

Functional and structural pattern of conduit arteries in two models of experimental hypertension

Funkčná a štrukturálna charakteristika magistrálnych tepien v dvoch modeloch experimentálnej hypertenzie

Drobná M, Kristek F, Török J

Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Drobna M, Kristek F, Torok J. **Functional and structural pattern of conduit arteries in two models of experimental hypertension.** Cardiology Lett. 2015;24(3):141–149

Abstract. *Aim:* The aim of the study was to compare reactivity and structural alterations in thoracic aorta and carotid artery in two different animal models of hypertension NO-deficient and spontaneous hypertensive rats (SHR).

Methods: Three groups of animals were used: 1) control normotensive Wistar rats, 2) NO-deficient rats (Wistar rats treated for 6 weeks with NO-synthase inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methylester - L-NAME), and 3) SHR. The experiment lasted from the 10th to the 16th week of the animals' age. At the end of the experiment functional and morphological investigations were performed. For functional study isolated rings from thoracic aorta and carotid artery were used and relaxation responses to increasing doses of acetylcholine (1 nmol/l – 10 µmol/l) after precontraction with submaximal dose of phenylephrine (1 µM) were monitored. For morphological study the same arteries were processed after perfusion fixation under the pressure 120 mm Hg according to standard electron microscopy procedure. The geometry of the arteries: inner diameter, wall thickness, cross sectional area (tunica intima+media) (CSA), and wall thickness/inner diameter ratio were studied in light microscopy. *Results:* At the end of the experiment blood pressure increase accompanied by cardiac hypertrophy (increase of relative heart weight) was observed in both models of hypertensive animals. Morphometry of both arteries revealed in NO-deficient and SHR an increase of wall thickness, CSA, and wall thickness/inner diameter ratio. The inner diameter was increased only in thoracic aorta: in the carotid artery it was not changed. Administration of acetylcholine to the bath medium resulted in dose dependent relaxation of both arteries in normotensive animals. Dose dependent relaxation of both arteries was significantly blunted in NO-deficient rats. In contrast to this endothelium dependent relaxation to acetylcholine was not affected in both arteries in SHR. The arterial relaxation in SHR as well as residual relaxation in arteries of NO-deficient hypertension was completely inhibited after acute addition of L-NAME into the incubation medium.

Conclusions: The results of the study suggest that the increase of systolic blood pressure and accompanied changes in cardiovascular system are not primarily responsive for the decline of endothelium dependent relaxation in experimental hypertension. Fig. 7, Ref. 48, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: endothelium dependent relaxation – NO-deficient hypertension – spontaneous hypertension – morphometry – arterial wall

Drobná M, Kristek F, Török J. **Funkčná a štrukturálna charakteristika magistrálnych tepien v dvoch modeloch experimentálnej hypertenzie.** Cardiology Lett. 2015;24(3):141–149

Abstrakt. *Cieľ:* Hlavným cieľom tejto štúdie bolo porovnať reaktivitu a štrukturálne zmeny v hrudnej aorte a karotickej artérii u dvoch odlišných zvieracích modeloch hypertenzie, a to u NO-deficitných potkanov a u spontánne hypertenzných potkanov (SHR).

Metódy: Pre experiment boli vytvorené tri skupiny zvierat: 1. Kontrolné normotenzné Wistar potkany, 2. NO-deficitné potkany, Wistar potkany, ktorým sa šesť týždňov podával inhibítor NO syntázy, N^G-nitro-L-arginín metylester (L-NAME) a 3. Skupina SHR. Experiment trval od 10. do 16. týždňa veku potkanov. Pre funkčné štúdie sa na izolovaných prstencoch z hrudnej aorty a karotickej artérie sledovali, po predkontrakcii submaximálnou dávkou fenylefrínu (1 µmol/l), relaxačné odpovede na vzostupnú koncentráciu acetylcholínu (1 nmol/l – 10 µmol/l). Pre morfológické štúdie sa rovnaké artérie po perfúznej fixácii pod tlakom 120 mmHg spracovávali podľa štandardnej metódy pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu. Vo svetelnom mikroskope sa hodnotila geometria artérií: vnútorný diameter, hrúbka steny, plocha steny (tunica intima + media) (CSA) a pomer hrúbky cievnej steny/vnútorný diameter.

Výsledky: Pri obidvoch modeloch hypertenzných zvierat bol na konci experimentu zvýšený tlak krvi spojený s hypertrofiou srdca (nárast relatívnej hmotnosti srdca) v porovnaní s kontrolnými normotenznými potkanmi. Morfometriou hrudnej aorty a karotickej artérie sa u NO-deficitnej hypertenzie aj SHR preukázala zväčšená hrúbka cievnej steny, CSA a pomer hrúbky cievnej steny/cievny diameter. Vnútorný diameter bol zväčšený v hrudnej aorte, ale nie v karotickej artérii. V izolovaných cievach normotenzných potkanov, podanie acetylcholínu viedlo k dávkovo závislej relaxácii. Od endotelu závislá relaxácia hrudnej aorty a karotickej artérie v skupine s NO-deficitnou hypertenziou bola výrazne potlačená. Na rozdiel od toho, v obidvoch artériách v skupine SHR nebola od endotelu závislá relaxácia na acetylcholíne signifikantne znížená. Po akútnom podaní L-NAME do inkubačného média bola relaxácia artérií u SHR rovnako, ako aj zostatková relaxácia artérií u potkanov s NO-deficitnou hypertenziou úplne inhibovaná.

Záver: Výsledky tejto práce naznačili, že zvýšený systolický tlak krvi a sprievodné zmeny v kardiovaskulárnom systéme nie sú primárne zodpovedné za zhoršenie od endotelu závislej relaxácie v experimentálnej hypertenzii. Obr. 7, Lit. 48, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: od endotelu závislá relaxácia – NO-deficitná hypertenzia – spontánne hypertenzný potkan – morfometria – cievna stena

