

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Mgr. Šárka Vacková

**Úloha významných vazoaktivních systémů a jejich vzájemné interakce v regulaci
renálních funkcí a krevního tlaku – patofyziologické mechanismy rozvoje hypertenze,
orgánového poškození a orgánového selhání**

The role of important vasoactive systems and their interactions in the regulation of renal
function and blood pressure - pathophysiological mechanisms of hypertension development,
organ damage and organ failure

Disertační práce

Vedoucí práce: MVDr. Libor Kopkan, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně, bez použití umělé inteligence a řádně jsem citovala všechny použité zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Tato práce byla sepsána na základě publikací, které mají více autorů. Všechny operační techniky popisované v této práci jsem prováděla já, v případě velkých skupin zvířat s pomocí kolegů citovaných v publikaci. Histologické zpracování vzorků a vyhodnocení preparátů provedl MUDr. Petr Kujal, Ph.D. Biochemické analýzy jsem prováděla s pomocí Mgr. Zuzany Huskové, Ph.D. a Mgr. Soni Kikerlové. V druhé publikaci, která byla podkladem mé disertační práce, je zahrnuta také studie hodnotící srdeční funkce pomocí echokardiografie a tlakově-objemové analýzy. Tyto výsledky byly zpracovány prof. MUDr. Vojtěchem Melenovským, CSc. a prof. MUDr. Milošem Tábořským, CSc., FESC, MBA, proto nejsou zahrnuty v mé disertační práci, ale pouze v příloženém článku.

V Praze

.....
Šárka Vacková

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Liboru Kopkanovi, Ph.D. a konzultantce mé práce prof. MUDr. Věře Čertíkové Chábové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady během mého studia a při sepisování této práce.

Poděkování patří také všem kolegům z Laboratoře experimentální hypertenze a nefrologie a Laboratoře molekulární a experimentální kardiologie Centra experimentální medicíny v IKEM za pomoc a cenné rady během plánování a provádění vlastních experimentů a zejména pak vedoucímu prof. MUDr. Lud'ku Červenkoví, CSc. MBA za možnost podílet se na výzkumných projektech jeho oddělení a dokončit tuto práci.

Děkuji také své rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého mého studia.

Obsah

1	Abstrakt	6
2	Abstract	8
3	Seznam zkratek	10
4	Literární úvod	13
4.1	Regulace krevního tlaku	13
4.1.1	Role ledvin v regulaci krevního tlaku	14
4.1.2	Role vaskulatury v regulaci krevního tlaku	18
4.1.3	Role sympatického nervového systému v regulaci krevního tlaku	19
4.1.4	Role imunitního systému v regulaci krevního tlaku	19
4.1.5	Vybrané vazoaktivní systémy v regulaci kardiovaskulárních funkcí	20
4.1.6	Interakce vybraných vazoaktivních systémů v regulaci kardiovaskulárních funkcí	31
4.2	Patofyziologie kardiovaskulárních onemocnění	34
4.2.1	Hypertenze	34
4.2.2	Srdeční selhání	39
4.2.3	Léčba hypertenze a srdečního selhání	42
5	Cíle disertační práce	45
6	Experimentální část	46
6.1	Studie 1: Progrese hypertenze a CKD v závislosti na věku u FHH potkanů – úloha zvýšené aktivity RAAS a snížení dostupnosti protektivních vazoaktivních látek NO a EETs	46
6.1.1	Hlavní cíle Studie 1	46
6.1.2	Metody Studie 1	46
6.1.3	Výsledky Studie 1	50
6.1.4	Diskuze ke Studii 1	60

6.1.5	Závěr Studie 1	63
6.2	Studie 2: Farmakologická blokáda solubilní epoxid hydrolázy zmírňuje progresi CHF u modelu CKD.....	64
6.2.1	Hlavní cíle Studie 2	64
6.2.2	Metody Studie 2.....	64
6.2.3	Výsledky Studie 2.....	65
6.2.4	Diskuze ke Studii 2.....	78
6.2.5	Závěr Studie 2.....	81
6.3	Studie 3: Porušená renální vaskulární reaktivita na vazomotorické látky u modelu potkanů s Ang II-dependentní hypertenzí po rozvoji CHF	82
6.3.1	Hlavní cíle Studie 3	82
6.3.2	Metody Studie 3.....	82
6.3.3	Výsledky Studie 3.....	84
6.3.4	Diskuze ke Studii 3.....	91
6.3.5	Závěr Studie 3.....	95
7	Shrnutí	96
8	Podpora.....	97
9	Použitá literatura	97

1 Abstrakt

Hlavním cílem této práce bylo studium významných vazoaktivních systémů a jejich interakcí, jež se uplatňují v patofyziologii hypertenze a přidruženého orgánového poškození a to zejména systém oxidu dusnatého (NO), cytochromu P450 a renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS). Protože tyto systémy vykazují často protichůdné fyziologické účinky, jejich nerovnováha může vést k narušení řady orgánových funkcí a může hrát významnou roli v patogenezi kardiovaskulárních a renálních poruch.

