

Śródbłonkowe działanie aldosteronu – implikacje terapeutyczne płynące z badań podstawowych i klinicznych

Endothelial action of aldosteron – therapeutic implications from basic and clinical research

Ł. Drelicharz¹, J. Mikita², E. Chabielska², S. Chłopicki¹

¹Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

Aldosteron jest podstawowym hormonem regulującym gospodarkę wodno-elektrolitową ustroju. Jest produkowany i wydzielany w warstwie kłębkowatej kory nadnerczy, jak również w komórkach mięśnia sercowego i w ścianie naczyń krwionośnych.

Artykuł stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat roli aldosteronu w fizjologii i patologii układu sercowo-naczyniowego. Autorzy przedstawili jądrowe i błonowe mechanizmy śródbłonkowego działania aldosteronu, w szczególności udział tych mechanizmów w wywoływaniu patologii układu sercowo-naczyniowego. Opisano także nowe wskazania terapeutyczne dla antagonistów receptorowych aldosteronu.

Abstract

Aldosterone is the main hormone regulating the water and electrolyte balance of the organism. It is produced and secreted by zona glomerulosa of the adrenal gland cortex, cardiomyocytes as well as by cells of the blood vessel wall. The article is the review of contemporary knowledge of the role of aldosterone in physiology and pathophysiology of cardiovascular system. The authors describe the nuclear and membrane mechanisms of endothelial action of aldosterone, especially their role in the development of cardiovascular system pathologies. New therapeutic indications for aldosterone receptor antagonists are also discussed.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 409-419

Wprowadzenie

Aldosteron jest podstawowym hormonem regulującym gospodarkę wodno-elektrolitową ustroju. Wytwarzany jest w warstwie kłębkowatej (*zona glomerulosa*) kory nadnerczy. Za pośrednictwem receptorów cytoplazmatycznych zlokalizowanych w nabłonku kanalików nerkowych, jelit, gruczołów potowych i ślinianek aldosteron reguluje (re)absorbpcję Na⁺ i wody oraz sekrecję K⁺. Głównymi czynnikami stymulującymi korę nadnerczy do wydzielania aldosteronu są angiotensyna II i jony K⁺. Mniejsze znaczenie w regulacji wydzielania aldosteronu ma ACTH. Nawet niewielki wzrost aktywności układu renina-angiotensyna lub stężenia K⁺ w osoczu

mogą spowodować kilkukrotny wzrost wydzielania aldosteronu, podczas gdy ACTH odpowiada głównie za dobowe wahania poziomu aldosteronu [1–3].

Przez wiele lat uważano, że aldosteron jest produkowany i wydzielany jedynie przez komórki *zona glomerulosa* kory nadnerczy. Ostatnie lata przyniosły dowody na to, że aldosteron może być również produkowany w komórkach mięśnia sercowego, w ścianie naczyń krwionośnych, jak również w komórkach nerwowych. Receptory dla mineralokortykoidów znajdują się nie tylko w komórkach nabłonkowych nerek, jelit, gruczołów potowych i ślinianek, ale również w komórkach mięśnia sercowego, naczyń krwionośnych, tkanki mózgowej. Tak więc aldosteron, produkowany lokalnie

Adres do korespondencji:

Stefan Chłopicki, Zakład Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Grzegorzeczka 16, 31-531 Kraków tel.: +48 12 421 11 68, +48 12 294 34 44, faks: +48 12 421 72 17, e-mail: mfschlop@cyf-kr.edu.pl

w ścianie naczynia lub w mięśniu sercowym, może wywierać bezpośrednie działanie na układ sercowo-naczyniowy, niezależnie od klasycznego nerkowego działania aldosteronu z kory nadnerczy na gospodarkę wodno-elektrolitową. Co więcej, w patologii układu krążenia aldosteron zyskuje coraz większe znaczenie jako lokalny przekaźnik, podczas gdy jego działanie hormonalne schodzi na dalszy plan.

Wciąż jednak niewiele wiadomo o fizjologicznej czynności aldosteronu wytwarzanego lokalnie. Być może w fizjologii lokalne działanie aldosteronu ma również związek z homeostazą elektrolitową komórki. Bez względu na te niejasności, intrygujący i ważny wydaje się fakt, że to patologiczne działanie aldosteronu ogniśkuje się w śródbłonku.

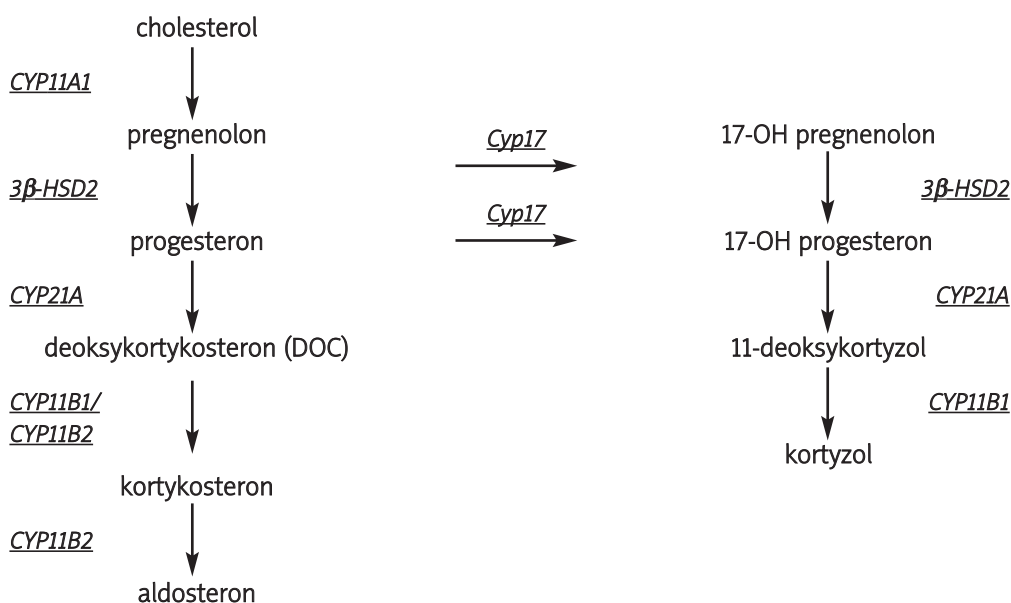
Śródbłonek naczyniowy nie jest *ptachtą celofanu* z *powklejanymi jądrami komórkowymi* oddzielającą przestrzeń wewnątrznaczyniową od otaczających tkanek, ale stanowi narząd wydzielniczy ustroju. Prawidłowy śródbłonek jest wyznacznikiem zdrowego układu sercowo-naczyniowego, a choroby układu krążenia, takie jak choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, miażdżyca, zawsze przebiegają z pierwotnym lub wtórnym upośledzeniem funkcji śródbłonka. Prawidłowa czynność śródbłonka naczyniowego jest jednym z najważniejszych czynników rokowniczych we współczesnej kardiologii, a jego dysfunkcja często pierwszym objawem (niestety niemyym klinicznie) nadchodzącej choroby [4]. Patologiczne działanie aldosteronu na śródbłonek, wywołujące dysfunkcję śródbłonka, może więc mieć bardzo groźne skutki dla układu krążenia.