Hypertenzia je ochorenie sprevádzané funkčnými a štrukturálnymi zmenami kardiovaskulárneho systému. Nie je objasnené, či tieto zmeny vznikajú ako následok zvýšeného krvného tlaku, alebo je nárast krvného tlaku dôsledkom zmien v cievnom riečisku. Po zistení výrazných vazorelaxačných vlastností oxidu dusnatého (NO) a preukázaní jeho produkcie v cievnej stene endotelovými bunkami sa otvorila otázka či porucha v produkcii NO nie je hlavnou príčinou, respektíve do akej miery prispieva k rozvoju patologických zmien spojených s hypertenziou. Znížená endotelová funkcia sa zistila nielen v rôznych experimentálnych modeloch hypertenzie, ako napríklad renovaskulárna hypertenzia (1), hypertenzia vyvolaná koarktáciou aorty (2), hypertenzia indukovaná acetátom deoxykortikosterónu (3) a esenciálna hypertenzia (4 – 6), ale aj v primárnej a sekundárnej forme ľudskej hypertenzie (7, 8). Rozdielne výsledky z jednotlivých laboratórií však naznačujú, že relaxácia artérií u hypertenzných zvierat nie je vždy narušená. Navyše, zmenené od endotelu závislé odpovede môžu byť vyvolané zvýšeným tlakom krvi (napríklad hypertenzia vyvolaná koarktáciou aorty) a po normalizácii tlaku krvi dochádza k ich normalizácii (2). Pre objasnenie úlohy NO v kardiovaskulárnom systéme sa stal bežne používaný model NO-deficitnej hypertenzie, v ktorom sa normotenzným potkanom dlhodobo podáva blokátor endotelovej NO syntázy (eNOS) N^G-nitro-L-arginín metylesteru (L-NAME). Dlhodobé podávanie L-NAME vyvoláva podobné zmeny v kardiovaskulárnom systéme ako sa pozorujú u spontánne hypertenzných potkanov (SHR), ktoré v experimente reprezentujú najčastejšie využívaný model ľudskej esenciálnej hypertenzie (majú mnohé spoločné, ale i rozdielne

znaky). Aj keď u obidvoch spomínaných modeloch hypertenzie je spoločným znakom trvalo zvýšený tlak krvi a aj iné patologické zmeny kardiovaskulárneho systému s tým spojené (9, 10), predpokladá sa, že patologické mechanizmy vedúce k zmenám (hypertrofia srdca a cievnej steny) (11 – 14) sú pravdepodobne pri NO-deficitnej hypertenzii a SHR odlišné. U SHR sa prekvapujúco zistila zvýšená syntéza NO, ako kompenzačný mechanizmus na zvýšený tlak krvi (15, 16). U SHR je známa zhoršená relaxačná odpoveď artérií z dôvodu zníženej biodostupnosti NO (15, 17) v dôsledku zvýšenej prítomnosti voľných kyslíkových radikálov a endotelom uvoľňovaných konstriktorických látok (prostanoidov) (18, 19). Potvrdením, že hypertenzia je u SHR podmienená zvýšeným výskytom reaktívnych foriem kyslíka a s tým spojenou zníženou biodostupnosťou NO, je čiastočné potlačenie nárastu tlaku krvi po chronickom podávaní antioxidantu s tiolovou skupinou N-acetylcysteínu (20). Odlišnosti medzi SHR a NO-deficitnou hypertenziou sa zistili aj po dlhodobom podávaní exogénnych NO donorov, ktoré nevykazujú nitrátovú toleranciu (PETN a molsidomín). U SHR nemalo podávanie týchto látok, na rozdiel od NO-deficitnej hypertenzie, benefičný účinok na tlak krvi, geometriu srdca a prívodných artérií (21, 22). Z toho vyplýva, že patologické mechanizmy vedúce k hypertenzii sú pri NO-deficitnej hypertenzii a SHR odlišné.

Cieľom štúdie je porovnať od endotelu závislé relaxačné odpovede a štrukturálne zmeny vo veľkých prívodných artériách – hrudnej aorte a karotickej artérii odobraných z normotenzných potkanov, NO-deficitných a spontánne hypertenzných potkanov.

Metodika

Experimenty na zvieratách sa uskutočnili v súlade s ústavnými smernicami odsúhlasenými Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR a Etickou komisiou podľa Európskej dohody na ochranu zvierat použitých na experimentálne a iné vedecké účely (smernica 2010/63/EU Európskeho parlamentu). Zvieratá boli chované pri teplote 22 – 24 °C, 12-hodinovom cykle svetlo/tma a kŕmené peletami pre laboratórne potkany.

Do experimentu boli zaradené desať týždňov staré normotenzné Wistar potkany a SHR. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín: 1. Skupina kontrolných normotenzných Wistar potkanov (n = 16), 2. Skupina potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (skupina normotenzných Wistar potkanov, ktorým sa šesť týždňov podával inhibítor NO syntázy N^G-nitro-L-arginín metylester (L-NAME, 50 mg/kg/deň) v pitnej vode) (n = 16), 3. Skupina SHR (n = 16). Všetkým zvieratám z každej skupiny sa týždenne meral systolický tlak krvi a srdcová frekvencia neinvazívnou pletyzmografickou metódou na chvostovej artérii. V rovnakom veku života (v 16. týždňoch) boli zvieratá zapojené do funkčných, alebo morfológických experimentov.

Pre funkčné štúdie (in vitro) boli potkany usmrtené dekapitáciou po krátkej CO₂ anestéze. Následne boli hrudná aorta a karotická artéria odobraté, očistené od okolitého tkaniva a nakrájané na prstence (23). Cievne preparáty boli ponorené do 20 ml orgánovej vamičky obsahujúcej modifikovaný bikarbonátový Krebsov roztok; jeden koniec preparátu bol fixovaný na držiak a druhý bol niťou pripevnený na tenzometer Sanborn FT 10, (USA). Zaznamenávanie zmien izometrickej kontrakcie bolo zabezpečené polygrafom TZ 4200 (Labora, Czech Republic). Zloženie Krebsovho roztoku (v mmol/l): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 5, MgSO₄ · 7 H₂O 1,2, CaCl₂ 2,5, glukóza 11, CaNa₂ EDTA 0,03 a kyselina askorbová 1,1. Roztok bol prebublávaný zmesou O₂ (95 %) a CO₂ (5 %) a udržiavaný pri teplote 37 °C a pH medzi 7,3 – 7,4. Pokojové predpätie bolo upravené na tenziu 10 mN, ktorá sa kontrolovala každých 15 minút počas 60 – 90-minútovej fázy ustáľovania.

Arteriálnu od endotelu závislú relaxáciu sme sledovali na fenylefrínom (1 μmol/l) predkontrahovaných cievnych preparátoch. Po dosiahnutí vyrovnaného stavu kontrakcie sme aplikovali v narastajúcich dávkach acetylcholínu alebo nitroprusidu sodného. Veľkosť relaxácie sme vyjadrovali ako percento úbytku fenylefrínovej kontrakcie považovanej za 100 %. Aby sa vylúčila možnosť účasti vazoaktívnych prostaglandínov v relaxácii vyvolanej acetylcholínom, bol vo všetkých pokusoch použitý indometacín v dávke 10 μmol/l.

