e  $\beta$ 1- (B1R),  $\beta$ 2- (B2R) e  $\beta$ 3-adrenorecettori (B3R). I recettori A1R e A2R a loro volta vengono suddivisi in diverse sottopopolazioni recettoriali, distinguendosi i recettori  $\alpha$ 1A- (A1<sub>a</sub>R),  $\alpha$ 1B- (A1<sub>b</sub>R) e  $\alpha$ 1D (A1<sub>d</sub>R) e  $\alpha$ 2A- (A2<sub>a</sub>R),  $\alpha$ 2B- (A2<sub>b</sub>R) e  $\alpha$ 2C-adrenorecettori (A2<sub>c</sub>R) (22).

I dati presenti in letteratura suggeriscono che la riduzione del flusso ematico renale sia prevalentemente mediata dall'attivazione degli A1<sub>a</sub>R; l'attivazione di questi recettori ad opera della noradrenalina infatti determina una vasocostrizione sia dell'arteriola afferente che dell'arteriola efferente, con conseguente riduzione del flusso ematico a livello glomerulare e riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (22). I recettori A1<sub>b</sub>R risultano invece prevalentemente implicati nei meccanismi di regolazione del riassorbimento del sodio a livello tubulare (22). A livello della membrana basolaterale delle cellule tubulari del tubulo prossimale vi è una considerevole espressione di recettori A1<sub>a</sub>R la cui stimolazione determinerebbe un incremento del riassorbimento di acqua e sodio. L'aumentata stimolazione dei recettori A1<sub>a</sub>R infatti si

traduce in un incremento dell'attività dello scambiatore  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , con conseguente incremento del riassorbimento di sodio a cui segue, un incrementato riassorbimento di acqua (22).

I recettori  $\text{A}_{2a}\text{R}$  e  $\text{A}_{2c}\text{R}$  risultano invece implicati nel controllo di noradrenalina a livello sinaptico. Infatti la stimolazione recettoriale a livello pre-sinaptico, riduce, mediante un meccanismo di feed-back negativo il rilascio della noradrenalina a livello della sinapsi (22).

L'attivazione dei recettori  $\text{A}_{2}\text{R}$ , oltre a determinare un'azione sinergica con gli  $\text{A}_{1}\text{R}$  a livello del tubulo prossimale per quanto concerne il riassorbimento di sodio, sono in grado di aumentare la diuresi interferendo in senso negativo con i meccanismi di secrezione della vasopressina (ADH) ed inibendone quindi l'azione a livello del dotto collettore ne riducono il riassorbimento di acqua (21).

Per quanto riguarda i recettori  $\beta$ -adrenergici, si distinguono recettori  $\beta_1$ -adrenergici ( $\text{B}_{1}\text{R}$ ) distribuiti a livello delle cellule juxtaglomerulari, a livello del tubulo distale e del dotto collettore. La loro attivazione determina la stimolazione, a livello delle cellule juxtaglomerulari, della liberazione di renina; per quanto concerne invece i recettori  $\beta_2$ -adrenergici ( $\text{B}_{2}\text{R}$ ), questi sono localizzato solamente a livello del tubulo prossimale e distale ed a livello del dotto collettore. A livello corticale la loro attivazione si traduce in un aumentato riassorbimento di  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , mentre a livello corticale e midollare mediano il riassorbimento di  $\text{NaCl}$  (21).

Effetti mediati dall'attivazione recettoriale		
	EFFETTO	RECETTORE
Arteria Renale	Vasocostrizione Vasodilatazione	$\alpha_1$ $\alpha_2$ $\text{D}_1$
Secrezione di Renina	↑ ↓	$\beta_1$ $\alpha_2$
Produzione di prostaglandine	↓	$\alpha_1$
TUBULO PROSSIMALE		
Riassorbimento di Sodio	↑ ↓	$\alpha_1$ $\alpha_2$ D
Riassorbimento $\text{HCO}_3^-$	↑	$\alpha_1$
Attività controtrasporto Na-H	↑ ↓	$\alpha_2 > \alpha_1$ $\text{D}_1$
Glucogenesi	↑	$\alpha_1$
TUBULO DISTALE		
Riassorbimento di $\text{Na}^+$	↓	$\alpha_2$
Riassorbimento di $\text{Cl}^-$	↑	$\beta$
Secrezione di $\text{K}^+$	↑	$\beta_1$

Tabella 3: effetti sulla funzione renale mediata dall'attivazione del sistema nervoso simpatico renale

L'attività del sistema simpatico renale è regolata a livello centrale dai nuclei localizzati a livello ipotalamico e a livello del midollo allungato, tra i quali il nucleo ventricolare (PVN) il nucleo rostrale ventrolaterale (RVLM) e rostrale ventromediale (RVMM). I neuroni localizzati a livello del nucleo ventromediale esplicano un'attività simpatico-eccitatoria, giocando un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività dei nervi afferenti al rene, come documentato da evidenze sperimentali sul modello animale, nel quale, la distruzione dei neuroni del nucleo ventromediale, comporterebbe una importante riduzione dei valori pressori, mentre invece la stimolazione di questo nucleo, mediante l'iniezione di amminoacidi eccitatori determinerebbe un incremento dei valori tensivi (23) (24).

I neuroni del nucleo RVLM proiettano ai neuroni pre-gangliari a livello della colonna cellulare interno-medio-laterale del midollo spinale che attraverso efferenze post-gangliari, proiettano a livello degli organi periferici quali arterie cuore e rene (25).

In risposta ad un incremento della pressione arteriosa, i barocettori localizzati a livelli del seno carotideo e dell'arco aortico, tramite fibre afferenti localizzate prevalentemente all'interno del nervo vago e nel nervo glossofaringeo, inviano stimoli nervosi ai neuroni del nucleo del tratto solitario, i quali a loro volta proiettano a livello del nucleo caudale ventrolaterale del midollo allungato (CVLM). Successivamente, la neurotrasmissione tra il CVLM e il RVLM, mediata da neuroni di natura GABAergica, pertanto inibitori, che sopprimendo l'attività del RVLM, riducono l'attività del sistema nervoso simpatico renale, riducendo quindi, in ultima analisi, i valori tensivi (21). Fibre sensoriali afferenti provenienti dal rene, che proiettano a livello del RVLM attraverso il PVN ed il NTS, integrano il controllo centrale dell'attività simpatica a livello renale.

Le fibre nervose afferenti ed efferenti si ridistribuiscono a livello della pelvi renale separatamente tra di loro, nonostante decorrano all'interno dello stesso fascio di nervi. Studi anatomici eseguiti su scimmie e ratti, hanno permesso di localizzare i corpo cellulari dei neuroni da cui originano le fibre afferenti al rene, prevalentemente a livello dei gangli dorsali dei nervi spinali nei tratti di midollo spinale compreso tra T12-L1 (26). Le fibre afferenti del sistema nervoso simpatico renale risultano quindi modulate, grazie alla presenza di archi riflessi, dall'attività delle fibre efferenti mediante interazione con i recettori  $\alpha_1$ -  $\alpha_2$ -adrenergici. E' grazie a questa intima relazione tra fibre efferenti e fibre afferenti che si viene a sviluppare il riflesso reno-renale, che unitamente al controllo da parte del Sistema Nervoso Centrale, gioca un ruolo

fondamentale della modulazione dell'attività del sistema nervoso simpatico renale. Il riflesso reno-renale è un riflesso di natura inibitoria tramite il quale, l'attivazione della segnalazione nervosa attraverso le fibre efferenti, si determina una riduzione dell'attività simpatica delle fibre afferenti a livello renale, sia ipsilaterale che controlaterale; questa riduzione quindi dell'attività delle fibre simpatiche afferenti ai reni si traduce in una incrementata natriuresi ed incremento del volume di diuresi

La misurazione dell'attività nervosa a livello delle fibre efferenti post-gangliari hanno dimostrato che nei nervi simpatici diretti a cuore, rene e muscolatura scheletrica è comunemente incrementata nei pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale (27) (28); l'incremento quindi dell'attività nervosa simpatica determinerebbe l'innescò e successivamente il mantenimento degli elevati livelli pressori. A livello renale l'iperattività simpatica quindi determinerebbe un incremento della secrezione di renina ed un incremento del riassorbimento di sodio e acqua con conseguente sviluppo di ipertensione.

Quale sia il meccanismo che determina l'iperattivazione del sistema nervoso simpatico tuttora non è stato ancora chiarito; ciononostante un recente lavoro pubblicato da Li e collaboratori ha suggerito un possibile ruolo del peptide ipotalamico Orexina come fattore in grado di influire sull'iperattivazione simpatica. I recettori dell'Orexina a livello del sistema nervoso sono localizzati in molte aree deputate al controllo della pressione arteriosa quali il PVN, l'RVLM, la colonna interno-medio-laterale del midollo spinale ed a livello dei neuroni pregangliari dei nervi simpatici (29). Utilizzando un modello sperimentale animale di ratti SHR e sottoponendoli alla somministrazione di Almorexant, un inibitore reversibile dei recettori dell'Orexina, Li e collaboratori hanno evidenziato una significativa riduzione dei valori tensivi, dell'attività del sistema nervoso simpatico e nei livelli di noradrenalina e adrenalina, sia a livello del liquido cefalorachidiano che a livello plasmatico (29). Queste osservazioni inducono quindi a pensare che, in rapporto anche alla presenza dei recettori per l'Orexina in specifiche aree cerebrali deputate al controllo della pressione arteriosa, questo peptide possa avere un gioco di forza nel controllo dell'iperattività simpatica.

Altri dati a supporto del ruolo dell'Orexina nel controllo della pressione arteriosa provengono dai risultati degli studi condotti da Clifford (30); ratti SHR differiscono a livello ipotalamico dai WHY per una maggior densità, nell'ipotalamo mediale, di orexin neurons. Pertanto l'incremento di questa popolazione neuronale potrebbe determinare una sovraregolazione della segnalazione nervosa Orexina mediata, fattore che

potrebbe quindi incrementare l'attività del sistema nervoso renale simpatico con conseguente sviluppo, nel tempo, dell'ipertensione

## 2.SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è un complesso sistema enzimatico che gioca un ruolo integrante nella complessa omeostasi della pressione arteriosa, nel controllo della perfusione tissutale e nel controllo del volume extracellulare (31). Inizia attraverso la biosintesi e la secrezione di renina a livello delle cellule juxtaglomerulari del rene. La secrezione di renina è regolata da 4 fattori indipendenti tra loro quali:

- 1) il meccanismo barorecettoriale renale a livello dell'arteriola afferente in grado di attivarsi in seguito a modificazioni della pressione di perfusione renale;
- 2) modificazioni della concentrazione di Cl<sup>-</sup> a livello della macula densa (che insieme alle cellule juxtaglomerulari costituisce l'apparato juxtaglomerulare);
- 3) stimolazione nervosa simpatica mediata dai recettori beta-1 adrenergici;
- 4) feed-back negativo mediante azione diretta dell'angiotensina II (Ang-II) a livello delle cellule juxtaglomerulare.

Pertanto, attraverso questi meccanismi, una riduzione della pressione di perfusione renale, un incremento dell'attività nervosa renale o una riduzione delle concentrazioni tubulari di NaCl determineranno una stimolazione in senso positivo sulla secrezione di renina. Il controllo della secrezione reninica è il punto chiave dell'attività del sistema RAAS (31). Una volta liberata ed immessa nella circolazione, la renina è in grado di scindere l'angiotensinogeno, prodotto dal fegato, in angiotensina I (Ang I); successivamente per effetto dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), l'Ang-I viene convertita in Ang-II, una molecola octapeptidica che è la componente fisiologicamente attiva (32).

L'azione Ang-II si esplica mediante l'interazione con specifici recettori. I recettori di tipo II dell'angiotensina (AT-2) sono principalmente espressi in diversi tessuti durante la vita fetale, espressione che si riduce marcatamente nel periodo postnatale. Ciononostante vi sono evidenze nel soggetto adulto che, nonostante di una bassa espressione di AT-2, tale recettore possa mediare effetti di vasodilatazione ed antiproliferativi e mediare nel rene il riassorbimento di sodio a livello del tubulo prossimale (31). I recettori di tipo I per l'angiotensina (AT-1) sono invece particolarmente rappresentati a livello vascolare, renale, encefalico e

surrenalico, dove mediano la maggior parte degli effetti biologici dell'Ang-II quali vasocostrizione, incremento della pressione arteriosa, incremento della contrattilità cardiaca, riassorbimento tubulare di sodio e rilascio da parete della zona glomerulare del surrene di aldosterone (31) (32). A livello surrenalico la l'AT-1 promuove la traslocazione del colesterolo a livello della membrana mitocondriale interna e l'attivazione dell'aldosterone sintetasi, attraverso la trascrizione del gene CYP11B2, con conseguente sintesi ormonale (33).

L'Ang-II, sebbene il principale, non è l'unico fattore in grado di regolare la sintesi e quindi la secrezione di aldosterone da parte della ghiandola surrenalica. Ad esempio, il potassio è in grado di determinare in maniera indipendente dal sistema renina-angiotensina un controllo sulla secrezione di aldosterone. In seguito alla depolarizzazione della membrana plasmatica delle cellule della granulosa del surrene, si vengono ad attivare canali per il  $Ca^{++}$  voltaggio dipendenti con conseguente sviluppo di una corrente per il  $Ca^{++}$ . lo sviluppo di tale corrente ionica porta all'attivazione della chinasi calmodulina-dipendente che a sua volta attiva fattori di trascrizione per CYP11B2, con conseguente incremento della sintesi ormonale (33).

