

Vplyv perivaskulárneho tukového tkaniva na reaktivitu veľkých artérií u potkanov s rôznou predispozíciou k hypertenzii

Zemančíková A, Török J

Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Effect of perivascular adipose tissue on the reactivity of conduit arteries in rats with different predisposition to hypertension

Zemancikova A, Torok J

Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Zemančíková A, Török J. **Vplyv perivaskulárneho tukového tkaniva na reaktivitu veľkých artérií u potkanov s rôznou predispozíciou k hypertenzii.** Cardiology Lett. 2017;26(6):336–347

Abstrakt. Práca sa zaoberá vplyvom perivaskulárneho tukového tkaniva (PVTT) na sympatoadrenergické kontrakcie izolovaných artérií potkanov s normálnym a zvýšeným krvným tlakom. Z 12-týždňových potkanov normotenzného kmeňa Wistar-Kyoto (WKY), spontánne hypertenzných potkanov (SHR) a ich krížencov – hranične hypertenzných potkanov (BHR) bola po usmrtení vypreparovaná *arteria mesenterica superior* a *aorta abdominalis*, z ktorých boli pripravené prstencové preparáty so zachovaným a s odstráneným PVTT. U normotenzných aj hypertenzných potkanov PVTT vykazovalo inhibičný vplyv na kontrakcie mezenterickej artérie v odpovedi na exogénny noradrenalin. V mezenterickej artérii WKY potkanov sa antikontraktilný efekt PVTT prejavil tiež pri neurogénnych kontrakciách vyvolaných elektrickou stimuláciou perivaskulárnych sympatikových nervov, nebol však významný u BHR a SHR. Pri brušnej aorte PVTT významne neovplyvnilo kontraktilnú odpoveď na exogénny noradrenalin ani u jednej skupiny potkanov. V prípade neurogénnych kontrakcií brušnej aorty sa v prítomnosti PVTT pozorovalo ich významné zväčšenie u WKY a BHR, pravdepodobne v dôsledku hustejšieho výskytu sympatikových nervových zakončení v PVTT tejto artérie. Z výsledkov vyplýva, že inhibičný vplyv PVTT na sympatoadre-

Zemancikova A, Torok J. **Effect of perivascular adipose tissue on the reactivity of conduit arteries in rats with different predisposition to hypertension.** Cardiology Lett. 2017;26(6):336–347

Abstract. In this study, the effect of perivascular adipose tissue (PVAT) on sympathoadrenergic contractions of conduit arteries was studied in rats with normal and increased blood pressure. The superior mesenteric artery and abdominal aorta were excised from 12-week-old rats of the Wistar-Kyoto (WKY), normotensive strain, spontaneously hypertensive rats (SHR), and borderline hypertensive rats (BHR) derived from cross-breeding SHR females with WKY males, and paired ring preparations with PVAT intact or removed were prepared from these arteries. In normotensive as well as in hypertensive rats, PVAT exhibited an inhibitory effect on contractile responses of mesenteric arteries to exogenous noradrenaline. In the mesenteric arteries of WKY, the anticontractile effect of PVAT was observed also during neurogenic contractions evoked by electrical stimulation of perivascular sympathetic nerves; however, it was not significant in BHR and SHR. In the abdominal aorta of any group of rats, PVAT did not significantly influence the contractions to exogenous noradrenaline. The neurogenic contractions of the abdominal aorta from WKY and BHR were significantly increased in the presence of PVAT, possibly due to the higher density of sympathetic nerve endings in the PVAT of this artery. In conclusion, the inhibitory effect of PVAT on sympathoadrenergic contractions is

Z Ústavu normálnej a patologickej fyziológie SAV v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 18. novembra 2017; prijaté dňa 22. novembra 2017

Adresa pre korešpondenciu: Doc. MUDr. Jozef Török, CSc., Ústav normálnej a patologickej fyziológie SAV, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: jozef.torok@savba.sk

From Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Manuscript received on November 18, 2017; accepted for publication November 22, 2017

Address for correspondence: Assoc. prof. Jozef Török, MD, PhD, Institute of Normal and Pathological Physiology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovak Republic, e-mail: jozef.torok@savba.sk

nergické odpovede závisí od denzity a distribúcie sympatikových nervov v arteriálnej stene, keďže tieto môžu zasahovať až do PVTT a ovplyvňovať tak jeho vazomodulačné účinky. Zároveň sa u SHR dokázal slabší antikontraktilný efekt PVTT v mezenterickej artérii, čo môže prispievať k zvýšenej arteriálnej senzitivite na adrenergické stimuly u týchto potkanov. Obr. 2, Tab. 1, Lit. 34, online full text (Free, PDF) www.sks.sk

Kľúčové slová: perivaskulárne tukové tkanivo – magistrálne tepny – sympatikový nervový systém – hypertenzia

Perivaskulárne tukové tkanivo (PVTT) a jeho parakrinná účasť na regulácii cievnych funkcií sa stali predmetom štúdií v rámci viacerých experimentálnych prác z ostatných rokov. Soltis a Cassis (1) boli prvými autormi, ktorí dokázali tlmivý vplyv perivaskulárneho tuku na kontraktilné odpovede izolovanej aorty potkana indukované noradrenalinom. Následné pozorovania iných autorov potvrdili inhibičné pôsobenie PVTT na kontrakcie vyvolané rozličnými typmi vazokonstriktorov na preparátoch aorty (2, 3) a na mezenterických artériách potkana (4, 5), ako aj na hrudných artériách človeka (6). V súčasnosti je známych viacero látok – adipokínov, cytokínov, mastných kyselín, plyných transmitterov a ďalších, ktoré sú produkované touto štruktúrou a vykazujú modulačné vplyvy na funkčné prejavy ciev, vrátane cievneho tonusu (7, 8). Z výsledkov mnohých štúdií, ako i z našich doterajších pozorovaní je zrejmé, že pri normálnych podmienkach prevláda antikontraktilné pôsobenie PVTT, ktoré je jednak podmienené prítomnosťou intaktného endotelu, jednak je z časti od endotelu nezávislé (3), súvisiace s aktiváciou rozličných typov K⁺ kanálov podľa typu cievy alebo druhu organizmu (2, 4 – 6). Uvedené nálezy viedli k otázke významu zachovania intaktného PVTT v *in vitro* experimentoch na izolovaných cievach, ako aj v klinickej praxi, a to najmä kvôli prevencii vazospazmov, ku ktorým dochádza pri porušení alebo odstránení PVTT počas izolácie cievnych štepov pred ich chirurgickým použitím (6, 9).

Doteraz nebola uspokojivo zodpovedaná otázka, ako je parakrinná – vazomodulačná funkcia PVTT ovplyvnená pri vysokom krvnom tlaku, respektíve či sa jej zmeny uplatňujú pri rozvoji hypertenzie, napríklad v rámci metabolického syndrómu, kedy je zvýšená telesná adipozita. Je známe, že množstvo viscerálneho tuku pri metabolickom syndróme významne koreluje s prevalenciou hypertenzie (10). Hypertenzia súvisiaca so stavom obezity sa tak zdá byť v rozpore s poznatkami o inhibičnom (antikontraktilnom) pôsobení perivaskulárneho tuku na cievny tonus. Ukazuje sa však, že pri nadmernej akumulácii tuku dochádza v PVTT ku zvýšenej tvorbe vazokonstriktčných a proinflamačných látok, čo môže pôsobiť ako iniciátor aterosklerotických zmien v cievnej stene, stimulovať kontrakciu a proliferáciu hlad-

dependent on the density and distribution of sympathetic nerves in the arterial wall, as the sympathetic innervation might also be present in PVAT and it could influence the vasomodulatory action of PVAT. Furthermore, the weaker anticontractile effect of PVAT in the mesenteric arteries from SHR might contribute to their enhanced sensitivity to adrenergic stimuli. Fig. 2, Tab. 1, Ref. 34, online full text (Free, PDF) www.sks.sk

