

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Katarzyna Kosicka

***Poziomy endogennych glikokortykosteroidów
i ich metabolitów jako kryterium rozpoznania zaburzeń
metabolicznych u ludzi
z uwzględnieniem oceny polimorfizmu genetycznego
dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej izoformy 2***

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Franciszek Główka, prof. UM

Poznań 2011

Praca współfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Projekt badawczy nr N-405-01632/1498

Słowa kluczowe: *nadciśnienie tętnicze, kortyzol, kortyzon, tetrahydro-*
metabolity, HPLC w odwróconym układzie faz

Praca została wykonana we współpracy z:

- Kliniką Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – kierownik: prof. dr hab. Danuta Pupek-Musialik
- Katedrą Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – kierownik: prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska
- Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – kierownik: dr Marek Chuchracki

Panu dr. hab. Franciszkowi Głowce, prof. UM

serdecznie dziękuję

*za umożliwienie wykonania pracy, wskazanie
bardzo interesującego tematu, wszystkie cenne
wskazówki i uwagi podczas wykonywania pracy
oraz cierpliwość i wyrozumiałość*

Składam serdeczne podziękowania

*Panu dr. Maciejowi Cymerysowi za miłą współpracę
oraz pomoc w klinicznej części badań*

*Panu dr. Markowi Chuchrackiemu za pomoc
w zebraniu materiału biologicznego*

*Pani mgr Aleksandrze Majchrzak-Celińskiej
za życzliwość i pomoc w wykonaniu badań
genetycznych*

*Pracownikom Katedry Farmacji Fizycznej
i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za wszelką
pomoc i życzliwość*

Część pracy została opublikowana:

- Głowska F.K., Kosicka K., Karaźniewicz-Łada M., *HPLC method for determination of fluorescence derivatives of cortisol, cortisone and their tetrahydro- and allo-tetrahydro- metabolites in biological fluids*. Journal of Chromatography B 2010, 878, 283-289 (IF=2.777; KBN=32).
- Kosicka K., Głowska F.K., Kośła A., Cymerys M., Chuchracki M., *Rola glikokortykosteroidów w etiologii nadciśnienia tętniczego*. Nadciśnienie Tętnicze 2010, 3, 208-215 (KBN=9).

I	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	12
II	WSTĘP	14
III	CEL PRACY	16
IV	CZĘŚĆ TEORETYCZNA	17
1.	Glikokortykosteroidy	17
1.1.	Budowa chemiczna GKS	17
1.2.	Biosynteza hormonów kory nadnerczy	19
1.3.	Regulacja wydzielania i transport GKS	22
1.4.	Działanie GKS.....	23
1.5.	Metabolizm i wydalanie GKS.....	28
2.	Dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa (11 β -HSD).....	30
2.1.	Funkcja 11 β -HSD	31
2.2.	Budowa genu <i>HSD11B2</i>	33
2.3.	Zaburzenia w aktywności 11 β -HSD2	34
2.4.	Przyczyny defektów w aktywności 11 β -HSD2	38
2.4.1.	Mutacje w genie <i>HSD11B2</i>	38
2.4.2.	Nabyta niedoczynność 11 β -HSD2.....	41
2.5.	Ocena aktywności 11 β -HSD2.....	41
3.	Nadciśnienie tętnicze	43
3.1.	Definicja oraz klasyfikacja nadciśnienia tętniczego.....	43
3.2.	Etiologia nadciśnienia tętniczego	44
3.2.1.	Nadciśnienie tętnicze wtórne	45
3.2.2.	Nadciśnienie tętnicze pierwotne.....	48
3.2.3.	Rola GKS w etiologii nadciśnienia tętniczego	49
3.3.	Następstwa niewyrównanego ciśnienia tętniczego	51
3.4.	Epidemiologia nadciśnienia tętniczego	53
V	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	54
1.	Aparatura i odczynniki chemiczne.....	54

1.1.	Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w metodzie HPLC.....	54
1.2.	Odczynniki stosowane w metodzie HPLC.....	54
1.3.	Odczynniki zastosowane do badania genotypu	55
1.4.	Aparatura i sprzęt laboratoryjny zastosowany do badania genotypu oraz pomiarów antropometrycznych	57
2.	Metoda HPLC oznaczania endogennych GKS i ich metabolitów w płynach biologicznych	57
2.1.	Warunki analizy HPLC.....	57
2.1.1.	Przygotowanie fazy ruchomej	58
2.2.	Roztwory stosowane w metodzie HPLC	58
2.2.1.	Roztwory podstawowe i wzorcowe GKS	58
2.2.2.	Roztwory pomocnicze	58
2.3.	Przygotowanie próbek do krzywych wzorcowych.....	59
2.3.1.	Ekstrakcja GKS	59
2.3.2.	Derywatywacja	59
2.3.3.	Izolacja analitów metodą SPE.....	60
2.4.	Analiza GKS w płynach biologicznych.....	60
2.4.1.	Przygotowanie próbek osocza.....	61
2.4.2.	Przygotowanie próbek moczu	61
2.5.	Optymalizacja procesu enzymatycznej hydrolizy oraz reakcji derywatywacji	61
2.5.1.	Wpływ pH, rodzaju buforu oraz temperatury na hydrolizę glukuronianów i siarczanów GKS.....	61
2.5.2.	Wpływ stężenia zasad organicznych oraz ilości 9-AN na reakcję derywatywacji.....	62
2.6.	Walidacja metody HPLC oznaczania GKS	62
2.6.1.	Liniowość	62
2.6.2.	Wykrywalność (LOD) i oznaczalność (LOQ)	63
2.6.3.	Precyzja i dokładność	63
2.6.4.	Odzysk	63
2.6.5.	Zastosowanie metody w warunkach <i>in vivo</i>	64

3. Poziomy endogennych GKS w osoczu i moczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników	64
3.1. Charakterystyka probantów	64
3.1.1. Zdrowi ochotnicy	64
3.1.2. Chorzy z nadciśnieniem tętniczym	67
4. Analiza struktury genu <i>HSD11B2</i>	69
4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej	69
4.2. Amplifikacja fragmentów genu <i>HSD11B2</i> poddawanych sekwencjonowaniu.....	70
4.2.1. Wyznaczenie starterów do amplifikacji.....	70
4.2.2. Warunki procesu amplifikacji	71
4.2.3. Analiza produktów amplifikacji	72
4.3. Sekwencjonowanie fragmentów genu <i>HSD11B2</i>	72
4.4. Analiza restrykcyjna.....	73
5. Analiza statystyczna	76
VI WYNIKI.....	77
1. Metoda HPLC oznaczania endogennych GKS i ich metabolitów w płynach biologicznych	77
1.1. Optymalizacja procesu enzymatycznej hydrolizy oraz reakcji derywatyzacji	78
1.2. Walidacja metody HPLC oznaczania endogennych GKS w płynach biologicznych.....	79
1.2.1. Liniowość	79
1.2.2. LOD i LOQ	80
1.2.3. Precyzja, dokładność i odzysk.....	81
1.2.4. Zastosowanie metody w warunkach <i>in vivo</i>	82
2. Poziomy endogennych GKS w osoczu i moczu oraz ich metabolitów w moczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników.....	84
2.1. Poziomy endogennych F i E w osoczu	85
2.2. Poziomy endogennych F i E oraz ich metabolitów w moczu.....	90
2.3. Opisy przypadków	99
3. Analiza struktury genu <i>HSD11B2</i>	102
3.1. Wyniki sekwencjonowania fragmentów genu <i>HSD11B2</i>	102

3.2.	Wyniki analizy restrykcyjnej	104
3.2.1.	Charakter oraz częstość występowania zmiany w pozycji c.534.....	104
3.2.2.	Charakter oraz częstość występowania zmiany c.*197.	105
4.	Wpływ aktywności 11 β -HSD2 na występowanie nadciśnienia tętniczego.....	108
VII	OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	109
1.	Metoda analityczna	109
2.	Poziomy GKS w płynach biologicznych u ludzi	114
3.	Analiza struktury genu <i>HSD11B2</i>	124
4.	Podsumowanie	128
VIII	WNIOSKI	130
IX	STRESZCZENIE.....	131
X	ABSTRACT	133
XI	PIŚMIENNICTWO	135
XII	WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW	148

I WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

11β-HSD	dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa
11β-HSD1	izoforma 1 dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej
11β-HSD2	izoforma 2 dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej
9-AN	nitryl kwasu 9-antroilowego
ACE-I	inhibitory konwertazy angiotensyny (<i>angiotensin-converting enzyme inhibitors</i>)
ACN	acetonitryl
ACRD	zespół pozornego niedoboru reduktazy kortyzonu (<i>apparent cortisone reductase deficiency</i>)
ACTH	hormon adrenokortykotropowy (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
AIAT	aminotransferaza alaninowa
allo-THE	allo-tetrahydrokortyzon
allo-THF	allo-tetrahydrokortyzol
AME	pozorny nadmiar mineralokortykosteroidów (<i>apparent mineralocorticoid excess</i>)
ARO	aktywność reninowa osocza
AspAT	aminotransferaza asparaginianowa
AVP	wazopresyna argininowa (<i>arginine vasopressin</i>)
BH₄	tetrahydrobiopteryna
BIA	pomiar bioimpedancji elektrycznej (<i>bioelectrical impedance analysis</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (<i>body mass index</i>)
BP	ciśnienie tętnicze krwi (<i>blood pressure</i>)
BSA	surowicza albumina wołowa (<i>bovine serum albumin</i>)
CBG	globulina wiążąca kortykosteroidy (<i>corticoid-binding globulin</i>)
C_{cr}	stężenie kreatyniny w surowicy
Cl_{cr}	klirens kreatyniny
cNOS	konstytutywna syntaza tlenu azotu
CRH	kortykotropina (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
dATP	deoksyadenozyno-5'-trifosforan
DBD	domena wiążąca DNA (<i>DNA-binding domain</i>)
DCM	dichlorometan
dCTP	deoksycytozyno-5'-trifosforan
ddNTP	dideoksynukleotydy
dGTP	deoksyguanozyno-5'-trifosforan
DHEA	dihydroepiandrosteron
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	deoksynukleotydy
dTTP	deoksytymidyno-5'-trifosforan
DZM	dobowa zbiórka moczu
E	kortyzon
ECFV	objętość płynu zewnątrzkomórkowego (<i>extracellular fluid volume</i>)
ENaC	nabłonkowy kanał sodowy (<i>epithelial sodium channel</i>)
eNOS, NOS3	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu, izoforma 3 syntazy tlenu azotu
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (<i>European Society of Cardiology</i>)
ESH	Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (<i>European Society of Hypertension</i>)
F	kortyzol
FID	detektor płomieniowo-jonizacyjny
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy
FLD	detektor fluorescencyjny (<i>fluorescence detector</i>)
FMN	mononukleotyd flawinowy
GALFs	czynniki podobne do kwasu glicyretynowego (<i>glycyrrhetic acid-like factors</i>)

GKS	glikokortykosteroidy
GR	receptor glikokortykosteroidowy (<i>glucocorticoid receptor</i>)
GRE	elementy oddziałujące z glikokortykosteroidami (<i>glucocorticoid-response elements</i>)
HPA	oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (<i>hypothalamo-pituitary-adrenal axis</i>)
HRE	elementy odpowiedzi na hormon (<i>hormone-response elements</i>)
HSD11B2	gen kodujący izoformę 2 dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej
HSP	białko szoku termicznego (<i>heat shock protein</i>)
I.S.	wzorzec wewnętrzny (<i>internal standard</i>)
ICFV	objętość płynu wewnątrzkomórkowego (<i>intracellular fluid volume</i>)
iNOS, NOS2	indukowalna syntaza tlenu azotu, izoforma 2 syntazy tlenu azotu
LBD	domena wiążąca ligand (<i>ligand-binding domain</i>)
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (<i>low density lipoprotein</i>)
LOD	wykrywalność (<i>limit of detection</i>)
LOQ	oznaczalność (<i>limit of quantitation</i>)
MR	receptor mineralokortykosteroidowy (<i>mineralocorticoid receptor</i>)
MS	spektrometr mas
NAD	dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADH	zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
nNOS, NOS1	neuronalna syntaza tlenu azotu, izoforma 1 syntazy tlenu azotu
NO	tlenek azotu (<i>nitric oxide</i>)
NOS	syntaza tlenu azotu (<i>nitric oxide synthase</i>)
NTD	N-końcowa domena transaktywacyjna (<i>N-terminal transactivation domain</i>)
NS	nieistotne statystycznie
OR	iloraz szans (<i>odds ratio</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
P	prednizolon
PCOS	zespół policystycznych jajników (<i>polycystic ovary syndrome</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	reakcja łańcuchowa polimerazy połączona z analizą długości fragmentów restrykcyjnych (<i>polymerase chain reaction – restriction fragments length polymorphism</i>)
PTH	parathormon
Q	chinuklidyna
RCF	względna siła odśrodkowa (<i>relative centrifugal force</i>)
RIA	metoda radioimmunologiczna (<i>radioimmunoassay</i>)
RPM	liczba obrotów rotora wirówki na minutę (<i>revolutions per minute</i>)
RSD	względne odchylenie standardowe (<i>relative standard deviation</i>)
SD	odchylenie standardowe (<i>standard deviation</i>)
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (<i>solid phase extraction</i>)
TEA	trietyloamina
THF	tetrahydrokortyzol
TSH	tyreotropina (hormon tyreotropowy, <i>thyroid-stimulating hormone</i>)
UFE	frakcja niezwiązanego kortyzonu wydalona z moczem (<i>urinary free cortisone</i>)
UFF	frakcja niezwiązanego kortyzolu wydalona z moczem (<i>urinary free cortisol</i>)
UTR	fragmenty genu nieulegające translacji (<i>untranslated regions</i>)
WC	obwód talii (<i>waist circumference</i>)
WHR	stosunek obwodu talii do obwodu bioder (<i>waist to hip ratio</i>)

II WSTĘP

Choroby układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną przedwczesnych zgonów we wszystkich częściach świata. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia z powodu chorób sercowo-naczyniowych, a przede wszystkim z powodu zawałów serca i udarów, każdego roku umiera na całym świecie ok. 17 milionów ludzi. Problem ten dotyczy w równym stopniu kobiet i mężczyzn, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Badania NATPOL III PLUS z 2002 roku wykazały, że w Polsce na nadciśnienie tętnicze choruje ok. 8,6 miliona osób, a kolejne 8,9 miliona jest w grupie ryzyka rozwojem choroby. Badania WOBASZ z 2005 roku wskazują, że problem nadciśnienia dotyczy aż 42,1% mężczyzn i 32,9% kobiet w populacji dorosłych Polaków. Niepokojący jest jednak fakt, że u większości chorych terapia jest nieskuteczna, co jest szczególnie groźne, zważywszy na bardzo poważne powikłania wynikające z długotrwałego niewyrównanego nadciśnienia tętniczego. Wymienione dane epidemiologiczne są wysoce niepokojące i świadczą o tym, jak ważny jest to problem społeczny. Ponadto, wykazano ścisłą korelację pomiędzy wartościami ciśnienia krwi a ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Im wyższa wartość ciśnienia tętniczego, tym większe zagrożenie wystąpieniem zawału serca, udaru mózgu, niewydolności serca czy chorób nerek. Co więcej, nadciśnienie tętnicze często ma utajony przebieg i przez długi czas może nie dawać charakterystycznych objawów prowadzących do rozpoznania choroby i wdrożenia odpowiedniej terapii. Dodatkowo, u ok. 90% pacjentów cierpiących na nadciśnienie tętnicze etiologia choroby nie jest znana. Dlatego poszukuje się nowych metod wykrywania choroby na jak najwcześniejszym jej etapie, kiedy nie występują jeszcze groźne powikłania narządowe. Dużego znaczenia nabierają w tym świetle badania metabolomiczne mające na celu znalezienie dyskretnych zmian profilu biochemicznego organizmu i wyodrębnienia związków – markerów stanów patologicznych, które pojawiają się już na wczesnym etapie rozwoju choroby.

Zespół pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów (AME) jest jedną z dziedzicznych postaci nadciśnienia tętniczego, w którym obserwuje się utratę aktywności dehydrogenazy 11β -hydroksysteroidowej izoformy 2 (11β -HSD2) spowodowaną mutacją w genie *HSD11B2* kodującym ten enzym. Skutkuje to zaburzeniem metabolizmu kortyzolu (F), który zaczyna oddziaływać na receptor mineralokortykosteroidowy (MR) powodując efekty charakterystyczne dla nadmiaru mineralokortykosteroidów. Podejrzewa się, że lżejsze defekty 11β -HSD2 mogą leżeć u podstaw powstawania nadciśnienia tętniczego pierwotnego, szczególnie tego z sodowrażliwością, niskoreninowego, z niskim poziomem potasu. Aktywność wymienionego enzymu ocenia się na podstawie poziomów endogennych glikokortykosteroidów: F, kortyzonu (E) oraz ich metabolitów. Równie pomocne są badania genetyczne mające na celu ustalenie występowania mutacji w genie *HSD11B2*.

Zaproponowane w tej pracy badania mają na celu określenie aktywności 11 β -HSD2 u chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym oraz ocenę przydatności poziomów endogennych glikokortykosteroidów i ich metabolitów jako markerów nadciśnienia tętniczego. Analiza profilu steroidowego została poszerzona o badania genetyczne w celu ustalenia występowania mutacji w genie kodującym wymieniony enzym. W przypadku pozytywnych rezultatów, badania te mogłyby znaleźć zastosowanie w wykrywaniu nadciśnienia tętniczego już na bardzo wczesnym etapie rozwoju choroby, co wiązałoby się z uniknięciem powikłań. Ustalenie przyczyny schorzenia wiązałoby się także z bardziej racjonalną, a zarazem skuteczną terapią.

III CEL PRACY

Celem pracy była ocena funkcjonowania 11 β -HSD2 u chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym w kontekście przydatności poziomów endogennych GKS w płynach biologicznych jako markerów choroby nadciśnieniowej.

Cel badań był realizowany przez wykonanie kolejnych zadań:

1. Opracowanie odpowiednio czułej, selektywnej, precyzyjnej i dokładnej metody HPLC z detekcją fluorescencyjną do oznaczania poziomów endogennych: F i E w moczu i w osoczu oraz ich tetrahydro- i allo-tetrahydro- metabolitów w moczu.
2. Analiza poziomów endogennych GKS i ich metabolitów u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej zdrowych ochotników.
3. Wyznaczenie parametrów oceniających aktywność 11 β -HSD2 u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej.
4. Analiza struktury fragmentów kodujących genu *HSD11B2* w celu ustalenia występowania mutacji mogących wpływać na funkcję 11 β -HSD2.
5. Ocena korelacji pomiędzy genotypem – występowaniem mutacji w genie *HSD11B2*, oraz fenotypem – poziomami endogennych GKS i ich metabolitów u chorych.

IV CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy (GKS), których najważniejszym przedstawicielem u człowieka jest kortyzol (F), biorą udział w regulacji wielu podstawowych funkcji fizjologicznych, a także są niezbędne w utrzymaniu homeostazy w warunkach stresu. GKS biorą udział niemal w każdym procesie fizjologicznym organizmu i odgrywają kluczową rolę w decydujących procesach biologicznych, takich jak: wzrost, rozmnażanie, metabolizm, procesy odpornościowe i zapalne, funkcjonowanie OUN, układu sercowo-naczyniowego oraz utrzymanie homeostazy wodno-elektrolitowej [1-8].

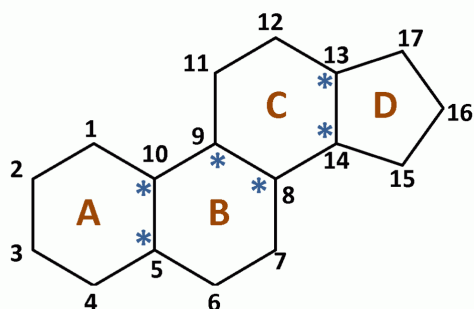
Syntetyczne GKS stanowią także grupę leków, które są szeroko stosowane w terapii chorób o podłożu zapalnym, autoimmunologicznym i limfoproliferacyjnym [1]. Stanowią niezbędny element leczenia w wielu dziedzinach medycyny:

- reumatologii – m.in. w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów, tocznia układowego, kolagenoz;
- okulistyce – przede wszystkim w stanach alergicznych i zapalnych w obrębie gałki ocznej;
- dermatologii – zewnętrznie w przebiegu schorzeń alergicznych lub wewnętrznie w autoimmunologicznych chorobach skóry;
- otolaryngologii – w ostrych stanach zapalnych lub chorobach autoimmunologicznych;
- endokrynologii – np. w niedoczynności kory nadnerczy i przysadki mózgowej;
- pulmonologii i alergologii – jako podstawa terapii astmy oskrzelowej;
- gastroenterologii – w nieswoistych zapaleniach jelit;
- położnictwie – GKS przyspieszają dojrzewanie nabłonka pęcherzyków płucnych – podawane są kobietom ciężarnym przy zagrożeniu przedwczesnym porodem;
- ortopedii – w stanach zapalnych, po urazach;
- onkologii i hematologii – wykorzystywane są właściwości immunosupresyjne GKS, wchodzi one w skład większości schematów chemioterapii;
- neurologii – w celu obniżenia ciśnienia śródczaszkowego oraz jako leki przeciwzapalne w chorobach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego;
- transplantologii – wykorzystuje się właściwości przeciwzapalne GKS oraz hamujące odrzucenie przeszczepu [9-12].

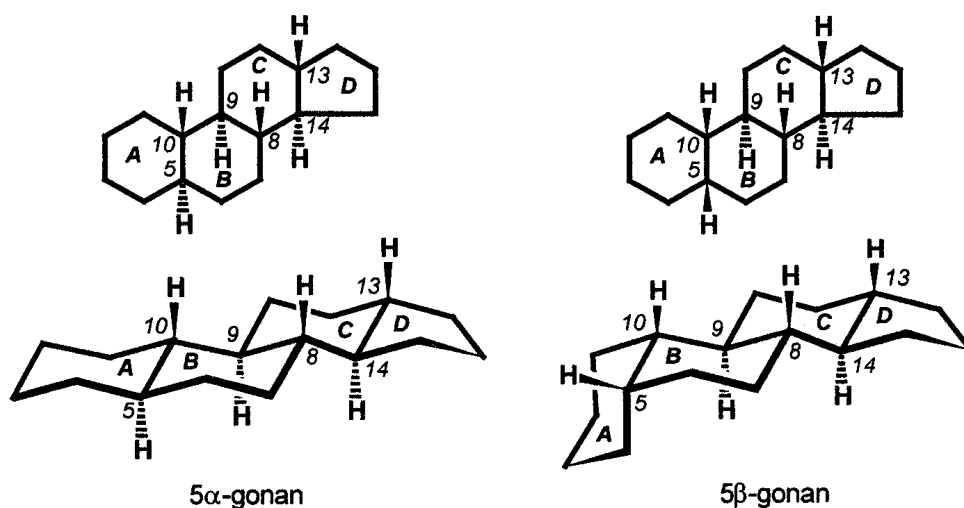
1.1. Budowa chemiczna GKS

GKS są pochodnymi cholesterolu, a ich budowa opiera się na układzie 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu, zwanego steranem (Ryc. 1) [13,14]. W 17-węglowym układzie steranu kolejne pierścienie cykloheksanowe oznaczane są literami A, B, C, natomiast pierścien

cyklopentanowy – literą D. Występuje tu 6 asymetrycznych atomów węgla: 5, 8, 9, 10, 13, 14. Pierścienie cykloheksanowe przyjmują konformację krzesłową. Pierścienie B i C oraz C i D mają konfigurację *trans*, natomiast w zależności od wzajemnej orientacji pierścieni A i B układ steranu przyjmuje nazwę 5 α -gonanu (w przypadku konfiguracji *cis*) lub 5 β -gonanu (w przypadku konfiguracji *trans*) (Ryc. 2) [14].

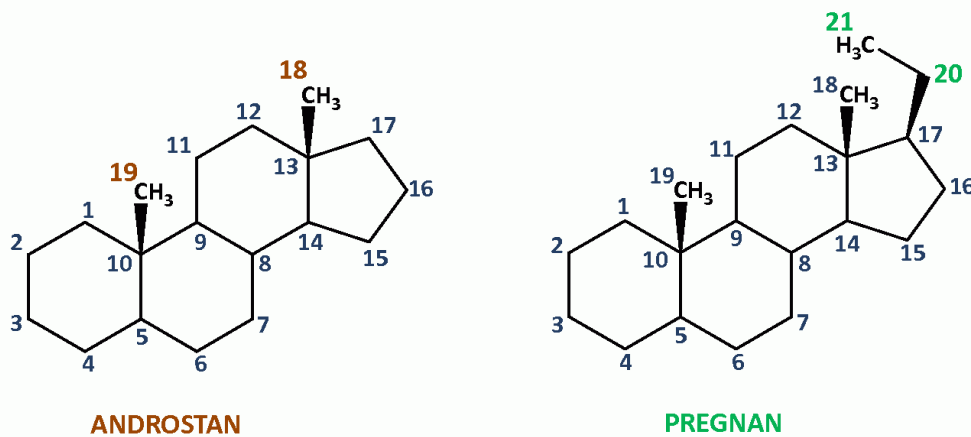


Ryc. 1. Schemat budowy steranu (gwiazdką oznaczono centra stereogeniczne) [14].



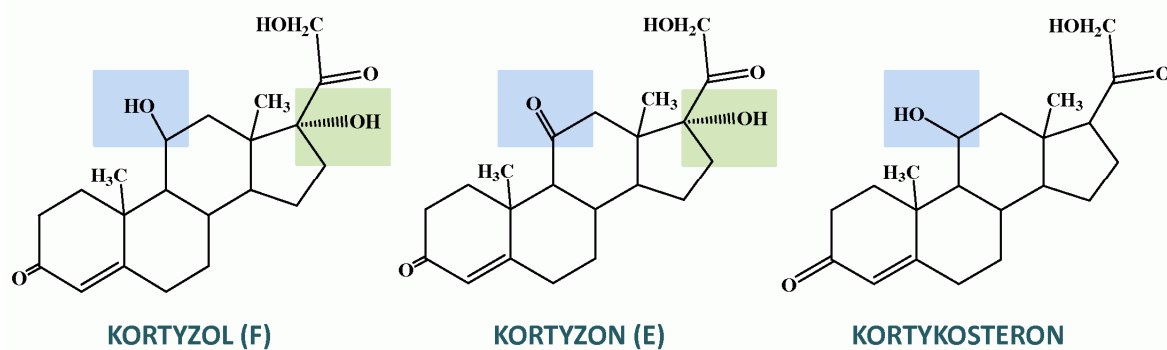
Ryc. 2. Schemat budowy 5 α -gonanu oraz 5 β -gonanu z uwzględnieniem przestrzennej konformacji pierścieni A, B, C, D [14].

Steroidy wydzielane przez korę nadnerczy można podzielić na dwa rodzaje: androgeny, których struktura opiera się na 19-węglowym układzie androstanu, oraz kortykosteroidy, które są pochodnymi pregnanu (Ryc. 3). Pregnan to układ 21-węglowy, który różni się od strukturalnego układu steranu tym, że posiada dodatkowe grupy metylowe w pozycjach 10 i 13 oraz łańcuch boczny (podstawnik etylowy) w pozycji 17. Dodatkowo, kortykosteroidy posiadają w pozycji 17 grupę hydroksylową, dlatego często są nazywane 17-hydroksykortykosteroidami. Związki te wykazują działanie mineralo- lub glikokortykosteroidowe [13,14].



Ryc. 3. Schemat budowy 19-węglowego androstanu oraz 21-węglowego pregnanu [14].

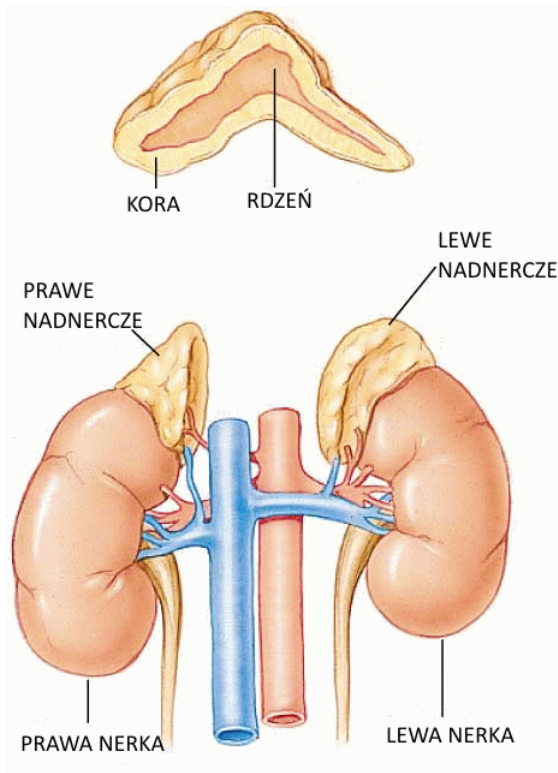
Do naturalnych GKS w organizmie człowieka należą: F, na który przypada ok. 95% aktywności glikokortykosteroidowej oraz kortyzon (E) i kortykosteron (Ryc. 4) [2,15,16].



Ryc. 4. Wzory strukturalne kortyzolu (F), kortyzonu (E) oraz kortykosteronu (kolorowym tłem zaznaczono elementy budowy charakterystyczne dla danego steroidu) [14].

1.2. Biosynteza hormonów kory nadnerczy

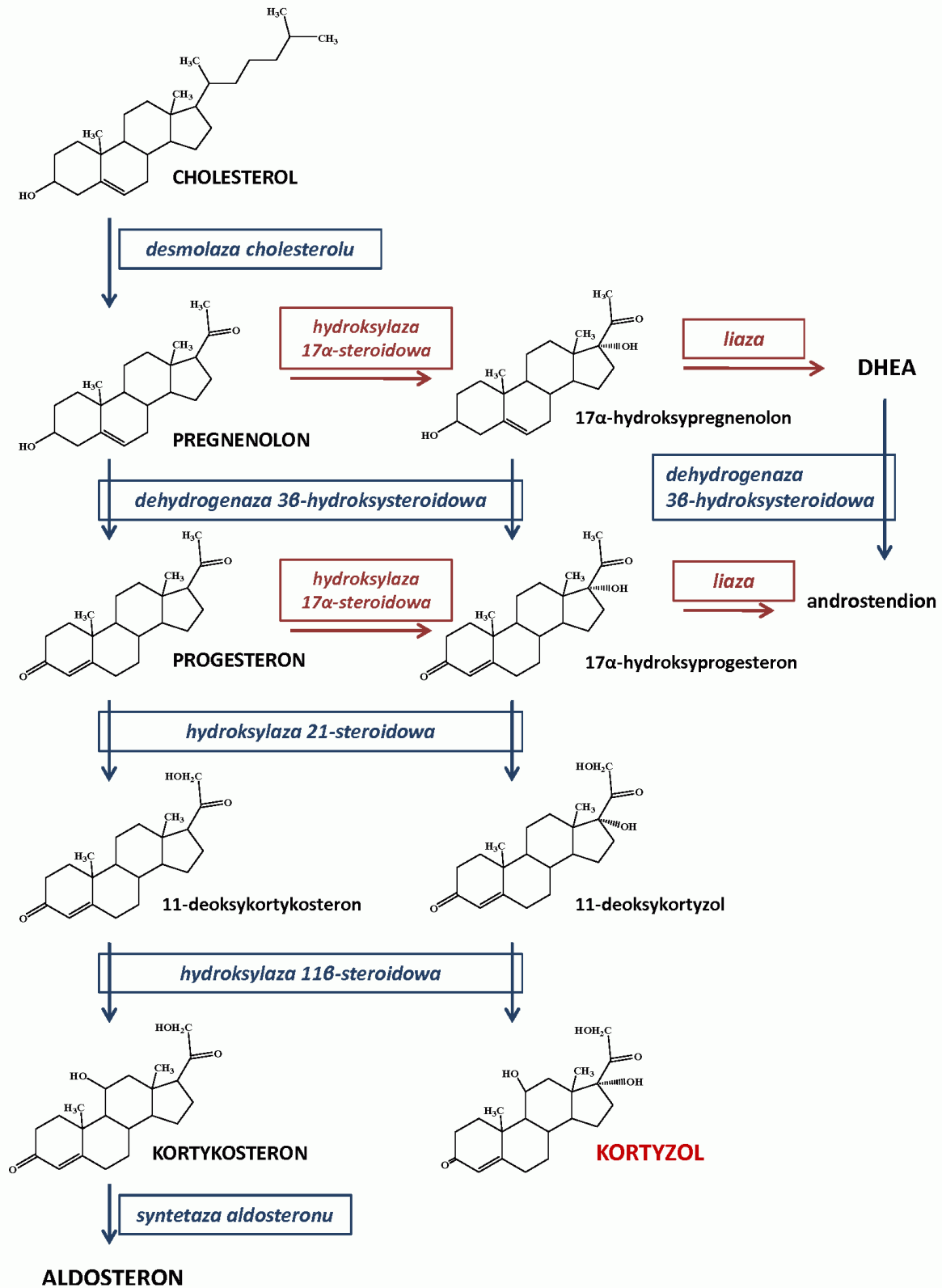
GKS są wydzielane przez korę nadnerczy [7-9,13,15-19]. Nadnercza to parzyste gruczoły leżące powyżej nerek, każdy o masie ok. 5g (Ryc. 5) [19]. Kora nadnerczy składa się z trzech warstw stanowiących ok. 80-90% masy całego gruczołu: warstwy kłębkowatej, pasmowatej oraz siatkowatej [13,16,19]. Warstwy te cechują się odmienną specjalizacją: GKS wydzielane są przez warstwę pasmowatą, warstwa siatkowata wydziela głównie androgeny, natomiast za sekrecję mineralokortykosteroidów, których głównym przedstawicielem jest aldosteron, odpowiada warstwa kłębkowata [7-9,13,15-17,19]. Z kory nadnerczy wyizolowano dotychczas ponad 50 różnych związków steroidowych (stanowią one pośrednie metabolity w steroidogenezie), tylko 8 z nich jest aktywnych biologicznie, a tylko 2 – F i aldosteron, są ważnymi życiowo hormonami kory nadnerczy [16].



Ryc. 5. Schemat budowy i lokalizacji nadnerczy [20]. Górna część ryciny przedstawia przekrój poprzeczny przez prawe nadnercze; dolna część - położenie nadnerczy względem nerek.

Prekursorem w syntezie steroidów nadnerczowych jest cholesterol, pochodzący w większości z krążących w osoczu lipoprotein o małej gęstości (LDL). Cholesterol (układ dwudziestosiedmiowęglowy) jest uwalniany z połączeń estrowych, w postaci których jest magazynowany, przy udziale esterazy i transportowany w postaci wolnej do mitochondrium [13,16,19,21]. Szlak syntezy steroidów nadnerczowych (Ryc. 6) rozpoczyna reakcja usunięcia sześciowęglowego fragmentu z łańcucha bocznego cholesterolu, katalizowana przez enzym zwany desmolazą cholesterolu lub inaczej enzymem odszczepiającym łańcuch boczny [13,17,21]. Powstały w tej trzyetapowej reakcji dwudziestojednowęglowy pregnenolon jest związkiem, z którego syntetyzowane są wszystkie hormony kory nadnerczy [16]. Jest to także etap decydujący o szybkości procesu steroidogenezy w nadnerczach i jednocześnie podlegający regulacji przez hormon adrenokortykotropowy (ACTH, *adrenocorticotropic hormone*) [16,19,21]. Następnie pregnenolon przechodzi do siateczki śródplazmatycznej, gdzie częściowo jest utleniany do progesteronu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę 3 β -hydroksysteroidową [13,17]. Kluczowym enzymem szlaku syntezy F jest natomiast hydroksylaza 17 α -steroidowa [17]. Jest ona odpowiedzialna za dwie reakcje enzymatyczne – hydroksylację pregnenolonu lub rzadziej progesteronu oraz odszczepienie łańcucha bocznego. We wspomnianej reakcji hydroksylacji powstają odpowiednio: 17 α -hydroksypregnenolon i 17 α -hydroksyprogesteron (powstający w znacznie mniejszej ilości). Hydroksylaza 17 α -steroidowa ma także właściwości liazy, dzięki której z 17 α -hydroksypregnenolonu i 17 α -hydroksyprogesteronu (C₂₁ steroidy) powstają poprzez odczepienie łańcucha bocznego dehydroepiandrosteron (DHEA) i androstendion (C₁₉ steroidy) [13,17]. 17 α -hydroksypregnenolon jest przekształcany do 17 α -hydroksyprogesteronu przy udziale wspomnianej już dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej, działającej tu jako izomeraza (katalizującej izomeryzację wiązania podwójnego Δ^5 do Δ^4) [17,21]. Kolejny etap steroidogenezy zachodzi także w siateczce śródplazmatycznej i polega na hydroksylacji 17 α -hydroksyprogesteronu w pozycji 21 (reakcja jest katalizowana przez hydroksylazę

21-steroidową) do 11-deoksykortyzolu. Związek ten przenoszony jest następnie do mitochondriów i hydroksylowany przy udziale hydroksylazy 11 β -steroidowej do F, który jest końcowym produktem syntezy GKS, wydzielanym do krwi [13,16,17,21].



Ryc. 6. Schemat steroidogenezy [9,13,16,17,21,22].

W warstwie kłębkowatej brakuje 17α -hydroksylazy, dlatego progesteron nie może tu zostać przekształcony w F [16]. Jeśli hydroksylację progesteronu w pozycji 17 (działanie 17α -hydroksylazy) poprzedzi reakcja przy węglu 21 (działanie hydroksylazy 21-steroidowej), to w konsekwencji następuje aktywacja szlaku syntezy kortykosteronu i aldosteronu [17].

1.3. Regulacja wydzielania i transport GKS

Regulacja sekrecji endogennych GKS odbywa się za pośrednictwem podwójnego ujemnego sprzężenia zwrotnego, pod kontrolą osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA, *hypothalamo-pituitary-adrenal axis*) [2,3,5-9,18,19,21]. Głównym czynnikiem kontrolującym wydzielanie F jest ACTH [16,21,22]. ACTH powstaje z prekursora, jakim jest pro-opiomelanokortyna, która w komórkach korykotropowych jest przekształcana do ACTH i β -endorfiny [2,6,19]. Wydzielanie ACTH z przedniego płata przysadki jest regulowane przez podwzgórze i OUN za pośrednictwem dwóch neurotransmiterów: wazopresyny argininowej (AVP, *arginine vasopressin*) oraz hormonu uwalniającego korykotropinę (CRH, *corticotropin-releasing hormone*) [4-6,8,9,16,18,21]. Sekrecja CRH jest natomiast hamowana w układzie podwójnego ujemnego sprzężenia zwrotnego przez GKS (długa pętla sprzężenia zwrotnego) i ACTH (krótka pętla sprzężenia zwrotnego) [16].

Zmiany stężenia F w osoczu ściśle odpowiadają zmianom poziomu ACTH [16,19,21]. Istnieją trzy elementy regulacji neuroendokrynnej:

- rytm dobowy [3-6,8,13,19,21] – fluktuacje poziomu F w osoczu podlegają ściśle określonego rytmowi dobowemu. W prawidłowych warunkach sekrecja F wzrasta nocą, około 3-5 godziny snu, a szczyt wydzielania przypada na pierwszą godzinę po przebudzeniu. W następnych godzinach porannych poziom F w osoczu szybko spada. W ciągu dnia występuje jeszcze kilka pulsów wydzielniczych, najczęściej związanych z posiłkami lub wysiłkiem fizycznym. Najniższy poziom F w ciągu doby obserwuje się w późnych godzinach wieczornych i w pierwszych godzinach snu. Rytm dobowy podlega dużej zmienności międzyosobniczej, gdyż wpływają na niego między innymi zmiany w godzinach snu, pory posiłków, oświetlenie, stres fizyczny i psychiczny oraz niektóre choroby.
- reakcja na czynniki stresowe [2,4-6,8,13,16,19,21,23] – dobowe fizjologiczne wahania poziomu ACTH, a co za tym idzie także F, są stosunkowo niewielkie w porównaniu ze zmianami w warunkach działania czynników stresowych. Przedłużające się narażenie organizmu na bodźce stresowe prowadzi wręcz do zniesienia rytmu dobowego. Do czynników stresowych można zaliczyć między innymi: hipoglikemię, wszelkiego rodzaju urazy (także zabiegi operacyjne), zakażenia, wahania temperatury ciała, ból, wysiłek fizyczny, stany emocjonalne (np. strach, złość). ACTH i F są wydzielane w ciągu kilku minut od momentu, kiedy działanie czynnika

stresowego osiągnęło wartość progową. Dochodzi wtedy do wzrostu wydzielania CRH w podwzgórzu i nasilenia sekrecji ACTH z przysadki. W mechanizmie odpowiedzi organizmu na działanie bodźca stresowego uczestniczą także inne hormony (m.in. aldosteron, hormon wzrostu, wazopresyna) oraz układ współczulny.

- ujemne sprzężenie zwrotne [2,4,6,8,13,19,21] – GKS zwrotnie hamują aktywność HPA zmniejszając wydzielanie CRH, ACTH, a w konsekwencji F.

F krąży w osoczu w większości w postaci związanej z białkami, bardzo niewielką część stanowi wolna frakcja F [5,7,13,19]. Za transport F w osoczu odpowiada przede wszystkim (w ok. 70-90%) globulina wiążąca kortykosteroidy (CBG, *corticosteroid-binding globulin*), zwana także transkortyną [5,7,8,13,18,19,21]. F wiąże się także w niewielkiej ilości (w ok. 6-20%) z albuminami osocza [5,8,13,19,21]. Steroidy w połączeniach z białkami są nieaktywne, frakcję czynną biologicznie stanowią hormony niezwiązane (ok. 3-10% całkowitej puli F w łożysku naczyniowym) [5,7,19,21]. Cząsteczki F są silnie lipofilowe, o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej (362,46 Da) i łatwo przenikają przez błony komórkowe na drodze dyfuzji biernej [5,18]. Biologiczny okres półtrwania F w osoczu wynosi średnio 60-90 minut [5,13,21,24].

CBG jest α_1 -glikoproteiną o masie cząsteczkowej rzędu 50-60 kDa [5,21]. Powstaje ona głównie w wątrobie, a jej syntezę zwiększają estrogeny [13]. Dlatego też wzrost produkcji CBG obserwowany jest w stanach hiperestrogenizmu – m.in. podczas ciąży, przyjmowania estrogenów lub doustnych środków antykoncepcyjnych [13,21]. Wraz ze zwiększeniem stężenia CBG w osoczu, większa ilość F ulega związaniu i początkowo zmniejsza się frakcja wolna hormonu. To jednak pobudza sekrecję ACTH, co powoduje wydzielanie F aż do momentu ustalenia się nowego stanu równowagi – całkowite stężenie F w osoczu jest wyższe, ale więcej F jest też związane z białkami, więc frakcja wolna pozostaje w zakresie prawidłowym. Odwrotnie jest w przypadku, gdy stężenie CBG spada, np. w niedoczynności tarczycy czy marskości wątroby [13].

1.4. Działanie GKS

Działanie GKS wywierane jest za pośrednictwem specyficznych wewnątrzkomórkowych receptorów glikokortykosteroidowych (GR, *glucocorticoid receptor*), znajdujących się zarówno w cytoplazmie, ale także w jądrze komórkowym [1-3,8,10,12,18,21,25-28]. GR, obok receptorów mineralokortykosteroidowych (MR, *mineralocorticoid receptor*), androgenowych, progesteronowych i estrogenowych, należą do rodziny białek, które zostają zaktywowane przez związanie hormonu. Zostały one zakwalifikowane do podrodziny 3 receptorów jądrowych - zależnych od liganda czynników transkrypcyjnych. W strukturze tych receptorów można wyróżnić trzy wyraźne fragmenty: N-kończącą domenę transaktywacyjną (NTD, *N-terminal transactivation domain*), domenę wiążącą

DNA (DBD, *DNA binding domain*) oraz domenę łączącą się z ligandem (LBD, *ligand binding domain*) [1,8,18,21,27]. DBD jest regionem bogatym w cysteinę, który po schelatowaniu jonów cynku przyjmuje konformację palca cynkowego [1,8,18,21,26]. LBD posiada sekwencję wiążącą ligand, ale także aktywującą transkrypcję oraz wiążącą białka szoku termicznego (HSP, *heat shock protein*) [1,27]. Poszczególne receptory z tej podrodziny zachowały znaczną homologię w obrębie DBD i LBD, np. GR i MR mają w tych domenach odpowiednio w 94% i 56% identyczną sekwencję aminokwasową [18,21,29]. W szczegółowych badaniach dotyczących tych receptorów wykazano ponadto, że MR i GR wiążą się z identycznymi sekwencjami DNA regulowanych przez siebie genów (elementy odpowiedzi na hormon, HRE, *hormone-response elements*) [18,25,29,30].

Przy braku liganda receptory steroidowe występują jako cytoplazmatyczne, multimericzne kompleksy zawierające białka opiekuńcze, m.in. HSP [1,2,8,18,21,27]. Po wniknięciu F do komórki i związaniu z receptorem następuje zmiana konformacji przestrzennej, czego skutkiem jest oddysocjowanie białek opiekuńczych i przeniesienie kompleksu GR-GKS do jądra komórkowego [1-3,12,18,27,28]. W jądrze zachodzi dimeryzacja, gdyż dopiero jako homodimer kompleks GR-GKS może przyłączyć się do sekwencji regulatorowych DNA, tzw. elementów oddziałujących z GKS (GRE, *glucocorticoid-response elements*) [1-3,8,10,12,18,21,28]. Kompleks GR-GKS spełnia funkcję czynnika transkrypcyjnego lub też oddziałuje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulując ekspresję genów docelowych. Może on stymulować lub hamować transkrypcję poszczególnych genów: w przypadku aktywacji genu sekwencję GRE, z którą związał się kompleks, nazywamy pozytywną, natomiast w przypadku zahamowania transkrypcji – GRE nazywamy negatywną [1-3,8,18,28]. Po aktywacji lub zahamowaniu transkrypcji regulowanych genów, kompleks GR-GKS ulega dysocjacji i nie wykazuje tak dużego powinowactwa do GRE. Niezwiązany z ligandem GR przez jakiś czas pozostaje jeszcze w obrębie jądra komórkowego, a następnie jest transportowany do cytoplazmy [1]. GKS wpływają na wiele genów również bez bezpośredniego oddziaływania z DNA, odbywa się to na drodze bezpośrednich interakcji białko-białko kompleksu GR-GKS z innymi czynnikami transkrypcyjnymi [1-3,10,12,18,28].

Opisane powyżej efekty GKS związane z wpływem na transkrypcję genów były do niedawna uznawane za jedyny mechanizm działania tych hormonów. Efekty te pojawiają się z opóźnieniem (synteza swoistych białek rozpoczyna się zazwyczaj po ok. 30 minutach od ekspozycji komórek na GKS) [28]. Znane są jednakże efekty działania GKS pojawiające się dużo szybciej, co dowodzi istnienia innego, niegenomowego mechanizmu działania [2,8,11,12,18,21,28]. Funkcje te spełniają GKS przede wszystkim za pośrednictwem GR występujących w błonie komórkowej, uruchamiając system przekaźników, które w konsekwencji zmieniają bieg niektórych procesów komórkowych [2,8,12,28]. Niegenomowe działanie GKS może się odbywać także bez udziału receptorów i wtedy wiąże się

przede wszystkim z oddziaływaniem GKS na błonowe kanały jonowe i zmianę przepuszczalności błon komórkowych [8,28].

GKS wywierają *działanie antyinsulinowe*. Zwiększają poziom glukozy we krwi, hamując obwodowy wychwyt glukozy przez mięśnie i tkankę tłuszczową. Działanie antyinsulinowe nie dotyczy jednak mózgu i serca, ważnych dla życia narządów, dla których glukoza jest podstawowym źródłem energii. W wątrobie GKS nasilają proces glukoneogenezy poprzez stymulację aktywności enzymów: glukozo-6-fosfatazy oraz karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej. Pod wpływem GKS zwiększa się uwalnianie substratów dla glukoneogenezy z tkanek obwodowych, w szczególności z mięśni. Zwiększona jest także reaktywność wątroby na glukagon. Poprzez spadek obwodowego wychwyty glukozy GKS powodują zwiększenie wydzielania insuliny, co indukuje insulinooporność. Wzrost poziomu glukozy we krwi prowadzi do cukrzycy pochodzenia nadnerczowego (działanie diabetogenne) w stanach przewlekłego nadmiaru GKS. W przypadku niewydolności nadnerczy stężenie glukozy we krwi utrzymuje się na prawidłowym poziomie, jednak tylko przy zachowanej odpowiedniej podaży kalorii. Przy niedoborze GKS niewystarczająca podaż pożywienia może doprowadzić do zagrażającej życiu hipoglikemii [2,9,13,16,21,31].

Efekt glukoneogeniczny GKS wiąże się ściśle z wpływem na *metabolizm białek*. Mobilizacja substratów dla glukoneogenezy powoduje katabolizm białek w tkankach pozawątrobowych, szczególnie w mięśniach i tkance kostnej. Zwiększone stężenie aminokwasów we krwi skutkuje nasileniem ich przemian w komórkach wątroby, po pierwsze metabolizmu (deaminacja, transaminacja, glukoneogeneza), ale także zwiększeniem syntezy nowych białek w wątrobie (działanie anaboliczne). Rozpad białek w tkankach pozawątrobowych prowadzi do ujemnego bilansu azotowego, który może być przyczyną zaników mięśniowych i osteoporozy [7,9,13,16,21].

Dominującym efektem działania GKS w *tkance tłuszczowej* jest nasilenie uwalniania kwasów tłuszczowych (lipoliza) oraz ich spalanie. Uwolnione kwasy tłuszczowe są w większym stopniu wykorzystywane zamiast glukozy do produkcji energii. Wynikiem tego może być nagromadzenie w organizmie ciał ketonowych (działanie ketogenne), szczególnie u chorych na cukrzycę, gdyż u osób zdrowych jest ono znoszone przez większe wydzielanie insuliny wskutek zwiększonego poziomu glukozy we krwi [2,9,13,16,21]. Obok omówionego działania lipolitycznego, GKS sprzyjają także rozwojowi tkanki tłuszczowej trzewnej. Wykazano, że F wpływa już na preadipocyty, przyspieszając ich różnicowanie do adipocytów. Reguluje także ekspresję genów dojrzałych komórek tłuszczowych sprzyjając ich przerostowi i akumulacji lipidów [2,7,31]. Nierównomierne odkładanie tkanki tłuszczowej jest charakterystycznym objawem nadmiaru GKS. W wyniku działania GKS zwiększa się całkowita zawartość tłuszczów w organizmie kosztem białek, a nagromadzona tkanka tłuszczowa ma charakterystyczne rozmieszczenie w okolicach twarzy, karku, tułowia i brzucha (charakterystyczna cecha w zespole Cushinga) [16,21,23]. Przewlekłe narażenie na nadmiar GKS prowadzi do nadmiaru

triglicerydów magazynowanych w wątrobie, ze względu na ich upośledzony metabolizm na drodze β -oksydacji. Ponadto, nadmierne pobudzenie GR w wątrobie może powodować dyslipidemię poprzez zahamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej w tkance tłuszczowej [2].

GKS wpływają na *gospodarkę wodno-elektrolitową* poprzez oddziaływanie na dwa typy receptorów: GR i MR. Fizjologicznie – poprzez pobudzenie GR, GKS zwiększają filtrację kłębuszkową i pobudzają diurezę oraz hamują wydzielanie hormonu antydiuretycznego, co prowadzi do usunięcia nadmiaru wody z organizmu (działanie przeciwobrzękowe) [9,13,16,19,21]. W przypadku nadmiaru GKS, F pobudza MR, który *in vitro* wykazuje podobne powinowactwo do aldosteronu i F [25,26,32]. To skutkuje retencją sodu i wody w kanalikach nerkowych, zwiększeniem objętości płynów zewnątrzkomórkowych i może prowadzić do powstawania nadciśnienia tętniczego (szczegółowy mechanizm hipertensyjnego działania GKS zostanie omówiony w rozdziale 3.2.3.) [25,31,33,34].

F i inne GKS wykazują także *działanie przeciwzapalne i przeciwalergiczne*, hamując reakcje zapalne i alergiczne na różnych etapach. Między innymi stabilizują błony lizosomów, a także hamują fosfolipazę A_2 , ograniczając tym samym syntezę prostaglandyn. Ponadto zmniejszają przepuszczalność naczyń włosowatych oraz zmniejszają liczbę krążących limfocytów, monocytów, eozynofili i bazofili. GKS zmniejszają migrację komórek odczynu zapalnego do miejsca urazu, co może tłumaczyć ich działanie przeciwzapalne oraz zwiększoną podatność na infekcje osób poddanych przewlekłemu leczeniu GKS (dlatego długotrwałą terapię GKS należy uzupełniać antybiotykami). Pod wpływem GKS zwiększa się z kolei liczba erytrocytów, neutrofilów oraz płytek krwi. GKS zmniejszają wrażliwość organizmu na alergeny oraz zapobiegają występowaniu niebezpiecznego dla życia wstrząsu anafilaktycznego. Zahamowanie reakcji alergicznej następuje w wyniku ograniczenia produktów wydzielniczych granulocytów i makrofagów, m.in. serotoniny i histaminy, które uczestniczą w odczynach zapalnych. GKS wywołują zanik węzłów limfatycznych, grasicy i śledziony, co z kolei skutkuje spadkiem liczby limfocytów T, eozynofili i bazofili oraz zmniejszeniem produkcji przeciwciał (efekt limfocytopeniczny). Zmniejszone są również synteza i uwalnianie cytokin, a więc zahamowana jest odporność komórkowa. Efekty immunosupresyjne wykorzystywane są w prewencji lub redukcji reakcji odpornościowej u biorcy organu transplantowanego [9,13,16,19,21].

W wyniku działania F dochodzi do spadku proliferacji komórek *błony śluzowej żołądka* oraz spadku wydzielania śluzu żołądkowego. Ten efekt w połączeniu ze zwiększonym skutkiem działania F wydzielaniem kwasu żołądkowego (poprzez wzmożone wydzielanie gastryny), może prowadzić do powstawania wrzodów żołądka podczas długotrwałej terapii GKS [8,9,21].

GKS odgrywają także znaczącą rolę w *gospodarce mineralnej*. Hamują resorpcję wapnia w przewodzie pokarmowym, działając antagonistycznie do aktywnych metabolitów witaminy D, co powoduje spadek jego stężenia w osoczu. Następstwem tego jest z kolei wzrost wydzielania parathormonu (PTH), którego działanie utrzymuje poziom wapnia w osoczu w zakresie prawidłowym

poprzez pobudzenie resorpcji kostnej. Dodatkowo, GKS mogą bezpośrednio pobudzać wydzielanie PTH. GKS zwiększają także wydalanie wapnia i fosforanów z moczem. Nadmiar GKS prowadzi zatem do ujemnego bilansu wapniowego. Ponadto, GKS powodują zahamowanie funkcji osteoblastów oraz proliferacji prekursorów komórek kościotwórczych. Nasilają apoptozę już dojrzałych osteoblastów i osteocytów, a także hamują apoptozę osteoklastów (komórek kościogubnych). Ujemny bilans wapniowy, zmniejszona osteogeneza oraz nasilona osteoliza prowadzą do ubytku masy kostnej i osteoporozy, która jest jednym z najpoważniejszych działań niepożądanych terapii GKS [9,10,16,19,21,33,35,36].

GKS hamują anaboliczne działanie hormonu wzrostu oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1, w szczególności w kościach. Zmniejszona jest też sekrecja hormonu wzrostu, czego skutkiem jest zahamowanie *wzrostu*. Z drugiej strony, GKS powodują przyspieszenie rozwoju wielu narządów u płodu, np. przyspieszają dojrzałość nabłonka pęcherzyków płucnych i zwiększają produkcję surfaktantu oraz przyspieszają rozwój układów enzymatycznych w wątrobie i układzie pokarmowym [9,19,21].

F jest istotnym czynnikiem w *utrzymaniu prawidłowego ciśnienia tętniczego krwi* (BP, *blood pressure*). W wyniku jego działania zwiększa się pojemność wyrzutowa serca oraz wzmożone jest działanie katecholamin, np. wazopresyjne działanie noradrenaliny. Niedobór GKS może prowadzić do niedociśnienia, natomiast nadmiar jest przyczyną wystąpienia nadciśnienia tętniczego. Nadciśnienie tętnicze może być wywołane poprzez działanie mineralokortykosteroidowe GKS, ale także na drodze innych efektów, między innymi wpływu na produkcję tlenku azotu (NO), podstawowego czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne [9,19,21,25,37,38]. Szczegółowy mechanizm hipertensyjnego działania GKS zostanie omówiony w rozdziale 3.2.3.