Anche la neurotrasmissione mediata dalla dopamina sembra avere un ruolo nella regolazione della secrezione di aldosterone. Come documentato infatti da Carey (34), l'infusione di Metoclopramide, un inibitore dei recettori D2 della dopamina, determina un incremento delle concentrazioni plasmatiche di aldosterone. Sebbene l'ACTH sia principalmente coinvolto nella regolazione della secrezione del cortisolo da parte della ghiandola surrenalica, di fatto esplica anche una funzione stimolatoria, mediante meccanismi a feed-back positivo, a livello della zona glomerulare del surrene. Il meccanismo tramite il quale è in grado di determinare un incremento della secrezione di aldosterone si esplica mediante interazione con il recettore di tipo 2 della melanocortina determinando un incremento del trasporto di colesterolo a livello della membrana mitocondriale interna con conseguente aumento della sintesi di aldosterone (33). Anche l'ormone antidiuretico (ADH) e il peptide natriuretico atriale (ANP) sono in grado di stimolare la secrezione di aldosterone; il primo mediante interazione con specifici recettori a livello della superficie cellulare delle cellule della zona granulosa, mentre il secondo interverrebbe nella regolazione della secrezione dell'aldosterone modulando la corrente calcio-dipendente, e inibendo, mediante feed-back negativo la secrezione di renina e ACTH

L'aldosterone esplica la sua azione principale a livello del tubulo distale e del dotto collettore regolando il riassorbimento di sodio e di acqua attraverso i canali epiteliali del sodio (ENaC). In seguito infatti all'azione dell'aldosterone a livello delle cellule bersaglio, si osserva un incremento della densità degli ENaC a livello della membrana apicale delle cellule principali e questo avviene mediante due meccanismi:

- 1) Incrementata sintesi di ENaC a livello della membrana luminale delle cellule tubulari. Sebbene la regolazione dell'espressione genica avviene in una fase precoce, dopo poche ore dalla stimolazione indotta dall'aldosterone, di fatto l'effetto finale risulta tardivo, osservandosi solo dopo la produzione e la traslocazione di nuove pompe a livello della membrana apicale della cellula tubulare (33). ;
- 2) Ridotta degradazione degli ENaC, meccanismo mediato dall'attivazione della chinasi 1 (SCK1), che viene attivata molto precocemente, dopo circa 30 minuti dalla stimolazione indotta dall'aldosterone, e che comporta la fosforilazione dell'ubiquitina ligasi Nedd 4-2. La fosforilazione dell' ubiquitina ligasi Nedd 4-2 ne comporta la sua disattivazione con conseguente blocco della degradazione degli ENaC (33).

L'azione a livello renale dell'aldosterone comporta pertanto un incrementato riassorbimento di  $\text{Na}^{++}$  attraverso gli ENaC con conseguente aumentato riassorbimento di acqua.

Pertanto una riduzione della pressione di perfusione e di conseguenza una ridotta perfusione a livello dell'arteriola afferente determinata per esempio da una riduzione del volume circolante induce la secrezione da parte delle cellule juxtaglomerulari, che rivestono l'arteriola afferente e sono sensibili allo stiramento, di renina; questo meccanismo a sua volta risulta essere rinforzato dall'aumentata attività del sistema simpatico renale e dalla riduzione della concentrazione di NaCl nella pre-urina rilevata dalle cellule della macula densa a livello del tubulo distale (31).

Le diverse azioni svolte dall'Ang-II sono pertanto fondamentali nel mantenimento dell'omeostasi circolatori; infatti, oltre ad incrementare la secrezione di aldosterone a livello della corteccia surrenalica, l'Ang-II promuove la vasocostrizione arteriolare sistemica e renale e media i meccanismi di riassorbimento del sodio nella porzione tubulare prossimale.

## 2.3.VASOPRESSINA

Oltre al RAAS, a livello renale, il bilancio di sodio e acqua è altamente influenzato dall'azione dell'ADH

L'ADH è prodotto dai neuroni magnocellulari dei nuclei sovraottico e paraventricolare dell'ipotalamo e dai neuroni parvocellulari. Questo ormone non solo è immagazzinato e rilasciato dalla neuroipofisi, ma è anche in grado di penetrare, attraverso il circolo portale, a livello dell'ipofisi anteriore, dove è in grado di stimolare la secrezione di ACTH.

L'azione dell'ADH si esercita mediante l'interazione con i suoi specifici recettori, i quali appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G. Sono noti 2 diversi recettori della vasopressina. Il recettore V1 (V1R) è a sua volta distinto in V1aR e V1bR. V1aR è particolarmente espresso a livello delle cellule muscolari lisce, dove esercita un'azione vasocostrittrice, mentre il V1bR è espresso a livello dell'adenipofisi e media il rilascio di ACTH. Per quanto riguarda invece il V2R, questo è particolarmente espresso a livello delle cellule principali del dotto collettore del nefrone. L'azione esplicata dall'ADH a livello renale è fondamentale nel mantenimento del bilancio idrico e la cellula chiave che media questo processo è la cellula principale presente a livello del dotto collettore. Tale cellula presenta a livello basolaterale specifici canali per l'acqua costitutivamente espressi, le aquaporine 3 e 4 (AQP3-4). La porzione apicale risulta essere impermeabile all'acqua per la mancanza di specifici canali; la permeabilità all'acqua è quindi influenzata dalla disponibilità di altri canali per l'acqua, le aquaporine 2 (AQP2) (35).

A livello renale quindi, il legame dell'ADH al suo specifico recettore determina l'attivazione della cascata intracellulare del segnale mediata dall'adenilato ciclasi con conseguente formazione di cAMP e PKA cui segue controllo dell'espressione genica e traslocazione sulla membrana luminale delle AQP2 (36). Solo dopo la traslocazione delle AQP2 a livello della membrana luminale, le cellule principali sono in grado di poter riassorbire acqua a livello del dotto collettore, riassorbimento che è reso possibile dalla presenza di un gradiente osmotico tra il lume del dotto collettore e il fluido extracellulare.

Diversi sono i sistemi di controllo che regolano la secrezione di ADH da parte dell'ipofisi posteriore, tra questi l'osmolarità plasmatica e lo stato volemico.

Il trigger determinato dall'osmolarità plasmatica sul rilascio di ADH da parte della neuroipofisi è mediato dalla presenza di neuroni, localizzati a livello ipotalamico, con funzioni osmorecettoriali. La sensibilità al rilascio di ADH da parte della neuroipofisi in seguito a modificazioni della osmolarità plasmatica è estremamente sensibile; in condizioni fisiologiche l'incremento dell'1% dell'osmolarità plasmatica è in grado di determinare l'incremento della concentrazione plasmatica di ADH di 1 pg/mL, mentre in condizioni di stress osmotico la risposta secretiva della neuroipofisi può portare a concentrazioni plasmatiche di ADH a 15-20 pg/mL. Questa elevata sensibilità conferisce al controllo osmorecettoriale un ruolo primario nel controllo della secrezione di ADH. Per quanto riguarda invece lo stato volemico, sebbene meno sensibile rispetto al controllo osmorecettoriale, possiede la caratteristica di incrementare in maniera esponenziale il rilascio di ADH da parte della neuroipofisi. Una riduzione del 5%-10% del volume plasmatico di norma ha uno scarso effetto sul rilascio di ADH, mentre perdite del 20-30% del volume circolante sono in grado di innescare una risposta secretiva (50-100 pg/mL) molto superiore rispetto al livello richiesto per ottenere il massimo dell'azione antidiuretica (37).

Condizione necessaria affinché l'acqua sia riassorbita a livello dei dotti collettori, oltre a rendere permeabile la membrana apicale delle cellule principali mediante la traslocazione di AQP2, risulta essere la formazione di un gradiente osmotico tra lume ed interstizio. Questo è reso possibile dall'iperosmolarità interstiziale della midollare del rene; nella formazione del gradiente osmotico lo stesso ADH gioca un ruolo fondamentale, attraverso meccanismi che coinvolgono il riassorbimento di sodio e di urea a livello del dotto collettore.

Incrementando l'attività di specifici trasportatori per l'urea, UT-A1 e l'UT-A3, localizzati a livello dei dotti collettori a livello della midollare interna, l'ADH influenza, in senso positivo il riassorbimento dell'urea (38).

Data la relativa impermeabilità del dotto collettore all'urea, questa viene progressivamente concentrata dal riassorbimento di acqua fino a raggiungere la papilla renale. A tale livello, per l'azione mediata dall'ADH sugli specifici trasportatore, l'urea viene riassorbita a livello interstiziale (37).

L'ADH inoltre è in grado di influenzare il riassorbimento di sodio a livello del dotto collettore, azione mediata dai canali epiteliali per il sodio (ENaC) (39)

L'Azione svolta dall'ADH sul riassorbimento di sodio e di urea contribuisce quindi a creare nell'interstizio della midollare del rene un ambiente ipertonico, creando quindi una "forza motrice osmotica" necessaria per il riassorbimento dell'acqua.

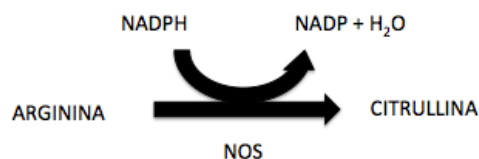
Nonostante l'ipertonicità della midollare sia requisito indispensabile affinché l'acqua venga riassorbita, lo stress osmotico interstiziale comporterebbe un aumento della volumetria cellulare tubulare condizionandone il funzionamento se non corretto attraverso l'attivazione di meccanismi di compenso osmotico. La betaina, presente sia a livello alimentare che prodotta dal metabolismo della colina, è un composto organico osmoticamente attivo che a livello renale preserva le cellule tubulari dagli effetti negativi determinati dallo stress osmotico (40) (41) (42). Le cellule della midollare renale accumulano a livello citosolico betaina dal sangue, tramite la presenza sulla membrana basolaterale, di un trasportatore per la betaina/acido gammamminobutirrico (BGT1). Tale trasportatore risulta inoltre essere particolarmente rappresentato a livello del tratto spesso dell'ansa di Henle ed a livello dei dotti collettori (40) e la sua espressione risulta esserne influenzata dall'osmolarità. In condizioni di isotonicità infatti il BTG1 presenta una scarsa attività, mentre in condizioni di ipertonicità, in seguito all'aumentata trascrizione di mRNA per BT1, si osserva un incremento della capacità di accumulo intracellulare di betaina di 5-10 volte (41).

Essendo la betaina di vitale importanza per la sopravvivenza delle cellule tubulari sottoposte a stress osmotico, e seppur indirettamente, contribuisce quindi al mantenimento del gradiente osmotico a livello interstiziale permettendone quindi il riassorbimento di acqua.

### 3.OSSIDO NITRICO ED IPERTENSIONE ARTRIOSA

L'ossido nitrico (NO) è una specie chimica altamente reattiva, per decenni considerato un gas inquinante e più recentemente riconosciuto come uno dei mediatori chimici più potenti che l'organismo sia in grado di sintetizzare. Trovandosi in uno stato intermedio di ossidazione, la molecola è in grado sia di ossidare che di ridurre i composti chimici con i quali reagisce.

Nell'organismo l'NO può essere generato attraverso due vie: una via non enzimatica, attraverso reazioni di riduzione dei nitriti, oppure attraverso una via enzimatica, catalizzata dall'enzima Ossido Nitrico Sintetasi (NOS), che porta alla sintesi di molecole di NO attraverso la trasformazione di L-Arginina in L-Citrullina secondo la reazione:



Finora sono state identificate tre diverse isoforme di NOS, una delle quali inducibile, mentre le altre costitutivamente rappresentate. Per quanto concerne le forme costitutivamente rappresentate, si riconoscono una isoforma neuronale (nNOS), localizzata nel sistema nervoso centrale e periferico, ed una isoforma endoteliale (eNOS), localizzata nell'endotelio. nNOS ed eNOS risultano essere enzimi Ca<sup>++</sup>-dipendenti in quanto l'attività enzimatica è regolata dalle concentrazioni intracellulari di Ca<sup>++</sup> che legandosi alla calmodulina è in grado di innescare l'attività enzimatica della NOS. Per quanto concerne l'isoforma inducibile (iNOS) questa risulta essere localizzata prevalentemente a livello macrofagico e prodotta in risposta alla stimolazione da parte di diverse citochine durante i processi flogistici. Tale isoforma, oltre ad essere inducibile, si differenzia dalle precedenti per il sistema di controllo dell'attività enzimatica. Risulta essere infatti Ca<sup>++</sup>-indipendente dal momento che la calmodulina si trova di per se già legata all'enzima e la sua attività enzimatica risulta essere quindi regolata dall'attivazione genica che regola la sintesi di calmodulina (43).

Strutturalmente l'enzima NOS è costituito da due domini, un dominio C-terminale, dotato di attività reduttasica ed un dominio N-terminale ad attività ossigenasica al quale si lega il substrato L-Arginina. Inoltre il dominio N-terminale presenta il sito attivo per il citocromo P450 di tipo eme ed il sito di legame per il coenzima tetraidrobiopterina (BH4). Sul versante opposto invece, a livello della regione C-terminale sono presenti siti di legame per il substrato FAD, NADPH e FMN (43).

L'NO è dotato di una potente azione vasodilatante. A livello endoteliale la stimolazione mediata dall'acetilcolina (ACh) e dalla bradichinina determina un incremento delle concentrazioni intracitoplasmatiche di  $Ca^{++}$ , con formazione del complesso  $Ca^{++}$ -calmodulina e conseguente attivazione della eNOS (44). L'NO quindi diffonde a livello della cellula muscolare liscia dove legandosi al gruppo EME della guanilato ciclastasi provoca un immediato e potente incremento dell'attività enzimatica che comporta un aumento della velocità di trasformazione della magnesio guanosina 5'-trifosfato in guanosina 3',5'-monofosfato (GMP ciclico – cGMP) (45).

A livello della cellula muscolare liscia, l'incremento delle concentrazioni intracitoplasmatiche di cGMP determinano un incremento dell'attività della guanilato ciclastasi con conseguente ricaptazione di  $Ca^{++}$  dal citosol al reticolo sarcoplasmatico. Ne deriva quindi una riduzione dei complessi  $Ca^{++}$ -calmodulina, necessari per attivare la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK). L'MLCK attraverso la fosforilazione delle catene leggere della miosina, porta alla formazione di ponti tra i filamenti di actina e miosina con conseguente contrazione cellulare; pertanto una riduzione della sua attività mediata dal cGMP determina il rilasciamento della cellula muscolare liscia cui consegue, a livello vascolare, vasodilatazione (44).

Grazie alla sua azione vasodilatante, l'NO possiede la capacità di influenzare il tono arterioso e pertanto è in grado di determinare modifiche della resistenza vascolare. Quindi alterazioni della sintesi e del rilascio della molecola possono influenzare lo stato tensivo ed in questo senso diverse sono le evidenze in letteratura che evidenziano una relazione tra ipertensione arteriosa e NO.

Ad esempio, in ratti SHR, la sintesi di NO risulta deficitaria (46). In modelli animali, la somministrazione di antagonisti dell'L-Arginina quali la  $N^G$ -monometil-L-arginina (NMMA) o  $N^G$ -nitro-L-arginin metil-estere (L-NAME) determina un incremento dei valori pressori (47) (48). Ciò è determinato dal fatto che, venendo

meno il substrato necessario per produrre NO, inevitabilmente la produzione di NO risulterà deficitaria, con conseguente riduzione degli effetti vasodilatatori mediati dalla molecola. Anche la deficienza di cofattori necessari per l'attività enzimatica della NOS possono determinare una riduzione della produzione di ossido nitrico come documentato dal fatto che, in un modello animale sperimentale, la somministrazione di BH4 previene lo sviluppo di ipertensione (49).