Key words: perivascular adipose tissue – conduit arteries – sympathetic nervous system – hypertension

Perivascular adipose tissue (PVAT) and its paracrine regulation of vascular function has become the subject of many experimental studies during recent years. Soltis a Cassis (1) were the first who demonstrated the attenuating effect of perivascular fat on contractile responses of isolated rat aorta to noradrenaline. The subsequent observations of other authors confirmed the inhibitory action of PVAT during contractions induced by various types of vasoconstrictors in rat aorta (2, 3) and mesenteric arteries (4, 5) as well as in the human internal thoracic artery (6). Presently, many substances – adipokines, cytokines, fatty acids, gaseous transmitters and others – are known to be produced in PVAT, acting as modulators of functional properties of the vessels, including vascular tone (7, 8). From the results of many studies, as well as from our previous observations it is evident that in physiological conditions the anticontractile effect of PVAT prevails, which was found to be partially dependent on and partially independent of the presence of intact endothelium (3). Furthermore, this effect is connected to the activation of various types of potassium channels, depending on the type of vessel and organism (2, 4 – 6). Such findings led to the question of importance of retaining the intact PVAT on the surface of vessels in *in vitro* measurements of their reactivity, as well as in clinical praxis in the effort to prevent vasospasms which are produced due to removal of PVAT during the isolation of vessel grafts before their surgical use (6, 9).

Moreover, it is necessary to explore whether the paracrine function of PVAT is altered in conditions of elevated vascular resistance, or whether the changes in vasomodulatory function of PVAT might participate in the development of hypertension, particularly in metabolic syndrome when the body adiposity is increased. It is well known that abdominal (visceral) fat mass significantly correlates with the prevalence of hypertension (10). Thus, the obesity-related hypertension seems to be contrary to the inhibitory (anticontractile) effect of PVAT on vascular tone. It has been shown, however, that during excessive fat accumulation, a higher production of vasoconstrictor and pro-inflammatory substances occurs in PVAT, which might lead to the initiation of atherosclerotic processes in the vascular wall, induction of contraction and proliferation of vascular smooth muscle cells, and

kosvalových buniek a viesť tak k vzniku kardiovaskulárnych ochorení (8, 11, 12).

Na druhej strane, aj pri zníženom množstve PVTT sa môže prejavíť jeho nižšia antikontraktilná kapacita. Napríklad u spontánne hypertenzných potkanov (SHR), najčastejšie využívanom modeli ľudskej esenciálnej hypertenzie, sa zistila významná redukcia množstva viscerálneho tuku i celkovej telesnej adipozity, čo viacerí autori dávajú do súvislosti so slabším antikontraktilným vplyvom PVTT na cievny systém pri tomto kmeni potkanov. Ukázalo sa, že okrem kvantitatívnej odlišnosti perivaskulárny tuk u SHR vykazuje tiež mnohé kvalitatívne odchýlky, akými sú napríklad zvýšené zastúpenie hnedých adipocytov či zvýšená inervácia sympatikovým nervovým systémom (13, 14). Zosilnená aktivita sympatikového nervového systému je typická pre SHR a prejavuje sa už v skorých fázach ich ontogenézy, kedy sa dokázala zvýšená koncentrácia nervového rastového faktora v cievnej stene (15) a u juvenilných SHR sa zistila zvýšená denzita sympatikovej inervácie kardiovaskulárneho systému (16), čo sa u nich skoro prejavuje hyperkinetickou cirkuláciou (17).

Lokalizácia sympatikových nervových vlákien v stene cievy sa sústreďuje prevažne do adventiciálnej vrstvy, pričom pomocou imunofluorescenčnej detekcie tyrozín hydroxylázy, limitujúceho enzýmu v syntéze noradrenalinu sa ukázalo, že sympatikové vlákna môžu zasahovať aj do vzdialenejšieho PVTT. Dôkazy o priamom nervovom zásobení PVTT sú pomerne sporadické a nejasné, keďže to do značnej miery závisí od typu cievy a jej celkovej inervácie, napriek tomu je však opodstatnené uvažovať o funkčnej asociácii PVTT s cievnyim sympatikovým nervovým systémom. Na tejto úrovni sa predpokladajú rozsiahle vzájomné interakcie, ktoré zahŕňajú stimuláciu alebo inhibíciu uvoľňovania adipokínov a iných látok prostredníctvom aktivácie neurotransmiterových receptorov na adipocytoch, ako aj reguláciu samotnej nervovej aktivity adipokínmi (18, 19). Tieto procesy môžu tiež významným spôsobom prispievať k zmenám cievneho tonusu, a to najmä v patologických situáciách, kedy je narušená rovnováha vo funkcii jednotlivých uvedených štruktúr a receptorových systémov.

Cieľom práce bolo charakterizovať a porovnať vazoregulačné účinky PVTT vo veľkých artériách potkana, najmä jeho modulačný vplyv na prejavy sympatikovej aktivity na úrovni cievnej kontrakcie. Uvedené charakteristiky PVTT sa skúmali pri rôznych úrovniach krvného tlaku – u troch príbuzných genotypov potkanov vyznačujúcich sa odlišnou predispozíciou k hypertenzii: u normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov a u ich krížencov – hranične hypertenzných potkanov.

Metóda

V experimente sa použili dospelé samce potkana laboratórneho normotenzného kmeňa Wistar-Kyoto (WKY; 8

subsequently to the development of cardiovascular disorders (8, 11, 12).

On the other hand, the reduction in body fat may also be associated with the decreased anticontractile capacity of PVAT. For example, in spontaneously hypertensive rats (SHR), the most often used animal model of human essential hypertension, a significant reduction in the mass of visceral fat and also in the whole body adiposity was found, which was related to the weaker anticontractile influence of PVAT on the vessel system in this hypertensive rat strain. Besides the quantitative changes, many alterations in qualitative properties are manifested in PVAT from SHR arteries; e.g., it contains their amount of brown adipocytes and increased sympathetic innervation (13, 14).

The enhanced activity of the sympathetic nervous system is typical of SHR and is evident in early phases of their ontogenesis. In developing SHR, the elevated concentration of nerve growth factor in the vascular wall was detected (15) and the increased density of sympathetic innervation in the cardiovascular system was confirmed (16), which was soon shown by hyperkinetic circulation in these rats (17). The vascular sympathetic nerve fibres are predominantly localized within the adventitia, or in the adventitio-medial junction; however, the immunofluorescence methods for detection of tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme of noradrenaline synthesis, showed that the sympathetic nerves might also reach more peripheral structures including PVAT. The evidences of the direct sympathetic neural supply of PVAT are quite rare and sporadic, as this is substantially dependent on the vessel type and its total innervation. In spite of that, it is necessary to take in consideration the functional association of PVAT with the vascular sympathetic nervous system. Many important reciprocal interactions are expected there, including stimulation and inhibition of adipokine release by activation of the adipocyte receptors for neurotransmitters, as well as the regulation of sympathetic nervous activity by PVAT-derived substances (18, 19). These processes may contribute importantly to the changes in arterial tone, particularly in the pathological conditions when the balance in the function of these structures and of the receptor systems is disrupted.

The aim of this study was to characterize and compare the vasoregulatory effects of PVAT in rat conduit arteries, particularly the modulatory impact of PVAT on the sympathetic nerve activity at the level of vascular contraction. The characteristics of PVAT were studied at various blood pressure levels – in three related rat genotypes with different predisposition to hypertension: normotensive and spontaneously hypertensive rats, and their crossbreeds – borderline hypertensive rats.