V této práci jsem se zabývala změnami v renální vaskulární reaktivitě souvisejícími s rozvojem renálního a srdečního poškození na experimentálním modelu chronického onemocnění ledvin (CKD) a chronického srdečního selhání (CHF) indukovaného vytvořením aorto-kavální fistule (ACF) u potkanů se spontánní nebo indukovanou hypertenzí a přidruženého renálního poškození. Dále jsem u modelu CKD kombinovaného s CHF studovala vliv protektivních epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) na rozvoj renálního a srdečního poškození za využití inhibitoru solubilní epoxid hydrolázy (sEH). A v poslední části této práce jsem se u modelu CKD a CHF zaměřila na změny v citlivosti na vybrané vazoaktivní látky.

Tato práce prokázala, že hypertenzní Fawn-Hooded potkani (FHH), kteří slouží jako model geneticky podmíněné hypertenze asociované s rozvojem CKD, mají zvýšenou vaskulární reaktivitu na angiotenzin II (Ang II). Naopak hladiny protektivních EETs a NO v ledvině u FHH potkanů s věkem klesají, což pravděpodobně souvisí s rozvojem endoteliální dysfunkce a CKD u tohoto modelu. Blokáda RAAS vedla ke snížení krevního tlaku a hladin Ang II a zvýšení protektivního Ang 1-7 v ledvině a oddálila rozvoj renálního poškození. Vytvoření ACF u FHH potkanů vedlo k rozvoji srdečního selhání doprovázeného výraznou aktivací RAAS a ještě většímu snížení renálních EETs a výrazně akcelerovalo rozvoj CKD. Léčba inhibitorem sEH normalizovala dostupnost renálních EETs, zmírnila rozvoj renálního poškození a srdeční hypertrofie a zlepšila dlouhodobé přežívání zvířat. Indukce CHF vytvořením ACF vedlo k aktivaci RAAS i u normotenzních potkanů kmene HanSD i TGR potkanů, kteří slouží jako model Ang II dependentní formy hypertenze, u kterých byl nárůst aktivity RAAS ještě výraznější. Indukce ACF vedla také k ovlivnění renální vaskulární reaktivity. ACF TGR potkani vykazovali zvýšenou citlivost na Ang II a naopak sníženou citlivost na NA a vazodilatační působení EETs, což by mohlo být důvodem renální dysfunkce u tohoto modelu.

Studie přinesly nové poznatky zaměřené na mezisystémové funkční interakce důležitých vazoaktivních systémů, které se uplatňují v regulaci renálních a kardiovaskulárních funkcí a tedy i krevního tlaku. Zvýšená aktivita vazokonstrikční osy RAAS a naopak snížená aktivita vazodilatační osy RAAS, systémů NO a cytochromu P450 (tvorba EETs) spolu se změnami ve vaskulární reaktivitě se mohou významně podílet na patofyziologii hypertenze a přidruženého orgánového poškození. Tyto výsledky mohou být v budoucnu využity i v klinické medicíně. Nové farmakologické přístupy, které by měnily poměry těchto vazoaktivních systémů a zlepšily vaskulární citlivost a s ní i orgánové funkce, by tak mohly výrazně přispět k léčbě CKD a CHF.

Klíčová slova

Krevní tlak, hypertenze, srdce, ledviny, chronické onemocnění ledvin (CKD), chronické srdeční selhání (CHF), vazoaktivní systémy, renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS), angiotenzin II (Ang II), oxid dusnatý (NO), epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs), cytochrom P450, solubilní epoxid hydroláza (sEH), aorto-kavální fistule (ACF), Fawn-Hooded potkani, Ren-2 transgenní potkani (TGR)

2 Abstract

The main objective of this study was focused on study of significant vasoactive systems and their interaction involved in the pathophysiology of hypertension and associated organ damage, especially nitric oxide (NO) system, cytochrom P450 system, and the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Since these systems often exhibit opposing physiological effects, their imbalance may lead to disruption of various organ functions and may play a critical role in the pathogenesis of cardiovascular and renal disorders

In this study, I investigated changes in renal vascular reactivity associated with the development of renal and cardiovascular damage in an experimental model of chronic kidney disease (CKD) and chronic heart failure (CHF) induced by the creation of an aorto-caval fistula (ACF) in rats with spontaneous or induced hypertension and associated renal damage. Using a rat model of CKD associated with CHF, I also studied the impact of protective epoxyeicosatrienoic acids (EETs) on the development of renal and cardiovascular damage, using soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitors in laboratory rat models of CKD and CHF. In the final part of the study, I focused on changes in sensitivity to selected vasoactive substances in the CKD and CHF models.