Istotnie, pacjenci z zespołem pierwotnego aldosteronizmu (PA) charakteryzują się częstszym występowaniem powikłań narządowych, takich jak przerost serca, tętniaki naczyń mózgowych i krwawienia podpajęczynówkowe, uszkodzenie nerek [5, 6]. Częstość powikłań jest niewspółmierna do nadciśnienia tętniczego towarzyszącego PA i zależy od wysokich wartości krążącego aldosteronu. Wyższy poziom aldosteronu, ale mieszczący się w granicach fizjologicznych, predysponuje do rozwoju nadciśnienia tętniczego u człowieka [7]. Badania CONSENSUS I i SAVE wykazały, że u pacjentów z niewydolnością serca podwyższone wartości krążącego aldosteronu korelują z gorszym rokowaniem.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie mechanizmów śródbłonkowego działania aldosteronu, a w szczególności udział tych mechanizmów w wywołaniu patologii układu sercowo-naczyniowego. Wynikają z tego bowiem nowe wskazania terapeutyczne dla antagonistów receptorowych aldosteronu (antagoniści receptora aldosteronowego – ARA).

Lokalna synteza aldosteronu w ścianie naczynia i w mięśniu sercowym

Synteza aldosteronu w warstwie kłębkowatej (*zona glomerulosa*) kory nadnerczy przebiega w kilku etapach (Rycina 1.). Ludzkie komórki śródbłonka i mięśni gładkich aorty i tętnicy płucnej wyposażone są w identyczny, pełny zestaw enzymów do produkcji aldosteronu *de novo* z cholesterolu. Aldosteron w tych komórkach może również powstawać z prekursorów krążących we krwi, np. z dezoksy-



Rycina 1. Biosynteza aldosteronu w korze nadnerczy

kortykosteronu (DOC). W przeciwieństwie do jednoznacznych dowodów co do zdolności komórek ściany naczyń do produkcji aldosteronu, nie ma takiej pewności co do tego, czy aldosteron wytwarzają komórki dojrzałego mięśnia sercowego w warunkach fizjologicznych [8, 9].

Istotnie, w kardiomiocytach ludzkiego serca wykryto transkrypcję genów niezbędnych do syntezy aldosteronu (tj. CYP11A1, CYP21A, 3 β -HSD typ 2), ale transkrypt genu syntazy aldosteronu (CYP11B2) wykryto jedynie w sercach płodowych [10] i w niewydolności serca [11], co może wskazywać na to, że synteza aldosteronu jest jednym z elementów fenotypu płodowego mięśnia sercowego, obecnego w sercach płodowych i uruchamianego w odpowiedzi przerostowej kardiomiocytów. Również po ostrym zawale serca stwierdzono pojawienie się transkrypcji genu CYP11B2 w mięśniu sercowym [12]. Co więcej, wykryto bezpośrednią korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA dla CYP11B2 a objętością kolageny w przewlekłej niewydolności serca [13–15].

Nie wszyscy autorzy jednak potwierdzają, że wytwarzanie aldosteronu zwiększa się w niewydolnym mięśniu sercowym. Dla przykładu Mizano i wsp. opisuje zwiększoną produkcję aldosteronu w niewydolnym sercu ludzkim, nie potwierdzają tego natomiast badania Tsutsamoto i wsp. [16, 17]. Kontrowersje budzi również intensywność lokalnej produkcji aldosteronu przez kardiomiocyty i udział *sercowej* produkcji aldosteronu w zmianach poziomu aldosteronu w osoczu.

Warto dodać, że aldosteron jest również produkowany w centralnym systemie nerwowym, gdzie odpowiada m.in. za centralną regulację ciśnienia tętniczego krwi [18–20]. Wykazano, że dokomorowe podanie ARA (RU-28318) normalizowało podwyższone ciśnienie tętnicze krwi (wywołane parenteralnym podaniem aldosteronu), ale nie zapobiegało narządowym (sercowym, naczyniowym, nerkowym) powikłaniom hiperaldosteronizmu [21].

Receptory dla aldosteronu

Od czasu izolacji i scharakteryzowania aldosteronu (przeszło 50 lat temu) zwykło się uważać, że jest on produkowany w korze nadnerczy i podobnie do wielu innych hormonów sterydowych działa przez swoisty receptor zlokalizowany w cytoplazmie komórek docelowych, w tym przypadku receptor dla mineralokortykoidów w komórkach nabłonkowych nerek, jelit, gruczołów potowych i ślinianek. Receptor dla mineralokortykoidów należy do nadrodziny receptorów jądrowych, do której należą również receptory dla glikokortykoidów, witaminy D, hormonów tarczycy, kwasu retinowego oraz tzw. receptory sieroce (*orphan receptors*). Receptory jądrowe po przyłączeniu ligandu (hormonu) przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego i tam regulują procesy transkrypcji i translacji prowa-

dzące do syntezy białek odpowiedzialnych za transport jonów przez błonę komórkową komórek nabłonkowych. Jednak odkrycie bezpośredniego wpływu aldosteronu nie tylko na mięsień sercowy, naczynia krwionośne, ale również na limfocyty, erytrocyty i CSN oraz istnienie natychmiastowego *pozagenowego* działania aldosteronu na komórki docelowe każe nam zrewidować dotychczasowe rozumienie mechanizmów działania aldosteronu.

Klasyczny, jądrowy mechanizm działania aldosteronu

Cytoplazmatyczny receptor dla aldosteronu zbudowany jest z trzech domen, pełniących różne funkcje. Domena przy końcu karboksylowym odpowiada za łączenie się z hormonem, środkowa domena odpowiada za połączenie z DNA, a domena przy końcu aminowym za połączenie z innymi czynnikami regulującymi transkrypcję. Przyłączenie ligandu (hormonu) powoduje oddysocjowanie białek szoku cieplnego (HSP), dimeryzację receptora i przemieszczenie go z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do interakcji ze specyficznymi sekwencjami DNA, wywołującymi transkrypcję – tzw. elementami odpowiedzi na hormon (SREs *steroid response elements*) lub z regionami hamującymi transkrypcję (nSREs *negative steroid response elements*). Opisano również możliwość regulacji transkrypcji przez interakcję kompleksu hormon-receptor z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, a więc bez wiązania się z DNA [22, 23]. Ponieważ efekt biologiczny aldosteronu związany z aktywnością receptora jądrowego wymaga zmiany ekspresji genów i syntezy nowych białek, pierwsze zmiany czynności komórek i widoczny klinicznie efekt pojawiają się z kilkugodzinnym opóźnieniem. Selektywność działania aldosteronu zależy od obecności receptorów jądrowych dla mineralokortykoidów w tkankach docelowych. *In vitro* receptor dla mineralokortykoidów wykazuje podobne powinowactwo względem mineralo- jak i glikokortykoidów (GKS), co oznacza, że w komórce hormony te mogą konkurować o wiązanie w receptorem dla mineralokortykoidów i z receptorem zwiąże się ten hormon, którego stężenie w otoczeniu receptora będzie większe. Ponieważ poziom kortyzolu w osoczu jest 100–1 000 razy wyższy niż poziom aldosteronu, receptor dla mineralokortykoidów powinien być *zajęty* wyłącznie przez glikokortykoidy. Ten paradoks udało się rozwiązać dzięki odkryciu dehydrogenazy 11- β -hydroksysteroidowej typ 2 (11 β -HSD2). Ten enzym występuje w komórkach nabłonkowych, wrażliwych na aldosteron i rozkłada glikokortykoidy do pochodnych o niskim powinowactwie do receptorów dla mineralokortykoidów (u człowieka kortyzol do kortyzonu) i w ten sposób zapewnia tkankową selektywność aldosteronu [24]. Te badania ujawniają, że działanie