Pre morfológické vyšetrenie bol kardiovaskulárny systém potkanov perfundovaný s fixatívom (300 mmol/l glutaraldehydu v 100 mmol/l fosfátového pufru) pod tlakom 120 mmHg cez kanylu zavedenú do ľavej komory srdca. Následne sa odobrali hrudná aorta a karotická artéria a spracovali štan-

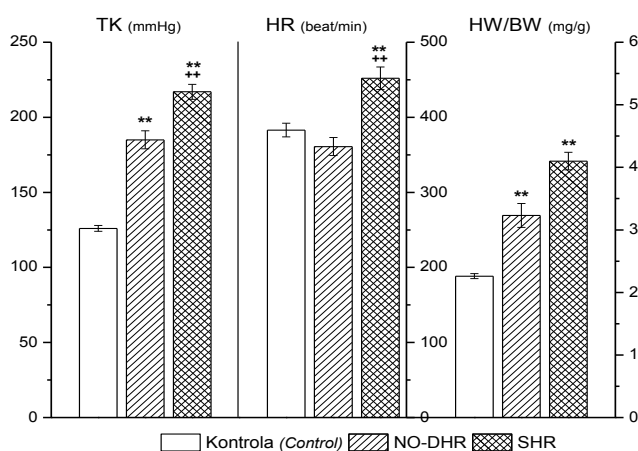
dardnou metódou pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu (25). Dva náhodne vybrané bločky z každej cievy sa krájali kolmo na pozdĺžnu os cievy. Vo svetelnom mikroskope sa merala geometria ciev: vnútorný diameter (ID) a hrúbka steny (WT) (tunica intima + tunica media). Z nameraných hodnôt sa vypočítala plocha cievnej steny (CSA) na priečnom priereze $CSA = \pi[(ID/2+WT)^2 - (ID/2)^2]$ a pomer hrúbky cievnej steny k vnútornému diameteru (WT/ID).

Výsledky sú prezentované ako priemerná hodnota ± SEM. Štatistická významnosť medzi hodnotami kontrolnej a experimentálnych skupín sa vyhodnocovala dvojcestnou analýzou premennej a následne Bonferroniho testom pre nepárovú premennú. Výsledky na úrovni $p < 0,05$ sa považovali za štatisticky významné.

Výsledky

Základné kardiovaskulárne parametre

Sledovanie základných kardiovaskulárnych parametrov ukázalo, že systolický tlak krvi meraný po šiestich týždňoch podávania L-NAME bol vyšší oproti kontrolnej skupine a zároveň nižší oproti skupine SHR. Srdcová frekvencia bola zvýšená len v skupine SHR. Relatívna hmotnosť srdca (pomer hmotnosti srdca k hmotnosti tela) bola zväčšená (hypertrofia srdca) v oboch experimentálnych skupinách (NO-deficitná hypertenzia a SHR). Medzi experimentálnymi skupinami nebol zistený rozdiel v hypertrofii srdca (obrázok 1).



Obrázok 1 Systolický tlak krvi (TK), srdcová frekvencia (HR) a pomer hmotnosti srdca k hmotnosti tela (HW/BW) u kontrolných Wistar potkanov (Kontrola, n = 16), Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, n = 16) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR, n = 16). ** $p < 0,01$ vs. Kontrola, ++ $p < 0,01$ vs. NO-DHR.

Figure 1 The systolic blood pressure (TK), heart rate (HR) and heart weight/body weight ratio (HW/BW) of control Wistar rats (Control, n=16), Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, n=16) and spontaneously hypertensive rats (SHR, n=16). ** $p < 0,01$ vs. Control, ++ $p < 0,01$ vs. NO-DHR.

Funkčné štúdie

Od endotelu závislá relaxácia na konci experimentu (po šesťtyždňovom podávaní L-NAME) sa sledovala v hrudnej aorte a karotickej artérii podávaním vzostupnej dávky acetylcholínu (1 nmol/l – 10 μ mol/l) na fenylefrínom predkontrahovaných artériách. Acetylcholínom vyvolaná relaxácia hrudnej aorty bola v experimentálnej skupine potkanov s NO-deficitnou hypertenziou výrazne redukovaná. V skupine SHR bola dávkoovo závislá relaxácia na acetylcholíne v aorte rozsahom podobná ako v kontrolnej skupine (obrázok 2).

Relaxácia hrudnej aorty bola po akútnom podaní L-NAME (0,1 mmol/l) inhibovaná v oboch experimentálnych skupinách (obrázok 3). Podobný vzor relaxácie sa pozoroval v kontrolnej aj v oboch experimentálnych skupinách (NO-deficitná a SHR) v karotickej artérii (obrázok 4). Avšak veľkosť inhibície na acetylcholíne bola u kontrolných zvierat v porovnaní s hrudnou aortou zmenšená. Akútne podanie L-NAME (0,1 mmol/l) do inkubačného média odstránilo zvyškovú relaxáciu karotickej artérie v skupine s NO-deficitnou hypertenziou a u SHR (obrázok 5).

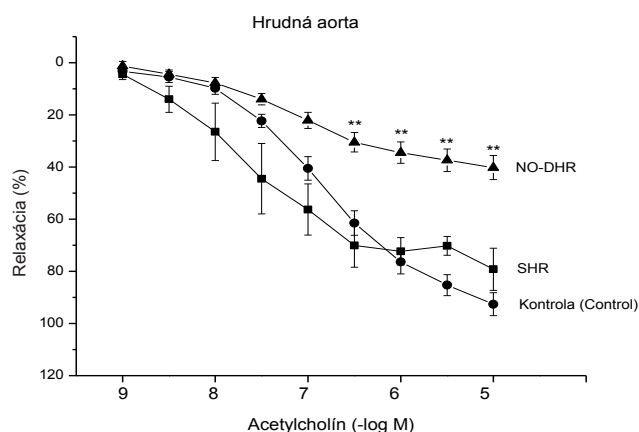
Akútne podávanie nitroprusidu sodného (exogénny donor NO) do inkubačného roztoku malo za následok maximálnu relaxáciu oboch sledovaných artérií (aorta, a. carotis communis) tak z normo, ako aj z oboch hypertenzných skupín potkanov (bez obrázku).