This work demonstrated that hypertensive Fawn-Hooded rats (FHH), which serve as a model of genetically determined hypertension associated with the development of CKD, exhibit increased vascular reactivity to angiotensin II (Ang II). Conversely, renal levels of protective EETs and nitric oxide (NO) in FHH rats decrease with age, which could be associated with the development of endothelial dysfunction and CKD in this model. RAAS blockade led to a reduction in blood pressure, a decrease in Ang II levels, an increase in protective Ang 1-7 in the kidney, and delayed the development of renal damage. The creation of an ACF in FHH rats resulted in the development of heart failure, accompanied by significant activation of RAAS and an even greater reduction in renal EETs, which significantly accelerated the development of CKD. Treatment with an sEH inhibitor normalized the availability of renal EETs, reduced the development of renal damage and cardiac hypertrophy and improved the long-term survival of the animals. The induction of CHF by creating an ACF led to the activation of RAAS, even in normotensive HanSD rats. TGR rats, which serve as a model of Ang II-dependent hypertension, exhibited an even more pronounced increase in RAAS activity after ACF creation. The induction of ACF also affected renal vascular reactivity. ACF TGR rats showed increased sensitivity to Ang II and decreased sensitivity to norepinephrine (NE), as well as

decreased sensitivity to the vasodilatory effects of EETs, which could be a contributing factor to renal dysfunction in this model.

These studies provided new insights into the functional interactions of important vasoactive systems relevant in the regulation of renal and cardiovascular functions, and thus blood pressure. Increased activity of the vasoconstrictive RAAS axis and decreased activity of the vasodilatory RAAS axis, NO and cytochrome P450 systems (EETs formation), together with changes in vascular reactivity, can significantly contribute to the pathophysiology of hypertension and associated organ damage. These findings may be applied in clinical medicine. New pharmacological approaches that could alter the balance of these vasoactive systems and improve vascular sensitivity—and thus organ function—could significantly contribute to the treatment of CKD and CHF.

Keywords

Blood pressure, hypertensio, heart, kidney, chronic kidney disease, chronic heart failure, vasoactive systems, renin-angiotensin system (RAAS), Angiotensin II, nitric oxide (NO), epinephrine, norepinephrine, acetylcholine, bradykinin, epoxyeicosatrien acids (EETs), soluble epoxide hydrolase (sEH), aorto-caval fistula (ACF), Fawn-Hooded rats, Ren-2 transgenic rats (TGR)

3 Seznam zkratek

A	Adrenalin
AA	kyselina arachidonová (arachidonic acid)
ACE, ACE2	Angiotenzin-konvertující enzym (Angiotensin converting enzyme)
ACEi	inhibitor ACE
ACF	aorto-kavální fistule
Add3	γ -adducin
ADH	antidiuretický hormon (vazopresin)
ADMA	asymetrický dimethyl arginin
AGT	Angiotenzinogen
ACh	Acetylcholin
Ang I, II, (1-7), ...	Angiotenzin I, II, (1-7),...
ANP	Antriální natriuretický peptid
APA	Aminopeptidáza A
ARB	blokátor AT ₁ R
ARNI	inhibitor neprylizinu
AT ₁ R, AT ₂ R, ...	Ang II receptor typu 1, 2, ...
ATP	Adenozintrifosfát
B1R, B2R	bradykininový receptor B1, B2
BK	Bradykinin
BKK	blokátor kalciových kanálů
Ca ²⁺	vápenaté kationty
c-AUCB	cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido) cyclohexyloxy]-benzoová kyselina (= inhibitor sEH)
cGMP	cyklický guanosin-monofosfát
CHF	chronické srdeční selhání (chronic heart failure)
CKD	chronické onemocnění ledvin (Chronic kidney disease)
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
DHETEs	dihydroxyeikosatrienové kyseliny
EDHF	endoteliální hyperpolarizační faktor (endothelium-derived hyperpolarising factor)
EDRF	endoteliální relaxační faktor
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ENaC	epiteliální sodíkový kanál
ESC	Evropská kardiologická společnost
ESH	Evropská hypertenzní společnost
ET-1	Endotelin-1
ET _A , ET _B	endotelinový receptor typu A, B
FHH	hypertenzní Fawn-Hooded potkani (Fawn-Hooded Hypertensive)
FHL	normotenzní Fawn-Hooded potkani (Fawn-Hooded Low pressure)
GFR	glomerulární filtrace (glomerular filtration rate)
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny (G-protein-coupled receptor)
GSI	glomerulosklerotický index
HanSD	Hannover Sprague-Dawley potkani
HETE	hydroxyeikosatetraenová kyselina
HFmrEF	srdeční selhání s mírně sníženou ejekční frakcí (HF with mildly reduced ejection fraction)
HFpEF	srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí (heart failure with preserved ejection fraction)
HFrEF	srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí (heart failure with reduced ejection fraction)
CHF	chronické srdeční selhání (chronic heart failure)
IL-1	Interleukin-1
ISCH	ischemická choroba srdeční
JGA	juxtaglomerulární aparát
KKS	kallikrein-kininový systém
LV	levá komora srdeční (left ventriculus)
MasR	Mas receptor
MK	Metabolická klec
MR	mineralokortikoidní receptor
MrgD	receptor příbuzný Mas receptoru typu D (Mas-related GPCR D)
NA	Noradrenalin
NaCl	Chlorid sodný
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEP	Neprylisin
NHE2	Na ⁺ /H ⁺ výměník
NKCC2	Na ⁺ K ⁺ Cl ⁻ kotransporter