biologiczne aldosteronu może być ściśle związane z działaniem glikokortykoidów, w tkankach docelowych posiadających receptor dla mineralokortykoidów, a nieposiadających 11 β -HSD2. Równocześnie świadczą o tym, że zmiany aktywności 11 β -HSD2 mogą w istotny sposób modulować wrażliwość tkanek na aldosteron i glikokortykoidy. 11 β -HSD2 wykryto w kardiomiocytach [25], w komórkach mięśni gładkich naczyń [26] i w śródbłonku [27], tzn. w tych komórkach, które odpowiadają za patologiczne działania aldosteronu w układzie krążenia.

Pozagenowy mechanizm działania aldosteronu

Warto zaznaczyć, że pierwsze dowody świadczące o *pozagenowym*, szybkim działaniu aldosteronu pochodzą sprzed ponad 40 lat! W 1964 r. Klein i Henk wykazali, że u zdrowych ludzi dożylnie podanie aldosteronu w ciągu 5 min wywoływało wzrost oporu obwodowego i spadek rzutu serca [28]. Tak szybki efekt działania aldosteronu nie mógł być wytłumaczony klasycznym, jądrowym mechanizmem działania aldosteronu. Rok później Spach i Streen wykazali wpływ aldosteronu na błonowy transport jonów Na⁺ w erytrocytach [29]. Już wtedy nie było wątpliwości, że chodzi o działanie *pozagenowe* aldosteronu erytrocyty nie posiadają przecież jądra komórkowego.

Znaczenie biologiczne *pozagenowego* mechanizmu działania aldosteronu potwierdzono w wielu modelach eksperymentalnych i w różnych typach komórek, m. in. w komórkach mięśni gładkich naczyń, limfocytach, komórkach śródbłonka, kardiomiocytach, komórkach nabłonkowych jelit i nerek [1, 30–33].

Choć nie zidentyfikowano jeszcze receptora błonowego dla aldosteronu odpowiedzialnego za *pozagenowe* skutki działania aldosteronu [32], wiadomo, że jego aktywacja prowadzi do uruchomienia mechanizmów wtórnego przekazywania zależnych od diacyloglicerolu (DAG), trójforanu inozytoli (IP₃), kinazy białkowej C (PKC), cAMP [33–36], co doprowadza (w ciągu 2–3 min) do zmian aktywności wymiennika Na⁺/H⁺ (NHE3), kanałów K⁺ oraz innych białek odpowiedzialnych za równowagę elektrolitową komórki oraz poziom [Ca²⁺]_i. Warto dodać, że istnieje wiele dowodów na to, że receptor błonowy i receptor jądrowy funkcjonują niezależnie. Dla przykładu, w fibroblastach myszy genetycznie pozbawionych receptora MR (MR *knockout*) aldosteron wywoływał *natychmiastowy* wzrost poziomu [Ca²⁺]_i i cAMP [37]. Z drugiej strony zablokowanie receptora jądrowego dla mineralokortykoidów przez spironolakton lub kanrenon nie wpływało na *natychmiastowe* działanie aldosteronu (wzrost [Ca²⁺]_i i IP₃) w komórkach śródbłonka [38, 39]. Ciekawe, że eplerenon, RU-28318 i spi-

ronolakton hamowały natychmiastowy napływ jonów Na⁺ i wzrost poziomu [Ca²⁺]_i w mięśniówce gładkiej naczyń [40, 41]. Pomimo więc odrębności receptora jądrowego i błonowego i uruchamianych przez nie szlaków sygnałowych, istnieje możliwość, że niektóre leki z grupy antagonistów aldosteronu wpływają na jądrowe i błonowe skutki działania aldosteronu.

Warto dodać, że istnieje również taka możliwość, że niektóre skutki działania aldosteronu, które przypisuje się działaniu *pozagenowemu*, mogą jednak wynikać z pobudzenia klasycznego receptora MR w cytoplazmie. *Szybka ścieżka* sygnalizacyjna uruchamiana przez aktywację receptora jądrowego może być związana np. z aktywacją białek jądrowych, np. HSP90 i HSP70, które oddysocjują od receptora po przyłączeniu ligandu (hormonu) i aktywują system wtórnych przekaźników w cytoplazmie [42].

Podsumowując, zarówno jądrowe, jak i błonowe mechanizmy działania aldosteronu odgrywają rolę w działaniu aldosteronu na układ sercowo-naczyniowy, jednak powiązania pomiędzy nimi i szlaki sygnalizacyjne nie są do końca poznane.

Patologiczne działanie aldosteronu na śródbłonek naczyń krwionośnych

Fenotyp zdrowego śródbłonka wyznacza wytwarzanie naczynioprotekcyjnych przekaźników, takich jak tlenku azotu (NO) tworzony z L-argininy przez homodimer oksydoreduktazy NOS-3, prostacyklina (PGI₂) wytwarzana z kwasu arachidonowego (AA) przez cyklooksygenazy COX-1 lub COX-2, EDHF (śródbłonkowy czynnik hyperpolaryzacyjny) i wyciszenie aktywności przeciwwzapalnych i przeciwzakrzepowych mechanizmów śródbłonka (np. IL-6, ICAM, PAI-1). Z drugiej fenotyp dysfunkcji śródbłonka wyznaczają upośledzenie wytwarzania przekaźników naczynioprotekcyjnych, nadmierne wytwarzanie anionu nadtlenkowego (O₂⁻) przez oksydazy (np. NAD (P) H-zależną albo ksantynową lub przez monomer NOS-3) i zwiększona ekspresja prozapalnych cytokin (np. IL-6, IL-8), chemokin (np. MCP-1) cząsteczek adhezyjnych (np. selektyna P, selektyna E, ICAM-1, VCAM-1) oraz aktywacja prozakrzepowych mechanizmów śródbłonka (np. PAI-1) [43]. Wiele jest mechanizmów przyczyniających się do rozwoju dysfunkcji śródbłonka. Ostatnie lata wskazują na to, że w niektórych patologiach układu krążenia winowajcą dysfunkcji śródbłonka może być aldosteron.