Methods

The experiments were performed on adult male laboratory rats of normotensive strain Wistar-Kyoto (WKY; 8

jedincov), kmeňa so spontánnym/geneticky podmieneným typom hypertenzie (SHR, Spontaneously Hypertensive Rats; 9 jedincov) a hranične hypertenzné potkany (BHR, Borderline Hypertensive Rats; 8 jedincov), ktoré sa získali ako 1. generácia kríženia SHR samice a WKY samca. Všetky potkany pochádzali zo schváleného chovného zariadenia Ústavu normálnej a patologickej fyziológie SAV; boli chované pri štandardných podmienkach, pri teplote 22 – 24 °C s 12-hodinovým svetelným režimom (12 hodín svetlo : 12 hodín tma). Mali voľný prístup k pitnej vode a štandardnej granulovanej potrave. Experiment schválila Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky.

Potkany použité v experimente mali vek 12 týždňov. Systolický krvný tlak sa potkanom meral neinvazívnou pletyzomografickou metódou na chvostovej artérii v bdelom stave. Približne 12 hodín pred samotným experimentom bol každý jedinec izolovaný od skupiny a bol mu zamedzený prístup k potrave, aby bol v deň experimentu nalačno. V deň pokusu bol odvážený a následne dekapitovaný v anestéze CO₂. Bola mu stanovená hmotnosť ľavej komory srdca a retroperitoneálneho tuku a bola odobratá krv na stanovenie plazmatickej koncentrácie glukózy a triglyceridov. Po otvorení brušnej dutiny potkana mu boli vypreparované cievy – *arteria mesenterica superior* a *aorta abdominalis*, z ktorých sa pripravili dva prstencové preparáty široké 2 – 3 mm, jeden so zachovaným a jeden s odstráneným PVAT. Tieto sa umiestnili do orgánových vaničiek s termostatickým plášťom, naplnených modifikovaným Krebsovým roztokom s týmto zložením (v mmol/l): NaCl 118; KCl 5; NaHCO₃ 25; MgSO₄·7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂·2H₂O 2,5; glukóza 11; CaNa₂EDTA 0,03. Teplota roztoku sa udržiavala na 37 °C a kyslík sa dodával vo forme plynnej zmesi 95 % O₂ a 5 % CO₂. Preparáty boli pripojené na indukčný snímač tenzie Sanborn FT10 (Sanborn, Baltimore, USA) na meranie izometrických kontrakcií. Pri pasívnom východiskovom predpätí 1 g (10 mN) boli stabilizované 60 minút a výmena pracovného roztoku sa uskutočňovala každých 15 – 20 minút.

Po ustálení cievneho tonusu pri danom predpätí bola vyvolávaná transmurálna elektrická stimulácia (TES) pomocou elektrostimulátora ST 3 (Medicor, Budapešť, Maďarsko), ktorý je zdrojom pravouhlých unipolárnych impulzov s parametrami nastavenými pre selektívnu stimuláciu perivaskulárnych nervov: šírka impulzu 0,5 ms; amplitúda > 30 V (supramaximálna voltáž); frekvencia impulzov 4 Hz; dĺžka stimulácie 20 s. Elektrické impulzy boli vedené na platinové elektródy, ktoré sú súčasťou držiaka a sú umiestnené po stranách cievneho preparátu bez možnosti priameho kontaktu s ním.

Transmurálna elektrická stimulácia vyvolávala neurogénne kontrakcie cievnych preparátov, ktoré boli spôsobené účinkom endogénneho noradrenalinu uvoľneného z excitovaných nervových zakončení v stene cievy. Neurogénne kontrakcie boli vyblokovateľné guanetidínom alebo fentolamínom, čo potvrdzuje ich adrenergický pôvod.

n=8), spontaneously hypertensive rats (SHR; n=9), and borderline hypertensive rats (BHR; n=8) obtained by the cross-breeding SHR females with WKY males. All rats were housed at a temperature of 22 – 24 °C on a 12:12-h dark-light cycle (06.00 – 18.00 h lights on) and maintained on standard laboratory rat chow and tap water *ad libitum*. The animal protocols were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health, and they were approved by the Animal Health and Welfare Division of the State Veterinary and Food Administration of the Slovak Republic.

The rats used in experiments were aged 12 weeks. Systolic blood pressure was measured in conscious animals by the non-invasive tail-cuff method. Food was withdrawn 12 hours before the experiment. Rats were sacrificed under CO₂ anesthesia; their body weights, relative left heart ventricle weights (as left heart ventricle weight to tibia length ratio) and retroperitoneal fat weights were determined and samples of their blood were collected and used for measurement of plasma glucose and triglyceride concentration.

The selected conduit arteries (superior mesenteric artery, abdominal aorta) were removed and prepared for isometric tension recording. Paired endothelium-intact rings (2.8 – 3.2 mm in width) – one with PVAT preserved and other with PVAT removed – were prepared from each artery and connected to a force-displacement transducer FT 10 (Sanborn, Baltimore, USA) for the recording of isometric tension. The arterial rings were suspended in 20 ml organ baths with oxygenated modified Krebs solution (95% O₂ + 5% CO₂) maintained at 37 °C. The Krebs solution had the following composition (in mmol/l): NaCl 118, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, CaNa₂EDTA 0.03. The preparations were equilibrated under a resting tension of 10 mN for 60 – 90 min, and the solution was changed every 15 – 20 min.

After stabilization of arterial tone, transmural electrical stimulation (TES) was applied to evoke neurogenic contractions, which are induced by endogenous noradrenaline released from the excited sympathetic nerve endings in the vascular wall. For this procedure, an ST 3 electrostimulator (Medicor, Budapest, Hungary) was used as a source of square pulses with selective parameters for neural excitation: pulse duration 0.5 ms, supramaximal voltage > 30 V, frequency 4 Hz, total period 20 s. The neurogenic contractions were blocked by phentolamine or tetrodotoxin, indicating that they were induced mainly by nerve-released noradrenaline.

Exogenous noradrenaline was applied to arterial preparations in the concentration 10⁻⁶ mol/l.

Arterial isometric responses were expressed in mN and they were normalized to the length of the respective ring preparations. The results are presented as mean±SEM. Sta-

Exogénny noradrenalin bol na cievne preparáty aplikovaný vo výslednej koncentrácii 10^{-6} mol/l.

Zmeny tenzie cievneho preparátu boli vyjadrované v absolútnych jednotkách ako rozsah vyvinutej tenzie v mN v prepočte na dĺžku daného prstenca. Takto získané výsledky boli vyjadrené ako priemer so strednou chybou (priemer $\pm$ SEM) a štatisticky vyhodnotené pomocou one-way ANOVA testu. Za významné sa považovali rozdiely, pre ktoré hodnoty P boli menšie ako 0,05.

Výsledky

V **tabuľke 1** sú uvedené niektoré kardiovaskulárne a metabolické charakteristiky jednotlivých experimentálnych skupín potkanov. V 12. týždni života SHR vykazujú významne zvýšené hodnoty systolického tlaku krvi, srdcovej frekvencie a relatívnej hmotnosti ľavej komory srdca v porovnaní s WKY potkanmi. Naopak, telesná hmotnosť, množstvo retroperitoneálneho tuku a plazmatická koncentrácia triglyceridov sú u SHR nižšie ako u WKY. Ich krížence, BHR, majú hodnoty tlaku krvi medzi hodnotami u WKY a SHR, pričom sa významne odlišujú od oboch skupín. Srdcová frekvencia je u BHR významne vyššia v porovnaní s WKY a neodlišuje sa od SHR. Hodnoty relatívnej hmotnosti srdca sú u BHR na úrovni WKY potkanov a sú významne odlišné od SHR. Taktiež telesná hmotnosť, hmotnosť retroperitoneálneho tuku a plazmatická koncentrácia triglyceridov sa neodlišujú medzi WKY a BHR, obidve tieto skupiny sa však v uvedených parametroch významne odlišujú od SHR.

tistical evaluation was carried out by using one-way analysis of variance (ANOVA). The results were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

Selected cardiovascular and metabolic parameters in normotensive Wistar-Kyoto rats, borderline hypertensive rats, and spontaneously hypertensive rats are presented in **table 1**. At the 12th week of age, SHR have significantly increased systolic blood pressure, heart rate, and relative heart left ventricle weight when compared to WKY rats. On the contrary, values of body weight, retroperitoneal fat mass, and plasma triglyceride concentration were smaller in SHR comparing to WKY. Their crossbreeds, BHR, had significantly different values of blood pressure, ranging between those of WKY and SHR. The heart rate was higher in BHR than in WKY but it did not differ from the values in SHR. The left heart ventricle weight-to-tibia length ratio in BHR was at the level of WKY rats and they both have significantly smaller values of this parameter from those in SHR. Similarly, body weight, retroperitoneal fat mass, and plasma triglyceride concentration values were not different between WKY and BHR and these two groups differed from SHR in the mentioned parameters.