Il ruolo critico dell'NO come fattore fondamentale nello sviluppo dell'ipertensione è inoltre dimostrato dal fatto che in modelli sperimentali animali topi knock-out per il gene dell'eNOS mostrano una tendenza all'incremento della pressione arteriosa nello stato eterozigotico, mentre i topi omozigoti per il disruptor genico presentano elevati livelli tensivi (50).

Una volta rilasciato dalle cellule l'NO va incontro a reazione di autossidazione con produzione di ione nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) il quale, a sua volta, interagendo con l'emoglobina, determina la formazione di ione nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). L'  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  sono relativamente stabili nel plasma e pertanto la loro determinazione può essere utilizzata come indicatore della sintesi endogena dell'NO (51). Sulla base di queste premesse Node e collaboratori, determinando la concentrazione plasmatica di  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  hanno documentato come, in pazienti ipertesi, rispetto i normotesi vi sia una significativa riduzione della sintesi endogena di NO (51).

Dati i noti effetto vasodilatatori dell'NO, sulla base di queste osservazioni è quindi ipotizzabile che in seguito ad una riduzione della sintesi di NO si venga a rompere l'equilibrio tra fattori vasocostrittore e vasodilatatori, a cui consegue un predominante effetto vasocostrittore a livello vasale. La vasocostrizione determina inevitabilmente un incremento delle resistenze periferiche, con conseguente incremento dei valori pressori.

Il ruolo dell'NO nello sviluppo di ipertensione non si esplica solo a livello vascolare, modulandone la vasocostrizione. Dai risultati di diversi studi presenti in letteratura appare infatti evidente un effetto pleiotropico dell'NO quale fattore implicato nell' ipertensione, intervenendo nei meccanismi di bilancio del riassorbimento di sodio e acqua a livello renale, modulando l'attivazione dei recettori A1R ed intervenendo nei meccanismi di attivazione del sistema RAAS (52).

Per quanto riguarda il ruolo dell'NO a livello renale nel mantenimento dell'omeostasi del sodio e dell'acqua, Lahera e collaboratori hanno documentato, su un modello sperimentale animale, un

incremento della capacità del rene di eliminare sodio ed un incremento del volume di diuresi, in seguito all'infusione, a livello dell'arteria renale, di Ach, molecola in grado di mediare il rilascio di NO da parte delle cellule endoteliali (53). Tali dati trovano successivamente conferma negli studi condotti da Majir; bloccando a livello renale l'attività della NOS mediante infusione di analoghi dell'L-arginina ed infondendo successivamente S-nitroso-n-acetilpenicillamina, un potente vasodilatatore che esplica la sua azione mediante il rilascio di NO e quindi in grado di mimare gli effetti dell'NO prodotto dalla NOS, si otteneva un'incrementata risposta natriuretica (54) (55) ed un incremento del volume di diuresi (54).

Tali studi suggeriscono pertanto l'importanza dell'NO nella regolazione del bilancio di acqua e vengono rafforzati dalle osservazioni sperimentali in cui la capacità renale di eliminare acqua e sodio si riduce in seguito all'infusione a livello renale di analoghi dell'L-arginina e conseguente inibizione dell'attività enzimatica della NOS (53) (56) (57).

A livello renale risultano essere espresse tutte le diverse isoforme di NOS (eNOS, nNOS, iNOS). Esiste di fatto una differenza sostanziale però per quanto riguarda la distribuzione della NOS tra la corticale e la midollare del rene. Studi eseguiti sul modello animale di ratto, analizzando l'attività enzimatica della NOS in tessuto omogeneizzato di rene, hanno evidenziato come a livello della midollare interna del rene l'attività della NOS sia circa 25 volte superiore rispetto la midollare esterna e la corticale renale (58).

Mattson e Wu hanno successivamente documentato come l'NO sia un importante regolatore paracrino nel modulare la funzione midollare del rene. Utilizzando come modello sperimentale animale ratti Sprague Dawley, e sottoponendoli all'infusione continua per cinque giorni dell'inibitore della NOS L-NAME, tali autori hanno documentato una significativa riduzione del flusso ematico a livello della midollare del rene, ma non della corticale renale, riduzione del flusso ematico che si associava ad un incremento dei valori tensivi ed ad un incremento del riassorbimento di sodio e ritenzione di acqua con progressivo incremento del peso degli animale; nel momento in cui l'infusione di L-NAME veniva sospesa si assisteva quindi ad normalizzazione del flusso ematico a livello della midollare ed alla comparsa di un bilancio negativo per quel che riguarda l'escrezione di sodio. Gli stessi risultati si ottenevano nel momento in cui l'L-NAME veniva somministrato a livello interstiziale anziché a livello vascolare (59). Utilizzando invece un modello animali di ratti Dahl salt-sensitive, un modello animale caratterizzato dallo sviluppo di ipertensione sale sensibile, e

sottoponendoli all'infusione interstiziale di L-Arginina e soluzione salina, questi autori hanno documentato una risposta negativa in termini di incremento della pressione arteriosa negli animali trattati rispetto ai controlli (59). Nell'insieme pertanto queste osservazione permettono di rilevare l'importanza svolta dalla NOS nel regolare il bilancio di acqua e sodio a livello della midollare e di prevenire lo sviluppo di ipertensione arteriosa sale-sensibile.

#### **4.MODELLI ANIMALI DI RATTO NELLO STUDIO DELL'IPERTENSIONE**

Nell'ambito della ricerca scientifica, i modelli animali sono da sempre utilizzati per comprendere le basi fisiopatologiche delle malattie e studiare possibili interventi terapeutici. L'utilizzo dei modelli animali presenta diversi vantaggi. Tra questi, la similarità con gli esseri umani, sia sul piano anatomico che fisiologico (topi e scimpanzè per esempio hanno in comune rispettivamente il 98% e 99% del patrimonio genetico) ne permette di traslare i risultati e le osservazioni sperimentali sull'uomo; inoltre la semplicità nel poter controllare nel modello animale le diverse variabili sperimentali (es. esposizione a fattori ambientali, somministrazione di cibo, somministrazione di farmaci), l'ottenimento di dati in tempi relativamente brevi e, non da ultimo, costi talvolta più contenuti rispetto a studi sull'uomo, si traducono nella fattibilità del progetto sperimentale(60).

Nell'ambito delle patologie cardiovascolari, in particolare per quanto riguarda lo studio dell'ipertensione, diversi sono i modelli sperimentali murini utilizzati. Uno dei modelli sperimentali più frequentemente utilizzati nell'ambito dello studio delle patologie cardiovascolari prevede l'utilizzo di ratti denominati Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) come gruppo sperimentale, utilizzando ratti Wistar Kyoto (WKY) come gruppo di controllo (61). Gli SHR sono un modello murino di ratti ipertesi introdotto da Okamoto e Aoki nel 1963. Incrociando ratti maschi WKY spontaneamente ipertesi con femmine WKY relativamente ipertese tali ricercatori ottennero, a partire dalla terza generazione, ratti che sviluppavano spontaneamente ipertensione arteriosa, definita come valori di pressione sistolica superiore a 150 mmHg, nella quasi totalità dei casi (62). Questi animali tendono a sviluppare ipertensione arteriosa tra la 12<sup>a</sup> e la 14<sup>a</sup> settimana di vita; tra la 6<sup>a</sup> e l'8<sup>a</sup> settimana di vita invece si osserva lo sviluppo di una fase pre- ipertensiva caratterizzata da valori di pressione sistolica variabili tra i 100-120 mmHg. Come avviene negli esseri umani, nei maschi SHR rispetto le femmine SHR, l'ipertensione arteriosa si sviluppa molto più rapidamente e con valori di pressione sistolica più elevati (61).

L'ipertensione arteriosa essenziale è una patologia multifattoriale nella quale sono coinvolti sia fattori genetici che fattori ambientali; questa multifattorialità rende talvolta difficile lo sviluppo di protocolli di ricerca nell'uomo.

In tale contesto l'utilizzo di ratti SHR come modello sperimentale presenta alcuni vantaggi. Innanzitutto la presenza all'interno di ciascuna colonia di ratti di un pool genico uniforme permette di ottenere delle modificazioni uniformi a carico del sistema cardiovascolare (63). Un altro vantaggio nell'utilizzo di ratti SHR come modello sperimentale nello studio dell'ipertensione è il fatto che la progressione della malattia è molto simile a quanto avviene nell'uomo, passando da una fase pre-ipertensiva, della durata di alcune settimane, fino allo sviluppo dello stato ipertensivo conclamato. Pertanto, la presenza di questa finestra temporale di fase pre-ipertensiva crea un modello animale che da un punto di vista sperimentale ben si adatta allo studio dei meccanismi fisiopatologici alla base dell'ipertensione.

Successivamente, a partire dai ratti SHR sono stati sviluppati altri modelli animali sperimentali che oltre allo studio dell'ipertensione ben si adattano anche a studiare le patologie cardiovascolari correlate all'ipertensione. Un esempio sono i ratti Stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR-SP) (61), un modello animale di ratto caratterizzato dallo sviluppo già alla 5ª settimana di età di elevati livelli di pressione sistolica e con una elevata tendenza a sviluppare lesioni cerebrali ipertensione-correlate. Da questo modello è stato quindi sviluppato un ulteriore subset caratterizzato dallo sviluppo di trombosi spontanea e quindi successivamente denominato Spontaneous Thrombogenic Rats (STR). Un buon modello animale che si adatta allo studio dello scompenso cardiaco correlato all'ipertensione è quello dello Spontaneously Hypertensive Rats with Failure (SHR-F); il limite di questo modello animale è quello di sviluppare insufficienza cardiaca in età avanzata, intorno ai 48 mesi di età, e pertanto a sua volta la funzione cardiaca può essere ulteriormente compromessa dall'aging (64).

Pur essendo un buon modello animale per lo studio dell'ipertensione, i ratti SHR presentano il difetto di avere un pool genetico limitato; per tale motivo sono stati sviluppati altri modelli di ipertensione essenziale geneticamente determinata quali il ceppo francese (Lyone Rats) (65), il ceppo israeliano (Sabra Rats) (66) il ceppo italiano (Milan Rats) (67), il ceppo neozelandese (New Zeland Rats) (68).

Un valido modello animale di ipertensione geneticamente determinata, per quanto riguarda lo studio dell'ipertensione correlata alla sale-sensibilità, è quello dei ratti i Dahl salt-sensitive; questo modello animale è stato sviluppato a partire da ratti Sprague-Dawley sulla base di somministrazione di sale nella dieta (60). I ratti sensibili al sale divengono ipertesi quando assumono un normale contenuto di sodio con la

dieta, mentre invece se sottoposti ad una dieta ricca di sodio (8% di NaCl), sviluppano un'ipertensione grave e fatale. Inoltre questo modello animale si caratterizza per lo sviluppo nefropatia ipertensiva, ipertrofia cardiaca con grave insufficienza cardiaca (60).

Oltre ai modelli animali di ratti ipertesi geneticamente determinati, sono stati sviluppati anche modelli sperimentali nei quali l'influenza genica assume un aspetto secondario nel determinare lo sviluppo di ipertensione. Tra questi i DOCA – salt rats, un modello di ratto mono-nefrectomizzato che sviluppa ipertensione dall'azione combinata di desossicorticosterone acetato, somministrato per via sottocutanea, ed un incrementato apporto dietetico di NaCl. Come i ratti SHR, anche i ratti DOCA – salt si caratterizzano per il fatto che maschi raggiungono valori pressori più elevati rispetto le femmine. Inoltre, questo modello animale si caratterizza per la presenza di un silenziamento dell'attività del RAAS e pertanto possono essere efficacemente utilizzati qualora si vogliano studiare i meccanismi alla base dell'ipertensione non legati all'attivazione del RAAS (60).

I modelli animali di ipertensione reno-vascolare si caratterizzano per il fatto di sviluppare ipertensione arteriosa in seguito all'ischemia renale; modelli animali quindi si caratterizzano per una riduzione del flusso ematico renale secondario al posizionamento di una clip a livello dell'arteria renale. Si distinguono quindi i modelli sperimentali one-kidney one clip (1K1C) model, nel quale un rene viene asportato e nel rimanente viene posizionata una clip a livello dell'arteria renale, i modelli two-kidney one clip (2K1C), dove nell'animale vengono mantenuti entrambi i reni, ma il posizionamento della clip a carico dell'arteria renale coinvolge un solo organo, ed i modelli two-kidney two clip, che si differenziano dai precedenti per il fatto di posizionare i clip a carico delle arterie renali di entrambi gli organi (2K2C) (61) .

Esistono quindi una vasta gamma di modelli animali di ratto utili in ambito scientifico per lo studio dell'ipertensione arteriosa; ciononostante sebbene la maggior parte dei modelli animali a disposizione imiti alcuni aspetti della malattia che si sviluppa nell'uomo, nessuno dei modelli sperimentali ad oggi a disposizione è sovrapponibile alla malattia umana. Nello studio dell'ipertensione arteriosa uno dei maggiori limiti nell'utilizzo dei modelli animali è la non riproducibilità della lenta insorgenza della patologia che tipicamente si osserva invece nell'uomo. Inoltre, data la multifattorialità dell'ipertensione arteriosa da un punto di vista eziologico e fisiopatologico, l'approccio scientifico con modelli animali non dovrebbe essere limitato ad un unico modello sperimentale.

## **5. MATERIALI E METODI**

### **5.1. SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo dello studio è stato quello di indagare le eventuali alterazioni del bilancio di acqua e sodio e l'osmoregolazione in un modello poligenico e multifattoriale di ipertensione arteriosa; è stato inoltre valutato il ruolo dell'antagonismo dei recettori V2 dell'ADH nello sviluppo di ipertensione arteriosa in ratti spontaneamente ipertesi. Sono stati eseguiti due set di esperimenti su modelli sperimentali di ratto. Un primo set di esperimenti ha utilizzato il modello dei ratti SHR valutando le relazioni fra sviluppo di ipertensione arteriosa e riassorbimento di acqua e di sodio. Nella specifico, il modello dei ratti SHR è stato utilizzato dalla fase pre-ipertensiva fino alla fase di ipertensione arteriosa conclamata quando evidente risulta la presenza di danno d'organo. Sulla base delle risultanze del primo set di esperimenti si è deciso di progettare il secondo set di esperimenti valutando in condizioni di normotensione la interazione specifica fra NO e ADH attraverso l'utilizzo di un altro modello sperimentale nel quale risultava inibita la attività della NOS con riduzione della sintesi di NO.