Aldosteron i aktywność śródbłonkowego NO

Aldosteron upośledza aktywność biologiczną śródbłonkowego NO. Zarówno podany jednorazowo dożylnie

nie [44], jak i podawany długoterminowo [45] aldosteron upośledza odpowiedź rozkurczową naczyń na acetylocholinę, która zależy od śródbłonkowego NO. U pacjentów z niewydolnością krążenia, jak również w modelach zwierzęcych pozawatowej niewydolności krążenia zastosowanie antagonistów receptora MR spironolaktonu lub eplerenonu związane było z normalizacją zależnej od NO funkcji śródbłonka [44, 46–48]. W jakim mechanizmie aldosteron może wywoływać upośledzenie aktywności śródbłonkowego NO? Sugeruje się, że aldosteron ma wpływ zarówno na ekspresję NOS-3 w śródbłonku, jak i na wytwarzanie anionów ponadtlenkowych (O_2^-). Anion ponadtlenkowy jawi się dzisiaj jako ważny czynnik regulacji aktywności biologicznej NO, bowiem w jednej z najszybszych znanych reakcji, dokonującej się pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami NO i O_2^- unieczynnia NO, tworząc nadtlenoazotyn ($ONOO^-$).

Istotnie wykazano, że aldosteron nasila, a antagoniści receptora dla aldosteronu (ARA) zmniejszają wytwarzanie anionu ponadtlenkowego, zależne od oksydazy NADPH w ścianie naczyń krwionośnych i w mięśniu sercowym [47, 49–53]. Wykazano również, że zastosowanie ARA (eplerenon) prowadzi do zwiększenia ekspresji eNOS w śródbłonku u szczurów z nadciśnieniem [54, 55]. Zmniejszenie *stresu oksydacyjnego* przez probucol lub N-acetylocysteinę również zmniejszało powikłania narządowe wywołane przez aldosteron [56–58]. Można więc sądzić, że aldosteron zmniejsza aktywność biologiczną NO, nie tylko nasilając rozpad NO, ale również zmniejszając ekspresję syntazy NO. Warto dodać, że nadtlenoazotyn ($ONOO^-$) powstający w reakcji NO i O_2^- nitruje tyrozynę 430 i unieczynnia również syntazę prostacykliny (PGI-S). Jak dotąd brak jednak przekonujących danych świadczących o istnieniu bezpośredniej zależności między aktywnością aldosteronu a produkcją PGI_2 przez śródbłonek. Paradoksalnie wykazano, że prostacyklina może być mediatorem dysfunkcji śródbłonka wywołanej przez aldosteron [59]. Jednak do tej pracy można mieć dużo zastrzeżeń merytorycznych.

Wykazano również, że aldosteron wpływa na przezłonowy transport jonów w ludzkich komórkach śródbłonka (HUVECSs), powodując obrzęk komórek zależny od aktywacji kanałów Na^+ . Fizjologiczne znaczenie tego zjawiska nie jest jednak poznane [60].

Ciekawe, że aldosteron zmniejsza aktywność biologiczną NO za pośrednictwem podobnych mechanizmów jak angiotensyna II. Rzeczywiście, blokada aldosteronu hamowała *stres oksydacyjny* w ścianie naczyń wywołany przez angiotensynę II [51]. Czyżby więc aldosteron był faktycznym wykonawcą aktywacji mechanizmów wolnorodnikowych w ścianie naczyń uruchamianych przez angiotensynę II?

Aldosteron i aktywacja zapalna śródbłonka

Zwykle upośledzenie biologicznej aktywności NO idzie w parze z rozbujającą aktywnością zapalną śródbłonka. Tak też jest w przypadku działania aldosteronu na ścianę naczyń. Jego toksyczne działania na ścianę naczyń wyznaczają procesy odpowiedzi zapalnej naczyń, które mogą doprowadzić do uszkodzenia nie tylko samej ściany naczyń, ale również otaczających je tkanek [61–65]. Na poziomie morfologicznym egzogeny aldosteron może wywołać zapalenie okołonaczyniowe z pogrubieniem warstwy środkowej, naciekiem leukocytów i proliferacją tkanki łącznej okołonaczyniowej z towarzyszącą martwicą ogniskową, nie tylko w sercu, ale również w nerkach oraz tkance mózgowej [62, 66, 67]. Co najważniejsze, Rocha i wsp. [68] wykazali, że zmiany morfologiczne w naczyniach i tkance okołonaczyniowej są poprzedzone pojawieniem się fenotypu zapalnego śródbłonka w naczyniach wieńcowych obejmującego wzrost ekspresji COX-2, MCP-1, osteopontyny, ICAM-1, VCAM-1. W tych doświadczeniach eplerenon hamował zarówno pojawienie się fenotypu zapalnego śródbłonka, jak i późniejsze, pozapalne zmiany morfologiczne naczyń wieńcowych.

Warto dodać, że hamujące działanie eplerenonu na fenotyp zapalny śródbłonka, w tym na ekspresję molekuł adhezyjnych (ICAM-1 i VCAM-1) [54], jest związane ze wzrostem ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu.

Poza powyższymi stwierdzeniami mechanizmy, w jakich aldosteron indukuje odpowiedź zapalną śródbłonka, nie są poznane. Wydaje się, że wraz z aldosteronem uczestniczą w niej inne układy przekaźnikowe (układ renina-angiotenzyna, endotelina), a wzajemne zależności pomiędzy nimi są bardzo złożone. Istotnie, udowodniono, że nie tylko ARA [68–70], ale również antagonizm receptorów angiotensynowych (AT_1) [71–73] i endotelinowych (ET_A) [63, 74, 75] chronił serce czy nerki przed uszkodzającym działaniem aldosteronu.

Ponadto zmniejszanie poziomu $[Ca^{2+}]_i$ przez dihidropirydyny [76] lub blokery kanałów Ca^{2+} typu T oraz hamowanie wymiennika Na/H przez celiporid [77] hamowały proces zapalny w ścianie naczyń, a w konsekwencji również toksyczne działanie aldosteronu na narządy (serce, nerki). Intrygujące jest więc przypuszczenie, że mechanizmy pośredniczące w odpowiedzi śródbłonka na aldosteron mają związek z homeostazą jonową komórki.

Aldosteron i mechanizmy prozakrzepowe śródbłonka

Aktywacja zapalna śródbłonka jest ściśle związana z fenotypem prozakrzepowym śródbłonka. Znów profil działania aldosteronu na śródbłonek zdaje się potwierdzać te zależności. Z jednej strony aldosteron aktywuje

mechanizmy prozakrzepowe śródbłonka, z drugiej hamuje śródbłonkowe mechanizmy fibrynolizy.