Morfologické štúdie

Hrúbka cievnej steny hrudnej aorty v kontrolnej skupine bola $60,41 \pm 2,37 \mu\text{m}$, u NO-deficitných potkanov bola

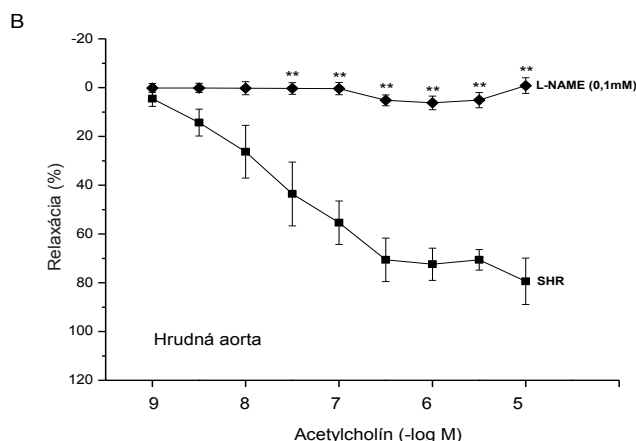
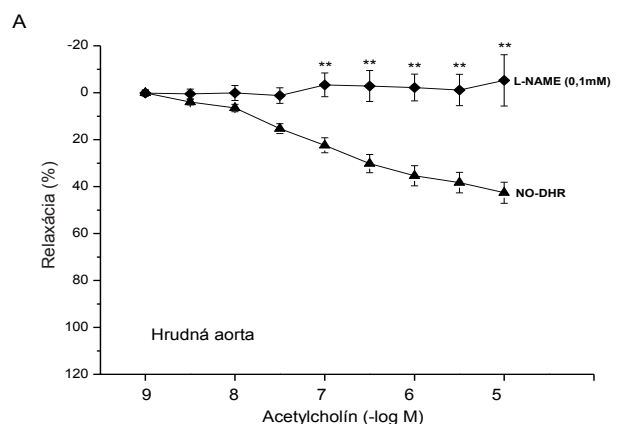
zväčšená na $78,35 \pm 1,42 \mu\text{m}$ a u SHR na $80,79 \pm 2,26 \mu\text{m}$ ($p < 0,01$) (obrázok 6A). Podobné odpovede sa pozorovali aj v karotickej artérii, kde bola hrúbka steny kontrolnej skupiny $25,01 \pm 1,27 \mu\text{m}$, v NO-deficitnej hypertenznej skupine $42,94 \pm 1,43 \mu\text{m}$ a SHR $48,20 \pm 1,52 \mu\text{m}$, ($p < 0,01$), (obrázok 7A). Rozdiel v hrúbke cievnej steny nebol zistený medzi NO-deficitnými zvieratami a SHR ani v hrudnej aorte a ani v karotickej artérii.

CSA hrudnej aorty u kontrolných potkanov bola $331,600 \pm 11,600 \mu\text{m}^2$, CSA sa v NO-deficitnej hypertenznej skupine významne zväčšila na hodnotu $458,000 \pm 9\,640 \mu\text{m}^2$ a u SHR na hodnotu $478,900 \pm 1\,969 \mu\text{m}^2$, ($p < 0,01$) (obrázok 6A). Podobný výrazný trend v náraste masy cievnej steny ako v stene aorty bol zistený aj v stene karotickej artérie, CSA bola v kontrolnej skupine $67,152 \pm 3340 \mu\text{m}^2$, v NO deficit-



Obrázok 2 Acetylcholínom vyvolaná relaxácia hrudnej aorty u kontrolných Wistar potkanov (Kontrola, $n = 8$), Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, $n = 8$) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR, $n = 8$). Prstence aorty boli prekontrahované fenylefrínom (1 μM). ** $p < 0,01$ vs. Kontrola.

Figure 2 Acetylcholine-induced relaxation in thoracic aorta from control Wistar rats (Control, $n=8$), Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, $n=8$) and spontaneously hypertensive rats (SHR, $n=8$). Aortic rings were precontracted by phenylephrine (1 μM). ** $p < 0,01$ vs. Control.



Obrázok 3 Zostatková acetylcholínom vyvolaná relaxácia hrudnej aorty A) Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, $n = 8$) a B) spontánne hypertenzných potkanov (SHR, $n = 8$) pred a po pridání N^G -nitro-L-arginín metylesteru (L-NAME; 0,1 mM) do inkubačného média. ** $p < 0,01$ vs. Kontrola.

Figure 3 Residual acetylcholine-induced relaxation in thoracic aorta from A) Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, $n=8$) and B) spontaneously hypertensive rats (SHR, $n=8$) before and after addition of N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 0,1 mM) to the incubation medium. ** $p < 0,01$ vs. Control.

ných potkanov $112,037 \pm 10,000 \mu\text{m}^2$, a u SHR $145,253 \pm 6\,120 \mu\text{m}^2$, ($p < 0,01$), (**obrázok 7A**). Medzi experimentálnymi skupinami nebol v CSA hrudnej aorty a karotickej artérie zaznamenaný významný rozdiel.

Vnútorný diameter hrudnej aorty u kontrolných zvierat bol $1\,683 \pm 39,70 \mu\text{m}$, u NO-deficitných hypertenzných zvierat bol zväčšený na $1\,793 \pm 25,48 \mu\text{m}$, a u SHR na $1\,805 \pm 44,62 \mu\text{m}$, ($p < 0,01$) (**obrázok 6B**). Vo vnútornom diametri karotickej artérie sa nezistili medzi jednotlivými skupinami významné zmeny. Vnútorný diameter kontrolnej karotickej artérie bol $833 \pm 31,53 \mu\text{m}$, NO-deficitnej $802 \pm 22,19 \mu\text{m}$ a SHR $883 \pm 18,45 \mu\text{m}$ (**obrázok 7B**). Medzi experimentálnymi skupinami neboli signifikantné rozdiely vo vnútornom diametri u aorty a karotickej artérie.