### **5.2. STORIA NATURALE NEL RATTO SHR e WKY DALLA FASE PRE-IPERTENSIVA ALLA FASE IPERTENSIVA CON SVILUPPO DI DANNO D'ORGANO**

Cinquantotto ratti spontaneamente ipertesi (SHR) sono stati confrontati con 46 ratti normotesi Wistar Kyoto (WKY) dalla fase pre-ipertensiva (età 4-5 settimane) fino allo sviluppo di ipertensione arteriosa e danno d'organo (età 28-30 settimane).

Per evitare potenziali differenze fenotipiche legate a fattori alimentari o a condizioni di allevamento, in un periodo di 5 anni sono stati acquistati quattro lotti di SHR femmine da tre colonie differenti (Charles River France L'Arbresle – Francia; Charles River Laboratories, Calco – Italia; Charles River Netherlands, Maastricht – Olanda).

I ratti sono stati quindi mantenuti in stabulario in condizioni ambientali costanti di ciclicità luce/buio di 12 ore, temperatura 23-25°C e umidità del 40-46%. Sono stati alimentati con una dieta standard (0,54% di NaCl, Basal Purified Diet 5755C, Purina Mills Inc., St. Luis, Missouri – USA), con libero accesso all'acqua.

All'età di 5 settimane i ratti sono stati posti in apposite gabbie metaboliche per permettere la raccolta delle urine delle 24 ore e valutare l'introito di cibo e acqua.

Sono quindi stati successivamente valutati a livello urinario: sodio, potassio, creatinina, osmolarità, acquaporine 2 (MBS703718, AQ2 ELISA, MBS, San Diego, California – USA) proteine ed albumina. Sono stati inoltre determinati su campioni urinari delle 24 ore (dopo raccolta in gabbie metaboliche e mantenimento in ghiaccio) i livelli di nitriti/nitrati (NO<sub>x</sub>, misurazione con metodo spettrofotometrico con metodo di Griess, Cayman Chemical, Ann Arbor MI, USA). Sono stati inoltre eseguiti campionamenti ematici attraverso la vena cava superiore, utilizzati per la valutazione di: sodio, potassio, osmolarità plasmatica e concentrazione di ADH (Coat-A-Count; Diagnostic Products, Los Angeles, California – USA) e di NO<sub>x</sub>.

All'età di 3-5 settimane, 28 ratti SHR e 23 ratti WKY sono stati sacrificati, come precedentemente descritto (Cabassi 2007), per lo studio immunoblotting ed immunostochimico del trasportatore beta-amino-n-butirrico (BTG1), Aquaporine 2, proteine di Tamm-Horsfall, pompa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasi. Il rene destro è stato rapidamente asportato e dissezionato in tre porzioni (Midollare interna, midollare esterna e corticale renale) ed immediatamente congelato. Il rene sinistro è stato invece fissato mediante perfusione retrograda (Cabassi 2007) e processato per la successiva inclusione in paraffina.

I rimanenti animali (23 ratti SHR e 20 ratti WKY), all'età di 14-15 settimane sono stati ricollocati in gabbie metaboliche per la determinazione dei soli parametri urinari, mentre all'età 28 settimane sono stati sottoposti alla procedura sperimentale precedentemente descritta per gli animali di 5 settimane di età (13 ratti SHR e 11 ratti WKY).

### **5.3. TRATTAMENTO ATTIVO CON ANTAGONISTI RECETTORIALI V2**

In una seconda fase dello studio 18 ratti femmina SHR di 25 giorni di età (3,5 settimane di età, Charles River France L'Arbresle – Francia) sono stati trattati dal 25° al 49° giorno di età (7 settimane di età) con antagonisti del recettore V2 (Tolvaptan, 0.05%) e suddivisi in 2 gruppi sperimentali:

- Gruppo 1: ratti SHR non trattati (n° 8);
- Gruppo 2: ratti SHR trattati con anti-V2 (n° 10)

Sono state inoltre utilizzati 12 ratti femmine WKY come gruppo di controllo.

Dalla 3° settimana di età fino alla 27° settimana di età gli animali sono stati sottoposti a monitoraggio della pressione arteriosa. Mediante pletismografia (Harvard Apparatus Ltd., South Natick, Massachusetts – USA) sono state effettuate misurazioni indirette della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca e registrate su sistema Maclab/8 (AD Instruments Ltd., Castle Hill, South Wales – Australia).

#### **5.4.STUDIO DELL' INTERAZIONE TRA NO E ADH**

Un gruppo di 42 ratti di sesso femminile Wistar Kyoto ottenuti da Charles River (Charles River Laboratories, Calco – Italia) all'età di 3 settimane sono stati stabulati 4 per gabbia e precedentemente suddivisi in 2 gruppi (dal tempo 0 fino alla 4 settimana):

- Gruppo 1: ratti non trattati (controllo n°12);
- Gruppo 2: ratti trattati con dosi sub-pressorie (presso il nostro laboratorio tali dosaggi si sono dimostrati non comportare un incremento dei valori pressori nel ceppo WKY e Sprague-Dawley) di N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil-estere (L-NAME, 7.5 mg/kg/die nell'acqua da bere, n° 30) per 7 settimane;

A partire dal termine della 4° settimana il gruppo in trattamento con L-NAME veniva ulteriormente suddiviso in due gruppi:

- Gruppo 2.A: ratti che proseguivano il trattamento in atto con L-NAME, (7.5 mg/Kg/die)
- Gruppo 2.B: ratti trattati con dosi sub-pressorie L-NAME, 7.5 mg/kg/die nell'acqua da bere, che iniziava un concomitante trattamento con Tolvaptan (0.05%) per 3 settimane, n° 12

I gli animali sono stati quindi posti in gabbie metaboliche per la raccolta delle urine e il monitoraggio di cibo e di acqua per 3 giorni (escludendo nell'analisi le urine raccolte nelle prime 24 ore). Sono stati quindi valutati i parametri relativi ai successivi 2 periodi di 24 ore. Tale valutazione è stata fatta al tempo 0 (prima di suddividere i ratti nei gruppi sperimentali) e successivamente dopo 4 settimane e al termine del disegno sperimentale a 7 settimane.

I valori di pressione arteriosa sono stati misurati settimanalmente mediante pletismografia (Harvard Apparatus Ltd., South Natick, Massachusetts – USA) e registrate su sistema Maclab/8 (AD Instruments Ltd., Castle Hill, South Wales – Australia). Sono stati successivamente valutati a livello urinario: sodio, potassio, creatinina, osmolarità, acquaporine 2 (MBS703718, AQ2 ELISA, MBS, San Diego, California – USA)

proteine ed albumina. Sono stati inoltre determinati su campioni urinari delle 24 ore (dopo raccolta in gabbie metaboliche e mantenimento in ghiaccio) i livelli di nitriti/nitrati (NO<sub>x</sub>, misurazione con metodo spettrofotometrico con metodo di Griess, Cayman Chemical, Ann Arbor MI, USA) (69).

Sono stati inoltre eseguiti campionamenti ematici attraverso la vena cava superiore, utilizzati per la valutazione di: sodio, potassio, osmolarità plasmatica, concentrazione di ADH (Coat-A-Count; Diagnostic Products, Los Angeles, California – USA) e di NO<sub>x</sub>.

## 6.RISULTATI

### 6.1. STORIA NATURALE NEL RATTO SHR E WKY DALLA FASE PRE-IPERTENSIVA ALLA FASE IPERTENSIVA CON SVILUPPO DI DANNO D'ORGANO

Non sono state evidenziate differenze di pressione arteriosa, frequenza cardiaca, peso corporeo, concentrazione sierica di creatinina sodio e potassio alle misurazioni eseguite all'età di 4-5 settimane tra i ratti SHR ed i ratti WKY.

Nei ratti SHR in fase pre-ipertensiva il volume urinario risulta ridotto se comparato con ratti WKY (36%  $p < 0.01$ ) così come risulta incrementata l'osmolarità urinaria ( $p < 0.01$ ); inoltre si osserva un trend di riduzione dell'escrezione urinaria di sodio ( $p = 0.079$ ) (Tabella 4; Fig.1)

Si osserva inoltre un marcato accumulo di BGT-1 a livello della midollare esterna nei ratti SHR se confrontati con ratti WKY e la sua espressione risulta essere direttamente correlata con l'osmolarità urinaria (Tabella 4; Fig 4-5); tale relazione si osserva solamente durante la fase pre-ipertensiva (Fig 2).

Non si documenta alcuna differenza nei livelli circolanti di ADH tra ratti SHR e ratti WKY durante la fase ipertensiva, ma il rapporto nell'escrezione urinaria di acquaporine/creatinina risulta più elevato nei ratti SHR in fase pre-ipertensiva rispetto ai controlli (Fig.3). Inoltre, in fase pre-ipertensiva, si riscontra un incremento dell'espressione della pompa  $Na^+-K^+-ATPasi$  e proteina di Tamm-Horsfall (Fig.5)

All'età di 28-30 settimane, nei ratti SHR ipertesi e con sviluppo di una moderata insufficienza renale non si documenta alcuna differenza nell'osmolarità urinaria e nell'espressione di BTG-1 rispetto i controlli WKY (Tabella 2; Fig.6).

### 6.2. TRATTAMENTO ATTIVO CON ANTAGONISTI RECETTORIALI V1 e V2

Nei ratti femmina SHR non trattati (Gruppo1) si osserva un incremento della pressione arteriosa tra la 7°-8° settimana fino ad ottenere un plateau stabile dei valori tensivi intorno alla 12°-13° settimana di età.

Nei ratti SHR sottoposti a trattamento con antagonista V2 (Gruppo 2 - Tolvaptan) nello stesso arco temporale, si osserva un ritardato sviluppo dell'ipertensione per 4-5 settimane (Figura 7)

Comparando i ratti i 2 gruppi sperimentali si osserva nei ratti appartenenti al Gruppo 2 (Trattamento con Tolvaptan) in incremento significativo della produzione di urina, mentre l'osmolarità urinaria risulta diminuita (Figura 8). In questi gruppo inoltre il rapporto tra acquaporine2/creatinina risulta essere marcatamente ridotto, il che indica una riduzione più profonda dello shreeding urinario delle acquaporine2 dal versante apicale tubulare (Figura 9). Nel corso del tempo inoltre l'escrezione urinaria del sodio risulta diminuire nei ratti SHR del Gruppo 2.

### **6.3. STUDIO DELL' INTERAZIONE TRA NO E ADH**

Nelle tabella 6, 7, e 8 sono espressi i parametri registrati al tempo 0, dopo 4 settimane e dopo 7 settimane (termine del programma sperimentale). Non sono state evidenziate differenze di pressione arteriosa sistolica misurata nel corso dello studio alle dosi di L-NAME utilizzata (ad eccezione del gruppo trattato con tolvaptan nel quale alla settimana 5 si riscontrava una lieve riduzione dei valori pressori associati a lieve rialzo della frequenza cardiaca). Tale riscontro non si confermava alla valutazione della pressione arteriosa sistolica e frequenza cardiaca alla 6° e alla 7° settimana.

I livelli plasmatici e urinari di NOx risultano decisamente ridotto nei ratti trattati con L-NAME rispetto ai WKY non tratti (Figure 11-12) non si sono rilevate differenze nel gruppo trattato con Tolvaptan rispetto a quello non trattato. Il rapporto nell'escrezione urinaria di acquaporine2/creatinina risulta lievemente (+39%) più elevato nei ratti normotesi WKY trattati con L-NAME. Il contemporaneo trattamento con Tolvaptan ha portato ad una marcata riduzione della quantità di con acquaporine2/creatinina rispetto al gruppo con solo L-NAME (Tabella 8).

	WKY	SHR
Body Weight, g	105 ± 11	102 ± 8
Systolic BP, mmHg	130.3 ± 6.4	105.8 ± 9.3
Food Intake, g/day	15.1 ± 2.2	15.3 ± 1.9
Water intake, ml/day	14.2 ± 2.2	13.9 ± 2.5
Urine Output, ml/day	8.8 ± 2.7	4.2 ± 1.5*
P-Cr, mg/dL	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.03
Ccr, ml/min	0.91 ± 0.10	0.88 ± 0.12
P-Na, mmol/L	142.8 ± 3.1	139.0 ± 2.9
P-K mmol/L	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.6
U <sub>Na</sub> , mmol/day	1.13 ± 0.08	0.93 ± 0.08
FE <sub>Na</sub> %	0.64 ± 0.11	0.59 ± 0.08
m-TAL BGT-1, f.u	90 ± 49	199 ± 50*
U-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	1373 ± 292	2230 ± 492**
P-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	299.5 ± 5.5	300.4 ± 7.2
ADH	2.68 ± 1.10	3.15 ± 1.29
Urinary aquaporin2/creat, pg/mg	410 ± 143	1077 ± 291*
Urinary Albumin, mg/day	0.99 ± 0.37	1.06 ± 0.48

**Tabella 4. : Parametri a 4-5 settimane di età. WKY, Wistar-Kioto Rats; SHR, Spontaneously Hypertensive Rats. \* p< 0.01; \*\* p<0.05. Dati espressi come media e DS**

	WKY	SHR
Body Weight, g	252 ± 35	223 ± 22*
Systolic BP, mmHg	118 ± 11	189 ± 14*
Food Intake, g/day	20.4 ± 1.4	20.8 ± 2.1
Water intake, ml/day	28.3 ± 4	24.6 ± 6
Urine Output, ml/day	11.1 ± 0.8	8.9 ± 0.06**
P-Cr, mg/dL	0.34 ± 0.08	0.56 ± 0.10*
Ccr, ml/min	1.70 ± 0.44	1.20 ± 0.48*
P-Na, mmol/L	142.6 ± 5.5	140.6 ± 5.1
P-K mmol/L	4.6 ± 0.5	4.7 ± 0.6
U <sub>Na</sub> , mmol/day	1.09 ± 0.23	0.94 ± 0.27
FE <sub>Na</sub> %	0.54 ± 0.09	0.61 ± 0.09
m-TAL BGT-1, f.u	127 ± 27	129 ± 26
U-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	1527 ± 306	1683 ± 427*
P-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	297.3 ± 6.1	298.5 ± 7.0
ADH	2.78 ± 1.51	8.95 ± 4.11*
Urinary aquaporin2/creat, pg/mg	433 ± 137	597 ± 229
Urinary Albumin, mg/day	1.45 ± 0.66	245 ± 1.20

**Tabella 5: Parametri a 28-30 settimane di età. WKY, Wistar-Kioto Rats; SHR, Spontaneously Hypertensive Rats. \* p< 0.01; \*\* p<0.05. Dati espressi come media e DS**