W hodowlach komórkowych śródbłonka, jak również i innych komórek, aldosteron zwiększa ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) i to działanie zależne jest od receptora dla mineralokortykoidów [78, 79]. Istotnie, w promotorze genu kodującego PAI-1 odkryto miejsce wrażliwe na działanie gliko- i mineralokortykoidów (*Glucocorticoid Responsive Element* – GRE), zaś mutacja w tym regionie znosi oddziaływanie aldosteronu na aktywność PAI-1 [78].

W badaniach doświadczalnych w modelach zwierzęcych dożylnie podanie aldosteronu przyspieszało formowanie zakrzepu tętniczego [80] jak też mikrangiopatii zakrzepowej u szczurów z nadciśnieniem samoistnym ze skłonnością do udarów (SHRSP) [81]. Natomiast w modelu mysim miażdżycy (myszy LDLR^{-/-}), 18-tygodniowa infuzja spironolaktonu wydłużała czas powstawania zakrzepu tętniczego. Ten efekt był związany z poprawą aktywności śródbłonkowego NO, co wskazuje że zmiany aktywności PAI-1, tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i NO są powiązane [80].

Z kolei w badaniach klinicznych stwierdzono, że istnieje korelacja między podwyższonym stężeniem aldosteronu a stężeniem antygeny PAI-1 w osoczu u pacjentów z nadciśnieniem i pierwotnym hyperaldosteronizmem [78, 82, 83]. U pacjentów z nadciśnieniem leki z grupy ARA obniżały stężenie PAI-1 [78, 84], oraz zwiększały stężenie t-PA [82, 84].

Tak więc aldosteron ma działanie prozakrzepowe zależne od śródbłonkowej aktywności PAI-1 i t-PA oraz od NO. Przeciwwzakrzepowe działanie NO jest nie tylko związane z jego działaniem na aktywność PAI-1 [85] i tPA [86], ale również z działaniem przeciwtytkowym tego przekaźnika.

Istotnie w pozawałowej niewydolności serca u szczurów podwyższona aktywność płytek krwi była tłumiona przez eplerenonem. Świadczyły o tym obniżenie ekspresji płytkowej P-selektyny oraz zmniejszenie wiązania fibrynogenu z receptorem GPIIb/IIIa. To przeciwtytkowe działanie eplerenonu zależne było częściowo od tlenu azotu [87].

Działanie śródbłonkowe aldosteronu a włóknienie

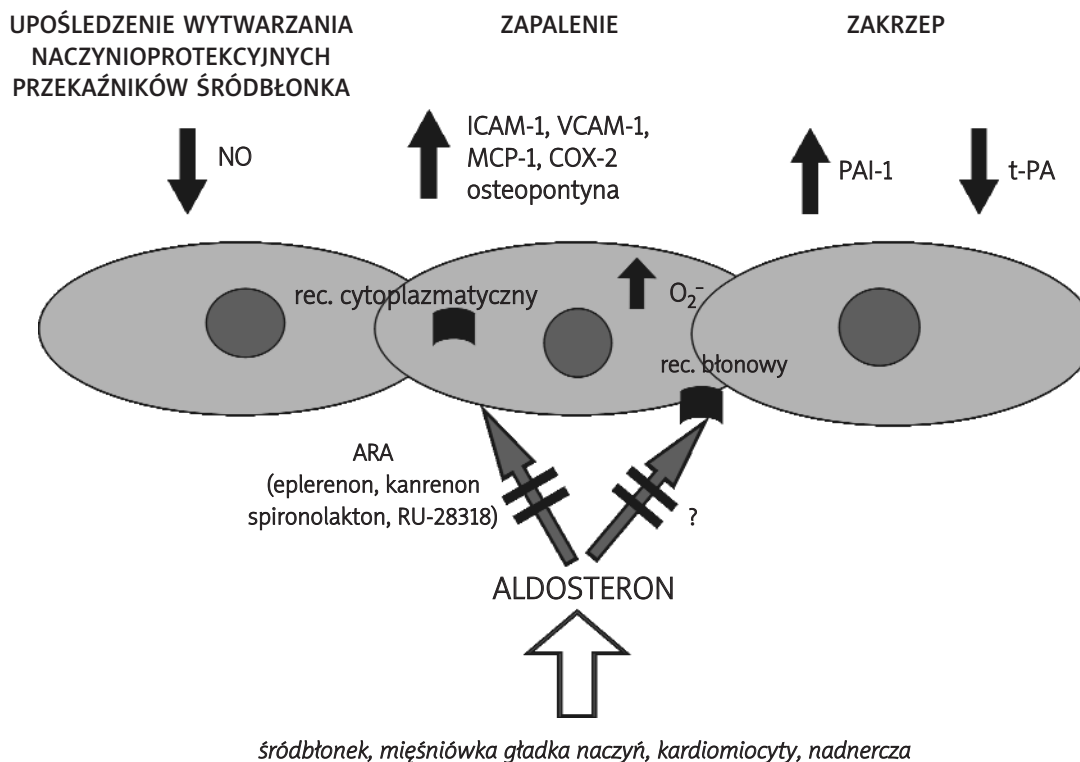
W badaniach klinicznych wielokrotnie podkreślano, że antagoniści aldosteronu zmniejszają włóknienie serca, co może sugerować bezpośredni wpływ aldosteronu na fibroblasty i syntezę kolagenu. Istotnie, w wielu eksperymentalnych modelach podwyższony poziom aldosteronu korelował z włóknieniem podścieliska w mięśniu sercowym i nerkach [88-91], a leki z grupy ARA hamowały ten proces. Kontrowersje budzi jednak mecha-

nizm, w jakim aldosteron stymuluje fibroblasty i nasila odkładanie się kolagenu (głównie typu I i III). Badania *in vitro* nad bezpośrednim wpływem aldosteronu na fibroblasty przynoszą sprzeczne dane [92-94]. Większość badaczy przychyliła się do opinii, że włóknienie jest konsekwencją zapalenia i uszkodzenia ścian naczyń, ogniskowej martwicy okołonaczyniowej [95, 96] oraz zwiększania przez aldosteron m.in. syntezy receptora AT₁ [15], enzymu konwertującego (ACE) [97], endoteliny [98] i receptorów endoteliny [99], a także receptora B₂ (bradykininy) [100]. Powyższe szlaki mają udowodniony bezpośredni lub pośredni wpływ na procesy włóknienia. Również dynamika procesu przemawia za pośrednim mechanizmem działania aldosteronu, ponieważ wzrost sercowego kolagenu zależny od aldosteronu nie jest natychmiastowy i pojawia się po kilku tygodniach [95, 101], natomiast zmiany zapalne i markery zapalenia już po tygodniu podawania aldosteronu [102].