Plasma glucose concentration was not different between the particular experimental groups.

The contractile responses to exogenous noradrenaline (10^{-6} mol/l) in isolated mesenteric arteries with preserved PVAT were significantly higher in SHR (2.11 ± 0.15 mN/mm)

Tabuľka 1 Vybrané kardiovaskulárne a metabolické parametre u normotenzných Wistar-Kyoto (WKY) potkanov, hranične hypertenzných potkanov (BHR) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR)

Table 1 Selected cardiovascular and metabolic parameters in normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats, borderline hypertensive rats (BHR) and spontaneously hypertensive rats (SHR)

	WKY	BHR		SHR	
Systolický tlak krvi (Systolic blood pressure) (mmHg)	114,1 $\pm$ 1,8	125,9 $\pm$ 2,3	**	161,7 $\pm$ 5,1	***
			+++		
Srdcová frekvencia (Heart rate) (bpm)	340,8 $\pm$ 9,8	426,4 $\pm$ 12,9	***	454,3 $\pm$ 13,6	***
Telesná hmotnosť (Body weight) (g)	291,7 $\pm$ 3,3	294,1 $\pm$ 6,3		254,6 $\pm$ 5,7	***
			+++		
Hmotnosť ľavej komory srdca/dĺžka tibia (Heart-left ventricle weight/Tibia length) (mg/mm)	20,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,3		23,0 $\pm$ 0,7	*
			++		
Hmotnosť retroperitoneálneho tuku (Retroperitoneal fat weight) (mg)	2 150,9 $\pm$ 127,5	2 163,3 $\pm$ 131,1		1 452,5 $\pm$ 69,0	***
			+++		
Glukóza [(Glucose (plasma))] (mmol/l)	6,9 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,2		6,2 $\pm$ 0,3	
Triglyceridy [(Triglycerides (plasma))] (mmol/l)	0,80 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,07		0,62 $\pm$ 0,02	**
			+		

Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM; $n = 8 - 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. WKY; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ vs. SHR (Values represent mean $\pm$ SEM; $n = 8 - 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. WKY; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$ vs. SHR).

Koncentrácia glukózy v plazme nebola signifikantne odlišná medzi experimentálnymi skupinami.

Kontraktilné odpovede izolovanej mezenterickej artérie na exogénny noradrenalín (10^{-6} mol/l) boli pri zachovanom PVTT významne vyššie u SHR ($2,11 \pm 0,15$ mN/mm) v porovnaní s BHR ($1,47 \pm 0,18$ mN/mm) a WKY ($1,48 \pm 0,15$ mN/mm) ($P < 0,05$); na preparátoch bez PVTT sa neprejavil rozdiel vo veľkosti noradrenalínovej kontrakcie medzi jednotlivými skupinami potkanov. V prítomnosti intaktného PVTT sa pozorovala menšia kontraktilná odpoveď na noradrenalín u všetkých troch experimentálnych skupín, pričom tento efekt bol menej výrazný u SHR (**obrázok 1**).

V prípade brušnej aorty neboli významné rozdiely vo veľkosti kontrakcie na exogénny noradrenalín medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami, ani medzi preparátmi s intaktným a odstráneným PVTT (**obrázok 1**).

Neurogénne kontrakcie v odpovedi na TES (4 Hz) boli u preparátov mezenterickej artérie so zachovaným PVTT významne menšie u WKY ($0,92 \pm 0,07$ mN/mm) v porovnaní s SHR ($1,48 \pm 0,09$ mN/mm) ($P < 0,05$), tento rozdiel sa však nezistil na preparátoch bez PVTT. V prípade mezenterických artérií z BHR sa veľkosť neurogénnych kontrakcií významne neodlišovala od ostatných dvoch skupín, a to ani na preparátoch s PVTT, ani pri odstránení PVTT. V prítomnosti intaktného PVTT neurogénne kontrakcie mezenterickej artérie boli signifikantne menšie u WKY potkanov, nie však u SHR a BHR (**obrázok 2**).

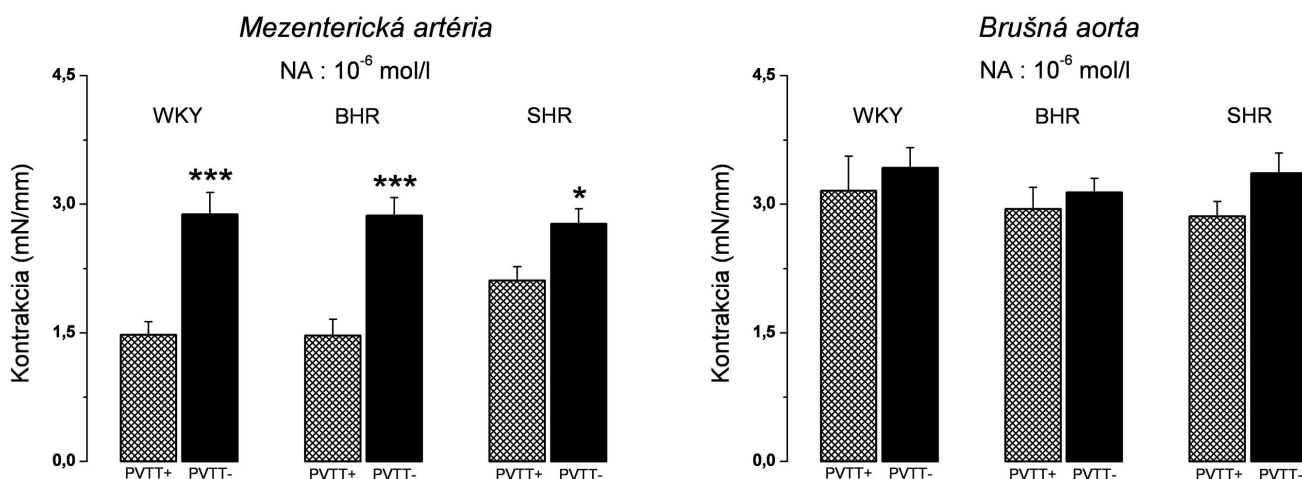
Neurogénne kontrakcie izolovanej brušnej aorty so zachovaným PVTT sa medzi jednotlivými skupinami potkanov

when compared to BHR (1.47 ± 0.18 mN/mm) and WKY (1.48 ± 0.15 mN/mm) ($p < 0.05$); on preparations without PVAT the differences in noradrenaline contractions were not detected between the particular rat groups. In the presence of intact PVAT, smaller mesenteric arterial contractile responses to noradrenaline were observed in all groups, when compared to the respective preparations without PVAT. The inhibitory effect of PVAT on noradrenaline contraction was less considerable in SHR (**Figure 1**).

In abdominal aorta, the differences in contractile responses to exogenous noradrenaline were not detected between the preparations with PVAT intact and PVAT removed, as well as between the particular experimental rat groups (**Figure 1**).