GKS opóźniają gojenie się ran, co wynika z niekorzystnego wpływu na *tkankę łączną*. GKS zmniejszają rozrost fibroblastów. Rozkład białek wywołany przez GKS może prowadzić do osłabienia i zaniku mięśni, ścięczenia skóry, rozstępów oraz zmniejszenia wytrzymałości ścian naczyń krwionośnych, co z kolei może powodować wybroczyny [9,19,21].

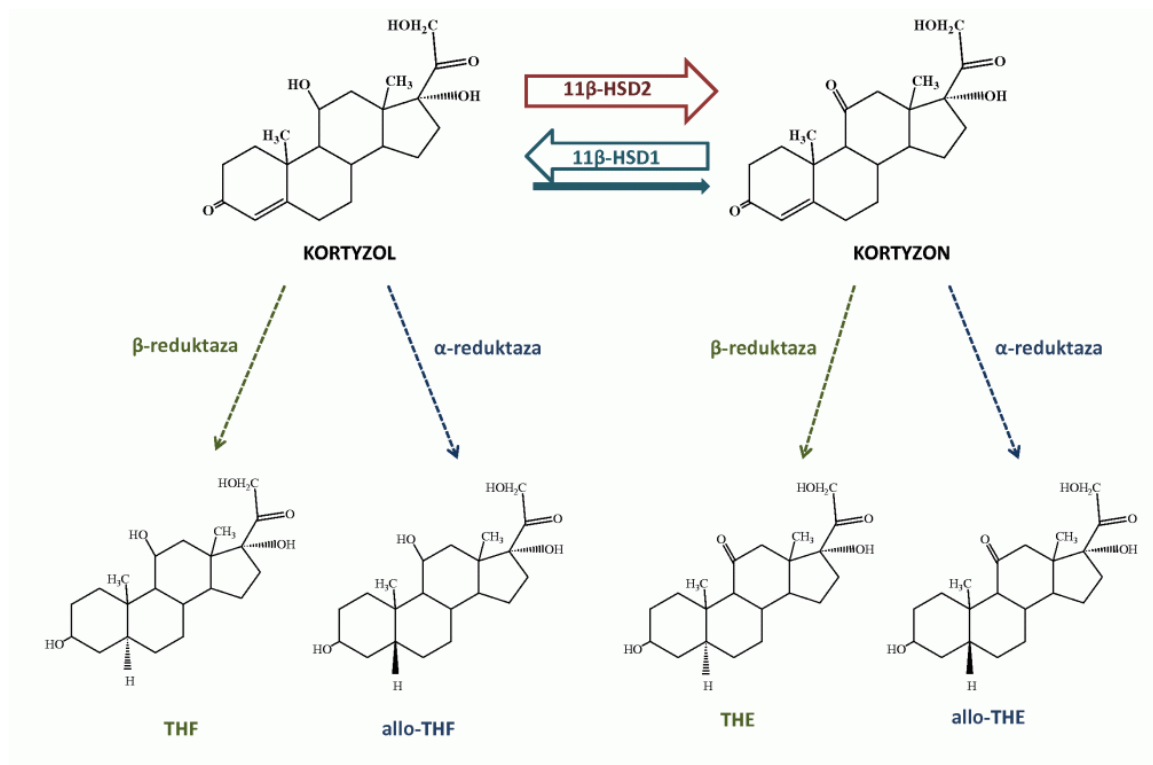
GKS wywołują również szereg efektów w *OUN*, silnie wpływając na zachowanie i funkcje poznawcze. W mózgu GKS biorą udział w regulacji metabolizmu komórkowego, czynności elektrofizjologicznych, neuroendokrynych, prawidłowego podziału oraz dojrzewania neuronów. W przypadku nadmiaru GKS może pojawić się euforia, jednak później pojawiają się zachowania psychotyczne, drażliwość, wahania nastrojów, depresja. Wysokie poziomy F w organizmie mogą także wywoływać bezsenność, upośledzenie pamięci, rozdrażnienie, depresję. Wśród pacjentów, którym przewlekłe podawano leki steroidowe opisywano przypadki demencji [9,13,19,21,39,40]. Niedobór GKS (np. w chorobie Addisona) może skutkować występowaniem apatii i depresji, zmniejszonym łaknieniem, przy jednoczesnym zwiększeniu wrażliwości smakowej i zapachowej [21].

1.5. Metabolizm i wydalanie GKS

Metabolizm steroidów, podobnie jak sprzężanie z resztą kwasu glukuronowego i siarkowego, mają na celu unieczynnienie GKS oraz zwiększenie ich rozpuszczalności w wodzie, tak aby ułatwić ich wydalanie z moczem [21]. Głównym miejscem, w którym zachodzi przekształcenie GKS do nieaktywnych metabolitów oraz sprzężanie jest wątroba [13,19]. Powstałe metabolity GKS są w ok. 90% wydalane przez nerki [21].

Dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa (11 β -HSD) jest enzymem odpowiedzialnym za wzajemne przekształcenie aktywnego biologicznie F do nieczynnego E. Scharakteryzowano dwie izoformy 11 β -HSD: występującą przede wszystkim w wątrobie izoformę 1 (11 β -HSD1) oraz występującą głównie w nerkach izoformę 2 (11 β -HSD2). 11 β -HSD1 in vivo ma właściwości przede wszystkim redukujące E do F, natomiast 11 β -HSD2 odpowiada za unieczynnienie F, przekształcając ten związek do E [7,8,13,15,19,21,24,25,30,41-43]. Następnie, F i E ulegają dalszemu metabolizmowi w analogiczny sposób.

Najważniejszy ilościowo szlak metabolizmu F (Ryc. 7) obejmuje nieodwracalną reakcję dwustopniowej redukcji w pierścieniu A. W pierwszym etapie, katalizowanym przez Δ^4 -reduktazę, powstaje dihydrokortyzol, który następnie jest przekształcany do tetrahydro pochodnej przy udziale dehydrogenazy 3 α -hydroksysteroidowej. Atom węgla w pozycji 5 staje się węglem asymetrycznym, dlatego atom wodoru może zostać przyłączony do wiązania podwójnego w położeniu 5 α lub 5 β . Powstałe produkty różnią się wzajemnym zorientowaniem przestrzennym pierścieni A i B. W zależności od tego, czy redukcję wiązania podwójnego katalizuje 5 α - czy też 5 β -reduktaza, końcowym produktem jest odpowiednio: 5 α -tetrahydrokortyzol (allo-tetrahydrokortyzol, allo-THF) lub 5 β -tetrahydrokortyzol (tetrahydrokortyzol, THF). Analogicznie metabolizowany jest E, powstają odpowiednio tetrahydrokortyzon (THE) i allo-tetrahydrokortyzon (allo-THE) [7,15,19,21,22,24,41,43,44]. W fizjologicznych warunkach przeważa szlak katalizowany przez 5 β -reduktazę, a stosunek THF:allo-THF wynosi ok. 2:1 [7]. Powstałe zredukowane metabolity ulegają w wątrobie sprzężaniu z resztą kwasu glukuronowego i siarkowego i prawie w całości są wydalane z moczem właśnie w postaci koniugatów [7,21,45,46]. Reszta kwasu glukuronowego jest przyłączana głównie do grupy hydroksylowej w pozycji 3 α , sprzężanie z siarczanem zachodzi rzadziej, a reszta kwasu siarkowego przyłączana jest do grupy hydroksylowej w pozycji 21. Tetrahydro- i allo-tetrahydro-pochodne F i E mogą być także dalej przekształcane do kwasów kortowych przez utlenienie w pozycji 21 [7,21].



Ryc. 7. Główne szlaki metaboliczne F [7,22,44].

Zredukowane metabolity F i E mogą podlegać dalszej redukcji, katalizowanej przez dehydrogenazę 20 α - lub 20 β -hydroksysteroidową. Na tej drodze F i E są przekształcane do odpowiednio α - i β -kortolów i kortolonów [7,21]. F może podlegać redukcji grupy karbonylowej w pozycji 20 także bezpośrednio, bez uprzedniej redukcji w pierścieniu A. Powstaje wtedy 20 α - lub 20 β -hydroksykortyzol.

Kolejną alternatywną drogą metabolizmu F i E (jednak przebiegającą w mniejszym stopniu) jest hydroksylacja w pozycji 6, katalizowana przez hydroksylazę 6 β -hydroksysteroidową, prowadząca do powstania 6 β -hydroksykortyzolu [7,21,41].

Podsumowując, wydzielony F jest metabolizowany i wydalany: w ok. 50% w postaci tetrahydropochodnych F i E, w ok. 25% w postaci kortonów i kortolonów, w ok. 10% w postaci 19-węglowych pochodnych steroidowych. Pozostała część to F i E wydalone z moczem w postaci niezmienionej (UFF i UFE) oraz 6 β -hydroksykortyzol i 20 α - lub 20 β -kortyzol [7].

2. Dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa (11 β -HSD)

11 β -HSD jest enzymem katalizującym reakcje wzajemnego przekształcenia F oraz jego ok. 300 razy mniej aktywnego biologicznie [26] metabolitu - E. Przekształcenia te obejmują reakcje utlenienia i redukcji w obrębie grupy hydroksylowej F i grupy karbonylowej E w pozycji 11 (Ryc.3) [7,23-25,30,36,38-40,43,47-50]. Reakcjom tym nie ulega aldosteron, ze względu na występujące w jego strukturze ugrupowanie hemiketalowe pomiędzy atomami węgla w pozycjach 11 i 18 [25,26,32,47]. Opisano dwie odrębne izoformy 11 β -HSD: 11 β -HSD1 oraz 11 β -HSD2 [25,47,48]. Oba izoenzymy wykazują jedynie ok. 21-22% homologii sekwencji aminokwasowej, są kodowane przez odrębne geny oraz różnią się między innymi funkcją, rozmieszczeniem w organizmie, kofaktorem i powinowactwem do substratów (Tabela 1) [8,25,26,36,38,39,41,42,47,50-53].

Tabela 1. Porównanie 1 i 2 izoformy 11 β -HSD [8,25,26,36,39,41,42,47,50-55]

	11 β -HSD1	11 β -HSD2
<i>lokalizacja genu</i>	chromosom 1	chromosom 16
<i>wielkość genu</i>	30 kb 6 eksonów	6,2 kb 5 eksonów
<i>wielkość cząsteczki enzymu</i>	292 aminokwasy; 34 kDa	405 aminokwasów; 44 kDa
<i>kofaktor</i>	NADP ⁺ /NADPH	NAD ⁺ /NADH
<i>kinetyka</i>	<i>in vitro</i> : dwukierunkowa (F \leftrightarrow E) <i>in vivo</i> : głównie reduktaza (E \rightarrow F)	wyłącznie dehydrogenaza (F \rightarrow E)
<i>powinowactwo do substratu</i>	do F: niskie (K _m rzędu μ mol/l) do E: wysokie (K _m rzędu nmol/l)	do F: wysokie (K _m rzędu nmol/l)
<i>występowanie</i>	wątroba, tkanka tłuszczowa, płuca, gonady, mózg, kości	nerki, jelito grube, łożysko, ślinianki
<i>funkcja</i>	reguluje działanie GKS w tkankach bogatych w GR	chroni MR przed działaniem GKS zapewniając jego selektywność w stosunku do aldosteronu

Izoforma 1, zwana także wątrobową, występuje w tkankach bogatych w GR - najliczniej w wątrobie oraz w tkance tłuszczowej, ale jest obecna także w płucach, gonadach, mózgu, kościach. Jest enzymem zależnym od NADP⁺/NADPH. *In vitro* posiada zdolność katalizowania dwukierunkowej reakcji: utlenienia F do E (11 β -dehydrogenaza), ale także redukcji E do F (11-oksoreduktaza) [7,23,25,26,36,38,40,42,47,52,53,56]. *In vivo* pełni funkcję reduktazy, zapewniając odpowiednie

stężenie F w tkankach bogatych w GR [25,26,42]. 11 β -HSD1 charakteryzuje się niższym powinowactwem do F ($K_m = 1,8 \mu\text{mol/l}$) niż do E ($K_m = 270 \text{ nmol/l}$) [7,41,54]. Gen kodujący tę izoformę (*HSD11B1* lub *HSD11L*) jest zlokalizowany w chromosomie 1 w regionie 1q32.2, obejmuje 6 eksonów i składa się z ok. 30 tys. par zasad [7,36,42,55].

Izoforma 2 enzymu, zwana nerkową, występuje w tkankach bogatych w MR, m.in. w nerkach, jelicie grubym, śliniankach. 11 β -HSD2 działa wyłącznie jednokierunkowo jako dehydrogenaza, katalizując reakcję utlenienia F do praktycznie nieczynnego biologicznie E [15,25,26,32,38,41,47,50,52-56]. Izoforma ta charakteryzuje się znacznie wyższym powinowactwem do F ($K_m = 190 \text{ nmol/l}$), w porównaniu do 11 β -HSD1 [7,41,54]. Kofaktorem dla 11 β -HSD2 jest NAD^+/NADH [15,30,41,42,55]. Gen kodujący 11 β -HSD2, określane skrótem *HSD11B2* lub *HSD11K*, składa się z 5 eksonów, obejmuje 6200 par zasad i zlokalizowany jest w chromosomie 16 [34,36,42,51,56].

2.1. Funkcja 11 β -HSD

Aktywność GKS zależy od obecności w strukturze aktywnej grupy hydroksylowej w pozycji 11, tak jak ma to miejsce w F oraz w kortykosteronie (aktywnym GKS u gryzoni). Utlenienie tej grupy powoduje dezaktywację GKS – kortyzon i 11-dehydrokortykosteron nie są czynne biologicznie [7,15]. Obie izoformy 11 β -HSD biorą udział w reakcjach utleniania grupy hydroksylowej i redukcji grupy karbonylowej w pozycji 11 steroidów, jednak pełnią odmienne funkcje w organizmie. Ich specyficzna ekspresja w tkankach determinuje ekspozycję tkanki na aktywne GKS, a więc jest kluczowa w utrzymaniu prawidłowej gospodarki mineralo- i glikokortykosteroidowej [7,8,24,25,30,47,50]. Poprzez modulację poziomów GKS w różnych tkankach enzymy te odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych, między innymi w gospodarce węglowodanowej, procesach pamięci, otyłości, reaktywności naczyń krwionośnych, utrzymaniu prawidłowego BP oraz osteoporozie [56].

11 β -HSD1 obecna jest przede wszystkim w tkankach bogatych w GR, gdzie odpowiada za reakcję redukcji E do F, przez co zapewnia w tych tkankach odpowiednio wysoki poziom aktywnego GKS. Za jej pośrednictwem są więc regulowane fizjologiczne funkcje GKS, np. udział w wątrobowej glukoneogenezie, a także procesy zachodzące w tkance tłuszczowej [7,25,26,38,42,50,52,53,56]. Kluczowym warunkiem dla prawidłowej funkcji 11 β -HSD1 jest obecność odpowiedniego stężenia jej kofaktora – NADPH [7,15,42,52,56].

Zaburzenia w funkcji 1 izoformy 11 β -HSD związane są z występowaniem wielu chorób i zaburzeń metabolicznych. Niedobór 11 β -HSD1 jest nazywany zespołem pozornego niedoboru reduktazy kortyzonu (ACRD, *Apparent Cortisone Reductase Deficiency*). W zespole tym upośledzone jest przekształcenie E do F, a co za tym idzie zwiększona jest szybkość dezaktywacji F. W wyniku zwiększonego metabolizmu F dochodzi do pobudzenia HPA, co w konsekwencji powoduje zwiększoną

produkcję F (aby utrzymać prawidłowy poziom F w organizmie) i androgenów nadnerczowych. W schorzeniu tym obserwuje się prawidłowe poziomy F w osoczu, natomiast w moczu przeważają znacznie tetrahydrometabolity E, pochodne F występują w bardzo niskiej lub nawet niewykrywalnej ilości. Stąd stosunek sumy metabolitów F do sumy metabolitów E (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) w moczu jest znacznie obniżony (wartości $<0,05$). Ten rzadki zespół objawia się u kobiet hirsutyzmem, trądzikiem, zaburzeniami cyklu miesięczkowego oraz bezpłodnością, u mężczyzn natomiast nadmiernym owłosieniem [7,36,39-42,57]. Podobne symptomy mają pacjentki cierpiące na zespół policystycznych jajników (PCOS, *Polycystic Ovary Syndrome*). Także w etiologii tego schorzenia podejrzewa się znaczący udział 11β -HSD1 [7,36,39,41,42]. Obecna w komórkach tkanki tłuszczowej 11β -HSD1 sprzyja rozwojowi otyłości brzusznej, co z kolei wiąże się z poważnymi następstwami: cukrzycą typu 2, nadciśnieniem tętniczym, dyslipidemią oraz innymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi [7,23,31,36,39,40,42,58]. Co ciekawe, otyłość jest związana z nadmierną produkcją F, jednak jego poziomy w osoczu nie są wyższe u osób otyłych. Przeciwnie, poziomy te są zwykle niższe niż u nieotyłych, co wskazuje, że obwodowy metabolizm F jest w otyłości zwiększony [31,39,59]. W otyłości obserwuje się zwiększoną aktywność 11β -HSD1 w tkance tłuszczowej, natomiast w wątrobie przeciwnie – dochodzi do zmniejszenia aktywności tej izoformy, a spadek aktywności koreluje ze wzrostem wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*) [23,39,40,42,59]. Wyjątkiem od tej zasady są pacjenci z cukrzycą typu 2, u których nie obserwuje się zmniejszenia aktywności 11β -HSD1 w wątrobie wraz ze zwiększeniem wartości BMI [42]. Co więcej, w badaniach wykazano, że zwiększona aktywność 11β -HSD1 w tkance tłuszczowej dodatkowo korelowała z insulinoopornością u otyłych [23]. Ponadto, zaburzenia w funkcji 11β -HSD1 są potencjalną przyczyną występowania schorzeń, w których obserwuje się zmiany w działaniu insuliny - zwiększona aktywność 11β -HSD1 w wątrobie prowadzi do insulinooporności i obniżonej tolerancji glukozy [7,23,31,36,39-42,52,56,58]. Wykazano także związek pomiędzy aktywnością 11β -HSD1 a ryzykiem występowania zależnej od GKS osteoporozy. Ważne jest także, że aktywność tej izoformy w osteoblastach korelowała z wiekiem, co może świadczyć o wpływie enzymu na związane z wiekiem zmiany w gospodarce kostnej [7,36,41,42,56]. Niezmiernie istotna jest też rola 11β -HSD1 w OUN. Izoforma ta występuje w OUN najliczniej w obrębie hipokampa, podwzgórza oraz kory mózgowej [7,39,40,52]. Hipokamp, struktura odpowiedzialna za funkcje poznawcze, jest szczególnie wrażliwy na działanie GKS. Dlatego też wydaje się słuszne założenie, że zaburzona funkcja 11β -HSD1 w OUN może mieć wpływ na występowanie chorób degeneracyjnych, między innymi choroby Alzheimera [39-41]. W związku z tak szerokim spektrum efektów zaburzenia funkcji 11β -HSD1 poszukuje się nowych leków, których punktem uchwytu byłby właśnie wspomniany enzym. Inhibicja tej izoformy wydaje się być mechanizmem, który mógłby być potencjalnie wykorzystany w terapii otyłości, insulinooporności, zespołu metabolicznego, osteoporozy czy też chorób neurodegeneracyjnych [23,36,39-42,56].

11 β -HSD2 zlokalizowana jest w tych tkankach, w których najliczniej występuje MR, przede wszystkim w cewkach zbiorczych w nerkach, ale także w jelicie grubym czy łożysku. Funkcja tej izoformy polega na utlenianiu aktywnego GKS – F do praktycznie nieczynnego biologicznie E. Utlenienie to zachodzi w obrębie grupy hydroksylowej w pozycji 11 steroidu [24,25,33,34,38,41,42,48-50,52,54-56,60,61]. Ta reakcja zapewnia utrzymanie prawidłowej gospodarki mineralokortykosteroidowej, ponieważ *in vitro* wykazano, że F ma podobne powinowactwo do MR jak aldosteron [29] – fizjologiczny agonista tego receptora. E nie posiada powinowactwa do MR. Jak już wspomniano, aldosteron posiada ugrupowanie hemiketalowe w pozycjach 11 i 18, co uniemożliwia jego metabolizm przy udziale 11 β -HSD2. Tak więc dzięki funkcji 11 β -HSD2 zapewniona jest selektywność MR w stosunku do aldosteronu [32,34]. Działanie wspomnianej izoformy w ochronie MR przed dostępem F jest szczególnie istotne, ponieważ F występuje w ilościach od 100 do 1000 razy wyższych niż aldosteron [29,32,34,47,48,62]. Zachowanie możliwości pobudzenia MR przez F jest najprawdopodobniej ewolucyjnym mechanizmem lepszej adaptacji organizmu do warunków stresowych. Swoistość odpowiedzi tkanki docelowej jest regulowana nie przez receptor, ale przez pre-receptorowy mechanizm enzymatyczny [24,32,42].

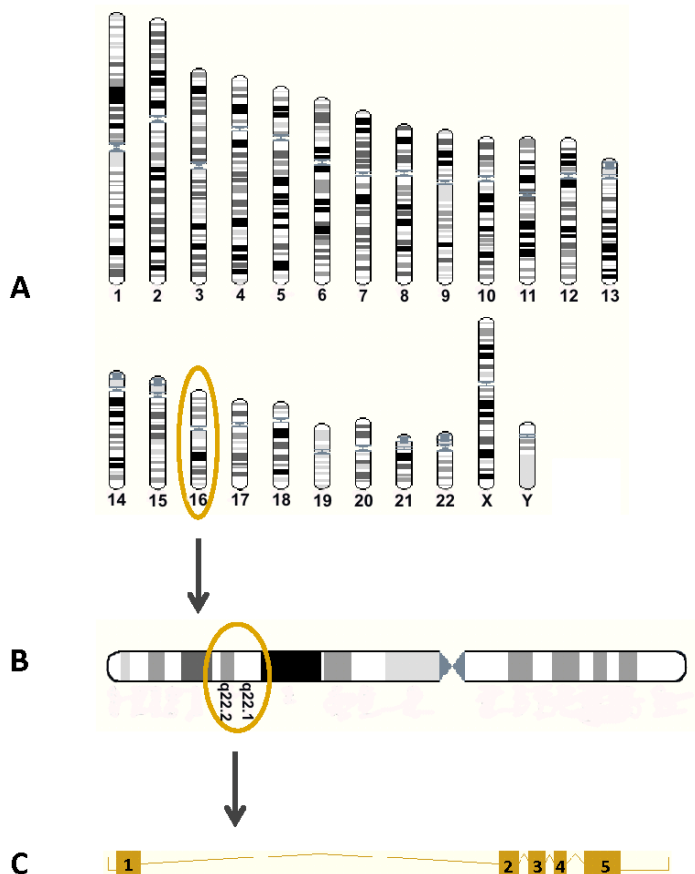
11 β -HSD2 występuje także w dużej ilości w łożysku, gdzie pełni bardzo istotną rolę ochraniając rozwijający się płód przed nadmiarem GKS pochodzących od matki, ale także regulując przepływ elektrolitów i wody w łożysku. Jest to tym ważniejsze, że nadmiar GKS spowalnia rozwój płodu. Pochodzący od matki F (produkowany przez organizm kobiety w dużo większej ilości niż fizjologiczny poziom tego hormonu u rozwijającego się płodu) jest inaktywowany przez łożyskową 11 β -HSD2 prawie w całości. Wykazano, że około $\frac{3}{4}$ aktywnych GKS u noworodka jest produkowane przez nadnercza dziecka, a tylko ok. $\frac{1}{4}$ pochodzi od matki [47,50,52,63-65]. Ponadto, 11 β -HSD2 występuje licznie w mózgu rozwijającego się płodu w 2 tryestrze ciąży, co sugeruje jej funkcję neuroprotekcijną [52].

Sugerowana jest także rola 11 β -HSD2 w procesie powstawania nowotworów. Jak wiadomo, GKS wykazują działanie antyproliferacyjne poprzez hamowanie cyklu komórkowego w fazie G1, a 11 β -HSD2 przekształcając F do E, zmniejsza ten efekt wywołany przez endogenne F. W badaniach wykazano, że w niektórych hodowlach komórkowych, między innymi raka piersi i endometrium, inhibicja 11 β -HSD2 okazała się korzystna, gdyż zwiększona została antyproliferacyjna aktywność GKS, przez co wzrost guza był spowolniony [8,36,42,52].

2.2. Budowa genu *HSD11B2*

Enzym 11 β -HSD2 jest kodowany przez gen określany skrótem *HSD11B2* lub *HSD11K*, który zlokalizowany jest w chromosomie 16 [51,66,67]. Gen *HSD11B2* jest położony w odległości wynoszącej 55% długości mierzonej od centromeru do telomeru długiego ramienia chromosomu

16 [51], w regionie 16q22 [51,66,67]. Całkowita długość genu wynosi około 6200 par zasad. W procesie transkrypcji powstaje mRNA o długości 1879 par zasad [67], a powstałe w procesie translacji białko enzymatyczne składa się z 405 aminokwasów [51,66,67]. *HSD11B2* składa się z 5 eksonów, które zbudowane są odpowiednio z: 376, 213, 186, 138 oraz 966 par zasad. Pierwszy ekson jest położony w odległości ok. 4000 par zasad przed pozostałymi czterema, które rozdzielone są od siebie krótkimi fragmentami intronowymi, wynoszącymi odpowiednio: 116, 106 oraz 201 par zasad [66,67]. Fragment 5'UTR stanowiący część eksonu 1 ma długość 112 par zasad, natomiast fragment 3'UTR, będący końcowym odcinkiem piątego eksonu, jest zbudowany z 549 par zasad [67]. Region promotorowy oraz ekson 1 genu *HSD11B2* to odcinki bogate w powtórzenia zasad G i C (tzw. *GC-rich*). G i C stanowią około 80% wszystkich zasad w sekwencji tych fragmentów [51,68]. W regionie promotorowym *HSD11B2* brak elementów TATA. W odcinku promotorowym oraz w eksonie 1 ludzkiego genu *HSD11B2* znajdują się dwie typowe wyspy CpG, kolejne dwie wyspy CpG zlokalizowano w obrębie eksonu 5 oraz w regionie za genem w kierunku 3' [68]. Schemat budowy oraz lokalizacji genu *HSD11B2* przedstawiony jest na rycinie 8.



Ryc. 8. Schemat budowy i lokalizacji genu *HSD11B2*: A - chromosomy; B - chromosom 16; C - gen *HSD11B2*, eksony są zaznaczone kolorowymi prostokątami i ponumerowane, introny zaznaczone linią [67].

2.3. Zaburzenia w aktywności 11 β -HSD2

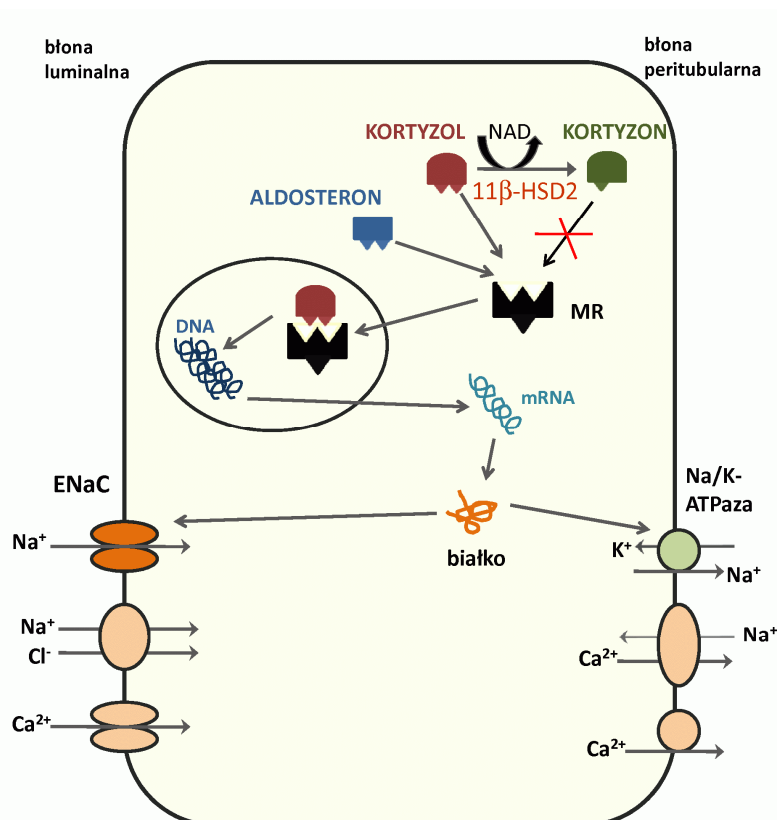
W przypadku zmniejszenia lub całkowitym braku aktywności 11 β -HSD2 dochodzi do upośledzenia dezaktywacji F i jego nagromadzeniu w ustroju. Wrodzony niedobór 11 β -HSD2 jest określany jako zespół pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów (AME, *Apparent Mineralocorticoid Excess*). Defekty w aktywności 11 β -HSD2 mogą mieć jednak także charakter nabyty – szerzej przyczyny zaburzeń w funkcji tego enzymu zostaną opisane w rozdziale 2.4. Klasyczna postać AME charakteryzuje się całkowitym brakiem aktywności 11 β -HSD2. Sugeruje się jednak, że łżejsze defekty wymienionego enzymu, których skutkiem jest częściowa utrata aktywności, mogą leżeć u podstaw etiologii nadciśnienia tętniczego, szczególnie jeśli chodzi o postać nadciśnienia niskoreninowego z sodowrażliwością [16,24,25,30,32-34,38,41,42,44,53,55,56,60,69,70-75]. Wykazano, że obniżenie aktywności 11 β -HSD2 koreluje z cechą sodowrażliwości, czyli spadkiem BP po ograniczeniu podaży soli w diecie. U pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, którzy nie mają wyraźnych objawów nadmiaru mineralokortykosteroidów, ale u których wartości BP korelują dodatnio z poziomem sodu w osoczu, a ujemnie ze stężeniem potasu, kortykosteroidy nadnerczy odgrywają najprawdopodobniej istotną rolę w patogenezie choroby nadciśnieniowej [15,25,55,60]. Rola 11 β -HSD2 w etiologii nadciśnienia tętniczego jest prawdopodobnie szersza niż udział w ochronie MR przed dostępem F. Wykazano, że enzym ten bierze udział w regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych poprzez wpływ na odpowiedź na czynniki wazokonstrykcyjne. Zahamowanie aktywności 11 β -HSD2 w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych skutkowało silniejszym skurczem naczyń w odpowiedzi na działanie angiotensyny II czy fenylefryny [38,60].

11 β -HSD2 obecna w łożysku jest bardzo ważnym enzymem w procesie prawidłowego rozwoju płodu, a aktywność łożyskowej 11 β -HSD2 koreluje pozytywnie z masą urodzeniową dziecka. W przypadku zaburzeń w aktywności wymienionego enzymu jednym z następstw jest między innymi niska masa urodzeniowa. Ponadto, wykazano, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu enzymatycznej bariery chroniącej płód przed matczynymi GKS predysponują w przyszłości do wystąpienia nadciśnienia tętniczego oraz nietolerancji glukozy u dziecka [25,39,47,50,63,64].

Patomechanizm AME

Upośledzenie aktywności 11 β -HSD2 prowadzi do zmniejszonego metabolizmu F do nieczynnego biologicznie E i nagromadzenia F w organizmie. W tkankach bogatych w MR zaburzony zostaje pre-receptorowy mechanizm chroniący MR przed dostępem F. Wskutek tego F zaczyna pełnić rolę mineralokortykosteroidu, wywołując efekty charakterystyczne dla działania aldosteronu. Przy tym, co najbardziej niebezpieczne, mineralokortykosteroidowa aktywność F nie podlega kontroli układu renina-angiotensyna. W wyniku pobudzenia MR w komórkach kanalka dalszego nefronu dochodzi do otwarcia nabłonkowych kanałów sodowych (ENaC, *Epithelial Sodium Channel*) (Ryc. 9). Jony sodowe

są transportowane do wnętrza komórki, a więc rośnie stężenie wewnątrzkomórkowe jonów Na^+ . To z kolei pobudza w błonie peritubularnej pompę sodowo-potasową (Na/K-ATPazę), która usuwa z wnętrza komórki jony Na^+ oraz powoduje napływ jonów potasowych do wnętrza komórki. Retencji osmotycznie czynnych jonów Na^+ towarzyszy zatrzymanie wody w płynie zewnątrzkomórkowym, a więc zwiększenie jego objętości. Wskutek powstałej hiperwolemii zwiększa się objętość wyrzutowa serca. Dodatkowo, reabsorbacja Na^+ powoduje zwiększone wydalanie z moczem K^+ oraz H^+ . Tak więc wskutek nadmiernej aktywacji MR dochodzi do rozwoju nadciśnienia tętniczego, hipokaliemii oraz zasadowicy [15,25,33,34,55,60].



Ryc. 9. Patomechanizm AME związany z pobudzeniem MR przez F [15,25,33].

Objawy kliniczne oraz diagnostyka AME

AME jest schorzeniem dziedzicznym autosomalnie, dlatego najczęściej obserwuje się pierwsze objawy już we wczesnym dzieciństwie. Konsekwencją defektu w funkcjonowaniu $11\beta\text{-HSD2}$ w klasycznej postaci AME (AME I), a więc przy całkowitej utracie aktywności enzymu, jest niska masa urodzeniowa, a następnie nieprawidłowy wzrost dziecka, osłabienie mięśniowe, polidypsja oraz poliuria. Następnie pojawiają się ostre objawy, często zagrażające życiu, takie jak: nadciśnienie tętnicze, hipokaliemia oraz zasadowica metaboliczna. Obserwuje się także niską aktywność reninową osocza (ARO) oraz bardzo niski poziom aldosteronu w surowicy. Stąd też wzięła się nazwa zespołu –

pomimo objawów podobnych do hiperaldosteronizmu występuje prawie niewykrywalny poziom aldosteronu w surowicy, a więc jest to „pozorny nadmiar mineralokortykosteroidów”. Występująca w AME silna hipokaliemia może doprowadzić z kolei do arytmii, rabdomiolizy oraz moczówki prostej nerkowej, która objawia się zwiększonym pragnieniem oraz poliurią. Poliuria spowodowana jest hipokaliemią, ale też zwiększeniem objętości płynu zewnątrzkomórkowego i zwiększoną filtracją kłębuszkową. Wśród innych groźnych dla życia zaburzeń można wyróżnić także niewydolność nerek, do której dochodzi wskutek występowania torbieli oraz kamicy nerkowej. Zasadowica metaboliczna skutkuje obniżeniem poziomu wapnia we krwi, co w połączeniu z występującą hiperkalciurią powoduje wtórną nadczynność przytarczyc. Niewyrównane nadciśnienie tętnicze pociąga za sobą wiele zmian narządowych, między innymi w nerkach, systemie sercowo-naczyniowym, siatkówce oka oraz OUN [15,23,25,33,34,38,41,42,48,52,55,56,60,69,71,76].

Wyróżnia się także łagodniejszą postać zespołu (AME II), w przypadku której pierwsze objawy pojawiają się w okresie pokwitania lub u młodych dorosłych. Nie obserwuje się tu całkowitej utraty działania 11 β -HSD2, ale częściowy defekt w jej funkcjonowaniu. Obie postaci zespołu to te same jednostki chorobowe, jednak pojawiające się w AME II objawy mają zdecydowanie mniejsze nasilenie. Pomimo tego, że metabolizm F jest w obu postaciach AME zaburzony, pacjenci z tym schorzeniem nie wykazują cech charakterystycznych dla zespołu Cushinga. Poziom F w osoczu jest prawidłowy, co wiąże się z ujemnym sprzężeniem zwrotnym regulującym wydzielanie GKS [15,38,41,55,60,69,71].

Diagnostyka AME rozpoczyna się od stwierdzenia charakterystycznych dla zespołu objawów, a więc niskiej masy urodzeniowej, spowolnienie tempa wzrostu, polidypsji i poliurii. Następnie przeprowadza się analizę biochemiczną krwi oceniając przede wszystkim poziom potasu i aldosteronu oraz ARO. Jeśli wyniki przeprowadzonych w tym etapie badań nie wykluczają AME, przechodzi się do oceny aktywności 11 β -HSD2, przede wszystkim poprzez ocenę profilu GKS w osoczu oraz w dobowej zbiorce moczu (DZM; szczegółowy opis parametrów wykorzystywanych w ocenie aktywności 11 β -HSD2 znajduje się w rozdziale 2.5.). W przypadku wyników sugerujących AME, diagnozę należy dodatkowo potwierdzić wykonując badania genetyczne mające na celu ustalenie występowania mutacji w genie *HSD11B2*. Za rozpoznaniem przemawia także złagodzenie objawów po wprowadzeniu diety bezsolnej, oraz ich nasilenie po podaniu ACTH [15,25,33,38,41,42,55,56,60,69,71].

Leczenie chorych z AME

Podstawowym zadaniem terapii u pacjentów z AME jest normalizacja wartości BP oraz utrzymanie prawidłowego poziomu potasu. Nadciśnienie tętnicze w AME wynika z nadmiernej ekspresji ENaC regulowanej przez MR, wskutek czego dochodzi do nadmiernego wchłaniania zwrotnego jonów Na⁺ w kanalik dystalnym. Wobec tego leczenie opiera się na ograniczeniu podaży

soli w diecie oraz suplementacji potasu [15,25,41,42,71]. Farmakoterapia rozpoczyna się najczęściej od podania deksametazonu, który nie wykazuje działania antymineralokortykosteroidowego, ale hamuje wydzielanie ACTH, co z kolei zmniejsza sekrecję F. Bardzo ważne jest tu jednak prawidłowe ustalenie przyjmowanych przez pacjenta dawek, gdyż zbyt duża dawka leku mogłaby doprowadzić do jatrogennego zespołu Cushinga. Często istnieje konieczność włączenia do terapii dodatkowych leków hipotensyjnych. W takiej sytuacji stosuje się diuretyki oszczędzające potas i będące inhibitorami ENaC – amilorid i triamteren, lub blokery MR – spironolakton lub eplerenon. Spironolakton ma tu jednak ograniczone zastosowanie ze względu na konieczność przyjmowania bardzo wysokich dawek, co z kolei nasila ryzyko wystąpienia poważnych działań niepożądanych [15,24,25,38,41,42,60,69,71]. W terapii AME zastosowanie znalazły także inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACE-I, *angiotensin-converting enzyme inhibitors*), a w szczególności kaptopril. W badaniach wykazano, że lek ten może nasilać działanie nerkowej 11 β -HSD2, co jest szczególnie istotne w leczeniu pacjentów, u których częściowo zachowana jest aktywność enzymu [42]. W przypadku chorych z AME cierpiących na niewydolność nerek wyleczenie obserwowano po przeszczepieniu nerki [15,42,60].

2.4. Przyczyny defektów w aktywności 11 β -HSD2

Zaburzenia w aktywności 11 β -HSD2, które objawiają się nadciśnieniem tętniczym z hipokaliemią, zasadowicą metaboliczną i niską ARO, są najczęściej skutkiem mutacji występujących w genie *HSD11B2*. Mogą one jednak wynikać także z działania inhibitorów 11 β -HSD2, do których zaliczyć można zarówno leki i substancje pochodzenia roślinnego, jak też związki endogenne (nabyta niedoczynność 11-HSD2 została szerzej opisana w rozdziale 2.4.2).

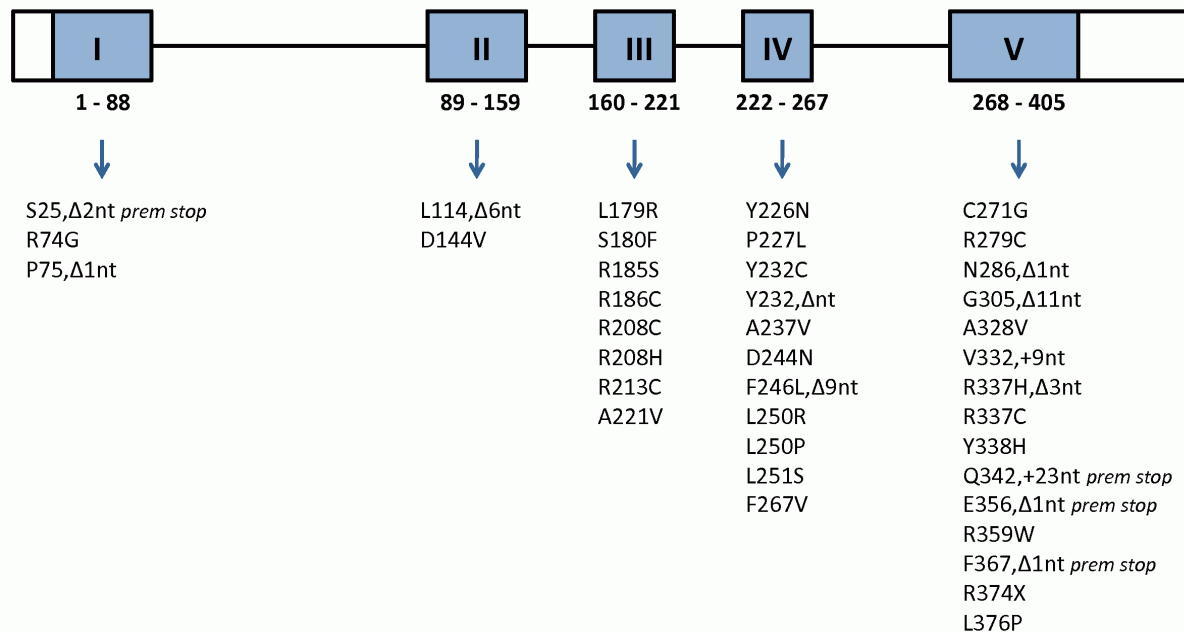
Podobne objawy do AME obserwuje się także w przypadku nadmiernej produkcji F w organizmie, jak ma to miejsce w zespole ekotopowego wydzielania ACTH, czy zespole Cushinga. Powstający w nadmiarze F osiąga wtedy tak wysoki poziom w organizmie, że 11 β -HSD2, której aktywność jest zupełnie prawidłowa, zostaje wysycona substratem. Skutkuje to oddziaływaniem F z MR, a w organizmie obserwuje się objawy nadmiaru mineralokortykosteroidów [15,33,41,60,71,72].

2.4.1. Mutacje w genie *HSD11B2*

AME jest chorobą genetyczną, dziedziczną autosomalnie recesywnie. Spowodowana jest inaktywującą mutacją w genie *HSD11B2*, która skutkuje powstaniem nieprawidłowego białka enzymatycznego o obniżonej aktywności. Wykazano też ścisłą korelację pomiędzy klinicznym i biochemicznym fenotypem pacjenta a jego genotypem. Im bardziej istniejąca mutacja obniża aktywność 11 β -HSD2, tym bardziej nasilone objawy AME [25,38,42,55,60,61,69,77].

Do tej pory opisano ponad 30 mutacji występujących w genie *HSD11B2* [34,44,61,73-93]. Większość znanych mutacji w genie *HSD11B2* została zlokalizowana w eksonach 3 – 5 (Ryc. 10),

jednak to eksony 3 i 4 wydają się być fragmentami genu mającymi największe znaczenie jeśli chodzi o występowanie mutacji [15,41,42,55]. Zidentyfikowane u pacjentów z AME mutacje miały w większości charakter homozygotyczny, rzadziej heterozygotyczny. Mutacje w genie *HSD11B2* polegają najczęściej na wymianie pojedynczego nukleotydu i skutkują przedwczesnym pojawieniem się kodonu stop lub zmianą w sekwencji aminokwasów w białku enzymatycznym. Białko o zmienionej sekwencji wykazuje natomiast zmniejszoną w różnym stopniu aktywność, aż do całkowitej utraty funkcji katalitycznej [15,38,41,42,55].



Ryc. 10. Lokalizacja mutacji w genie *HSD11B2*. Niebieskimi prostokątami są zaznaczone eksony, liniami – introny. Białe prostokąty odpowiadają fragmentom UTR. Pod eksonami podano numery aminokwasów kodowanych przez dane fragmenty [55].

Pierwszą opisaną mutacją w genie *HSD11B2* występującą u chorych na AME pochodzących z Iranu była zamiana argininy na cysteinę w pozycji 337 spowodowana wymianą C na T w kodonie 337 (R337C). Mutacja R337C u chorych na AME była homozygotyczna, natomiast członkowie rodziny, u których nie stwierdzono AME byli heterozygotami [82]. Wiele mutacji w genie *HSD11B2* opisanych u pacjentów z AME polega właśnie na wymianie argininy na cysteinę [44,76,77,82,84,88] co jest zgodne z obserwacjami, że najczęstszy typ punktowych mutacji to zamiana nukleotydów C na T (CpG na TpG), co skutkuje wspomnianą zmianą aminokwasów w białku [77,82]. Mutacja R213C skutkuje powstaniem enzymu o aktywności wynoszącej poniżej 5% w porównaniu do 11β-HSD2 o prawidłowej budowie [44,76,88]. Zamiana argininy na cysteinę w pozycji 279 białka (R279C) powoduje w konsekwencji powstanie enzymu, którego aktywność jest zachowana na poziomie 33% wartości prawidłowej [77].

Klasyczna postać AME jest rzadkim zespołem, ale podejrzewa się, że genetycznie uwarunkowane zaburzenia w aktywności 11β-HSD2 mogą być częstą przyczyną pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

Dotyczy to przypadków nadciśnienia tętniczego, wśród których obserwuje się niski poziom potasu w osoczu, sodowrażliwość oraz niską ARO [15,23-25,38,39,42,44,55,60,62,72-74,91,92]. Prowadzono badania mające na celu ocenę wpływu aktywności 11 β -HSD2 na powstawanie nadciśnienia tętniczego, w których jednak nie uzyskano jednoznacznych wyników. Dowiedziono, że u pacjentów pochodzenia włoskiego z sodowrażliwością obserwuje się zaburzoną funkcję tego enzymu objawiającą się podwyższonymi wartościami UFF/UFE oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE). Ponadto, udowodniono związek pomiędzy długością fragmentów mikrosatelitarnych w intronie 1 genu *HSD11B2* a występowaniem sodowrażliwości, zarówno u osób zdrowych, jak i u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Obserwowano krótsze fragmenty powtórzeń CA w intronie 1 u osób z sodowrażliwością, a długość tych fragmentów korelowała negatywnie z wartościami UFF/UFE [74]. Inne badania, przeprowadzone na dużej grupie pacjentów w Chile, wykazały związek pomiędzy ilością powtórzeń CA w intronie 1 genu *HSD11B2* a wartością stosunku F/E w osoczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym niskoreninowym. Zależności tej nie obserwowano u osób z prawidłowym BP, ani u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym z prawidłowymi wartościami ARO [91]. Wyodrębniono także polimorfizm polegający na wymianie G na A w pozycji 534 genu *HSD11B2*, w kodonie 178 (GAG→GAA) [73,75,79,83,93]. Wykazano, że w populacji pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym pochodzących ze Szwecji, częściej pojawia się genotyp 534GG w porównaniu do osób zdrowych [73]. Podobnych wyników nie uzyskano jednak w badaniach wykonanych na dużej populacji francuskiej [79]. Ten polimorfizm został także już wcześniej opisany w badaniach na populacji osób rasy kaukaskiej. Wykazano, że pojawia się on z większą częstością u pacjentów z niewydolnością nerek po przeszczepie nerki niż u osób zdrowych [83]. W innych badaniach, wykonanych na dużej grupie osób rasy białej, nie wykazano jednak związku pomiędzy tym polimorfizmem a występowaniem niewydolności nerek [75]. Dodatkowo, zmiana ta nie wpływa na sekwencję aminokwasów w białku enzymatycznym, a co za tym idzie nie obniża bezpośrednio funkcji katalitycznej 11 β -HSD2, tak więc mechanizm powiązania występowania nadciśnienia tętniczego czy niewydolności nerek z tym markerem pozostaje nie do końca jasny [55,73,75,83]. W badaniach przeprowadzonych na populacji włoskiej nie wykazano związku mutacji 534G>A z występowaniem nadciśnienia tętniczego, wyodrębniono jednak polimorfizm w pozycji 468 genu *HSD11B2*, dla którego związek z nadciśnieniem tętniczym był istotny [93]. Badania przeprowadzone w grupach Japończyków nie wykazały związku pomiędzy występowaniem mutacji w genie *HSD11B2* a powstawaniem pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Opisano kilka nowych punktowych mutacji, jednak pojawiały się one z podobną częstością w grupie chorych na nadciśnienie tętnicze oraz u zdrowych osób z grupy kontrolnej [89,90].

Podsumowując, można stwierdzić, że dotychczas nie ma jednoznacznych wyników badań, które potwierdziłyby lub zanegowały udział 11 β -HSD2 w etiologii nadciśnienia tętniczego. Zasadne jest

jednak, aby szczególną uwagę zwrócić na przypadki pierwotnego nadciśnienia tętniczego, u których obserwuje się hipokaliemię, sodowrażliwość oraz niską ARO, gdyż to właśnie u tych pacjentów najbardziej prawdopodobny jest udział endogennych GKS w etiologii schorzenia [15,23,38,39,42,55,60,91,92].

2.4.2. Nabyta niedoczynność 11 β -HSD2

Obniżenie aktywności 11 β -HSD2 nie musi wynikać z przyczyn genetycznych. Znane są inhibitory tego enzymu, są to zarówno leki, składniki produktów pochodzenia roślinnego, jak i substancje endogenne. Ich działanie wywołuje efekty charakterystyczne dla nadmiaru mineralokortykosteroidów, jednak najczęściej o mniejszym nasileniu niż te obserwowane u pacjentów z AME. Klasycznym przykładem jest tu kwas glicyretynowy zawarty w lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*), która jest surowcem wykorzystywanym jako lek roślinny, ale także jako środek słodzący w przemyśle spożywczym. Innym przykładem jest flawonoid – naryngenina, zawarty między innymi w soku grejpfrutowym, jak również polifenole zawarte w herbacie. Wśród leków właściwościami hamującymi aktywność 11 β -HSD2 cechuje się karbenoksolon, który jest pochodną kwasu glicyretynowego stosowaną w leczeniu choroby wrzodowej żołądka. Karbenoksolon stracił obecnie na znaczeniu w terapii choroby wrzodowej na korzyść inhibitorów pompy protonowej. Słabym kompetytywnym inhibitorem obu izoform 11 β -HSD jest również furosemid, lek z grupy diuretyków pętlowych szeroko stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego [15,23-25,27,32,38,41,53-55,62,71,94-97].

Wykazano, że na aktywność 11 β -HSD2 mogą także wpływać substancje endogenne – są to związki o budowie podobnej do kwasu glicyretynowego (GALFs, *Glycyrrhetic Acid-like Factors*). Do związków tych zalicza się zarówno progesteron, jak i jego metabolity - 11 α - oraz 11 β -hydroksyprogesteron. U kobiet w ciąży obserwuje się podwyższony poziom GALFs, szczególnie w drugim i trzecim trymestrze, dlatego związki te były podejrzewane o udział w patogenezie nadciśnienia tętniczego u ciężarnych. Jednakże badania, w których próbowano korelować poziom GALFs wydalanych z moczem z wartościami BP lub innymi parametrami charakterystycznymi dla nadmiaru mineralokortykosteroidów nie dały pozytywnych rezultatów [15,25,53,54,60].

2.5. Ocena aktywności 11 β -HSD2

W przypadku obniżonej aktywności 11 β -HSD2, tak dziedzicznej, jak nabytej, dochodzi do nagromadzenia F w organizmie [23]. Pacjenci z AME nie wykazują jednak cech charakterystycznych dla nadmiaru F (cech zespołu Cushinga), co tłumaczy się tym, że zmniejszony metabolizm F prowadzi na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego do zmniejszenia sekrecji F. Dlatego też często obserwuje się prawidłowy poziom F u pacjentów z AME [33,60]. Defekt w aktywności 11 β -HSD2 stwierdza się

przede wszystkim na podstawie zaburzeń we wzajemnych przemianach F i E (Tabela 2). Ze względu na upośledzony metabolizm F dochodzi do wydłużenia czasu półtrwania F w osoczu z ok. 60-90 min w warunkach fizjologicznych [5,13,21,24,60] do ok. 120-190 min u pacjentów z AME [24,60]. W związku ze zmniejszonym metabolizmem F do E w nerkach obserwuje się także podwyższenie wydalania w DZM wolnego F (UFF) w stosunku do wolnego E (UFE). Zdrowy człowiek wydalą z moczem ok. 2-3 razy więcej UFE niż UFF (w prawidłowych warunkach stosunek UFF/UFE wynosi <0,6), w przypadku braku aktywności 11 β -HSD2 poziomy UFE w DZM są praktycznie niewykrywalne. Ponadto, w przypadku zaburzeń w funkcji 11 β -HSD2 obserwuje się zwiększenie wydalania z moczem metabolitów F (THF oraz allo-THF) w porównaniu do metabolitów E (THE i allo-THE). W warunkach fizjologicznych stosunek sumy metabolitów F do sumy metabolitów E: (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) jest w przybliżeniu równy jedności, przyjmuje się za prawidłowe wartości tego parametru nie przekraczające 1,4. W przypadku klasycznej postaci AME wartość (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) może być nawet kilkanaście-kilkadziesiąt razy wyższa. Czwartym parametrem użytecznym w ocenie aktywności 11 β -HSD2 jest stosunek stężenia F do stężenia E w osoczu. Wartość F/E w osoczu jest podwyższona w przypadku zmniejszonego metabolizmu F [15,24,33,38,41,42,44,49,60,71].

Defektowi 11 β -HSD2 towarzyszy często zaburzenie funkcji 5 β -reduktazy, która metabolizuje F do THF. U pacjentów z AME obserwuje się zatem często podwyższone wartości stosunku allo-THF/THF w DZM, który obrazuje równowagę pomiędzy 5 α - oraz 5 β -reduktazą [15,24,42,44,60].

Najbardziej użytecznym parametrem w ocenie aktywności izoformy 2 11 β -HSD jest stosunek UFF/UFE w DZM. Pozostałe parametry uważa się za mniej dokładne ze względu na to, że na ich wartość ma wpływ także aktywność 11 β -HSD1, a więc obrazują one bardziej całkowitą aktywność 11 β -HSD w organizmie. Potwierdzeniem są tu przypadki osób z AME typu II, u których obserwuje się łagodniejsze objawy niedoboru 11 β -HSD2. U tych pacjentów często nie dochodzi do znaczącego wzrostu wartości parametrów F/E w osoczu oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) w DZM, natomiast UFF/UFE oraz biologiczny okres półtrwania F są podwyższone [15,42,49,55,60].

Tabela 2. Parametry użyteczne w ocenie aktywności 11 β -HSD2 – wartości referencyjne oraz przemawiające za rozpoznaniem AME [24].

parametr	wartość prawidłowa	rozpoznanie AME
$\frac{UFF}{UFE}$ w DZM	< 0,6	$\geq 3,0$
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$ w DZM	< 1,4	$\geq 3,0$
$\frac{F}{E}$ w osoczu	< 4,0	$\geq 10,0$

W przypadku, gdy wartości podanych powyżej parametrów są wyższe niż prawidłowe, ale nie wskazują na rozpoznanie AME, możliwe jest między innymi przedawkowanie lukrecji lub naryngeny, zespół ektopowego wydzielania ACTH, niewydolność nerek, marskość wątroby, łagodna postać AME (AME II) lub nadciśnienie tętnicze na tle zmniejszonej aktywności 11β -HSD2 [24].

3. Nadciśnienie tętnicze

3.1. Definicja oraz klasyfikacja nadciśnienia tętniczego

Kryteria rozpoznania nadciśnienia tętniczego, a więc oddzielenie stanu normalnego od patologii, mają charakter umowny. *Głuszek i wsp.* [98] zaproponowali definicję nadciśnienia tętniczego jako „trwałe podwyższenie BP do wartości, które w istotny sposób zwiększają ryzyko sercowo-naczyniowe w stosunku do wartości optymalnych ciśnienia, a jednocześnie takich, przy których skuteczna terapia hipotensyjna istotnie zmniejsza ryzyko sercowo-naczyniowe, tzn. korzyści terapii przewyższają związane z nią ryzyko”. Według aktualnych zaleceń (z 2007 roku) Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH, *European Society of Hypertension*) oraz Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC, *European Society of Cardiology*) nadciśnienie tętnicze rozpoznaje się po wielokrotnie stwierdzonych w gabinecie lekarskim lub w warunkach domowych wartościach BP przekraczających 140/90 mmHg [98-101]. Najnowsze zalecenia ESH/ESC z 2007 roku utrzymały klasyfikację wartości BP (Tabela 3) zaproponowaną w poprzednich wytycznych z 2003 roku, jednak z pewnymi zastrzeżeniami [100]:

- jeżeli przy ocenie całkowitego ryzyka sercowo-naczyniowego wartości skurczowego i rozkurczowego BP kwalifikują pacjenta do różnych kategorii, to przy podejmowaniu decyzji o leczeniu farmakologicznym i ocenie jego skuteczności należy brać pod uwagę kategorię wyższą.
- izolowane skurczowe nadciśnienie tętnicze należy podzielić według wartości ciśnienia skurczowego na stopnie 1 – 3 tak, jak w przypadku nadciśnienia skurczowo-rozkurczowego. Niskie wartości ciśnienia rozkurczowego (na poziomie 60 – 70 mmHg) powinny być u tych pacjentów postrzegane jako dodatkowy czynnik ryzyka.
- wartość progową rozpoznania nadciśnienia tętniczego i wdrożenia farmakoterapii należy rozpatrywać indywidualnie, biorąc pod uwagę całkowite ryzyko i profil sercowo-naczyniowy.