Włóknienie okołonaczyniowe i podścieliska jest więc skutkiem procesu zapalnego toczącego się w ścianie naczyń, u którego podstaw leży, zależne od aldosteronu, upośledzenie ochronnej czynności śródbłonka i aktywacja zapalna śródbłonka. Skuteczność ARA w hamowaniu procesu włóknienia może więc również mieć podłoże śródbłonkowe.

Działanie śródbłonkowe aldosteronu a jego działanie proarytmiczne

Aldosteron wywiera działanie proarytmiczne, choć mechanizm nie jest do końca poznany. Wywołując zaburzenia elektrolitowe (spadek K⁺, Mg²⁺), przerost, włóknienie miocardium, dysfunkcję skurczową i rozkurczową serca, hamowanie wychwytu katecholamin i wzrost gęstości receptorów β-adrenergicznych, aldosteron może pośrednio doprowadzać do wystąpienia arytmii komorowych [103, 104]. Również bezpośredni wpływ aldosteronu na kardiomiocyt wydaje się mieć niebagatelne znaczenie. Wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego (*action potential duration*, APD) w wyniku tzw. remodelingu elektrycznego jest odpowiedzialne za arytmie w przerostym mięśniu sercowym. Udowodniono, że aldosteron nasila prąd Ca²⁺ (I_{Ca}) oraz hamuje prąd K⁺ (I_{Ko}), co doprowadza do wydłużenia APD i może odpowiadać za efekt proarytmiczny aldosteronu. Zastosowanie RU-29318 (selektywnego antagonisty receptorów dla mineralokortykoidów) hamowało *remodeling* elektryczny po zawale serca u szczurów [105]. Podobnie spironolakton u pacjentów z niewydolnością serca zmniejsza ilość arytmii komorowych i incydentów nagłej śmierci sercowej (*sudden cardiac death*, SCD) [106]. Kliniczny efekt ARA na ilość incydentów SCD może być również związany z zależnymi od śródbłonka zmianami aktywności autonomicznego układu nerwowego. Aldosteron



Rycina 2. Działanie śródbłonkowe aldosteronu

powoduje wzrost impulsacji adrenergicznej i spadek aktywności nerwu błędnego. Ten efekt działania aldosteronu zależy od zmniejszenia wrażliwości baroreceptorów naczyniowych oraz od bezpośredniego jego wpływu na ośrodki naczynioruchowe w CSN [107]. ARA udowodniły swoją skuteczność w zwiększaniu wrażliwości baroreceptorów naczyniowych i poprawie czynności układu autonomicznego [108]. Co więcej, zmniejszenie wrażliwości baroreceptorów jest prawdopodobnie skutkiem dysfunkcji śródbłonka naczyniowego wywołanej przez aldosteron. Wang i wsp. wykazali, że wpływ aldosteronu na baroreceptory zatoki szyjnej psa znika po usunięciu śródbłonka [103].

Centralna rola dysfunkcji śródbłonka w patologicznym działaniu aldosteronu na układ krążenia

Utrata ochronnej funkcji śródbłonka ma fundamentalne znaczenie w rozwoju patologii układu krążenia. Wydają się, że nadmierna aktywacja aldosteronu może do tego prowadzić. Istotnie, aldosteron upośledza zdolność śródbłonka do wytwarzania NO, jak również indukuje odpowiedź zapalną i mechanizmy prozakrzepowe

śródbłonka. Konsekwencją tego jest zaburzenie homeostazy ściany naczynia, szerzący się proces zapalny i uszkodzenie naczyń, serca i nerek. Przerywając patologiczny wpływ aldosteronu na śródbłonek, można hamować, a nawet odwracać zależne od aldosteronu uszkodzenia układu krążenia, czego najlepszym dowodem jest kliniczna skuteczność antagonistów aldosteronu. Czy potwierdzone w wielu badaniach klinicznych, przeciwwłóknieniowe i przeciwartymiczne działanie ARA ma również związek z działaniem śródbłonkowym aldosteronu, pozostaje do wyjaśnienia.

Wzajemne powiązania pomiędzy angiotensyną II i aldosteronem

ARA oraz inhibitory ACE (lub antagoniści receptora AT₁) wykazują podobną skuteczność kliniczną m.in. w redukcji nadciśnienia tętniczego, przerostu lewej komory serca, mikroalbuminurii. Jednak obie grupy leków wykazują synergizm działania, jeśli zastosowane są łącznie [109]. Świadczy to o istnieniu istotnej klinicznie interakcji między angiotensyną II a aldosteronem. Z jednej strony moglibyśmy się spodziewać, że hamowanie syntezy ATII (inhibitory ACE) lub blokowanie jej

receptorów (antagoniści receptora AT_1) zmniejsza produkcję aldosteronu. Z drugiej strony aldosteron zwrotnie hamuje układ renina-angiotensyna zgodnie z zasadą ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Istnieją silne dowody kliniczne na to, że aldosteron *ucieka* spod hamującego wpływu inhibitorów ACE i/lub antagonistów receptora AT_1 u leczonych przewlekle pacjentów z niewydolnością serca [110]. Nie ma pewności, jak wytłumaczyć to zjawisko. Sugeruje się wiele hipotez. Być może znaczenie ma również to, że ATII nie jest jedynym czynnikiem stymulującym produkcję aldosteronu, choć równie silnym są jony K^+ . Istotnie, u myszy genetycznie pozbawionych angiotensynogenu, u których poziom ATII jest nieoznaczalny, prawidłowa produkcja aldosteronu regulowana jest przez poziom K^+ [111].

Z drugiej strony, aldosteron wpływa również na syntezę ATII, nasilając ją! Udowodniono, że aldosteron zwiększa ekspresję mRNA dla ACE w kardiocytach szczura [112]. Również u ludzi z niewydolnością serca wykazano, że spironolakton hamuje konwersję ATI do ATII [113]. Dodatkowo aldosteron nasila biologiczny efekt ATII przez wzrost syntezy receptorów AT_1 i spadek ekspresji receptorów AT_2 [15, 51, 114, 115].

Podsumowując, istnieje silny synergizm działania pomiędzy aldosteronem i ATII, a dodatnie sprzężenie nasila produkcję obu przekaźników. W wielu modelach eksperymentalnych wykazano, że ARA hamują działanie biologiczne ATII. Wydaje się więc, że przynajmniej część efektów biologicznych przypisywanych ATII w rzeczywistości jest efektem działania samego aldosteronu lub jest skutkiem wzmocnienia toksycznego działania ATII przez aldosteron, m.in. przez wzrost gęstości receptorów AT_1 i spadek receptorów AT_2 . Z drugiej strony, odosobnione zahamowanie aldosteronu może być niewystarczające do powstrzymania rozbijającej aktywności ATII i aldosteronu i konieczne jest łączne podawanie inhibitorów ACE (lub antagonistów receptora AT_1) razem z ARA.

Czy nadchodzi era antagonistów aldosteronu w kardiologii?