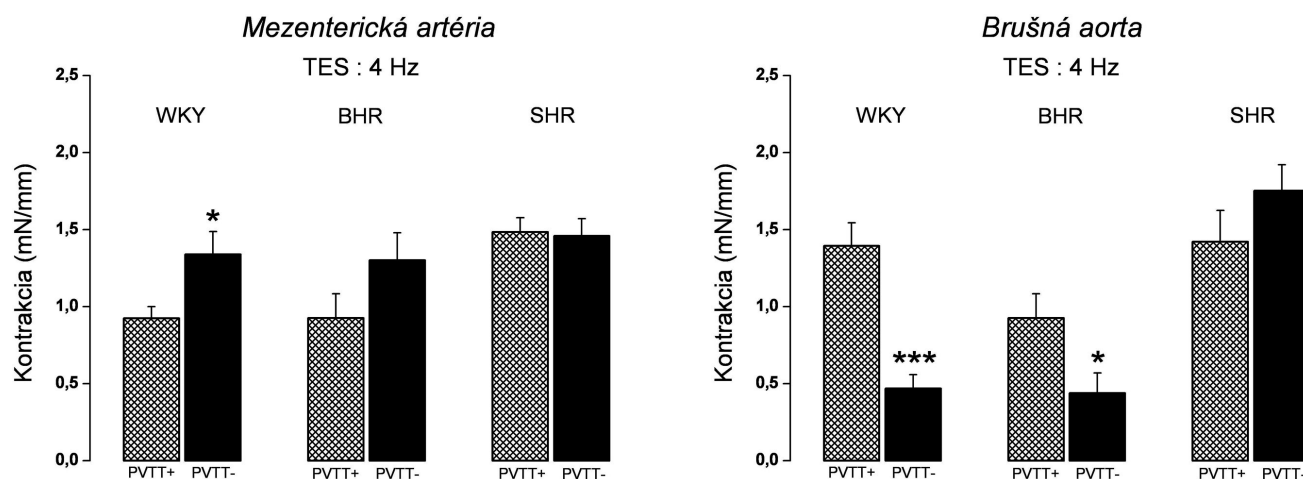
The neurogenic contractions in response to TES (4 Hz) in mesenteric arterial preparations with intact PVAT were significantly smaller in WKY (0.92 ± 0.07 mN/mm) when compared to those in SHR (1.48 ± 0.09 mN/mm) ($p < 0.05$); however, the differences were not observed in preparations with PVAT removed. Neurogenic contractile responses of mesenteric arteries from BHR did not differ from those in WKY and SHR, in conditions of PVAT intact, as well as PVAT removed. In WKY, in the presence of PVAT, the neurogenic contractions of mesenteric arteries were significantly decreased when compared to preparations without PVAT; however, this effect was not observed in SHR and BHR (**Figure 2**).

The neurogenic contractions of isolated abdominal aorta with preserved PVAT were not significantly different between the rat groups; however, in PVAT-denuded aortas,



Obrázok 1 Kontraktilné odpovede indukované exogénnym noradrenalínom (NA; 10^{-6} mol/l) v mezenterických artériách a brušných aortách s intaktným (+) a odstráneným (–) perivaskulárnym tukovým tkanivom (PVTT) u normotenzných Wistar-Kyoto (WKY) potkanov, hranične hypertenzných potkanov (BHR) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM; $n = 8 - 9$. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs. PVTT+ v príslušnej skupine.

Figure 1 Contractile responses induced by exogenous noradrenaline (NA; 10^{-6} mol/l) in mesenteric arteries and abdominal aortas with intact (+) and removed (–) perivascular adipose tissue (PVTT) in normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats, borderline hypertensive rats (BHR) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Values represent mean $\pm$ SEM, $n=8-9$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. PVTT+ in the respective group.



Obrázok 2 Neurogénne kontrakcie vyvolané transmúrálou elektrickou stimuláciou (TES; 4 Hz) v mezenterických artériách a brušných aortách s intaktným (+) a odstráneným (–) perivaskulárnym tukovým tkanivom (PVTT) u normotenzných Wistar-Kyoto (WKY) potkanov, hranične hypertenzných potkanov (BHR) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Výsledky sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SEM; $n = 8 - 9$. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs. PVTT+ v príslušnej skupine.

Figure 2 Neurogenic contractile responses induced by transmural electrical stimulation (TES; 4 Hz) in mesenteric arteries and abdominal aortas with intact (+) and removed (–) perivascular adipose tissue (PVTT) in normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats, borderline hypertensive rats (BHR) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Values represent mean $\pm$ SEM, $n=8-9$. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs. PVTT+ in the respective group.

významne neodlišovali, na preparátoch s odstráneným PVTT boli však signifikantne menšie u WKY ($0,47 \pm 0,09$ mN/mm) a BHR ($0,44 \pm 0,13$ mN/mm) v porovnaní s SHR ($1,75 \pm 0,17$ mN/mm) ($P < 0,001$). Preparáty brušnej aorty s odstráneným PVTT vykazovali pri porovnaní s preparátmi s intaktným PVTT signifikantne menšie neurogénne kontrakcie u WKY a u BHR, tento rozdiel sa však nepozoroval u SHR (obrázok 2).

these contractions were significantly smaller in WKY (0.47 ± 0.09 mN/mm) and BHR (0.44 ± 0.13 mN/mm) compared to SHR (1.75 ± 0.17 mN/mm) ($p < 0.001$). The preparations of abdominal aorta with removed PVAT, compared to those with preserved PVAT, exhibited significantly smaller neurogenic contractions in WKY and in BHR; in SHR, the magnitude of neurogenic contractions was not significantly influenced by PVAT (Figure 2).

Diskusia

Perivaskulárny tuk sa iba v nedávnom období začal považovať za dôležitý faktor, ktorý v interakcii s ostatnými regulačnými systémami významne ovplyvňuje fyziologické i patofyziologické procesy v cievnej stene. Viaceré práce ukázali, že vo väčšine artérií prevažuje antikontraktilný hyperpolarizujúci vplyv PVTT, čo potvrdzujú aj prezentované výsledky tejto práce z meraní kontraktilných odpovedí na noradrenalin na izolovanej mezenterickej artérii v prítomnosti a po odstránení PVTT. Tento inhibičný účinok PVTT na noradrenalinovú kontrakciu bol prítomný u normotenzných, ako aj u hypertenzných potkanov, pričom sa ukázalo, že je menej výrazný u SHR, čo je v súlade s pozorovaniami iných autorov dokazujúcich oslabený antikontraktilný vplyv PVTT pri artériách z SHR (13, 20). Prezentované výsledky tiež ukazujú, že v prítomnosti PVTT sú kontrakcie mezenterickej artérie na noradrenalin významne väčšie u SHR v porovnaní s normotenznými WKY potkanmi, kým po odstránení PVTT

Discussion

Perivascular fat has only recently begun to be considered as an important factor which, in interaction with other regulatory systems, significantly influences many physiological and pathophysiological processes in the vascular wall. Many studies have shown that in most of arteries the main effect of PVAT manifests as an inhibition of contractile responses by hyperpolarisation, which is also confirmed by the results of this study presenting the measurements of noradrenaline contractions in isolated mesenteric arteries with PVAT intact or removed. Such inhibitory effect of PVAT on noradrenaline responses was found in normotensive as well as in hypertensive rats; however, it was less considerable in SHR, which is in agreement with the observations of other authors who demonstrated the weakened anticontractile influence of PVAT in arteries from SHR (13, 20). The presented results also demonstrate that in the presence of intact PVAT the contractile responses of mesenteric arteries to noradrenaline

sa rozdiel vo veľkosti kontrakcie medzi SHR a WKY nepozoruje. To naznačuje, že u SHR by zmenené vlastnosti PVTT spolu s endotelovou dysfunkciou (21) a ďalšími faktormi mohli významne prispievať k zvýšenej senzitivite artérií na adrenergické stimuly.