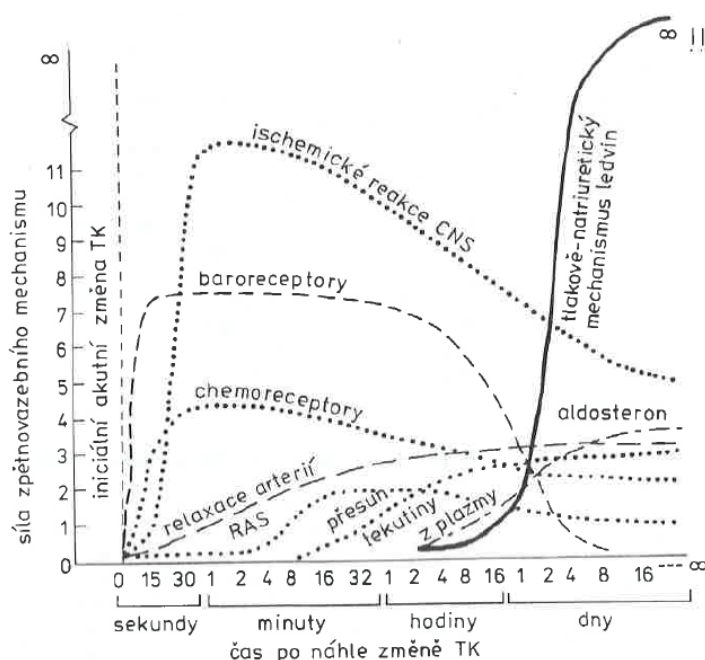
NO	Oxid dusnatý
NO ₂ ⁻	Dusitany (nitrity)
NO ₃ ⁻	Dusičnany (nitráty)
NOS	NO syntáza (endoteliální, inducibilní, neuronální)
(eNOS, iNOS, nNOS)	
Nox2	NADPH oxidáza 2
O ₂ ⁻	Superoxid
OECT	objem extracelulární tekutiny
P _{GC}	glomerulární kapilární tlak
PGs	Prostaglandiny
PRA	plazmatická aktivita reninu (Plasma renin activity)
RAAS	Renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RBF	průtok krve ledvinou (Renal blood flow)
Rf-1 – Rf-5	Oblast chromozomu zodpovědná za renální selhání (renal failure gene)
RIA	radioimunologická metoda (radioimmunoassay)
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RPP	renální perfuzní tlak (renal perfusion pressure)
RVR	renální vaskulární rezistence
SBP	systolický tlak krve (systolic blood pressure)
sEH	solubilní epoxid hydroláza
SEM	střední chyba průměru (standard error of mean)
sGC	solubilní guanylát cykláza
SGLT2	sodíko-glukózový kotransporter 2
Sham	zdánlivá operace u experimentálního modelu
SHR	Spontánně hypertenzní potkani
SNS	sympatický nervový systém
sPRR	solubilní (pro)reninový receptor
TAC	transverzální konstrikce aorty (transversal aortic constriction)
TGR	transgenní kmen potkanů s vloženým myším reninovým genem - TGR(mRen2) ²⁷
TII	tubulointersticiální index
TK	tlak krve
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α)
β -AR	β -adrenergní receptor

4 Literární úvod

4.1 Regulace krevního tlaku

Hodnota krevního tlaku (TK) se významně podílí na udržování homeostázy, a proto je regulována celou řadou mechanismů, které zajišťují její optimální výši. TK v arteriálním cévním řečišti je určen srdečním výdejem a periferní cévní rezistencí a jeho regulaci můžeme podle rychlosti účinku rozdělit na:

- 1) krátkodobá (vteřiny až minuty) je zajištěna baroreceptory, chemoreceptory a ischemickou reakcí centrálního nervového systému (CNS);
- 2) střednědobá (minuty až hodiny) je zprostředkována přesunem tekutiny mezi cévami a intersticiem a vazokonstrikčními či vazodilatačními systémy, např.: renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS), kalikrein-kininový systém (KKS), endotelinový systém nebo systém oxidu dusnatého (NO);
- 3) dlouhodobá (hodiny až dny) probíhá v ledvinách na úrovni regulace objemu extracelulární tekutiny (OECT) udržováním vyrovnané bilance iontů a tekutin. Tím se odlišuje od krátkodobých a střednědobých mechanismů, které ovlivňují pouze kapacitu krevního řečiště (Guyton and Coleman 1967).



Obr.1. Znázornění aktivace různých systémů podílejících se na regulaci TK. (převzato z Červenka et al. 2000)

Regulace TK je velmi komplexní fyziologický proces a nové výzkumy ukazují, že kromě výše zmíněných mechanismů, které jsou studovány již řadu desetiletí, ovlivňuje výši TK také řada dalších faktorů. Patří mezi ně např. geneticky podmíněné poruchy, oxidační stres, zánětlivé reakce, vliv prostředí, hluku nebo stav střevního mikrobiomu (Harrison et al. 2021; Yang et al. 2023; Mancia et al. 2023).

4.1.1 Role ledvin v regulaci krevního tlaku

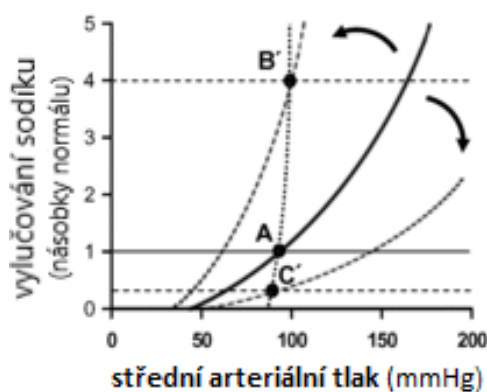
Ledviny mají několik významných mechanismů, jimiž se uplatňují v regulaci TK. Jsou schopné vyvažovat tlakovou diurézu a natriurézu (tlakově-natriuretický mechanismus ledvin), produkují renin, který je hlavním rychlost limitujícím prvkem RAAS a jsou schopné také lokální aktivace intrarenálního RAAS vedoucí k retenci sodíku a nárůstu TK. Další důležitou funkcí ledvin je schopnost modulovat tonus sympatického nervového systému (SNS) prostřednictvím aferentních nervů (tzv. reno-cerebrální sympatický reflex) a hrají roli také v aktivaci imunitního systému (Urushihara and Kagami 2017; Harrison et al. 2021).

Zásadní vliv ledvin na regulaci TK byl prokázán i mnohými transplantačními studiemi. Po transplantaci ledviny od normotenzního dárce došlo u hypertenzního příjemce k normalizaci TK (Dahl and Heine 1975; Kawabe et al. 1978; Curtis et al. 1983; Heller et al. 1993). A naopak pokud byla normotenzním jedincům transplantována ledvina z hypertenzního zvířete, došlo v mnohých případech k rozvoji hypertenze u dříve zdravých zvířat (Dahl and Heine 1975).

4.1.1.1 Tlakově-natriuretický mechanismus ledvin

Nejvýznamnější mechanismus, kterým ledviny ovlivňují výši TK je bezpochyby tlaková natriuréza. První, kdo prokázal jednoznačný vztah mezi funkcí ledvin, OEKT a výši TK byli Langstan a jeho spolupracovníci (Langstan et al. 1963). Tuto „natriuretickou“ teorii následně rozvíjel a přesně popsal Guyton a Coleman (1967) a vytvořili renální funkční křivku popisující přímý vztah mezi výši TK a množstvím vyloučené vody ledvinami. S narůstajícím systémovým TK dochází také ke zvýšení renálního perfuzního tlaku (renal perfusion pressure, RPP) a zvýšení vylučování sodíku a vody (tlaková natriuréza), což vede k poklesu objemu OEKT a snížení TK (Guyton et al. 1972; Guyton 1987). Za normálních okolností ledviny regulují sklon natriuretické křivky tak, aby hodnota TK zůstala stabilní i při různých příjmech sodíku. Pokud

se sklon křivky z nějakého důvodu nepřizpůsobí, může dojít k nárůstu nebo naopak poklesu TK. Existuje celá řada humorálních, neurálních a parakrinních modulátorů tlakově-natriuretického mechanismu, které posouvají natriuretickou křivku doprava a vedou k vzestupu TK (např. RAAS, SNS nebo samotný pokles OECT.) Naopak posun křivky doleva je způsoben nárůstem OECT nebo farmakologickou inhibicí RAAS. Obecně lze vylučování sodíku ovlivnit buď změnou glomerulární filtrace (glomerular filtration rate, GFR) nebo tubulární reabsorpce.