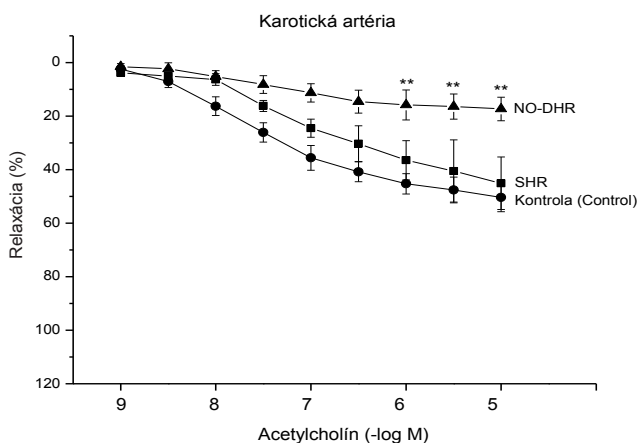
Pomer hrúbky cievnej steny k vnútornému diametru bol v kontrolnej aorte $3,56 \pm 0,19 \times 10^{-2}$, po dlhodobom podávaní L-NAME zväčšený na $4,39 \pm 0,11 \times 10^{-2}$ a u SHR na $4,49 \pm 0,16 \times 10^{-2}$, ($p < 0,01$) (**obrázok 6B**). Podobný trend sa zistil v karotickej artérii. V kontrolnej skupine bol $3,06 \pm 0,24 \times 10^{-2}$, v NO-deficitnej hypertenzii bol zväčšený na $5,43 \pm 0,3119 \times 10^{-2}$ a u SHR $5,49 \pm 0,2319 \times 10^{-2}$ ($p < 0,01$) (**obrázok 7B**). Medzi experimentálnymi skupinami nebol zaznamenaný rozdiel ani v aorte a ani v karotickej artérii.

Diskusia

Zvýšený systolický tlak krvi spojený so zväčšením relatívnej hmotnosti srdca, pozorovaný v oboch experimentálnych

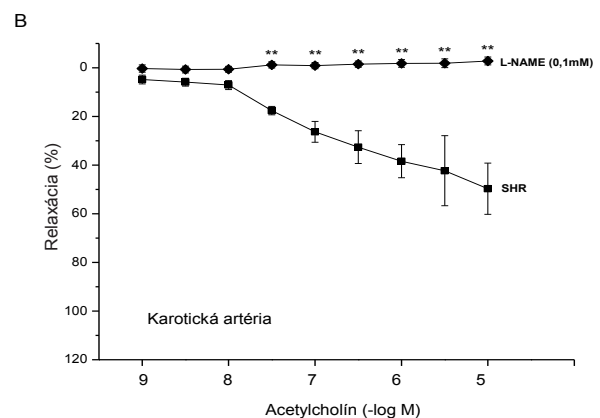
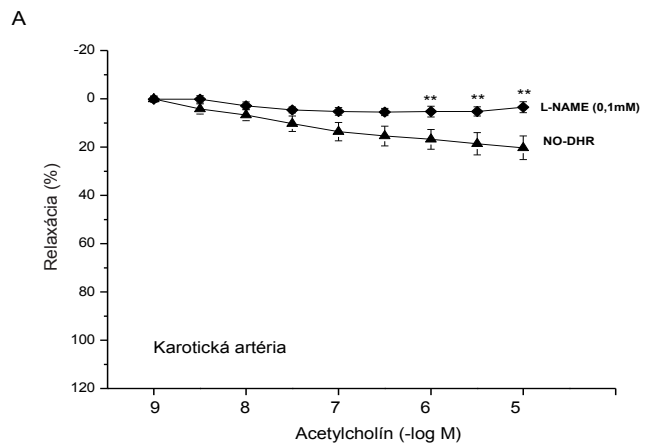
skupinách NO-deficitnej hypertenzie a SHR, poukazuje na hypertrofiu myokardu.

Toto zistenie je v súlade so štúdiami, v ktorých bola použitá rovnaká koncentrácia L-NAME a približne rovnaký čas jeho podávania (12, 25 – 28). Ukázalo sa, že srdcová hypertrofia srdca pri NO-deficitnej hypertenzii je spojená so zvýšenými myokardiálnymi fibrózami a zvýšením koncentrácie metabolických proteínov a nukleových kyselín (29). Zdá sa, že experimentálna hypertenzia vyvolaná šesťtyždňovým podávaním L-NAME vedie k podobným morfológickým zmenám v kardiovaskulárnom systéme, aké vznikajú pri iných modeloch experimentálnej hypertenzie (30). Hypertrofia srdca sa považuje za univerzálny mechanizmus adaptácie srdca na dlhodobu trvajúci zvýšený tlak krvi.



Obrázok 4 Acetylcholínom vyvolaná relaxácia karotickej artérie u kontrolných Wistar potkanov (Kontrola, $n = 8$), Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, $n = 8$) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR, $n = 8$). Prstence karotickej artérie boli prekontrahované fenylefrínom ($1 \mu\text{M}$). ** $p < 0,01$ vs. Kontrola.

Figure 4 Acetylcholine-induced relaxation in carotid artery from control Wistar rats (Control, $n=8$), Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, $n=8$) and spontaneously hypertensive rats (SHR, $n=8$). Rings of carotid artery were precontracted by phenylephrine ($1 \mu\text{M}$). ** $p < 0,01$ vs. Control.



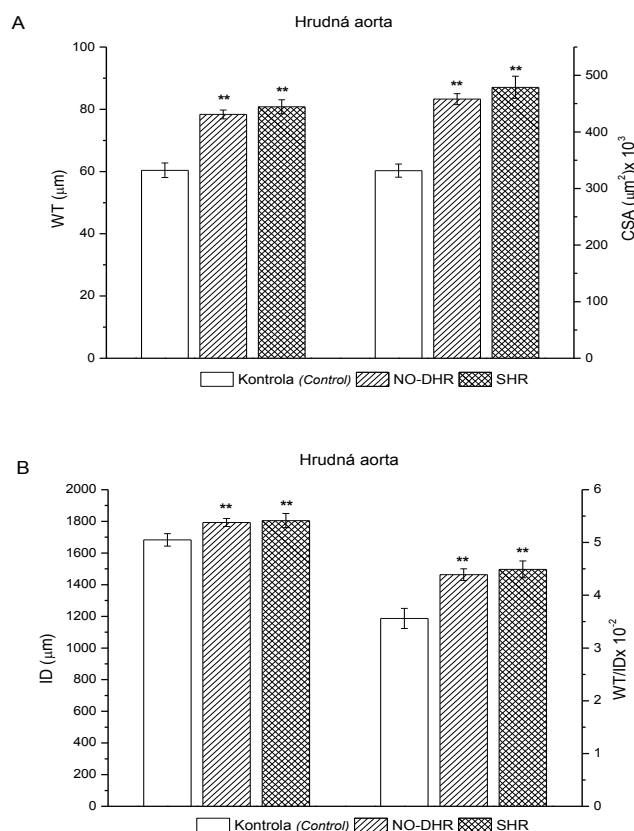
Obrázok 5 Zostatková acetylcholínom vyvolaná relaxácia karotickej artérie A) Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, $n = 8$) a B) spontánne hypertenzných potkanov (SHR, $n = 8$) pred a po pridaní N^{G} -nitro-L-arginín metylesteru (L-NAME; $0,1 \text{ mM}$) do inkubačného média. ** $p < 0,01$ vs. Kontrola.