SHR je kmeň potkanov s geneticky podmienenou hypertenziou, charakterizovaný obvykle nižšou telesnou hmotnosťou a adekvátne nižším obsahom telesného tuku v porovnaní s pôvodným normotenzným kmeňom WKY, ako ukazujú i vyššie prezentované výsledky. Gálvez et al. (13) zistili, že hmotnosť mezenteria a jeho celkový lipidový obsah je u SHR nižší. Možno predpokladať, že znížené množstvo PVTT u SHR má za následok menšiu kvantitu antikrakilne pôsobiacich látok produkovaných a uvoľňovaných z PVTT. Viac než kvantitatívne rozdiely sú však zreteľné kvalitatívne rozdiely v PVTT medzi SHR a WKY. Lee et al. (22) zistili, že uvoľňovanie relaxačne pôsobiacej látky – metylesteru kyseliny palmitovej – je znížené, kým produkcia angiotenzínu II je zvýšená v PVTT z artérií pochádzajúcich z SHR v porovnaní s WKY. Nálezy Lu et al. (14) ukazujú, že PVTT hrudnej aorty u SHR má podobnú veľkosť plochy na priečnom priereze, obsahuje však vyššiu denzitu a celkové množstvo hnedých adipocytov v porovnaní s WKY, čo naznačuje zníženú sekrečnú kapacitu PVTT u SHR. Okrem zníženej produkcie relaxačných faktorov tiež zvýšená sympatiková inervácia PVTT (23) a deficientná funkcia membránových K⁺ kanálov zodpovedných za hyperpolarizáciu cievnych hladkosvalových buniek (20, 24) môžu čiastočne prispievať k slabšiemu antikrakilnému efektu PVTT u SHR.

Pri neurogénnych kontrakciách, vyvolaných endogénnym noradrenálnom uvoľnením z perivaskulárnych sympatikových nervov počas ich elektrickej stimulácie, sa antikrakilný vplyv PVTT signifikantne prejavil iba u normotenzných WKY potkanov, nie však u hypertenzných skupín. Podobne ako pri exogénnom noradrenalíne, ukázalo sa, že v prítomnosti PVTT sú neurogénne kontrakcie mezenterickej artérie významne väčšie u SHR v porovnaní s WKY potkanmi, kým na preparátoch s odstráneným PVTT sa tento rozdiel nezistil. To opäť potvrdzuje zníženú antikrakilnú kapacitu PVTT u SHR.

U BHR, ktoré predstavujú prvú generáciu kríženia SHR a WKY, je v porovnaní s normotenznými jedincami mierne zvýšený krvný tlak i srdcová frekvencia, kým telesnou hmotnosťou a množstvom retroperitoneálneho tuku a plazmatických triglyceridov sú bližšie k WKY a významne sa odlišujú od SHR. Z prezentovaných výsledkov je vidieť, že u BHR tiež veľkosť adrenergických kontrakcií na preparátoch mezenterickej artérie s intaktným PVTT zodpovedá viac hodnotám normotenzných WKY potkanov než SHR, hoci inhibičný vplyv PVTT pri neurogénnych kontrakciách nebol u BHR štatisticky významný. Z týchto zistení vyplýva, že v 12. týždni života, v porovnaní s WKY sú u BHR tlak krvi a srdcová frekvencia

were significantly higher in SHR when compared to those in normotensive WKY rats, while in preparations without PVAT the difference in contractions between SHR and WKY was not detected. This indicates that in SHR, the altered properties of PVAT, together with endothelial dysfunction (21) and other factors, could importantly contribute to the increased sensitivity of their arteries to adrenergic stimuli.

SHR represent a strain of rats with genetically determined hypertension, frequently having smaller body weight and correspondingly lesser content of body fat in comparison to the original normotensive strain WKY, as is documented also by the results presented above. Gálvez et al. (13) found that the weight of the mesentery and its total lipid content is decreased in SHR. One can suppose that the reduced amount of PVAT in SHR causes correspondingly smaller production and release of PVAT-derived anticontractile substances. However, more than the differences in quantity, the qualitative alterations are evident in PVAT from SHR arteries. Lee et al. (22) detected the reduced release of a relaxant substance – methyl palmitate, while the production of angiotensin II was increased in PVAT from SHR, when compared to WKY. The findings of Lu et al. (14) showed that PVAT in thoracic aortas from SHR has a similar cross sectional area but contains a higher density and amount of brown adipocytes when compared to WKY, which indicates its reduced secretory capacity. Besides the restricted production of relaxant substances in PVAT, it can be supposed that the increased sympathetic innervation (23) and the deficient function of the membrane potassium channels, responsible for the hyperpolarisation of vascular smooth muscle cells (20, 24), could also contribute to the weaker anticontractile effect of PVAT in SHR.

When considering the neurogenic contractions induced by endogenous noradrenaline released from perivascular sympathetic nerves during TES, the anticontractile effect of PVAT was detected to be significant only in mesenteric arteries from WKY rats but not in the two hypertensive rat groups. Similarly to the responses to exogenous noradrenaline, the neurogenic contractions of mesenteric arterial rings with intact PVAT were significantly higher in SHR when compared to WKY rats, while in the preparations without PVAT this difference was not observed. This again confirms the reduced anticontractile capacity of PVAT in SHR.

In BHR, which represent the first generation of cross-breeding SHR with WKY, the blood pressure and heart rate were moderately increased in comparison with normotensive rats; however, the values of their body weight, retroperitoneal fat weight, and plasma triglyceride concentration were closer to WKY, and differed significantly from SHR. The presented results also showed that in BHR the adrenergic contractions in mesenteric arterial preparations with intact PVAT corresponded more to those in WKY than to those in SHR, although the inhibitory effect of PVAT on neurogenic contractions in BHR mesenteric arteries was not statistically

mierne, ale signifikantne zvýšené; tieto patologické odchýlky sa však u nich ešte neprejavujú zvýšenými hodnotami relatívnej hmotnosti srdca a adrenergických kontrakcií mezenterickej artérie s intaktným PVTT, ako je to u SHR. V 20. týždni veku však už BHR pri porovnaní s WKY už vykazujú signifikantne väčšie adrenergické kontrakcie artérií ako aj hypertrofiu srdca, hoci veľkosť ich tlaku krvi nedosahuje také vysoké hodnoty, aké sú u SHR (25).

Z vyššie uvedeného vyplýva, že na mezenterickej artérii u zdravých normotenzných WKY PVTT spôsobuje významné zmenšenie kontrakcií v odpovedi na exogénny, ako aj na endogénny noradrenalin uvoľnený pri TES. Preto možno predpokladať, že táto inhibícia sa uskutočňuje prevažne na postsynaptickej úrovni – znížením citlivosti cievnej hladkej svaloviny na konstriktorické stimuly. Na rozdiel od toho v prípade brušnej aorty sa nepozoroval inhibičný efekt PVTT na kontrakcie v odpovedi na exogénny noradrenalin; v prípade neurogénnych kontrakcií boli tieto dokonca významne väčšie na aortálnych prstencoch so zachovaným PVTT v porovnaní s preparátmi bez PVTT. Prezentované výsledky naznačujú, že prítomnosť PVTT pri brušnej aorte nespôsobuje zmenšenie kontrakcie na samotný noradrenalin, ale zrejme interferuje s uvoľňovaním noradrenalinu z endogénnych zdrojov v cievnej stene. Možno predpokladať, že v PVTT sú produkované látky, napríklad angiotenzín II alebo superoxid, ktoré ovplyvňujú sympatickú neurotransmisiu a môžu zvyšovať veľkosť neurogénnych kontrakcií (26, 27). Iným možným vysvetlením by mohlo byť to, že perivaskulárny tuk abdominálnej aorty je zdrojom endogénneho noradrenalinu, ktorý tak participuje na neurogénej kontrakcii v odpovedi na TES. Táto časť noradrenalinových zdrojov bola eliminovaná pri odstránení PVTT z povrchu aorty, a jej absencia sa prejavila menšími kontrakciami na TES v porovnaní s preparátmi so zachovaným PVTT. Vargovic et al. (28) vo svojej práci ukázali, že i samotné adipocyty môžu produkovať noradrenalin. Napriek tomu sa možno domnievať, že v prezentovaných výsledkoch sa pri neurogénnych kontrakciách brušnej aorty v odpovedi na TES uplatňoval noradrenalin nervového pôvodu, ako je naznačené v metodической časti textu. Priame dôkazy o sympatickej inervácii PVTT sú však sporadické, s výnimkou niektorých prác dokumentujúcich inerváciu perivaskulárneho tuku u mezenterickej artérie potkana (29), vény sapheny u človeka (9) a mezenterických artérií myši (18). Naopak, vyššie uvedené nálezy na mezenterickej artérii potkana naznačujú, že PVTT tejto artérie neobsahuje významné množstvo endogénneho noradrenalinu nervového pôvodu a že väčšina adrenergických nervov je lokalizovaná v rámci povrchových vrstiev samotnej cievnej steny, keďže v prítomnosti PVTT sú neurogéne kontrakcie zmenšené. Takéto pozorovanie možno vysvetliť tiež zvýšenou produkciou relaxačných faktorov v PVTT, ktorých antikontraktilný efekt u normotenzných WKY značne prevyšuje možný