	WKY
Body Weight, g	69±8
Systolic BP, mmHg	90.3±4.8
Food Intake, g/day	9.3±1.5
Water intake, ml/day	9.6±1.7
Urine Output, ml/day	6.0±1.4
P-Cr, mg/dL	0.22±0.01
P-Na, mmol/L	137.9±4.7
P-K mmol/L	4.1±0.7
U <sub>Na</sub> , mmol/day	0.91±0.05
U-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	1479±243
P-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	294.2±3.9
ADH	2.04±0.66
Urinary aquaporin2/creat, pg/mg	329±101
Urinary Albumin, mg/day	0.51±0.12

**Tabella 6: Parametri a 3-4 settimane di età. WKY, Wistar-Kyoto Rats. Dati espressi come media e DS**

	WKY	WKY L-NAME
Body Weight, g	159±13	151±9
Systolic BP, mmHg	115.9±9.8	111.7±8.5
Food Intake, g/day	21.7±3.1	20.6±2.7
Water intake, ml/day	23.6±2.0	21.8±2.3
Urine Output, ml/day	17.4±2.3	12.9±1.8*
P-Cr, mg/dL	0.31±0.04	0.29±0.03
P-Na, mmol/L	141.3±3.1	138.6±4.8
P-K mmol/L	4.6±0.5	4.0±0.4
U <sub>Na</sub> , mmol/day	1.14±0.13	0.94±0.10
U-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	1339±198	1744±203*
P-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	296.3±2.4	298.8±2.1
ADH	2.69±0.69	3.04±0.76
Urinary aquaporin2/creat, pg/mg	428±88	595±109*
Urinary Albumin, mg/day	0.58±0.17	0.49±0.10

**Tabella 7: parametri alla 7° settimana del protocollo sperimentale (WKY età di 7 settimane). WKY, Wistar-Kyoto Rats; WKY L-NAME, Wistar-Kyoto Rats sottoposti a trattamento con L-NAME. Dati espressi come media e DS. \* p < 0.05**

	WKY	WKY L-NAME	WKY-L-NAME- antV2
Body Weight, g	159±13	151±9	217±12
Systolic BP, mmHg	115.9±9.8	111.7±8.5	117.8±11.4
Food Intake, g/day	21.7±3.1	20.6±2.7	30.2±4.1
Water intake, ml/day	23.6±2.0	21.8±2.3	37.7±3.9
Urine Output, ml/day	17.4±2.3	12.9±1.8*	26.3±2.4
P-Cr, mg/dL	0.31±0.04	0.29±0.03	0.36±0.04
P-Na, mmol/L	141.3±3.1	138.6±4.8	144.2±3.9
P-K mmol/L	4.6±0.5	4.0±0.4	4.3±0.3
U <sub>Na</sub> , mmol/day	1.14±0.13	0.94±0.10	1.36±0.16
U-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	1339±198	1744±203*§	602±141
P-Osm, mosmol/KgH <sub>2</sub> O	296.3±2.4	298.8±2.1	299.7±1.7
ADH	2.69±0.69	3.04±0.76	3.61±0.92
Urinary aquaporin2/creat, pg/mg	428±88	595±109*§	253±41
Urinary Albumin, mg/day	0.58±0.17	0.49±0.10	0.48±0.14

**Tabella 8: parametri alla 10° settimana del protocollo sperimentale (WKY età di 7 settimane). WKY, Wistar-Kyoto Rats; WKY L-NAME, Wistar-Kyoto Rats sottoposti a trattamento con L-NAME. Dati espressi come media e DS. \* p < 0.05 vs WKY-L-NAME- antV2; vs WKY**

### Escrezione Urinaria di Sodio

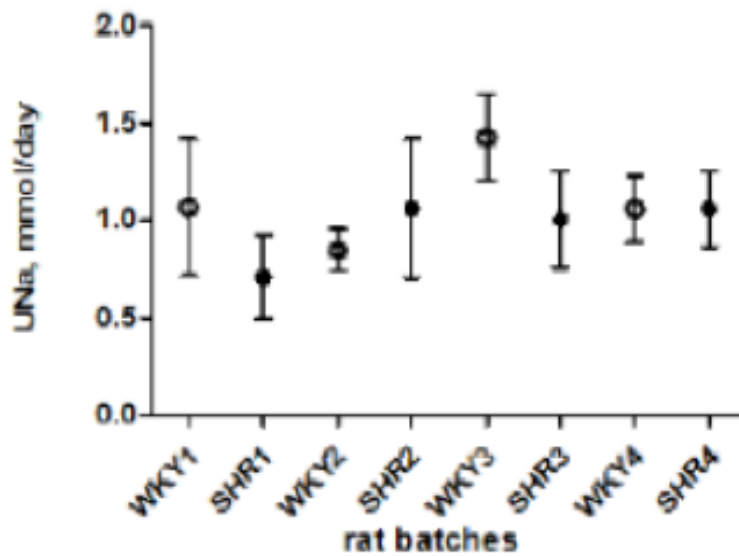


Figura 1: escrezione urinaria di sodio di ratti SHR e WKY da 4 differenti lotti

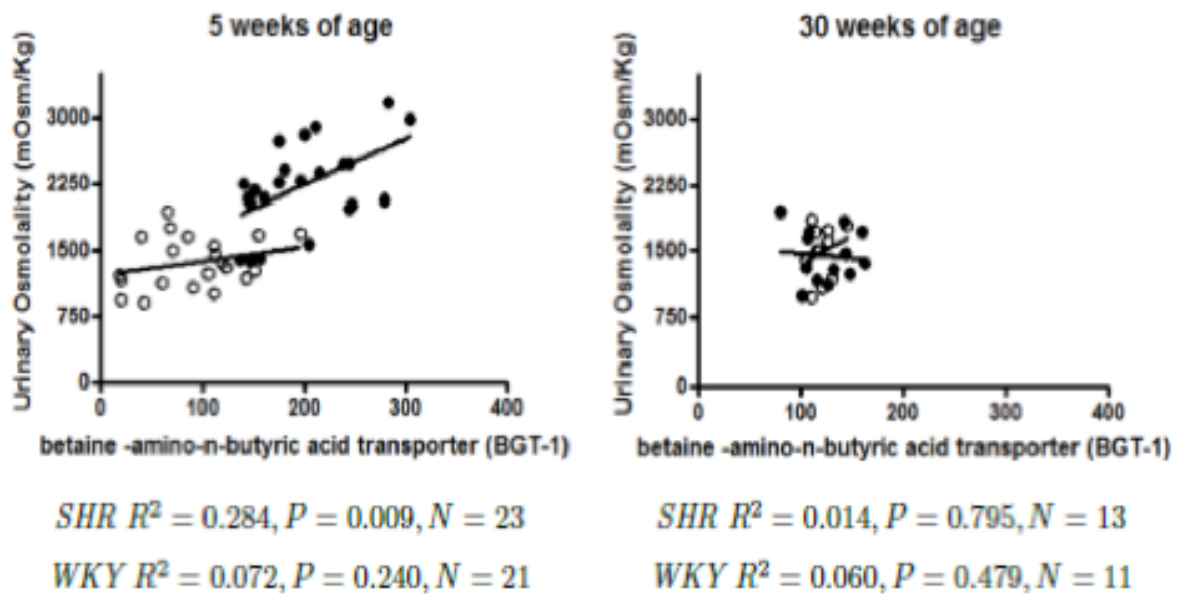


Figura 2: Osmolarità urinaria ed espressione tissutale di BGT-1 nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle in ratti SHR (full circle) e ratti WKY (open circle)

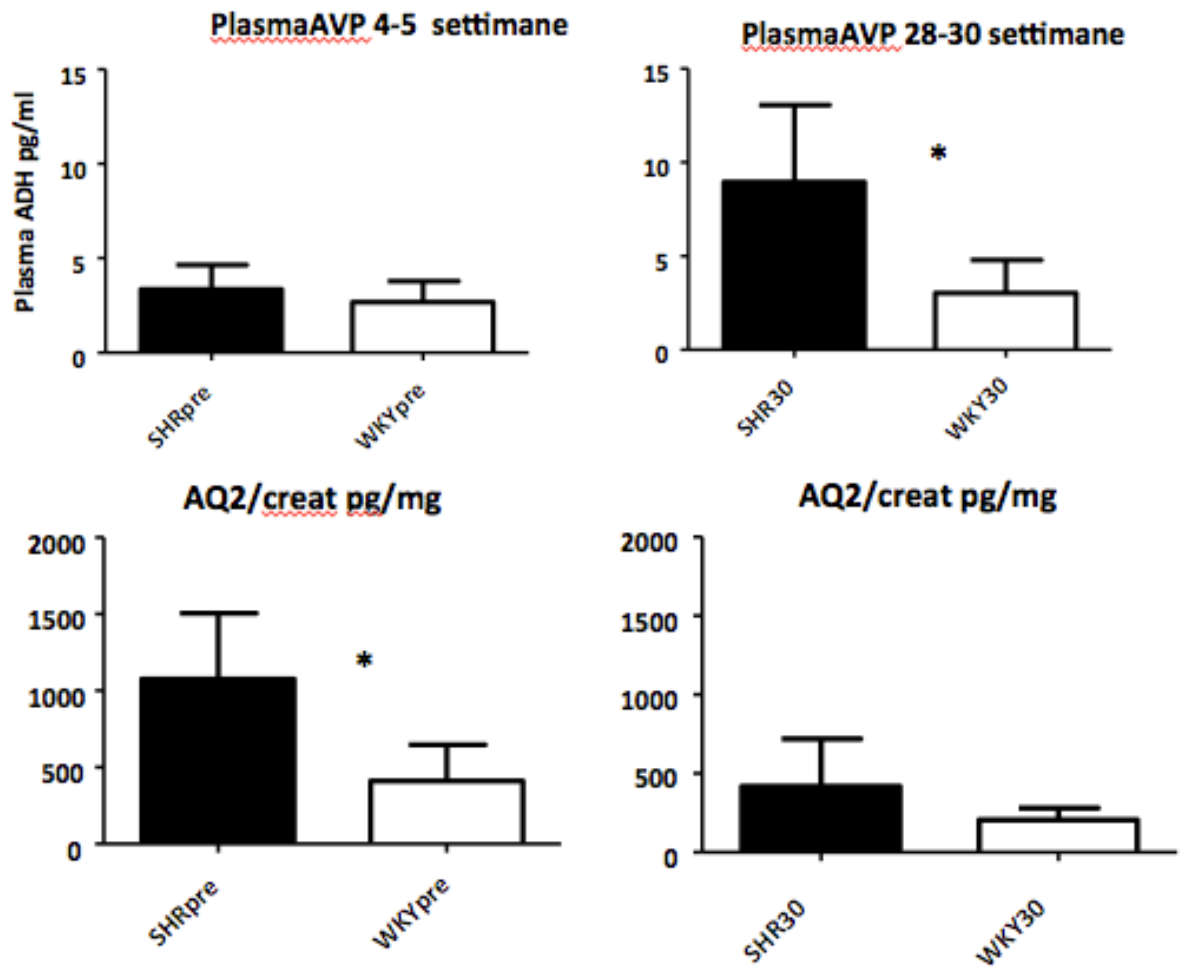
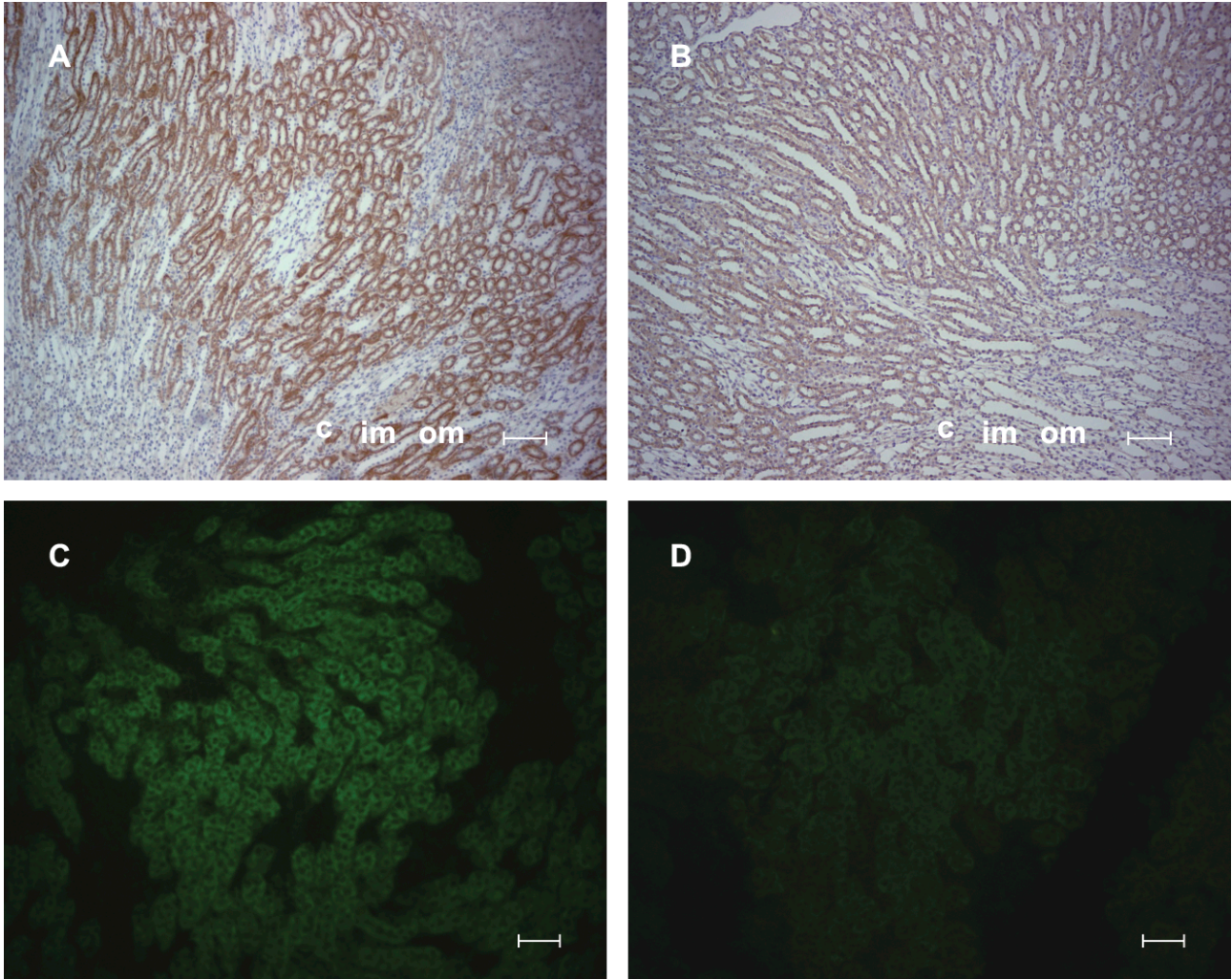
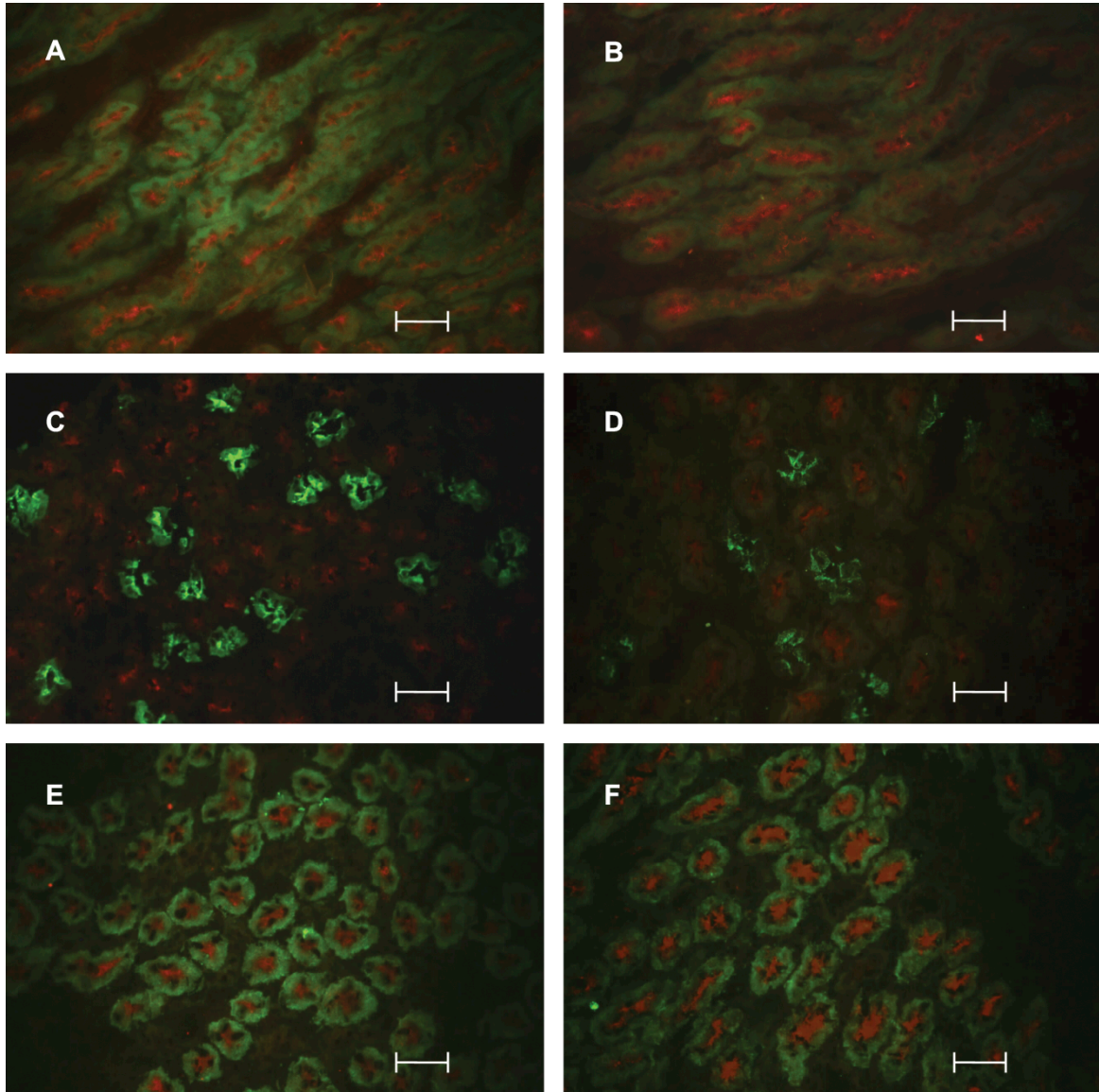