Figure 5 Residual acetylcholine-induced relaxation in carotid artery from A) Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, $n=8$) and B) spontaneously hypertensive rats (SHR, $n=8$) before and after addition of N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; $0,1 \text{ mM}$) to the incubation medium. ** $p < 0,01$ vs. Control.

Z funkčného hľadiska najvýznamnejším nálezom pri artériách (hrudná aorta, a. carotis comm.) s NO-deficitnou hypertenziou je zistenie ich zmenšenej relaxácie na acetylcholín. Predradené podávanie indometacínu neovplyvnilo veľkosť relaxačných odpovedí u hypertenzných potkanov, čo znamená, že inhibícia relaxácie nie je výsledkom uvoľnenia konstriktorických prostaglandínov z endotelu. Zmenšenie relaxácie nie je spôsobené ani poškodením hladkej svaloviny cievej steny, pretože cievnú svalovinu neovplyvňuje ani na ňu priamo pôsobiaca vazodilatačná látka nitoprusid sodný (5, 26).

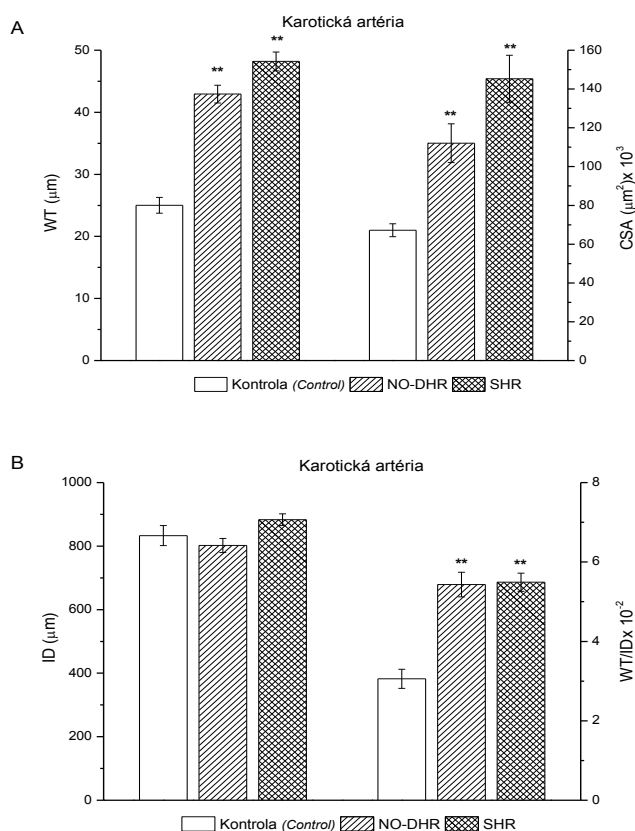
Výsledky funkčných štúdií ukázali odlišnosti v cievných odpovediach na acetylcholín v hrudnej aorte a karotickej artérii už u kontrolných normotenzných potkanov; (a. carotis

comm. vykazovala relatívne menšiu relaxačnú kapacitu na acetylcholín), ktoré sa prejavili aj v oboch skupinách s experimentálnou hypertenziou. U potkanov s deficitom NO sa zmenšila maximálna relaxácia na acetylcholín, ktorú nemožno vysvetliť len vzniknutými štrukturálnymi zmenami. Vzniknutá hypertrofia výraznou mierou prispieva k zhoršeniu vazodilácie a zväčšeniu vazokonstrikcie počas chronickej hypertenzie (31). Relaxačná odpoveď na acetylcholín je sprostredkovaná predovšetkým cez NO. Toto potvrdili naše experimenty, v ktorých došlo aj po akútnom podaní L-NAME u oboch ciev v experimentálnych skupinách NO-deficitnej hypertenzie a SHR k potlačeniu zvyškovej relaxácie. Rovnako inhibíciu acetylcholínom vyvolanej relaxácie vyvoláva aj odstránenie endotelu (32). Predpoklad jednej z najvýznamnejších úloh



Obrázok 6A Hrúbka (WT) a plocha (CSA) cievej steny (tunica intima + media) na priečnom priereze, **6B** vnútorný diameter (ID) a pomer hrúbky cievej steny k vnútornému diameteru (WT/ID) hrudnej aorty u kontrolných Wistar potkanov (Kontrola, n = 8), Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, n = 8) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR, n = 8). **p < 0,01 vs. Kontrola.

Figure 6A Wall thickness (WT) and cross sectional area (CSA) of arterial wall (tunica intima+media), **6B** inner diameter (ID) and wall thickness/inner diameter ratio (WT/ID) of thoracic aorta in control Wistar rats (Control, n=8), Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, n=8) and spontaneously hypertensive rats (SHR, n=16). **p<0,01 vs. Control.



Obrázok 7A Hrúbka (WT) a plocha (CSA) cievej steny (tunica intima + media) na priečnom priereze, **7B** vnútorný diameter (ID) a pomer hrúbky cievej steny k vnútornému diameteru (WT/ID) karotickej artérie u kontrolných Wistar potkanov (Kontrola, n = 8), Wistar potkanov s NO-deficitnou hypertenziou (NO-DHR, n = 8) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR, n = 8). **p < 0,01 vs. Kontrola.

Figure 7A Wall thickness (WT) and cross sectional area (CSA) of arterial wall (tunica intima+media), **7B** inner diameter (ID) and wall thickness/inner diameter ratio (WT/ID) of carotid artery in control Wistar rats (Control, n=8), Wistar rats with NO-deficient hypertension (NO-DHR, n=8) and spontaneously hypertensive rats (SHR, n=16). **p<0,01 vs. Control.

NO v acetylcholínom indukovanej relaxácii je podporený schopnosťou čiastočnej obnovy inhibovanej relaxácie ciev z NO-deficitnej hypertenzie po podaní exogénneho L-arginínu (26).

