

Zakład Farmakologii. Instytut Patologii Klinicznej. Wydział Lekarski.  
Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Zdzisław Kleinrok

Grażyna SZURSKA

**Wpływ diety bogatosolnej na poziom kininogenu całkowitego,  
jego frakcji osoczowej i moczowej  
oraz na zawartość prekallikreiny w osoczu białych szczurów**

Влияние богатысолевой диеты на уровень общего кининогена, его плазмовой и мочевой фракций и на содержание прекалликреина в плазме белых крыс

The Influence of a High Salted Diet on the Content of Total Kininogen, its Plasmic and Urine Fractions and on the Level of Prekallikreine in Rat Plasma

Nie wiemy, czy kininy mogą być pierwotną przyczyną różnych stanów patologicznych, niemniej ich współudział w patogenezie wielu chorób wydaje się bezsprzeczny. W zakresie układu krążenia powodują one rozszerzenie tętniczek i naczyń włosowatych, przez co maleje opór obwodowy i obniża się układowe ciśnienie tętnicze. Jedną z najczęstszych chorób układu krążenia jest choroba nadciśnieniowa, w której powstawaniu bierze udział wiele czynników (10). Znaczenie sodu w patogenezie nadciśnienia tętniczego podkreśla wiele obserwacji doświadczalnych (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14). T o b i a n (18) uważa, że przyczyną zwiększonego oporu obwodowego, warunkującego wzrost ciśnienia krwi, jest zwężenie światła arterioli spowodowane nadmiernym gromadzeniem się sodu i wody, a następnie obrzmieniem jej ściany. F r i e d m a n (wg 11) twierdzi, że zaburzenie gospodarki sodowej w nadciśnieniu tętniczym polega na zachwianiu wzajemnego stosunku sodu wewnątrzkomórkowego do zewnątrzkomórkowego, co powoduje wzmożone napięcie ściany komórkowej. Wiadomo także, że ograniczenie zawartości sodu w diecie powoduje wzrost wytwarzania aldosteronu (10) oraz wzrost wydalania katecholamin z moczem (11).

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia wskazujące na istnienie zależności między katecholaminami a układem renina — angiotenzyna. W warunkach doświadczalnych stwierdzono u psów, że wlew dożylny angiotenzyny powoduje wyraźny wzrost wytwarzania katecholamin (10). Niewiele prac poświęcono roli układu kininowego w rozwoju hipertensji. Celem naszej pracy było zbadanie wpływu obciążenia solnego na zachowanie się układu kininowego w osoczu szczurów.

#### METODYKA

Badania przeprowadzono na białych szczurach, samcach o wyjściowym ciężarze ciała 100—120 g. Zwierzęta podzielono na 2 grupy. Grupa 1 — kontrolna, licząca 80 szczurów, karmiona była dietą standardową i otrzymywała do picia wodę. Natomiast grupa 2 — doświadczalna, licząca także 80 szczurów otrzymywała ponadto do picia 4% roztwór NaCl przez 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 24 i 28 tygodni. Po tym też czasie oznaczano w osoczu szczurów zawartość kininogenu całkowitego, jego frakcji osoczowej i moczowej, a także poziom prekallikreiny. Badania wykonano opierając się na metodzie Briseida i wsp. (2, 3), która na podstawie ubytku czy też wzrostu kininogenu i prekallikreiny pozwala ocenić kininogenezę *in vivo*. Oznaczenia przeprowadzono metodą biologiczną na izolowanej macicy szczura. Posługiwano się klamrowym sposobem testowania, w którym wzajemny stosunek dawek bradykininy wynosił 2:3. Jako standardu używano bradykininy firmy Sandoz. Krew do oznaczeń pobierano w lekkiej narkozie eterowej sprzętem silikonowanym z *vena cava inferior*. Jako środka przeciwkrzepliwego używano cytrynianu sodowego w stosunku 1:10. Po pobraniu krew wirowano w temp. ok. +4°C z prędkością 2200 obr./min. w ciągu 30 min. Osocze po odpipetowaniu rozlewano w porcjach 1 ml i trzymano w temp. -20°C, bądź używano od razu do sporządzania preparatów kininogenu i kallikreiny. Po 15 tygodniach doświadczenia w obu grupach zwierząt kontrolowano zawartość w surowicy białka całkowitego, albumin i globulin metodą biuretową (19).