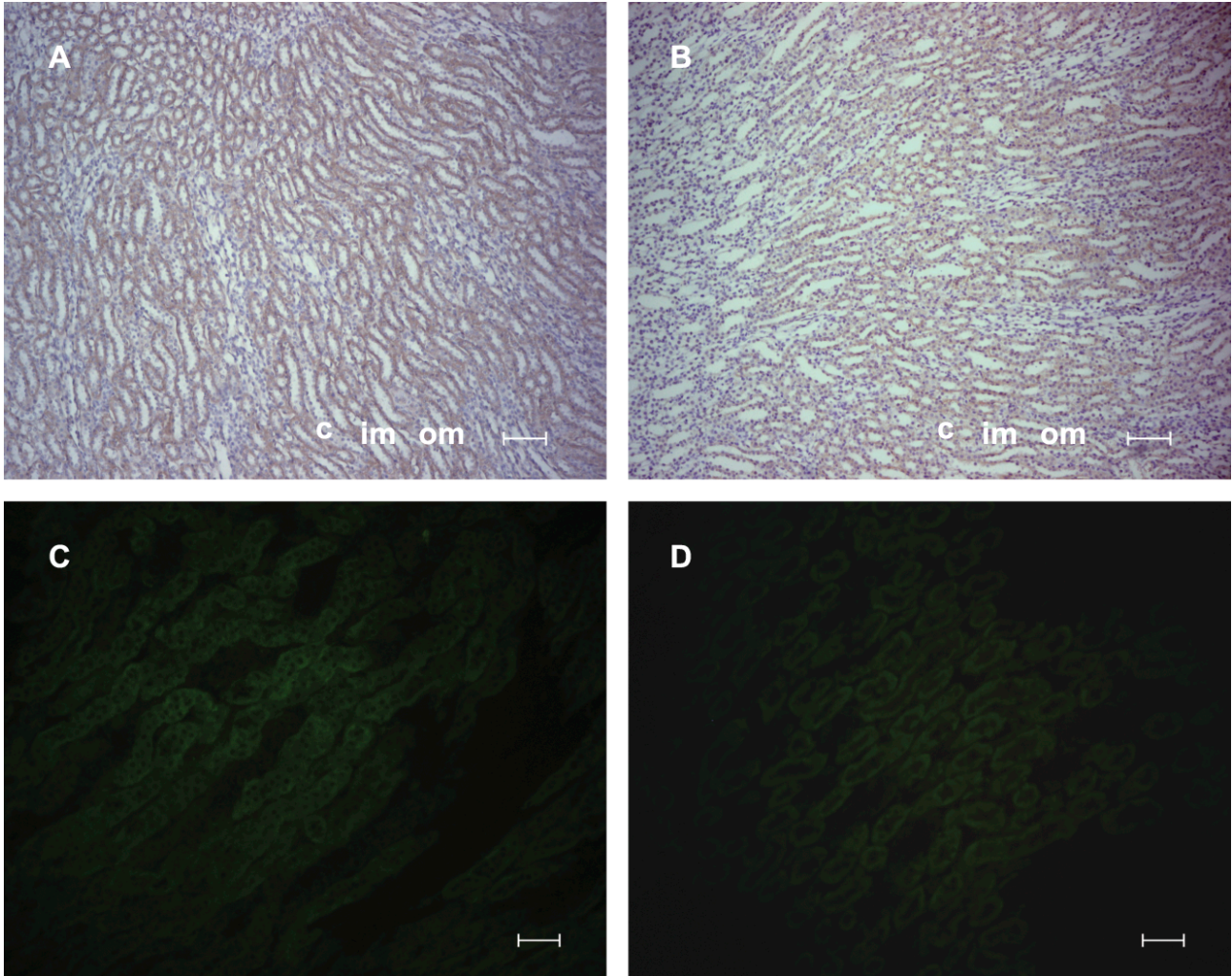
Figura 3: Livelli plasmatici di ADH e Aquaporine2 urinarie in ratti SHR e WKY



**Figura 4: immunoistochimica BGT-1 tissutale in ratti SHR (A-C) e ratti WKY (B-D) in fase preipertensiva. Immunoperossidasi indiretta in sezione in paraffina (A-B) e immunofluorescenza indiretta in criosezione (C-D)**



**Figura 5: Co- immunistoichimica e localizzazione di BGT-1, Tamm-Horsfall, Aquaporina 2 e pompa  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$  nella midollare renale di ratti SHR (A-C-E) e ratti WKY (B-D-F). Immunofluorescenza indiretta in criosezione (A,B,C,D, E, F ). A-B: immunistoichimica BGT-1 e proteina di Tamm-Horsfall. C-D: immunistoichimica Aquaporine2 e proteina di Tamm-Horsfall. E-F: immunistoichimica pompa  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasi}$  e proteina di Tamm-Horsfall**



**Figura 6: immunistoichimica per BGT-1 tubulare in ratti SHR (A-C) e ratti WKY (B-D). Immunoperossidasi indiretta in sezione in paraffica (A-B) e immunofluorescenza indiretta in crio sezione (C-D). Unità di misura: A-B 200 um; C-D 100 um**

### Andamento temporale della pressione arteriosa in ratti SHR

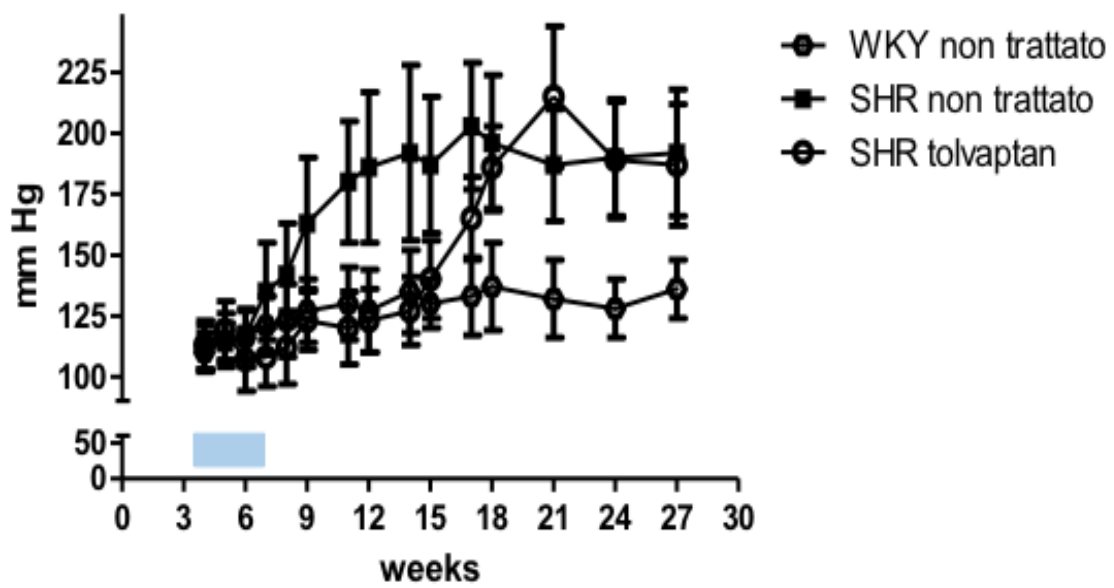


Figura 7: andamento temporale della pressione arteriosa. Il rettangolo azzurro indica il periodo di trattamento attivo con anti-V2

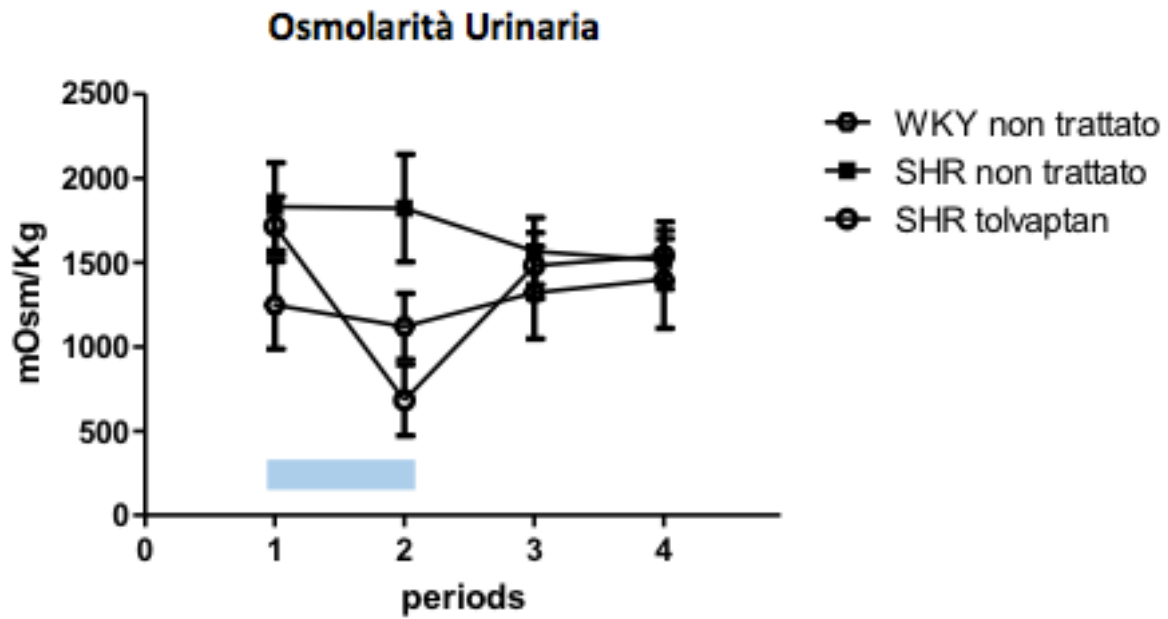


Figura 8: Il rettangolo azzurro indica il periodo di trattamento attivo con anti-V2