W ostatnich latach ukazały się dwa duże, randomizowane badania dotyczące skuteczności ARA w leczeniu niewydolności serca. W badaniu RALES oceniano efekt dodania spironolaktonu do optymalnej (β -adrenolityk, inhibitor ACE, diuretyk) terapii u pacjentów z zaawansowaną zastoinową niewydolnością serca. Natomiast w badaniu EPHEsus stosowano eplerenon u pacjentów z pozawałową dysfunkcją lewej komory, leczonych wg dotychczasowych standardów. Wyniki obu badań wskazują, że dodanie ARA do optymalnej terapii niewydolności serca wiąże się ze znaczną redukcją śmiertelności z powodów sercowo-naczyniowych [116, 117].

Badania RALES i EPHEsus wprowadziły ARA (spironolakton i eplerenon) do *elitarniej* grupy leków zmniejszających śmiertelność u pacjentów z niewydolnością serca. Wyniki tych badań znalazły odzwierciedlenie w najnowszych wytycznych leczenia niewydolności serca Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2005 r. Obecnie stosowanie ARA zaleca się u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością skurczową serca (klasa NYHA III i IV) oraz u pacjentów po zawale serca z dysfunkcją skurczową i objawami niewydolności serca lub cukrzycą [118]. Kliniczna skuteczność ARA w grupie pacjentów z łagodną niewydolnością serca (klasa NYHA I i II) musi zostać potwierdzona w dużych, randomizowanych badaniach, podobnie jak skuteczność tych leków w innych schorzeniach obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Szczególnie ARA mogą się okazać bardzo skuteczne w ochronie takich narządów jak serce, nerki i mózg. Istnieją dane potwierdzające skuteczność ARA w zmniejszaniu masy lewej komory i mikroalbuminurii u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [109]. W modelach eksperymentalnych ARA zmniejszały powikłania nadciśnienia tętniczego i cukrzycy, tj. udary mózgu, przerost/niewydolność serca, uszkodzenie nerek (proteinurię, włóknienie i szklwienie kłębuszków nerkowych) [1, 119]. Również w zwierzęcych modelach miażdżycy ARA udowodniły swoją skuteczność: poprawiają czynność śródbłonna naczyniowego, zmniejszają generację wolnych rodników tlenowych przez ścianę naczyń, ROS, hamują aktywację makrofagów i powstawanie ox-LDL, a w konsekwencji hamują rozwój *atherothrombosis* [53, 65, 120].

Podsumowując, podobnie jak w latach 80. XX w. inhibitory ACE, a w latach 90. statyny, obecnie renesans przeżywają antagoniści receptora aldosteronowego. Już dziś można mówić o plejotropowym śródbłonkowym działaniu antagonistów receptora aldosteronowego, a kolejne badania kliniczne i podstawowe odkrywają coraz to nowe aspekty działania i zastosowania dla tych leków. Być może za kilka lat leki te powtórzą sukces aspiryny, inhibitorów ACE, statyn i pojawią się w apteczce każdego pacjenta kardiologicznego. Będzie to kolejny sukces farmakologii śródbłonna.

Piśmiennictwo

1. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005; 186: 1-20.
2. Aguilera G, Kiss A, Lu A, et al. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr Res* 1996; 22: 433-43.
3. Cozza EN, Vila MC, Acevedo-Duncan M, et al. Treatment of primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells with adrenocorticotropin (ACTH) and phorbol esters: a comparative study of the effects on aldosterone production and ACTH signaling system. *Endocrinology* 1990; 126: 2169-76.

4. Chtopicki S. Czynność śródbłonka – wyznacznik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 75-81.
5. Litchfield WR, Anderson BF, Weiss RJ, et al. Intracranial aneurysm and hemorrhagic stroke in glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Hypertension* 1998; 31: 445-50.
6. Beevers DG, Brown JJ, Ferriss JB, et al. Renal abnormalities and vascular complications in primary hyperaldosteronism. Evidence on tertiary hyperaldosteronism. *Q J Med* 1976; 45: 401-10.
7. Vasan RS, Evans JC, Larson MG, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med* 2004; 351: 33-41.
8. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998; 273: 4883-91.
9. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, et al. Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology* 2004; 145: 4796-802.
10. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2519-25.
11. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, et al. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5121-6.
12. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, et al. Role of cardiac aldosterone in post-infarction ventricular remodeling in rats. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1999; 92: 991-6.
13. Young M, Funder JW. Aldosterone and the heart. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 224-6.
14. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 381-6.
15. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-986.
16. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001; 103: 72-7.
17. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Spironolactone inhibits the transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 838-44.
18. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, et al. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP 11A1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 1998; 71: 2231-8.
19. Stromstedt M, Waterman MR. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 34: 75-88.
20. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, et al. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 1997; 138: 3369-73.
21. Gomez-Sanchez EP, Fort CM, Gomez-Sanchez CE. Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 1990; 258: E482-4.
22. Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998; 93: 487-90.
23. Reichardt HM, Schutz G. Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 146: 1-6.
24. Stewart PM, Krozowski ZS. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999; 57: 249-324.
25. Bonvalet JP, Alfaidy N, Farman N, et al. Aldosterone: intracellular receptors in human heart. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl. N): 92-7.
26. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Gene expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the mesenteric arteries of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 23: 577-80.
27. Brem AS, Bina RB, King TC, et al. Localization of 2 11beta-OH steroid dehydrogenase isoforms in aortic endothelial cells. *Hypertension* 1998; 31: 459-62.
28. Klein K, Henk W. Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation. *Z Kreislaufforsch* 1963; 52: 40-53.
29. Spach C, Streeten DH. Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J Clin Invest* 1964; 43: 217-27.
30. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-56.
31. Moura AM, Worcel M. Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 1984; 6: 425-30.
32. Eisen C, Meyer C, Christ M, et al. Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: a 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell Mol Biol* 1994; 40: 351-8.
33. Maguire D, MacNamara B, Cuffe JE, et al. Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids* 1999; 64: 51-63.
34. Falkenstein E, Christ M, Feuring M, et al. Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney Int* 2000; 57: 1390-4.
35. Harvey BJ, Condliffe S, Doolan CM. Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News Physiol Sci* 2001; 16: 174-7.
36. Ebata S, Muto S, Okada K, et al. Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 1999; 56: 1400-12.
37. Haseroth K, Gerdes D, Berger S, et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 257-61.
38. Christ M, Meyer C, Sippel K, et al. Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 123-9.
39. Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, et al. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 475-81.
40. Alzamora R, Michea L, Marusic ET. Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 2000; 35: 1099-104.
41. Michea L, Delpiano AM, Hirschfeld C, et al. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* 2005; 146: 973-80.
42. Someren JS, Faber LE, Klein JD, et al. Heat shock proteins 70 and 90 increase calcineurin activity in vitro through calmodulin-dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 619-25.
43. Chtopicki S. Zapalenie śródbłonka w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 77-88.
44. Farquharson CA, Struthers AD. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103: 425-31.