Obr.2: Vztah mezi arteriální tlakem a vylučováním sodíku.

Za normálních podmínek dochází při nárůstu TK k vyššímu vylučování sodíku a vody, dokud se TK nevrátí do ekvilibračního bodu (A). Při zvýšeném příjmu soli dojde u zdravého organismu k napřímení křivky, aby hodnota TK zůstala zachována (B), naopak při nízkém příjmu soli je křivka posunuta doprava (C).

(Upraveno podle: Guyton 1987)

Nicméně novější studie ukazují, že nakládání organismu se sodíkem je ještě více komplexnější, než klasický Guytonův model. Titze a jeho kolegové (Machnik et al. 2009) navrhli teorii, že při zvýšeném příjmu soli se může v podkožním intersticiu vytvářet „rezervoár“ sodíku v lymfatických cévách a pufrovat tak negativní působení akumulace sodíku a nárůst OECT a TK. Tato teorie je podpořena řadou dalších studií, které prokázaly, že blokáda dráhy vaskulárního růstového faktoru C (VEGF-C), který stimuluje hyperplazii lymfatických cév, vede k rozvoji sůl-senzitivní hypertenze (Machnik et al. 2010; Wiig et al. 2013; Selvarajah et al. 2017; Chachaj et al. 2023).

4.1.1.2 Autoregulace v ledvinách

Dalším významným mechanismem je autoregulační schopnost ledvin, která udržuje relativně stálou GFR nezávisle na změnách v systémovém TK a umožňuje tak přesnou regulaci vylučování vody a solí ledvinami. Intrarenální regulační mechanismy jsou schopny udržet průtok krve ledvinou (renal blood flow, RBF) a tedy i GFR nezávislé na renálním perfuzním tlaku v rozmezí 80 – 180 mmHg MAP. GFR je závislá na výši RBF a hnací silou GFR je hydrostatický tlak v glomerulu, který je ovlivňován systémovým TK a vaskulárním tonem

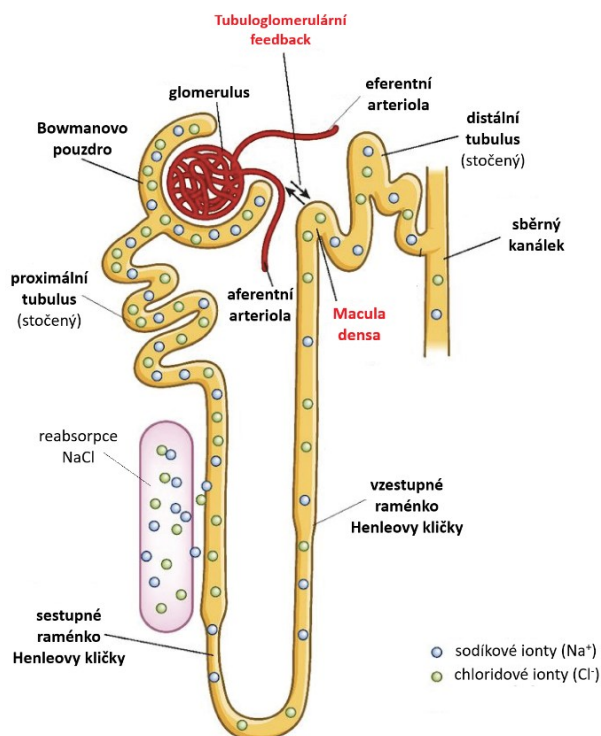
glomerulárních arteriol (aferentní a eferentní). Dominantní je role aferentní arterioly, kde působí tři hlavní regulační mechanismy - myogenní reaktivita, tubuloglomerulární zpětná vazba (tubuloglomerular feedback, TGF) a zpětná vazba mezi spojovacím kanálkem a aferentní arterioulou (Romero and Carretero 2019).

Myogenní reaktivita

Tlakem indukovaná myogenní konstrikce aferentních arteriol (tzv. Baylissův efekt) chrání ledvinu před náhlým zvýšením TK. Je založená na mechanické aktivaci neselektivních kationtových kanálů v plazmatické membráně buněk hladkých svalů cévní stěny (vascular smooth muscle cell, VSMC), které je způsobeno roztažením cév v důsledku zvýšeného TK (Davis and Hill 1999). Mechanismus kontrakce je pravděpodobně zprostředkován vápníkem aktivovanými chloridovými kanály (Cl_{Ca} kanály) a brání výraznému zvýšení RBF a GFR (Yip et al. 2018).