Indywidualne rozpatrywanie każdego przypadku jest niezmiernie istotne, ponieważ wartości BP akceptowalne w grupie pacjentów niskiego ryzyka mogą być uznane za zbyt wysokie i wymagające leczenia farmakologicznego u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego [100]. Jest to tym ważniejsze, że zauważono, że wzrastające wartości BP już od uznawanego za prawidłowy

poziomu 110 – 115 mmHg dla ciśnienia skurczowego i 70 – 75 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego korelują dodatnio z ryzykiem sercowo-naczyniowym [98,100,102].

Tabela 3. Klasyfikacja wartości BP wg zaleceń ESH/ESC z 2007 roku [98-100].

KATEGORIA	CIŚNIENIE SKURCZOWE [mmHg]	CIŚNIENIE ROZKURCZOWE [mmHg]
optymalne	<120	i <80
prawidłowe	120 – 129	i/lub 80 – 84
wysokie prawidłowe	130 – 139	i/lub 85 – 89
nadciśnienie stopnia 1 – łagodne	140 – 159	i/lub 90 – 99
nadciśnienie stopnia 2 – umiarkowane	160 – 179	i/lub 100 – 109
nadciśnienie stopnia 3 – ciężkie	≥180	i/lub ≥110
izolowane ciśnienie skurczowe	≥140	i <90

Wytyczne ekspertów amerykańskich z *Joint National Comitee* z 2003 roku wprowadziły uproszczoną klasyfikację. Połączono 2 i 3 stopień nadciśnienia ze względu na podobne postępowanie terapeutyczne zalecane w obu grupach oraz obniżono górną granicę prawidłowych wartości BP do 120/80 mmHg. Wprowadzono także pojęcie stanu przednadciśnieniowego (*prehypertension*), który rozpoznaje się przy wartościach BP w granicach 120 – 139 mmHg dla ciśnienia skurczowego i 80 – 89 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego. W wytycznych ESH/ESC nie zdecydowano się jednak na wprowadzenie tego określenia. W podejmowaniu takiej decyzji kierowano się między innymi wynikami badań, które dowodziły istotnych różnic w ryzyku sercowo-naczyniowym u osób z prawidłowymi (120-129/80-84 mmHg) i wysokimi prawidłowymi (130-139/85-89 mmHg) wartościami BP. Ponadto, pojęcie „stan przednadciśnieniowy” może budzić lęk u laika, co z kolei skutkowałoby niepotrzebnymi wizytami u lekarza. Konieczność objęcia tak dużej grupy osób szczególną opieką medyczną byłaby także niekorzystna ze względów ekonomicznych. Termin ten jest istotny dla pacjentów z cukrzycą, po przebytym udarze mózgu lub zawale serca, jednak w grupie osób bez patologii narządowych nie ma już tak dużego znaczenia [98-100,102].

3.2. Etiologia nadciśnienia tętniczego

Ze względu na etiopatogenezę, nadciśnienie tętnicze możemy podzielić na pierwotne, lub inaczej zwane samoistnym, oraz wtórne. Nadciśnienie pierwotne, nazywane również idiopatycznym, obejmuje 90 – 95% wszystkich przypadków nadciśnienia. Etiologia powstawania samoistnego nadciśnienia tętniczego nie jest znana, według aktualnej wiedzy powstawanie tego schorzenia jest wieloczynnikowe. Tę postać nadciśnienia tętniczego diagnozuje się najczęściej pomiędzy 30 a 50

rokiem życia [98,101,103]. Nadciśnienie tętnicze wtórne, czyli takie, którego przyczyna jest znana, to zaledwie 5 – 10% wszystkich rozpoznanych przypadków. Jest ono związane najczęściej z chorobami nerek, zaburzeniami endokrynologicznymi, koarktacją (zwężeniem) aorty, chorobami neurologicznymi. Do tej postaci zalicza się także nadciśnienie występujące u kobiet podczas ciąży oraz przypadki nadciśnienia tętniczego po zażyciu leków lub innych substancji [98,103].

3.2.1. Nadciśnienie tętnicze wtórne

Wtórna postać nadciśnienia tętniczego dotyczy niewielkiej części pacjentów cierpiących na to schorzenie. Do przyczyn powstawania nadciśnienia tętniczego wtórnego można zaliczyć:

- choroby nerek – nadciśnienie tętnicze może być spowodowane przez wiele schorzeń nerek, zarówno w obrębie tkanki śródmiąższowej (odmiedniczkowe zapalenie nerek, kłębuszkowe zapalenie nerek, zaburzenia odpływu moczu, nowotwory nerek), jak i naczyń krwionośnych doprowadzających krew do nerek (miażdżyca tętnic nerkowych, uszkodzenie małych naczyń) [98,103].
- zaburzenia endokrynologiczne – dotyczące przede wszystkim hormonów nadnerczy: pierwotny hiperaldosteronizm (zespół Conna), zespół Cushinga, guz chromochłonny nadnerczy (wydziela aminy katecholowe). Postacią wtórną nadciśnienia tętniczego związaną z zaburzeniami metabolizmu F jest także opisany wcześniej zespół AME. Ponadto, nadciśnienie tętnicze może wystąpić jako konsekwencja nadczynności lub niedoczynności tarczycy [98,103,104].
- koarktacja aorty – jest to zwężenie aorty w pobliżu odejścia lewej tętnicy podobojczykowej. Obserwuje się podwyższenie ciśnienia w kończynach górnych i obniżenie ciśnienia w kończynach dolnych, a zmniejszona perfuzja nerek powoduje zwiększoną aktywność układu renina-angiotensyna i skurcz tętnic obwodowych [98,103].

Specyficzną postacią nadciśnienia tętniczego wtórnego jest nadciśnienie pojawiające się u kobiet w czasie ciąży. Problem ten dotyczy ok. 5 – 10% wszystkich ciężarnych kobiet, szacuje się, że w Polsce rocznie występuje ok. 30 tys. przypadków, a większość z nich to kobiety w młodym wieku. Kryteria rozpoznania nadciśnienia tętniczego u kobiet ciężarnych to ciśnienie skurczowe ≥ 140 mmHg lub/i ciśnienie rozkurczowe ≥ 90 mmHg. Nadciśnienie pojawia się najczęściej w trzecim trymestrze ciąży, a ustępuje w ciągu 42 dni po porodzie. Etiologia większości zdiagnozowanych przypadków jest nieznana, za przyczynę podwyższenia BP uważa się zaburzenia przepływu krwi w łożysku. Często wysokim wartościom BP towarzyszy białkomocz oraz wzrost stężenia moczanów w surowicy – wtedy nadciśnienie tętnicze związane z ciążą określa się jako stan przedzucawkowy (*preclampsia*). Podwyższone wartości BP w czasie ciąży mogą prowadzić do groźnych powikłań, zarówno u matki, jak

i u dziecka. Nadciśnienie tętnicze związane z ciążą jest istotną przyczyną chorobowości i umieralności matek, płodów i noworodków [99,103,105].

Nadciśnienie tętnicze może rozwinąć się także w konsekwencji stosowania niektórych leków lub innych substancji. Najpowszechniej stosowanymi preparatami powodującymi nadciśnienie tętnicze są doustne środki antykoncepcyjne. Szacuje się, że u ok. 5% kobiet stosujących te preparaty nadciśnienie tętnicze rozwija się w ciągu 5 lat. Po odstawieniu doustnych środków antykoncepcyjnych u 50% kobiet wartości BP ulegają normalizacji. Podwyższenie ciśnienia może wystąpić także po stosowaniu preparatów lukrecji lub karbenoksolonu, co jest związane z opisanym wcześniej hamowaniem aktywności 11 β -HSD2. Do innych leków powodujących znaczący wzrost BP należą między innymi: cyklosporyna i takrolimus, erytropoetyna, glikokortykosteroidy przyjmowane doustnie, niesteroidowe leki przeciwzapalne, sibutramina, składniki kropli do nosa obkurczające naczynia krwionośne (np. ksylometazolina czy oksymetazolina), leki przeciwdepresyjne (szczególnie wenlafaksyna). Ponadto, stosowanie wielu używek może w konsekwencji prowadzić do rozwoju nadciśnienia tętniczego – są to np. nadużywanie alkoholu, nikotyna, kokaina, amfetamina, steroidy anaboliczne [98,99,103].

Dotychczasowe badania pozwoliły wyodrębnić dziedziczne postacie nadciśnienia tętniczego, za powstawanie których odpowiadają defekty określonych genów (Tabela 4). Te postacie nadciśnienia, zwane monogenowymi lub mendlowskimi, są rzadkimi zespołami, jednak rozumienie mechanizmu wzrostu BP w tych schorzeniach wskazuje kierunek badań mający na celu wyjaśnienie etiologii nadciśnienia tętniczego w całej populacji chorych. Zasadne wydaje się więc poszukiwanie polimorfizmów w obrębie tych genów i ich potencjalnego związku z powstawaniem pierwotnego nadciśnienia tętniczego [106-111].

Tabela 4. Monogenowe postacie nadciśnienia tętniczego [106,107,111-114].

SCHORZENIE	FENOTYP (obserwowane objawy)	GENOTYP (występowanie mutacji)	PATOMECHANIZM
zespół Geller'a	nadciśnienie zaostrejące się w czasie ciąży, niska ARO	mutacja w genie <i>MR</i> (zmiana dominująca) prowadząca do powstania nieprawidłowego <i>MR</i> (zmiana w domenie wiążącej ligand)	nadmierne pobudzenie <i>MR</i> – stałe lub wywołane przez steroidy pozbawione grupy OH w pozycji 21 (progesteron) lub spironolakton
Pseudohipoaldosteronizm typu 2	nadciśnienie, hiperkaliemia, niska ARO, kwasica metaboliczna	mutacje (dominujące) w co najmniej jednym z 3 genów znajdujących się w regionach 1q31-42, 12p13 oraz 17p11-q21	hiperwolemiczne nadciśnienie tętnicze powstające prawdopodobnie poprzez nasiloną reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych

zespół Liddle'a	nadciśnienie, hipokaliemia, zasadowica, niski poziom aldosteronu, niska ARO	mutacja w genie <i>ENaC</i> (zmiana dominująca) powodująca powstanie nieprawidłowej podjednostki β lub γ białka ENaC	nasiloną funkcją ENaC
AME	nadciśnienie, hipokaliemia, zasadowica, niski poziom aldosteronu, niska ARO	mutacja w genie <i>HSD11B2</i> (zmiana recesywna) prowadząca do powstania białka enzymatycznego 11 β -HSD2 o obniżonej aktywności	nieprawidłowy metabolizm F prowadzący do nagromadzenia F i pobudzenia MR przez F (rozdział 2.3)
Rodzinny hiperaldosteronizm typu I (Hiperaldosteronizm podatny na leczenie GKS)	nadciśnienie, hipokaliemia, zasadowica, niska ARO, wysoki poziom aldosteronu obniżający się po podaniu deksametazonu	Gen chimeryczny <i>CYP11B1/CYP11B2</i> zawierający region promotorowy z genu syntazy aldosteronu i region kodujący z genu hydroksylazy 11 β -steroidowej	nadmierne wydzielanie aldosteronu regulowane przez ACTH (ekspresja genu syntazy aldosteronu regulowana przez ACTH)
Rodzinny hiperaldosteronizm typu II	nadciśnienie, hipokaliemia, niska ARO, prawidłowy lub podwyższony poziom aldosteronu	zidentyfikowano w siódmym chromosomie, locus związany z tym schorzeniem – 7p22	nadmierne wydzielanie aldosteronu regulowane przez autonomiczny układ nerwowy
Niedobór hydroksylazy 11 β -steroidowej	nadciśnienie, hipoaldosteronizm, niska ARO, hipokaliemia, wirylicacja dziewcząt, przedwczesne dojrzewanie płciowe chłopców	mutacja w genie <i>CYP11B1</i> prowadząca do utraty aktywności hydroksylazy 11 β -steroidowej, która jest ważnym enzymem w syntezie mineralokortykosteroidów	cechy wrodzonej hiperplazji nadnerczy, nadmierne wydzielanie 11-deoksykortyzolu i deoksykortykosteronu, który ma zdolność pobudzania MR
Niedobór hydroksylazy 17 α -steroidowej	nadciśnienie, hipoaldosteronizm, niska ARO, hipokaliemia, hipogonadyzm u płci żeńskiej, obojnactwo rzekome u płci męskiej	mutacja w genie <i>CYP17</i> prowadząca do utraty aktywności hydroksylazy 17 α -steroidowej	cechy wrodzonej hiperplazji nadnerczy, nadmierne wydzielanie kortykosteronu i deoksykortykosteronu
Nadciśnienie z brachydaktylią	ostre nadciśnienie, nieprawidłowa budowa kości dłoni i nadgarstka	mutacja (zmiana dominująca) w obrębie regionu 12p11.2-12.2	nieznany
Mutacja w obrębie genu kodującego receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów PPAR γ	nadciśnienie powiązane z insulinopornością lub cukrzycą, wrażliwe na działania tiazolidynedionów	mutacja w obrębie genu <i>PPARγ</i> (zmiana dominująca) skutkująca powstaniem białka receptora o zmienionej sekwencji aminokwasowej	zmniejszenie wrażliwości receptora PPAR γ

3.2.2. Nadciśnienie tętnicze pierwotne

Wartość BP jest bezpośrednio związana z objętością wyrzutową serca oraz z oporem obwodowym. Rozwój nadciśnienia tętniczego jest zatem związany ze zwiększeniem objętości wyrzutowej serca lub wzrostem oporu naczyń krwionośnych, albo z obydwoma tymi czynnikami jednocześnie. Mechanizmy prowadzące do powstania nadciśnienia tętniczego muszą zatem oddziaływać na te parametry. Wraz z chorobą rozwijają się jednak mechanizmy kompensacyjne w organizmie, dlatego rozpoznanie schorzenia następuje dość późno, najczęściej kiedy dochodzi już do powikłań. We wczesnym etapie objętość minutowa serca jest tylko nieznacznie podwyższona, a opór naczyniowy utrzymuje się w normie. Wraz ze stopniem zaawansowania choroby spada objętość minutowa a opór obwodowy rośnie. Prowadzi to do przerostu ścian tętnic i tętniczek, a przerost ten staje się następnie wtórnym czynnikiem utrwalającym nadciśnienie tętnicze [99,103,113,114].

Objętość minutowa serca jest bezpośrednio związana z objętością płynu zewnątrzkomórkowego (ECFV, *Extracellular Fluid Volume*), która jest z kolei kontrolowana przez nerki. I to właśnie nerki są uważane za organ, którego funkcja jest kluczowa w rozwoju nadciśnienia tętniczego [113]. Pamiętać trzeba jednak o złożoności mechanizmów regulujących wartość BP, do których zaliczyć można:

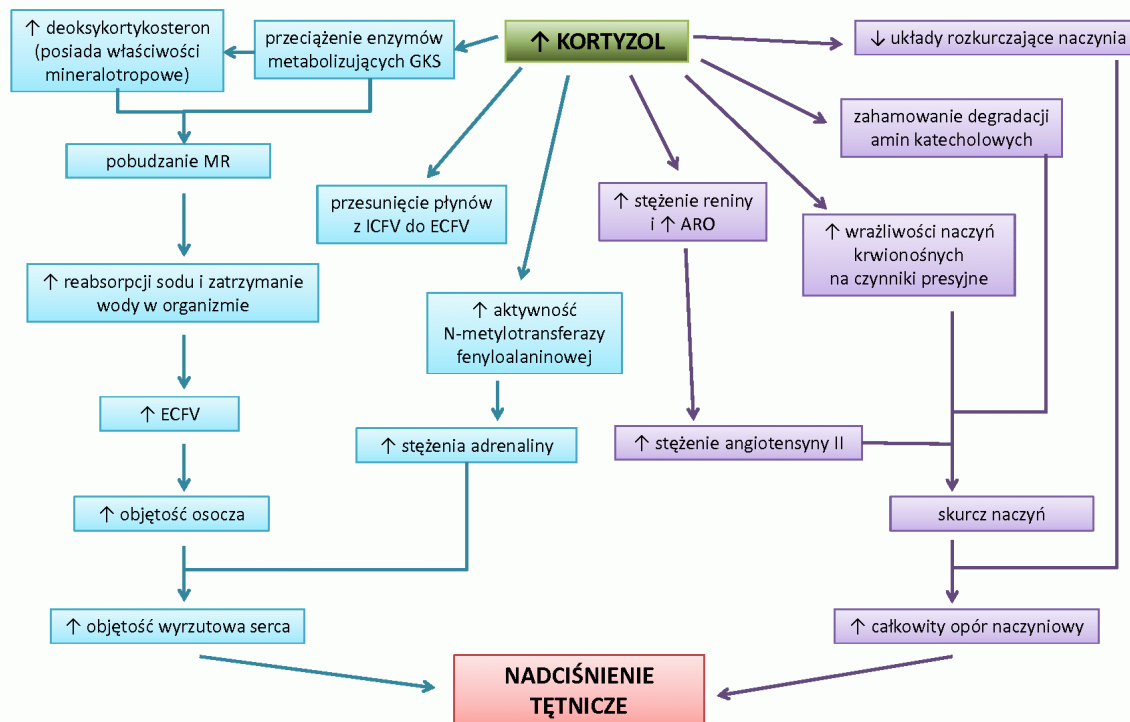
- baroreceptory, które znajdują się w naczyniach i reagują na nagłe zmiany BP;
- peptydy natriuretyczne – produkowane w mózgu i sercu w konsekwencji wzrostu BP w tych organach;
- układ renina-angiotensyna-aldosteron, który bierze udział w regulacji objętości płynu w łożysku naczyniowym oraz napięcia ścian naczyń krwionośnych;
- układ kinina-kalikreina, którego funkcją jest utrzymanie prawidłowego napięcia ścian naczyń krwionośnych oraz kontrola nad wydalaniem lub reabsorpcją sodu w nerkach;
- receptory adrenergiczne, za pośrednictwem których regulowana jest siła skurczu mięśnia sercowego i objętość minutowa serca, ale także napięcie ścian naczyń krwionośnych;
- czynniki produkowane przez śródbłonek naczyń krwionośnych: wazodilatacyjne, np. tlenek azotu (NO) oraz wazokonstrykcyjne, np. endotelina [103,114].

Patologia w wymienionych powyżej układach skutkująca podwyższeniem BP, pojawia się na skutek interakcji czynników genetycznych, środowiskowych oraz demograficznych. Ze względu na niejednorodny charakter choroby oraz złożoną, wieloczynnikową etiologię, trudne jest jednoznaczne wyodrębnienie genów odpowiadających za powstawanie nadciśnienia tętniczego. Przeprowadzone liczne badania pozwoliły jednak stworzyć listę tzw. genów kandydatów, w przypadku których potwierdzono ich udział w predysponowaniu do pojawienia się schorzenia. Na liście tej znajdują się między innymi geny kodujące składniki układów: renina-angiotensyna-aldosteron, kinina-kalikreina,

biorących udział w transporcie jonów przez błony komórkowe, różnych czynników wazoaktywnych i hormonów, neurotransmiterów, receptorów itd. Potwierdzeniem genetycznej składowej w etiologii nadciśnienia tętniczego jest także fakt, że wyższą chorobowość stwierdzono u osób rasy czarnej w porównaniu do rasy białej w badaniach przeprowadzonych na populacji USA [99,103,106,107,112-116]. W patogenezie nadciśnienia tętniczego istotną rolę odgrywają także czynniki środowiskowe oraz demograficzne. Niższe wartości BP odnotowano u Indian pochodzących ze słabo rozwiniętych ekonomicznie terenów Ameryki Południowej w porównaniu do Europejczyków mieszkających w wysoko rozwiniętych ekonomicznie regionach. Na wzrost wartości BP z wiekiem, a więc ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego, wpływ mają także: płeć, aktywność fizyczna, nawyki żywieniowe. Występowaniu choroby sprzyja siedzący tryb życia, otyłość, nadmierne spożycie soli kuchennej oraz alkoholu [99,103,115].

3.2.3. Rola GKS w etiologii nadciśnienia tętniczego

Ważną przyczyną powstawania nadciśnienia tętniczego są także zaburzenia hormonalne. Wśród hormonów mogących odgrywać znaczącą rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego znajdują się niewątpliwie GKS. Przypuszcza się, że ta grupa hormonów może mieć udział w etiologii nawet 30% przypadków pierwotnego nadciśnienia tętniczego [92,117]. Jednakże mechanizm działania GKS prowadzący do podwyższenia wartości BP nie jest jednoznaczny. Z jednej strony duże znaczenie może mieć opisana wcześniej 11β -HSD2 oraz związany ze zmianą aktywności tego enzymu nieprawidłowy metabolizm F (rozdział 2.), skutkujący nadmiarem F w organizmie, pobudzeniem MR przez F i zwiększoną reabsorpcją sodu i wody w nerkach. To zjawisko nie wyjaśnia jednak hipertensyjnego działania syntetycznych GKS, które nie zwiększają wchłaniania zwrotnego sodu w kanalikach nerkowych, a wręcz wykazują działanie natriuretyczne. Ponadto, u pacjentów z zespołem Cushinga, u których jednym z efektów nadmiaru F w organizmie jest nadciśnienie tętnicze, nie uzyskuje się znaczącego obniżenia wartości BP po podaniu spironolaktonu, który jest selektywnym antagonistą MR. W związku z tym w wyjaśnieniu hipertensyjnego wpływu GKS bierze się pod uwagę, obok zmian w metabolizmie F przy udziale 11β -HSD2, także inne mechanizmy. Wiadomo, że efektem działania F jest zwiększenie produkcji adrenaliny w rdzeniu nadnerczy oraz zwiększenie objętości wyrzutowej serca, jednakże uwzględnić należy także wpływ F na zwiększenie oporu obwodowego naczyń, między innymi poprzez potęgowanie działania czynników wazokonstrykcyjnych – mechanizmy hipertensyjnego działania F przedstawione zostały na rycinie 11 [21,25,37,117-119].



Ryc. 11. Wpływ GKS na powstawanie nadciśnienia tętniczego [21]. ECFV - objętość płynu zewnątrzkomórkowego (*extracellular fluid volume*); ICFV - objętość płynu wewnątrzkomórkowego (*intracellular fluid volume*).

W ciągu ostatnich lat duże zainteresowanie wzbudzał wpływ GKS na gospodarkę NO, czynnika odgrywającego ważną rolę w regulacji BP poprzez działanie wazodilatacyjne, zwiększenie wydalania jonów sodu i wody oraz wpływ na aktywność sympatycznego układu nerwowego. Ponadto, NO wpływa hamująco na agregację płytek krwi oraz adhezję leukocytów, zatem ma pośrednią aktywność antyaterogenną. Substratem do produkcji NO w organizmie jest L-arginina, która jest przekształcana do L-cytruliny i NO w procesie katalizowanym przez syntazę tlenku azotu (NOS). Przebieg tej reakcji warunkuje obecność NADPH, niezbędnymi kofaktorami są także dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) oraz mononukleotyd flawinowy (FMN). Maksymalną aktywność NOS zapewnia natomiast tetrahydrobiopteryna (BH₄) [25,37,117,119,120].

Scharakteryzowano trzy izoformy NOS, które są kodowane przez trzy odmienne geny. Izofорма 1 i 3, odpowiednio: neuronalna NOS (NOS1, nNOS) i śródbłonkowa NOS (NOS3, eNOS), to formy konstytutywne NOS (cNOS), stale obecne w komórkach i dostarczające określone ilości NO. Izofорма 2, tak zwana indukowalna NOS (NOS2, iNOS), powstaje poprzez egzogenną stymulację przez kininy [25,37,121,122].

GKS wpływają na gospodarkę NO na drodze kilku mechanizmów. Po pierwsze, hamują wytwarzanie NO indukowane działaniem cytokin, a więc przy udziale NOS2. GKS hamują ekspresję

białka iNOS zmniejszając bezpośrednio ilość enzymu, ale aktywność iNOS jest także pośrednio obniżona ze względu na zmniejszoną dostępność L-argininy będącej substratem do syntezy NO, oraz niezbędnego kofaktora – BH₄. Hamujący wpływ GKS na iNOS może być szczególnie istotny w etiologii nadciśnienia tętniczego, gdyż właśnie ta izoforma jest odpowiedzialna za kompensacyjną produkcję NO, w przypadku gdy eNOS produkuje niewystarczające ilości NO. Ponadto, wykazano również niekorzystne działanie GKS na eNOS, poprzez zmniejszenie ekspresji i destabilizację mRNA oraz poprzez zmniejszenie ilości białka enzymatycznego [25,37,119,123]. GKS powodują także zmniejszenie ekspresji cyklohydrolazy GTP, enzymu biorącego udział w syntezie BH₄ z GTP. Ograniczona dostępność BH₄, będącej niezbędnym kofaktorem dla wszystkich izoform NOS, skutkuje z kolei zmniejszeniem syntezy NO. Co więcej, GKS ograniczają dostępność w komórkach L-argininy, substratu do syntezy NO. Dzieje się tak na skutek zmniejszenia ilości specyficznych białek transportujących ten aminokwas: CAT-1, CAT-2B i CAT-2A oraz poprzez obniżenie ekspresji mRNA syntazy bursztynianu argininy. Enzym ten katalizuje reakcję odtwarzania L-argininy z L-cytruliny [25,120].

Wykazano także, że GKS nasilają efekt wywołany przez czynniki wazokonstrykcyjne, między innymi angiotensyny II oraz adrenaliny [119]. Istnieją także hipotezy, że hipertensyjne działanie GKS wynika ze zwiększenia produkcji erytropoetyny (EPO), której zwiększony poziom w surowicy skutkuje zwiększeniem oporu naczyniowego w obrębie nerek [118]. Powyższe dane wskazują na złożoność mechanizmów wpływu GKS na podwyższenie BP, a więc wciąż konieczne są badania dotyczące roli tych hormonów w etiologii nadciśnienia tętniczego.

3.3. *Następstwa niewyrównanego ciśnienia tętniczego*

Rozwojowi nadciśnienia tętniczego często nie towarzyszą charakterystyczne objawy, a rozpoznania choroby dokonuje się w trakcie przypadkowych badań lekarskich. Dolegliwości obserwowane u osób z nadciśnieniem tętniczym, takie jak np. bóle i zawroty głowy, szum w uszach, łatwe męczenie się podczas wysiłku, pojawiają się często także u osób z prawidłowym BP. Skutkuje to późnym diagnozowaniem choroby, kiedy to pojawiają się specyficzne objawy kliniczne oraz kiedy dochodzi do powikłań narządowych [98,99,101,103]. Do najważniejszych zmian narządowych wynikających z niewyrównanego nadciśnienia tętniczego należą:

- zmiany w mięśniu sercowym – dotyczą przede wszystkim lewej komory serca oraz naczyń wieńcowych. Podczas przewlekłego występowania podwyższonego BP dochodzi do przerostu lewej komory serca, który prowadzi do usztywnienia jej ścian i zaburzenia kurczliwości. W konsekwencji może rozwinąć się niewydolność lewokomorowa, której mogą towarzyszyć zaburzenia rytmu. Przerost mięśnia lewej komory jest też głównym czynnikiem ryzyka zawału mięśnia sercowego, niewydolności serca, udaru, zaburzeń rytmu (ryzyko zwiększone 4 – 10

krotnie) oraz miażdżycy naczyń wieńcowych i obwodowych. Zwiększenie masy mięśnia lewej komory pociąga za sobą zwiększenie zapotrzebowania na tlen. Tętnice wieńcowe ulegają poszerzeniu, jednak nie zawsze jest to wystarczające do pokrycia zapotrzebowania mięśnia sercowego. Jest to przyczyną występowania niedokrwienia podczas wysiłku u osób z nadciśnieniem i przerostem mięśnia lewej komory, nawet wtedy, kiedy nie ma zmian w naczyniach wieńcowych [99,101,103].

- zmiany w obrębie nerek – u pacjentów, u których terapia nadciśnienia jest nieskuteczna lub u których nadciśnienie tętnicze w ogóle nie jest leczone, rozwija się stopniowo niewydolność nerek. Wiąże się ona ze spadkiem nerkowego przepływu krwi oraz zaburzeniem autoregulacji przepływu nerkowego i ukrwienia nerek. Obserwowana początkowo mikroalbuminuria rozwija się do coraz bardziej nasilonego białkomoczu, spada także klirens kreatyniny. Długotrwałe niewyrównane nadciśnienie może zatem prowadzić do niewydolności nerek oraz konieczności dializoterapii [99,101,103].
- zmiany w naczyniach mózgowych – wynikają one ze zgrubienia ścian tętnic oraz zmniejszenia światła i wzrostu oporu tętnic mózgowych. Przepływ mózgowy jest mniejszy u pacjentów z podwyższonymi wartościami BP w porównaniu do osób z prawidłowym BP, co wiąże się z ryzykiem niedokrwienia mózgu. Nadciśnienie tętnicze jest głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia udarów niedokrwiennych, wynikających zwykle z zatorów lub zakrzepicy wewnątrznaczyniowej. Nadciśnienie tętnicze jest ponadto, obok wieku, ważnym czynnikiem ryzyka występowania tętniaków mózgu, których pęknięcie skutkuje udarem krwotocznym. Krwotoki mózgowie mogą być spowodowane także poprzez pęknięcie zdrowych małych tętnic i tętniczek mózgowych na skutek gwałtownego wzrostu BP. Badania wykazały, że nadciśnienie tętnicze jest przyczyną 70 – 80% przypadków krwotoku mózgowego. Wśród wszystkich przypadków udarów mózgu będących konsekwencją niewyrównanego nadciśnienia tętniczego, ok. 80% ma charakter niedokrwienny, pozostałe 20% - krwotoczny. Co więcej, nadciśnienie tętnicze predysponuje do występowania zaburzeń w funkcjach poznawczych oraz demencji u osób starszych oraz sprzyja rozwojowi choroby Alzheimera. Trwale podwyższone BP u osób w podeszłym wieku sprzyja występowaniu niewielkich zawałów mózgowych, które przebiegają bezobjawowo, jednak w konsekwencji prowadzą do upośledzenia sprawności intelektualnej i demencji [99,101,103,124].
- zmiany naczyniowe w obrębie oka – w konsekwencji niewyrównanego nadciśnienia tętniczego dochodzi do znacznego zwężenia i stwardnienia ścian naczyń siatkówki. W przypadku zaawansowanych zmian może dochodzić do obrzęku i krwotoków siatkówkowych, a także do obrzęku tarczy nerwu wzrokowego. Zmiany te oraz stopień ich nasilenia można ocenić w badaniu

dna oka, na którego podstawie weryfikuje się wystąpienie uszkodzeń narządowych powstałych w konsekwencji nadciśnienia tętniczego [99,103].

Wraz z nadciśnieniem tętniczym bardzo często współistnieją także inne zaburzenia prowadzące do rozpoznania tzw. zespołu metabolicznego. Diagnoza zespołu metabolicznego opiera się na stwierdzeniu występowania u pacjenta: otyłości brzusznej, podwyższonego poziomu triglicerydów w surowicy, obniżonego poziomu HDL, podwyższonego BP oraz podwyższonego poziomu glukozy na czczo. Zaburzenia występujące w zespole metabolicznym są ważnymi czynnikami zwiększającymi ryzyko rozwoju choroby miażdżycowej, choroby niedokrwiennej serca oraz udaru mózgu [101].

3.4. Epidemiologia nadciśnienia tętniczego

Nadciśnienie tętnicze jest poważnym problemem społecznym, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Szacuje się, że podwyższone BP jest przyczyną 4,5% chorób na całym świecie, a z powodu nadciśnienia tętniczego umiera przedwcześnie rocznie około 7 milionów ludzi [125]. Ponadto, istnieje ścisła korelacja pomiędzy podwyższonymi wartościami BP a ryzykiem sercowo-naczyniowym. U osób w wieku 40 – 70 lat podwyższenie ciśnienia skurczowego o 20 mmHg a rozkurczowego o 10 mmHg skutkuje podwojeniem ryzyka zawału serca, udaru, niewydolności serca czy chorób nerek [126]. Skuteczna terapia podwyższonego BP obniża o około 35 – 40% ryzyko udaru oraz o co najmniej 16% zmniejsza ryzyko zawału mięśnia sercowego [125].

Badanie NATPOL III PLUS z 2002 roku wykazało, że w Polsce na nadciśnienie tętnicze choruje 29% dorosłej populacji, czyli 8,6 miliona osób. Ponadto, tylko milion pacjentów było poddawanych skutecznej terapii hipotensyjnej. Kolejnym niepokojącym faktem wynikającym z tego badania było ustalenie, że wysokie prawidłowe BP występowało u 30% dorosłej populacji, co oznacza, że kolejne 8,9 miliona Polaków jest zagrożone rozwojem nadciśnienia tętniczego [127]. Badanie WOBASZ zakończone w 2005 roku wykazało, że problem nadciśnienia tętniczego dotyczy jeszcze większego odsetka dorosłych Polaków, bo aż 36% ogółu (42,1% mężczyzn i 32,9% kobiet). Ponownie okazało się, że stosowana terapia hipotensyjna u wielu osób z nadciśnieniem tętniczym jest nieskuteczna - tylko u 14,1% pacjentów BP było prawidłowo kontrolowane [128].

V CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura i odczynniki chemiczne

1.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w metodzie HPLC

- zestaw HPLC (Hewlett Packard 1100, USA): degazer (typ G1322A), pompa (typ G1311A), auto-sampler (typ G1313A), termostat (typ G1316A), detektor fluorescencyjny (typ G1321A) – zestaw sterowany za pomocą oprogramowania ChemStation umożliwiającego analizę danych
- kolumna monolityczna Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm) z pre-kolumną monolityczną Chromolith RP-18e (5 µm; 4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- kolumna LiChrospher 100 RP-18e (125 mm x 4 mm; 5 µm) z pre-kolumną LiChroCART (4 mm x 4 mm; 5 µm) (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- kolumny do SPE Bakerbond C-18, o pojemności 1ml, zawierające 100 mg fazy stacjonarnej (J.T.Baker, Deventer, Holandia) – izolacja analitów
- kolumny do SPE Bakerbond C-18, o pojemności 3 ml, zawierające 200 mg fazy stacjonarnej (J.T.Baker, Deventer, Holandia) – oczyszczanie moczu z endogennych GKS
- zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- waga analityczna Sartorius BP110S (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- wytrząsarka 358S (Elpan, Lubawa, Polska)
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- urządzenie do odgazowywania metodą ultradźwięków UM-4 (Unitra, Olsztyn, Polska)
- urządzenie do odparowywania rozpuszczalników organicznych Techne Dri-Block DB3 (Techne, UK)
- wytrząsarka typu Minishaker MS2 (IKA – Works Inc., USA)
- szklany zestaw filtracyjny (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- filtry membranowe z nitrocelulozy, wielkość porów 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- łaźnia wodna ze wstrząsarką typ 357 (Elpan, Lubawa, Polska)
- pH-metr automatyczny CyberScan 500 (Utech Cybernetics, Singapur)
- urządzenie do dejonizacji wody (Simplicity UV, Millipore, Milwaukee, USA)

1.2. Odczynniki stosowane w metodzie HPLC

- prednizolon - P (Polfa Pabianice, Polska)
- hydrokortyzon - F (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- kortyzon – E, czystość min. 98% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- tetrahydrokortyzol – THF (Research Plus Inc., New Jersey, USA)

- allo-tetrahydrokortyzol – allo-THF (Research Plus Inc., New Jersey, USA)
- tetrahydrokortyzon – THE (Research Plus Inc., New Jersey, USA)
- allo-tetrahydrokortyzon – allo-THE (Research Plus Inc., New Jersey, USA)
- trietyloamina – TEA, czystość min. 99% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- chinuklidyna – Q, czystość min. 97% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- bezwodny wodorofosforan disodowy Na₂HPO₄ cz.d.a. (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- jednozasadowy fosforan potasu KH₂PO₄ cz.d.a. (Xenon Łódź, Polska)
- kwas orto-fosforowy 85%, czystość techniczna (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- bezwodny octan sodu, czystość min. 99% (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- kwas octowy 99,5% cz.d.a. (POCh Gliwice, Polska)
- β-glukuronidaza z *Helix pomatia*, roztwór zawierający >100000 U/ml β-glukuronidazy i ≤7500 U/ml sulfatazy (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- nityl kwasu 9-antroilowego – 9-AN (SynChem Laborgemeinschaft OHG, Kassel, Niemcy)
- aceton cz.d.a. (POCh Gliwice, Polska)
- acetonitryl o czystości do HPLC – ACN (Rathburn, Walkerburn, Szkocja, UK)
- n-heksan o czystości do HPLC (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- metanol o czystości do HPLC (J.T.Baker, Deventer, Holandia)
- dichlorometan o czystości do HPLC – DCM (Labscan, Dublin, Irlandia)
- azot (Messer, Austria)
- woda dejonizowana uzyskana z zastosowaniem aparatury Simplicity UV
- woda jałowa (*Aqua pro injectione*, Polpharma S.A., Starogard Gdański, Polska)

1.3. Odczynniki zastosowane do badania genotypu

- zestaw do izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej (Bio Basic Inc., Ontario, Kanada), w skład którego wchodzi: bufor TBP, bufor TBM, bufor TE (pH 8,0), proteinaza K, roztwór do przemywania, bufor do elucji
- etanol (Polmos, Polska)
- startery do PCR (Oligo, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Warszawa, Polska) – dostarczane w postaci liofilizowanej, roztwory podstawowe o stężeniu 100 μmol/l przygotowywano poprzez dodanie wody jałowej w ilości określonej przez producenta. Do reakcji PCR używano roztworów o stężeniu 10 μmol/l, które przygotowywano przez rozcieńczenie roztworów podstawowych wodą jałową.
- zestaw dNTP, deoksynukleotydy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Niemcy) – roztwory podstawowe o stężeniach 100 mmol/l; do reakcji PCR używano mieszaniny o stężeniu każdego składnika wynoszącym 10 mmol/l, którą przygotowywano

przez zmieszanie czterech roztworów podstawowych i dodanie odpowiedniej ilości jałowej wody.

- roztwór $MgCl_2$ o stężeniu 25 mmol/l (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Szwajcaria)
- roztwór CG-RICH (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Szwajcaria)
- agaroz (BioShop Canada Inc., Ontario, Kanada)
- bromek etydyny (Sigma, St. Louis, USA) – roztwór o stężeniu 10 mg/ml
- marker masy DNA – GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Wilno, Litwa) – w buforze zawierającym: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6); 10 mmol/l EDTA; 0,005% błękitu bromofenolowego; 0,005% ksylencyjanolu FF i 10% glicerolu

enzymy:

- FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Szwajcaria) o stężeniu 5 U/ μ l – w buforze zawierającym: 20 mmol/l Tris-HCl (pH 9,0), 100mmol/l KCl, 0,1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 0,2% Tween 20, 50% glicerol
- DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas, Wilno, Litwa), o stężeniu 5 U/ μ l – w buforze zawierającym: 20 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l DTT, 0,1 mmol/l EDTA, 100 mmol/l KCl, 0,5% Nonidet P40, 0,5% Tween 20, 50% glicerol
- enzym restrykcyjny Taal (HpyCH4III) (Fermentas, Wilno, Litwa), o stężeniu 10 U/ μ l – w buforze zawierającym: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 100 mmol/l KCl, 0,1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 0,2 mg/ml BSA (*Bovine Serum Albumin*), 50% glicerol
- enzym restrykcyjny HhaI (Fermentas, Wilno, Litwa), o stężeniu 10 U/ μ l – w buforze zawierającym: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,4), 100 mmol/l KCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 0,2 mg/ml BSA, 50% glicerol

bufory:

- bufor dla polimerazy FastStart Taq DNA (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Szwajcaria), w skład którego wchodzi: 500 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l KCl, 50 mmol/l $(NH_4)_2SO_4$ (pH 8,3)
- bufor dla polimerazy DreamTaq DNA (Fermentas, Wilno, Litwa), w skład którego wchodzi: KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 20 mmol/l $MgCl_2$
- bufor TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) (BioShop Canada Inc., Ontario, Kanada) o składzie: Tris – 89 mmol/l; kwas borowy – 89 mmol/l; EDTA – 2 mmol/l. Przed użyciem bufor rozcieńczano dziesięciokrotnie wodą dejonizowaną.
- bufor obciążający do elektroforezy (*DNA Loading Dye*) (Fermentas, Wilno, Litwa), w skład którego wchodzi: 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6); 0,03% błękit bromofenolowy; 0,03% ksylencyjanol FF; 60% glicerol oraz 60 mmol/l EDTA

- bufor TANGO dla enzymów restrykcyjnych (Fermentas, Wilno, Litwa), w skład którego wchodzi: 33 mmol/l Tris-octan (pH 7,9), 10 mmol/l octan magnezu, 66 mmol/l octan potasu, 0,1 mg/ml BSA

1.4. *Aparatura i sprzęt laboratoryjny zastosowany do badania genotypu oraz pomiarów antropometrycznych*

- aparat do elektroforezy żelowej poziomej (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- inkubator (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- mikrowirówka typ EBA 12 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Niemcy)
- probówki do PCR o poj. 0,2 ml oraz 96-dołkowe płytki do PCR z kołnierzem do połowy wysokości (Axygen Inc., Union City, USA)
- probówki EasyCap o poj. 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- probówki zakręcane o poj. 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- systemy aspiracyjno-próżniowe zawierające Na₂EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- probówki z kolumnkami EZ-10 do izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej (Bio Basic Inc., Ontario, Kanada)
- termocykler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)
- transiluminator UV typu G:BOX (Syngene, Alexandria, USA)
- wirówka (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- analizator procentowej zawartości tłuszczu w organizmie Nais Body Fat Watcher EW 4100 (NAIS Wellneslife, Düsseldorf, Niemcy)
- ciśnieniomierz OMRON M1 Classic (Omron Healthcare Co. Ltd., Illinois, USA)
- program do projektowania starterów: Primer3 (v. 0.4.0)
- program do odczytu wyników sekwencjonowania: FinchTV (v. 1.4.0)
- programy do analizy sekwencji kwasów nukleinowych: Sequence Scanner (v. 1.0), MegAlign DNASTar

2. **Metoda HPLC oznaczania endogennych GKS i ich metabolitów w płynach biologicznych**

2.1. *Warunki analizy HPLC*

Rozdział analitów prowadzono na kolumnie HPLC Chromolith Performance RP-18e (wypełnionej krzemionką związaną chemicznie z fazą C₁₈) wyposażonej w pre-kolumnę Chromolith RP-18e.

Warunki pracy chromatografu:

- faza ruchoma – ACN : 0,3 mmol/l kwas orto-fosforowy (470 : 530 v/v); pH=4,6

- temperatura kolumny: 25°C
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 2 ml/min
- objętość nastrzyku: 50 μ l
- detekcja fluorescencyjna:
 - maksimum wzbudzenia: $\lambda=360$ nm
 - maksimum emisji: $\lambda=460$ nm

2.1.1. Przygotowanie fazy ruchomej

Fazę ruchomą przygotowano poprzez zmieszanie 470 ml ACN z 530 ml wody bidestylowanej, uprzednio przesączonej przez sącdek nitrocelulozowy o średnicy porów 0,45 μ m. Następnie roztwór doprowadzano do pH 4,6 przy użyciu 0,1 mol/l kwasu orto-fosforowego i odgazowywano za pomocą ultradźwięków.

2.2. Roztwory stosowane w metodzie HPLC

2.2.1. Roztwory podstawowe i wzorcowe GKS

Roztwory podstawowe GKS przygotowano w bezwodnym ACN:

- P o stężeniu 400 μ g/ml
- F o stężeniu 500 μ g/ml
- E o stężeniu 500 μ g/ml
- THF o stężeniu 500 μ g/ml
- THE o stężeniu 500 μ g/ml
- allo-THF o stężeniu 100 μ g/ml
- allo-THE o stężeniu 100 μ g/ml

Następnie z roztworów podstawowych sporządzono roztwory wzorcowe (również w bezwodnym ACN), w których stężenia F, E, THF, THE, allo-THF, allo-THE były jednakowe i wynosiły: 0,03 μ g/ml; 0,05 μ g/ml; 0,1 μ g/ml; 0,25 μ g/ml; 0,50 μ g/ml; 1,00 μ g/ml; 2,50 μ g/ml; 5,00 μ g/ml; 10,00 μ g/ml. Każdy roztwór wzorcowy zawierał P (wzorzec wewnętrzny, I.S.) o stężeniu 2,00 μ g/ml.

2.2.2. Roztwory pomocnicze

- bufor fosforanowy o pH 7,4 przygotowano poprzez zmieszanie 40,9 ml 0,0667 mol/l wodnego roztworu Na_2HPO_4 i 9,1 ml 0,0667 mol/l wodnego roztworu KH_2PO_4
- bufor octanowy o pH 5,1 przygotowano poprzez zmieszanie 40,0 ml 0,5 mol/l wodnego roztworu CH_3COONa i 10,0 ml 0,5 mol/l roztworu CH_3COOH

- roztwór 9-AN o stężeniu 0,2 mg/ml (odczynnik derywatyzujący) przygotowano w bezwodnym ACN
- przygotowano roztwory w bezwodnym ACN: 12,5% TEA oraz 0,5% Q, które następnie zmieszano w stosunku objętościowym 4:1. W uzyskanej mieszaninie stężenia składników wynosiły: 10,0% TEA i 0,1% Q.
- mocz wykorzystywany do przygotowania krzywych wzorcowych oczyszczano z endogennych GKS poprzez trzykrotną ekstrakcję SPE. Na kolumny (o pojemności 3 ml z 200 mg fazy stacjonarnej), aktywowane wcześniej 6 ml metanolu i 6 ml wody bidestylowanej, nanoszono 3 ml moczu. GKS znajdujące się w próbce moczu zatrzymywały się na fazie stacjonarnej, oczyszczony filtrat zbierano, a całą procedurę powtarzano trzykrotnie w celu usunięcia wszystkich zawartych w moczu GKS.

2.3. Przygotowanie próbek do krzywych wzorcowych

Krzywe wzorcowe były wykonywane w zakresie stężeń 3 – 1000 ng/ml GKS w matrycy, jako I.S. stosowany był P w stężeniu 200 ng/ml w matrycy. Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej obejmowało trzy etapy: ekstrakcję ciecz-ciecz, derywatyzację oraz izolację GKS metodą SPE.

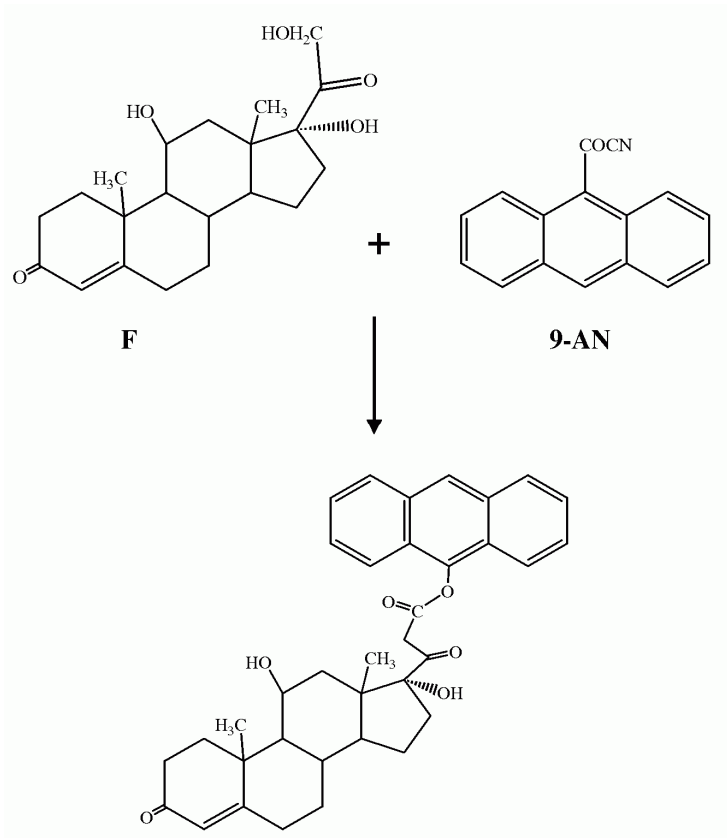
2.3.1. Ekstrakcja GKS

Do fiolek ekstrakcyjnych odmierzano 0,5 ml wody bidestylowanej lub moczu (uprzednio oczyszczonego z endogennych GKS) oraz 50 μ l roztworu wzorcowego o odpowiednim stężeniu. Uzyskane stężenia GKS w matrycy wynosiły odpowiednio: 3 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 25 ng/ml; 50 ng/ml; 100 ng/ml; 250 ng/ml; 500 ng/ml; 1000 ng/ml. Stężenie wzorca wewnętrznego w matrycy wynosiło każdorazowo 200 ng/ml. Próbkę zerową przygotowano dodając zamiast 50 μ l roztworu wzorcowego – 50 μ l czystego ACN.

Do próbek dodawano 1,0 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 i ekstrahowano 4 ml DCM. Mieszaninę wytrząsano przez 10 min przy amplitudzie 4 cm i częstotliwości 300 cykli/min. Następnie próby oziębiano przez 10 min w temp. 4°C oraz odwirowywano przez 10 min przy RCF = 1740 g w celu wyraźnego rozdzielenia warstw. Pobierano dolną warstwę organiczną i odparowywano do sucha w łagodnym przepływie azotu w temp. 40°C.

2.3.2. Derywatyzacja

Suchą pozostałość po ekstrakcji rozpuszczano w 100 μ l TEA : Q (4 : 1), a następnie dodawano 150 μ l roztworu 9-AN. Mieszaninę pozostawiano w temp. pokojowej w zaciemnionym miejscu w warunkach bezwodnych. Po 30 min próby odparowywano do sucha w łagodnym przepływie azotu w temp. 30°C. Reakcja derywatyzacji została przedstawiona na rycinie 12.



Ryc. 12. Schemat reakcji derywatywacji F przy użyciu 9-AN [129].

2.3.3. Izolacja analitów metodą SPE

Suchą pozostałość po derywatywacji rozpuszczano w 200 μl ACN, dodawano 800 μl wody bidestylowanej, a następnie próby przenoszono na kolumny SPE wypełnione krzemionką związaną z fazą C_{18} , które uprzednio aktywowano 2 ml ACN i 2 ml wody bidestylowanej. Naniesione próby przemywano 2 ml wody bidestylowanej i pozostawiano (10 min) do wyschnięcia w przepływie powietrza. Następnie próby przemywano mieszaniną DCM i n-heksanu (1:1 v/v). Antroilowe pochodne GKS eluowano 1 ml acetonu. Eluaty odparowywano do sucha w łagodnym przepływie azotu w temp. 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 50 μl ACN i 50 μl fazy ruchomej i nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

2.4. Analiza GKS w płynach biologicznych

F i E były oznaczane we wszystkich trzech matrycach (osoczu, moczu bez hydrolizy i moczu po enzymatycznej hydrolizie), natomiast ich metabolity (THF, allo-THF, THE i allo-THE) tylko w moczu po enzymatycznej hydrolizie. Każdorazowo, oprócz próbek biologicznych, w trakcie jednej serii przygotowywano i poddawano analizie próbki zawierające 3 różne stężenia GKS z krzywej wzorcowej

(50 ng/ml; 250 ng/ml oraz 1000 ng/ml) w celu monitorowania poprawności procedury analitycznej (*quality samples*). Ponadto, każda seria zawierała również próbę zerową.

2.4.1. Przygotowanie próbek osocza

Do fiolek ekstrakcyjnych dodawano 0,5 ml osocza oraz 50 μ l roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 2 μ g/ml. Po wymieszaniu dodawano 1 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 i ekstrahowano 4 ml DCM. Próby wytrząsano, a następnie poddawano derywatywacji i oczyszczano wg identycznej procedury jak dla krzywych wzorcowych (Rozdz. 2.3).

2.4.2. Przygotowanie próbek moczu

Próbki moczu zostały podzielone na dwie serie w celu oznaczenia zarówno wolnej frakcji GKS, jak i całkowitej ilości GKS wydalanych z moczem (frakcja wolna + GKS sprzężone z glukuronianami i siarczanami).

Próbki moczu nie poddawane enzymatycznej hydrolizie były przygotowywane w identyczny sposób jak próbki osocza (Rozdz. 2.4.1). Analiza moczu nie poddanego wcześniejszej hydrolizie prowadzona była w celu oznaczenia UFF i UFE.

Aby oznaczyć całkowitą ilość GKS w DZM, próbki moczu poddawano enzymatycznej hydrolizie z użyciem β -glukuronidazy z *Helix pomatia*. Do fiolek ekstrakcyjnej zawierającej 0,5 ml moczu oraz 1 ml buforu fosforanowego o pH 7,4 dodawano enzym (5800 U/ml moczu) i inkubowano przez 20 h w temp. 37°C. W trakcie inkubacji próbki były lekko wstrząsane (amplituda: 4 cm, częstotliwość: 50 cykli/min). Po zakończeniu hydrolizy do próbek dodawano 50 μ l roztworu P o stężeniu 2 μ g/ml oraz ekstrahowano 4 ml DCM. Dalsza część analizy (wytrząsanie, derywatywacja, izolacja analitów) przebiegała identycznie jak w przypadku krzywych wzorcowych (Rozdz. 2.3).

2.5. *Optymalizacja procesu enzymatycznej hydrolizy oraz reakcji derywatywacji*

2.5.1. Wpływ pH, rodzaju buforu oraz temperatury na hydrolizę glukuronianów i siarczanów GKS

W celu optymalizacji hydrolizy koniugatów GKS przy użyciu β -glukuronidazy zbadano wpływ czasu i temperatury inkubacji oraz rodzaju zastosowanego buforu na wydajność tego procesu.

Próbki moczu (z tej samej DZM) podzielono na 4 serie, po 5 próbek każda. Każda z próbek zawierała 0,5 ml moczu i β -glukuronidazę w ilości 5800 U/ml moczu. Do dwóch serii (I i II) dodano po 1 ml buforu fosforanowego o pH 7,4; do dwóch kolejnych (III i IV) – po 1 ml buforu octanowego o pH 5,1. Po wymieszaniu próbki były inkubowane w następujących warunkach:

- seria I (bufor fosforanowy) i III (bufor octanowy) – 20 h w temp. 37°C

- seria II (bufor fosforanowy) i IV (bufor octanowy) – 2 h w temp. 55°C

Po zakończeniu inkubacji do próbek dodawano 50 µl roztworu wzorca wewnętrznego (2 µg/ml) i analizowano wg opisanej wcześniej procedury (Rozdz. 2.4)

2.5.2. Wpływ stężenia zasad organicznych oraz ilości 9-AN na reakcję derywatywacji

Optymalizację reakcji GKS z 9-AN przeprowadzono poddając analizie wydajność procesu w obecności zasad organicznych oraz przy braku TEA i Q, a także po zastosowaniu różnych ilości odczynnika derywatyzującego, a także po użyciu roztworów Q o różnych stężeniach (0,10%; 0,15%; 0,20%; 0,30%). Zbadano także wpływ temperatury, w której próbki były odparowywane w łagodnym przepływie azotu po procesie derywatywacji.

W celu ustalenia optymalnej ilości czynnika derywatyzującego, wykonano serię prób, gdzie do suchej pozostałości po ekstrakcji dodawano 100 µl mieszaniny TEA:Q (stężenie zasad w mieszaninie wynosiło odpowiednio 10% i 0,10%) w celu zalkalizowania środowiska oraz różne (wzrastające: 100, 150, 200, 300, 400, 500 µl) ilości odczynnika derywatyzującego 9-AN (w stężeniu 0,20 mg/ml). Analizowano wielkości pól powierzchni pików uzyskanych dla poszczególnych GKS.

Wpływ zasad organicznych (TEA i Q) na wydajność procesu derywatywacji analizowano po oznaczeniu prób z kilku serii, w których do suchej pozostałości po ekstrakcji dodano do alkalizacji: 100 µl mieszaniny TEA:Q o stężeniach 10% : 0,10%; roztwór TEA o stężeniu 10% oraz roztwór Q o stężeniu 0,10%. Analizie poddano także wpływ stężenia Q na wydajność reakcji derywatywacji, przygotowując serie prób, gdzie do suchej pozostałości po ekstrakcji dodawano 100 µl roztworu Q o różnym stężeniu: 0,10%; 0,15%; 0,20% i 0,30%. Następnie dodano 150 µl odczynnika derywatyzującego. Jako odniesienie przyjęto wyniki uzyskane dla mieszaniny TEA:Q.