Preparat kininogenu — 1 ml cytrynianowego osocza inkubowano dla wyeliminowania aktywności kininazowej przez 24 godz. w temp. 37°C z 4,0 mg EDTA. 2 Na rozpuszczonym w 0,4 ml H<sub>2</sub>O. Po tym czasie preparaty kininogenu wstawiano do zamrażarki o temp. -20°C.

Preparat kallikreiny osoczowej — 1 ml cytrynianowego osocza w celu aktywacji prekallikreiny inkubowano z 0,25 ml acetonu w temperaturze pokojowej przez 17 godz. Aktywność kininazową eliminowano przez następną inkubację mieszaniny z dodatkiem 0,04 ml wodnego roztworu EDTA. 2 Na (4 mg/ml) przez 24 godz. w temp. 37°C. Preparat kallikreiny moczowej — mocz od szczurów zbierano w kłatkach metabolicznych przez 24 godz., a następnie wirowano przy obrotach 2200/min. przez 10 min. w temp. +4°C. Po dekantacji mocz był dializowany w bieżącej wodzie przez 24 godz. Następnie dodawano do niego 4 mg EDTA. 2 Na/ml i doprowadzano pH do wartości 7,3 za pomocą 1M NaOH. Inkubację z EDTA. 2 Na przeprowadzano w temp. 37°C przez 24 godz.

Oznaczanie kininogenu całkowitego — do 1 ml preparatu kininogenu dodawano 1 ml preparatu kallikreiny osoczowej. Mieszaninę inkubowano w 37°C przez 10 min. Następnie dodawano 1 ml preparatu kallikreiny moczowej i inkubację kontynuowano przez dalsze 10 min. Aktywność uwolnionych kinin oznaczano zaraz bądź

w ciągu najbliższych 48 godz., przechowując testy w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ . Oznaczanie frakcji osoczowej — do 1 ml preparatu kininogenu dodawano 1 ml preparatu kallikreiny osoczowej. Mieszaninę inkubowano w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  przez 10 min. Zawartość kinin oznaczano w ciągu 48 godz., przechowując w tym czasie testy w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ . Frakcję moczową oznaczano w analogiczny sposób jak frakcję osoczową dodając w miejsce kallikreiny osoczowej kallikreinę moczową.

Oznaczanie poziomu prekallikreiny. Za miarę poziomu prekallikreiny przyjmowano ilość mikrolitrów preparatu kallikreiny na 1 ml substratu, potrzebnej do reakcji enzymatycznej uwalniającej 50% kinin powstałych w wyniku reakcji z nadmiarem enzymu. Na 41 godz. przed planowanym badaniem, w celu aktywacji prekallikreiny, do 1 ml cytrynianowego osocza dodawano 0,25 ml acetonu. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 17 godz. Następnie, dla wyeliminowania aktywności kininazowej, dodawano 4 mg EDTA. 2 Na i mieszaninę umieszczano w cieplarni o temp.  $37^{\circ}\text{C}$  na 24 godz. Po tym czasie do 5 preparatów kininogenu dodawano w odstępach 1 min. po 0,001, 0,03, 0,05, 0,08 i 0,5 ml inkubatu. Mieszaniny inkubowano w temp.  $37^{\circ}\text{C}$  przez 10 min. Oznaczenia kinin wyzwolonych w inkubatach były wykonywane tego samego dnia lub też w dniu następnym. Wykreślano krzywą procentową, z której odczytywano poziom prekallikreiny. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie posługując się t-testem Studenta.

#### WYNIKI

Poziom kininogenu całkowitego oraz frakcji osoczowej i moczowej. Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 1. Już od 2 tygodnia stosowania diety obserwowano wzrost poziomu kininogenu całkowitego. Wzrost ten już po tym czasie był statystycznie istotny. Po 2 tygodniach doświadczenia nie występowały różnice w poziomach obu badanych frakcji w porównaniu z grupą kontrolną. W dalszym przebiegu doświadczenia, tj. po 4, 6 tygodniach, poziom kininogenu całkowitego uległ podwyższeniu, przy nie zmienionych zasadniczo zawartościach frakcji osoczowej i moczowej. Po 8 i 10 tygodniach stosowania diety nastąpił dalszy wzrost poziomu kininogenu całkowitego, któremu towarzyszy podniesienie zawartości obu frakcji. Wzrost frakcji moczowej okazał się statystycznie istotny. Maksimum wzrostu wszystkich trzech badanych parametrów układu kininowego wystąpiło po 12—15 tygodniach stosowania 4% roztworu NaCl. Wzrost ten był wysoce statystycznie istotny. Po upływie tego czasu obserwowano tendencję spadkową poziomów kininogenu całkowitego i obu frakcji. Całkowity powrót do wartości grup kontrolnych wystąpił po upływie 28 tygodni. Poziom prekallikreiny w trakcie 28-tygodniowego stosowania diety solnej nie wykazywał w porównaniu z grupą kontrolną statystycznie istotnych różnic (tab. 2). Również oznaczenia białka całkowitego, albumin i globulin nie wykazały różnic między wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej i badanej.