Tubuloglomerulární zpětná vazba

TGF je zpětnovazebný systém, který reguluje rezistenci aferentní arterioly v závislosti na množství iontů Na^+ v macula densa, kde dochází ke kontaktu aferentní arterioly a distálního tubulu. Zvýšený systémový TK vede ke zvýšení glomerulárního tlaku, tím dojde ke zvýšení GFR a množství Na^+ v oblasti macula densa. Množství Na^+ je detekováno $Na^+K^+Cl^-$ kotransporterem (NKCC2) a v menší míře Na^+/H^+ výměníkem (NHE2). Vstup Na^+ do buněk vede k uvolnění ATP a z něj vznikající adenosin přes A1 receptor kontrahuje aferentní arteriolu a přes A2 receptor pravděpodobně dilatuje eferentní arteriolu. Tím dojde k poklesu glomerulárního tlaku a návratu GFR k původní hodnotě (Hansen et al. 2003; Lai et al. 2006; Al-Mashhadi et al. 2009, Romero and Carretero 2019). Citlivost TGF zvyšují různé modulátory jako např. angiotenzin II (Ang II), hydroxyeikosatetraenová kyselina (HETE), adenosintrifosfát (ATP) nebo snížení OECT. Naopak citlivost TGF snižuje oxid dusnatý (NO), superoxid (O_2^-) nebo pokles OECT (Dobrowolski et al. 2007; Persson et al. 2013; Romero and Carretero 2019).



Obr.3: Schéma nefronu s vyznačením TGF

Zvýšení TK vede ke zvýšení GFR a zvýšení koncentrace iontů Na⁺ a Cl⁻ v distálním tubulu. V místě, kde se dotýká aferentní arteriola a distální tubulus (macula densa) dojde k uvolnění vazokonstrikčních látek a konstriktci aferentní arterioly a tím dojde k poklesu glomerulárního tlaku a normalizaci GRF. TGF – tubuloglomerulární zpětná vazba, GFR – glomerulární filtrace. (Upraveno podle: Alicic et al. 2017)

Zpětná vazba mezi spojovacím kanálkem a glomerulem

Romero a jeho spolupracovníci popsali v místě spojovacího kanálku druhou oblast, kde dochází ke komunikaci aferentní arterioly s glomerulem a navrhli druhý zpětnovazebný mechanismus. Zde dochází k opačné situaci než u TGF. Zvýšené množství NaCl vede k aktivaci epiteliálního Na⁺ kanálu (ENaC), vazodilataci aferentní arterioly a tím dochází ke zvýšení GFR (Wang et al. 2017; Romero and Carretero 2019). Mechanismus, kterým ENaC vazodilataci zprostředkovávají, zatím není objasněn, nicméně možným mediátorem by mohly být prostaglandiny a epoxyeikosatrienové kyseliny (EET) (Ren et al. 2009).

4.1.1.3 Intrarenální RAAS

RAAS je intenzivně studován již od objevu reninu Tigerstedtem a Bergmanem v roce 1898 a od té doby byla zdokumentována řada mechanismů, kterými se podílí na patofyziologii hypertenze a renálního poškození. RAAS bude podrobněji popsán v kapitole 3.1.3.1. V této kapitole bych se chtěla zmínit pouze o roli intrarenálního RAAS, jako jednom z mechanismů, jehož prostřednictvím se ledviny také podílí na regulaci TK. Skupina prof. Navara navrhla teorii o lokální a nezávislé aktivaci RAAS v ledvinách, která by mohla v přispět k narušení

vyučování sodíku a tím k rozvoji hypertenze a renálního poškození (Navar et al. 2011; Urushihara and Kagami 2017). U řady hypertenzních modelů byly totiž hladiny RAAS komponent (angiotenzinogen (AGT), Ang I a Ang II) v proximálním tubulu výrazně vyšší, než by odpovídalo jejich koncentracím v plazmě. Kobori a jeho spolupracovníci ukázali, že zvýšené intrarenální hladiny AGT korelují s výší TK a zároveň korelují s hladinami AGT v moči, které by tak mohly být dobrým ukazatelem stavu intrarenálního RAAS (Kobori et al. 2010). Významnou roli v aktivaci intrarenálního RAAS a zvýšení reabsorpce Na^+ sehrává proreninový receptor (PRR). Zvýšení intrarenální koncentrace Ang II vede k poklesu aktivity reninu v plazmě, ale v distální nefronu se jeho aktivita zvyšuje, stejně jako exprese PRR (Yang et al. 2025).