signifikant. From these findings it is evident that in the 12th week of life, the values of blood pressure and heart rate are moderately, but significantly, increased in BHR when compared to the age-matched WKY rats; such alterations in BHR, however, were not reflected in the higher relative left heart weight and in the increase of adrenergic contractions of mesenteric arteries with intact PVAT, as was observed in SHR. On the contrary, in the 20th week of life, the increase in arterial adrenergic contractions, as well as the left heart hypertrophy, was already observed in BHR, although the level of their blood pressure did not reach the values in SHR (25).

From the above-mentioned it is obvious that in mesenteric arteries from normotensive WKY rats, PVAT causes significant reduction in contractile responses to exogenous as well as to endogenous noradrenaline released from electrically excited perivascular sympathetic nerves. Therefore, it might be supposed that this inhibition occurs mostly at the postsynaptic level – by the decrease in sensitivity of vascular smooth muscle to constrictor stimuli.

On the contrary, in abdominal aorta, the inhibitory effect of PVAT on contractile responses to exogenous noradrenaline was not observed in this study; moreover, the neurogenic contractions were even higher in aortal rings with intact PVAT comparing to those with PVAT removed. These results indicate that the presence of PVAT in abdominal aorta does not cause the decrease in contractions to noradrenaline itself, and that it possibly interferes with the release of noradrenaline from endogenous sources in the arterial wall. One can suppose that some substances like angiotensin II or superoxide, which are known to be produced in PVAT (26, 27), can influence the sympathetic neurotransmission and increase the neurogenic contractions in the abdominal aorta, as was observed in the present study. Other possible explanation might be that in this artery, PVAT itself is a source of endogenous noradrenaline which can participate in the neurogenic contractions in response to TES. This part of the noradrenaline source was eliminated after PVAT removal from the surface of aortal preparations, and this manifested itself by smaller contractile responses to TES compared to preparations with intact PVAT. Vargovic et al. (28) found in their study that the adipocytes can also produce noradrenaline. In spite of that, when considering the presented results, it may be assumed that noradrenaline of neural origin was involved in the observed contractile responses to TES, as is indicated in Methods. However, direct evidence of sympathetic innervation of PVAT is quite rare, with the exception of several studies confirming the presence of sympathetic nerves in perivascular fat in rat mesenteric artery (29), human saphenous vein (9), and in the mesenteric arteries of mice (18). By contrast, the findings of this study indicate that PVAT in the rat mesenteric artery does not contain significant amount of neutrally-originated endogenous noradrenaline, and that the sympatho-adrenergic nerves are predominantly localized within the outer layers of

príspevok sympatikových nervov v PVTT k neurogéennej kontrakcii (23).

V prípade abdominálnej aorty sa však tvorba a uvoľňovanie antikontraktilne pôsobiacich látok z PVTT zdajú byť menej významné, ako to možno pozorovať pri kontrakcii na exogénny noradrenalin, ktorej veľkosť nebola ovplyvnená prítomnosťou PVTT; vplyv adrenergetickej inervácie prítomnej v PVTT sa tu však zdá byť podstatnejší. Brown et al. (30) priniesli pozorovania, že brušná aorta je obklopená PVTT, ktoré je zmesou bielych a hnedých adipocytov (tzv. béžové tukové tkanivo), kým PVTT pri mezenterických artériách obsahuje iba biele adipocyty. Je známe, že veľkosť denzity sympatikovej inervácie pozitívne koreluje s množstvom hnedých adipocytov v tukovom tkanive (31), čo je v zhode s uvedenými nálezmi a predstavami o rozdielnom pomere sympatikového nervového zásobenia medzi PVTT a vlastnou cievnu stenou mezenterickej artérie a brušnej aorty.

Okrem rozdielnej distribúcie sympatikovej inervácie v rámci arteriálnych a periarteriálnych štruktúr tiež prítomnosť iných typov nervov a neurotransmiterov môže zohrávať významnú úlohu v modulačnom účinku PVTT na noradrenergické kontrakcie u rôznych artérií. Dubrovská et al. (32) zistili, že v aorte potkana sa senzorické neurotransmitery, aktivujúce vaniloidné, kanabinoidné receptory a receptory pre CGRP (calcitonin gene-related peptide), nepodieľajú na modulačnom pôsobení PVTT na kontraktilné odpovede. Naopak, zistilo sa, že v mezenterickom arteriálnom riečisku funkcia peptidergických (senzorických) nervov má významnú úlohu a ich aktivácia spôsobuje inhibíciu kontrakcií týchto artérií (33). Uvoľňovanie CGRP, jedného zo senzorických neurotransmiterov, ktorý hyperpolarizuje cievnu svalovinu aktiváciou K^+ kanálov, sa potvrdilo tiež v rámci PVTT (34). Aktivácia senzorických nervov obsahujúcich relaxačné neurotransmitery môže tak pri TES prekrývať vplyv adrenergických nervov v mezenterickej artérii a je pravdepodobné, že do značnej miery prispieva k antikontraktilnému účinku PVTT.

U BHR a SHR, podobne ako u normotenzných WKY potkanov, inhibičný vplyv PVTT na kontrakcie brušnej aorty v odpovedi na exogénny noradrenalin sa nepozoroval. Naproti tomu, na rozdiel od WKY a BHR, u SHR neboli v prítomnosti PVTT zväčšené neurogéenne kontrakcie tejto cievy. Ukazuje sa, že v brušnej aorte u SHR je väčšina sympatikového nervového zásobenia sústredená v rámci vlastnej cievnej steny, ako je dokumentované významne väčšími neurogénymi kontrakciami preparátov bez PVTT u SHR v porovnaní s WKY a BHR.

Záver

Na záver možno zhrnúť, že prezentované výsledky potvrdili antikontraktilné pôsobenie PVTT v mezenterickej artérii

the proper mesenteric arterial wall. This was documented by the decreased neurogenic contractions of mesenteric arterial rings in the presence of PVAT. Such findings could be also explained by the increased production of relaxant factors in PVAT, the anticontractile effect of which importantly overlaps the potential contribution of sympathetic nerves in PVAT to neurogenic contractions of mesenteric arteries from WKY rats (23).

In contrast, in the abdominal aorta, the production and release of anticontractile substances from PVAT seem to be less important, as the contractile responses to exogenous noradrenaline were not influenced by the presence of PVAT; however, the activity of sympathetic nerves could be of greater importance. Brown et al. (30) made the observations that the abdominal aorta is surrounded by PVAT with a mixture of white and brown adipocytes ("beige" adipose tissue), while PVAT in mesenteric arteries contains only white adipocytes. It was found that the density of sympathetic innervation in adipose tissue positively correlates with the amount of brown adipocytes (31) which is in accordance with the above-mentioned findings and ideas about the different sympathetic nerve content in PVAT and in the proper vascular wall in mesenteric artery and in abdominal aorta.