Tab. 1. Poziom kininogenu całkowitego oraz frakcji osoczowej i moczowej w osoczu wyrażony w  
The levels of total kininogen and plasmic and urine fractions in rat plasma during

Kininogen całkowity p	Tygodnie stosowania diety			
	kontrola	2	4	6
	2,00 ±0,03 (32)	2,40 ±0,053 <0,01 (4)	2,46 ±0,03 <0,001 (12)	2,47 ±0,03 <0,001 (11)
Fracja osoczowa p	1,31 ±0,07 (15)	1,25 ±0,07 (4)	1,22 ±0,04 (7)	1,22 ±0,02 (5)
Fracja moczowa	1,11 ±0,04 (17)	1,24 ±0,10 (4)	1,20 ±0,04 (7)	1,18 ±0,10 (7)

p — obliczano w stosunku do grupy kontrolnej (calculated versus control group).

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Sugerowane znaczenie układu kininowego jako układu antagonistycznego w stosunku do układu renina — angiotenzyna, pochodzącego z tej samej frakcji  $\alpha_2$ -globulin (16), poparte jest coraz większą ilością danych doświadczalnych, choć nie są one zawsze jednoznaczne. Znaczenie sodu w rozwoju hipertensji może polegać na jego wpływie na reaktywność mięśniówki naczyniowej, na czynniki presyjne i depresyjne (8, 9), na regulacji wydzielania reniny i angiotenzyny, a także wydzielania aldosteronu (wg 10). Liczne prace doświadczalne poświęcono wpływowi diety solnej na ciśnienie tętnicze u szczura. I tak *H o n o r e i G a r d n e r* (8, 9) wykazali wzrost ciśnienia krwi u szczurów po podaniu im przez okres 4 tygodni 1% NaCl do picia. Po tym samym czasie rejestrowali wyższe ciśnienia krwi *M e n e l l y i w s p.* (14), podający szczurom sól w karmie stałej. Zbliżone do wyników otrzymanych w naszej pracy są wyniki opisane przez *N i e k r a s o w a i S z w a c a b a j a* (15, 17). Autorzy ci obserwowali podwyższenie poziomu kininogenu w doświadczalnym nadciśnieniu u zwierząt wywołanym niedokrwieniem nerek drogą jednostronnego podwiązania naczyń nerkowych bądź przez koarktację brzuszego odcinka aorty, a także we wczesnym stadium nieutralowanego nadciśnienia u ludzi. Zatem wprowadzenie diety bogatosolnej doprowadza do tego samego efektu, a mianowicie wzrostu poziomu kininogenu całkowitego.

Zaobserwowane w naszej pracy obniżenie poziomu prekallikreiny, choć statystycznie nieistotne, może świadczyć o wzmożonym jej przejściu w czynną kallikreinę w przebiegu stosowania diety bogatosolnej. Zatem nie może tłumaczyć wzrostu poziomu kininogenu, gdyż wskazuje raczej na zwiększone w tym czasie uwalnianie kinin. Różnica pomiędzy sumą frakcji osoczowej i moczowej kininogenu a kininogenem całkowitym

białych szczurów w trakcie 28-tygodniowego stosowania diety wzbogaconej 4% NaCl,  $\mu\text{g/ml}$  osocza

the 28 weeks treatment on a high salted diet; results are expressed as  $\mu\text{g/ml}$  of plasma

Tygodnie stosowania diety						
8	10	12	15	20	24	28
2,72 $\pm$ 0,06 <0,001 (10)	2,72 $\pm$ 0,08 <0,001 (15)	3,40 $\pm$ 0,10 <0,001 (8)	3,00 $\pm$ 0,14 <0,001 (9)	2,83 $\pm$ 0,06 <0,001 (5)	2,41 $\pm$ 0,06 <0,001 (5)	1,96 $\pm$ 0,04 (10)
1,48 $\pm$ 0,03 <0,05 (8)	1,47 $\pm$ 0,03 <0,05 (8)	1,46 $\pm$ 0,03 <0,05 (8)	1,57 $\pm$ 0,03 <0,001 (8)	1,53 $\pm$ 0,04 <0,01 (8)	1,24 $\pm$ 0,03 (5)	1,30 $\pm$ 0,04 (7)
1,55 $\pm$ 0,09 <0,001 (8)	1,38 $\pm$ 0,04 <0,05 (8)	1,46 $\pm$ 0,07 <0,05 (8)	1,61 $\pm$ 0,07 <0,001 (6)	1,42 $\pm$ 0,03 <0,001 (8)	1,28 $\pm$ 0,05 (6)	1,28 $\pm$ 0,04 (8)