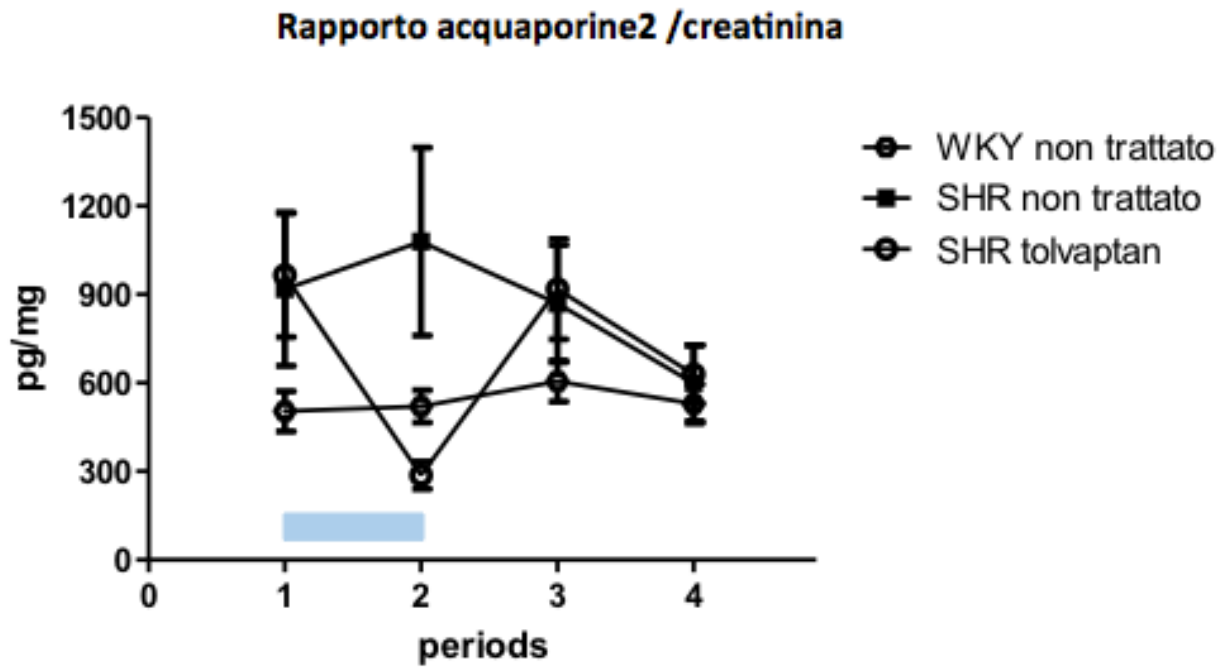


Tabella 9: il rettangolo azzurro indica il periodo di trattamento attivo con anti-V2

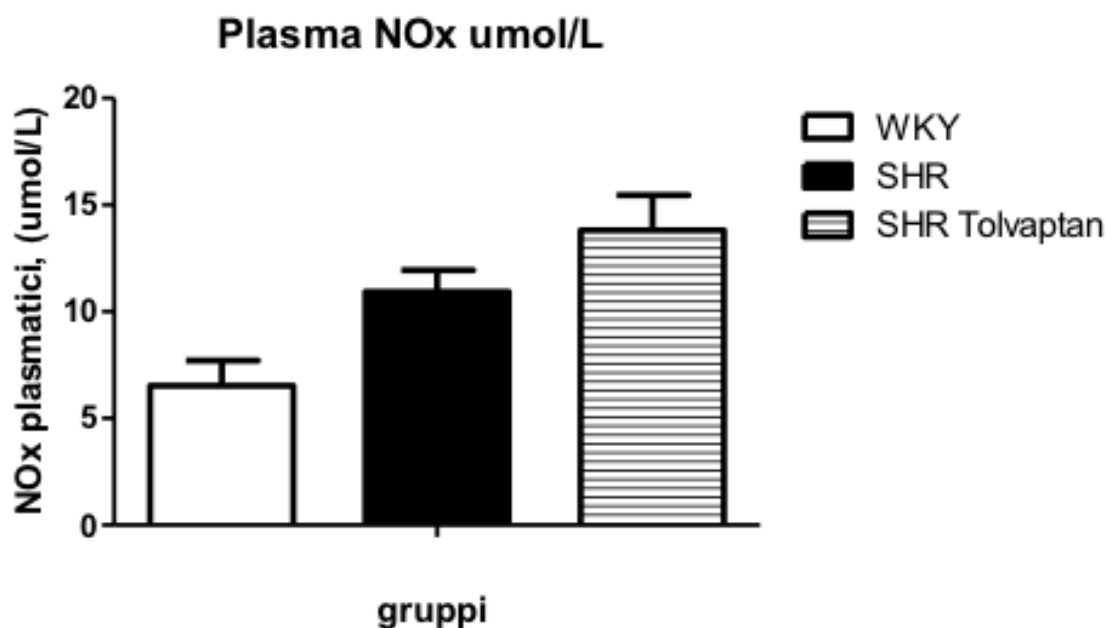


Figura 9: livelli plasmatici di NOx nei tre gruppi sperimentali. WKY: Wistar-Kyoto Rats. SHR: Spontaneously Hypertensive Rats. SHR Tolvaptan; ratti Spontaneously Hypertensive Rats sottoposti a trattamento con antagonista del recettore V2 dell'ADH

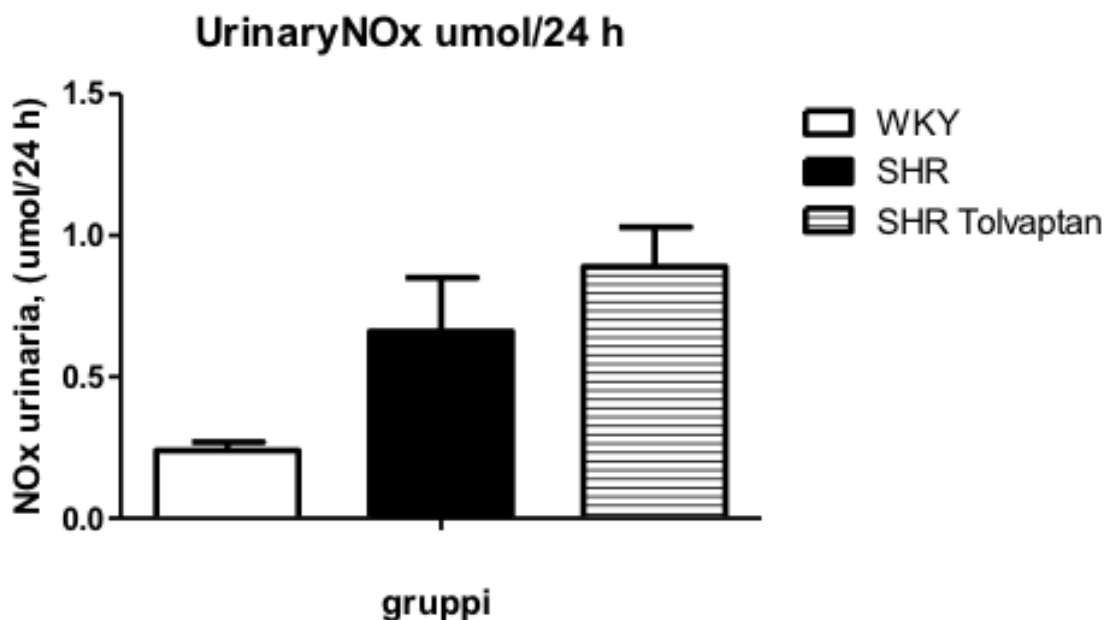


Figura 10: livelli urinari di NOx nei tre gruppi sperimentali. WKY: Wistar-Kyoto Rats. SHR: Spontaneously Hypertensive Rats. SHR Tolvaptan; ratti Spontaneously Hypertensive Rats sottoposti a trattamento con antagonista del recettore V2 dell'ADH

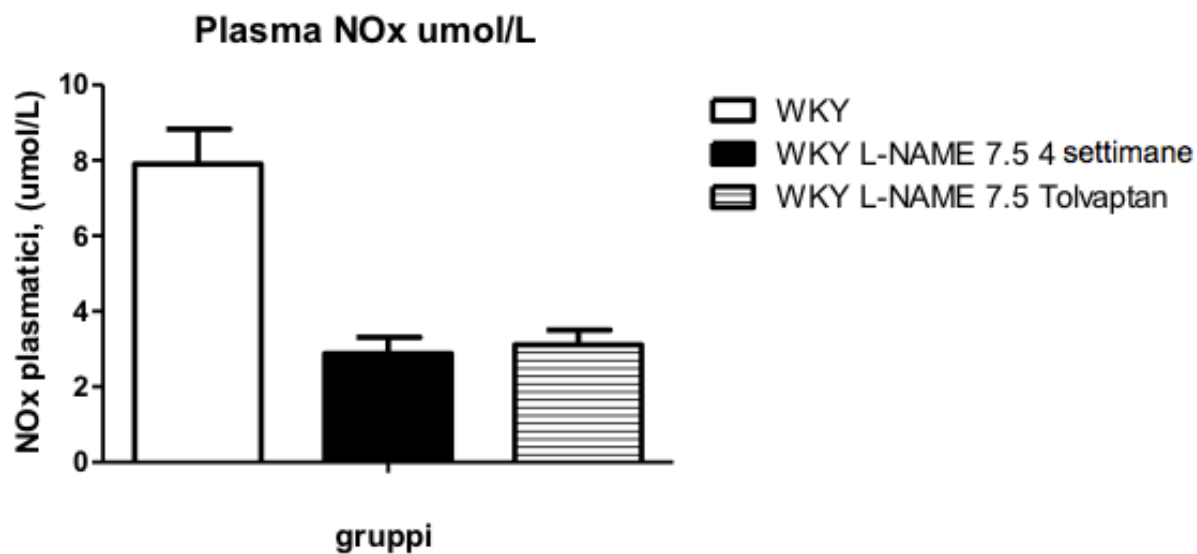


Figura 11: livelli plasmatici di NOx nei tre gruppi sperimentali. WKY: Wistar-Kyoto Rats. WKY L-NAME: ratti Wistar Kyoto sottoposti a trattamento con L-NAME. WKY L-NAME Tolvaptan: ratti Wistar-Kyoto sottoposto a contemporaneo trattamento con L-NAME e antagonista del recettore V2 dell'angiotensina

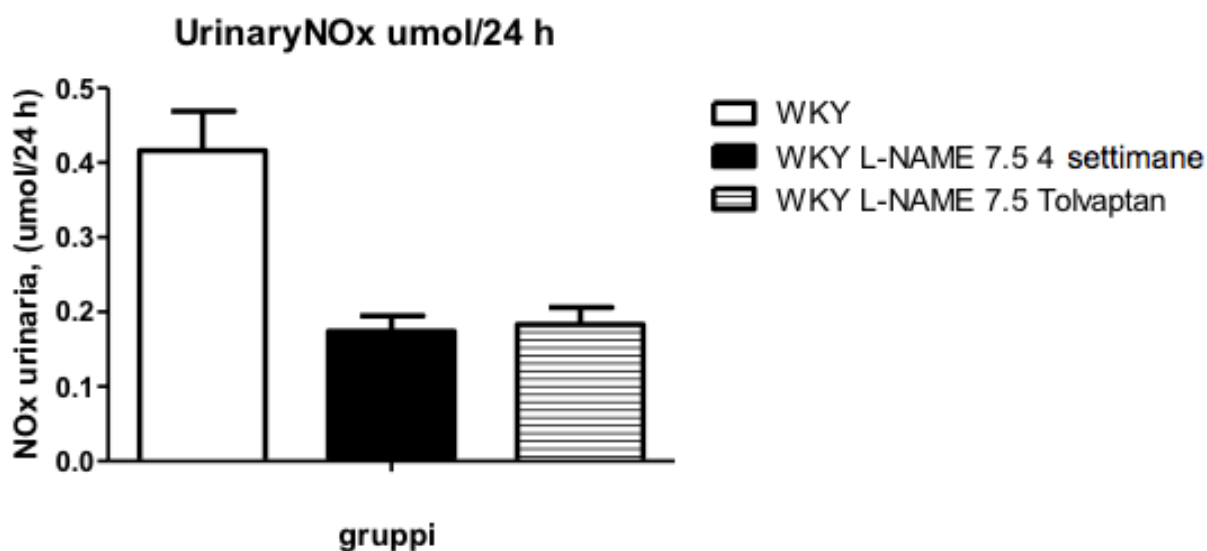


Figura 12: livelli urinari di NOx nei tre gruppi sperimentali. WKY: Wistar-Kyoto Rats. WKY L-NAME: ratti Wistar Kyoto sottoposti a trattamento con L-NAME. WKY L-NAME Tolvaptan: ratti Wistar-Kyoto sottoposto a contemporaneo trattamento con L-NAME e antagonista del recettore V2 dell'angiotensina



## 7.DISCUSSIONE

Il nostro studio, che si è focalizzato su di un modello di ipertensione arteriosa essenziale quale quello dei ratti SHR, ha voluto valutare le alterazioni del bilancio dell'acqua e del sodio dalla fase pre-ipertensiva (4-5 settimane) fino alla fase di ipertensione conclamata con danno d'organo (28-30 settimane). In particolare abbiamo osservato una riduzione del volume urinario nei ratti SHR nella fase pre-ipertensiva associata ad un'elevata osmolarità urinaria. I valori di ADH plasmatici non differiscono tra i ratti SHR in fase pre-ipertensiva ed i WKY della stessa età, mentre, nella fase di ipertensione associata a danno d'organo i ratti SHR presentano un incremento dei valori circolanti di ADH.

Inoltre i ratti SHR in fase pre-ipertensiva presentano un incremento delle aquaporine2 urinarie normalizzate per l'escrezione urinaria di creatinina quando comparati con ratti WKY della stessa età; abbiamo inoltre osservato una up-regolazione di BGT-1 che indica che i meccanismi di riassorbimento dell'acqua sono attivati. L'incremento dell'espressione di BGT-1 associata all'iperosmolarità urinaria ci indica un incremento dell'ipertonicità a livello della midollare renale del ratto SHR in fase pre-ipertensiva. Tale rilievo conferma quanto osservato in un precedente studio che mostrava un incremento di aquaporine2 nella midollare esterna di ratti SHR in fase ipertensiva (70).

Inoltre, l'aumentato rapporto urinario tra aquaporina2/creatinina, che deriva dal fenomeno dello shredding a livello della membrana apicale del dotto collettore, consente di stimare come tale aumento correli con un'incrementata espressione tissutale del canale dell'acqua. Nel nostro studio, nello specifico, si è osservata una correlazione diretta fra espressione di aquaporine2 su tessuto e aquaporine2 urinarie. I risultati sopra elencati mostrano come il riassorbimento di acqua sia presente in tutti i lotti studiati, mentre il bilancio positivo del sodio lo si osservi in un lotto su 4 di ratti SHR ipertesi. Questi elementi ci inducono a suggerire un'aumentata sensibilità all'ADH del rene di ratti SHR in fase pre-ipertensiva.

In letteratura i valori di ADH circolante risultano variabili con riscontri di elevazione in fase pre-ipertensiva ed anche del ratto anziano (71); altri mostrano invece valori di vasopressina circolante estremamente ridotti nelle prime fasi di sviluppo dell'ipertensione in ratti SHR (72) (73). Le discrepanze riportate anche nei confronti delle nostre osservazioni possono dipendere da diversi metodi di dosaggio della vasopressina o

alla necessità di eseguire pool di differenti sieri per ottenere una quantità sufficiente per poter consentire il dosaggio di ADH.