45. Garnier A, Bendall JK, Fuchs S, et al. Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation* 2004; 110: 1819-25.
46. Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, et al. Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 351-8.
47. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, et al. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 655-62.
48. Wang D, Liu YH, Yang XP, et al. Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *J Card Fail* 2004; 10: 67-73.
49. Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, et al. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation* 2005; 111: 420-7.
50. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 2005; 46: 555-61.
51. Virdis A, Neves MF, Amiri F, et al. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 2002; 40: 504-10.
52. Ahokas RA, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Circulation* 2005; 111: 51-7.
53. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 2212-6.
54. Kobayashi N, Hara K, Tojo A, et al. Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension* 2005; 45: 538-44.
55. Hao L, Kanno Y, Fukushima R, et al. Effects of eplerenone on heart and kidney in two-kidney, one-clip rats. *Am J Nephrol* 2004; 24: 54-60.
56. Sun Y, Zhang J, Lu L, et al. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002; 161: 1773-81.
57. Mervaala E, Finckenberg P, Lapatto R, et al. Lipoic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury. *Kidney Int* 2003; 64: 501-8.
58. Theuer J, Dechend R, Muller DN, et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3.
59. Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, et al. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2005; 46: 107-12.
60. Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, et al. Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension* 2004; 43: 952-6.
61. MacLeod AB, Vasdev S, Smeda JS. The role of blood pressure and aldosterone in the production of hemorrhagic stroke in captopril-treated hypertensive rats. *Stroke* 1997; 28: 1821-8.
62. Rocha R, Stier CT Jr, Kifor I, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000; 141: 3871-8.
63. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, et al. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension* 2000; 36: 282-90.
64. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, et al. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000; 35: 587-94.
65. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation* 2004; 109: 2213-20.
66. Rocha R, Chander PN, Khanna K, et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 451-8.
67. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33: 232-7.
68. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1802-10.
69. Brilla CG, Matsubara LS, Weber K T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 563-75.
70. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, et al. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001; 37: 787-93.
71. Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, et al. Angiotensin II (AT (1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol* 2000; 157: 111-22.
72. Vacher E, Fornes P, Domergue V, et al. Quinapril prevents stroke both during and after the treatment period in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1993; 6: 951-9.
73. Fornes P, Richer C, Vacher E, et al. Losartan's protective effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats persist durably after treatment withdrawal. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 305-13.
74. Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens* 2002; 15: 164-9.
75. Pu Q, Neves MF, Virdis A, et al. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 2003; 42: 49-55.
76. Park JK, Fiebeler A, Muller DN, et al. Lacidipine inhibits adhesion molecule and oxidase expression independent of blood pressure reduction in angiotensin-induced vascular injury. *Hypertension* 2002; 39: 685-9.
77. Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al. Na/H exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid/salt-induced cardiac injury. *Hypertension* 2003; 41: 493-8.
78. Brown NJ, Kim KS, Chen Y, et al. Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 336-44.
79. Chun TY, Pratt JH. Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 239: 55-61.
80. Rajagopalan S, Bodary P, Duquaine D. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates thrombotic response to injury in atherosclerosis through favorable effects on nitric oxide bioavailability. *JACC* 2003; 129: 1032.
81. Chander PN, Rocha R, Ranaudo J, et al. Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1990-7.

82. Sawathiparnich P, Kumar S, Vaughan DE, et al. Spironolactone abolishes the relationship between aldosterone and plasminogen activator inhibitor-1 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 448-52.
83. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, et al. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension* 1998; 32: 965-71.
84. Yalcin AI, Dincer M, Aslan V, et al. Effect of spironolactone on impaired fibrinolysis of hypertensive patients. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25: 260-4.
85. Bieron K, Grodzinska L, Kostka-Trabka E, et al. Prostacyclin and molsidomine synergise in their fibrinolytic and anti-platelet actions in patients with peripheral arterial disease. *Wien Klin Wochenschr* 1993; 105: 7-11.
86. Gryglewski RJ, Uracz W, Chłopicki S, et al. Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr Pathol Mol Med* 2002; 21: 279-290.
87. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann S, et al. Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost* 2003; 89: 1024-30.
88. Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, et al. Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1199-206.
89. Brilla CG, Pick R, Tan LB, et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990; 67: 1355-64.
90. Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* 1994; 15 (Suppl. D): 45-52.
91. Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 2004; 172: 1590-4.
92. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1863-7.
93. Brilla CG, Rupp H. Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure. *Cardiologia* 1994; 39 (12 Suppl. 1): 389-93.
94. Kohler E, Bertschin S, Woodtli T, et al. Does aldosterone-induced cardiac fibrosis involve direct effects on cardiac fibroblasts? *J Vasc Res* 1996; 33: 315-26.
95. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995; 26: 971-8.
96. Stier CT Jr, Chander PN, Rocha R. Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiol Rev* 2002; 10: 97-107.
97. Sun Y, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. *J Lab Clin Med* 1996; 127: 94-101.
98. Lariviere R, Deng LY, Day R, et al. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2123-31.
99. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone regulates collagen output of cardiac fibroblasts by upregulation of endothelin receptors. *Endocrin Soc Proc* 1998; 93: 511.
100. Sun Y, Ratajska A, Weber KT. Bradykinin receptor and tissue ACE binding in myocardial fibrosis: response to chronic angiotensin II or aldosterone administration in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 813-22.
101. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, et al. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 30-6.
102. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33: 232-7.
103. Wang W, McClain JM, Zucker IH. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. *Hypertension* 1992; 19: 270-7.
104. Jazayeri A, Mayer WJ. III: Mineralocorticoid-induced increase in beta-adrenergic receptors of cultured rat arterial smooth muscle cells. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 987-91.
105. Perrier E, Kerfant BG, Lalevee N, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 776-83.
106. Ramires FJ, Mansur A, Coelho O, et al. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1207-11.
107. Yee KM, Struthers AD. Aldosterone blunts the baroreflex response in man. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 687-92.
108. Fletcher J. Acute Aldosterone Antagonism Improves Cardiac Vagal Control in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1270-5.
109. Brown NJ. Eplerenone: cardiovascular protection. *Circulation* 2003; 107: 2512-8.
110. MacFadyen RJ, Lee AF, Morton JJ, et al. How often are angiotensin II and aldosterone concentrations raised during chronic ACE inhibitor treatment in cardiac failure? *Heart* 1999; 82: 57-61.
111. Okubo S, Niimura F, Matsusaka T, et al. Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption. *Kidney Int* 1998; 53: 617-25.
112. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001; 104: 137-9.
113. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101: 594-7.
114. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, et al. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 2004; 44: 340-5.
115. Michel F, Ambrosine ML, Duriez M, et al. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 2004; 109: 1933-7.
116. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
117. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348: 1309-21.
118. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26: 1115-40.
119. Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 970: 89-100.
120. Keidar S, Hayek T, Kaplan M., et al. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 955-63.