Nezmenená relaxačná odpoveď na acetylcholín v skupine SHR s cievnou hypertrofiou a dokonca s vyšším systolickým tlakom krvi poukazuje na heterogénne zmeny v endotelovej funkcii odlišných modeloch hypertenzie. Preto nemožno zovšeobecniť úlohu NO u normotenzných zvierat a pri rôznych typoch experimentálnej hypertenzie (30). Tak ako pri NO-deficitnej hypertenzii, je aj v iných modeloch experimentálnej hypertenzie (renálna, mineralokortikoidná) NO systém inhibovaný, na druhej strane existujú práce, ktoré naopak poukazujú, že u SHR môže byť tento systém nadmieru aktívny (33 – 35). Nezmenená relaxácia artérií SHR oproti normotenzným potkanom je pravdepodobne výsledkom zvýšeného uvoľnenia NO v porovnaní s normotenznými zvieratami, ktoré je však vo zvýšenej miere vychytávané voľnými kyslíkovými radikálmi. Relaxačný účinok cievneho NO pôsobí ako kompenzačný mechanizmus na zvýšený tlak krvi v hypertrofickkej arteriálnej stene SHR. Tieto výsledky sú v súlade s vysvetlením Arnala et al. (25), ktorí našli nezmenený cyklický GMP v stene aorty u SHR v porovnaní s normotenznými potkanmi. Z toho autori predpokladajú, že bazálne uvoľnenie NO nie je u SHR narušené, prinajmenšom v prírodných artériách, ale NO predstavuje hlavný tlmiaci mechanizmus na zvýšenú cievnú rezistenciu v genetickom modeli arteriálnej hypertenzie. Ďalším potvrdením toho, že u SHR nie je narušený systém NO, je neovplyvnená geometria prírodných artérií po dlhodobom podávaní NO donorov (22).

Veľkosť relaxácie nie je funkciou zvýšeného krvného tlaku, pretože pri NO-deficitnej hypertenzii sú relaxácie významne inhibované, kým pri spontánne hypertenzných potkanov, kde bol systémový krvný tlak dokonca vyšší ako u potkanov po L-NAME, veľkosť relaxácií nebola významne ovplyvnená (36). Redukcia od endotelu závislej relaxácie artérií hypertenzných zvierat nie je spôsobená pretrvávajúcim zvýšeným tlakom, čo dokázali aj výsledky, v ktorých sa zistilo, že relaxácia je rovnako zmenšená v nízkotlakovom systéme (a. pulmonalis), ako i vo vysokotlakovom cirkulačnom systéme (aorta, a. renalis) (37).

Morfometrické štúdie odhalili, že v hrudnej aorte a karotickej artérii nastávajú štrukturálne zmeny v oboch experimentálnych skupinách hypertenzných potkanov. Zväčšenie relatívnej hmotnosti srdca a hypertrofia cievnej steny vznikli počas dlhodobého trvania zvýšeného krvného tlaku. Podľa Folkowa (31) hypertrofia môže byť zodpovedná na jednej strane za zlepšenie vazokonstriktu a na druhej strane za zníženie vazodilatáciu počas chronickej hypertenzii. Na základe našich výsledkov sa domnievame, že štrukturálne zmeny v arteriálnej stene hrudnej aorty a karotickej artérie u SHR sú prítomné až v stabilnej fáze hypertenzie. Nárast hrúbky tunica media

pri oboch sledovaných artériách u SHR bol pravdepodobne dôsledkom hypertrofie hladkých svalových buniek, ako to ukázali aj iní autori (38, 39).

Dlhodobé podávanie blokátora NO syntázy (L-NAME) vyvolalo hypertrofiu myokardu a hypertrofiu cievnej steny hrudnej aorty a karotickej artérie. Tento účinok je v súlade s predchádzajúcimi pozorovaniami (12, 40, 41). Analýza cievnej steny (objemové zastúpenie bunkových a nebunkových komponentov v prírodných artériách) ukázala, že hlavný podiel na náraste masy steny (zväčšenie plochy na pričnom reze) má nárast extracelulárnej matrix v tunica media (40).

V iných experimentálnych modeloch hypertenzie sa tak tiež zistilo zhrubnutie cievnej steny prírodných artérií, avšak špecifické zmeny boli odlišné, závislé od experimentálneho modelu zvierat a dĺžky trvania hypertenzie (42, 43). Cievné remodeling, aký nastáva v prírodných artériách, nastáva aj v malých artériách (44 – 46). Štrukturálne zmeny artérií (zväčšenie hrúbky steny, alebo CSA) môžu viesť k ešte výraznejšiemu účinku niektorých vazokonstriktorických stimulov (37) a tak prispievať k udržiavaniu vysokého tlaku krvi počas hypertenzie. Takéto zmeny v cievnej stene vznikajú pravdepodobne sekundárne, čo dokazujú zistené štrukturálne zmeny (hypertrofia hladkosvalových buniek), ktoré sa objavujú až po rozvoji hypertenzie v troch zvieracích modeloch hypertenzie (47). Zdá sa, že takéto zväčšenie hrúbky cievnej steny je sekundárna adaptačná zmena aj pri NO-deficitnej hypertenzii. Za kvantitatívne odlišnosti v cievnej štruktúre medzi zvieracími modelmi môže byť zodpovedný rôzny stupeň závažnosti zmien v jednotlivých typoch experimentálnej hypertenzie.

Zmeny nájdené v štruktúre hrudnej aorty a karotickej artérie pri NO-deficitnej hypertenzii poukazujú na znížené uvoľnenie NO v izolovaných cievach. Pre model NO-deficitnej hypertenzie je charakteristická znížená aktivita NO-syntázy v hrudnej aorte. Následkom deficitu NO sa v aorte zlepšila syntéza DNA a proteosyntéza (48). Tieto zistenia ukazujú na to, že znížená biodostupnosť NO u hladkosvalových buniek môže mať vplyv aj na bunkovú a extracelulárnu časť komponentov cievnej steny a na cievnú rast.

V oboch skupinách hypertenzných potkanov sa vnútorný diameter v karotickej artérii významne nemenil. Naopak, vnútorný diameter sa zväčšil, aj keď len nepatrne, v hrudnej aorte. Tieto rozdiely mohli vzniknúť vzhľadom na odlišné biomechanické vlastnosti rôznych typov artérií v spojitosti pasívnych a aktívnych komponentov ich cievnej steny.