2.6. Walidacja metody HPLC oznaczania GKS

2.6.1. Liniowość

Krzywe wzorcowe przedstawiono jako zależność stosunku pola powierzchni pików danego steroidu (P_x) do pola powierzchni pików I.S. (P_p) od stężenia danego analitu w matrycy. Krzywe wzorcowe wyznaczono w zakresach 5,0 – 1000,0 ng/ml dla F, E i THF oraz 10,0 – 1000,0 ng/ml dla allo-THF i THE+allo-THE. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczono równania krzywych wzorcowych, które posłużyły następnie do obliczenia poziomów GKS w osoczu i moczu. Wyznaczono współczynniki korelacji r . Dodatkowo potwierdzono liniowość krzywych wzorcowych przy użyciu testu Mandel'a (*Mandel's fitting test*; przy poziomie istotności $\alpha=0,05$), który służy do weryfikacji poprawności liniowego lub kwadratowego modelu regresji. O liniowości świadczy wartość testowa $TV < F_{kryt}$ [130].

2.6.2. Wykrywalność (LOD) i oznaczalność (LOQ)

Za LOD przyjęto stężenie GKS, dla którego stosunek wysokości sygnału pochodzącego od analitu do szumów linii podstawowej (S : N) wynosił 3 : 1.

LOQ wyznaczono jako najmniejsze stężenie analitu, które można oznaczyć z odpowiednią precyzją (RSD% < 20%) i dokładnością (wartość bezwzględna błędu nieprzekraczająca 20%). Kontrolna seria prób o stężeniach analitów w matrycy: 5,00 ng/ml dla F, E i THF oraz 10,00 ng/ml dla allo-THF, THE i allo-THE została niezależnie przygotowana i oznaczona.

2.6.3. Precyzja i dokładność

Precyzję w ciągu dnia (*intra-day*) wyznaczono poprzez oznaczenie poziomów endogennych GKS w próbkach moczu i osocza. próbki moczu analizowano bez wcześniejszej hydrolizy oraz po 20-godzinnej inkubacji z β -glukuronidazą. Każda z serii zawierała po 6 próbek.

Precyzję między dniami (*inter-day*) wyznaczono poprzez oznaczenie poziomów endogennych GKS w osoczu oraz w moczu (bez hydrolizy oraz po inkubacji z β -glukuronidazą). Przygotowano 3 serie, po 9 próbek każda (3 próby osocza, 3 próby moczu nie poddanego hydrolizie oraz 3 próby moczu po inkubacji z β -glukuronidazą) i oznaczono je w ciągu 3 dni (każda seria innego dnia).

Dokładność między dniami została wyznaczona dla wszystkich stężeń GKS z zakresów krzywych wzorcowych i przedstawiona jako różnica (wyrażona w procentach) między stężeniem oznaczonym (C_{ozn}) a stężeniem nominalnym (C_{nom}):

$$bias [\%] = \frac{C_{nom} - C_{ozn}}{C_{nom}} * 100\%$$

2.6.4. Odzysk

Odzysk GKS wyznaczono zarówno dla próbek moczu (przed i po enzymatycznej hydrolizie), jak i osocza. W tym celu oznaczono najpierw stężenie endogennych GKS w próbkach osocza i moczu (stężenie początkowe). Następnie do próbek osocza i moczu (pochodzących od tych samych osób) dodano roztwór wzorcowy o znanej ilości GKS i oznaczono całkowite stężenie GKS (wynikające z zawartości w próbkach biologicznych endogennych GKS oraz dodanych z roztworem wzorcowym). Odzysk wyznaczono jako różnicę między oczekiwanym stężeniem GKS w próbkach (początkowe + dodane) a końcowym oznaczonym stężeniem:

$$odzysk [\%] = \frac{\text{koncowe oznaczone stezenie GKS}}{\text{oczekiwane stezenie GKS}} * 100\%$$

2.6.5. Zastosowanie metody w warunkach *in vivo*

Opracowaną metodę HPLC oznaczania endogennych GKS sprawdzono w warunkach *in vivo*, oznaczając poziomy endogennych: F i E w osoczu i moczu oraz THF, allo-THF, THE i allo-THE w moczu. Próbkę osocza pochodziły z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu (3 różne serie), próbki moczu uzyskano od trzech zdrowych ochotników.

3. Poziomy endogennych GKS w osoczu i moczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników

3.1. Charakterystyka probantów

W badaniach uczestniczyło 79 chorych na nadciśnienie tętnicze leczonych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Szpitala Klinicznego nr 1 Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz 70 zdrowych ochotników. Próbkę krwi od zdrowych ochotników zostały pozyskane przy udziale Centralnego Laboratorium Szpitala Ginekologiczno-Położniczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (uchwała nr 117/08; załącznik nr 1). Wszyscy uczestnicy badań zostali poinformowani o celu i metodyce badań oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

3.1.1. Zdrowi ochotnicy

Grupę kontrolną stanowiło 70 zdrowych ochotników, 34 kobiety oraz 36 mężczyzn, w wieku od 21 do 71 lat ($36,6 \pm 15,3$ lat). Od każdej osoby pobrano w godzinach porannych (8:00 – 9:00) próbkę krwi oraz przeprowadzono DZM (zanotowano dokładnie objętość oddanego moczu). DZM przeprowadzano według ściśle określonej, standardowej procedury stosowanej w placówkach medycznych [131], do dalszej analizy pobrano objętość 5 ml. Próbkę krwi podzielono na 2 części – jedną próbkę pełnej krwi bezpośrednio zamrażano, drugą próbkę krwi odwirowano w celu zebrania osocza. Próbkę pełnej krwi, osocza oraz moczu przechowywano w temp. -30°C do momentu analizy. Każdy ochotnik udzielił wywiadu mającego na celu ustalić ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego (ankieta – załącznik nr 2). Ponadto dokonano następujących pomiarów i obliczeń:

- pomiar BP
- pomiar procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie
- obliczenie wskaźnika masy ciała BMI

- pomiar obwodu talii WC (*waist circumference*) oraz obliczenie stosunku obwodu talii do obwodu bioder WHR (*waist-to-hip ratio*)

BMI [kg/m^2] to współczynnik powstały przez podzielenie masy ciała [kg] przez podniesiony do kwadratu wzrost (wyrażony w metrach):

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / (\text{wzrost [m]})^2$$

Na jego podstawie u osób dorosłych klasyfikuje się prawidłową masę ciała, nadwagę i otyłość (Tabela 5). Jest to także istotny wskaźnik przy ocenie ryzyka wielu chorób, między innymi związanych z układem sercowo-naczyniowym. Podwyższone wartości BMI korelują z występowaniem zawału serca, ryzykiem zapadalności na nadciśnienie tętnicze, cukrzycę typu 2, chorobę wieńcową, a także wielu nowotworów, między innymi piersi, jelita grubego, prostaty czy endometrium. Otyłość, mierzona za pomocą BMI, jest także czynnikiem sprzyjającym występowaniu chorób układu kostnego [132].

Tabela 5. Klasyfikacja niedowagi, nadwagi oraz otyłości u osób dorosłych na podstawie wartości BMI wg Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) [132]

klasyfikacja	wartość BMI [kg/m^2]
NIEDOWAGA	<18,5
poważna niedowaga	<16,00
umiarkowana niedowaga	16,00 – 16,99
łagodna niedowaga	17,00 – 18,49
PRAWDŁOWA MASA CIAŁA	18,50 – 24,99
NADWAGA	≥25,00
stan przed otyłością	25,00 – 29,99
OTYŁOŚĆ	≥30,00
otyłość I stopnia	30,00 – 34,99
otyłość II stopnia	35,00 – 39,99
otyłość III stopnia	≥40,00

WHR jest parametrem pozwalającym ocenić rozkład tkanki tłuszczowej w organizmie. Za pomocą BMI można stwierdzić nadwagę czy otyłość, jednak parametr ten nie daje żadnych informacji o rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej w organizmie. Podwyższone wartości WHR wskazują natomiast na akumulację tkanki tłuszczowej w okolicach brzusznych. Otyłość androidalna (nagromadzenie tkanki tłuszczowej w obrębie jamy brzusznej) wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego w porównaniu z akumulacją tkanki tłuszczowej w okolicach bioder. U osób rasy kaukaskiej wartości prawidłowe parametru WHR mieszczą się w granicach: dla kobiet 0,67 – 0,80; u mężczyzn 0,85 – 0,95 [133].

Drugim, obok WHR, parametrem oceniającym rozkład tkanki tłuszczowej w organizmie jest **WC**. Wartości tego parametru korelują z wartościami BMI i WHR. Za prawidłowy przyjmuje się WC nie przekraczający 88 cm u kobiet oraz 102 cm u mężczyzn. Wyższe wartości są uznawane za czynnik ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Oba parametry oceniające rozmieszczenie tkanki tłuszczowej w organizmie, zarówno WHR, jak i WC, są uznawane za lepsze wskaźniki oceny ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 niż BMI [101,132]. Analiza kilkunastu projektów badawczych przeprowadzonych na dużych populacjach wykazała, że wartości parametrów WC i WHR są znacząco związane z ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. Wzrost WC o 1 cm zwiększa ryzyko wystąpienia takiego zdarzenia o 2%, wzrost wartości WHR o 0,01 podnosi ryzyko wystąpienia incydentu sercowo-naczyniowego o 5% [134].

Ocena **procentowej zawartości tkanki tłuszczowej** w organizmie opiera się na pomiarze bioimpedancji elektrycznej BIA (*Bioelectrical Impedance Analysis*). Metoda ta pozwala na ustalenie składu ciała poprzez pomiar oporu elektrycznego tkanek – wykorzystuje się różnice w przewodzeniu impulsu elektrycznego przez tkankę tłuszczową, mięśniową i kostną [135,136]. Producent stosowanego do pomiaru aparatu (NAiS Wellneslife, Niemcy) za poziom referencyjny zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie podaje wartości: dla kobiet <30%, dla mężczyzn <25%.

Tabela 6. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, pomiary antropometryczne oraz obliczenia w grupie zdrowych ochotników. Wartości przedstawiono jako zakres (minimum – maksimum), średnia \pm SD oraz mediana.

	GRUPA KONTROLNA		
	<i>n</i> =70	kobiety <i>n</i> =34	mężczyźni <i>n</i> =36
wiek [lata]	21 – 71 36,6 \pm 15,3 31,5	21 – 71 38,5 \pm 16,9 32,5	21 – 64 34,8 \pm 13,6 30
masa ciała [kg]	43,0 – 100,0 (<i>n</i> =67) 69,5 \pm 13,4 68,0	43,0 – 74,5 60,0 \pm 7,9 62,25	56,0 – 100,0 (<i>n</i> =33) 79,2 \pm 10,7 79,0
BMI [kg/m ²]	18,4 – 32,5 (<i>n</i> =67) 23,3 \pm 3,3 22,9	18,4 – 31,1 22,1 \pm 3,9 22,1	19,2 – 32,5 (<i>n</i> =33) 24,5 \pm 3,2 24,4
ciśnienie skurczowe [mmHg]	96 – 153 (<i>n</i> =67) 122 \pm 12 121	97 – 144 117 \pm 12 116,5	96 – 153 (<i>n</i> =33) 127 \pm 11 129
ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	58 – 96 (<i>n</i> =67) 74 \pm 8 74	59 – 96 72 \pm 8 72	58 – 91 (<i>n</i> =33) 76 \pm 7 75
WC [cm]	63,0 – 115,0 (<i>n</i> =67) 82,6 \pm 11,9 82,0	63,0 – 98,0 74,8 \pm 7,8 72,5	71,0 – 115,0 (<i>n</i> =33) 90,5 \pm 10,0 89,0
WHR	0,68 – 1,06 (<i>n</i> =67) 0,83 \pm 0,09 0,84	0,68 – 0,95 0,76 \pm 0,06 0,76	0,79 – 1,06 (<i>n</i> =33) 0,90 \pm 0,06 0,88
zawartość tkanki tłuszczowej [%]	14,0 – 45,2 (<i>n</i> =67) 26,3 \pm 6,7 27,0	22,7 – 40,0 30,2 \pm 4,2 29,4	14,0 – 45,2 (<i>n</i> =33) 22,2 \pm 6,4 22,1

3.1.2. Chorzy z nadciśnieniem tętniczym

Grupę badaną stanowiło 79 pacjentów cierpiących na nadciśnienie tętnicze o nieznannej etiologii, 31 kobiet oraz 48 mężczyzn, w wieku od 17 do 71 lat (43,4 \pm 13,4 lat). Byli to pacjenci znajdujący się pod opieką Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Szpitala Klinicznego nr 1 UMiKM w Poznaniu, jedna osoba została zakwalifikowana do badania po zgłoszeniu się do Poradni Nadciśnienia Tętniczego i Zaburzeń Metabolicznych Szpitala Klinicznego nr 1 UMiKM w Poznaniu. Pacjenci znajdujący się w Klinice zostali poddani rutynowym badaniom diagnostycznym, które obejmowały przede wszystkim: badania biochemiczne krwi, USG jamy brzusznej, EKG oraz badanie ogólne moczu. Dodatkowo, pacjenci wypełnili taką samą ankietę, jak osoby z grupy kontrolnej (załącznik nr 2) oraz dokonano takich samych pomiarów i obliczeń jak

u zdrowych ochotników. Ponadto, w godzinach porannych pobrano od chorych próbki krwi (w godzinach 8:00 – 9:00) oraz wykonano DZM w celu oznaczenia poziomów endogennych GKS w osoczu i moczu oraz ustalenia sekwencji genu *HSD11B2*. Próbki pełnej krwi, osocza (pозyskanego po odwirowaniu części krwi pobranej od pacjenta) oraz moczu zamrażano i przechowywano w temp. -30°C do momentu analizy. Oznaczenia poziomów GKS wykonano w Katedrze Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMiKM, natomiast badania genetyczne w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej UMiKM oraz w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu.

Badania biochemiczne krwi obejmowały między innymi oznaczenie stężenia K^+ , Na^+ , aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), aminotransferazy alaninowej (AlAT), kreatyniny (C_{cr}), aldosteronu, tyreotropiny (TSH) oraz ARO. Ponadto, korzystając z wzoru Cockrofta-Gaulta obliczano klirens kreatyniny (Cl_{cr}) [137,138]:

dla mężczyzn:
$$Cl_{cr} \text{ [ml/min]} = \frac{(140 - \text{wiek [lata]}) * \text{masa ciała [kg]}}{72 * C_{cr} \text{ [mg/dl]}}$$

dla kobiet:
$$Cl_{cr} \text{ [ml/min]} = 0,85 * \frac{(140 - \text{wiek [lata]}) * \text{masa ciała [kg]}}{72 * C_{cr} \text{ [mg/dl]}}$$

Tabela 7. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, pomiary antropometryczne oraz obliczenia w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym. Wartości przedstawiono jako zakres (minimum – maksimum), średnia \pm SD oraz mediana.

	GRUPA CHORYCH Z NADCIŚNIENIEM TĘTNICZYM		
	<i>n</i> =79	kobiety <i>n</i> =31	mężczyźni <i>n</i> =48
wiek [lata]	17 – 71	17 – 67	19 – 71
	43,3 \pm 13,4	41,4 \pm 14,1	44,6 \pm 13,0
	44,0	40,0	46,5
masa ciała [kg]	46,5 – 144,0	46,5 – 129,0	67,0 – 144,0
	92,8 \pm 23,1	79,0 \pm 21,2	101,8 \pm 19,7
	94,0	74,0	101,7
BMI [kg/m ²]	17,9 – 50,4	17,9 – 50,4	22,0 – 49,1
	31,5 \pm 7,4	29,9 \pm 8,3	32,6 \pm 6,6
	30,5	27,5	31,5
ciśnienie skurczowe [mmHg]	110 – 260 (<i>n</i> =78)	110 – 240 (<i>n</i> =30)	110 – 260
	156 \pm 31	160 \pm 33	154 \pm 30
	150	157,5	150
ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	70 – 150 (<i>n</i> =78)	75 – 150 (<i>n</i> =30)	70 – 145
	97 \pm 18	97 \pm 19	97 \pm 17
	95	90	95
WC [cm]	65,0 – 138,0 (<i>n</i> =62)	65,0 – 118,0 (<i>n</i> =20)	81,0 – 138,0 (<i>n</i> =42)
	102,7 \pm 17,6	89,8 \pm 16,2	108,8 \pm 14,9
	104,0	86,5	108,0
WHR	0,70 – 1,32 (<i>n</i> =62)	0,70 – 1,01 (<i>n</i> =20)	0,82 – 1,32 (<i>n</i> =42)
	0,94 \pm 0,11	0,84 \pm 0,09	0,99 \pm 0,08
	0,96	0,82	0,97
zawartość tkanki tłuszczowej [%]	17,7 – 57,5 (<i>n</i> =53)	22,8 – 48,5 (<i>n</i> =14)	17,7 – 57,5 (<i>n</i> =39)
	31,8 \pm 8,9	35,6 \pm 8,0	30,4 \pm 8,9
	29,9	35,0	29,4

4. Analiza struktury genu *HSD11B2*

4.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Do izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej zastosowano zestaw EZ-10 Spin Column Blood Genomic DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc). W metodzie tej przy użyciu odpowiedniego buforu, najpierw TBP, a następnie TBM, oraz proteiny K komórki poddawane są lizie, zachodzi także denaturacja wszelkich białek. Dodatek etanolu zwiększa powinowactwo kwasów nukleinowych do krzemionkowego wypełnienia kolumnienek. DNA ulega związaniu przez specjalną krzemionkową membranę, podczas gdy inne składniki komórkowe oraz zanieczyszczenia są wmywane. Zatrzymane

na membranie DNA jest przemywane buforem (*washing solution*) w celu usunięcia resztek zanieczyszczeń, a po elucji buforem o odpowiednim pH (zawierającym Tris-HCl), uzyskany materiał genetyczny nadaje się do bezpośredniego wykorzystania bez konieczności precipitacji. Ponieważ DNA jest wrażliwe na zmiany pH (ulega hydrolizie), zapewnienie odpowiedniego środowiska (pH 8.0) jest konieczne przy dłuższym przechowywaniu wyizolowanego materiału genetycznego.

Próbki krwi były pobierane przy użyciu systemów aspiracyjno-próżniowych zawierających antykoagulant – Na₂EDTA. Do próbki o pojemności 1,5 ml odmierzano 0,5 ml krwi obwodowej, wirowano przez 3 min w temp. 4°C przy 1150 x g, odrzucano supernatant. Następnie dodawano 0,8 ml buforu TBP, delikatnie mieszano i ponownie odwirowywano przez 3 min przy 1150 x g, supernatant odrzucano. Czynność tę powtarzano do momentu, kiedy pozostały na dnie próbki osad miał zabarwienie bladofioletowe lub białe. Następnie dodawano 0,5 ml buforu TBM, energicznie mieszano oraz dodawano 3 µl roztworu proteiny K. Próbki inkubowano w temperaturze 55°C przez 30 min, kilkakrotnie delikatnie mieszając. Jeśli po 30-minutowej inkubacji widoczne były w próbce nierozpuszczone cząstki, próbki były odwirowywane przez 2 min przy 3210 x g, osad był odrzucany a supernatant przenoszony do czystej próbki. Następnie do próbki dodawano 260 µl etanolu 96° i mieszano. Mieszanina była kolejno przenoszona na kolumnki EZ-10 zawierające krzemionkową membranę. Probówki z umieszczonymi w nich kolumnkami wirowano przez 1 min przy 12 850 x g, przesącz z próbki odrzucano. Następnie do kolumnki dodawano 0,5 ml roztworu do przemywania (*washing solution*) i ponownie wirowano przez 1 min przy 12 850 x g. Czynność tę powtarzano. W celu usunięcia pozostałości roztworu do przemywania z kolumnek, próbki ponownie wirowano przez 1 min przy 12 850 x g. Kolumnki były następnie umieszczane w czystych probówkach o pojemności 1,5 ml. Bufor do elucji w ilości 40 µl dodawano uważnie na środek membrany wypełniającej kolumnkę. Próbki inkubowano przez 2 min w temp. 37°C. Następnie próbki wirowano przez 1 min przy 12 850 x g w celu elucji DNA z kolumnek.

4.2. *Amplifikacja fragmentów genu HSD11B2 poddawanych sekwencjonowaniu*

4.2.1. Wyznaczenie starterów do amplifikacji

W genie *HSD11B2* wyodrębniono 5 fragmentów obejmujących sekwencje kodujące białko enzymatyczne 11β-HSD2 oraz część sekwencji intronowych. Startery do amplifikacji pożądaných fragmentów zaprojektowano przy użyciu programu Primer3. Specyficzność starterów sprawdzano wykonując analizę BLAST. Ekson 5 genu *HSD11B2*, ze względu na jego wielkość, podzielono na 2 fragmenty. Startery zaprojektowano tak, aby sekwencje przez nie powielane w części pokrywały się, a w konsekwencji, by w procesie amplifikacji uzyskać fragmenty zawierające kompletny ekson. Sekwencje starterów, długości amplifikowanych fragmentów oraz temperaturę przyłączania

starterów, wyznaczoną poprzez wykonanie reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*) w gradiencie temperatur (55°C - 65°C), przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka starterów stosowanych do amplifikacji fragmentów genu *HSD11B2*

fragment genu	ekson zawarty w amplifikowanym fragmencie	sekwencja startera	długość produktu PCR [pz]	temperatura przyłączenia starterów [°C]
1	1	1F: AGGGCGAGCAGAGAAAGCG 1R: CGCAGCGGCAGGTAGTGAA	609	63
2	2	2F: GGGAAAGGAGTTAGGGTTGTTG 2R: CACAGAGCAGAGGAGGGAAG	461	61
3	3 i 4	3F: GGCAAGTGTCCACCAGGCAA 3R: AAGGAGTGGCAAGGTCAGAG	735	63
4	część eksonu 5	4F: AGTCCTAATTGGCTTTGGCTC 4R: CGTAATGCTGGGGGTTTTTCG	562	61
5	część eksonu 5	5F: ACAGGACGCAGCCCAGGAC 5R: AGCACCTGCCGCATTTTAGA	624	61

4.2.2. Warunki procesu amplifikacji

Reakcje amplifikacji DNA fragmentów genu *HSD11B2* metodą PCR przeprowadzono w 13 µl mieszaniny reakcyjnej. Skład mieszaniny przedstawiony został w tabeli 9.

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji amplifikacji fragmentów genu *HSD11B2* metodą PCR (skład buforu podano w rozdziale 1.3)

składnik mieszaniny reakcyjnej	stężenie wyjściowe	objętość [µl]
bufor dla polimerazy FastStart Taq DNA	--	1,30
MgCl ₂	25 mmol/l	0,78
dNTP	2,5 mmol/l	1,00
starter F	10 µmol/l	0,50
starter R	10 µmol/l	0,50
woda	--	5,12
roztwór GC-RICH	--	2,60
polimeraza FastStart Taq DNA	5 U/µl	0,20
DNA	różne	1,00
całkowita objętość		13,00

Proces amplifikacji prowadzono w następującym schemacie czasowo-temperaturowym:

- 1) wstępna denaturacja dwuniciowego DNA: 94°C – 4 min
- 2) denaturacja dwuniciowego DNA: 94°C – 35 s

- 3) przyłączenie starterów: 61°C lub 63°C (Tabela 8) – 35 s
- 4) synteza nici komplementarnej: 72°C – 45 s
- 5) końcowa amplifikacja fragmentu DNA pomiędzy starterami: 72°C – 7 min

Etapy 2 – 4 powtarzano cyklicznie 35 razy.

4.2.3. Analiza produktów amplifikacji

Po amplifikacji fragmentów genu *HSD11B2*, 4 μ l mieszaniny reakcyjnej zmieszano z 2 μ l buforu obciążającego (*DNA Loading Dye*) i poddawano elektroforezie. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 160 V i natężeniu 75 mA, w 1,5% żelu agarozowym (przygotowanym poprzez rozpuszczenie na gorąco 5,625 g agarozy w 375 ml buforu TBE) z dodatkiem 8 μ l roztworu bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ml. Produkty amplifikacji analizowano w świetle UV ($\lambda=302$ nm). Każdorazowo, wraz z produktami amplifikacji, poddawano także elektroforezie próbkę zawierającą marker masy DNA w celu analizy długości powielonych metodą PCR fragmentów. Składy: buforu obciążającego do elektroforezy, buforu TBE oraz markera masy DNA podano w rozdziale 1.3 części doświadczalnej.

4.3. Sekwencjonowanie fragmentów genu *HSD11B2*

Uzyskane w procesie amplifikacji fragmenty poddano sekwencjonowaniu w celu analizy występowania mutacji mogących wpływać na aktywność enzymu 11 β -HSD2 kodowanego przez gen *HSD11B2*. Proces sekwencjonowania został wykonany przy użyciu sekwencera 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI, USA) przez Wydziałową Pracownię Techniki Biologii Molekularnej przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu.

Proces sekwencjonowania opierał się na metodzie znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów (ddNTP), która jest modyfikacją metody Sangera. Materiał wyjściowy do reakcji sekwencjonowania tą metodą składa się z:

- puli identycznych jednoniciowych cząsteczek DNA (produkt PCR),
- odpowiedniego startera,
- polimerazy DNA,
- zestawu dNTP, które są wykorzystywane do syntezy nici DNA przez polimerazę DNA,
- ddNTP, które po przyłączeniu do syntetyzowanej nici uniemożliwiają jej dalsze wydłużenie.

Każdy z ddNTP znakowany jest innym fluoroforem, co umożliwia wykonanie reakcji w jednej próbce. W pierwszym etapie reakcji starter przyłącza się do jednoniciowej matrycy, a polimeraza DNA dobudowuje kolejne dNTP wydłużając starter. Dzieje się tak do momentu przyłączenia jednego z ddNTP, w którym brak grupy hydroksylowej w pozycji 3' uniemożliwia utworzenie kolejnego wiązania pomiędzy nukleotydami, a więc dochodzi do terminacji łańcucha. Podczas reakcji powstają

fragmenty różnej długości, każdy z nich jest zakończony odpowiednim ddNTP znakowanym fluorescencyjnie. Automatyzację procesu umożliwiło wykorzystanie do rozdziału powstałych oligonukleotydów elektroforezy kapilarnej, a detektor fluorescencyjny pozwala na szybkie uzyskanie fluorogramu odzwierciedlającego sekwencję badanego fragmentu DNA [139-142].

Sekwencjonowaniu poddano wszystkie próbki DNA uzyskane od pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (77 prób) oraz 18 prób pochodzących od osób z grupy kontrolnej. Sekwencjonowanie fragmentu pierwszego prowadzono w kierunku 3' do 5' (*reverse*), pozostałe fragmenty genu *HSD11B2* – w kierunku 5' do 3' (*forward*).

Wyniki reakcji sekwencjonowania poddano analizie wykorzystując programy Sequence Scanner (v. 1.0), FinchTV (v. 1.4.0) oraz MegAlign DNASTar i porównano z prawidłową sekwencją dostępną w bazach internetowych: Ensembl Genome Browser [67] oraz National Center for Biotechnology Information [66].

4.4. Analiza restrykcyjna

Charakter oraz częstość występowania wybranych zmian w sekwencji genu *HSD11B2* uzyskanych w procesie sekwencjonowania analizowano wykorzystując metodę opartą na reakcji PCR połączonej z analizą restrykcyjną, PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphism*). Wybrane fragmenty genu *HSD11B2*, w których po procesie sekwencjonowania zaobserwowano zmiany w sekwencji poddano amplifikacji, a następnie trawieniu przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych. W celu ustalenia częstości występowania badanej zmiany oraz jej związku z występowaniem nadciśnienia tętniczego, analizie restrykcyjnej poddano DNA uzyskane od osób chorych, a także od zdrowych ochotników.

Startery użyte do amplifikacji pożądaných fragmentów genu *HSD11B2* zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3, a ich specyficzność została potwierdzona za pomocą analizy BLAST. Temperaturę przyłączania starterów ustalono poprzez przeprowadzenie reakcji PCR w gradiencie temperatur (55 - 65°C). Sekwencje starterów użytych do powielenia wybranych fragmentów genu *HSD11B2*, temperaturę ich przyłączania oraz wielkość produktu amplifikacji przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Charakterystyka starterów zastosowanych do amplifikacji wybranych fragmentów genu *HSD11B2*

fragment genu	sekwencja startera	długość produktu PCR [pz]	temperatura przyłączenia starterów [°C]
1	1F: GACCAAACCAGGAGACATTAG 1R: TCCCCACAGTCACGATGCGG	355	65
2	2F: CGAAAACCCCAGCATTACG 2R: GCCCTAATTCTTGAGCCAGT	393	63

Reakcje amplifikacji DNA wybranych fragmentów genu *HSD11B2* przeprowadzono przy użyciu termostabilnej polimerazy DreamTaq DNA Polymerase. Reakcje PCR przeprowadzono w mieszaninie o objętości 15 µl, o składzie podanym w tabeli 11.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji amplifikacji wybranych fragmentów genu *HSD11B2* metodą PCR (skład buforu podano w rozdziale 1.3)

składnik mieszaniny reakcyjnej	stężenie wyjściowe	objętość [µl]
bufor dla polimerazy DreamTaq DNA	--	1,50
dNTP	10 mmol/l	0,20
starter F	10 µmol/l	0,75
starter R	10 µmol/l	0,75
woda	--	10,65
polimeraza DreamTaq DNA	5 U/µl	0,15
DNA	różne	1,00
całkowita objętość		15,00

Reakcję PCR przeprowadzono w następującym schemacie czasowo-temperaturowym:

- 1) wstępna denaturacja dwuniciowego DNA: 95°C – 5 min
- 2) denaturacja dwuniciowego DNA: 95°C – 30 s
- 3) przyłączenie starterów: 63°C lub 65°C (Tabela 10)– 30 s
- 4) synteza nici komplementarnej: 72°C – 30 s
- 5) końcowa amplifikacja fragmentu DNA pomiędzy starterami: 72°C – 5 min

Etapy 2 – 4 powtarzano cyklicznie 35 razy. Po zakończonej reakcji amplifikacji, produkty PCR poddawano elektroforezie w żelu agarozowym według procedury opisanej w rozdziale 4.2.3.

Uzyskane w wyniku amplifikacji DNA produkty poddawano trawieniu przy użyciu enzymów restrykcyjnych dostępnych komercyjnie, dobranych uprzednio do analizowanej zmiany w sekwencji genu *HSD11B2*. W tym celu przygotowano mieszaninę o składzie podanym w tabeli 12, którą kolejno inkubowano przez 16 h w temperaturze odpowiedniej dla danego enzymu (Tabela 13). Następnie

produkty reakcji poddawano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym (żel przygotowywano według procedury opisanej w rozdziale 4.2.3).

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej w procesie trawienia z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych.

składnik mieszaniny reakcyjnej	stężenie wyjściowe	objętość [μ l]
produkt PCR	różne	10,00
bufor TANGO dla enzymów restrykcyjnych	--	2,00
woda	--	7,90
enzym restrykcyjny	10 U/ μ l	0,10
całkowita objętość		20,00

Tabela 13. Warunki analizy restrykcyjnej. Numer pozycji, w której zachodzi inwersja nukleotydów, określono przyjmując za nukleotyd +1 pierwszy nukleotyd kodonu start (A w kodonie ATG) – według *Human Genome Variation Society* [143].

mutacja	enzym restrykcyjny	temperatura inkubacji	miejsce cięcia enzymu	długość produktu reakcji RFLP
c.534 G>A	Taal	65°C	ACN/GT	prawidłowy (GG): 347 pz zmutowany heterozygota (AG): 347 +236 + 111 pz homozygota (AA): 236 +111 pz
c.*197 C>T	HhaI	37°C	GCG/C	prawidłowy (CC): 261+132 pz zmutowany heterozygota (CT): 393+261+132 pz homozygota (TT): 393 pz

N = A, C, G lub T

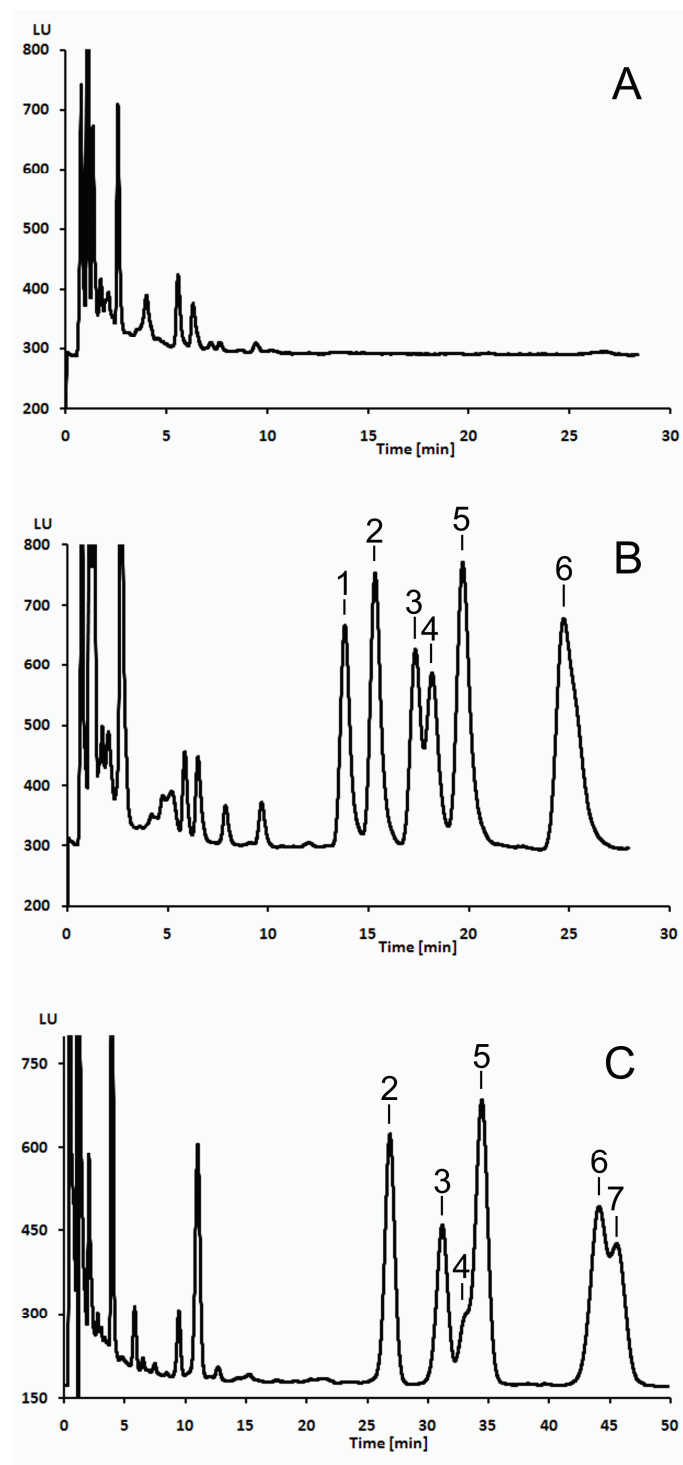
5. Analiza statystyczna

Analizy statystycznej uzyskanych wyników dokonano przy wykorzystaniu programów Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., USA) oraz Statistica 8 (StatSoft Inc., USA). Wszystkie testy statystyczne przeprowadzane były przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Oceny zgodności rozkładu wartości badanych zmiennych z rozkładem normalnym dokonywano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Ze względu na brak zgodności rozkładu większości badanych zmiennych z rozkładem normalnym, dalsze analizy statystyczne były przeprowadzane z zastosowaniem testów nieparametrycznych. Porównania wartości pomiarów antropometrycznych, oznaczonych poziomów GKS oraz parametrów obrazujących aktywność 11 β -HSD2 w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie zdrowych ochotników dokonano przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Porównania wartości badanych zmiennych w grupie chorych i grupie kontrolnej przeprowadzono także między innymi w zależności od płci oraz z uwzględnieniem genotypu. Analizę tę wykonano z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa, który jest rozwinięciem testu U Manna-Whitneya. Stwierdzono istnienie znamienych statystycznie różnic pomiędzy wartościami badanych zmiennych, gdy $p < 0,05$. Występowanie korelacji pomiędzy wybranymi parametrami analizowano testem Spearmana. Aby zweryfikować hipotezę o istotnej różnicy pomiędzy liczebnością osób z parametrami F/E, UFF/UFE oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz wśród zdrowych ochotników zastosowano analizę χ^2 lub w sytuacji, gdy liczebność przypadków była poniżej 5, dokładny test Fishera. Dla zbadania wpływu parametrów oceniających aktywność 11 β -HSD2 na występowanie nadciśnienia tętniczego zastosowano dodatkowo regresję logistyczną umożliwiającą obliczenie tzw. ilorazu szans (OR). W tym przypadku OR pozwala ocenić ile razy wzrasta ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego przy wzroście o jednostkę zmiennej traktowanej jako czynnik ryzyka (parametru oceny aktywności 11 β -HSD2). W celu sprawdzenia czy w badanych populacjach (pacjenci z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowi ochotnicy) zachowane jest prawo równowagi Hardy-Weinberga, skorzystano z programu do obliczeń na stronie www.ihg.gfs.de (Institute of Human Genetics, Technical University Munich and Helmholtz Center Munich). Porównanie częstości występowania alleli oraz poszczególnych genotypów w populacjach wykonano z wykorzystaniem testu dokładnego Fishera.

VI WYNIKI

1. Metoda HPLC oznaczania endogennych GKS i ich metabolitów w płynach biologicznych

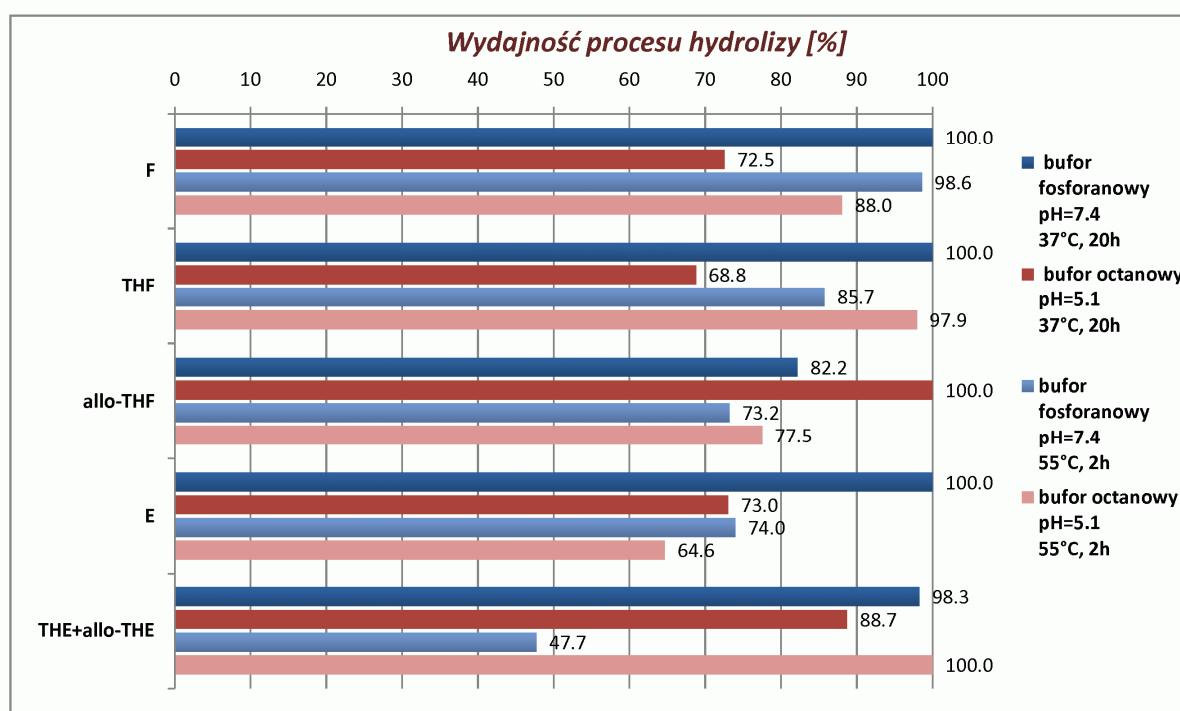
Chromatogramy obrazujące rozdział GKS w próbkach obciążonych analitami po zastosowaniu standardowej kolumny HPLC wypełnionej krzemionką związaną chemicznie z fazą C_{18} oraz kolumny monolitycznej wypełnionej krzemionką związaną z fazą C_{18} przedstawione zostały na rycinie 13.



Ryc. 13. Chromatogramy A i B uzyskane po analizie próbek moczu pochodzącego od zdrowego ochotnika, mocz uprzednio oczyszczony z endogennych GKS metodą SPE; rozdział prowadzony na kolumnie monolitycznej Chromolith: A – próba zerowa; B – próba obciążona analitami: 1 – P, 2 – F, 3 – THF, 4 – allo-THF, 5 – E, 6 – THE+allo-THE (stężenie analitów w matrycy 250 ng/ml; stężenie I.S. równe 200 ng/ml). Chromatogram C uzyskany po ekstrakcji analitów z wody jako matrycy obciążonej roztworem wzorcowym GKS: 2 – F, 3 – THF, 4 – allo-THF, 5 – E, 6 – THE, 7 – allo-THE (stężenie analitów w matrycy wynosiło 500 ng/ml); rozdział uzyskany na kolumnie LiChrospher.

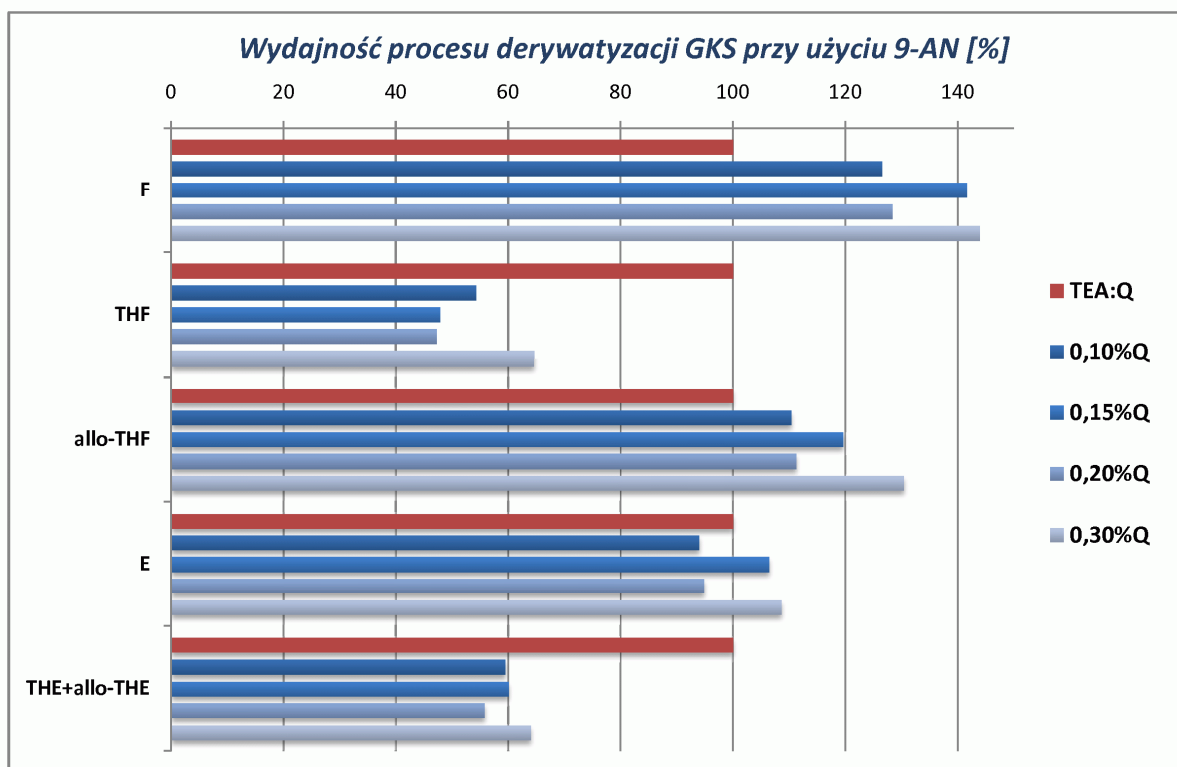
1.1. Optymalizacja procesu enzymatycznej hydrolizy oraz reakcji derywatacji

Wpływ zastosowanego buforu, pH, temperatury oraz czasu inkubacji na wydajność procesu hydrolizy enzymatycznej z użyciem β -glukuronidazy przedstawiony został na rycinie 14. Dla każdego z GKS wyszczególniono warunki, w których wydajność hydrolizy danego steroidu była największa. Wydajność procesu hydrolizy przebiegającego w tych warunkach przyjmowano za 100%, wydajności reakcji w pozostałych warunkach przedstawione zostały jako % w stosunku do najwyższej wartości.



Ryc. 14. Wpływ buforu, temperatury oraz czasu inkubacji na wydajność procesu hydrolizy połączeń GKS z resztą kwasu glukuronowego i siarkowego.

Na rycinie 15 przedstawiono wpływ zasad organicznych (TEA i Q) na wydajność procesu derywatacji GKS przy użyciu 9-AN. Za 100% przyjęto wydajność procesu przebiegającego po zastosowaniu mieszaniny TEA:Q, wydajności derywatacji w innych warunkach są wyrażone jako % w stosunku do reakcji z użyciem TEA:Q.



Ryc. 15. Wpływ zasad organicznych na wydajność procesu derywatywacji GKS przy użyciu 9-AN.

1.2. Walidacja metody HPLC oznaczania endogennych GKS w płynach biologicznych

1.2.1. Liniowość

Liniowość została wyznaczona dla następujących stężeń endogennych GKS: 5,0 – 1000,0 ng/ml dla F, THF i E oraz 10,0 – 1000,0 ng/ml dla allo-THF i THE+allo-THE. Równania krzywych wzorcowych wyznaczono przy pomocy programu MSEXcel (Tabela 14), istotność współczynników regresji b została przeanalizowana przy pomocy testu t-Studenta ($\alpha=0,05$). Wartość współczynnika b różniła się istotnie od zera tylko w przypadku krzywej wzorcowej dla F, dla pozostałych związków wartości b nie różniły się istotnie od zera, dlatego dla E, THF, allo-THF i THE+allo-THE przyjęto równania krzywych wzorcowych $y = ax$ przechodzące przez początek układu współrzędnych. Liniowość krzywych wzorcowych została potwierdzona przy pomocy testu Mandel'a. O liniowości przyjętego modelu świadczyła wartość testowa $TV < F_{kryt}$ (Tabela 15). Obliczono także współczynniki korelacji r , które mieściły się w zakresie od 0,9995 do 0,9999. Wyznaczone równania krzywych wzorcowych wykorzystano następnie do obliczenia poziomów endogennych GKS i ich metabolitów w próbkach osocza i moczu od zdrowych ochotników i chorych z nadciśnieniem tętniczym.

Tabela 14. Równania krzywych wzorcowych^a dla F, E oraz ich tetrahydro- i allo-tetrahydro-metabolitów

związek	zakres krzywej wzorcowej (ng/ml)	równanie krzywej wzorcowej	Współczynnik korelacji <i>r</i>
F	5,0 – 1000,0	$P_F/P_P = (0,00509 \pm 0,00010)C_F + 0,02968$	0,9999
THF	5,0 – 1000,0	$P_{THF}/P_P = (0,00363 \pm 0,00011)C_{THF}$	0,9999
allo-THF	10,0 – 1000,0	$P_{allo-THF}/P_P = (0,00359 \pm 0,00014)C_{allo-THF}$	0,9996
E	5,0 – 1000,0	$P_E/P_P = (0,00727 \pm 0,00117)C_E$	0,9997
THE+allo-THE	10,0 – 1000,0	$P_{THE+allo-THE}/P_P = (0,00882 \pm 0,00146)C_{THE+allo-THE}$	0,9995

^a Sześć krzywych wzorcowych zostało przygotowanych w ciągu czterech tygodni. Równania krzywych wzorcowych obliczono na podstawie uśrednionych wartości stosunków pól powierzchni. Wartości współczynników kierunkowych podano wraz z SD ($a \pm SD$).

Tabela 15. Wartości funkcji testowych (TV) oraz F_{kryt} testu Mandel'a (*Mandel's fitting test*) potwierdzające liniowość krzywych wzorcowych dla wszystkich analitów

związek	TV	F_{kryt}	wniosek
F	0,1008	16,2582	
THF	9,3448	16,2582	$TV < F_{kryt}$
allo-THF	17,6575	21,1977	model liniowy lepiej opisuje
E	0,5585	16,2582	badaną zależność niż model
THE+allo-THE	13,4990	21,1977	regresji kwadratowej

1.2.2. LOD i LOQ

W opracowanych warunkach, LOD (przy S:N = 3:1) dla wszystkich oznaczanych GKS wynosi 3,0 ng/ml. LOQ natomiast wynosi: 5,0 ng/ml dla F, E, THF oraz 10,0 ng/ml dla allo-THF i THE+allo-THE (Tabela 16). Seria próbek o stężeniach GKS równych LOQ została niezależnie przygotowana i oznaczona, a wyznaczone dokładność (bias) i precyzja (%RSD) zostały przedstawione w tabeli 16.

Tabela 16. Wykrywalność i oznaczalność GKS

GKS	LOD (ng/ml) S:N=3:1	LOQ (ng/ml)	LOQ (bias; %RSD)
F	3,0	5,0	(-16,6 ; 8,3)
THF	3,0	5,0	(15,1 ; 11,7)
allo-THF	3,0	10,0	(-1,5 ; 7,4)
E	3,0	5,0	(6,0 ; 12,4)
THE+allo-THE	3,0	10,0	(7,9 ; 15,8)

n=6

1.2.3. Precyzja, dokładność i odzysk

Precyzja została wyznaczona dla osocza i moczu (nie poddanego hydrolizie oraz po 20-godzinnej inkubacji z β -glukuronidazą) i wyrażona jako %RSD. Precyzja w ciągu dnia mieściła się w zakresie 3,0 – 12,1% (Tabela 18); natomiast precyzja między dniami wynosiła od 2,0% do 14,0% (Tabela 17). Błąd oznaczeń, opisujący dokładność metody mieścił się natomiast w zakresie 0,2 – 15,1% (Tabela 17).

Tabela 17. Precyzja między dniami i dokładność metody HPLC-FLD oznaczania endogennych GKS w płynach biologicznych

Zakres krzywych wzorcowych (ng/ml)		precyzja między dniami ^a (%RSD)	dokładność ^b (%błąd)	
F	5,0-1000,0	<i>osocze</i>	2,0	
		<i>mocz nie poddany hydrolizie</i>	4,8	
		<i>mocz po inkubacji z β-glukuronidazą</i>	9,2	
THF	5,0-1000,0		9,6	0,4 – 7,1
allo-THF	10,0-1000,0		14,0	0,3 – 13,1
E	5,0-1000,0	<i>osocze</i>	6,6	
		<i>mocz nie poddany hydrolizie</i>	7,6	
		<i>mocz po inkubacji z β-glukuronidazą</i>	10,9	
THE+allo-THE	10,0-1000,0		12,4	1,2 – 10,4

^a precyzja między dniami została wyznaczona w ciągu 8 dni (n = 9); ^b n = 6

Odzysk GKS został wyznaczony dla wszystkich trzech matryc (osocza, moczu nie poddanego hydrolizie oraz po inkubacji z β -glukuronidazą). Odzysk analitów był wysoki i w każdym przypadku był równy lub przekraczał 90% (Tabela 18).

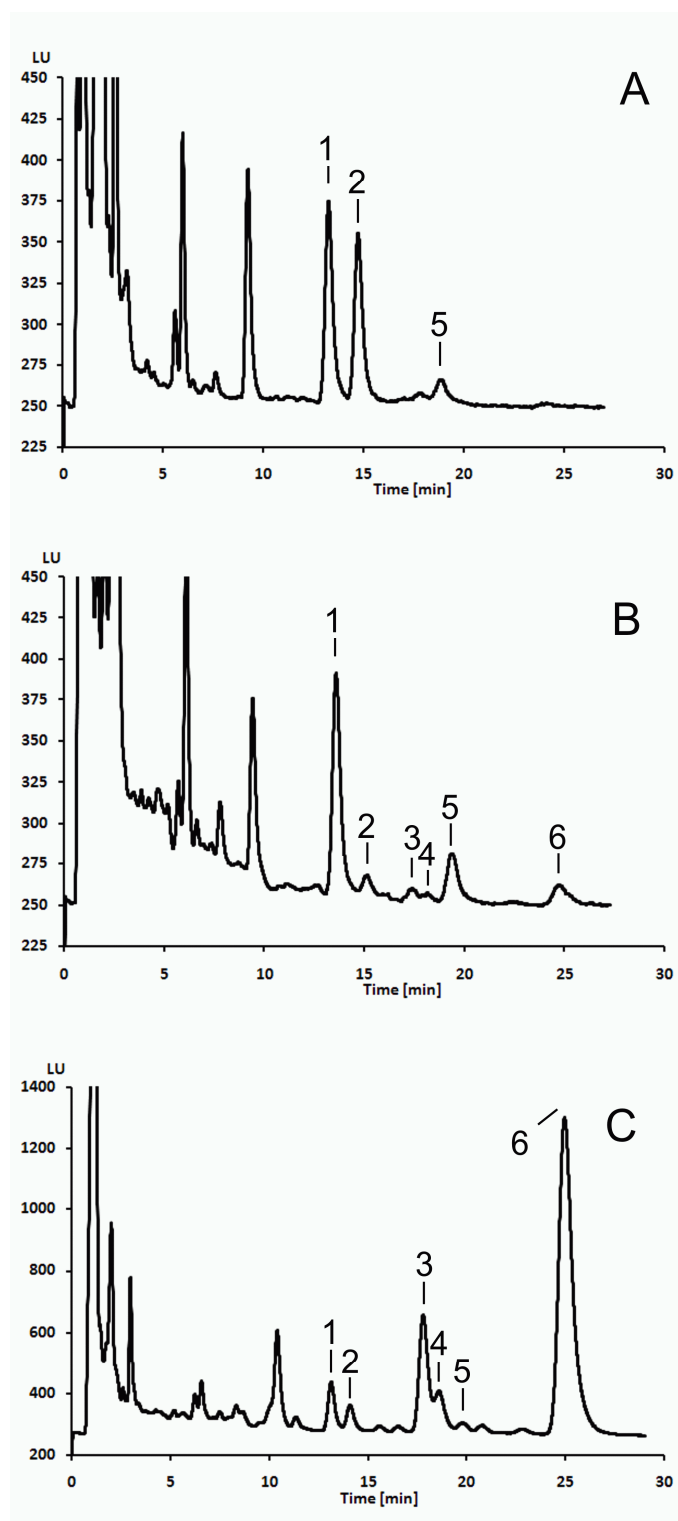
Tabela 18. Odzysk oraz precyzja w ciągu dnia dla F, E oraz ich metabolitów

GKS i matryca	początkowe (ng/ml)	dodane (ng/ml)	oczekiwane (ng/ml)	oznaczone (ng/ml)	odzysk %	RSD%
osocze						
F	109,70	100,00	209,70	216,91 ± 4,36	103,4	3,0
E	13,71	100,00	113,71	112,21 ± 3,76	98,7	10,0
mocz nie poddany enzymatycznej hydrolizie						
F	<LOQ	50,00	50,00	51,59 ± 3,66	103,2	12,1
E	8,32	50,00	58,32	62,86 ± 7,50	107,8	10,2
mocz po 20-godzinnej inkubacji z β-glukuronidazą						
F	36,08	50,00	86,08	85,31 ± 2,45	99,1	4,4
THF	207,97	50,00	257,97	253,40 ± 16,69	98,2	6,6
allo-THF	211,03	50,00	261,03	235,05 ± 22,32	90,0	8,7
E	14,17	50,00	64,17	73,22 ± 2,73	114,1	6,2
THE+allo-THE	185,05	50,00	235,05	237,72 ± 10,08	101,1	4,5

Każda seria składała się z 6 próbek.

1.2.4. Zastosowanie metody w warunkach *in vivo*

Poniżej (Ryc. 16) przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane po analizie próbek osocza oraz moczu (nie poddanego hydrolizie oraz po inkubacji z β-glukuronidazą). Na chromatogramie C przyjęto większą skalę fluorescencji, żeby pokazać pełen obraz analitów uzyskanych w wyniku enzymatycznej hydrolizy glukuronianów i siarczanów GKS.