W nawiasach podano ilość oznaczeń (the number of estimations in parentheses).

w grupie badanej i kontrolnej w pierwszym okresie doświadczenia może wskazywać na zwiększenie się trzeciej frakcji kininogenu, której istnienie sugeruje Briseid (3). Otrzymane wyniki mogą świadczyć o aktywnym udziale układu kininowego w regulacji ciśnienia krwi. Można przypuszczać, że układ kininowy spełnia w tym przypadku antagonistyczną rolę w stosunku do układu renina — angiotenzyna.

#### PIŚMIENNICTWO

- Bellin L. J., Wolle D. N.: *Nature* **227**, 1141—1143, 1970.
- Briseid K., Dyrud O. K., Arntzen F. C.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **28**, 238—144, 1970.
- Briseid K., Dyrud O. K., Öie Svein: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **28**, 124—137, 1970.
- Dahl L. K.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 571—575, 1961.
- Dahl L. K., Heine M.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 746—797, 1961.
- Fregly M. J.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 732—736, 1961.
- Grollman A.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 593—602, 1961.
- Honore L. H., Gardner D. L.: *Arch. int. Pharmacodyn.* **164**, 173—178, 1966.
- Honore L. H., Gardner D. L.: *Arch. int. Pharmacodyn.* **164**, 179—184, 1966.
- Januszewicz W., Sznajderman M.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* **43**, 1221—1226, 1969.
- Kędra M., Woyda J., Gryglewska I.: *Pol. Tyg. Lek.* **23**, 853—855, 1972.
- Koletsy S.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 576—581, 1961.
- Laragh J. H.: *Fed. Proc.* **26**, 39—40, 1967.
- Meneely G. R., Lamley-Stone J., Derby W. J.: *Am. J. Cardiol.* **8**, 527—532, 1961.
- Niekrasowa A. A., Łanberg E. A., Cziernowa N. A., Chuchariew W. W.: *Kardiologia* **11**, 9—15, 1970.
- Rocha e Silva M.: *Ann. N. J. Acad. Sci.* **104**, 190—210, 1963.
- Szwacabaja J. K.: *Tierapeutyczny Archiw.* **43**, 4—9, 1971.

Tab. 2. Poziom prekallikreiny w osoczu białych szczurów w trakcie 28-tygodniowego stosowania diety wzbogaconej 4% NaCl  
 The levels of prekallikreine in rat plasma during the 28 weeks treatment on a high salted diet

Ilość preparatu kallikreiny w $\mu\text{l}$	kontrola	Tygodnie stosowania diety						
		2	6	10	12	15	21	28
	23,02 $\pm$ 3,50 (11)	19,50 $\pm$ 4,70 (5)	42,10 $\pm$ 12,0 (5)	60,31 $\pm$ 7,2 (4)	32,91 $\pm$ 13,7 (3)	19,04 $\pm$ 4,0 (10)	30,40 $\pm$ 6,3 (5)	27,66 $\pm$ 2,9 (5)

W nawiasach podano ilość oznaczeń (the number of estimations in parentheses).

18. Tobian L., Bibion J. T.: *Circulation* 5, 754—757, 1952.
  19. Tulczyński M.: *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej*. PZWL 1962, s. 280—281.
- Otrzymano 10 VII 1975.

#### РЕЗЮМЕ

Изучалось влияние богатосольной диеты, содержащей 4% хлористого натрия, на уровень общего кининогена, его плазмовой и мочевой фракции и на содержание прекалликреина в плазме крыс. Установлено, что в течение 28-недельного применения богатосольной диеты уровень общего кининогена и его исследованных фракций повышается, а уровень прекалликреина в плазме крыс понижается.

#### SUMMARY

The influence of a high-salted diet (4% NaCl) on the content of total kininogen, its plasmic and urine fractions and on the level of prekallikreine in rat plasma has been investigated. It was found that the high-salted diet induced an increase in the concentration of total kininogen and its both fractions and a decrease in the level of prekallikreine.