Ancora nella fase pre-ipertensiva dei ratti femmine SHR si è osservata una incrementata espressione di Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasi nel tratto ascendente spesso dell'ansa di Henle; tale meccanismo è fondamentale nell'indurre un'ipertonicità interstiziale midollare.

Le osservazioni descritte nella fase pre-ipertensiva risultano attenuate nelle fasi più avanzate dell'ipertensione stabile ed associata a danno d'organo (28-30 settimane). Non sono infatti evidenti a quell'età differenze di osmolarità urinaria e espressione di BGT-1. I ratti a 28-30 settimane presentano una riduzione del filtrato glomerulare con riduzione dell'escrezione di albumina urinaria.

Un possibile coinvolgimento di un'alterata sintesi di NO nella fase pre-ipertensiva emerge dal riscontro di valori plasmatici ed urinari (escrezione delle 24 h) di NOx, quale metaboliti dell'NO. Tale elemento ci indurrebbe a considerare un possibile ruolo compensatorio di NO nei confronti dell'aumentata sensibilità del rene all'azione dell'ADH.

NO attraverso una dilatazione del circolo midollare dovrebbe favorire una dissipazione del gradiente di tonicità midollare e favorire una diuresi acquosa. Questo non si osserva nella fase pre-ipertensiva del ratto SHR, dove invece è presente una riduzione del volume di diuresi con osmolarità elevata. Tutte queste osservazioni occorrono ancora nella fase di normotensione del ratto SHR. Sembrerebbe quindi possa esserci una sorta di resistenza all'NO e gli elevati livelli di NOx come espressione di un tentativo non efficace di compenso di una prevalente vasocostrizione midollare.

Il blocco in fase pre-ipertensiva dei recettori V2 dell'ADH si esplicita in un ritardo nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa. Contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare considerando invece un blocco V1 dei recettori della vasopressina qual fenomeno efficace nell'interferire o procrastinare l'insorgenza di ipertensione, l'osservazione di un ritardato incremento dell'ipertensione dopo somministrazione di Tolvaptan ci induce a considerare un alterato controllo del bilancio dell'acqua un elemento fondamentale nello sviluppo di ipertensione.

Dalla letteratura emergerebbe un ruolo dell'antagonismo dei recettori V1a (74) non confermato invece quando l'antagonismo anti V1 veniva eseguito in una finestra temporale più tardiva (75).

In relazione a quanto osservato relativamente alla alterazione del metabolismo dell'NO, abbiamo intrapreso uno studio nel quale veniva bloccato l'azione della NOS mediante somministrazione di inibitore L-NAME. Tale studio veniva eseguito su ratti WKY normotesi, che non presentavano alterazioni pressorie dal blocco della NOS per 4 settimane. In questi ratti si osservava un incremento della espressione di acquaporine2 urinarie rapportata all'escrezione urinaria di creatinina a fronte di una riduzione della concentrazione di NOx plasmatiche e dell'escrezione urinaria di NOx.

Il blocco della NOS con L-NAME a basse dosi sembrerebbe facilitare un'aumentata sensibilità all'ADH. Quanto osservato profondamente diverge dalla condizione dell'SHR in fase pre-ipertensiva nel quale l'aumentata sensibilità all'ADH si associa ad un incremento di NOx.

L'antagonismo del recettore V2 con Tolvaptan non modificava i ridotti livelli di NOx (plasmatica ed urinaria) indotta da L-NAME. La spiegazione di tale osservazione non è di facile interpretazione se non ipotizzando una minor efficacia dell'NO generato negli SHR per un possibile eccesso di radicali liberi dell'ossigeno in grado di tamponare l'efficacia tissutale di NO. Ulteriori studi sono sicuramente necessari per cercare di comprendere meglio queste osservazioni che appaiono in contrasto tra loro.

Ciò che comunque emerge è che l'ADH è coinvolto nella patogenesi della ipertensione arteriosa nel modello sperimentale degli SHR e che sia presente un'aumentata sensibilità dei dotti collettori renali alla ritenzione di acqua e come l'interferenza sui recettori V2 della vasopressina ritardino lo sviluppo di ipertensione. Sulla base di quanto osservato negli SHR, che rappresentano il modello sperimentale più rappresentativo per lo studio dell'ipertensione umana, può essere suggerito che un alterato bilancio dell'acqua anche prima dello sviluppo delle alterazioni del sodio partecipa allo sviluppo dell'ipertensione arteriosa, come dimostrato nel nostro studio antagonizzando in fase precoce l'effetto dell'ADH sui suoi recettori V2.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet*. 2017 Jan 7;389(10064):37–55.
2. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA*. American Medical Association; 2013 Sep 4;310(9):959–68.
3. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018 Oct;36(10):1953–2041.
4. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):e13–15.
5. Kaplan NM. *Kaplan's Clinical Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 1 p.
6. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990–2015. *JAMA*. American Medical Association; 2017 Jan 10;317(2):165–82.
7. Gottesman RF, Albert MS, Alonso A, Coker LH, Coresh J, Davis SM, et al. Associations Between Midlife Vascular Risk Factors and 25-Year Incident Dementia in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Cohort. *JAMA Neurol*. 2017 Oct 1;74(10):1246–54.
8. Rovio SP, Pahkala K, Nevalainen J, Juonala M, Salo P, Kähönen M, et al. Cardiovascular Risk Factors From Childhood and Midlife Cognitive Performance: The Young Finns Study. *J Am Coll Cardiol*. 2017 May 9;69(18):2279–89.
9. Brown DW, Giles WH, Greenlund KJ. Blood pressure parameters and risk of fatal stroke, NHANES II mortality study. *Am J Hypertens*. 2007 Mar;20(3):338–41.
10. Lawes CMM, Rodgers A, Bennett DA, Parag V, Suh I, Ueshima H, et al. Blood pressure and cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *J Hypertens*. 2003 Apr;21(4):707–16.
11. Vishram JKK, Borglykke A, Andreasen AH, Jeppesen J, Ibsen H, Jørgensen T, et al. Impact of age on the importance of systolic and diastolic blood pressures for stroke risk: the MONica, Risk, Genetics, Archiving, and Monograph (MORGAM) Project. *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD; 2012 Nov;60(5):1117–23.
12. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. *Circulation*. 1999 Jul 27;100(4):354–60.
13. Williams B, Lindholm LH, Sever P. Systolic pressure is all that matters. *Lancet*. 2008 Jun 28;371(9631):2219–21.

14. SPRINT Research Group, Wright JT, Williamson JD, Whelton PK, Snyder JK, Sink KM, et al. A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2015 Nov 26;373(22):2103–16.
15. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. *Le basi patologiche delle malattie*. 2000. 1 p.
16. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhäger WH. Essential hypertension. *Lancet*. 2003 May 10;361(9369):1629–41.
17. Rettig R, Folberth CG, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, Baldauf G, et al. Hypertension in rats induced by renal grafts from renovascular hypertensive donors. *Hypertension*. 1990 Apr;15(4):429–35.
18. Rettig R, Bandelow N, Patschan O, Kuttler B, Frey B, Uber A. The importance of the kidney in primary hypertension: insights from cross-transplantation. *J Hum Hypertens*. 1996 Oct;10(10):641–4.
19. Guidi E, Menghetti D, Milani S, Montagnino G, Palazzi P, Bianchi G. Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Aug;7(8):1131–8.
20. Wadei HM, Textor SC. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Oct;8(10):602–9.
21. Sata Y, Head GA, Denton K, May CN, Schlaich MP. Role of the Sympathetic Nervous System and Its Modulation in Renal Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. Frontiers; 2018;5:82.
22. Kopp UC. *Neural Control of Renal Function*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
23. Guertzenstein PG, Silver A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol (Lond)*. Wiley-Blackwell; 1974 Oct;242(2):489–503.
24. McAllen RM, Dampney RA. The selectivity of descending vasomotor control by subretrofacial neurons. *Prog Brain Res*. 1989;81:233–42.
25. Kumagai H, Oshima N, Matsuura T, Iigaya K, Imai M, Onimaru H, et al. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertens Res*. Nature Publishing Group; 2012 Feb;35(2):132–41.
26. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev*. 1997 Jan;77(1):75–197.
27. Grassi G, Colombo M, Seravalle G, Spaziani D, Mancia G. Dissociation between muscle and skin sympathetic nerve activity in essential hypertension, obesity, and congestive heart failure. *Hypertension*. 1998 Jan;31(1):64–7.
28. Esler M, Jennings G, Korner P, Willett I, Dudley F, Hasking G, et al. Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension*. 1988 Jan;11(1):3–20.
29. Li A, Hindmarch CCT, Nattie EE, Paton JFR. Antagonism of orexin receptors significantly lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol (Lond)*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2013 Sep 1;591(17):4237–48.
30. Clifford L, Dampney BW, Carrive P. Spontaneously hypertensive rats have more orexin neurons in

their medial hypothalamus than normotensive rats. *Exp Physiol*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2015 Apr 1;100(4):388–98.

31. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. Academy of Managed Care Pharmacy; 2007 Oct;13(8 Suppl B):9–20.
32. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2179–83.
33. Cannavo A, Bencivenga L, Liccardo D, Elia A, Marzano F, Gambino G, et al. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor System in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. Hindawi; 2018;2018(2):1204598–10.
34. Carey RM. Acute dopaminergic inhibition of aldosterone secretion is independent of angiotensin II and adrenocorticotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1982 Feb;54(2):463–9.
35. Bockenhauer D, Bichet DG. Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; 2015 Oct;11(10):576–88.
36. Qian Q. Salt, water and nephron: Mechanisms of action and link to hypertension and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2018 Oct;23 Suppl 4:44–9.
37. Bankir L. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res*. 2001 Aug 15;51(3):372–90.
38. Fenton RA. Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):169–77.
39. Nicco C, Wittner M, DiStefano A, Jounier S, Bankir L, Bouby N. Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1143–9.
40. Kempson SA, Vovor-Dassu K, Day C. Betaine transport in kidney and liver: use of betaine in liver injury. *Cell Physiol Biochem*. Karger Publishers; 2013;32(7):32–40.
41. Kempson SA, Zhou Y, Danbolt NC. The betaine/GABA transporter and betaine: roles in brain, kidney, and liver. *Front Physiol*. Frontiers; 2014;5(165):159.
42. Kempson SA, Montrose MH. Osmotic regulation of renal betaine transport: transcription and beyond. *Pflugers Arch*. 2004 Dec;449(3):227–34.
43. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. Portland Press Ltd; 2001 Aug 1;357(Pt 3):593–615.
44. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015 Oct;129(2):83–94.
45. Ignarro LJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*. 1990 Nov;16(5):477–83.
46. Dohi Y, Thiel MA, Bühler FR, Lüscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension*. 1990 Aug;16(2):170–9.
47. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic

- hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1992 Jul;90(1):278–81.
48. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic effects of recombinant murine or human leptin in conscious rats. *Br J Pharmacol*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2000 Jun;130(4):805–10.
  49. Podjarny E, Hasdan G, Bernheim J, Rashid G, Green J, Korzets Z, et al. Effect of chronic tetrahydrobiopterin supplementation on blood pressure and proteinuria in 5/6 nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Sep;19(9):2223–7.
  50. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Academy of Sciences; 1996 Nov 12;93(23):13176–81.
  51. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 1):405–8.
  52. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li P-L, et al. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Int J Mol Sci*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2018 Sep 3;19(9):2605.
  53. Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ, Raji L, Romero JC. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension*. 1990 Jun;15(6 Pt 1):659–63.
  54. Majid DS, Williams A, Kadowitz PJ, Navar LG. Renal responses to intra-arterial administration of nitric oxide donor in dogs. *Hypertension*. 1993 Oct;22(4):535–41.
  55. Majid DS, Omoro SA, Chin SY, Navar LG. Intrarenal nitric oxide activity and pressure natriuresis in anesthetized dogs. *Hypertension*. 1998 Aug;32(2):266–72.
  56. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol*. American Physiological Society Bethesda, MD; 1991 Dec;261(6 Pt 2):F1033–7.
  57. Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 2):F344–7.
  58. Wu F, Park F, Cowley AW, Mattson DL. Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):F874–81.
  59. Mattson DL, Wu F. Control of arterial blood pressure and renal sodium excretion by nitric oxide synthase in the renal medulla. *Acta Physiol Scand*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2000 Jan;168(1):149–54.
  60. Leong X-F, Ng C-Y, Jaarin K. *Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis*. BioMed Research International. Hindawi; 2015;2015:528757.
  61. Doggrell SA, Brown L. *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure*. Cardiovasc Res. Oxford University Press; 1998 Jul 1;39(1):89–105.
  62. OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282–93.

63. Lindpaintner K, Kreutz R, Ganten D. Genetic variation in hypertensive and “control” strains. What are we controlling for anyway? *Hypertension*. 1992 May;19(5):428–30.
64. Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Jan;27(1):383–96.
65. Vincent M, Bornet H, Berthezene F, Dupont J, Sassard J. Thyroid function and blood pressure in two new strains of spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med*. 1978 Apr;54(4):391–5.
66. Zamir N, Gutman Y, Ben-Ishay D. Hypertension and brain catecholamine distribution in the Hebrew University Sabra, H and N rats. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1978 Dec;4:105s–107s.
67. Bianchi G, Fox U, Imbasciati E. The development of a new strain of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*. 1974 Jan 16;14(2):339–47.
68. SMIRK FH, HALL WH. Inherited hypertension in rats. *Nature*. 1958 Sep 13;182(4637):727–8.
69. Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Lake AD, Cherrington NJ. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2010 Dec;38(12):2293–301.
70. Lee J, Kim S, Kim J, Jeong MH, Oh Y, Choi KC. Increased expression of renal aquaporin water channels in spontaneously hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res*. 2006;29(1):18–23.
71. Crofton JT, Share L, Shade RE, Allen C, Tarnowski D. Vasopressin in the rat with spontaneous hypertension. *Am J Physiol*. 1978 Oct;235(4):H361–6.
72. Rascher W, Lang RE, Unger T, Ganten D, Gross F. Vasopressin in brain of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1982 Apr;242(4):H496–9.
73. Rascher W, Weidmann E, Gross F. Vasopressin in the plasma of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci*. 1981 Sep;61(3):295–8.
74. Burrell LM, Phillips PA, Risvanis J, Aldred KL, Hutchins AM, Johnston CI. Attenuation of genetic hypertension after short-term vasopressin V1A receptor antagonism. *Hypertension*. 1995 Nov;26(5):828–34.
75. Hosoya M, Ogura T, Watanabe H, Ota Z, Kageyama Z. Autoradiographic localization and age-related changes in vasopressin receptors in spontaneously hypertensive rats. *Nephron*. Karger Publishers; 1996;72(2):281–7.