Ryc 16. Chromatogramy uzyskane po analizie próbek osocza pochodzącego z Rejonowego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu oraz moczu uzyskanego od zdrowego ochotnika: A – osocze, B – mocz nie poddany enzymatycznej hydrolizie, C – próbka tego samego moczu jak na ryc. B, ale po 20-godzinnej inkubacji z β -glukuronidazą. Na ryc. oznaczono piki: 1 – P, 2 – F, 3 – THF, 4 – allo-THF, 5 – E, 6 – THE+allo-THE.

2. Poziomy endogennych GKS w osoczu i moczu oraz ich metabolitów w moczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników

Badaniami objęto grupę 79 chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz 70 zdrowych ochotników. Poniżej przedstawione są parametry charakteryzujące badane populacje (Tabela 19 i 20).

Tabela 19. Mediany parametrów charakteryzujących badane populacje

	chorzy z nadciśnieniem tętniczym	zdrowi ochotnicy	test U Manna-Whitneya $\alpha = 0,05$
wiek [lata]	44,0 (n = 79)	31,5 (n = 70)	p = 0,0022
masa ciała [kg]	94,0 (n = 79)	68,0 (n = 67)	p < 0,0001
BMI [kg/m ²]	30,5 (n = 79)	22,9 (n = 67)	p < 0,0001
ciśnienie skurczowe [mmHg]	150 (n = 78)	121 (n = 67)	p < 0,0001
ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	95 (n = 78)	74 (n = 67)	p < 0,0001

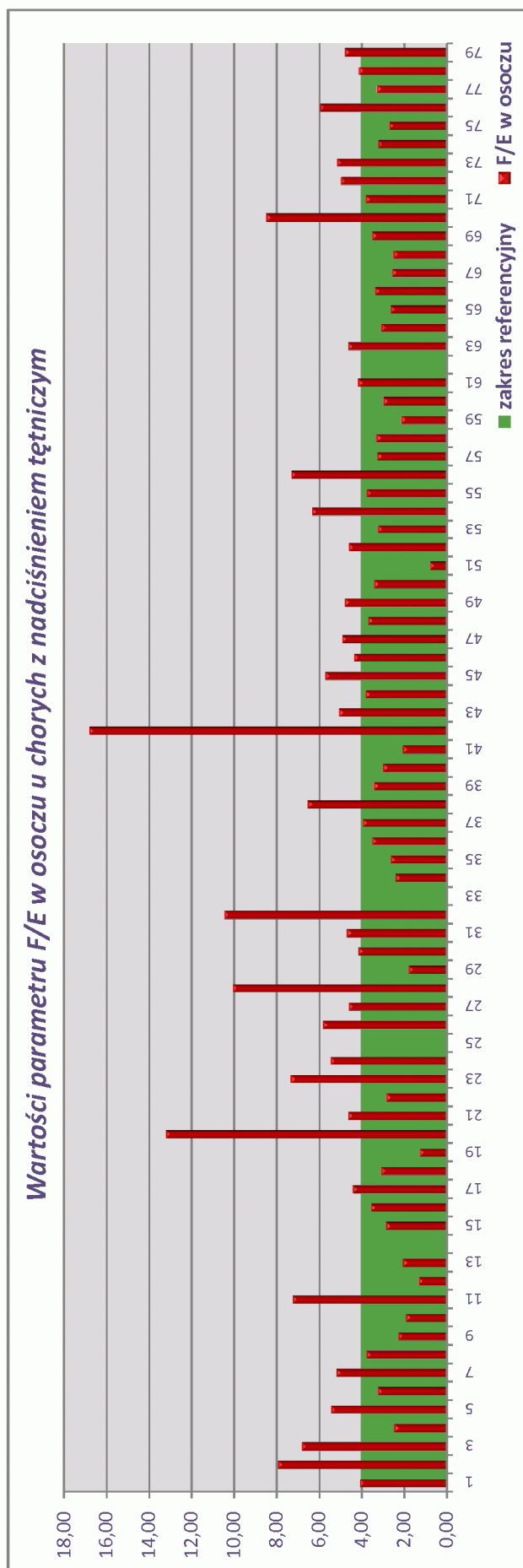
Tabela 20. Porównanie parametrów charakteryzujących badane populacje z uwzględnieniem płci (test Kruskala Wallisa)

	kobiety			mężczyźni		
	z nadciśnieniem tętniczym	zdrowe	p	z nadciśnieniem tętniczym	zdrowi	p
wiek [lata]	40,0 (n=31)	32,5 (n=34)	NS	46,5 (n=48)	30,0 (n=33)	0,0068
masa ciała [kg]	74,0 (n=31)	62,2 (n=34)	0,0005	101,7 (n=48)	79,0 (n=33)	0,0006
BMI [kg/m ²]	27,5 (n=31)	22,1 (n=34)	<0,0001	31,5 (n=48)	24,4 (n=33)	<0,0001
WC [cm]	86,5 (n=20)	72,5 (n=34)	0,0034	108,0 (n=42)	89,0 (n=33)	0,0006
WHR	0,82 (n=20)	0,76 (n=34)	NS	0,97 (n=42)	0,88 (n=33)	0,0021
zawartość tkanki tłuszczowej [%]	35,0 (n=14)	29,4 (n=34)	NS	29,4 (n=39)	22,1 (n=33)	0,0001
ciśnienie skurczowe [mmHg]	158 (n=30)	116 (n=34)	<0,0001	150 (n=48)	129 (n=33)	<0,0001
ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	90 (n=30)	72 (n=34)	<0,0001	95 (n=48)	75 (n=33)	<0,0001

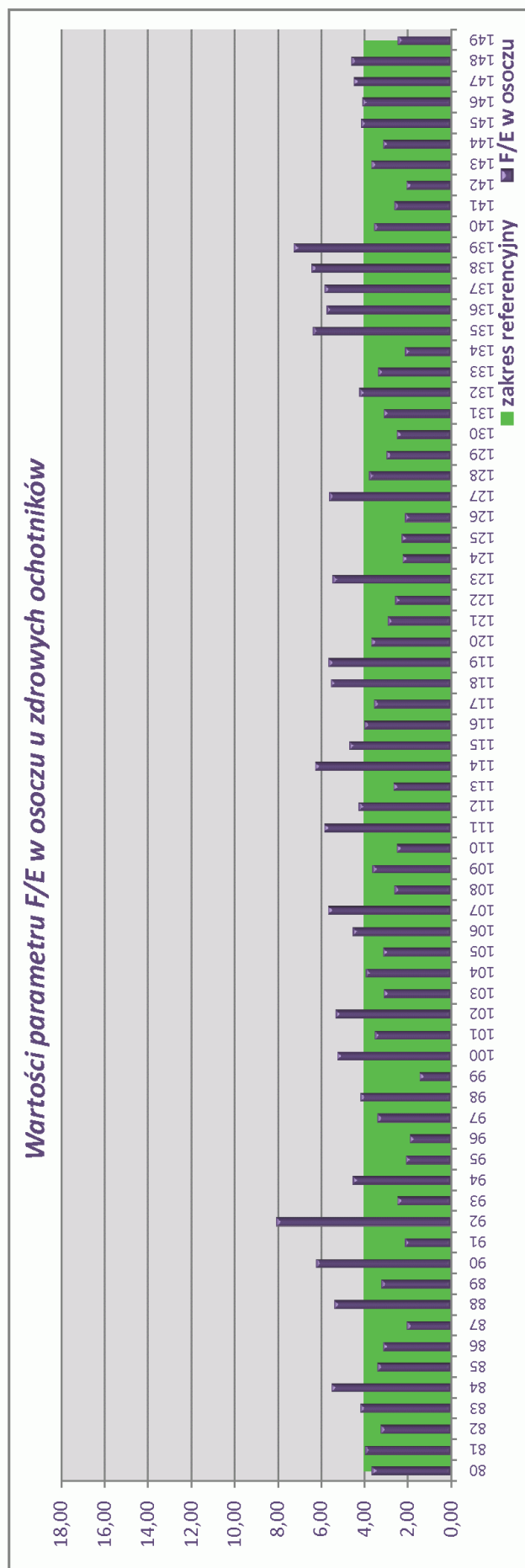
2.1. Poziomy endogennych F i E w osoczu

Wartości stężeń F oraz E oznaczone w osoczu pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników, a także stosunek F/E w osoczu, przedstawione zostały na rycinach 17 i 18 oraz w załączniku nr 3 (Tabele 1 i 2). Zakres uzyskanych wartości, wartości średnie, odchylenie standardowe oraz mediana zostały zestawione w tabelach 21 i 22. Poziomy endogennych GKS w osoczu oznaczono u 75 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u 70 zdrowych ochotników. Nie pozyskano próbek krwi od chorych oznaczonych numerami 14, 33 i 62, natomiast u pacjentki z numerem 25 niemożliwe było oznaczenie poziomów F i E w osoczu ze względu na obecność w próbce związków interferujących z analitami. Nie podano zakresu referencyjnego dla poziomu E w osoczu, ze względu na to, że w standardowej diagnostyce laboratoryjnej nie wykonuje się tego oznaczenia i brakuje danych odnośnie wartości prawidłowych.

Porównano wyniki oznaczeń poziomów F i E w osoczu oraz stosunek F/E w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników przy pomocy testu U Manna Whitneya (Tabela 23). Ponadto, korzystając z testu Kruskala Wallisa, porównano powyższe wielkości z uwzględnieniem płci, BMI, WHR, WC oraz zawartości tkanki tłuszczowej (Tabele 21, 22 i 24).



Ryc. 17 Wartości stosunku F/E w osoczu u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Zielonym obszarem zaznaczono zakres referencyjny [24].



Ryc. 18 Wartości stosunku F/E w osoczu u zdrowych ochotników. Zielonym obszarem zaznaczono zakres referencyjny [24]

Tabela 21. Poziomy endogennych GKS w osoczu u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Wyniki przedstawiono jako zakres, wartość średnią \pm SD oraz medianę.

	n=75	kobiety n=29	mężczyźni n=46	p	zakres referencyjny
F [nmol/l]	101,1 – 810,6	101,1 – 810,6	131,8 – 683,1	NS	138 – 689 [76]
	326,3 \pm 146,0	305,4 \pm 156,4	339,4 \pm 139,2		
	293,7	271,5	330,8		
E [nmol/l]	20,6 – 285,2	20,6 – 219,0	34,3 – 285,2	NS	---
	82,0 \pm 39,8	79,1 \pm 40,1	83,7 \pm 40,0		
	76,0	74,9	78,2		
$\frac{F}{E}$	0,81 – 16,78	1,93 – 8,48	0,81 – 16,78	NS	< 4,00 [24]
	4,47 \pm 2,59	4,16 \pm 1,62	4,67 \pm 3,04		
	3,82	3,77	3,88		

Tabela 22. Poziomy endogennych GKS w osoczu u zdrowych ochotników. Wyniki zostały przedstawione jako zakres, wartość średnią \pm SD oraz medianę.

	n=70	kobiety n=34	mężczyźni n=36	p	zakres referencyjny
F [nmol/l]	141,9 – 679,8	143,0 – 679,8	141,9 – 528,5	NS	138 - 689 [76]
	348,7 \pm 122,5	388,9 \pm 128,1	310,6 \pm 105,1		
	336,8	373,0	307,6		
E [nmol/l]	39,7 – 250,0	39,7 – 145,5	40,4 – 250,0	NS	---
	94,5 \pm 32,3	92,0 \pm 22,7	96,8 \pm 39,5		
	90,8	90,2	91,3		
$\frac{F}{E}$	1,44 – 8,04	2,12 – 7,26	1,44 – 8,04	NS	< 4,00 [24]
	3,92 \pm 1,45	4,33 \pm 1,30	3,53 \pm 1,49		
	3,64	4,12	3,36		

Tabela 23. Mediana poziomów F i E w osoczu oraz parametru F/E u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników

	chorzy z nadciśnieniem tętniczym (n = 75)	zdrowi ochotnicy (n = 70)	test U Manna-Whitneya $\alpha = 0,05$
F [nmol/l]	293,7	336,8	NS
E [nmol/l]	76,0	90,8	p = 0,0007
$\frac{F}{E}$	3,82	3,64	NS

Tabela 24. Mediany poziomów F i E w osoczu oraz stosunku F/E u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników z uwzględnieniem BMI, WC, WHR oraz zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie

		F _{os} [nmol/l]			E _{os} [nmol/l]			F/E		
		<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>
BMI [m ² /kg]	≤ 24,99	335,4 (n=17)	342,1 (n=51)	NS	80,0	94,9	NS	4,10	3,66	NS
	25,00–29,99	341,0 (n=16)	269,5 (n=13)	NS	64,6	88,0	NS	4,62	3,39	NS
	≥ 30,00	289,5 (n=42)	386,1 (n=3)	NS	75,4	62,5	NS	3,54	5,82	NS
WHR	K ≤ 0,80	288,6 (n=18)	331,5 (n=57)	NS	76,4	93,0	0,0158	4,62	3,65	NS
	M ≤ 0,95									
	K > 0,80	307,2 (n=43)	368,1 (n=10)	NS	74,7	72,4	NS	4,14	4,20	NS
	M > 0,95									
	<i>p</i>	NS	NS		NS	NS	NS	NS		
WC [cm]	K ≤ 88	345,1 (n=25)	342,1 (n=61)	NS	80,3	93,0	NS	4,62	3,65	NS
	M ≤ 102									
	K > 88	293,2 (n=36)	303,7 (n=6)	NS	69,8	63,9	NS	4,00	4,77	NS
	M > 102									
	<i>p</i>	NS	NS		NS	0,0273	NS	NS		
zawartość tkanki tłuszcz. [%]	K < 30,0	369,6 (n=18)	318,7 (n=45)	NS	79,0	93,0	NS	4,64	3,55	NS
	M < 25,0									
	K ≥ 30,0	300,4 (n=34)	387,6 (n=22)	NS	69,8	84,0	NS	4,15	4,36	NS
	M ≥ 25,0									
	<i>p</i>	NS	NS		NS	NS	NS	NS		

2.2. Poziomy endogennych F i E oraz ich metabolitów w moczu

Ilości wolnego F i E (UFF i UFE) oznaczone w DZM, zarówno dla chorych z nadciśnieniem tętniczym, jak i zdrowych ochotników, zostały przedstawione w załączniku 4 w tabelach 1 i 2. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartości parametru UFF/UFE, które również zostały przedstawione w załączniku 4 w tabelach 1 i 2 oraz na rycinach 19 i 20. W DZM oznaczono także całkowite ilości zredukowanych metabolitów F i E, uzyskane po enzymatycznej hydrolizie glukuronianów i siarczanów GKS. Ilości wydalonych z moczem w ciągu doby tetrahydropochodnych F i E, dla chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników, przedstawione są w załączniku 4 w tabelach 1 i 2, a wartości wyznaczonego na ich podstawie parametru $(\text{THF}+\text{allo-THF})/(\text{THE}+\text{allo-THE})$ zebrane zostały dodatkowo na rycinach 21 i 22. Zakres uzyskanych wartości, wartości średnie, odchylenie standardowe oraz mediana zostały zestawione w tabelach 25 i 26. Nie pozyskano DZM od 7 chorych z nadciśnieniem tętniczym (osoby oznaczone numerami 3, 5, 42, 46, 55, 56, 57). U jednej osoby (nr 5) brak DZM wynikał z tego, że była ta kobieta zakwalifikowana do badania po zgłoszeniu się do Poradni Nadciśnienia Tętniczego i Zaburzeń Metabolicznych, u pozostałych pacjentów z nadciśnieniem tętniczym braku DZM był spowodowany czynnikami fizjologicznymi. Ponadto, u pacjentów oznaczonych numerami 1 i 76, poziomy UFF były niemożliwe do oznaczenia (niższe od LOQ) zastosowaną metodą. W próbce pochodzącej od pacjentki oznaczonej numerem 50 zaobserwowano związki interferujące z analitami i uniemożliwiające oznaczenie poziomów steroidów. Wartości poziomów GKS eliminowanych z moczem oraz parametrów oceny aktywności 11 β -HSD2 porównano pomiędzy chorymi z nadciśnieniem tętniczym i grupą kontrolną przy pomocy testu U Manna Whitneya, a po uwzględnieniu płci, klasyfikacji BMI, WC, WHR oraz zawartości tkanki tłuszczowej – przy pomocy testu Kruskala Wallisa (Tabele 25 – 29).

Tabela 25. Ilości UFF i UFE w DZM oraz całkowite ilości tetrahydrometabolitów GKS (wolnych i sprzężonych) wydalonych z moczem w ciągu doby, a także parametry UFF/UFE i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u chorych z nadciśnieniem tętniczym.

	<i>n</i> =72	kobiety <i>n</i> =27	mężczyźni <i>n</i> =45	<i>p</i>	zakres referencyjny
UFF [μ g/24h]	0 – 1257,7 45,0 \pm 150,7 18,5	0 – 53,5 14,7 \pm 11,5 11,8	0 – 1257,7 63,2 \pm 188,9 25,0	0,0003	15 – 75 [144]
UFE [μ g/24h]	0 – 847,9 75,9 \pm 98,6 58,9	0 – 101,9 46,0 \pm 22,9 41,3	0 – 847,9 93,8 \pm 120,5 79,2	0,0012	---
$\frac{UFF}{UFE}$	0 – 2,96 0,451 \pm 0,436 0,363	0,110 – 1,296 0,369 \pm 0,259 0,317	0,100 – 2,960 0,497 \pm 0,505 0,376	NS	< 0,600 [24]
THF+allo-THF [mg/24h]	0,254 – 16,517 3,473 \pm 2,628 2,843	0,254 – 8,466 2,304 \pm 1,620 2,202	1,252 – 16,517 4,174 \pm 2,872 3,602	0,0001	---
THE+allo-THE [mg/24h]	0,298 – 16,636 3,570 \pm 2,575 2,952	0,298 – 6,331 2,251 \pm 1,513 2,124	0,732 – 16,636 4,361 \pm 2,764 3,786	0,0001	---
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$	0,37 – 8,11 1,17 \pm 0,98 0,98	0,40 – 8,11 1,34 \pm 1,49 1,00	0,37 – 2,32 1,06 \pm 0,46 0,96	NS	< 1,40 [24]

Tabela 26. Ilości UFF i UFE w DZM oraz całkowite ilości tetrahydrometabolitów GKS (wolnych i sprzężonych) wydalonych z moczem w ciągu doby, a także parametry UFF/UFE i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u zdrowych ochotników.

	<i>n</i> =70	kobiety <i>n</i> =34	mężczyźni <i>n</i> =36	<i>p</i>	zakres referencyjny
UFF [$\mu\text{g}/24\text{h}$]	8,1 – 71,0 31,2 \pm 14,2 28,5	12,3 – 56,8 27,5 \pm 10,9 24,8	8,1 – 71,0 34,6 \pm 16,2 31,2	NS	15 – 75 [144]
UFE [$\mu\text{g}/24\text{h}$]	15,3 – 205,5 87,8 \pm 40,4 79,4	35,7 – 205,5 84,3 \pm 38,4 73,1	15,3 – 187,1 91,2 \pm 42,4 83,0	NS	---
$\frac{UFF}{UFE}$	0,160 – 0,718 0,379 \pm 0,138 0,330	0,160 – 0,640 0,351 \pm 0,119 0,322	0,167 – 0,718 0,405 \pm 0,151 0,411	NS	< 0,600 [24]
THF+allo-THF [mg/24h]	0,452 – 10,454 2,564 \pm 1,416 2,374	0,863 – 10,454 2,254 \pm 1,643 1,844	0,452 – 5,759 2,857 \pm 1,108 2,959	0,0162	---
THE+allo-THE [mg/24h]	0,885 – 9,236 3,458 \pm 1,866 2,935	1,104 – 8,854 2,637 \pm 1,338 2,410	0,885 – 9,236 4,234 \pm 1,975 3,920	0,0012	---
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$	0,41 – 1,77 0,78 \pm 0,23 0,72	0,50 – 1,77 0,85 \pm 0,25 0,79	0,41 – 1,26 0,72 \pm 0,19 0,66	NS	< 1,40 [24]

Tabela 27. Mediany ilości GKS wydalonych w DZM oraz parametry UFF/UFE i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE)

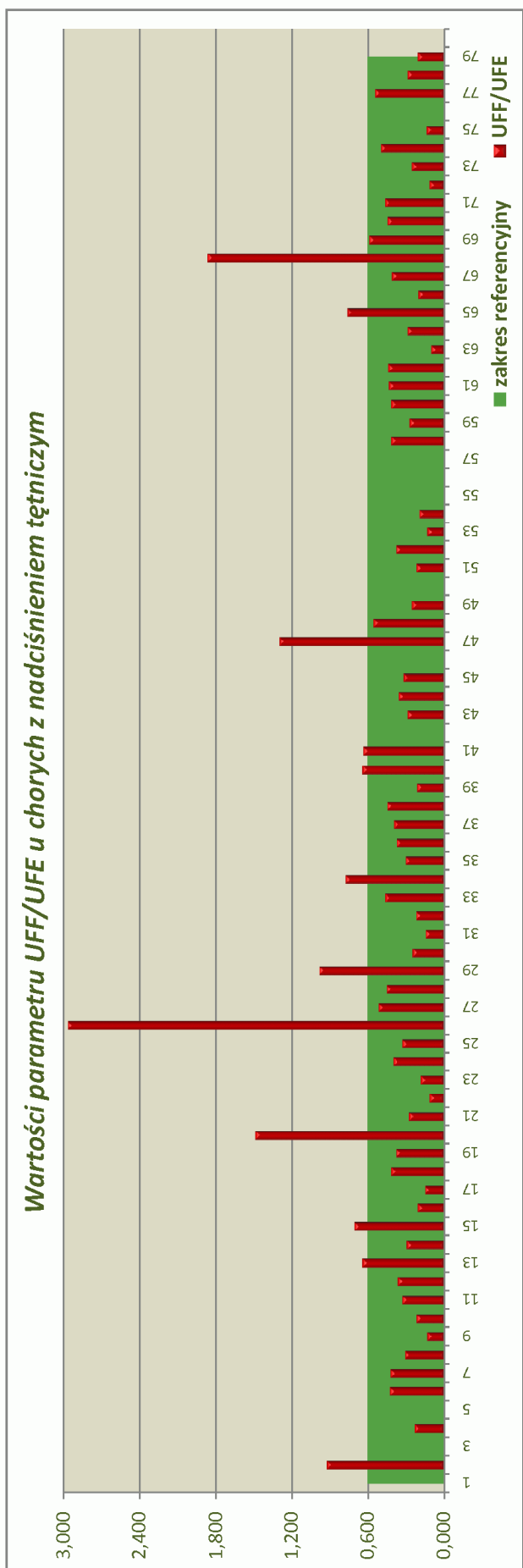
	chorzy z nadciśnieniem tętnicznym (<i>n</i> = 72)	zdrowi ochotnicy (<i>n</i> = 70)	test U Manna-Whitneya $\alpha = 0,05$
UFF [$\mu\text{g}/24\text{h}$]	18,5	28,5	$p = 0,0002$
UFE [$\mu\text{g}/24\text{h}$]	58,9	79,4	$p = 0,0015$
$\frac{UFF}{UFE}$	0,363	0,330	NS
THF+allo-THF [mg/24h]	2,843	2,374	$p = 0,0142$
THE+allo-THE [mg/24h]	2,952	2,935	NS
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$	0,98	0,72	$p < 0,0001$

Tabela 28. Mediany UFF i UFE wydalonych w DZM oraz stosunku UFF/UFE u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników z uwzględnieniem BMI, WC, WHR oraz zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie

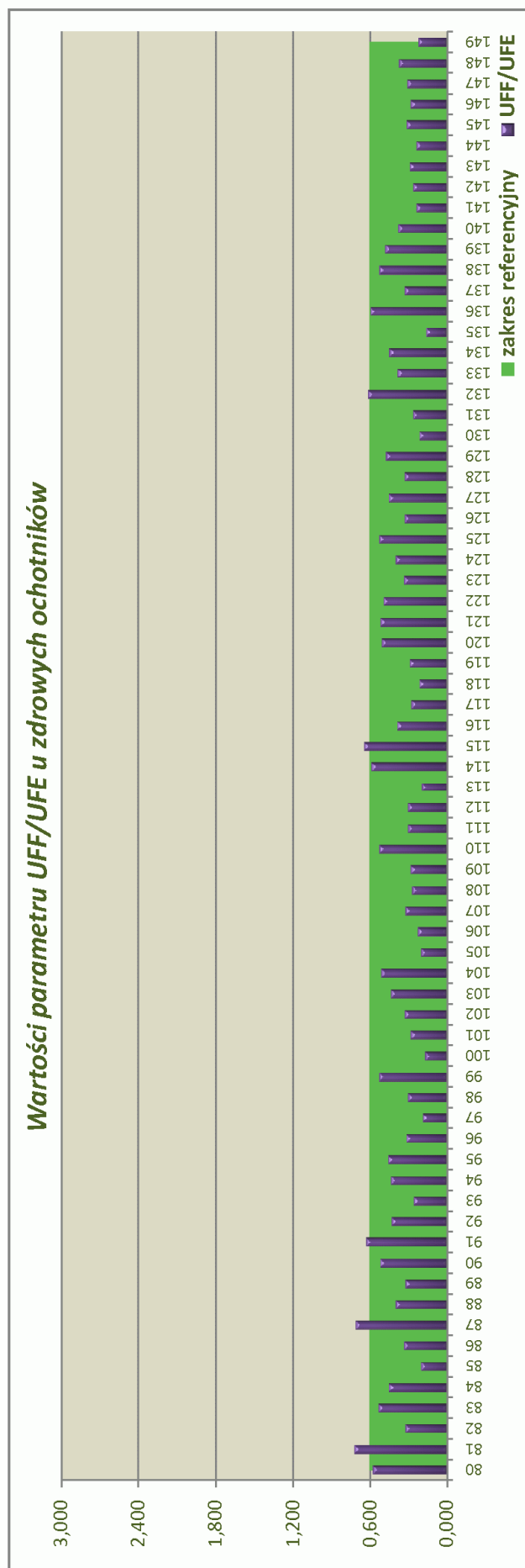
		UFF [$\mu\text{g}/24\text{h}$]			UFE [$\mu\text{g}/24\text{h}$]			UFF/UFE		
		<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>
BMI [m^2/kg]	$\leq 24,99$	20,2 (<i>n</i> =14)	27,7 (<i>n</i> =51)	NS	55,6	75,0	NS	0,423	0,331	NS
	25,00– 29,99	24,2 (<i>n</i> =18)	26,6 (<i>n</i> =13)	NS	58,9	104,0	NS	0,426	0,301	NS
	$\geq 30,00$	18,1 (<i>n</i> =40)	29,9 (<i>n</i> =3)	NS	61,7	68,3	NS	0,281	0,521	NS
WHR	$K < 0,80$	20,6	28,8	NS	59,6	81,9	NS	0,342	0,328	NS
	$M < 0,95$	(<i>n</i> =15)	(<i>n</i> =54)							
	$K \geq 0,80$	23,0	24,8	NS	61,7	68,3	NS	0,340	0,397	NS
	$M \geq 0,95$	(<i>n</i> =40)	(<i>n</i> =13)							
	<i>p</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
WC [cm]	$K \leq 0,80$	24,3	29,8	NS	59,6	83,0	NS	0,385	0,328	NS
	$M \leq 0,95$	(<i>n</i> =23)	(<i>n</i> =61)							
	$K > 0,80$	18,5	24,4	NS	61,7	64,3	NS	0,311	0,459	NS
	$M > 0,95$	(<i>n</i> =32)	(<i>n</i> =6)							
	<i>p</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
zawartość tkanki tłuszcz. [%]	$K \leq 88$	27,0	27,5	NS	80,5	75,0	NS	0,363	0,368	NS
	$M \leq 102$	(<i>n</i> =15)	(<i>n</i> =45)							
	$K > 88$	18,1	30,0	NS	53,5	90,9	0,0231	0,340	0,324	NS
	$M > 102$	(<i>n</i> =32)	(<i>n</i> =22)							
	<i>p</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Tabela 29. Mediany sum metabolitów F i E wydanych w DZM oraz stosunku (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników z uwzględnieniem BMI, WC, WHR oraz zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie

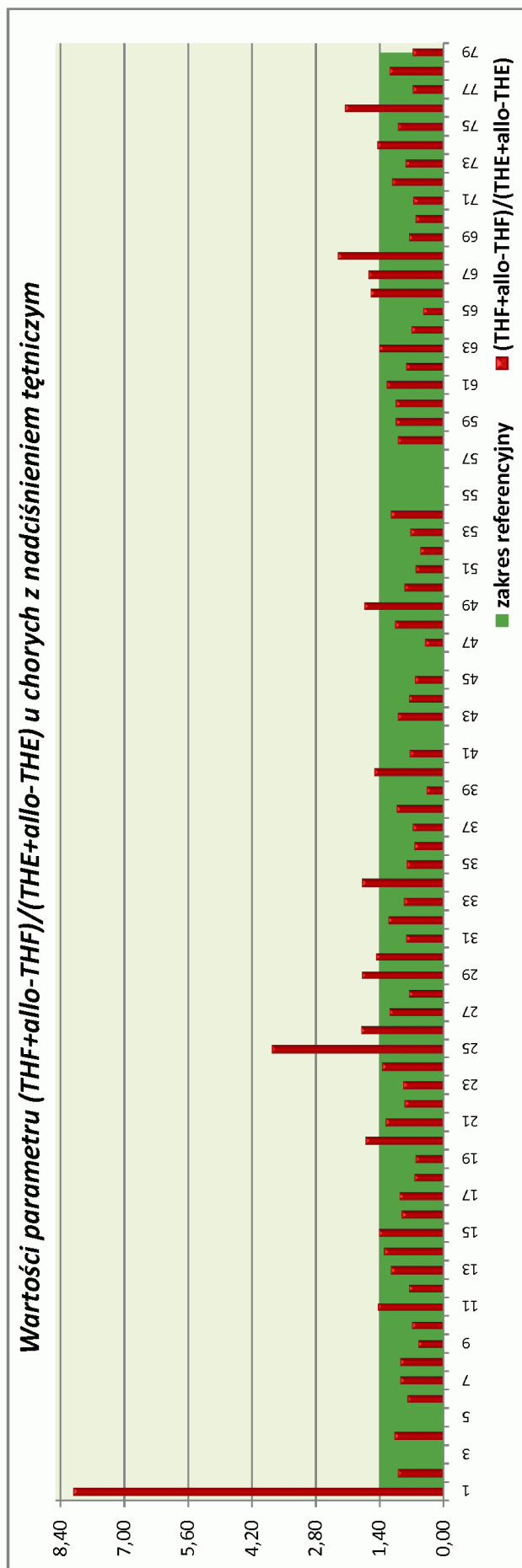
	THF+alloTHF [mg/24h]			THE+allo-THE [mg/24h]			$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$			
	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	<i>pacjenci</i>	<i>kontrola</i>	<i>p</i>	
BMI [m ² /kg]	≤ 24,99	2,108 (n=14)	1,957 (n=51)	NS	2,185	2,483	NS	1,04	0,77	NS
	25,00–29,99	2,782 (n=18)	2,988 (n=13)	NS	2,932	4,594	NS	1,02	0,66	0,0187
	≥ 30,00	3,325 (n=40)	2,999 (n=3)	NS	3,775	3,561	NS	0,92	0,84	NS
WHR	K ≤ 0,80	2,866 (n=15)	2,192 (n=54)	NS	3,318	2,916	NS	0,99	0,76	NS
	M ≤ 0,95									
	K > 0,80	3,192 (n=40)	2,692 (n=13)	NS	3,069	3,561	NS	0,98	0,72	NS
	M > 0,95									
<i>p</i>	NS	NS		NS	NS		NS	NS		
WC [cm]	K ≤ 88	2,834 (n=23)	2,195 (n=61)	NS	2,715	2,730	NS	1,00	0,74	0,0144
	M ≤ 102									
	K > 88	3,410 (n=32)	2,715 (n=6)	NS	3,775	3,687	NS	0,94	0,74	NS
	M > 102									
<i>p</i>	NS	NS		NS	NS		NS	NS		
zawartość tkanki tłuszcz. [%]	K < 30,0	3,298 (n=15)	2,195 (n=45)	0,0018	3,814	2,701	NS	1,03	0,73	NS
	M < 25,0									
	K ≥ 30,0	2,856 (n=32)	2,463 (n=22)	NS	2,831	2,987	NS	1,00	0,76	0,0251
	M ≥ 25,0									
<i>p</i>	NS	NS		NS	NS		NS	NS		



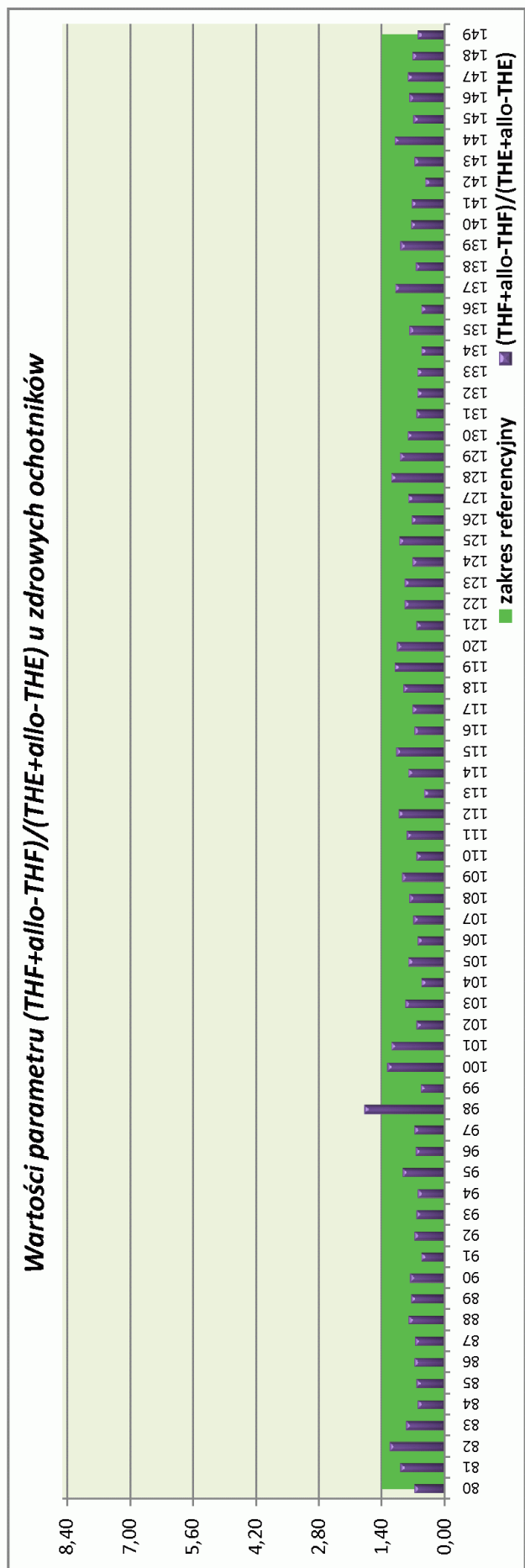
Ryc. 19 Wartości parametru UFF/UFE u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Zielonym obszarem zaznaczono zakres referencyjny [24].



Ryc. 20 Wartości parametru UFF/UFE u osób z grupy kontrolnej. Zielonym obszarem zaznaczono zakres referencyjny [24].



Ryc. 21 Wartości parametru $(THF+allo-THF)/(THE+allo-THE)$ u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Zakres referencyjny [24] zaznaczono kolorem zielonym.



Ryc. 22 Wartości parametru $(THF+allo-THF)/(THE+allo-THE)$ u zdrowych ochotników. Zielonym kolorem zaznaczony został zakres referencyjny [24].

2.3. *Opisy przypadków*

W przeprowadzonych badaniach wyodrębniono dwa przypadki pacjentów (oznaczonych numerami 20 i 26) przyjętych do Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, u których zaobserwowano objawy wskazujące na możliwe nieprawidłowości w funkcji 11 β -HSD2.

Przypadek pierwszy dotyczył 67-letniego mężczyzny (pacjenta oznaczonego numerem 20), przyjętego do Kliniki w celu diagnostyki zespołu Conna. Chory nigdy wcześniej nie leczył się z powodu nadciśnienia tętniczego. W badaniu przedmiotowym podczas przyjęcia do Kliniki zanotowano u tego chorego wartość BP równą 160/110 mmHg oraz tętno wynoszące 72 uderzenia/min. W badaniu USG jamy brzusznej nie stwierdzono zmian w nadnerczach. W ECHO serca zanotowano cechy przerostu lewej komory. Zlecono badania biochemiczne krwi, dokonano pomiarów antropometrycznych, a ponadto w Katedrze Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMiKM oznaczono poziomy endogennych GKS w osoczu i moczu oraz wyznaczono parametry służące do oceny aktywności 11 β -HSD2.

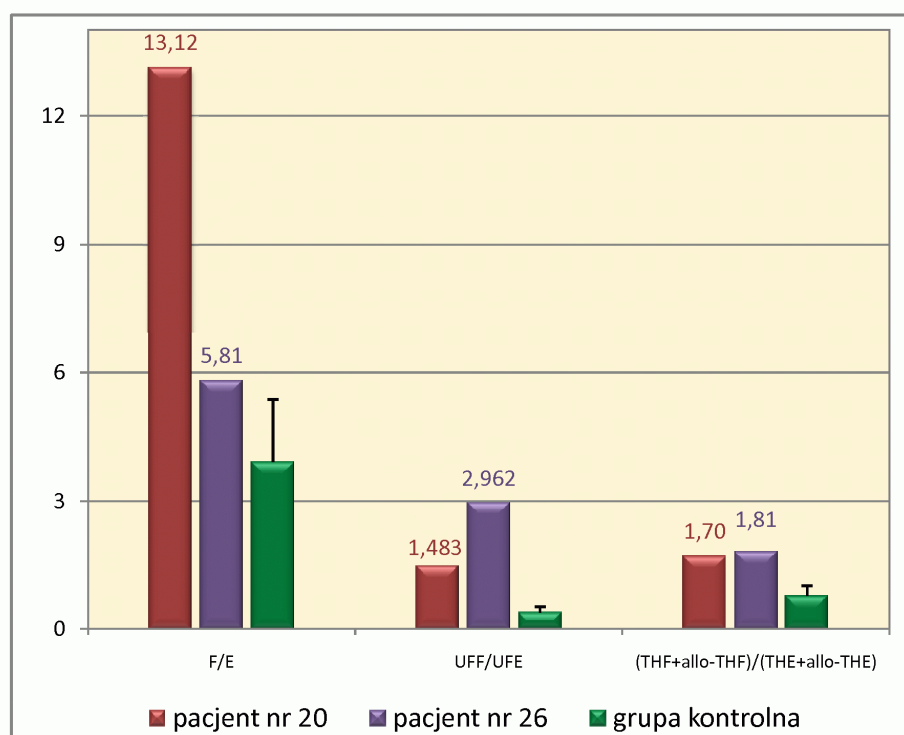
Przypadek drugi dotyczył 54-letniego mężczyzny (pacjenta oznaczonego numerem 26) z rozpoznaniem zespołem Conna, nadciśnieniem tętniczym, chorobą niedokrwinną serca oraz hipercholesterolemią. W przeprowadzonym badaniu przedmiotowym stwierdzono wartość BP na poziomie 150/90 mmHg. Badanie USG wykazało guz nadnercza. W przebiegu badania EKG metodą Holtera stwierdzono liczne epizody bradykardii. Ponadto wykonane zostały pomiary antropometryczne, zlecono wykonanie badań biochemicznych krwi oraz oznaczono w Katedrze Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMiKM poziomy endogennych GKS w osoczu i w moczu. Na podstawie oznaczonych poziomów GKS obliczono parametry oceniające aktywność 11 β -HSD2.

Wyniki pomiarów antropometrycznych oraz przeprowadzonych u obu pacjentów analiz przedstawiono w tabelach 30 i 31 oraz na rycinie 23.

Tabela 30. Wyniki pomiarów antropometrycznych oraz badań biochemicznych krwi przeprowadzonych u pacjentów nr 20 i 26 oraz zakresy referencyjne

	pacjent z numerem 20	pacjent z numerem 26	zakres referencyjny
wiek [lata]	67	54	--
BMI [kg/m ²]	28,38	25,91	18,50 – 24,99
zawartość tkanki tłuszczowej [%]	22,1	25,6	< 25,0 (mężczyźni)
WC [cm]	98	94	< 102 (mężczyźni)
WHR	1,05	0,97	0,85 – 0,95
Na ⁺ [mmol/l]	146	139	135 – 145*
K ⁺ [mmol/l]	3,3	3,6	3,5 – 5,1*
ARO [ng/ml/h]	1,30	brak danych	0 – 7,00*
aldosteron [pg/ml]	11,64 ^a	406,44 ^b	^a 8,00 – 172,00* ^b 42,00 – 201,50*

*zakres referencyjny laboratorium Szpitala Klinicznego nr 1 UMiKM, w którym wykonywane były oznaczenia



Ryc. 23. Wartości parametrów użytecznych w ocenie aktywności 11β-HSD2 u pacjentów oznaczonych numerami 20 i 26 oraz w grupie zdrowych ochotników (dla grupy kontrolnej wynik przedstawiony jako średnia ± SD).

Tabela 31. Ilości GKS wydalonych w DZM dla pacjentów z numerami 20 i 26 oraz dla zdrowych ochotników (w grupie kontrolnej wynik przedstawiony jako średnia \pm SD)

	pacjent z numerem 20	pacjent z numerem 26	zdrowi ochotnicy
F_{os} [nmol/l]	683,1	513,7	348,7 \pm 122,5
E_{os} [nmol/l]	52,0	89,0	94,5 \pm 32,3
UFF [μ g/24h]	1257,7	271,7	31,2 \pm 14,2
UFE [μ g/24h]	847,9	91,7	87,8 \pm 40,4
THF+allo-THF [mg/24h]	16,517	4,469	2,564 \pm 1,416
THE+allo-THE [mg/24h]	9,739	2,468	3,458 \pm 1,866

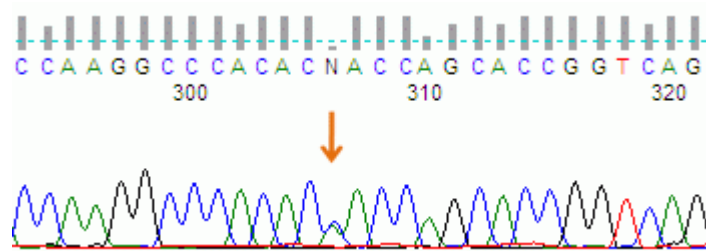
3. Analiza struktury genu *HSD11B2*

3.1. Wyniki sekwencjonowania fragmentów genu *HSD11B2*

Proces amplifikacji, a następnie sekwencjonowania, fragmentów genu *HSD11B2* przeprowadzono dla 77 próbek pochodzących od pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (w tym dwie niezależne próbki, pobrane w różnym czasie, pochodziły od jednego chorego) oraz 27 próbek pozyskanych od zdrowych ochotników. Od pacjentów oznaczonych numerami 14, 33 i 62 nie udało się pozyskać próbki krwi.

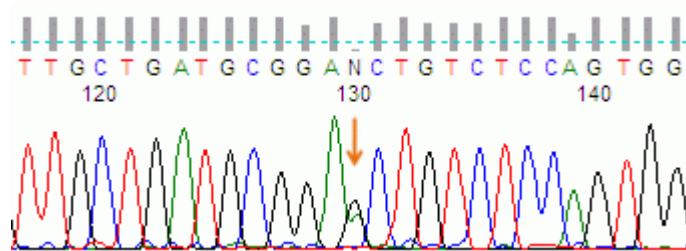
We fragmencie 1, zawierającym ekson 1 i obejmującym region od c.-125 do pozycji c.264+154, nie stwierdzono zmian w sekwencji nukleotydowej w żadnej z poddanych analizie próbek.

Fragment 2 obejmował region od nukleotydu c.265-89 do c.478-21, w którym to obszarze zawierał się ekson 2. Analiza tego fragmentu wykazała zmianę w sekwencji nukleotydowej (Ryc. 24) dotyczącą 5 osób z grupy chorych z nadciśnieniem tętniczym (oznaczonych numerami: 1, 18, 25, 50 i 52) oraz 1 zdrowego ochotnika (oznaczonego numerem 85). Zmiana ta polegała na transwersji C>A w pozycji c.468, co skutkuje odmienną budową kodonu 156 (CAC→CAA).

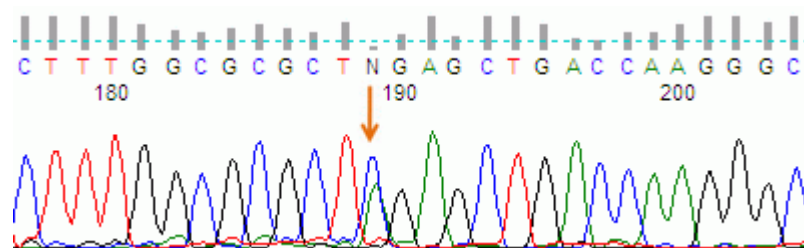


Ryc. 24. Fluorogram przedstawiający zmianę C>A w sekwencji nukleotydowej w pozycji c.468 (ekson 2) genu *HSD11B2* (zaznaczona pomarańczową strzałką) u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym oznaczonego numerem 18.

Fragment 3 genu *HSD11B2* stanowił odcinek od pozycji c.478-50 do c.801+48 i obejmował eksony 3 i 4. Analiza sekwencji tego fragmentu wykazała dwie różne zmiany: tranzycję G>A (Ryc. 25) w pozycji c.534 oraz transwersję C>A (Ryc. 26) w pozycji c.591. Pierwszą zmianę, skutkującą odmienną od prawidłowej budową kodonu 178 (GAG→GAA), zaobserwowano u 5 chorych z nadciśnieniem tętniczym (oznaczonych numerami: 1, 18, 25, 50, 52) oraz u ochotnika oznaczonego numerem 85. Transwersję C>A, w wyniku której zmieniony jest kodon 197 (CUC→CUA), stwierdzono u jednego ze zdrowych ochotników (oznaczonego numerem 133), natomiast u chorych z nadciśnieniem tętniczym nie znaleziono tej zmiany.

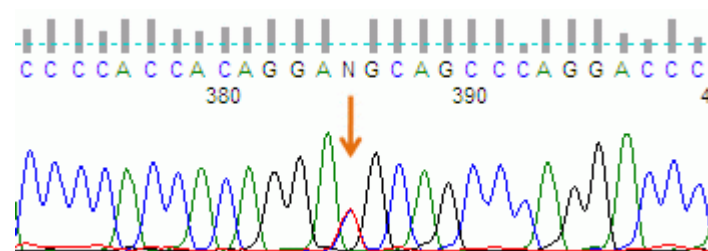


Ryc. 25. Fluorogram przedstawiający zmianę G>A w sekwencji nukleotydowej w pozycji c.534 (ekson 3) genu *HSD11B2* u zdrowego ochotnika oznaczonego numerem 85.



Ryc. 26. Fluorogram przedstawiający zmianę C>A w sekwencji nukleotydowej w pozycji c.591 (ekson 3) genu *HSD11B2* u zdrowego ochotnika oznaczonego numerem 133.

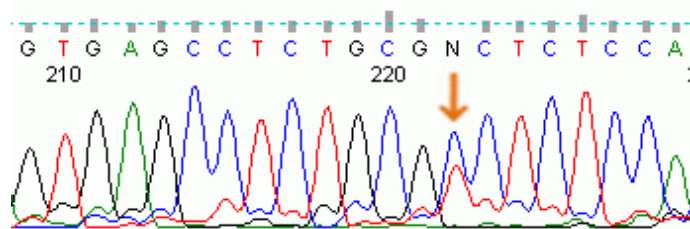
We fragmencie 4, obejmującym region od c.802-11 do c.*72 i zawierającym początkowy fragment eksonu 5 (część kodującą oraz fragment 3'UTR), zaobserwowano zmianę w sekwencji nukleotydowej (Ryc. 27) w jednej z próbek pochodzących od chorego z nadciśnieniem tętniczym (osoba z nr 17). Zmiana ta polegała na tranżycji C>T w pozycji c.1164. W konsekwencji, kodon 388 miał budowę odmienną od prawidłowej (GAC→GAU).



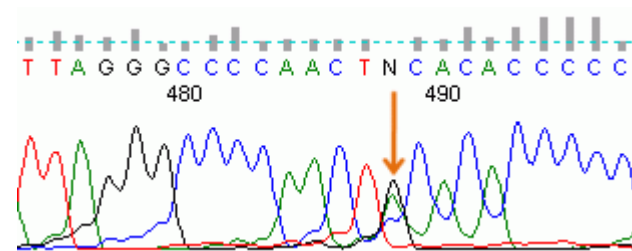
Ryc. 27. Fluorogram przedstawiający zmianę C>T w pozycji c.1164 (ekson 5) genu *HSD11B2* u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym oznaczonego numerem 17.

Fragmenc 5 obejmował odcinek od c.1205 do c.*549+2 i zawierał końcowy odcinek eksonu 5 (końcowy odcinek części kodującej oraz fragment 3'UTR). W części kodującej białko enzymatyczne eksonu 5 nie zaobserwowano nieprawidłowości w sekwencji nukleotydowej, natomiast w części 3'UTR wyodrębniono dwie zmiany o charakterze tranżycji. Pierwsza zmiana, zlokalizowana w pozycji c.*197, polegała na wymianie C>T (Ryc. 28). Zmiana ta została zaobserwowana u 7 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, w tym od jednego pacjenta w dwóch niezależnych próbach pozyskanych

w różnym czasie (próby nr 3, 13, 15, 16, 44, 45, 79) oraz u 2 osób z grupy kontrolnej (oznaczonych numerami 101, 105). Tranzycję A>G (Ryc. 29), zlokalizowaną w pozycji c.*465, zaobserwowano w próbce pochodzącej od osoby chorej na nadciśnienie tętnicze, oznaczonej numerem 66.



Ryc. 28. Fluorogram przedstawiający tranzycję C>T w pozycji c.*197 (ekson 5, fragment 3'UTR) genu *HSD11B2* u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym oznaczonego numerem 45.



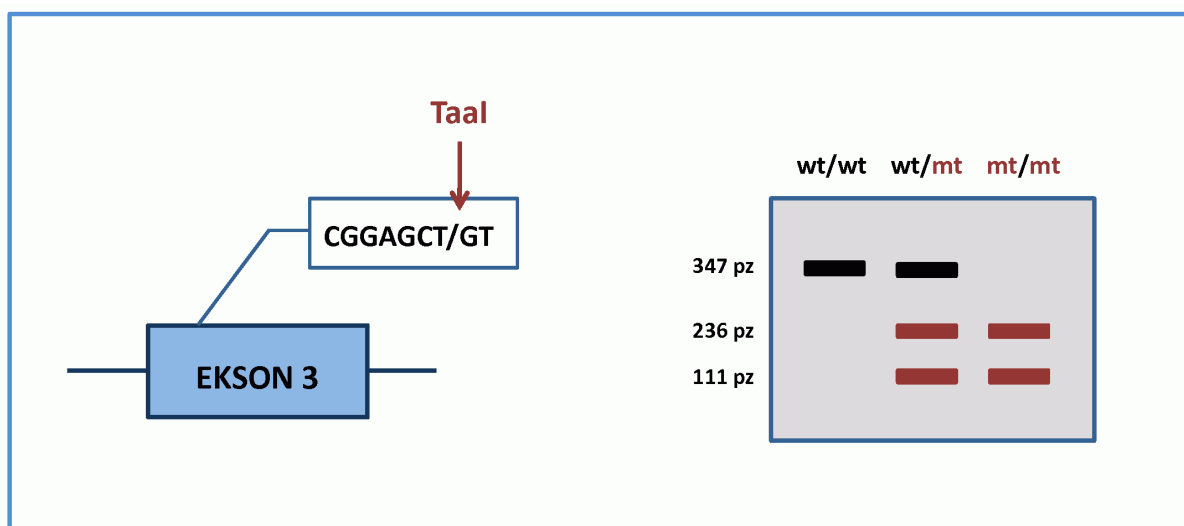
Ryc. 29. Fluorogram przedstawiający zmianę A>G w pozycji c.*465 (ekson 5, fragment 3'UTR) genu *HSD11B2* u pacjenta z nadciśnieniem tętniczym oznaczonego numerem 66.

3.2. Wyniki analizy restrykcyjnej

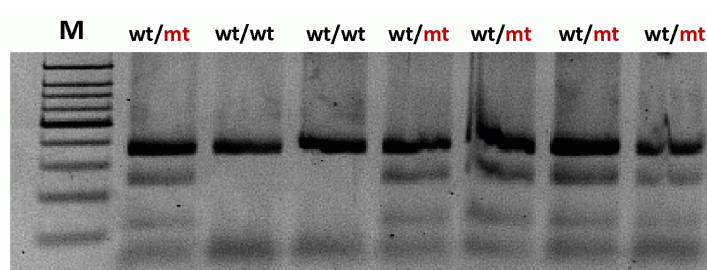
Analizie restrykcyjnej poddano dwie wybrane zmiany w sekwencji nukleotydowej genu *HSD11B2* wyodrębnione w procesie sekwencjonowania, zaobserwowane w największej liczbie badanych próbek. Były to: tranzycja G>A w pozycji c.534 w eksonie 3 oraz tranzycja C>T w pozycji c.*197 w eksonie 5 (fragment 3'UTR). Procesowi PCR-RFLP poddano wszystkie próbki pochodzące od chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników.

3.2.1. Charakter oraz częstość występowania zmiany w pozycji c.534

Wyniki analizy restrykcyjnej dotyczącej zmiany w pozycji c.534 genu *HSD11B2* przedstawiono na rycinach 30 i 31.



Ryc. 30. Przewidywane wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym Taal (cięty allel zmutowany); wt – allel prawidłowy (G), mt – allel zmutowany (A).

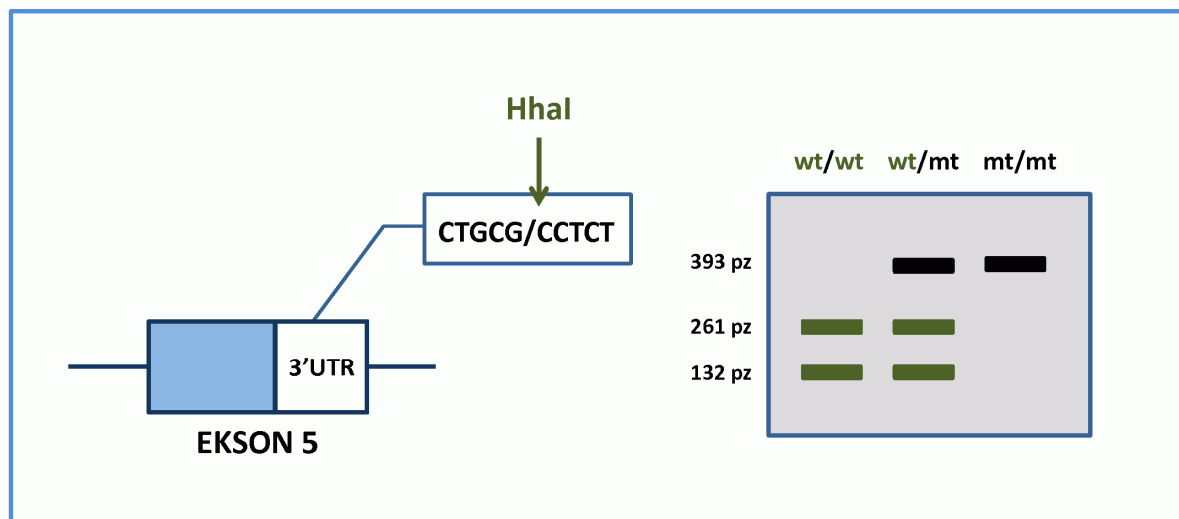


Ryc. 31. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów uzyskanych w analizie PCR-RFLP z użyciem enzymu Taal; M – wzorec masy, wt – allel prawidłowy (G), mt – allel zmutowany (A).

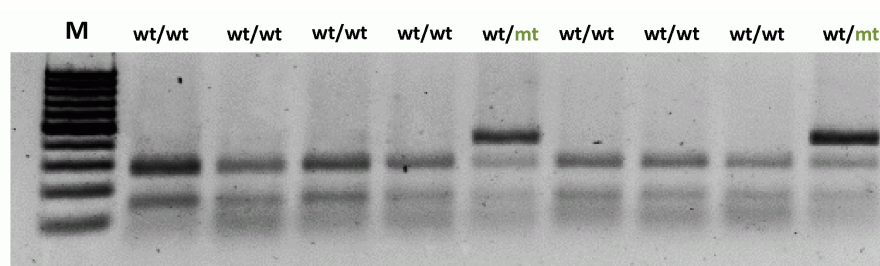
Analiza restrykcyjna potwierdziła występowanie mutacji w pozycji c.534 genu *HSD11B2* u 5 pacjentów oznaczonych numerami 1, 18, 25, 50 i 52 oraz u jednego zdrowego ochotnika (nr 85). W procesie PCR-RFLP nie wyodrębniono innych osób z badaną zmianą w genie *HSD11B2*. Wszystkie zaobserwowane zmiany miały charakter heterozygotyczny (1 allel prawidłowy i 1 allel zmutowany, G/A).