Besides the different distribution of sympathetic innervation within arterial and periarterial structures, the presence of other types of nerves and neurotransmitters could also play an important role when considering the modulatory effect of PVAT on noradrenergic contractions in various vessels. Dubrovská et al. (32) observed that in rat aorta the sensoric neurotransmitters activating vanilloid receptors, cannabinoid receptors, and receptors for CGRP (calcitonin gene-related peptide) do not contribute to the modulatory action of PVAT on contractile responses. On the other hand, it was found that in mesenteric arterial bed the function of peptidergic (sensoric) nerves plays a significant role and their activation causes inhibition of contractions in these arteries (33). The release of CGRP, one of the sensoric neurotransmitters, which hyperpolarises the vascular smooth muscle by activating the membrane potassium channels, was also confirmed in PVAT (34). Activation of sensoric nerves containing various relaxant neurotransmitters could, therefore, overlap the influence of adrenergic nerves in mesenteric artery, and this may importantly contribute to the anticontractile effect of PVAT during TES.

In BHR and SHR, as in the normotensive WKY rats, the inhibitory action of PVAT on contractions of the abdominal aorta in response to exogenous noradrenaline was not observed. The presence of intact PVAT did not affect the neurogenic contractions of SHR aortas, in contrast to WKY and BHR, where the contractile responses were higher in aortal preparations with preserved PVAT compared to those with removed PVAT. It seems that in the abdominal aorta of SHR, most of the sympathetic nerve supply is concentrated in the proper vascular wall, as was also documented by the

u normotenzných WKY potkanov. Tento efekt bol zachovaný v podobnom rozsahu tiež u potkanov s hraničnou hypertenziou (BHR), avšak bol významne menší u SHR, ktoré majú v dospelosti výrazne zvýšený krvný tlak. Z výsledkov vyplýva, že u SHR sa zmenené vlastnosti PVTT môžu významne podieľať na zväčšenej citlivosti mezenterických artérií na konstriktorické stimuly.

Tiež sa zistilo, že v prípade brušnej aorty samotné PVTT môže obsahovať sympatickú inerváciu a môže tak byť zdrojom endogénneho noradrenalinu, ktorého účinok môže výrazne prekryvať potenciálny vplyv antikontraktilne pôsobiacich látok, uvoľňovaných z tohto tkaniva.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA č. 2/0202/15.

increased neurogenic contractions of preparations without PVAT when compared to those of WKY and BHR.

In conclusion, the presented results confirmed the anticontractile action of PVAT in mesenteric arteries from 12-week-old normotensive WKY rats. This effect was preserved to a similar extent also in age-matched rats with borderline hypertension (BHR), but it was significantly reduced in SHR which had substantially increased blood pressure. From these findings it can be concluded that the altered properties of PVAT in SHR could importantly contribute to the increased sensitivity of their mesenteric arteries to constrictor stimuli.

It was also observed that in the abdominal aorta, PVAT might contain sympathetic innervation as a source of endogenous noradrenaline, the effect of which might considerably overlap the potential influence of anticontractile substances released from this tissue.

Acknowledgements

The study was supported by VEGA grant No. 2/0202/15.

Literatúra/References

1. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A* 1991;13(2):277-296.
2. Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 2002;16(9):1057-1063.
3. Gao YJ, Lu C, Su LY, Sharma AM, Lee RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2007;151(3):323-331.
4. Verlohren S, Dubrovská G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 2004;44(3):271-276.
5. Gálvez-Prieto B, Dubrovská G, Cano MV, Delgado M, Aranguez I, González MC, Ruiz-Gayo M, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;31(7):1415-1423.
6. Gao YJ, Zeng ZH, Teoh K, Sharma AM, Abouzahr L, Cybulsky I, Lamy A, Semelhago L, Lee RM. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(4):1130-1136.
7. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)* 2012;122(1):1-12.
8. Xia N, Li H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 2017;174(20):3425-3442.
9. Loesch A, Dashwood MR. On the sympathetic innervation of the human greater saphenous vein: relevance to clinical practice. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7(1):58-67.
10. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després JP. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 2009;53(4):577-584.
11. Rajsheker S, Manka D, Blomkalns AL, Chatterjee TK, Stoll LL, Weintraub NL. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(2):191-196.
12. Fernández-Alfonso MS, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Aranguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. *Int J Endocrinol* 2013;2013:402053.
13. Gálvez B, de Castro J, Herold D, Dubrovská G, Arribas S, González MC, Aranguez I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(6):1297-1302.
14. Lu C, Su LY, Lee RM, Gao YJ. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. *Eur J Pharmacol* 2011;656(1-3):68-73.
15. Zettler C, Rush RA. Elevated concentrations of nerve growth factor in heart and mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1993;614(1-2):15-20.
16. Mangiarua EI, Lee RM. Increased sympathetic innervation in the cerebral and mesenteric arteries of hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68(4):492-499.
17. Dickhout JG, Lee RM. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):H794-H800.
18. Bulloch JM, Daly CJ. Autonomic nerves and perivascular fat: interactive mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2014;143(1):61-73.
19. Loesch A, Dashwood MR. Nerve-perivascular fat communication as a potential influence on the performance of blood vessels used as coronary artery bypass grafts. *J Cell Commun Signal* 2017, in press.
20. Li R, Andersen I, Aleke J, Golubinskaya V, Gustafsson H, Nilsson H. Reduced anti-contractile effect of perivascular adipose tissue on mesenteric small arteries from spontane-

- ously hypertensive rats: role of Kv7 channels. *Eur J Pharmacol* 2013;698(1-3):310-315.
21. Puzserova A, Ilovská V, Balis P, Slezak P, Bernatova I. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. *Biomed Res Int* 2014;2014:658479.
 22. Lee YC, Chang HH, Chiang CL, Liu CH, Yeh JI, Chen MF, Chen PY, Kuo JS, Lee TJ. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation*. 2011;124(10):1160-1171.
 23. Török J, Zemančíková A, Kocianová Z. Interaction of perivascular adipose tissue and sympathetic nerves in arteries from normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res* 2016;65(Suppl 3):S391-S399.
 24. Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization. *Life Sci* 2016;166:46-53.
 25. Zemančíková A, Török J. Comparison Of Cardiovascular Characteristics In Normotensive And Hypertensive Rat Strains. *Indian J Physiol Pharmacol* 2015;59(4):361-368.
 26. Lu C, Su LY, Lee RM, Gao YJ. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 2010;634(1-3):107-112.
 27. Gao YJ, Takemori K, Su LY, An WS, Lu C, Sharma AM, Lee RM. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 2006;71(2):363-373.
 28. Vargovic P, Ukropec J, Laukova M, Cleary S, Manz B, Pacak K, Kvetnansky R. Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Lett* 2011;585(14):2279-2284.
 29. Diculescu I, Stoica M. Fluorescence histochemical investigation on the adrenergic innervation of the white adipose tissue in the rat. *J Neurovisc Relat* 1970;32(1):25-36.
 30. Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(8):1621-1630.
 31. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl* 2015;5(Suppl 1):S35-S39.
 32. Dubrovská G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(3):H1107-H1113.
 33. Abu Bakar H, Robert Dunn W, Daly C, Ralevic V. Sensory innervation of perivascular adipose tissue: a crucial role in artery vasodilatation and leptin release. *Cardiovasc Res* 2017;113(8):962-972.
 34. Dunn WR, Hardy TA, Brock JA. Electrophysiological effects of activating the peptidergic primary afferent innervation of rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2003;140(2):231-238.