Naše výsledky podporujú predpoklady iných autorov, že hladina NO v organizme nie je príčinou patologických zmien u SHR. V súlade s týmto predpokladom je, že (i) po akútnom podávaní L-NAME dochádza v prírodných artériách u SHR k výrazne väčšiemu úbytku od endotelu závislej relaxácie ako u NO-deficitných potkanov, (iii) zvýšený systolický tlak krvi

a zmeny, ktoré ho sprevádzajú nie sú primárne zodpovedné za zhoršenie od endotelu závislej relaxácie v experimentálnej hypertenzii.

Podakovanie

Práca bola finančne podporená grantmi VEGA 2/0067/13, 2/0202/15 a grantom Ministerstva zdravotníctva SR 2012/51-SAV-1.

Literatúra

- Van de Worde J, Leusen I. Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats. *Am J Physiol* 1986;250:H711-H717.
- Lockette W, Otsuka Y, Carrretero O. The loss of endothelium dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986;8(Suppl II):II61-II66.
- Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* 2000;101:1722-1728.
- Winquist RJ. Altered vasodilator and endothelium-dependent responses in hypertension. *Drug Dev Res* 1986;7:311-318.
- Tesfamariam B, Ogletree ML. Dissociation of endothelial cell dysfunction and blood pressure in SHR. *Am J Physiol* 1995;269:H189-H194.
- Mayhan WG. Impairment of endothelium-dependent dilatation of basilar artery during chronic hypertension. *Am J Physiol* 1990;259:H1455-H1462.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-933.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-27.
- Lee RMKW. Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1985;22:105-126.
- Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens* 1994;7:193-200.
- Arnal JF, El Amrani AI, Chatellier G, Menard J, Michel JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993;22:380-387.
- Delacretaz E, Hayoz D, Osterheld MC, Genton CY, Bruner HR, Waeber B. Long-term nitric oxide synthase inhibition and distensibility of carotid artery in intact rats. *Hypertension* 1994;23:967-970.
- Kristek F, Gerova M. Long-term NO synthase inhibition affects heart weight and geometry of coronary and carotid arteries. *Physiol Res* 1996;45:361-366.
- Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, et al. Chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. Novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 2000;101:423-429.
- Llorens S, Fernandez AP, Nava E. Cardiovascular and renal alterations on the nitric oxide pathway in spontaneous hypertensive rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37:147-156.
- Vaziri ND, Ni Z, Ovejsi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:1248-1254.
- Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron, O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2003;57:456-467.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1986;8:344-348.
- Vanhoutte PM, Lüscher TF, Gräser T. Endothelium-dependent contractions. *Blood Vessels*. 1991;28(1-3):74-83.
- Pechanova O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiological Research* 2007;56(2):S7-S16.
- Kristek F. Long-term administration of L-arginine did not influence blood pressure, heart rate, cardiac hypertrophy or arterial wall thickness of spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology* 1998;83(5):595-603.
- Kristek F, Faberova V, Varga I. Long-Term effect of molsidomine and pentaerythryl tetranitrate on cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Physiological Research* 2003;52(6):709-717.
- Török J. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanooids, nitric oxide and hyperpolarization. *Physiol Res* 2000;49:107-114.
- Ribeiro MO, Antunes E, DeNucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
- Arnal J-F, Battle T, Ménard J, Michel J-B. The vasodilatory effect of endogenous nitric oxide is a major counterregulatory mechanism in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1993;11:945-150.
- Török J, Holecová A, Kysela S, Bernatova I, Pechanova O. Changes in reactivity of pulmonary and systemic arteries in chronic NO-deficient hypertension. *Cardiology* 1998;7:30-36.
- Török J, Kristek F. Functional and morphological pattern of vascular responses in two models of experimental hypertension. *Experimental Cardiology* 2001; 6(3):142-148.
- Zemančíková A, Török J. Cardiovascular effects of high-fructose intake in rats with nitric oxide deficiency. *Interdisciplinary toxicology*, 2014, 7:159-164.
- Pechanova O, Bernatova I, Pelouch V, Simko F. Protein remodelling of the heart in NO deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3365-3374.
- Dominiczak AF, Bohr DF. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 1995;25:1202-1211.
- Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*1982;62:347-504.
- Cacanyiova S, Dovinova I, Kristek F. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2013;64(2):241-247.

33. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Functions. Boca Raton CRC Press 1990.
34. Junquero DC, Schini VB, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Enhanced production of nitric oxide in aorta from spontaneously hypertensive rats by interleukin-1. *Am J Hypertens* 1993;6:602-610.
35. Matsuda K, Sekiguchi F, Yamamoto K, Shimamura K, Sunamo S. Unaltered endothelium-dependent modulation of contraction in the pulmonary artery of hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2000;392:61-70.
36. Török J, Devát I, Ježek L. Diminished endothelium dependent relaxation on hypertension is not primarily a function of elevated blood pressure. 12-th Congr Pathol Clin Physiol, Olomouc, 1995, p.85.
37. Holecyova A, Torok J, Bernatova I, Pechanova O. Restriction of nitric oxide rather than elevated blood pressure is responsible for alternations of vascular responses in nitric oxide-deficient hypertension. *Physiol Res* 1996;45:317-321.
38. Cebova M, Kristek F. Age-dependent ultrastructural changes of coronary artery in spontaneously hypertensive rats. *Gen Physiol Biophys* 2011; 30:364-372.
39. Owens GK, Schwartz SM. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia. *Circ Res* 1982;51:280-289.
40. Morton JJ, Beattie EC, Speirs A, Gulliver F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in the young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *J Hypertens* 1993;11:1083-1088.
41. Kristek F, Gerova M, Devát I, Varga I. Remodelling of septal branch of coronary artery and carotid artery in L-NAME treated rats. *Physiol Res* 1996;45:329-333.
42. Bevan RD, Van Marthens E, Bevan JA. Hyperplasia of vascular smooth muscle in experimental hypertension in the rabbit. *Circ Res* 1976;38(Suppl II):II58-62.
43. Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud AV. Morphometry of medial hypertrophy in the rat thoracic aorta. *Lab Invest* 1980;42:559-565.
44. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual process of remodelling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-397.
45. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodelling. *J Clin Invest* 1998;101:731-736.
46. Ceiler DL, De Mey JGR. Chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester treatment does not prevent flow-induced remodelling in mesenteric feed arteries and arcading arteriols. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2057-2063.
47. Lee RMKW. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987;65:1528-1535.
48. Bernatova I, Pechanova O, Kristek F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term L-NAME treatment. *Jpn J Pharmacol* 1999;81:99-106.