3.2.2. Charakter oraz częstość występowania zmiany c.*197.

Wyniki analizy PCR-RFLP dotyczącej zmiany w pozycji c.*197 genu *HSD11B2* przedstawione zostały na rycinach 32 i 33.



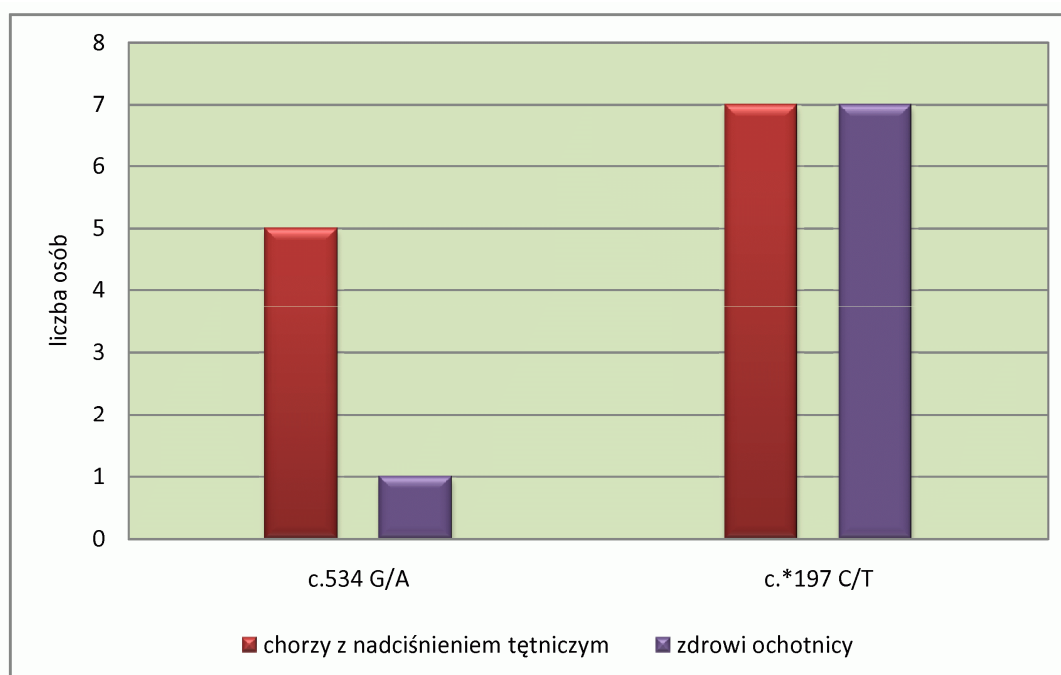
Ryc. 32. Przewidywane wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym HhaI (cięty allel prawidłowy); wt – allel prawidłowy (C), mt – allel zmutowany (T).



Ryc. 33. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego uzyskany po analizie PCR-RFLP z użyciem enzymu restrykcyjnego HhaI; M – wzorzec masy, wt – allel prawidłowy (C), mt – allel zmutowany (T).

W analizie restrykcyjnej dotyczącej zmiany w pozycji c.*197 badanego genu potwierdzono występowanie mutacji u 7 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (oznaczonych numerami 3, 13, 15, 16, 44, 45 i 79) oraz 2 osób z grupy kontrolnej (oznaczonych numerami 101 i 105). Dodatkowo, wyodrębniono 5 kolejnych próbek pochodzących od zdrowych ochotników (oznaczonych numerami 94, 106, 123, 135 i 145) zawierających badaną zmianę. Próbkę te nie były wcześniej poddane procesowi sekwencjonowania. Wszystkie zaobserwowane zmiany miały charakter heterozygotyczny (1 allel prawidłowy i 1 allel zmutowany, C/T).

Liczba osób, u których stwierdzono zmiany w sekwencji nukleotydów w pozycjach c.534 oraz c.*197 w genie *HSD11B2* w populacjach poddanych badaniu przedstawiona została na rycinie nr 34. Analizie poddano 77 próbek pochodzących od chorych z nadciśnieniem tętniczym (w tym od jednego pacjenta pozyskano 2 niezależne próbki pobrane w różnym czasie) oraz 70 próbek pochodzących od zdrowych ochotników.



Ryc. 34. Liczba osób, u których zaobserwowano zmianę nukleotydów w pozycji c.534 oraz c.*197.

Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli w populacji chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników została przedstawiona w tabeli 32. Tabela 33 przedstawia liczebność osób w badanych populacjach (pacjenci z nadciśnieniem tętniczym oraz grupa kontrolna) z różnymi genotypami stwierdzona w przeprowadzonych badaniach oraz obliczona wg prawa równowagi Hardy-Weinberga.

Tabela 32. Częstość występowania poszczególnych alleli oraz genotypów u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (grupa badana) oraz u zdrowych ochotników (grupa kontrolna)

		występowanie genotypów liczba przypadków (częstość)				występowanie alleli liczba przypadków (częstość)		
		n	G/G	G/A	A/A	n	G	A
c.534	<i>grupa kontrolna</i>	70	69 (0,986)	1 (0,014)	0 (0,000)	140	139 (0,993)	1 (0,007)
	<i>pacjenci</i>	76	71 (0,934)	5 (0,066)	0 (0,000)	152	147 (0,967)	5 (0,033)
		n	C/C	C/T	T/T	n	C	T
c.*197	<i>grupa kontrolna</i>	70	63 (0,900)	7 (0,100)	0 (0,000)	140	133 (0,950)	7 (0,050)
	<i>pacjenci</i>	76	69 (0,908)	7 (0,092)	0 (0,000)	152	145 (0,954)	7 (0,046)

Tabela 33. Liczebność osobników z różnymi genotypami stwierdzona w przeprowadzonych badaniach oraz obliczona z prawa Hardy-Weinberga.

genotyp	liczebność w populacji pacjentów z nadciśnieniem tętniczym		liczebność w populacji zdrowych ochotników	
	stwierdzona	oczekiwana	stwierdzona	oczekiwana
c.534 G/G	71	71,08	69	69,00
c.534 G/A	5	4,84	1	0,99
c.534 A/A	0	0,08	0	0,00
c.*197 C/C	69	69,16	63	63,17
c.*197 C/T	7	6,68	7	6,65
c.*197 T/T	0	0,16	0	0,17

4. Wpływ aktywności 11 β -HSD2 na występowanie nadciśnienia tętniczego

W celu ustalenia w jakim stopniu aktywność 11 β -HSD2 wpływa na wystąpienie nadciśnienia tętniczego, przeprowadzono analizę logistyczną, w której za czynniki ryzyka przyjęto parametry odzwierciedlające aktywność 11 β -HSD2 oraz wystąpienie mutacji w pozycjach c.534 oraz c.*197 genu *HSD11B2*. Wartość *p* wskazuje na istotność wpływu danego parametru na wystąpienie nadciśnienia tętniczego, natomiast wartość OR mówi ile razy wzrasta ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego przy wzroście F/E, UFF/UFE lub (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) o jednostkę lub przy posiadaniu heterozygotycznego genotypu c.534GA i c.*197CT.

W tabeli 34 zestawiono wpływ wszystkich analizowanych parametrów na wystąpienie nadciśnienia tętniczego.

Tabela 34. Zestawienie wyników regresji logistycznej

	<i>zależność</i>	<i>OR</i>	<i>p</i>
$\frac{F}{E}$ w osoczu	---	1,14	> 0,05
$\frac{UFF}{UFE}$ w DZM	---	2,24	> 0,05
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$ w DZM	dodatnia	11,34	< 0,0001
genotyp c.534GA	---	4,86	> 0,05
genotyp c.*197CT	---	0,91	> 0,05

VII OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

1. Metoda analityczna

Ocenę fenotypu (analizę aktywności 11β -HSD2) u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników przeprowadzano w oparciu o oznaczenia poziomów endogennych GKS w osoczu i moczu. W literaturze opisane są liczne metody wykorzystywane do oznaczania F, E i ich metabolitów. Są to między innymi: metody radioimmunologiczne (RIA, *radioimmunoassay*), kompetytywne wiązanie z białkami (*competitive protein binding assay*) oraz metody chromatograficzne: chromatografia gazowa oraz HPLC. RIA [145,146] oraz kompetytywne wiązanie z białkami [147] były wykorzystywane najczęściej do oznaczania UFF lub stężenia F w osoczu lub ślinie. Metodę RIA stosowano także w analizie poziomów F i E w osoczu, jednakże po uprzednim rozdiale chromatograficznym tych związków [72] lub też po ekstrakcji chlorkiem metylenu [148]. RIA i kompetytywne wiązanie z białkami mają jednak znaczącą wadę, a mianowicie są mało specyficzne. Istnieje realna możliwość krzyżowych reakcji przeciwciał ze związkami strukturalnie podobnymi do analitów. Może to powodować między innymi zawyżanie wyników przy oznaczeniach poziomów F poprzez krzyżową reakcję przeciwciał również z E, bądź innymi endogennymi steroidami czy też ich metabolitami. Z tego względu do prawidłowych oznaczeń GKS przy użyciu tych metod konieczne jest zastosowanie wysoce specyficznych przeciwciał [146,148,149]. Alternatywą dla tych metod są z całą pewnością metody chromatograficzne, HPLC czy GC. Niezaprzeczalną przewagą metod chromatograficznych jest możliwość jednoczesnego oznaczania poziomów F, E i ich metabolitów po uprzednim rodziale ich w kolumnie chromatograficznej [147,150]. Chromatografia gazowa, zarówno z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) [151], jak i sprzężona ze spektrometrem mas (MS) [46,150-158], była wykorzystywana do analizy poziomów GKS w trimetylosilylowych pochodnych. Stosowana metoda derywatywacji była jednak bardzo skomplikowana, wieloetapowa, a więc czasochłonna. Uzyskane związki były niestabilne, ulegały rozkładowi pod wpływem tlenu zawartego w powietrzu. Ponadto, rozdział dwóch stereozomerów, THF i allo-THF, związków istotnych w wyznaczeniu parametrów oceniających aktywność 11β -HSD2, był niezadowalający [151,159]. W celu zwiększenia stabilności pochodnych GKS, a także poprawienia selektywności metody, stosowano dwuetapową derywatyzację prowadzącą do otrzymania związków dipentafluoropropionylowych [159]. Poziomy GKS w próbkach biologicznych były także oznaczane z zastosowaniem metod HPLC-UV, zarówno w normalnym układzie faz [160], jak również w odwróconym układzie faz [147,161-164]. Tetrahydro- i allo-tetrahydro-metabolity F i E eliminowane z moczem oznaczano przy użyciu HPLC z tandemowym detektorem MS. Dużą zaletą metody HPLC-MS-MS jest bardzo wysoka wykrywalność na poziomie od 0,1 ng/ml [165] do 0,5 ng/ml [166]. Z drugiej strony, przytaczano problemy dotyczące specyficzności metody HPLC-MS-MS

wynikające z dużej liczby związków o budowie steroidowej wydalanych z moczem, które ze względu na podobieństwo strukturalne rozpadają się na podobne jony fragmentacyjne. Ponadto, tendencja steroidów do utraty cząsteczki wody w źródle jonizacji dodatkowo wpływa niekorzystnie na specyficzność opisywanej metody [166]. Metoda HPLC-FLD w normalnym układzie faz była wykorzystywana do oznaczania F, E, P i prednizonu po uprzedniej derywatywacji tych związków z 9-AN [167]. W podobnych warunkach analizowano także poziomy tetrahydro- i allo-tetrahydro-metabolitów w postaci antroilowych pochodnych [168]. W Katedrze Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki opracowano metodę RP-HPLC z detekcją fluorescencyjną do oznaczania triamcynolonu w obecności endogennych GKS. W tej metodzie uzyskano dobry rozdział endogennych F, E oraz ich zredukowanych metabolitów, jednak metoda ta nie została zwalidowana pod kątem oznaczania endogennych GKS [129]. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach opracowano i zwalidowano metodę RP-HPLC-FLD do jednoczesnego oznaczania endogennych F, E, THF, allo-THF, THE i allo-THE w płynach biologicznych. Na podstawie oznaczonych poziomów GKS możliwe było wyznaczenie parametrów służących do oceny aktywności 11 β -HSD2.

Do obliczenia poziomów GKS w próbkach biologicznych konieczne było wcześniejsze wyznaczenie zależności stosunku powierzchni piku danego analitu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego oraz obliczenie równań krzywych wzorcowych. Ponieważ F, E oraz ich tetrahydro- i allo-tetrahydro-pochodne to związki endogenne, nie można bezpośrednio zastosować moczu i osocza jako matrycy do przygotowania krzywych wzorcowych. Shibata i wsp. zaproponowali oczyszczanie moczu i osocza z endogennych GKS metodą SPE, jednak warunki tego procesu nie zostały szczegółowo opisane [167]. W innych artykułach problem matrycy używanej do przygotowania krzywych wzorcowych rozwiązywano poprzez zastosowanie moczu rozcieńczonego wodą w stosunku 1:50 [161] lub tylko wody [162,163]. W niniejszej pracy przeprowadzono próby oczyszczenia moczu i osocza z endogennych GKS przy użyciu kolumniek wypełnionych krzemionką związaną z fazą C₁₈. Po dwukrotnie przeprowadzonej ekstrakcji udało się całkowicie oczyścić mocz, jednakże w osoczu pozostałości endogennych GKS obserwowano nawet po czterokrotnie powtórzonym procesie ekstrakcji. Dlatego też używano wody dejonizowanej oraz oczyszczonego metodą SPE moczu jako matrycy do przygotowywania krzywych wzorcowych. Uzyskane równania krzywych wzorcowych dla obu użytych matryc były identyczne (Tabela 14), co potwierdza, że prawidłowe jest zastosowanie wody dejonizowanej jako matrycy w wykonanych oznaczeniach GKS. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi prezentowanymi przez Ruits i wsp. [161], gdzie nie wykazano różnic po zastosowaniu rozcieńczonego moczu oraz czystej wody jako matrycy do oznaczania UFF i 6 β -hydroksykortyzolu.

Rozdział F, E, THF, allo-THF, THE, allo-THE oraz P prowadzono na kolumnie monolitycznej HPLC Chromolith RP-18e. Zastosowanie kolumny monolitycznej pozwoliło uzyskać lepszy rozdział THF,

allo-THF i E oraz skrócić czas analizy do niespełna 30 min, w porównaniu z tradycyjną kolumną z fazą C₁₈ – LiChrospher RP-18e, gdzie czas analizy wynosił blisko 50 min (Ryc. 13). Nie udało się jednakże uzyskać rozdziału pików pochodzących od THE i allo-THE przy zastosowaniu kolumny monolitycznej Chromolith RP-18e. Przy zastosowaniu kolumny HPLC LiChrospher RP-18e rozdział pików pochodzących od tych analitów był nieznaczny, co świadczy o tym, że wymienione związki są trudne do skutecznego rozdziału. Analiza przeprowadzana opracowaną metodą HPLC oznaczania endogennych GKS jest jedną z najmniej czasochłonnych w porównaniu z innymi metodami HPLC-FLD opisanymi w literaturze [167,168]. Czasy retencji dla tetrahydro- i allo-tetrahydro-pochodnych F i E prezentowane przez Neufeld i wsp. [168] wynosiły ok. 45-50 min, w pracy tej nie przeprowadzono jednak równoczesnej analizy F i E. Zastosowanie kolumny monolitycznej pozwoliło na uzyskanie krótszych czasów retencji F i E także w porównaniu do metody prezentowanej przez Shibata i wsp. [167]. Ponadto, w opracowanej metodzie rozdział GKS prowadzono w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem mieszaniny ACN i wodnego roztworu kwasu orto-fosforowego o pH 4,6 jako fazy ruchomej, co jest znacznie bardziej przyjazne dla środowiska i ekonomiczne niż prowadzone wcześniej analizy w normalnym układzie faz, z fazą ruchomą będącą mieszaniną rozpuszczalników organicznych [167,168].

Wolna frakcja F i E stanowi około 20 – 40% całkowitej ilości tych związków wydalanej z moczem, pozostała część to połączenia tych związków z resztą kwasu glukuronowego i siarkowego [45]. Tetrahydro- i allo-tetrahydro-metabolity F i E są natomiast prawie w całości (ponad 90%) wydalone z moczem w postaci glukuronianów i siarczanów [45,46]. Dlatego też w celu oznaczenia całkowitej ilości GKS wydanych w DZM konieczne jest przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej. Hydroliza skoniugowanych z kwasem glukuronowym lub siarkowym GKS przeprowadzana jest najczęściej w temperaturze 37°C, natomiast czas inkubacji różni się w publikowanych metodach od kilku do nawet 48h [46,169,170]. Sugerowano jednak, że można uzyskać taką samą wydajność procesu hydrolizy w znacznie krótszym czasie – ok. 3 h, poprzez podniesienie temperatury inkubacji z 37°C do 55°C [45]. Ze względu na dużą rozbieżność danych literaturowych dotyczących warunków hydrolizy enzymatycznej glukuronianów i siarczanów GKS, poddano analizie wpływ buforu, czasu inkubacji oraz temperatury na wydajność procesu (Ryc. 14). Najlepszą wydajność reakcji hydrolizy koniugatów F, E i THF z zastosowaniem β -glukuronidazy z *Helix pomatia* uzyskano w środowisku buforu fosforanowego (pH 7,4) w temperaturze 37°C w czasie 20h. W przypadku THE+allo-THE uzyskano praktycznie taką samą wydajność procesów hydrolizy prowadzonych z użyciem buforu octanowego w temperaturze 55°C przez 2h oraz z zastosowaniem buforu fosforanowego w temperaturze 37°C przez 20h (odpowiednio: 100,0% i 98,3% wydajności). Największą ilość allo-THF uwolnioną w procesie hydrolizy z połączeń z resztą kwasu glukuronowego i siarkowego uzyskano po inkubacji z buforem octanowym (pH 5,1) w 37°C (przyjęto wydajność tego procesu za 100%). Użycie buforu

fosforanowego zamiast octanowego (w reakcji prowadzonej w 37°C przez 20h) zapewnia w przypadku allo-THF wysoką wydajność hydrolizy przekraczającą 80%. Biorąc pod uwagę wydajności procesów hydrolizy prowadzonych w różnych warunkach dla wszystkich oznaczanych związków, jako optymalne warunki reakcji uznano inkubację w środowisku buforu fosforanowego w temperaturze 37°C przez 20h.

Reakcja steroidów z nitylem kwasu 9-antroilowego była wykorzystywana w celu uzyskania większej oznaczalności fluorescencyjnych pochodnych badanych związków steroidowych [129,167,168]. Ważnym czynnikiem warunkującym selektywność tej reakcji jest temperatura, szczególnie w przypadku zredukowanych w pierścieniu A pochodnych GKS – THF, allo-THF oraz THE. W reakcji prowadzonej w temperaturze 60°C uzyskano pochodne zarówno 21-monoestrowe, ale również 3,21-diestrowe. Przeprowadzenie tej samej reakcji w niższej temperaturze (tj. temperaturze pokojowej) doprowadziło do uzyskania tylko jednego typu produktów, a mianowicie pochodnych 21-monoestrowych [168]. Można zatem wnioskować, że w temperaturze pokojowej acylacja grupy hydroksylowej steroidów zachodzi selektywnie w pozycji 21 łańcucha węglowego GKS. W celu zapewnienia wysokiej wydajności procesu derywatywacji z zastosowaniem 9-AN, konieczna jest obecność katalizatorów reakcji [167]. Z drugiej strony, wykazano, że obecność trzeciorzędowych amin organicznych, m.in. TEA, powodowała spadek szybkości reakcji chlorku kwasu 9-antroilowego ze związkami zawierającymi grupę hydroksylową [171,172]. Istnieje zatem prawdopodobieństwo, że 9-AN będzie reagować podobnie jak chlorek kwasu 9-antroilowego. W badaniach wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej nie zaobserwowano szybszego tworzenia antroilowych pochodnych GKS w reakcji z 9-AN bez użycia katalizatorów, jak to miało miejsce w przypadku chlorku [171]. Przeciwnie, reakcja GKS z 9-AN bez zastosowania TEA i Q jako katalizatorów praktycznie nie zachodziła. Stwierdzono też, że optymalną wydajność procesu derywatywacji wszystkich analitów uzyskuje się przy użyciu mieszaniny zawierającej 10,0% TEA i 0,1% Q (Ryc. 15). Reakcja steroidów z zastosowaniem jedynie 10,0% TEA jako katalizatora przebiegała z niższą wydajnością w przypadku wszystkich badanych związków. Poddano analizie także przebieg procesu derywatywacji w obecności tylko 0,1% Q. Zaobserwowano, że wydajności reakcji w przypadku F, E i allo-THF były porównywalne do sytuacji, gdy jako katalizatora używano mieszaniny TEA i Q. Jednakże wydajności reakcji 9-AN z THF oraz allo-THE+THE w środowisku 0,1% Q były znacznie niższe w porównaniu do derywatywacji z zastosowaniem mieszaniny zasad organicznych. Przyjęto zatem, że użycie mieszaniny 10,0% TEA i 0,1% Q jako katalizatorów jest optymalne w przypadku reakcji derywatywacji GKS przy pomocy 9-AN.

Poddano analizie także wpływ ilości 9-AN (o stężeniu 0,2 mg/ml) na wydajność procesu derywatywacji. Maksymalną wydajność reakcji obserwowano po zastosowaniu 200 µl roztworu 9-AN. Jednakże już po użyciu 150 µl odczynnika derywatywującego uzyskano wydajność reakcji przekraczającą 90% w porównaniu z derywatywacją przebiegającą po zastosowaniu 200 µl 9-AN.

Mając na uwadze zarówno wydajność procesu, ale także bardzo wysoki koszt 9-AN oraz ochronę środowiska, stwierdzono, że zastosowanie 150 μ l odczynnika derywatyzującego jest wystarczające, co potwierdzają parametry walidacyjne metody.

Proces derywatywacji steroidów z użyciem 9-AN wymaga zachowania bezwodnych warunków podczas trwania reakcji [167,168]. Korzystne dla stabilności produktów reakcji jest także ochrona próbek podczas derywatywacji przed dostępem światła [168]. Przy zachowaniu wymienionych warunków, uzyskane w procesie derywatywacji estrowe pochodne zachowują trwałość w temperaturze pokojowej nawet przez tydzień [167]. W niniejszej pracy, analizie poddano dodatkowo wpływ temperatury podczas odparowywania przy łagodnym przepływie azotu po reakcji derywatywacji na stabilność produktów tego procesu. Odparowywanie przy łagodnym przepływie azotu po derywatywacji przeprowadzano w temperaturze 40°C [167] lub też nie określano temperatury odparowywania [168]. W przeprowadzonych przez mnie badaniach stwierdzono natomiast, że obniżenie temperatury odparowywania z 40°C do 30°C zwiększa wydajność procesu derywatywacji o ok. 20%, dlatego odparowywanie po reakcji derywatywacji prowadzono w temp. 30°C.

Opracowaną metodę HPLC-FLD oznaczania endogennych GKS i ich metabolitów w płynach biologicznych poddano pełnej walidacji. Piki pochodzące od antroilowych pochodnych GKS po ekstrakcji z moczu i osocza przedstawione są na chromatogramie (Ryc. 16). Nie uzyskano całkowitego (do linii podstawowej) rozdziału metabolitów kortyzolu: THF i allo-THF, jednak uzyskany rozdział jest wystarczający do analizy poziomów tych związków w płynach biologicznych ($R_s = 1,43$). W opracowanych warunkach nie uzyskano rozdziału pików pochodzących od THE i allo-THE, jednak te związki są najczęściej oznaczane w próbkach biologicznych jako suma. Skuteczny rozdział THE i jego α -izomeru jest aktualnym problemem. Steroidy te udało się częściowo rozdzielić przy użyciu kolumny LiChrospher, jednak czas analizy pojedynczej próbki był stosunkowo długi i wynosił ok. 50 min. (Ryc. 13). Co ciekawe, w literaturze bardzo często jako metabolit E przedstawiany jest tylko THE, z pominięciem allo-THE [24,36,39,45,46,170,151-157,159,165,173]. Powodem takiego uproszczenia może być znacznie niższy poziom allo-THE wydalonego z moczem w porównaniu do THE [174], jednak nie można wykluczyć także trudności w skutecznym rozdziale chromatograficznym obu izomerów. Rozdział tych izomerów nie jest jednak niezbędny do oceny aktywności 11 β -HSD, gdyż parametrem użytecznym w tej ocenie jest stosunek sumy metabolitów F (THF+allo-THF) do sumy metabolitów E (THE+allo-THE) [7,15,24,41,46,60].

Liniowy zakres krzywych wzorcowych endogennych GKS wynosił 5,0 – 1000,0 ng/ml dla F, THF i E oraz 10,0 – 1000,0 ng/ml dla allo-THF i THE+allo-THE. Liniowość krzywych wzorcowych została potwierdzona przy pomocy testu Mandel'a, w którym wartość testowa TV była zawsze mniejsza od F_{kryt} (Tabela 15). Współczynniki korelacji r mieściły się w zakresie od 0,9995 do 0,9999. Wartość

współczynnika b różniła się istotnie od zera tylko w przypadku krzywej wzorcowej dla F, dla pozostałych związków wartości b nie różniły się istotnie od zera, dlatego dla E, THF, allo-THF i THE+allo-THE równania krzywych wzorcowych przyjęły postać $y = ax$. Wykrywalność (LOD) analitów w opracowanych warunkach przy S:N = 3:1 wynosiła 3,0 ng/ml dla GKS w próbkach moczu i osocza. LOQ, wyznaczone z odpowiednią precyzją (%RSD < 16%) oraz dokładnością (błąd < 17%), wynosiło 5,0 ng/ml dla F, THF i E oraz 10,0 ng/ml w przypadku allo-THF i THE+allo-THE (Tabela 16). Oznaczalność GKS na poziomie 5,0 ng/ml dla F, THF i E oraz 10,0 ng/ml dla allo-THF i THE+allo-THE jest wystarczająca do analizy poziomów GKS w osoczu i moczu (zarówno w postaci wolnej, jak i sprzężonej). Opracowana metoda charakteryzuje się ponadto wysoką precyzją, zarówno w ciągu dnia (*intra-day*), jak i między dniami (*inter-day*), odpowiednio: 3,0 – 12,1% (Tabela 18) i 9,2 – 14,0% (Tabela 17). Precyzja między dniami dla oznaczeń F i E została wyznaczona po analizie tych GKS w każdej z trzech możliwych matryc, tzn. w osoczu, moczu bez hydrolizy oraz w moczu po inkubacji z β -glukuronidazą. Przedstawiona wartość jest najwyższą z trzech wartości uzyskanych dla różnych matryc. THF, allo-THF, THE oraz allo-THE były oznaczane tylko w moczu po enzymatycznej hydrolizie, ze względu na to, że prawie w całości są wydalane z moczem w postaci glukuronianów i siarczanów. Poziomy tych związków w postaci wolnej są niemożliwe do oznaczenia przy pomocy zastosowanej metody HPLC. Opracowana metoda jest również odpowiednio dokładna, błąd oznaczeń mieści się w zakresie 0,2 – 15,1% (Tabela 17). Odzysk analitów był wysoki i przekraczał 90% (Tabela 18), co jest zgodne z danymi literaturowymi [164,167]. Podsumowując, można stwierdzić, że opracowana metoda HPLC z detekcją fluorescencyjną spełnia wymogi walidacyjne stawiane metodom analitycznym do oznaczania związków w płynach biologicznych. Dodatkowo, dzięki wysokiej wykrywalności i oznaczalności, do analizy potrzebne są niewielkie objętości płynów biologicznych (0,5 ml moczu i 0,5 ml osocza). Opracowaną metodę HPLC z detekcją fluorescencyjną zastosowano z powodzeniem do oznaczenia poziomów endogennych GKS w płynach biologicznych zdrowych ochotników i chorych z nadciśnieniem tętniczym.

2. Poziomy GKS w płynach biologicznych u ludzi

Badaniami objęto grupę 79 chorych z nadciśnieniem tętniczym będących pod opieką Kliniki Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Szpitala Klinicznego nr 1 Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Grupę kontrolną stanowiło 70 zdrowych ochotników.

Stężenia endogennych F i E w osoczu oznaczono dla 75 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz dla 70 zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabelach 21 i 22 oraz w tabelach 1 i 2 w załączniku 3. Za wartości referencyjne przyjęto zakres 138 – 689 nmol/l [76], choć w literaturze istnieją rozbieżności, jeśli chodzi o prawidłowe zakresy F w osoczu [82,144]. U wszystkich zdrowych ochotników obserwowano stężenia F w osoczu mieszczące się w przyjętym

zakresie referencyjnym (tabela 2 załącznik 3). U trojga pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (nr 41, 47, 73) obserwowano obniżone wartości stężenia F w osoczu, u dwojga chorych (nr 48, 56) stwierdzono poziomy F przekraczające zakres referencyjny (tabela 1 załącznik 3). Zbyt niskie stężenie F w osoczu może być spowodowane niedoczynnością nadnerczy [144] lub zbyt późnym pobraniem próbki krwi do analizy (szczyt wydzielania F, zgodnie z rytmem dobowym, przypada na pierwszą godzinę po porannym przebudzeniu [3-6,8,13,19,21]). Przyczyną zbyt wysokiego poziomu F w osoczu może być zmniejszony metabolizm F, nadczynność nadnerczy (m.in. w zespole Cushinga lub w zespole ekotopowego wydzielania ACTH) [15,16,21,23,41,60,70,144], nadmierna reakcja na czynniki stresowe [2,4-6,8,13,16,19,21,23] lub przyjmowanie preparatów estrogenowych lub doustnych środków antykoncepcyjnych [13,21]. Ze względu na brak próbki osocza dla pacjentów z numerami 14, 33 i 62 nie wykonano oznaczeń endogennych GKS. Ponadto, u pacjentki oznaczonej numerem 25 stwierdzono obecność w próbce związków, które interferowały z analitami i uniemożliwiły prawidłowe oznaczenie stężeń F i E w osoczu.

Na podstawie poziomów F i E w osoczu wyznaczono wartości parametru F/E stosowanego do oceny aktywności 11 β -HSD2. Podwyższone wartości tego parametru (przekraczające wartość referencyjną równą 4,00 [24]) obserwowano u 34 chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz u 29 zdrowych ochotników (tabela 1 i 2 załącznik 3). Uzyskane wyniki znajdują odzwierciedlenie w literaturze, ponieważ wartości parametru F/E wyznaczane dla zdrowych osób często wykraczają poza zakres referencyjny proponowany przez Romer i wsp. [24]. W badaniach przeprowadzonych przez Stewart i wsp. (1999 r.) [155] wśród 36 zdrowych ochotników sklasyfikowanych na podstawie wartości BMI wartości średnie parametru F/E wynosiły od $6,7 \pm 0,6$ do $7,8 \pm 0,6$. Podobnie, Morineau i wsp. (1999 r.) [44] uzyskali wśród 40 zdrowych mężczyzn wyniki F/E w osoczu mieszczące się w przedziale 5,1 – 16,7. Także Dötsch i wsp. (2001 r.) [72] uzyskali w grupie 20 zdrowych ochotników wartości F/E wynoszące $6,0 \pm 0,5$.

Analiza z zastosowaniem testu z χ^2 nie wykazała różnicy pod względem liczebności osób z wartościami F/E nie mieszczącymi się w zakresie referencyjnym pomiędzy grupą chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników ($p > 0,05$). Podobne wyniki uzyskano w analizie logistycznej, gdzie stwierdzono, że wpływ parametru F/E w osoczu na wystąpienie nadciśnienia tętniczego nie jest istotny ($p > 0,05$; OR = 1,14). Nie obserwowano także korelacji pomiędzy wartościami stosunku F/E a wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, ani w grupie kontrolnej. Nie potwierdzono zatem hipotezy, że parametr F/E może być istotnym markerem nadciśnienia tętniczego. Analizując wyniki porównania wartości stężeń F i E w osoczu (test U Manna Whitneya) można stwierdzić brak różnicy w poziomach F w osoczu u osób z nadciśnieniem tętniczym oraz u osób zdrowych (Tabela 23). Jednakże stężenie E w osoczu jest w grupie pacjentów znacząco niższe ($p = 0,0007$) niż u osób zdrowych, co wskazuje na

zmniejszony metabolizm F do E zachodzący przy udziale 11 β -HSD2 u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Ponadto, biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla wszystkich osób objętych badaniem, stwierdzono istnienie znamiennej statystycznie negatywnej korelacji pomiędzy stężeniem E w osoczu a wartością ciśnienia skurczowego (korelacja rangowa Spearmana; $p = 0,0063$; $R_s = -0,2290$; wykres 1 załącznik 5) oraz wartością ciśnienia rozkurczowego ($p = 0,0036$; $R_s = -0,2436$; wykres 2 załącznik 5). Może to wskazywać na fakt, że im mniejsze stężenie E w osoczu, a więc im mniejszy metabolizm F do E przy udziale 11 β -HSD2 (niższa aktywność enzymu), tym wyższe wartości BP. Mediana parametru F/E w grupie kontrolnej jest niższa u zdrowych ochotników w porównaniu do pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, jednak różnica ta nie jest istotna statystycznie. Nie potwierdzono tym samym wyników uzyskanych przez Krall i wsp. (2007 r.) [146], którzy w badaniach przeprowadzonych na dużej grupie mieszkańców Chile wykazali istnienie znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy wartością F/E w badanych populacjach (mediana F/E wynosiła 3,9 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz 3,0 u zdrowych ochotników). Jednak należy podkreślić, że otrzymana w przeprowadzonych przez mnie badaniach wartość F/E u chorych z nadciśnieniem tętniczym wynosząca 3,82 (mediana) była prawie identyczna jak w badaniach Krall i wsp., natomiast wartość mediany dla grupy kontrolnej była wyższa niż w cytowanej pracy (wynosiła 3,64), stąd wynika brak istotnych różnic w badanych populacjach: osób zdrowych i z chorobą nadciśnieniową. Także wcześniejsze badania wykonane przez Carvajal i wsp. (2005 r.) [91] na populacji pochodzącej z Chile wykazały istotnie wyższe wartości parametru F/E u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz z niskim ARO w porównaniu do osób zdrowych. Nie wykazano tej zależności dla pacjentów z nadciśnieniem tętniczym z prawidłowymi wartościami ARO. W badaniach tych obserwowano także korelację pomiędzy wartością F/E oraz poziomem aldosteronu w surowicy oraz ARO [91]. W przeprowadzonych przez mnie badaniach nie stwierdzono istnienia wymienionych korelacji (wykorzystując test Spearmana).

Analiza statystyczna (test Kruskala Wallisa) nie wykazała znamienych statystycznie różnic w poziomach F i E w osoczu oraz wartościach F/E w zależności od klasyfikacji BMI, WHR, WC oraz zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie. Osoby poddane badaniu podzielono na grupy w zależności od wielkości BMI ($\leq 24,99$; 25,00 – 29,99 oraz $\geq 30,00$) oraz w zależności od wartości WHR, WC i zawartości tkanki tłuszczowej (wg wartości referencyjnych podanych w rozdziale 3.1.1. części doświadczałnej, str. 65). Brak różnic w stężeniach F i E oraz wartościach stosunku F/E u osób z różnym BMI, zarówno w grupie pacjentów, jak i w grupie kontrolnej, potwierdza wyniki uzyskane przez Stewarta i wsp. (1999 r.) [155], którzy badając grupę 36 zdrowych ochotników nie zaobserwowali statystycznie istotnych różnic w analizowanych parametrach w zależności od klasyfikacji BMI. Ponadto, w przeprowadzonych przez mnie badaniach stwierdzono brak znaczących różnic w poziomach F w osoczu wśród osób otyłych w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała

oraz u osób ze zwiększoną zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie oraz jej nagromadzeniem w okolicach brzusznych. Potwierdza to dane literaturowe, które wskazują, że pomimo zwiększenia w otyłości wydzielania F, poziomy F w osoczu nie są wyższe u osób otyłych [31,39,59]. Nie stwierdzono także istotnych różnic w poziomach F i E w osoczu oraz wartościach F/E wśród kobiet i mężczyzn, zarówno u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, jak i zdrowych ochotników. Podobne wnioski dotyczące stężenia F w osoczu prezentowane są przez Finken i wsp. [152], którzy nie zaobserwowali różnic w poziomach F w osoczu wśród mężczyzn i kobiet będących w różnych fazach cyklu miesięczkowego.

Ilości UFF i UFE eliminowanych z moczem w ciągu doby oznaczono dla 69 osób z nadciśnieniem tętniczym oraz 70 zdrowych ochotników (tabele 1 i 2 załącznik 4). Za zakres referencyjny dla UFF przyjęto 15,0 – 75,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$ [144], choć istnieją rozbieżności co do tych wartości w literaturze. Lin i wsp. [147] w badaniach przeprowadzonych na grupie 101 zdrowych ochotników uzyskali wyniki mieszczące się w zakresie: UFF 5,0 – 55,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$; UFE 16,0 – 128,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$. Turpeinen i wsp. [149] w analizach obejmujących 28 zdrowe osoby ustalili zakres referencyjny UFF na poziomie 11,0 – 52,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$. Z kolei Odermatt i wsp. (2001 r.) [86] za wartości prawidłowe podają wyniki uzyskane we wcześniejszych badaniach: dla mężczyzn UFF $36,7 \pm 3,3$ $\mu\text{g}/24\text{h}$; UFE $60,9 \pm 5,7$ $\mu\text{g}/24\text{h}$; dla kobiet natomiast UFF $23,9 \pm 3,0$ $\mu\text{g}/24\text{h}$; UFE $48,0 \pm 5,9$ $\mu\text{g}/24\text{h}$. Uzyskane w przeprowadzonych przeze mnie badaniach wyniki dla zdrowych ochotników są zbliżone do powyższych i wynoszą: UFF 8,1 – 71,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$ oraz UFE 15,3 – 205,5 $\mu\text{g}/24\text{h}$. Świadczy to o użyteczności opracowanej metody i poprawności przeprowadzonych analiz, oraz że badane populacje posiadają podobne cechy. Wartości UFF oznaczone w 5 próbkach pochodzących od zdrowych ochotników były niższe od dolnej granicy przyjętego zakresu referencyjnego (15,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$), jednak żadna wartość nie była niższa niż 5,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$ - wartości uznawanej za prawidłową przez Lin i wsp. [147]. Wśród chorych z nadciśnieniem tętniczym u 26 osób obserwowano poziomy UFF poniżej 15,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$. W 3 próbkach (pacjenci z numerami 1, 50 i 76) stężenie wolnego F w moczu było poniżej poziomu oznaczalności metody (< LOQ), stąd niemożliwe było obliczenie UFF w DZM. U żadnego z pozostałych pacjentów z nadciśnieniem tętniczym UFF nie było niższe niż 5,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$. W próbkach pochodzących od trzech chorych (z numerami 20, 26 i 68) oznaczona wartość UFF przekraczała górną granicę zakresu referencyjnego (75,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$). Przypadki pacjentów oznaczonych numerami 20 i 26, u których poziomy GKS oraz parametry oceny aktywności 11β -HSD2 znacznie różniły się od pozostałych wyników w grupie chorych, zostały szczegółowo omówione w dalszej części niniejszego rozdziału.

W przeprowadzonych badaniach notowano wyższe wartości UFF u mężczyzn niż u kobiet, zarówno w grupie kontrolnej (kobiety – 24,8 $\mu\text{g}/24\text{h}$; mężczyźni – 31,2 $\mu\text{g}/24\text{h}$), jak i u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (kobiety – 11,8 $\mu\text{g}/24\text{h}$; mężczyźni – 25,0 $\mu\text{g}/24\text{h}$). Test Kruskala Wallisa wykazał jednak, że statystycznie istotna różnica dotyczy jedynie grupy chorych z nadciśnieniem

tętnicznym ($p = 0,0003$). Odmienne ilości eliminowanego z moczem wolnego F u mężczyzn i kobiet (wyższe u mężczyzn) stwierdzili także Odermatt i wsp. [86] (u osób zdrowych) oraz Litchfield i wsp. [92] (u chorych z nadciśnieniem tętnicznym, zarówno będących na diecie nisko-, jak i wysokosodowej). Finken i wsp. (1999 r.) [152] nie obserwowali różnic w ilości eliminowanego z moczem F wśród kobiet i mężczyzn (20 zdrowych osób rasy kaukaskiej), jednak w badaniach tych nie uwzględniano postaci wolnej (UFF). Analiza z zastosowaniem testu Kruskala Wallisa nie wykazała różnic w ilościach UFF w zależności od klasyfikacji BMI, WHR, WC oraz zawartości tkanki tłuszczowej w grupie chorych z nadciśnieniem tętnicznym oraz u zdrowych ochotników (Tabela 28). Wyniki te są zgodne z danymi prezentowanymi przez Stewarta i wsp. [155].

Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu U Manna Whitneya wykazała istotne różnice w ilościach wolnych GKS wydalanych z moczem pomiędzy chorymi na nadciśnienie tętnicze oraz grupą zdrowych ochotników (Tabela 27). Osoby zdrowe wydalały z moczem większe ilości UFF w porównaniu do pacjentów ($p = 0,0002$), ale także większe ilości UFE ($p = 0,0015$). Ponadto, w grupie zdrowych ochotników stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy ilością UFF w DZM a wartością ciśnienia skurczowego (korelacja rangowa Spearmana; $p = 0,0416$; $R_s = 0,2497$; wykres 3 załącznik 5). Może to potwierdzać znaczący wpływ GKS na wartość BP [21,25,37,117-119]. Nie znaleziono korelacji pomiędzy wartością ciśnienia skurczowego i UFF w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym. Wynik ten potwierdza wcześniejsze wnioski Krall i wsp. (2007 r.) [146], którzy w badaniach na populacji mieszkańców Chile stwierdzili co prawda wyższe wartości UFF eliminowane przez chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętnicznym w porównaniu do osób zdrowych, jednak nie znaleźli korelacji pomiędzy UFF i wartością BP. Wyższe ilości wolnego F w DZM u pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym w porównaniu do zdrowych ochotników wykazali także Litchfield i wsp. (1998 r.) [92].

Na podstawie poziomów wolnych GKS w DZM wyznaczono stosunek UFF/UFE, który jest uważany za najbardziej miarodajny wskaźnik aktywności 11β -HSD2 [15,42,49,55,60]. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach obserwowano wyższą wartość mediany UFF/UFE u osób z nadciśnieniem tętnicznym (0,363) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,330), jednak różnica ta nie jest istotna statystycznie (test U Manna Whitneya; $p > 0,05$). Nie potwierdza to wyników uzyskanych przez Mariniello i wsp. (2005 r.) [93], którzy w badaniach na populacji włoskiej obserwowali statystycznie istotną różnicę pomiędzy wartością UFF/UFE u pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym ($0,80 \pm 0,04$) w porównaniu do osób zdrowych ($0,57 \pm 0,03$). Agarwal i wsp. (2000 r.) [74] stwierdzili występowanie istotnej różnicy w wartości UFF/UFE wśród pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym sodowrażliwym w porównaniu do chorych z nadciśnieniem tętnicznym bez sodowrażliwości, jednak nie badali oni wielkości UFF/UFE u osób zdrowych. Analiza statystyczna (test Kruskala Wallisa) nie wykazała także znamiennej różnicy w wartościach stosunku UFF/UFE w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej

w zależności od klasyfikacji BMI, WHR, WC czy też zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie (Tabela 28). Brak istotnych różnic wartości UFF/UFE w zależności od klasyfikacji BMI uzyskali także Stewart i wsp. [155]. Wartość parametru UFF/UFE (mediana) była wyższa u mężczyzn niż u kobiet zarówno wśród chorych z nadciśnieniem tętniczym, jak i zdrowych ochotników. Różnica ta jednak nie była statystycznie istotna. Podobne wyniki prezentują Odermatt i wsp. [86], którzy nie stwierdzili istotnie statystycznej różnicy w wartości UFF/UFE w zależności od płci, choć uzyskane wyniki są wyższe u mężczyzn niż u kobiet. Finken i wsp. [152] także nie obserwowali różnic w stosunku F/E wydalonych z moczem wśród kobiet i mężczyzn, jednak prezentowane wyniki dotyczą całkowitej ilości F i E (wolnej + sprzężonej z kwasem glukuronowym i siarkowym) w DZM. Wykazano istotną zależność pomiędzy wartością stosunku UFF/UFE a wartością ciśnienia skurczowego w grupie zdrowych ochotników (korelacja rangowa Spearmana; $p = 0,0374$; $R_s = 0,2548$; wykres 4 załącznik 5). Korelacja ta może świadczyć o znaczącym wpływie aktywności 11β -HSD2 (której wykładnikiem jest właśnie stosunek UFF/UFE) na wartości BP. Zależności tej nie stwierdzono jednak w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Wśród chorych z nadciśnieniem tętniczym wartość UFF/UFE przekraczała przyjęty zakres referencyjny ($< 0,600$ [24]) u 11 osób (wyniki te mieściły się w zakresie $0,635 - 2,962$), w grupie zdrowych ochotników u 5 osób stwierdzono nieznacznie podwyższoną wartość tego stosunku (najwyższa zaobserwowana wartość w grupie kontrolnej wynosiła $0,718$; tabele 1 i 2 załącznik 4). Analiza χ^2 ($\alpha = 0,05$) nie wykazała istotnych różnic w liczebności osób z nieprawidłową wartością UFF/UFE w grupie pacjentów i w grupie kontrolnej, jednak uzyskany wynik był na granicy istotności statystycznej ($p = 0,07$). Analiza logistyczna także nie wykazała istotnego zwiększenia ryzyka wystąpienia nadciśnienia tętniczego przy wzroście parametru UFF/UFE o jednostkę (Tabela 34). Wyniki te nie potwierdzają założenia, że parametr UFF/UFE może być istotnym markerem nadciśnienia tętniczego.

W przeprowadzonych badaniach oznaczono również całkowite ilości metabolitów F i E w DZM (suma metabolitów F: THF+allo-THF oraz suma metabolitów E: THE+alloTHE) w próbkach pochodzących od 72 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz 70 zdrowych ochotników (tabele 1 i 2 załącznik 4). Uzyskane ilości metabolitów F i E w DZM są zgodne z danymi prezentowanymi w literaturze [86,152,155,165], co dodatkowo potwierdza użyteczność opracowanej metody HPLC oznaczania GKS w płynach biologicznych oraz poprawność wykonanych analiz. Test Kruskala Wallisa wykazał istnienie istotnych różnic w ilościach wydalanych z moczem metabolitów GKS w zależności od płci. Obserwowano większe ilości sumy metabolitów F oraz E w DZM u mężczyzn niż u kobiet, zarówno wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, jak i zdrowych ochotników (Tabele 25 i 26). Podobne wyniki uzyskali Finken i wsp. [152], którzy w badaniach na grupie zdrowych ochotników obserwowali istotnie wyższe poziomy zredukowanych metabolitów F i E u mężczyzn niż u kobiet. Ponadto, analogiczne zależności w ilości eliminowanych z moczem w ciągu doby tetrahydro-

allo-tetrahydro-metabolitów F i E w zależności od płci prezentowane są przez Odermatt i wsp. [86]. W przeprowadzonych przez mnie badaniach wykazano także istnienie korelacji (rangowa korelacja Spearmana) pomiędzy wartością BMI a ilością metabolitów F (THF+alloTHF) i E (THE+allo-THE) w DZM. Zależności te obserwowano w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0074$ i $R_s = 0,3129$ dla zależności BMI – suma metabolitów F oraz $p = 0,0009$ i $R_s = 0,3841$ dla zależności BMI – suma metabolitów E; wykresy 5 i 6 załącznik 5), jak również w grupie kontrolnej (odpowiednio: $p = 0,0001$ i $R_s = 0,4522$ oraz $p < 0,0001$ i $R_s = 0,5220$; wykresy 7 i 8 załącznik 5). Podobne wyniki prezentują Stewart i wsp. [155], którzy obserwowali większe ilości zredukowanych metabolitów F i E w DZM w grupach zdrowych osób z wzrastającymi wartościami BMI. Istotnie statystycznie różnice wykazali oni jednak tylko dla ilości metabolitów E w DZM [155]. W badaniach wykonanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stwierdzono również występowanie znaczącej korelacji (korelacja rangowa Spearmana) pomiędzy wartościami WHR oraz WC a ilością metabolitów GKS wydalonych z moczem w ciągu doby. W grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym od wartości WHR zależała zarówno ilość THF+allo-THF ($p = 0,0356$; $R_s = 0,2840$; wykres 9 załącznik 5), jak i THE+allo-THE ($p = 0,0170$; $R_s = 0,3206$; wykres 10 załącznik 5). Podobne zależności obserwowano w grupie kontrolnej, odpowiednio: $p = 0,0028$ i $R_s = 0,3596$ oraz $p < 0,0001$ i $R_s = 0,4920$ (wykresy 11 i 12 załącznik 5). Wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym stwierdzono istotną zależność pomiędzy wartością WC w cm a ilością sumy metabolitów F w DZM ($p = 0,0270$; $R_s = 0,2981$; wykres 13 załącznik 5) oraz sumą metabolitów E w DZM ($p = 0,0110$; $R_s = 0,3401$; wykres 14 załącznik 5). W grupie kontrolnej także obserwowano powyższe korelacje, odpowiednio: $p < 0,0001$ i $R_s = 0,4875$ oraz $p < 0,0001$ i $R_s = 0,5582$ (wykresy 15 i 16 załącznik 5). Powyższe zależności mogą być dowodem na istnienie zwiększonej sekrecji F w otyłości, która jednak nie objawia się zwiększonymi poziomami F w osoczu (w niniejszych badaniach nie obserwowano zależności pomiędzy F w osoczu a BMI, WC czy WHR), ale ma odzwierciedlenie w zwiększonej ilości metabolitów F eliminowanych z moczem [31,39,59].

Większe ilości metabolitów F obserwowano w DZM u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (2,843 mg/24h) w porównaniu do zdrowych ochotników (2,374 mg/24h), a różnica ta była znamienna statystycznie (test U Manna Whitneya; $p = 0,0142$). Ilości THE+alloTHE nie różniły się istotnie pomiędzy grupą pacjentów i grupą kontrolną (Tabela 27). Może to być dowodem na zwiększone ilości F w organizmie chorych z nadciśnieniem tętniczym, co jest wynikiem zmniejszonego metabolizmu F do E przy udziale 11β -HSD2. Ponadto, w grupie zdrowych ochotników obserwowano istnienie zależności pomiędzy ilością eliminowanych z moczem metabolitów F a BP. Istnienia tych korelacji nie stwierdzono w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym. Wraz ze zwiększeniem THF+allo-THF obserwowano w grupie kontrolnej wyższe wartości ciśnienia skurczowego (korelacja rangowa Spearmana; $p = 0,0016$; $R_s = 0,3777$; wykres 17 załącznik 5) oraz ciśnienia rozkurczowego ($p = 0,0033$;

$R_s = 0,3539$; wykres 18 załącznik 5). Zależność ta może być dowodem na hipertensyjne działanie GKS w organizmie [21,25,37,92,117-119].

Na podstawie poziomów metabolitów F i E w DZM wyznaczono stosunek (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) – parametr odzwierciedlający aktywność 11 β -HSD2. Jako zakres referencyjny przyjęto wartości < 1,40 proponowaną przez Romer i wsp. [24]. Także w przypadku tego parametru istnieją rozbieżności co do wartości prawidłowych wśród różnych autorów: Odermatt i wsp. [86] przyjmują wartości 0,66 – 1,44; Rogoff i wsp. [76] 0,65 – 1,45; Lavery i wsp. [87] 0,70 – 1,30; Wilson i wsp. [82] 0,54 – 1,95. Wartość (mediana) parametru (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) była istotnie wyższa u chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do zdrowych ochotników ($p < 0,0001$), co wskazuje na obniżoną aktywność wymienionego enzymu w grupie pacjentów. Wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym obserwowano wartości (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) przekraczające 1,40 w próbkach pochodzących od 16 osób, w grupie kontrolnej, tylko u 1 osoby oznaczona wartość tego parametru nie mieściła się w zakresie referencyjnym (tabele 1 i 2 załącznik 4). Test dokładny Fishera wykazał istotną różnicę w liczebności osób z wartością (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) przekraczającą zakres referencyjny w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,0001$). Analiza logistyczna dodatkowo potwierdziła, że parametr ten obrazujący aktywność 11 β -HSD2 może być istotnym wskaźnikiem nadciśnienia tętniczego. Wzrost wartości stosunku (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) o jednostkę powoduje ponad 11-krotne zwiększenie ryzyka wystąpienia nadciśnienia tętniczego (Tabela 34). Podwyższone wartości (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) obserwowano u pacjentów ze stwierdzonym AME, u których 11 β -HSD2 ma mniejszą aktywność lub w ogóle nie wykazuje aktywności [44,76,82,86,87]. Uzyskane w przeprowadzonych przeze mnie badaniach świadczą o zaburzeniach w funkcjonowaniu 11 β -HSD2 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do zdrowych ochotników. Ponadto, w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym stwierdzono istotną zależność pomiędzy wartością parametru (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE), a więc pośrednio pomiędzy aktywnością 11 β -HSD2, a wartością ciśnienia skurczowego ($p = 0,0307$; $R_s = 0,2548$; wykres 19 załącznik 5).

W przeprowadzonych badaniach wyodrębniono dwa przypadki pacjentów (oznaczonych numerami 2 i 26), u których zaobserwowano poziomy endogenny GKS i parametry oceny 11 β -HSD2 znacząco odbiegające od wartości referencyjnych (przedstawione w tabelach 30 i 31 oraz na rycinie 23). U pacjenta nr 20, który nigdy wcześniej nie leczył się z powodu nadciśnienia tętniczego, stwierdzono w badaniu przedmiotowym podwyższoną wartość BP, BMI wskazujące na nadwagę, a także wartość WHR informującą o znacznej akumulacji tkanki tłuszczowej w okolicy brzusznej. Dwa tygodnie przed przyjęciem do Kliniki rozpoznano u tego pacjenta cukrzycę typu 2. Zaordynowano przyjmowanie insuliny oraz metforminy w celu kontroli glikemii. ECHO serca wykazało cechy

przerostu lewej komory, co jest częstym następstwem przewlekłych wysokich wartości BP [99,101,103]. W wykonanych badaniach laboratoryjnych stwierdzono hipokaliemię oraz hipernatremię. Niski poziom potasu w krwi oraz podwyższone BP sugerowały hiperaldosteronizm [97]. Kolejne badania wykazały poziom aldosteronu w surowicy mieszczący się w dolnej granicy zakresu referencyjnego oraz prawidłową wartość ARO. Stosunek ARO do poziomu aldosteronu także był niski (wynosił 8,95), co dodatkowo (obok oznaczonego poziomu aldosteronu) wykluczało pierwotny hiperaldosteronizm (zespół Conna) [138,144]. Badanie USG jamy brzusznej wykluczyło zmiany w nadnerczach. W celu obniżenia BP zastosowano terapię złożoną z ACE-I ramiprilu, blokera receptorów β_1 -adrenergicznych karwedilolu, leku moczopędnego furosemidu oraz antagonisty receptorów dla aldosteronu - spironolaktonu. Dodatkowo, w celu złagodzenia hipokaliemii zalecono przyjmowanie preparatu zawierającego chlorek potasu. Oznaczono stężenie F w osoczu (próbki krwi pobrano w godzinach porannych), uzyskany wynik 683,1 nmol/l mieścił się w górnej granicy zakresu referencyjnego 138 – 689 nmol/l [76]. Ponadto, stosunek F/E w osoczu (równy 13,12) ponad trzykrotnie przewyższał wartość referencyjną wynoszącą 4,00 [24], co wskazywało na nadmierne nagromadzenie F w organizmie. Ilości UFF i UFE w DZM wielokrotnie przewyższały wyniki uzyskane w grupie zdrowych ochotników oraz zakresy referencyjne dostępne w literaturze [144,147]. Także wysoka wartość stosunku UFF/UFE wskazywała na nieprawidłowości w gospodarce GKS, co dodatkowo potwierdzały bardzo duże ilości metabolitów F i E wydalonych w DZM oraz parametr $(THF+allo-THF)/(THE+allo-THE)$. Obliczone na podstawie poziomów endogennych GKS parametry służące do oceny aktywności 11β -HSD2 wskazywały na możliwe zaburzenia w funkcji tego enzymu. Próbkę DNA pacjenta została poddana reakcji PCR w celu namnożenia fragmentów genu *HSD11B2* oraz ich późniejszego sekwencjonowania pozwalającego na ustalenie występowania mutacji w regionie kodującym tego genu. Przeprowadzona analiza genotypu nie wykazała jednak żadnych zmian w sekwencji nukleotydów w badanych fragmentach genu *HSD11B2*, w których zawierał się cały region kodujący białko enzymatyczne oraz odcinki UTR. Z tego względu można przypuszczać, że zmniejszenie aktywności 11β -HSD2 nastąpiło na skutek spożycia egzogennych substancji będących inhibitorami tego enzymu, tym bardziej, że notowane były przypadki występowania objawów AME np. po spożyciu preparatów lukrecji lub dużych ilości soku grejpfrutowego [95,97]. Pacjent przyjmował także furosemid, który jest słabym inhibitorem 11β -HSD2 [95,96], nie można więc wykluczyć jego hamującego wpływu na wymieniony enzym. Możliwy jest też synergizm hamującego wpływu na 11β -HSD2 furosemidu i przyjmowanych w diecie innych składników, np. naryngeniny z soku grejpfrutowego lub polifenoli zawartych w herbacie [96]. Przymywanie spironolaktonu, który jest blokiem receptorów MR nie spowodowało zniesienia objawów AME, co potwierdza fakt, że lek ten jest skuteczny w przypadku AME w bardzo wysokich dawkach [15,24,25,38,41,42,60,69,71]. Bardzo duże ilości UFF oraz THF i allo-THF w DZM w porównaniu do zakresów referencyjnych

i wartości uzyskanych dla zdrowych ochotników wskazują na zwiększone wydzielanie F. Znacznie wyższe ilości wydanych UFE oraz THE i allo-THE mogą sugerować wysycenie enzymu metabolizującego F, skutkujące podwyższonymi wartościami parametrów oceniających jego aktywność. Taka sytuacja ma miejsce między innymi w zespole ektopowego wydzielania ACTH, gdzie na skutek zwiększonego wydzielania ACTH dochodzi do nadmiernej sekrecji F. Wtedy, pomimo prawidłowej funkcji 11 β -HSD2 (na którą nie wpływa bezpośrednio ACTH) dochodzi do wysycenia enzymu, a co za tym idzie nie jest możliwe unieczynnienie całej puli wydzielonego F [15,41,60,70].

Drugi przypadek dotyczył 54-letniego mężczyzny (oznaczonego numerem 26) z rozpoznaniem zespołem Conna (pierwotnym hiperaldosteronizmem), nadciśnieniem tętniczym, chorobą niedokrwienną serca oraz hipercholesterolemią. W przeprowadzonym badaniu przedmiotowym stwierdzono podwyższone wartości BP, a także nieznacznie podwyższone BMI, WHR oraz zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie. Pacjent zażywał leki hipotensyjne: ACE-I cilazapril, bloker kanałów wapniowych amlodypinę, bloker receptorów β_1 -adrenergicznych bisoprolol, antagonistę receptorów α_1 -adrenergicznych doksazosynę, antagonistę receptora MR eplerenon. Ponadto, w celu poprawy profilu lipidowego oraz profilaktyki zawału mięśnia sercowego pacjent przyjmował atorwastatinę oraz kwas acetylosalicylowy. Wykonane badania laboratoryjne wykazały hipercholesterolemię, prawidłowy poziom jonów sodu w organizmie oraz poziom potasu mieszczący się w dolnej granicy zakresu referencyjnego. W celu kontroli kaliemii zalecono przyjmowanie chlorku potasu. Badanie USG jamy brzusznej wykazało guza nadnerczy, a przekraczające zakres referencyjny stężenie aldosteronu w surowicy potwierdzało rozpoznanie zespołu Conna [138,144]. Badanie EKG metodą Holtera ujawniło liczne epizody bradykardii, dlatego obniżono dawkę bisoprololu. Oznaczenia poziomów GKS w osoczu i moczu potwierdziły nadmierną produkcję kortykosteroidów przez nadnercza. Stężenie F w osoczu (próbka pobrana w godzinach porannych) mieściło się w zakresie referencyjnym, choć było wyższe niż przeciętnie uzyskiwane wyniki u osób zdrowych, i wynosiło 513,7 nmol/l. Także stężenie E w osoczu było porównywalne ze średnimi wartościami uzyskiwanymi u zdrowych ochotników. Stosunek F/E w osoczu był podwyższony i wynosił 5,81. Ilość UFF wydalaną w DZM była kilkakrotnie wyższa niż górna granica wartości referencyjnych i wynosiła 271,71 μ g/24h, natomiast ilość UFE mieściła się w zakresie uzyskiwanym w grupie kontrolnej. Parametr UFF/UFE znacznie przewyższał wartość prawidłową i wynosił 2,962. Poziomy tetrahydro- i allo-tetrahydro-metabolitów GKS w DZM były porównywalne z wynikami u osób zdrowych, jednak stosunek (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) był podwyższony i wynosił 1,81. Także analiza genu *HSD11B2* nie wykazała zmian w sekwencji nukleotydowej. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że pomimo wysokich wartości parametrów oceniających aktywność 11 β -HSD2 funkcja tego enzymu jest zachowana, o czym świadczą porównywalne z wynikami u osób zdrowych poziomy E oraz jego metabolitów. Metabolizm F przebiega zatem prawidłowo, a podwyższone wartości parametrów F/E, UFF/UFE

i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) wynikają z wysycenia enzymu, przez co niemożliwe jest unieczynnienie F produkowanego przez nadnercza w nadmiernej ilości.

3. Analiza struktury genu *HSD11B2*

W procesie sekwencjonowania fragmentów genu *HSD11B2* wyodrębniono 6 różnych zmian w sekwencji nukleotydów, wszystkie miały charakter SNP (Ryc. 24 – 29). Pięć z sześciu zaobserwowanych zmian znajduje się w bazie Ensembl: c.468C>A = rs5479; c.534G>A = rs45483293; c.1164C>T = rs45578842; c.*197C>T = rs56406870; c.*465A>G = rs72650128 [67]. Ponadto, mutacja c.534G>A została zaobserwowana w badaniach prowadzonych zarówno w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym, jak i z niewydolnością nerek [73,75,79,83,93]. W badaniach wykonanych na dużej populacji włoskiej wyodrębniono także mutację c.468C>A i wykazano częstsze jej występowanie u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób zdrowych [93]. Trzy z zaobserwowanych w przeprowadzonych przez mnie badaniach mutacji (c.591 C>A, c.1164C>T oraz c.*465A>G) występowały u pojedynczych osób (odpowiednio: zdrowy ochotnik z numerem 133, pacjent z numerem 17 oraz pacjent z numerem 66). Pozostałe trzy (c.468C>A, c.534G>A oraz c.*197C>T) zostały znalezione w próbkach pochodzących kolejno od 6 (5 pacjentów i 1 zdrowego ochotnika), 6 (5 pacjentów i 1 zdrowego ochotnika) oraz 9 osób (7 pacjentów i 2 zdrowych ochotników). Co ciekawe, zmiany c.468C>A i c.534G>A zostały zaobserwowane w próbkach pochodzących od tych samych osób, nie wyodrębniono natomiast żadnej osoby posiadającej tylko jedną z dwu wymienionych SNP. Podobne wyniki prezentują Mariniello i wsp. [93], którzy w badaniach obejmujących 292 chorych na nadciśnienie tętnicze oraz 163 zdrowych ochotników wyodrębnili tylko 1 osobę, u której zaobserwowano heterozygotyczny genotyp c.468CA bez współistniejącego genotypu c.534GA. Natomiast występowanie obu heterozygotycznych zmian c.468CA i c.534GA obserwowano u 26 chorych z nadciśnieniem tętniczym i 4 zdrowych ochotników. W omawianych badaniach w populacji włoskiej stwierdzono występowanie polimorfizmu c.534GA bez stwierdzonej zmiany w pozycji c.468 u 6 osób z grupy zdrowych ochotników (5%).

Do analizy restrykcyjnej wybrano 2 najczęściej pojawiające się mutacje (c.534 oraz c.*197). Nie udało się znaleźć enzymu restrykcyjnego do analizy charakteru zmiany (homo- lub heterozygotycznej) oraz częstości występowania transwersji C>A w pozycji c.468. W analizie PCR-RFLP nie znaleziono dodatkowych próbek ze zmianą c.534G>A wśród tych, które nie zostały wcześniej poddane sekwencjonowaniu. U wszystkich osób zaobserwowana w procesie sekwencjonowania mutacja w pozycji c.534 miała charakter heterozygotyczny. W badaniach przeprowadzonych przez Mariniello i wsp. [93] oraz przez Smolenicka i wsp. [83] także wszystkie zaobserwowane zmiany w pozycji c.534 miały charakter heterozygotyczny. Występowanie homozygotycznego genotypu c.534AA zostało stwierdzone u pojedynczych zdrowych osób w badaniach przeprowadzonych przez Melander i wsp.

[73] oraz Brand i wsp. [79]. W przypadku c.*197C>T znaleziono 5 próbek (nie poddanych procesowi sekwencjonowania) pochodzących od zdrowych ochotników zawierających badaną zmianę nukleotydów. Także w tym przypadku u wszystkich osób zmiana c.*197C>T miała charakter heterozygotyczny. W obu badanych populacjach i dla obu analizowanych mutacji nie obserwowano odchyień od prawa równowagi Hardy-Weinberga (Tabela 33). Przeprowadzono test dokładny Fishera w celu porównania dystrybucji alleli oraz poszczególnych genotypów w populacjach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników.

Obserwowano częstsze występowanie allelu c.534A w populacji chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób zdrowych (odpowiednio 3,3% i 0,7%, Tabela 32), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$). Także heterozygotyczny genotyp c.534GA pojawiał się z większą częstością u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym niż u zdrowych ochotników (odpowiednio u 6,6% i 1,4%). Jednakże, podobnie jak w przypadku allelu c.534A, różnica ta nie była znamienna statystycznie ($p > 0,05$). Analiza logistyczna także nie wykazała istotnego wpływu wystąpienia heterozygotycznego genotypu c.534GA na wystąpienia nadciśnienia tętniczego (Tabela 34). Podobne wyniki dotyczące rozmieszczenia heterozygotycznego genotypu u chorych z nadciśnieniem tętniczym uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Melander i wsp. (2000 r.) [73]. W populacji osób pochodzących ze Szwecji stwierdzono występowanie genotypu c.534GA u 6,9% pacjentów, natomiast w grupie kontrolnej heterozygotyczny genotyp pojawiał się częściej (różnica istotna statystycznie) i dotyczył 12,2% populacji. Zmutowany allel c.534A pojawiał się wśród przebadanych Szwedów częściej u zdrowych osób (6,1% populacji) niż u chorych z nadciśnieniem tętniczym (3,8%), jednak nie wykazano istotności statystycznej dla tej różnicy [73]. Również w badaniach przeprowadzonych we Francji przez Brand i wsp. (1998 r.) [79] nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w częstości występowania heterozygotycznego genotypu c.534GA u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników (wszystkie osoby były rasy kaukaskiej). W grupie kontrolnej genotyp ten pojawiał się z częstością 9,9%. Pacjenci z nadciśnieniem tętniczym objęci badaniem pochodzili z dwu różnych projektów BROHTA i PEGASE. Wśród tych chorych odpowiednio 8,9% i 8,8% populacji było heterozygotami posiadającymi genotyp c.534GA. Allel c.534A występował częściej u osób zdrowych (5,3% populacji) niż u chorych z nadciśnieniem tętniczym z grup BROHTA i PEGASE (odpowiednio 4,5% i 4,4%), jednak również te różnice nie były istotne statystycznie [79]. W badaniach prezentowanych przez Smolenicka i wsp. (1998 r.) [83] stwierdzono występowanie zmutowanego allelu c.534A u 8,6% zdrowych ochotników (10 ze 116 osób). Analizę genotypu c.534 przeprowadzono także u 25 osób chorych na cukrzycę typu 2, 41 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz 107 osób ze schyłkową niewydolnością nerek, w tym 46 pacjentów dializowanych oraz 61 pacjentów po przeszczepie nerki. Badanie przeprowadzono na terenie Szwajcarii, w populacji kaukaskiej. Wykazano występowanie allelu c.534A u 8,6% zdrowych

ochotników, 4,0% pacjentów z cukrzycą, 4,8% chorych na nadciśnienie tętnicze, 4,3% chorych z niewydolnością nerek poddawanych dializom oraz u 18,0% pacjentów po przeszczepie nerki. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w występowaniu zmutowanego allelu u osób z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Wykazano natomiast statystycznie istotną zależność pomiędzy dystrybucją analizowanego allelu pomiędzy pacjentami po przeszczepie nerki w odniesieniu do grupy kontrolnej [83]. Wyników tych nie potwierdzili Zaehner i wsp. (2000 r.) [75] w badaniach przeprowadzonych również na terenie Szwajcarii i obejmujących zdrowych ochotników oraz pacjentów z niewydolnością nerek (wyodrębniono grupę osób poddawanych dializom oraz grupę po przebytych przeszczepie nerki). Stwierdzono występowanie allelu c.534A u 11% osób zdrowych oraz 13% chorych z niewydolnością nerek (9% pacjentów dializowanych i 16% pacjentów po przeszczepie nerki) [75]. Ciekawe wyniki uzyskali Mariniello i wsp. (2005 r.) we wspomnianych wcześniej badaniach w populacji włoskiej [93], którzy wykazali istnienie znamiennej statystycznie różnicy w częstości występowania heterozygotycznego genotypu c.468CA wśród chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym (9% populacji) w porównaniu do osób zdrowych (3% populacji). Pomimo częstszego występowania także heterozygotycznego genotypu c.534GA (9% pacjentów i 7% zdrowych ochotników), nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie. Znamienna statystycznie różnica dotyczyła jednak występowania połączonych genotypów c.468CA i c.534GA (9% chorych z nadciśnieniem tętniczym i 2,4% osób z grupy kontrolnej) [93]. Wnioski te są tym bardziej ciekawe, że także w wynikach uzyskanych w przeprowadzonych przez mnie badaniach u wszystkich osób posiadających zmianę w pozycji c.468 stwierdzono występowanie mutacji w pozycji c.534. Jednakże, w celu potwierdzenia uzyskanych przez Mariniello i wsp. [93] wyników, należało by jednak zbadać charakter zmiany w pozycji c.468 genu *HSD11B2* oraz sprawdzić jej obecność w próbkach, które nie były poddawane sekwencjonowaniu.

Allel c.*197T pojawiał się z podobną częstością u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej (wynoszącą odpowiednio 4,6% i 5,0%). W obu badanych populacjach obserwowano podobne rozmieszczenie heterozygotycznego genotypu c.*197CT (0,092 w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz 0,100 u zdrowych ochotników; Tabela 32). Test dokładny Fishera wykluczył związek obecności zmutowanego allelu c.*197T z występowaniem nadciśnienia tętniczego. W analizie logistycznej także nie wykazano istotnego wpływu występowania heterozygotycznego genotypu c.*197CT na pojawienie się nadciśnienia tętniczego (Tabela 34). Brak jednak danych literaturowych dotyczących wymienionej mutacji w genie *HSD11B2* i jej ewentualnego znaczenia klinicznego.

Analiza z zastosowaniem testu Kruskala Wallisa nie wykazała istotnych różnic pomiędzy stężeniami F i E w osoczu, ilością UFF, UFE oraz sumą metabolitów F i E w DZM, a także parametrami oceniającymi aktywność 11 β -HSD2 w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych

ochotników. Można zatem wnioskować, że analizowane SNP nie wpływają na zmianę aktywności enzymu, tym bardziej, że mutacja w pozycji c.534 nie powoduje zmiany aminokwasu w białku (mutacja synonimowa), natomiast zmiana w pozycji c.*197 znajduje się w regionie 3'UTR, a więc w części genu, która nie koduje białka. Wyniki tej analizy odzwierciedlające związek genotypu z fenotypem przedstawiono w tabelach 35 i 36.

Tabela 35. Poziomy GKS oraz parametry oceny aktywności 11 β -HSD2 wśród osób z genotypem prawidłowym c.534GG oraz heterozygotycznym genotypem c.534GA w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników.

	pacjenci z nadciśnieniem tętniczym			zdrowi ochotnicy		
	c.534GG (n=71)	c.534GA (n=5)	<i>p</i>	c.534GG (n=69)	c.534GA (n=1)	<i>p</i>
F _{os} [nmol/l]	293,7	296,8	NS	342,1	319,4	NS
E _{os} [nmol/l]	74,9	85,6	NS	90,4	94,9	NS
F/E	3,82	3,76	NS	3,65	3,38	NS
UFF [μ g/24h]	21,4	13,3	NS	29,3	27,5	NS
UFE [μ g/24h]	63,8	40,6	NS	78,1	140,6	NS
UFF/UFE	0,354	0,376	NS	0,331	0,196	NS
THF+allo-THF [mg/24h]	2,856	2,516	NS	2,353	4,004	NS
THE+allo-THE [mg/24h]	3,008	2,252	NS	2,914	6,508	NS
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$	1,00	0,84	NS	0,73	0,62	NS

Tabela 36. Poziomy GKS oraz parametry oceny aktywności 11 β -HSD2 wśród osób z genotypem prawidłowym c.*197CC oraz heterozygotycznym genotypem c.*197CT w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników.

	pacjenci z nadciśnieniem tętniczym			zdrowi ochotnicy		
	c.*197CC (n=69)	c.*197CT (n=7)	<i>p</i>	c.*197CC (n=63)	c.*197CT (n=7)	<i>p</i>
F _{os} [nmol/l]	304,9	258,0	NS	331,5	392,0	NS
E _{os} [nmol/l]	77,4	72,5	NS	90,4	91,3	NS
F/E	3,80	3,82	NS	3,60	4,52	NS
UFF [μ g/24h]	18,8	23,3	NS	30,1	20,4	NS
UFE [μ g/24h]	61,2	48,1	NS	82,9	74,1	NS
UFF/UFE	0,370	0,335	NS	0,368	0,279	NS
THF+allo-THF [mg/24h]	2,865	2,176	NS	2,499	1,687	NS
THE+allo-THE [mg/24h]	3,018	2,538	NS	3,069	1,938	NS
$\frac{THF + allo - THF}{THE + allo - THE}$	1,00	0,82	NS	0,72	0,77	NS

4. Podsumowanie

Nadciśnienie tętnicze pierwotne, a więc bez ustalonej etiologii, dotyczy ponad 90% pacjentów z chorobą nadciśnieniową. Wielu badaczy sugeruje, że nawet 30% spośród tych przypadków ma podłoże w zaburzeniach gospodarki glikokortykosteroidowej [92,117]. Za kluczowy enzym uznaje się tu 11β -HSD2, który katalizuje unieczynnienie F do E w tkankach docelowych dla aldosteronu i chorni MR przed dostępem F. Defekt tego enzymu leży u podstaw dziedzicznej postaci nadciśnienia tętniczego – AME. Postulowany jest też fakt, że łagodniejsze zaburzenia 11β -HSD2, prowadzące do częściowej utraty aktywności, mogą być przyczyną powstawania nadciśnienia tętniczego.

Pierwszym czynnikiem obrazującym aktywność 11β -HSD2, wskazującym na możliwość wystąpienia nadciśnienia tętniczego, jest według danych literaturowych stosunek F/E w osoczu, którego prawidłowa wartość wynosi 4,00. Jednak przeprowadzone badania nie potwierdziły tego założenia. Bardziej miarodajnym parametrem oceniającym aktywność 11β -HSD2 wydawał się być UFF/UFE w DZM, którego wartość przy prawidłowej funkcji wymienionego enzymu nie powinna przekraczać 0,600. Jednak i w tym przypadku nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w wielkości tego parametru pomiędzy grupą chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz zdrowych ochotników. Znacznie bardziej różnicującym czynnikiem był stosunek $(\text{THF}+\text{allo-THF})/(\text{THE}+\text{allo-THE})$ w DZM. W tym przypadku różnice w wartościach tego parametru pomiędzy pacjentami z chorobą nadciśnieniową i grupą kontrolną są istotne statystycznie. Za prawidłowe uznaje się wartości tego parametru nie przekraczające 1,40. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że liczba osób z wartością parametru $(\text{THF}+\text{allo-THF})/(\text{THE}+\text{allo-THE})$ powyżej wartości referencyjnej jest znacznie większa w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym niż wśród zdrowych ochotników (14 : 1). Przeprowadzona analiza logistyczna w celu ustalenia jak aktywność 11β -HSD2 wpływa na występowanie nadciśnienia tętniczego wskazuje na istotny wpływ parametru $(\text{THF}+\text{allo-THF})/(\text{THE}+\text{allo-THE})$ na zwiększenie ryzyka pojawienia się choroby. Potwierdzeniem tego jest wysoka wartość OR na poziomie 11,34, która wskazuje na ponad 11-krotny wzrost ryzyka zachorowania na nadciśnienie tętnicze przy zmianie wymienionego parametru o jedną jednostkę.

Pomimo istnienia wskaźników potwierdzających zaburzenia w metabolizmie endogenego F u chorych z nadciśnieniem tętniczym, uzyskane rezultaty nie do końca znalazły odzwierciedlenie w ich genotypie. Co prawda stwierdzono większą liczbę przypadków z heterozygotycznym genotypem c.534GA wśród osób z chorobą nadciśnieniową w porównaniu z grupą kontrolną, jednak analiza statystyczna nie potwierdziła istotnej statystycznie większej częstości pojawiania się zmutowanego allelu c.534A w nadciśnieniu tętniczym. Ponadto, dane określające fenotyp u osób z heterozygotycznym genotypem nie były istotnie różne w porównaniu do osób, u których obserwowano genotyp prawidłowy (c.534GG).

Przyczyną obserwowanych różnic w metabolizmie F u chorych z nadciśnieniem tętniczym i zdrowych ochotników jest zmniejszona aktywność 11 β -HSD2 w chorobie nadciśnieniowej. Jednak ta zmniejszona aktywność enzymu u pacjentów nie wynika z występowania mutacji w genie kodującym białko prowadzących do nieprawidłowej sekwencji aminokwasowej, lecz może mieć podłoże epigenetyczne. Istnienie w regionie promotorowym oraz w eksonie 1 genu *HSD11B2* wysp CpG wskazuje na możliwość metylacji DNA, której wystąpienie skutkuje utrudnionym przyłączeniem czynników transkrypcyjnych i zmniejszoną ekspresją genu, a więc powstaniem mniejszej ilości białka enzymatycznego [68].

VIII WNIOSKI

1. Opracowana metoda HPLC-FLD spełnia wymogi walidacyjne stawiane metodom analitycznym i może być stosowana do oznaczania poziomów endogennych GKS w płynach biologicznych u ludzi.
2. Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań nie wskazują, aby stosunek F/E w osoczu oraz UFF/UFE w moczu były miarodajnymi markerami nadciśnienia tętniczego.
3. Parametr $(\text{THF} + \text{allo-THF}) / (\text{THE} + \text{allo-THE})$ jest znaczącym wskaźnikiem choroby nadciśnieniowej. Wzrost tego stosunku o jedną jednostkę zwiększa ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego ponad 11-krotnie.
4. Obserwowane zależności pomiędzy poziomami endogennych GKS w osoczu i moczu oraz ich metabolitów w moczu w grupie pacjentów z chorobą nadciśnieniową i w grupie kontrolnej wskazują na zmniejszoną aktywność 11β -HSD2 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.
5. Nie wykazano istotnego statystycznie związku zmutowanego allelu c.534A z występowaniem nadciśnienia tętniczego, pomimo obserwowanej większej liczby przypadków z tym allelem w grupie chorych w porównaniu do zdrowych ochotników.
6. Występowanie mutacji c.*197C>T nie ma klinicznego związku z nadciśnieniem tętniczym. Częstość występowania heterozygotycznego genotypu c.*197CT w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz wśród zdrowych ochotników jest porównywalna.
7. Wyjaśnieniem obniżonej aktywności 11β -HSD2 u chorych z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do zdrowych ochotników mogą być czynniki epigenetyczne zmniejszające ekspresję genu *HSD11B2*.

IX STRESZCZENIE

Nadciśnienie tętnicze pierwotne, czyli bez znanej etiologii, dotyczy ponad 90% wszystkich osób cierpiących na tę chorobę. Wielu badaczy sugeruje, że przyczyną powstawania nawet 30% przypadków nadciśnienia tętniczego pierwotnego mogą być zaburzenia gospodarki glikokortykosteroidowej. Za kluczowy enzym uznaje się izoformę 2 dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej (11 β -HSD2). Enzym ten katalizuje unieczynnienie kortyzolu (F) do kortyzonu (E) w tkankach docelowych dla aldosteronu, chroniąc tym samym receptor mineralokortykosteoidowy (MR) przed dostępem F. Defekt 11 β -HSD2 leży u podstaw dziedzicznej postaci nadciśnienia tętniczego – pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów (AME). Przypuszcza się jednak, że łagodniejsze zaburzenia funkcji 11 β -HSD2 mogą mieć wpływ na powstawanie pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

Celem pracy była analiza aktywności 11 β -HSD2 u chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym i zdrowych ochotników oraz weryfikacja przydatności poziomów endogennych glikokortykosteroidów (GKS) w płynach biologicznych jako markerów choroby nadciśnieniowej, a także ocena występowania mutacji w genie *HSD11B2*.

Do oznaczania poziomów endogennych F i E w osoczu i moczu oraz ich tetrahydro- (THF i THE) oraz allo-tetrahydro-metabolitów (allo-THF i allo-THE) w moczu opracowano i zwalidowano metodę HPLC z detekcją fluorescencyjną. Endogenne GKS oraz prednizolon (wzorzec wewnętrzny) ekstrahowano z próbek osocza i moczu przy użyciu dichlorometanu, a następnie przeprowadzano we fluorescencyjne pochodne w reakcji z nitylem kwasu 9-antrolowego w środowisku chinuklidyny i trietyloaminy. Uzyskane pochodne były oczyszczane i izolowane metodą SPE. W celu oznaczenia całkowitych ilości GKS i ich metabolitów wydalonych z moczem przeprowadzano enzymatyczną hydrolizę przy użyciu β -glukuronidazy. Zoptymalizowano reakcję derywatyzacji GKS z zastosowaniem 9-AN oraz proces hydrolizy enzymatycznej glukuronianów i siarczanów GKS. Rozdział analitów uzyskano na monolitycznej kolumnie chromatograficznej Chromolith Performance RP-18e. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i 30 mmol/l kwasu orto-fosforowego (470:530, v/v). Opracowana metoda była odpowiednio dokładna i precyzyjna, określono wykrywalność i oznaczalność analitów. Wyznaczono odzysk GKS i ich metabolitów, który wynosił ponad 90%. Opracowana metoda HPLC-FLD spełniała wymogi stawiane metodom analitycznym i została zastosowana do oznaczenia poziomów GKS w płynach biologicznych u ludzi.

Badaniami objęto grupę 79 chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz 70 zdrowych ochotników. W próbkach osocza i moczu oznaczono poziomy endogennych GKS, a na ich podstawie obliczono parametry oceny aktywności 11 β -HSD2: F/E w osoczu, stosunek wolnego F do wolnego E w moczu (UFF/UFE) oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) w dobowej zbiorce moczu (DZM). Uzyskane wyniki nie

wykazały istotnych różnic w wartości parametru F/E w osoczu w grupie osób z chorobą nadciśnieniową (mediana 3,82) i zdrowych ochotników (mediana 3,64). Nie stwierdzono także znamiennej różnicy pomiędzy wartością UFF/UFЕ u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (0,363) oraz w grupie kontrolnej (0,330). Nie potwierdzono tym samym przydatności parametrów F/E w osoczu i UFF/UFЕ w DZM jako markerów choroby nadciśnieniowej. Znacznie bardziej różnicującym czynnikiem był stosunek (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) w DZM. W tym przypadku różnice w wartościach tego parametru pomiędzy pacjentami z chorobą nadciśnieniową i grupą kontrolną były istotne statystycznie. Wykazano, że liczba osób z wartością parametru (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) powyżej wartości referencyjnej (1,40) jest znacznie większa w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym niż wśród zdrowych ochotników (14 : 1). Przeprowadzona analiza logistyczna w celu ustalenia jak aktywność 11 β -HSD2 wpływa na występowanie nadciśnienia tętniczego wskazuje na istotny wpływ parametru (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) na zwiększenie ryzyka pojawienia się choroby.

Pomimo istnienia wskaźników potwierdzających zaburzenia w metabolizmie endogennego F u chorych z nadciśnieniem tętniczym, uzyskane rezultaty nie do końca znalazły odzwierciedlenie w ich genotypie. Stwierdzono większą liczbę przypadków z heterozygotycznym genotypem c.534GA wśród osób z chorobą nadciśnieniową w porównaniu z grupą kontrolną, jednak analiza statystyczna nie potwierdziła istotnej statystycznie większej częstości pojawiania się zmutowanego allelu c.534A w nadciśnieniu tętniczym. Ponadto, dane określające fenotyp u osób z heterozygotycznym genotypem nie były istotnie różne w porównaniu do osób, u których obserwowano genotyp prawidłowy (c.534GG). Podobne wyniki uzyskano w analizie polimorfizmu c.*197C>T. Zmutowany allel c.*197T pojawiał się z porównywalną częstością u osób z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników. Także analiza logistyczna nie wykazała istotnego wpływu występowania zmutowanych alleli c.534A i c.*197T na ryzyko rozwoju choroby nadciśnieniowej.

X ABSTRACT**Levels of endogenous glucocorticoids and their metabolites as markers of metabolic disorders in human with regard to genetic polymorphism of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase**

Primary hypertension, a kind of hypertension with unknown etiology, refers to above 90% of all diagnosed cases. It is assumed that disturbances of glucocorticoids balance might be a source of primary hypertension in over 30% of cases. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) is a key enzyme in glucocorticoids (GCs) metabolism. It catalyzes the inactivation of cortisol (F) to cortisone (E) in aldosterone target tissues and, thereby protects mineralocorticoid receptor (MR) from F. Failure in 11 β -HSD2 activity is the base of inherited form of hypertension – apparent mineralocorticoid excess (AME). It is suggested that mild disturbances in 11 β -HSD2 function may lead to primary hypertension.

The aim of the study was to analyze the 11 β -HSD2 activity in hypertensive patients and healthy volunteers in order to verify whether levels of endogenous GCs in biological fluids may be used as markers of hypertension. Moreover, the goal of genetic part of the work was to investigate mutation's appearance in the *HSD11B2* gene.

HPLC method with fluorescence detection was evaluated and validated to determine levels of endogenous F and E in plasma and urine and their tetrahydro- (THF and THE) and allo-tetrahydro-metabolites (allo-THF and allo-THE) in urine. The endogenous GCs and prednisolone (the internal standard) were extracted from plasma and urine samples with dichloromethane. Subsequently, the analytes were derivatized to fluorescent compounds using 9-anthroyl nitrile (9-AN) in the presence of triethylamine and quinuclidine. The derivatized steroids were purified by SPE method. Enzymatic hydrolysis with the use of β -glucuronidase was proceeded to determine total urinary amounts of GCs and their metabolites. The conditions of the derivatization of steroids with 9-AN as well as of enzymatic hydrolysis of GC's conjugates were optimized. Chromatographic separation was accomplished in the Chromolith Performance RP-18e monolithic column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0,3 mM ortho-phosphoric acid (470:530 v/v). The elaborated method was adequately precise and accurate, limit of detection and limit of quantitation were calculated. The recoveries of GCs were very high and exceeded 90%. The elaborated HPLC-FLD method fulfilled the validation requirements for analytical methods and was applied for determination of levels of endogenous GCs in biological fluids in human.

The study included 79 hypertensive patients (study group) and 70 healthy volunteers (control group). Levels of endogenous GCs were determined in plasma and urine. Following parameters were calculated: F/E in plasma, urinary free F to urinary free E (UFF/UFE) and (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) in urine to estimate 11 β -HSD2 activity. No significant differences in F/E in plasma values were

observed between hypertensives (median 3.82) and healthy volunteers (median 3.64). Furthermore, UFF/UFE values did not differ significantly in patients (0.363) and controls (0.330). Thereby, there were no evidences for the assumption that F/E in plasma and UFF/UFE may be good indicators of hypertension. (THF+allo-THF)/(THE+alloTHE) in urine was better differentiating parameter. The dissimilarity of that ratio's values in hypertensives and healthy volunteers was statistically significant. The study proved that there are more people with (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) value exceeding reference range (1.40) among hypertensives than in controls (14:1). Logistic regression was carried out to analyze the role of 11 β -HSD2 activity in hypertension development. It demonstrated that the value of (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) influences the risk of hypertension.

Despite the presence of indicators of endogenous F metabolism disturbances in hypertensives, the obtained results were not fully reflected in genotypes of those patients. Greater number of cases with heterozygous genotype c.534GA was found among hypertensives compared to control group, but the statistical analysis did not confirm higher frequency of mutant allele c.534A in hypertension. Moreover, the data defining the phenotype in patients with heterozygous genotype were not significantly different when compared to people with the wild genotype (c.534GG). Analysis of c.*197C>T polymorphism gave similar results. A mutant allele (c.*197T) appeared with comparable frequency in hypertensives and healthy volunteers. Logistic regression did not show significant influence of the mutant alleles c.534A and c.*197T on the risk of hypertension.

XI PIŚMIENNICTWO

1. Nicolaides N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E., *The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function*. Steroids 2010, 75, 1-12.
2. Rose A.J., Vagiopoulos A., Herzig S., *Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2010, 122, 10-20.
3. Nader N., Chrousos G.P., Kino T., *Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis*. Trends Endocrinol. Metab. 2010, 21, 277-286.
4. Anderson Elverson C., Wilson M.E., *Cortisol: circadian rhythm and response to a stressor*. Newborn & Infant Nursing Reviews 2005, 5, 159-169.
5. Levine A., Zagoory-Sharon O., Feldman R., Lewis J.G., Weller A., *Measuring cortisol in human psychobiological studies*. Physiol. Behav. 2007, 90, 43-53.
6. Moryś J., Jeżewska M., Rynkiewicz A., *Znaczenie stresu w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Część I. Nadciśnienie Tętnicze* 2005, 9, 1-10.
7. Tomlinson J.W., Walker E.A., Bujalska I.J., Draper N., Lavery G.G., Cooper M.S., Hewison M., Stewart P.M., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of corticosteroid response*. Endocr. Rev. 2004, 25, 831-866.
8. Nagalski A., Kiersztan A., *Fizjologia i molekularny mechanizm działania glikokortykoidów*. Postepy Hig Med Dosw 2010, 64, 133-145.
9. Horst-Sikorska W., *Steroidoterpia – korzyści i zagrożenia*. Przew. Lek. 2008, 1, 133-136.
10. Mackiewicz S., *Glikokortykosteroidy – mity i fakty*. Reumatologia 2007, 45, 198-204.
11. Grzanka A., Jarzab J., *Niegenomowe działanie glikokortykosteroidów jako ważny mechanizm glikokortykosteroidoterapii wziewnej u chorych na astmę oskrzelową*. Pneumol. Alergol. Pol. 2009, 77, 453-459.
12. Spies C.M., Bijlsma J.W.J., Burmester G.R., Buttgerit F., *Pharmacology of glucocorticoids In rheumatoid arthritis*. Curr. Opin. Pharmacol. 2010, 10, 302-307.
13. Ganong W.F., *Fizjologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
14. Wrzeczono U., Zaprutko L., *Chemia związków naturalnych*. Wydawnictwa Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2001.
15. Hammer F., Stewart P.M., *Cortisol metabolism in hypertension*. Best Pract Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2006, 20, 337-353.
16. Traczyk W.Z., Trzebski A., Godlewski A., *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
17. Ziaja J., Cholewa K., Mazurek U., Cierpka L., *Molekularne podstawy syntezy aldosteronu i kortyzolu w prawidłowych nadnerczach i w gruczolakach kory nadnerczy*. Pol. J. Endocrinol. 2008, 59, 330-339.

18. Gross K.L., Lu N.Z., Cidlowski J.A., *Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance*. Mol. Cell. Endocrinol. 2009, 300, 7-16.
19. Bullock J., Boyle J., Wang M.B., *Fizjologia*. Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner, Wrocław 2004.
20. Dictionary and Thesaurus – www.yourdictionary.com, autor ryciny: Carlyn Iverson, data wejścia 01.12.2010
21. Greenspan F.S., Gardner D.G., Lewiński A., *Endokrynologia ogólna i kliniczna*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004.
22. Vierhapper H., Nowotny P., Waldhäusl W., *Stimulation of gonadal steroid synthesis by chronic excess of adrenocorticotropin in patients with adrenocortical insufficiency*. J. Clin. Invest. 1986, 77, 1063-1070.
23. Sukhija R., Kakar P., Mehta V., Mehta J.L., *Enhanced 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity, the metabolic syndrome and systemic hypertension*. Am. J. Cardiol. 2006, 98, 544-548.
24. Romer T.E., Litwin M., Małunowicz E., *Apparent mineralocorticoid excess – AME*. Pol. J. Endocrinol. 2004, 55, 463-470.
25. Kosicka K., Główska F.K., Kośła A., Cymerys M., Chuchracki M., *Rola glikokortykosteroidów w etiologii nadciśnienia tętniczego*. Nadciśnienie Tętnicze 2010, 14, 208-215.
26. Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G., Glaser T.M., Handelin B.L., Housman D.E., Evans R.M., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor*. Science 1987, 237, 268-275.
27. Zdrojewicz Z., Sztuka-Pietkiewicz A., Pietkiewicz W., *Rola receptorów mineralokortykoidowych w patogenezie nadciśnienia tętniczego*. Nadciśnienie Tętnicze 2000, 4, 209-215.
28. Grzanka A., Jarząb J., *Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów*. Pneumol. Alergol. Pol. 2009, 77, 387-393.
29. Funder J.W., *Adrenal steroids: new answers, new questions*. Science 1987, 237, 236-237.
30. Stewart P.M., Mason J.I., *Cortisol to cortisone: glucocorticoid to mineralocorticoid*. Steroids 1995, 60, 143-146.
31. Poprzezińska J., Krzyżanowska-Świniarska B., Mizagowski T., Ziemak J., Widecka K., *Metaboliczna otyłość u osób z prawidłową masą ciała a 11 β -dehydrogenaza hydroksysteroidowa typu 1 (11 β -HSD1)*. Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2009, 2, 73-80.
32. Funder J.W., Pearce P.T., Smith R., Smith I., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. Science 1988, 242, 583-585.
33. Ferrari P., *Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 17, 575-589.

34. White P.C., Mune T., Rogerson F.M., Kayes K.M., Agarwal A.K., *Molecular analysis of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess*. Steroids 1997, 62, 83-88.
35. Weinstein R.S., Jilka R.L., Parfitt J.A., Manolagas S.C., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids*. J. Clin. Invest. 1998, 102, 274-282.
36. Walker E.A., Stewart P.M., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections*. TRENDS Endocrinol. Metab. 2003, 7, 334-339.
37. Whitworth J.A., Schyvens C.G., Zhang Y., Andrews M.C., Mangos G.J., Kelly J.J., *The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension*. J. Hypertens. 2002, 20, 1035-1043.
38. Van Uum S.H.M., Hermus A.R.M.M., Smiths P., Thien T., Lenders J.W.M., *The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the pathogenesis of hypertension*. Cardiovasc. Res. 1998, 38, 16-24.
39. Sandeep T.C., Walker B.R., *Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases*. TRENDS Endocrinol. Metab. 2001, 10, 446-453.
40. Seckl J.R., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action*. Curr. Opin. Pharmacol. 2004, 4, 597-602.
41. Tomlinson J.W., Stewart P.M., *Cortisol metabolism and the role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2001, 15, 61-78.
42. Draper N., Stewart P.M., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action*. J. Endocrinol. 2005, 186, 251-271.
43. Główka F.K., Kosicka K., Karaźniewicz-Łada M., *HPLC method for determination of fluorescence derivatives of cortisol, cortisone and their tetrahydro- and allo-tetrahydro-metabolites in biological fluids*. J. Chromatogr. B 2010, 878, 283-289.
44. Morineau G., Marc J.M., Boudi A., Galons H., Gourmelen M., Corvol P., Pascoe L., Fiet J., *Genetic, biochemical and clinical studies of patients with A328V or R213C mutations in 11 β HSD2 causing apparent mineralocorticoid excess*. Hypertension 1999, 34, 435-441.
45. Shibasaki H., Tanabe Ch., Furuta T., Kasuya Y., *Hydrolysis of conjugated steroids by the combined use of β -glucuronidase preparations from Helix pomatia and Ampullaria: determination of urinary cortisol and its metabolites*. Steroids 2001, 66, 795-801.
46. Best R., Walker B.R., *Additional value of measurement of urinary cortisone and unconjugated cortisol metabolites in assessing the activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in vivo*. Clin. Endocrinol. 1997, 47, 231-236.
47. Edwards C.R.W., Benediktsson R., Lindsay R.S., Seckl J.R., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects*. Steroids 1996, 61, 263-269.

48. White P.C., Mune T., Agarwal A.K., *Functional studies of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Steroids 1995, 60, 65-68.
49. Walker B.R., Stewart P.M., Shackleton C.H.L., Padfield P.L., Edwards C.R.W., *Deficient activation of cortisol by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in essential hypertension*. Clin. Endocrinol. 1993, 39, 221-227.
50. Stewart P.M., Whorwood C.B., Mason J.I., *Type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life*. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1995, 55, 465-471.
51. Agarwal A.K., Rogerson F.M., Mune T., White P.C., *Gene structure and chromosomal localization of the human HSD11K gene encoding the kidney (type2) isozyme of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase*. Genomics 1995, 29, 195-199.
52. Krozowski Z., Li K.X.Z., Koyama K., Smith R.E., Obeyesekere V.R., Stein-Oakley A., Sasano H., Coulter C., Cole T., Sheppard K.E., *The type I and type II 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes*. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1999, 69, 391-401.
53. Krozowski Z., *The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects*. Mol. Cell. Endocrinol. 1999, 151, 121-127.
54. Bujalska I., Shimojo M., Howie A., Stewart P.M., *Human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: studies on the stably transfected isoforms and localization of the type 2 isozyme within renal tissue*. Steroids 1997, 62, 77-82.
55. Ferrari P., *The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension*. Biochim. Biophys. Acta 2010, 1802, 1178-1187.
56. Krozowski Z., Chai Z., *The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the cardiovascular system*. Endocr. J. 2003, 50, 485-489.
57. Małunowicz E.M., Romer T.E., Urban M., Bossowski A., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency (apparent cortisone reductase deficiency) in a 6-year-old boy*. Horm. Res. 2003, 59, 205-210.
58. Skowrońska B., Fichna M., Fichna P., *Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym*. Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2005, 3, 21-29.
59. Rask E., Olsson T., Söderberg S., Andrew R., Livingstone D.E., Johnson O., Walker B.R., *Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2001, 3, 1418-1421.
60. Quinkler M., Stewart P.M., *Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 2384-2392.
61. Stewart P.M., Krozowski Z.S., Gupta A., Molford D.V., Howie A.J., Sheppard M.C., Whorwood C.B., *Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene*. Lancet 1996, 347, 88-91.

62. Duax W.L., Ghosh D., *Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility and cancer*. Steroids 1997, 62, 95-100.
63. Seckl J.R., *Glucocorticoids, feto-placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and early life origins of adult disease*. Steroids 1997, 62, 98-94.
64. Seckl J.R., Benediktsson R., Lindsay R.S., Brown R.W., *Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension*. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 1995, 55, 447-455.
65. Hirasawa G., Takeyama J., Sasano H., Fukushima K., Suzuki T., Muramatsu Y., Darnel A.D., Kaneko C., Hiwatashi N., Toyota T., Nagura H., Krozowski Z.S., *11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000, 85, 1306-1309.
66. National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov, data wejścia 28.01.2010
67. Ensembl Genome Browser – www.ensembl.org, data wejścia 28.01.2010
68. Alikhani-Koopaei R., Fouladkou F., Frey F.J., Frey B.M., *Epigenetic regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression*. J. Clin. Invest. 2004, 114, 1146-1157.
69. Mantero F., Palermo M., Petrelli M.D., Tedde R., Stewart P.M., Shackleton C.H.L., *Apparent mineralocorticoid excess: type I and II*. Steroids 1996, 61, 193-196.
70. Palermo M., Quinkler M., Stewart P.M., *Apparent mineralocorticoid excess syndrome: an overview*. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 2004, 48, 687-696.
71. Stewart P.M., *Cortisol as a mineralocorticoid in human disease*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1999, 69, 403-408.
72. Dötsch J., Dörr, H.G., Stalla G.K., Sippell W.G., *Effect of glucocorticoid excess on the cortisol/cortisone ratio*. Steroids 2001, 66, 817-820.
73. Melander O., Orho-Melander M., Bengtsson K., Lindblad U., Råstam L., Groop L., Hulthén U.L., *Association between a variant in the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and primary hypertension*. J. Hum. Hypertens. 2000, 14, 819-823.
74. Agarwal A.K., Giacchetti G., Lavery G., Nikkila H., Palermo M., Ricketts M., McTernan C., Bianchi G., Manunta P., Strazzullo P., Mantero F., White P.C., Stewart P.M., *CA-repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity*. Hypertension 2000, 36, 187-194.
75. Zaehner T., Plueshke V., Frey B.M., Frey F.J., Ferrari P., *Structural analysis of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in end-stage renal disease*. Kidney Int. 2000, 58, 1413-1419.
76. Rogoff D., Smolenicka Z., Bergadá I., Vallejo G., Barontini M., Heinrich J.J., Ferrari P., *The codon 213 of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene is a hot spot for mutations in apparent mineralocorticoid excess*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998, 83, 4391-4393.

77. Li A., Tedde R., Krozowski Z.S., Pala A., Li K.X.Z., Shackleton C.H.L., Mantero F., Palermo M., Stewart P.M., *Molecular basis for hypertension in the „type II variant” of apparent mineralocorticoid excess*. Am. J. Hum. Genet. 1998, 63, 370-379.
78. Carvajal C.A., Gonzalez A.A., Romero D.G., González A., Mosso L.M., Lagos E.T., Hevia M.P., Rosati M.P., Perez-Acle T.O., Gomez-Sanchez C.E., Montero J.A., Fardella C.E., *Two homozygous mutations in the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 2501-2507.
79. Brand E., Kato N., Chatelain N., Krozowski Z.S., Jeunemaitre X., Corvol P., Plouin P.F., Cambien F., Pascoe L., Saubrier F., *Structural analysis and evaluation of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) gene in human essential hypertension*. J. Hypertens. 1998, 16, 1627-1633.
80. Nunez B.S., Rogerson F.M., Mune T., Igarashi Y., Nagakawa Y., Philipov G., Moudgil A., Travis L.B., Palermo M., Shackleton C., White P.C., *Mutants of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD2) with partial activity: improved correlations between genotype and biochemical phenotype in apparent mineralocorticoid excess*. Hypertension 1999, 34, 638-642.
81. Quinkler M., Bappal B., Draper N., Atterbury A.J., Lavery G.G., Walker E.A., DeSilva V., Taylor N.F., Hala S., Rajendra N., Stewart P.M., *Molecular basis for the apparent mineralocorticoid excess syndrome in the Oman population*. Mol. Cel. Endocrinol. 2004, 217, 143-149.
82. Wilson R.C., Harbison M.D., Krozowski Z.S., Funder J.W., Shackleton C.H.L., Hanauske-Abel H.M., Wei J., Hertecant J., Moran A., Neiberger R.E., Balfe J.W., Fattah A., Daneman D., Licholai T., New M.I., *Several homozygous mutations in the gene for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in patients with apparent mineralocorticoid excess*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995, 80, 3145-3150.
83. Smolenicka Z., Bach E., Schaer S., Liechti-Gallati S., Frey B.M., Frey F.J., Ferrari P., *A new polymorphic restriction site in the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998, 83, 1814-1817.
84. Ferrari P., Obeyesekere V.R., Li K., Wilson R.C., New M.I., Funder J.W., Krozowski, *Point mutations abolish 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II activity in three families with the congenital syndrome of apparent mineralocorticoid excess*. Mol. Cel. Endocrinol. 1996, 119, 21-34.
85. Li A., Li K.X.Z., Marui S., Krozowski Z.S., Batista M.C., Whorwood C.B., Arnhold I.J.P., Shackleton C.H.L., Mendonca B.B., Stewart P.M., *Apparent mineralocorticoid excess in a Brazilian kindred: hypertension in the heterozygote state*. J. Hypertens., 1997, 15, 1397-1402.
86. Odermat A., Dick B., Arnold P., Zaehner T., Plueschke V., Deregibus M.N., Repetto H., Frey B.M., Frey F.J., Ferrari P., *A mutation in the cofactor-binding domain of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 associated with mineralocorticoid hypertension*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2001, 86, 1247-1252.

87. Lavery G.G., Ronconi V., Draper N., Rabbitt E.H., Lyons V., Chapman K.E., Walker E.A., McTernan C.L., Gianchetti G., Mantero F., Seckl J.R., Edwards C.R.W., Connell J.M.C., Hewison J., Stewart P.M., *Late-onset apparent mineralocorticoid excess caused by novel compound heterozygous mutations in the HSD11B2 gene*. Hypertension 2003, 42, 123-129.
88. Morineau G., Sulmont V., Salomon R., Fiquet-Kempf B., Jeunemaitre X., Nicod J., Ferrari P., *Apparent mineralocorticoid excess: report of six new cases and extensive personal experience*. J. Am. Soc. Nephrol. 2006, 17, 3176-3184.
89. Kamide K., Kokubo Y., Hanada H., Nagura J., Yang J., Takiuchi S., Tanaka C., Banno M., Miwa Y., Yoshii M., Matayoshi T., Yasuda H., Horio T., Okayama A., Tomoike H., Kawano Y., Miyata T., *Genetic variations of HSD11B2 in hypertensive patients and in the general population, six rare missense/frameshift mutations*. Hypertens. Res. 2006, 29, 243-252.
90. Sugiyama T., Kato N., Ishinaga Y., Yamori Y., Yazaki Y., *Evaluation of selected polymorphisms of the mendelian hypertensive disease genes in the japanese population*. Hypertens. Res. 2001, 24, 515-521.
91. Carvajal C.A., Romero D.G., Mosso L.M., González A.A., Campino C., Montero J., Fardella C.E., *Biochemical and genetic characterization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in low-renin essential hypertensives*. J. Hypertens. 2005, 23, 71-77.
92. Litchfield W.R., Hunt S.C., Jeunemaitre X., Fisher N.D.L., Hopkins P.N., Corvol R.R., Williams G.H., *Increased urinary free cortisol: a potential intermediate phenotype of essential hypertension*. Hypertension 1998, 31, 569-574.
93. Mariniello B., Ronconi V., Sardu C., Pagliericcio A., Galletti F., Strazzullo P., Palermo M., Boscaro M., Stewart P.M., Mantero F., Giacchetti G., *Analysis of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension*. Am. J. Hypertens. 2005, 18, 1091-1098.
94. Fuster D., Escher G., Vogt B., Ackermann D., Dick B., *Furosemide inhibits 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2*. Endocrinol. 1998, 139, 3849-3854.
95. Bobeff I., Nogal P., Pniewska-Siark B., Lewiński A., *Nadmiar soku grejpfrutowego w diecie przyczyną wystąpienia nadciśnienia tętniczego i podejrzenia zespołu pozornego nadmiaru mineralokortykoidów (Apparent Mineralocorticoid Excess – AME) u 5-letniej dziewczynki z adrenarchoe praecox*. Endokrynologia pediatria 2006, 4, 73-76.
96. Guo J., Reidenberg M.M., *Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase by bioflavonoids and their interaction with furosemide and gossypol*. J. Lab. Clin. Med. 1998, 132, 32-38.
97. Palermo M., Armanini D., Delitala G., *Grapefruit juice inhibits 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in vivo, in man*. Clin. Endocrinol. 2003, 59, 143-144.
98. Głuszek J., *Współczesna terapia nadciśnienia tętniczego*. Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2008.

99. Brandys J., Jasik M., Lipski S., Łazowski J., Skowron A., *Opieka farmaceutyczna w nadciśnieniu tętniczym*. Biblioteka Naukowa Czasopisma Aptekarskiego, Warszawa 2006.
100. Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego, www.nadcisnienietetnicze.pl, data wejścia: 14.12.2010
101. Posadzy-Mańczyńska A., Nadciśnienie tętnicze od A do Z. Część 2. *Farmacja w praktyce* 2007 2, 44-48.
102. Giles T.D., Materson B.J., Cohn J.N., Kostis J.B., *Definition and classification of hypertension: an update*. *J. Clin. Hypertens.* 2009, 11, 611-614.
103. Gray H.H., Dawkins K.D., Morgan J.M., Simpson I.A., *Kardiologia*. Wydawnictwo Medyczne Via Medica, Gdańsk 2003.
104. Stewart P.M., *Mineralocorticoid hypertension*. *Lancet* 1999, 353, 1341-1347.
105. Saczko Z., Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A., Żórawski K., *Nadciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży. Etiopatogeneza*. *Nadciśnienie Tętnicze* 2009, 13, 199-205.
106. Kato N., *Genetic analysis in human hypertension*. *Hypertens. Res.* 2002, 25, 319-327.
107. Lifton R.P., *Genetic determinants of human hypertension*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 8545-8551.
108. Tobin M.D., Tomaszewski M., Braund P.S., Hajat C., Raleigh S.M., Palmer T.M., Caulfield M., Burton P.R., Samani N.J., *Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population*. *Hypertension* 2008, 51, 1658-1664.
109. Levy D., Eret G.B., Rice K., Verwoert G.C., Launer L.J., Dehghan A., Glazer N.L., Morrison A.C., Johnson A.D., Aspelund T., Aulchenko Y., Lumley T., Köttgen A., Vasani R.S., Rivadeneira F., Eiriksdottir G., Guo X., Arking D.E., Mitchell G.F., Mattace-Raso F.U.S., Smith A.V., Taylor K., Scharpf R.B., Hwang S., Sijbrands E.J.G., Bis J., Harris T.B., Ganesh S.K., O'Donnell C.J., Hofman A., Rotter J.I., Coresh J., Benjamin E.J., Uitterlinden A.G., Heiss G., Fox C.S., Witteman J.C.M., Boerwinkle E., Wang T.J., Gudnason V., Larson M.G., Chakravarti A., Psaty B.M., van Duijn C.M., *Genome-wide association study of blood pressure and hypertension*. *Nature Genetics* 2009, 41, 677-687.
110. Gu D., Kelly T.N., Hixson J.E., Chen J., Liu D., Chen J., Rao D.C., Mu J., Ma J., Jaquish C.E., Rice T.K., Gu C., Hamm L.L., Whelton P.K., He J., *Genetic variants in the renin-angiotensin-aldosterone system and salt sensitivity of blood pressure*. *J. Hypertens.* 2010, 28, 1210-1220.
111. Luft F.C., *Mendelian forms of human hypertension and mechanisms of disease*. *Clin. Med. Res.* 2003, 1, 291-300.
112. Gavras I., Manolis A., Gavras H., *Genetic epidemiology of essential hypertension*. *J. Hum. Hypertens.* 1999, 13, 225-229.

113. Staessen J.A., Wang J., Bianchi G., Birkenhäger A.H., *Essential hypertension*. Lancet 2003, 361, 1629-1641.
114. Lifton R.P., Gharavi A.G., Geller D.S., *Molecular mechanisms of human hypertension*. Cell 2001, 104, 545-556.
115. Katori M., Majima M., *A missing link between a high salt intake and blood pressure increase*. J. Pharmacol. Sci. 2006, 100, 370-390.
116. Ciechanowicz A., *Jak znaleźć właściwy gen? Od genów kandydatów do badań całego genomu i... z powrotem*. Kardiologia na co Dzień 2010, 5, 62-67.
117. Whitworth J.A., Williamson P.M., Mangos G., Kelly J.J., *Cardiovascular consequences of cortisol excess*. Vasc Health Risk Manag 2005, 1, 291-299.
118. Whitworth J.A., Mangos G.J., Kelly J.J., *Cushing, cortisol, and cardiovascular disease*. Hypertension 2000, 36, 912-916.
119. Baum M., Moe O.W., *Glucocorticoid-mediated hypertension: does the vascular smooth muscle hold all the answers?* J. Am. Soc. Nephrol. 2008, 19, 1251-1253.
120. Simmons W.W., Ungureanu-Langrois D., Smith G.K., Smith T.W., Kelly R.A., *Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport*. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23928-23937.
121. Schena M., Mulatero P., Schiavone D., Mengozzi G., Tesio L., Chiandussi L., Veglio F., *Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes*. Am. J. Hypertens. 1999, 12, 388-397.
122. Drew P.D., Chavis J.A., *Inhibition of microglial cell activation of cortisol*. Brain Res. Bull. 2000, 52, 391-396.
123. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S., *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 10043-10047.
124. Rigaud A.S., Seux M.L., Birkenhäger W.H., Forette F., *Cerebral complications of hypertension*. J. Hum. Hypertens. 2000, 14, 605-616.
125. *Prevention of Cardiovascular Disease. Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. Światowa Organizacja Zdrowia 2007.
126. Cline D.M., *Epidemiology of hypertension*. Ann. Emerg. Med. 2008, 51, S3-S4.
127. Zdrojewski T., Szpakowski P., Bandosz P., Pająk A., Więcek A., Krupa-Wojciechowska B., Wyrzykowski B., *Arterial hypertension in Poland in 2002*. J. Hum. Hypertens. 2004, 18, 557-562.
128. Tykarski A., Posadzy-Małaczyńska A., Wyrzykowski B., Kwaśniewska M., Pająk A., Kozakiewicz K., Rywik S., Broda G., *Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego oraz skuteczność jego leczenia u*

- dorosłych mieszkańców naszego kraju. Wyniki programu WOBASZ. *Kardiologia Polska* 2005, 63, supl. 4.
129. Główka F.K., Karaźniewicz M., Lipnicka E., *RP-HPLC method with fluorescence detection for determination of small quantities of triamcinolone in plasma in presence of endogenous steroids after derivatization with 9-anthroyl nitrile; pharmacokinetic studies*. *J. Chromatogr. B* 2006, 839, 54-61.
130. Van Loco J., Elskens M., Croux C., Beernaert H. *Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient*. *Accred. Qual. Assur.*, 2002, 7, 281-285.
131. National Institutes of Health Clinical Center, Patient Education – 24-hour urine collection: http://www.cc.nih.gov/ccc/patient_education/procdiag/24hr.pdf, data wejścia 10.10.2008
132. Dane Światowej Organizacji Zdrowia, www.who.int, data wejścia 10.11.2010
133. Singh D., *Female mate value at a glance: relationship of waist-to-hip ratio to health, fecundity and attractiveness*. *Neuroendocrinol. Lett.* 2002, 23, suppl. 4, 81-91.
134. De Koning L., Merchant A.T., Pogue J., Anand S.S., *Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies*. *Eur. Heart J.* 2007, 28, 850-856.
135. Lukaski H.C., Johnson P.E., Bolonchuk W.W., Lykken G.I., *Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body*. *Am. J. Clin. Nutr.* 1985, 41, 810-817.
136. Kule U.G., Bosaeus I., De Lorenzo A.D., Deurenberg P., Elia M., Gómez J.M., Heitman B.L., Kent-Smith L., Melchior J.C., Pirlich M., Scharfetter H., Schols A.M.W.J., Pichard C., *Bioelectrical impedance analysis – part I: review of principles and methods*. *Clin. Nutr.* 2004, 23, 1226-1243.
137. Wieczorowska-Tobis K., Grześkowiak E., Józwiak A., *Farmakoterapia geriatryczna*. Wydawnictwo Akademia Medycyny, Warszawa 2008.
138. Sztefko K., *Badania laboratoryjne u chorych z nadciśnieniem tętniczym*. *Nadciśnienie Tętnicze* 2009, 13, 120-130.
139. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 5463-5467.
140. Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connel C.R., Heiner C., Kent S.B.H., Hood L.E., *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. *Nature* 1986, 321, 674–679.
141. Cohen A.S., Najarian D.R., Paulus A., Guttman A., Smith J.A., Karger B.L., *Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 9660-9663.
142. Morozova O., Marra M.A., *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics*. *Genomics* 2008, 92, 255-264.
143. Human Genome Variation Society – www.hgvs.org – data wejścia: 21.02.2011.

144. Herrmann F., Müller P., Lohmann T., Wallaschofski H., *Endokrynologia w praktyce klinicznej: diagnostyka i leczenie*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
145. Dziurkowska E., Zarzycki P.K., *Rola oznaczania hormonów steroidowych w ślinie w nowoczesnej diagnostyce medycznej*. Bromat. Chem. Toksykol. – XL 2007, 4, 401-409.
146. Krall P., Carvajal C., Ortiz E., Muñoz C., Garrido J.L., Mosso L., Fardella C., *Urinary free cortisol is not a biochemical marker of hypertension*. Am. J. Hypertens. 2007, 20, 459-465.
147. Lin C., Wu T., Machacek D., Jiang N., Kao P.C., *Urinary free cortisol and cortisone determined by high performance liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997, 82, 151-155.
148. Isomura Y., Mune T., Morita H., Suwa T., Takada N., Yamamoto Y., Takeda J., *Physiologic roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidney*. Metabolism 2006, 1352 – 1357.
149. Turpeinen U., Markkanen H., Välimäki M., Stenman U., *Determination of urinary free cortisol by HPLC*. Clin. Chem. 1997, 43, 1386-1391.
150. Shackleton C.H.L., *Mass spectrometry in the diagnosis of steroid-related disorders and in hypertension research*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1993, 45, 127-140.
151. Shackleton C.H.L., Honour J.W., *Simultaneous estimation of urinary steroids by semi-automated gas chromatography. Investigation of neo-natal infants and children with abnormal steroid synthesis*. Clin. Chim. Acta 1976, 69, 267-283.
152. Finken M.J.J., Andrews R.C., Andrew R., Walker B.R., *Cortisol metabolism in healthy young adults: sexual dimorphism in activities of A-ring reductases, but not 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999, 84, 3316-3321.
153. Westerbacka J., Yki-Järvinen H., Vehkavaara S., Häkkinen A., Andrew R., Wake D.J., Seckl J.R., Walker B.R., *Body fat distribution and cortisol metabolism in healthy men: enhanced 5 β -reductase and lower cortisol/cortisone metabolite ratios in men with fatty liver*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 4924-4931.
154. Tiosano D., Eisentein I., Militianu D., Chrousos G.P., Hochberg Z., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in hypothalamic obesity*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 379-384.
155. Stewart P.M., Boulton A., Kumar S., Clark P.M.S., Shackleton C.H.L., *Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone \rightarrow cortisol conversion in subjects with central adiposity*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1999, 84, 1022-1027.
156. Andrews R.C., Herlihy O., Livingstone D.E.W., Andrew R., Walker B.R., *Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002, 87, 5587-5593.

157. Cooper M.S., Blumsohn A., Goddard P.E., Bartlett W.A., Shackleton C.H., Eastell R., Hewison M., Stewart P.M., *11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effects of glucocorticoids on bone*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 3874-3877.
158. Palermo M., Shackleton C.H.L., Mantero F., Stewart P.M., *Urinary free cortisone and the assessment of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in man*. Clin. Endocrinol. 1996, 45, 605-611.
159. Furuta T., Namekawa T., Shibasaki H., Kasuya Y., *Simultaneous determination of tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone in human plasma and urine by stable isotope dilution mass spectrometry*. J. Chromatogr. B 1998, 706, 181-190.
160. AbuRuz S., Millership J., Heaney L., McElnay J., *Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges*. J. Chromatogr. B 2003, 798, 193-201.
161. Rouits E., Boisdron-Celle M., Morel A., Gamelin E., *Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol in routine practice for CYP3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake*. J. Chromatogr. B 2003, 793, 357-366.
162. Hu Z., Gong Q., Hu X., Wang L., Cao Y., Cao W., Yu Q., Cheng Z., *Simultaneous determination of 6 β -hydroxycortisol and cortisol in human urine and plasma by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity*. J. Chromatogr. B 2005, 826, 238-243.
163. Furuta T., Mori Ch., Suzuki A., Shibasaki H., Yokokawa A., Kasuya Y., *Simultaneous determination of 6 β -hydroxycortisol and cortisol in human urine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity determined by the cortisol 6 β -hydroxylation clearance*. J. Chromatogr. B 2004, 801, 165-171.
164. Gatti R., Cappelin E., Zecchin B., Antonelli G., Spinella P., Mantero F., Franco de Palo E., *Urinary high performance reverse phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and at the end of a race in elite cyclists*. J. Chromatogr. B 2005, 829, 154-159.
165. Yamashita K., Nakagawa R., Okuyama M., Honma S., Takahashi M., Numazawa M., *Simultaneous determination of tetrahydrocortisol, allotetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone In human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Steroids 2008, 73, 727-737.
166. Raffaelli A., Saba A., Vignali E., Marcocci C., Salvadori P., *Direct determination of the ratio of tetrahydrocortisol + allo-tetrahydrocortisol to tetrahydrocortisone in urine by LC-MS-MS*. J. Chromatogr. B 2006, 830, 278-285.
167. Shibata N., Hayakawa T., Takada K., Hoshino N., Minouchi T., Yamaji A., *Simultaneous determination of glucocorticoids in plasma or urine by high-performance liquid chromatography*

- with precolumn fluorimetric derivatization by 9-anthroyl nitrile. *J. Chromatogr. B* 1998, 706, 191-199.
168. Neufeld E., Chayen R., Stern N., *Fluorescence derivatisation of urinary corticosteroids for high-performance liquid chromatographic analysis*. *J. Chromatogr. B* 1998, 718, 273-277.
169. Kotłowska A., Maliński E., Sworczak K., Kumirska J., Stepnowski P., *The urinary steroid profile in patients diagnosed with adrenal incidentaloma*. *Clin. Biochem.* 2009, 42, 448-454.
170. Poór V., Bíró I., Bufa A., Gáti Á., Fenyvesi I., Juricskay S., Tényi T., Kilár F., *Urinary steroids in young woman with eating disorders*. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2004, 61, 199-205.
171. Bayliss M.A.J., Homer R.B., Shepherd M.J., *Aromatic acylation of hydroxyl groups via the rare S_N1 reaction pathway*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990, 4, 305-306.
172. Bayliss M.A.J., Homer R.B., *Anthracene-9-carbonyl chloride as a fluorescence and ultraviolet derivatising reagent for the high-performance liquid chromatographic analysis of hydroxyl compounds*. *J. Chromatogr.* 1988, 445, 393-402.
173. N'Gankam V., Uehlinger D., Dick B., Frey B.M., Frey F.J., *Increased cortisol metabolites and reduced activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in patients on hemodialysis*. *Kidney Int.* 2002, 61, 1859-1866.
174. Vierhapper H., Nowotny P., *The stress of being a doctor: steroid excretion rates in internal medicine residents on and off duty*. *Am. J. Med.* 2000, 109, 492-494.

XII WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

1. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na prowadzenie badań.
2. Wzór ankiety wypełnianej przez osoby z grupy kontrolnej oraz chorych z nadciśnieniem tętniczym.
3. Poziomy endogennych F i E w osoczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników. Tabele 1 i 2.
4. Ilości GKS wydalonych w DZM oraz wartości parametrów UFF/UFE oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników. Tabele 1 i 2.
5. Istotne statystycznie zależności (korelacja rangowa Spearmana) zaobserwowane w przeprowadzonych badaniach. Wykresy 1 – 19.

Załącznik nr 1

Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.um.p.edu.pl

Uchwała nr 117/08

Na podstawie art. 29 ustawy z dnia 3 grudnia 1996r. o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz.U.z 2002r. Nr 21, poz.204 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz.480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz.U. Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2007r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3 stycznia 2007r. w sprawie wzoru wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego produktu leczniczego oraz o wydanie przez komisję bioetyczną opinii o badaniu klinicznym produktu leczniczego, kierując się Zasadami Przewodnego Prowadzenia Badań Klinicznych - GCP - opracowanymi w oparciu o Deklarację Helską;

Komisja, na posiedzeniu w dniu. 07 lutego 2008 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

dr hab. Franciszek Główka

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
UM w Poznaniu**

Główny badacz: dr hab. Franciszek Główka

Członkowie zespołu

badawczego:

dr n. med. Maciej Cymerys

dr n. farm. Marta Karaźniewicz-Łada

mgr farm. Katarzyna Kosicka

Anna Łukasiewicz

Temat

badania: "Analiza poziomów endogennych glikokortykoidów i ich metabolitów jako kryterium rozpoznania zaburzeń metabolicznych u ludzi z uwzględnieniem oceny polimorfizmu genetycznego enzymu dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej izoformy 2."

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Załącznik nr 2

Wzór ankiety wypełnianej przez osoby z grupy kontrolnej oraz chorych z nadciśnieniem tętniczym

IMIĘ I NAZWISKO			
PŁEĆ			
DATA URODZENIA			
CIŚNIENIE TĘTNICZE (w mmHg)			
WAGA (w kg)			
ZAWARTOŚĆ TKANKI TŁUSZCZOWEJ			
WZROST (w cm)			
BMI			
OBWÓD TALII (w cm)			
OBWÓD BIODER (w cm)			
WHR			
Czy ktoś z najbliższej rodziny choruje bądź chorował na nadciśnienie tętnicze (jeśli tak, proszę podać stopień pokrewieństwa)?			
*Jaka jest Pani/Pana aktywność fizyczna?	niska	średnia	wysoka
*Czy spożywa Pani/Pan alkohol?	Rzadziej niż raz w miesiącu	Kilka razy w miesiącu	Częściej niż raz w tygodniu
*Czy pali Pani/Pan tytoń (jeśli tak, proszę podać orientacyjną liczbę papierosów wypalanych dziennie)?	tak		nie
Proszę krótko scharakteryzować swoją dietę.			
Czy choruje Pani/Pan na jakieś choroby przewlekłe (proszę podać jakie)?			
Czy przyjmuje Pani/Pan przewlekłe leki (proszę podać jakie)?			
Czy w ciągu ostatniego miesiąca przyjmował/a Pan/Pani leki lub suplementy diety czy preparaty ziołowe lub homeopatyczne (jeśli tak, proszę wymienić jakie)?			
*Czy jest Pani/Pan optymistą?	tak		nie
*Czy łatwo ulega Pani/Pan stresowi?	tak		nie

* prawidłowe zakreślić

Załącznik nr 3

Poziomy endogennych F i E w osoczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników

Tabela 1. Poziomy endogennych GKS w osoczu u chorych z nadciśnieniem tętniczym (na czerwono zaznaczono wartości nie mieszczące się w zakresie referencyjnym)

Lp.	PŁEĆ	F [nmol/l]	E [nmol/l]	$\frac{F}{E}$
1	K	262,80	64,50	4,10
2	M	630,63	79,98	7,93
3	M	257,96	38,01	6,82
4	M	193,66	78,42	2,48
5	K	415,61	76,74	5,45
6	K	241,54	74,87	3,24
7	M	488,93	94,87	5,18
8	M	169,72	45,11	3,78
9	K	191,19	84,49	2,28
10	K	188,19	97,99	1,93
11	M	339,90	47,10	7,25
12	M	205,74	154,89	1,34
13	M	279,92	136,23	2,07
14	K	---	---	---
15	M	206,11	72,47	2,86
16	K	240,41	67,58	3,58
17	M	471,27	107,53	4,41
18	M	291,03	95,02	3,08
19	M	364,35	285,25	1,28
20	M	683,10	52,05	13,20
21	M	380,00	82,10	4,65
22	K	158,56	55,94	2,85
23	K	286,20	39,19	7,34
24	K	335,37	61,67	5,47
25	K	---	---	---
26	M	513,68	88,95	5,81
27	M	239,93	52,16	4,62
28	M	479,60	47,90	10,06
29	M	232,74	129,90	1,80
30	K	310,90	74,90	4,17
31	K	328,71	70,29	4,70
32	M	609,06	58,61	10,45
33	M	---	---	---
34	K	219,64	91,20	2,42
35	M	175,73	67,01	2,64
36	M	228,07	65,33	3,51

37	M	253,83	64,72	3,94
38	M	565,10	86,85	6,54
39	M	330,96	97,04	3,43
40	K	239,23	80,33	2,99
41	M	131,77	64,11	2,07
42	M	573,26	34,34	16,78
43	M	376,91	74,64	5,08
44	M	203,20	53,50	3,82
45	K	457,30	80,50	5,71
46	K	394,73	91,09	4,36
47	K	101,07	20,61	4,93
48	K	810,61	219,00	3,72
49	M	330,70	69,22	4,80
50	K	302,62	89,03	3,42
51	M	293,66	91,62	0,81
52	M	377,10	82,10	4,62
53	M	366,71	113,68	3,24
54	M	357,75	56,67	6,35
55	K	271,54	72,50	3,77
56	K	728,49	100,17	7,31
57	M	315,40	96,77	3,28
58	K	168,86	51,21	3,32
59	K	399,45	187,29	2,14
60	K	173,30	58,50	2,98
61	M	496,45	119,44	4,18
62	M	---	---	---
63	M	345,13	74,68	4,65
64	M	166,29	54,49	3,07
65	M	257,21	98,53	2,63
66	M	192,16	57,28	3,37
67	M	150,70	58,90	2,57
68	M	194,84	78,08	2,51
69	M	353,29	101,2	3,51
70	K	411,10	48,77	8,48
71	K	242,67	63,96	3,82
72	K	292,85	59,00	4,99
73	K	130,65	25,45	5,16
74	K	293,66	91,62	3,22
75	K	260,20	96,50	2,71
76	M	485,12	81,79	5,97
77	M	307,19	93,57	3,30
78	M	385,20	93,64	4,14
79	M	362,04	76,01	4,79

Tabela 2. Poziomy endogennych GKS w osoczu u zdrowych ochotników (na czerwono zaznaczono wartości nie mieszczące się w zakresie referencyjnym)

Lp.	PŁEĆ	F [nmol/l]	E [nmol/l]	$\frac{F}{E}$
80	K	142,99	39,69	3,62
81	M	400,31	101,62	3,96
82	K	466,17	145,50	3,22
83	M	221,36	53,39	4,17
84	K	508,31	93,00	5,50
85	M	319,37	94,94	3,38
86	K	351,41	112,69	3,14
87	M	197,53	98,68	2,01
88	K	480,77	89,98	5,37
89	K	424,63	133,64	3,20
90	M	386,09	62,47	6,21
91	M	275,09	131,69	2,10
92	M	350,18	43,81	8,04
93	M	207,30	85,10	2,45
94	M	392,05	87,12	4,53
95	M	296,50	142,91	2,09
96	M	214,33	114,41	1,90
97	M	268,38	79,53	3,39
98	K	286,20	68,84	4,18
99	M	357,80	250,02	1,44
100	M	506,64	97,04	5,25
101	M	318,73	91,28	3,51
102	M	389,04	73,53	5,32
103	M	331,50	107,84	3,09
104	K	389,95	99,86	3,93
105	K	297,68	95,29	3,14
106	K	426,35	94,87	4,52
107	M	446,58	79,33	5,66
108	K	246,53	95,29	2,60
109	K	286,31	79,98	3,60
110	M	236,07	95,25	2,49
111	K	483,83	83,27	5,84
112	K	508,20	120,66	4,24
113	M	454,15	171,76	2,66
114	K	506,11	81,01	6,28
115	K	355,98	76,43	4,68
116	K	406,32	102,50	3,99
117	M	261,29	74,26	3,54
118	K	488,66	88,49	5,55
119	K	310,67	55,60	5,62

120	M	281,90	77,35	3,66
121	M	343,95	118,87	2,91
122	M	170,74	67,01	2,56
123	K	543,84	100,40	5,45
124	M	203,65	91,24	2,24
125	M	141,92	62,66	2,28
126	M	360,22	172,41	2,10
127	M	528,49	94,94	5,60
128	K	473,96	126,92	3,75
129	K	316,69	106,89	2,98
130	K	301,82	122,23	2,48
131	K	232,31	75,82	3,08
132	M	459,68	110,32	4,19
133	M	324,63	97,31	3,35
134	K	190,87	90,36	2,12
135	K	565,85	89,45	6,36
136	M	230,86	40,41	5,74
137	K	473,79	81,85	5,82
138	K	679,85	106,66	6,41
139	K	611,42	84,72	7,26
140	K	294,79	83,46	3,55
141	M	168,49	65,37	2,59
142	M	179,92	88,00	2,06
143	M	269,51	74,22	3,65
144	K	298,44	95,71	3,14
145	K	181,75	44,11	4,14
146	K	349,64	86,01	4,09
147	K	342,13	76,59	4,49
148	M	493,87	108,53	4,58
149	M	194,52	80,94	2,42

Załącznik nr 4

Ilości GKS wydalonych w DZM oraz wartości parametrów UFF/UFE oraz (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz u zdrowych ochotników.

Tabela 1. Ilości GKS wydalonych w DZM oraz parametry UFF/UFE i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości nie mieszczące się w zakresie referencyjnym.

Lp.	PŁEĆ	UFF [µg/24h]	UFE [µg/24h]	UFF UFE	THF+allo-THF [µg/24h]	THE+allo-THE [µg/24h]	THF + allo – THF THE + allo – THE
1	K	0	28,01	--	2421,49	298,50	8,11
2	M	73,99	80,48	0,919	3298,55	3317,64	0,99
3	M	--	--	--	--	--	--
4	M	22,27	98,46	0,226	4043,30	3793,21	1,07
5	K	--	--	--	--	--	--
6	K	24,33	57,55	0,423	2119,73	2714,96	0,78
7	M	8,36	20,03	0,417	4485,80	4810,00	0,93
8	M	44,16	144,59	0,305	4683,50	4979,91	0,94
9	K	13,01	101,92	0,128	2665,48	4901,49	0,54
10	K	11,30	52,89	0,214	1627,26	2383,70	0,68
11	M	24,98	76,46	0,327	5755,90	4026,09	1,43
12	M	27,02	75,87	0,356	3295,53	4405,05	0,75
13	M	28,41	44,30	0,641	1965,30	1726,19	1,14
14	K	16,76	58,20	0,288	824,45	637,73	1,29
15	M	29,05	41,12	0,706	1912,45	1351,57	1,41
16	K	18,24	91,38	0,200	2387,08	2638,50	0,90
17	M	18,04	121,10	0,149	6541,40	6791,85	0,96
18	M	24,70	59,62	0,414	2515,72	3979,05	0,63
19	M	44,91	119,07	0,377	2701,89	4427,80	0,61
20	M	1257,71	847,94	1,483	16517,33	9738,98	1,70
21	M	29,32	107,29	0,273	2834,02	2246,34	1,26
22	K	8,50	77,13	0,110	1489,34	1770,51	0,84
23	K	6,87	37,82	0,182	5522,92	6330,76	0,87
24	K	28,33	71,30	0,397	2839,80	2124,38	1,34
25	K	13,29	40,65	0,327	8466,02	2252,26	3,76
26	M	271,71	91,74	2,962	4469,43	2467,72	1,81
27	M	52,74	103,67	0,509	4505,10	3813,70	1,18
28	M	41,39	91,61	0,452	4764,77	6340,27	0,75
29	M	30,91	31,62	0,978	2150,50	1206,41	1,78
30	K	9,59	39,22	0,244	2846,78	1925,30	1,48
31	K	9,41	65,45	0,144	2227,68	2711,80	0,82
32	M	20,64	95,53	0,216	4546,00	3763,82	1,21
33	M	12,19	26,57	0,459	1252,48	1451,18	0,86
34	K	40,95	52,71	0,777	1801,35	1017,71	1,77
35	M	23,78	79,22	0,300	2865,73	3581,17	0,80

36	M	29,53	79,85	0,370	4825,54	7653,19	0,63
37	M	27,26	69,34	0,393	2097,26	3119,69	0,67
38	M	23,76	53,69	0,443	2058,09	1996,51	1,03
39	M	18,84	90,41	0,208	6144,07	16635,86	0,37
40	K	15,72	24,54	0,640	1104,41	738,18	1,50
41	M	35,89	56,47	0,635	1975,07	2756,38	0,72
42	M	--	--	--	--	--	--
43	M	25,54	90,81	0,281	3028,69	3018,38	1,00
44	M	10,02	28,36	0,353	1819,62	2438,14	0,75
45	K	16,47	51,90	0,317	3354,73	5418,41	0,62
46	K	--	--	--	--	--	--
47	K	53,48	41,28	1,296	253,62	627,71	0,40
48	K	11,56	20,94	0,552	483,34	460,98	1,05
49	M	23,98	96,50	0,248	6564,28	3785,62	1,73
50	K	0	0	--	1284,89	1527,55	0,84
51	M	10,80	50,52	0,214	1768,54	2906,33	0,61
52	M	17,73	47,13	0,376	3031,32	6009,57	0,50
53	M	14,38	112,90	0,127	4060,50	5689,95	0,71
54	M	13,33	70,92	0,188	2864,91	2515,09	1,14
55	K	--	--	--	--	--	--
56	K	--	--	--	--	--	--
57	M	--	--	--	--	--	--
58	K	11,78	28,48	0,414	2209,58	2199,71	1,00
59	K	16,27	61,18	0,266	2976,64	2865,91	1,04
60	K	10,65	25,85	0,412	1627,98	1564,23	1,04
61	M	10,37	24,12	0,430	3881,34	3155,40	1,23
62	M	19,34	44,56	0,434	5058,21	6245,22	0,81
63	M	12,93	128,73	0,100	3870,07	2765,28	1,40
64	M	17,48	62,23	0,281	3602,02	5241,04	0,69
65	M	46,51	61,20	0,760	3465,48	7808,86	0,44
66	M	23,71	121,10	0,196	5489,29	3436,35	1,60
67	M	35,10	85,96	0,408	4925,12	2998,56	1,64
68	M	242,20	130,20	1,860	14761,44	6371,18	2,32
69	M	26,53	45,27	0,586	3144,53	4164,80	0,76
70	K	17,92	40,87	0,438	2586,69	4295,58	0,60
71	K	7,09	15,46	0,459	838,96	1296,80	0,65
72	K	5,48	49,75	0,110	2202,58	1959,22	1,12
73	K	6,89	27,61	0,249	2152,65	2604,46	0,83
74	K	16,56	33,43	0,495	1231,77	849,34	1,45
75	K	5,95	45,28	0,132	2658,23	2652,83	1,00
76	M	0	30,62	--	1571,65	732,54	2,15
77	M	10,96	20,20	0,543	2830,02	4216,46	0,67
78	M	25,28	89,84	0,281	3799,00	3224,10	1,18
79	M	35,37	176,36	0,201	6087,91	9143,73	0,67

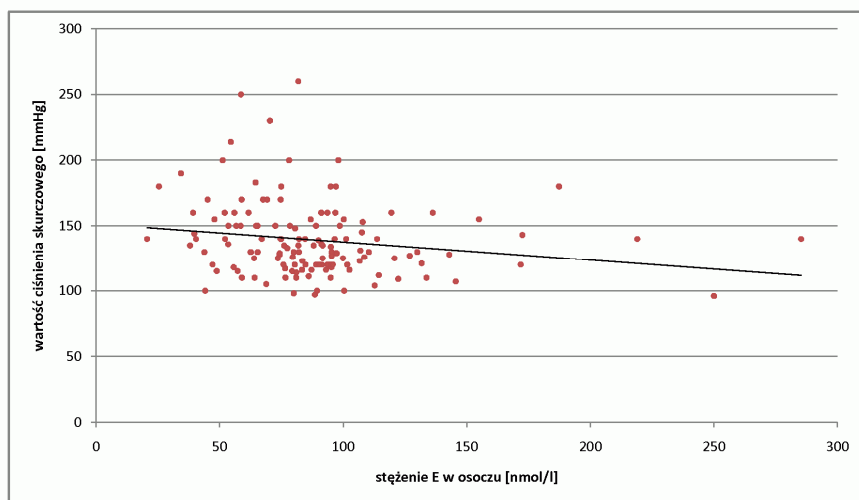
Tabela 2. Ilości GKS wydalonych w DZM oraz parametry UFF/UFE i (THF+allo-THF)/(THE+allo-THE) u zdrowych ochotników. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości nie mieszczące się w zakresie referencyjnym.

Lp.	PŁEĆ	UFF [µg/24h]	UFE [µg/24h]	UFF UFE	THF+allo-THF [µg/24h]	THE+allo-THE [µg/24h]	THF + allo – THF THE + allo – THE
80	K	54,98	96,04	0,573	2021,77	3059,76	0,66
81	M	56,05	78,10	0,718	2957,79	3069,19	0,96
82	K	23,24	72,14	0,322	4397,42	3630,61	1,21
83	M	36,09	68,31	0,528	2998,93	3561,06	0,84
84	K	27,72	61,57	0,450	1441,85	2482,88	0,58
85	M	27,50	140,63	0,196	4003,88	6507,92	0,62
86	K	33,17	100,17	0,331	1564,24	2356,42	0,66
87	M	58,37	82,93	0,704	4555,09	7110,04	0,64
88	K	23,97	60,33	0,397	2261,92	2914,29	0,78
89	K	18,30	56,82	0,322	1506,76	2065,47	0,73
90	M	24,78	47,52	0,521	3378,96	4509,93	0,75
91	M	45,96	73,55	0,625	2884,17	5649,86	0,51
92	M	55,10	129,30	0,426	3201,94	4849,48	0,66
93	M	25,08	57,16	0,257	3738,09	6072,08	0,62
94	M	15,84	36,64	0,432	3322,97	5765,76	0,58
95	M	41,05	89,86	0,457	2498,83	2729,96	0,92
96	M	52,36	166,03	0,315	1343,63	2121,12	0,63
97	M	19,80	103,99	0,190	3051,42	4594,58	0,66
98	K	30,22	99,91	0,302	1949,41	1103,67	1,77
99	M	8,06	15,34	0,526	1138,83	2183,92	0,52
100	M	22,58	135,32	0,167	1433,59	1134,64	1,26
101	M	22,53	80,76	0,279	2194,74	1862,93	1,18
102	M	34,84	107,18	0,325	1438,36	2312,65	0,62
103	M	30,51	70,63	0,432	1764,60	2061,97	0,86
104	K	56,77	111,94	0,507	1779,96	3554,57	0,50
105	K	20,37	103,37	0,197	1908,48	2408,20	0,79
106	K	15,35	68,15	0,225	1215,34	2059,06	0,59
107	M	13,67	42,58	0,321	2691,35	4026,13	0,67
108	K	32,18	119,86	0,268	2167,01	2843,73	0,76
109	K	40,74	145,06	0,281	1178,33	1270,57	0,93
110	M	29,82	56,53	0,527	1423,36	2311,24	0,62
111	K	38,68	129,85	0,298	2244,91	2688,66	0,83
112	K	30,11	100,13	0,301	3944,63	3918,36	1,01
113	M	31,86	165,92	0,192	3649,92	8309,69	0,44
114	K	23,25	39,68	0,586	1609,70	2044,38	0,79
115	K	25,00	38,92	0,642	2508,68	2393,63	1,05
116	K	23,84	61,75	0,386	1576,68	2395,11	0,66
117	M	11,25	41,26	0,273	2188,63	3137,30	0,70
118	K	43,55	205,46	0,212	1635,04	1812,74	0,90

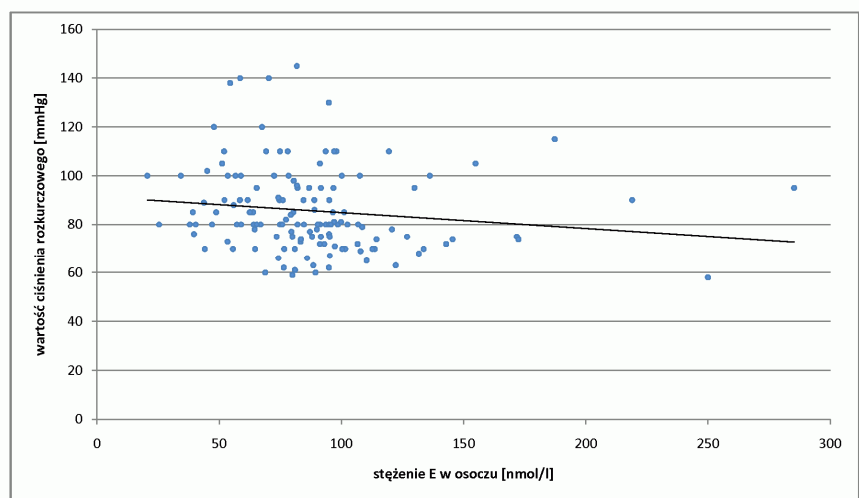
119	K	25,54	89,13	0,287	3155,00	2856,44	1,10
120	M	57,22	113,80	0,503	3891,03	3741,04	1,04
121	M	29,32	57,16	0,513	5759,01	9236,08	0,62
122	M	36,98	75,04	0,493	3092,57	3525,95	0,88
123	K	24,51	74,14	0,331	1686,68	1937,53	0,87
124	M	26,60	67,13	0,396	2919,73	4177,62	0,70
125	M	36,19	68,78	0,526	3195,38	3230,77	0,99
126	M	50,30	153,44	0,328	2557,95	3546,13	0,72
127	M	37,26	82,98	0,449	2353,12	2955,91	0,80
128	K	17,30	52,74	0,328	10454,44	8854,03	1,18
129	K	16,86	35,70	0,472	1439,51	1465,85	0,98
130	K	12,26	57,48	0,213	1682,97	2046,72	0,82
131	K	36,30	138,87	0,261	2396,10	3868,16	0,62
132	M	64,74	106,06	0,610	2960,02	4914,40	0,60
133	M	71,01	187,11	0,380	3386,52	5664,10	0,60
134	K	22,03	49,69	0,443	1586,44	3135,14	0,51
135	K	14,37	89,94	0,160	1450,55	1883,66	0,77
136	M	13,68	22,98	0,595	452,27	885,33	0,51
137	K	29,88	91,74	0,326	2664,71	2440,99	1,09
138	K	31,23	59,26	0,527	2393,92	3819,74	0,63
139	K	36,35	76,74	0,474	2705,40	2832,87	0,96
140	K	18,22	48,68	0,374	1070,79	1447,51	0,74
141	M	21,06	90,03	0,234	2738,18	3813,08	0,72
142	M	21,77	83,58	0,261	2117,19	5141,42	0,41
143	M	33,96	118,17	0,287	3208,44	4830,91	0,66
144	K	37,27	157,65	0,236	2985,04	2701,22	1,11
145	K	22,11	70,56	0,313	1226,49	1810,19	0,68
146	K	13,80	49,17	0,281	862,70	1132,84	0,76
147	K	16,20	52,73	0,307	1956,67	2411,88	0,81
148	M	55,47	150,93	0,368	5371,27	7698,28	0,70
149	M	26,09	117,52	0,222	2988,51	5176,29	0,58

Załącznik nr 5

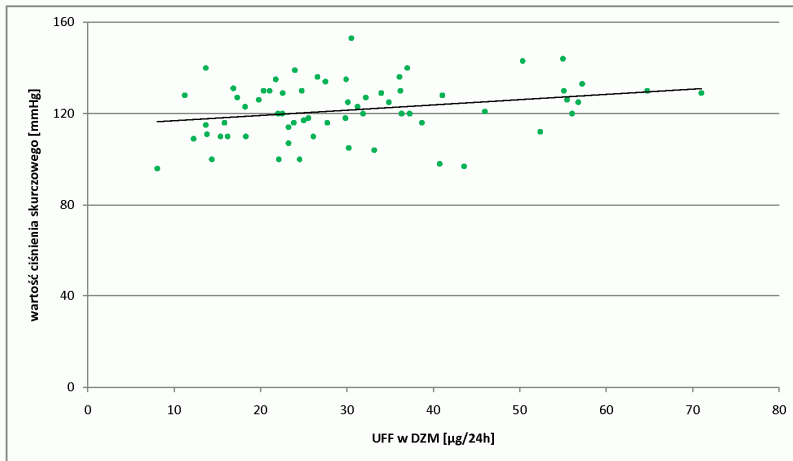
Istotne statystycznie zależności (korelacja rangowa Spearmana) zaobserwowane w przeprowadzonych badaniach.



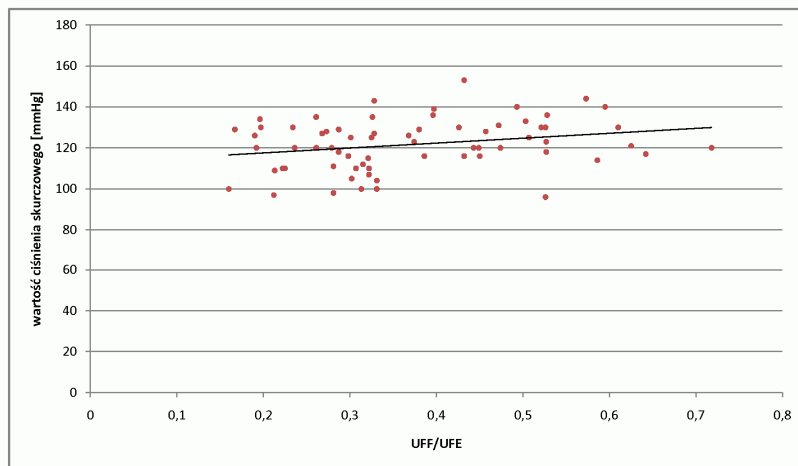
Wykres 1. Zależność ciśnienia skurczowego od stężenia E w osoczu ($p = 0,0063$; $R_s = -0,2290$) wśród wszystkich osób objętych badaniem.



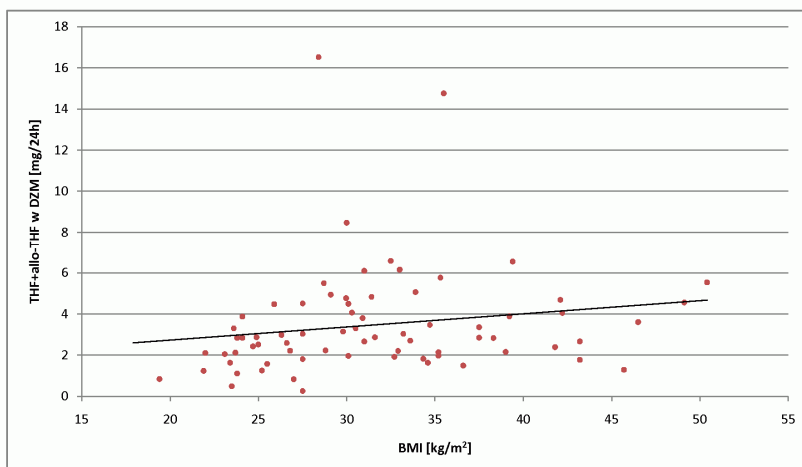
Wykres 2. Zależność ciśnienia rozkurczowego od stężenia E w osoczu ($p = 0,0036$; $R_s = -0,2436$) wśród wszystkich osób objętych badaniem.



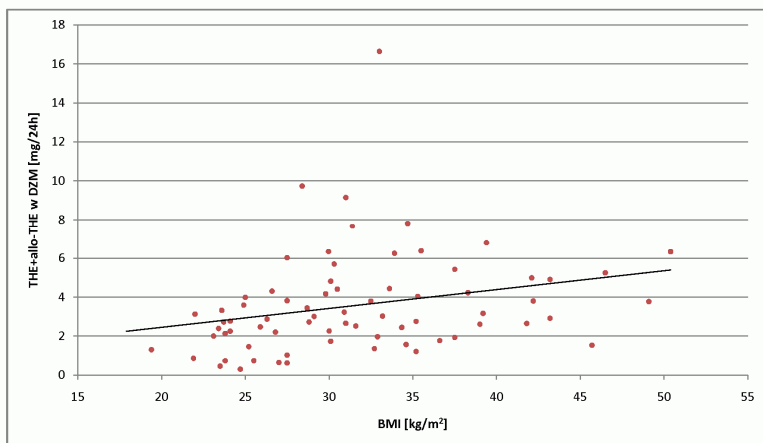
Wykres 3. Zależność ciśnienia skurczowego od ilości UFF w DZM ($p = 0,0416$; $R_s = 0,2497$) w grupie zdrowych ochotników.



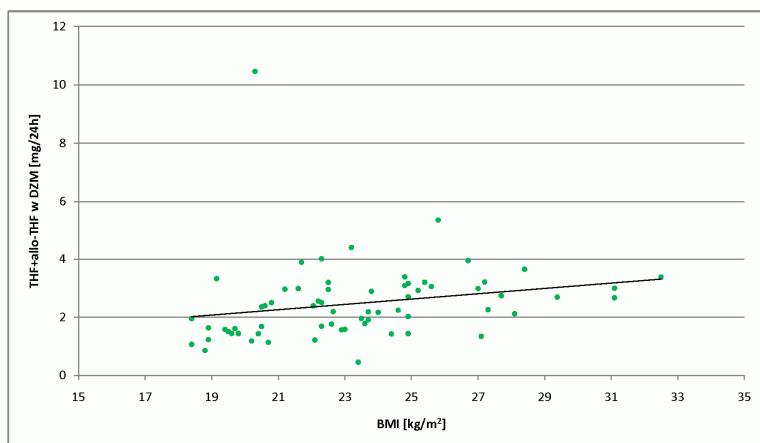
Wykres 4. Zależność ciśnienia skurczowego od wartości parametru UFF/UE ($p = 0,0374$; $R_s = 0,2548$) w grupie zdrowych ochotników.



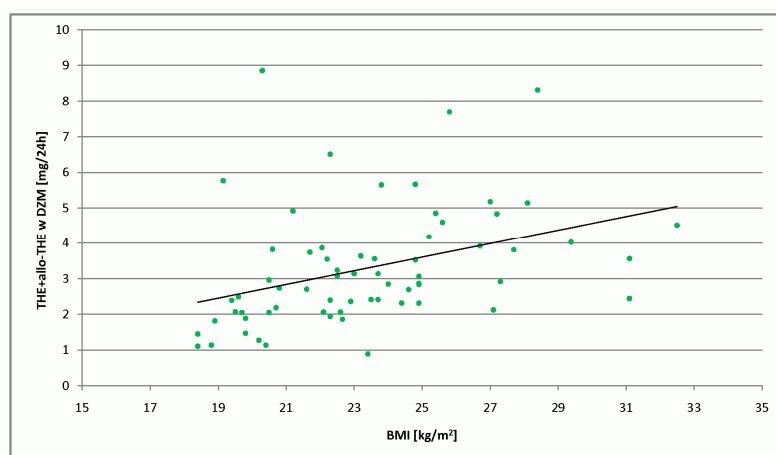
Wykres 5. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od BMI u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0074$; $R_s = 0,3129$).



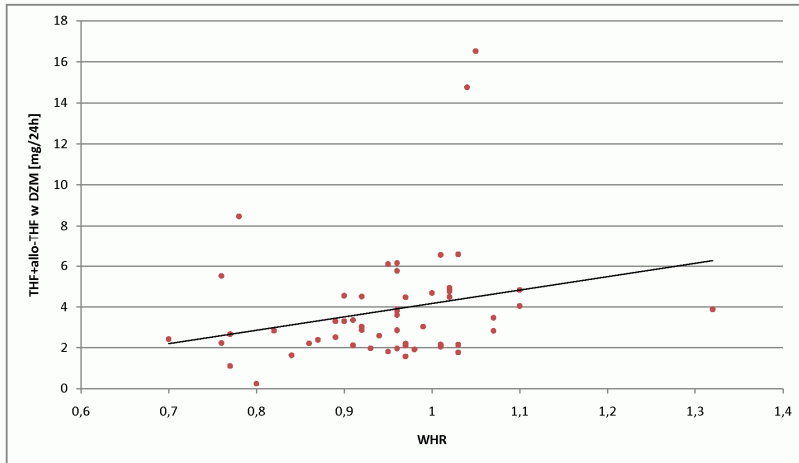
Wykres 6. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od BMI u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0009$; $R_s = 0,3841$).



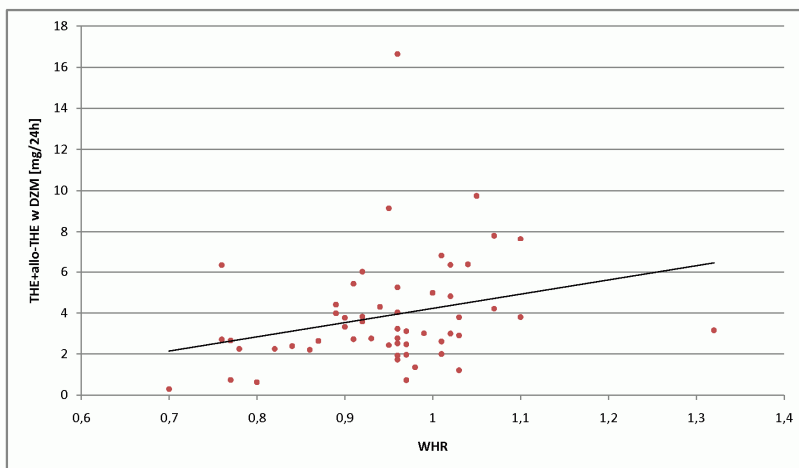
Wykres 7. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od BMI u zdrowych ochotników ($p = 0,0001$; $R_s = 0,4522$).



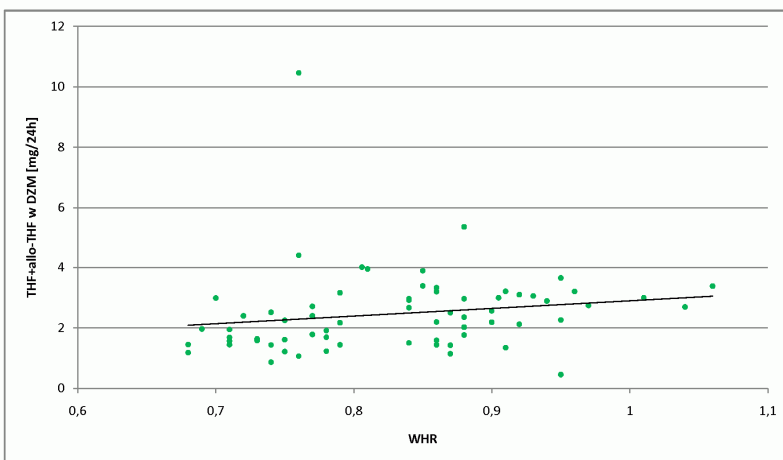
Wykres 8. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od BMI u zdrowych ochotników ($p < 0,0001$; $R_s = 0,5220$).



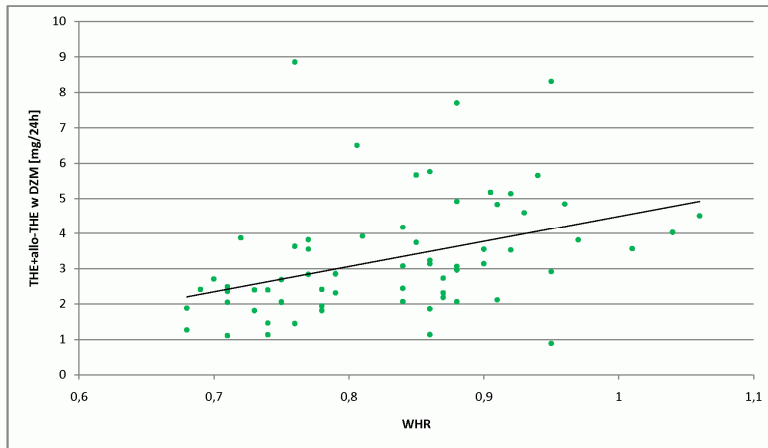
Wykres 9. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od WHR u chorych z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0356$; $R_s = 0,2840$).



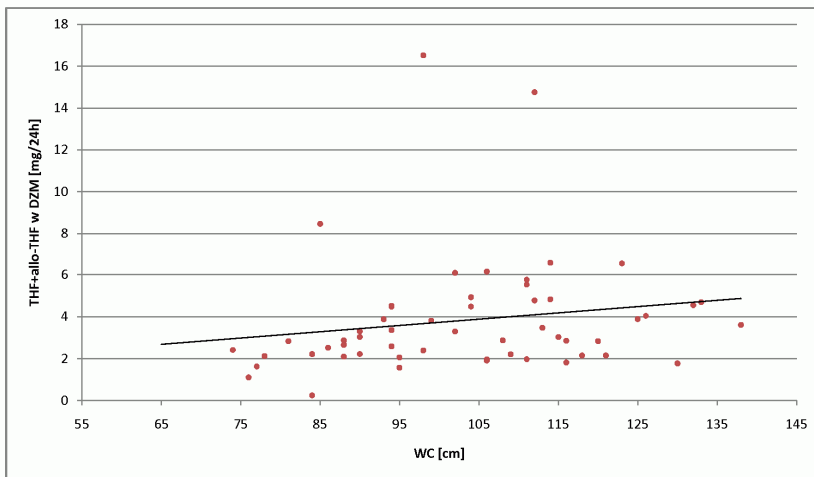
Wykres 10. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od WHR u chorych z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0170$; $R_s = 0,3206$).



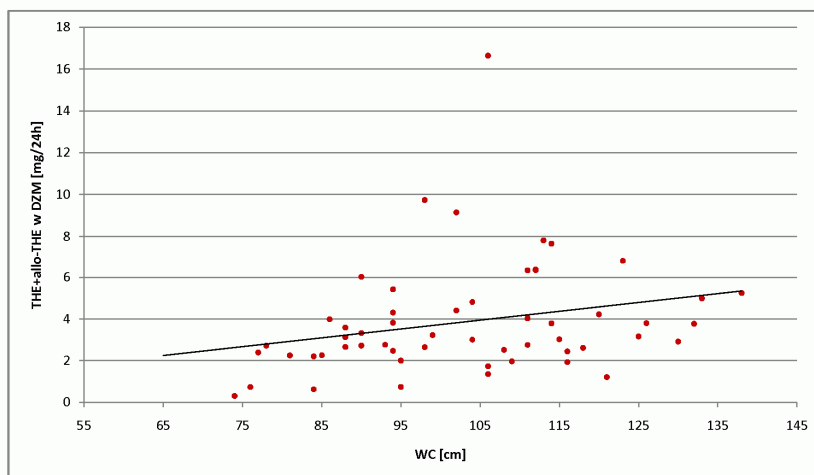
Wykres 11. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od WHR u zdrowych ochotników ($p = 0,0028$; $R_s = 0,3596$).



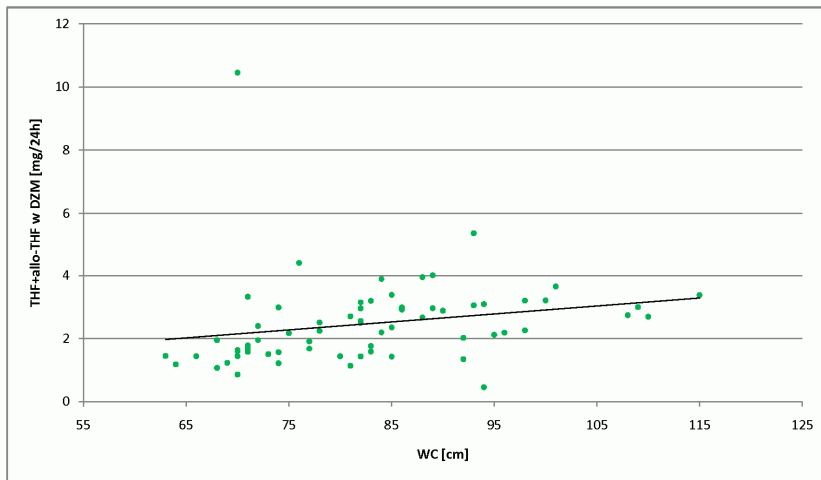
Wykres 12. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od WHR u zdrowych ochotników ($p < 0,0001$; $R_s = 0,4920$).



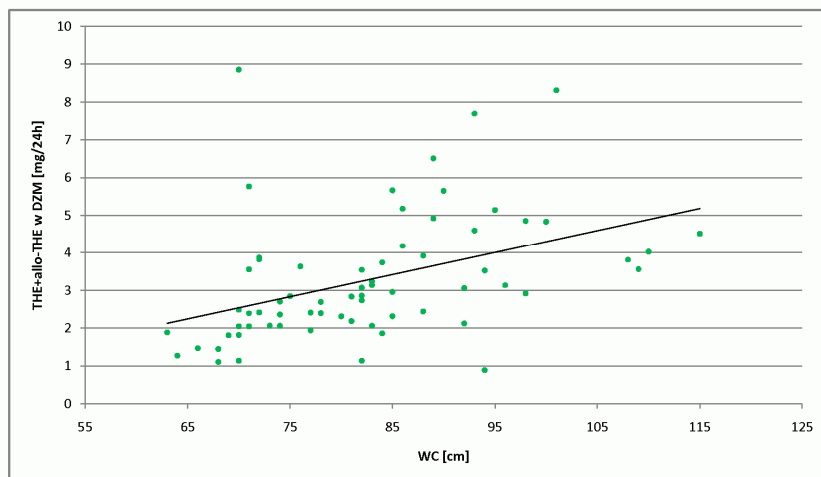
Wykres 13. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od WC u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0270$; $R_s = 0,2981$).



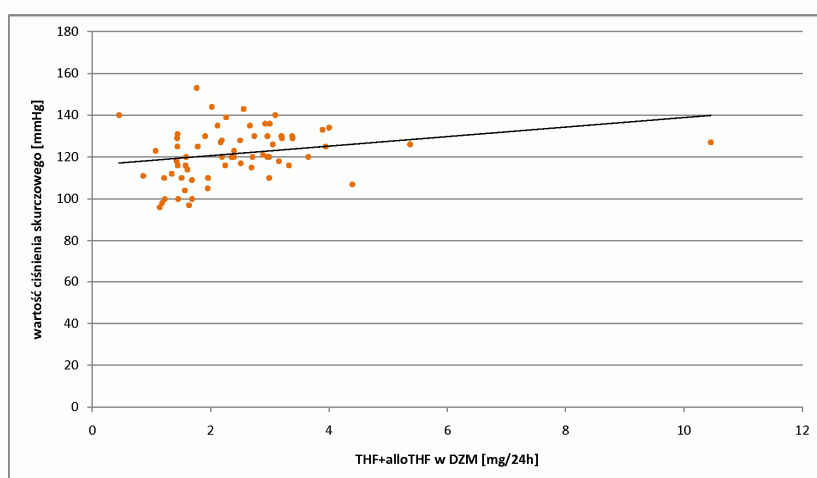
Wykres 14. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od WC u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($p = 0,0110$; $R_s = 0,3401$).



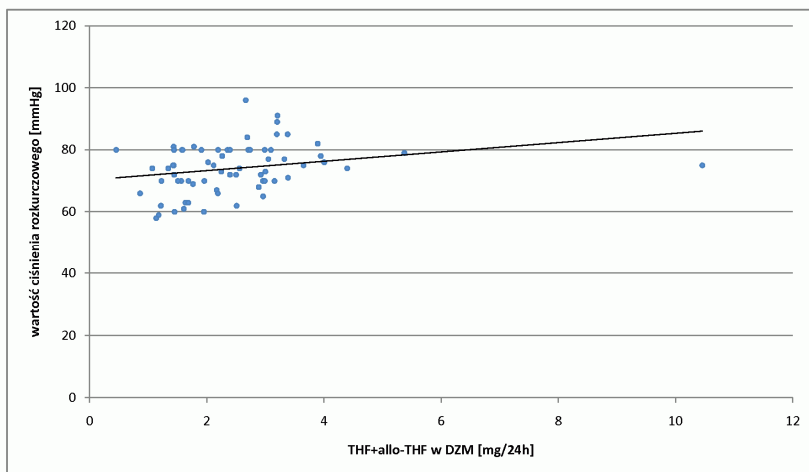
Wykres 15. Zależność ilości THF+allo-THF wydalonej w DZM od WC u zdrowych ochotników ($p < 0,0001$; $R_s = 0,4875$).



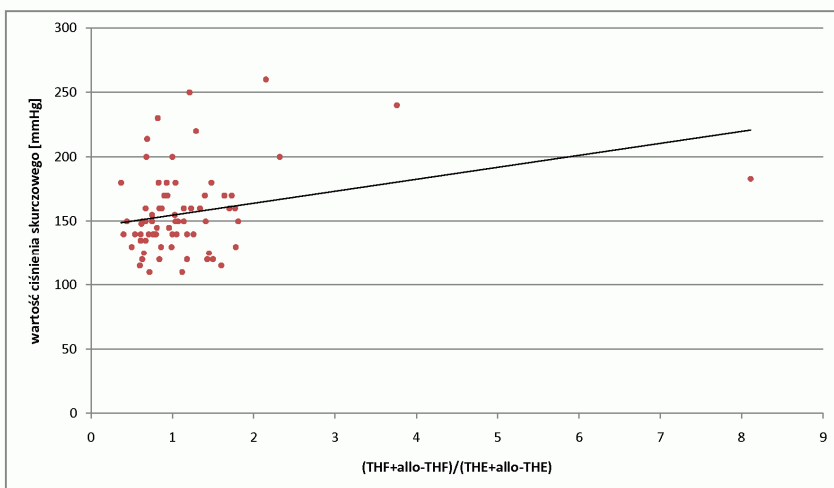
Wykres 16. Zależność ilości THE+allo-THE wydalonej w DZM od WC u zdrowych ochotników ($p < 0,0001$; $R_s = 0,5582$).



Wykres 17. Zależność wartości ciśnienia skurczowego od ilości THF+allo-THF w DZM w grupie zdrowych ochotników ($p = 0,0016$; $R_s = 0,3777$).



Wykres 18. Zależność wartości ciśnienia rozkurczowego od ilości THF+allo-THF w DZM w grupie zdrowych ochotników ($p = 0,0033$; $R_s = 0,3539$).



Wykres 19. Zależność wartości ciśnienia skurczowego od wartości parametru $(THF+allo-THF)/(THE+allo-THE)$ w grupie zdrowych ochotników ($p = 0,0307$; $R_s = 0,2548$).