4.1.1.4 Reno-cerebrální sympatický reflex

Většina renálních nervů jsou nervy eferentní, které přenáší signály ze sympatického nervového systému do ledviny (DiBona 2000). Menší část renálních nervů je aferentních. Tyto senzorické nervy slouží k přenosu signálů z ledviny do mozkového kmene a mohou regulovat tonus sympatiku a jeho prostřednictvím výši systémového TK. To potvrzují např. studie využívající metodu selektivní aferentní renální denervace (Campese and Kogosov 1995; Wu et al. 2022) nebo studie, které ukázaly, že zvýšená aferentní renální signalizace u zvířat s poškozením ledvin se významně podílela na rozvoji hypertenze a CKD (Ye et al. 2002; Cao et al. 2015).

4.1.2 Role vaskulatury v regulaci krevního tlaku

Výše arteriálního tlaku je funkcí srdečního výdeje a periferní cévní rezistence. U jedinců s normální srdeční funkcí tedy výši TK významně ovlivňuje také funkce vaskulatury. Narušením kontraktility systémových cév a jejich remodelací (strukturální změny, změny elasticity, tvaru a průměru či jejich složení na molekulární úrovni) dochází ke zvýšení vaskulárního tonu a periferní cévní rezistence, která se významnou měrou podílí na rozvoji hypertenze (Touyz et al. 2018; Totoň-Žuranska et al. 2024). Cévy hypertenzních zvířat často vykazují zvýšenou reaktivitu na vazokonstrikční látky a naopak sníženou vazodilatační funkci a sníženou endoteliální produkci NO a prostaglandinů (Doleželová et al. 2016; Kumar et al.

2020; Harrison et al. 2021). Narušení kontraktility VSMC může zvýšit TK buď přímo - zvýšením vaskulární rezistence, nebo nepřímo - zvýšením RPP, což vede k narušení vylučování sodíku a nárůstu TK (Crowley et al. 2005; Mendelsohn 2005; Touyz et al. 2018). Kontrakce VSMC je řízena intracelulární koncentrací Ca^{2+} iontů, která může být zvýšena v odpověď na mechanický stimul nebo může být řízena vazokonstrikčními působky jako je Ang II, aldosteron, katecholaminy (noradrenalin - NA, adrenalin - A), Endotelin-1 (ET-1), HETE nebo volnými kyslíkovými radikály (reactive oxygen species, ROS). Naopak vazodilatace zejména menších arterií a arteriol je zprostředkována endothelium-dependentní hyperpolarizací, vazodilatačními prostaglandiny a EETs. Větší cévy využívají především vazodilatační působení NO (Matsuda et al. 1997; Gouloupoulou and Webb 2014; Touyz et al. 2018).

4.1.3 Role sympatického nervového systému v regulaci krevního tlaku

SNS hraje významnou roli v dlouhodobé regulaci TK. Aktivace eferentních renálních nervů, které přenáší informace z mozku do ledviny, zvyšuje tubulární resorpci sodíku, uvolňování reninu a renální vazokonstrikci. Zvýšená aktivita sympatiku je spojena také s hypertrofií buněk hladkých svalů a remodelací stěny cév, vede k endoteliální dysfunkci a je spojena s řadou kardiovaskulárních onemocnění zejména s vysokým TK a CKD (Kaur et al. 2017; Singh et al. 2021; Evans et al. 2024). Tato zjištění vedla k zavedení renální denervace jako možné varianty léčby pro pacienty s rezistentní hypertenzí (Weber et al. 2019). Ale ukazuje se, že renální denervace má významný potenciál i pro léčbu CKD nebo chronického srdečního selhání (chronic heart failure, CHF) (Hering et al. 2017; Honetschlagerová et al. 2021b; Miklovič et al. 2024; Honetschlagerová et al. 2024; Shinohara 2024).

4.1.4 Role imunitního systému v regulaci krevního tlaku

Hypertenze je doprovázena systémovou zánětlivou reakcí, která přispívá k patofyziologii hypertenze a orgánového poškození. Ale bylo zjištěno, že vrozená a adaptivní imunita může také přispívat k jejímu rozvoji. Roli adaptivní imunity, respektive T a B lymfocytů v rozvoji hypertenze potvrdila například práce Guzik et al. (2007) nebo Elks et al. (2009) a dosavadní znalosti byly shrnuty např. v publikacích Xiao and Harrison (2020) a Zhang et al. (2023).

Akumulace zánětlivých buněk v intersticiu krevních cév a ledvin je doprovázena uvolňováním zánětlivých mediátorů a cytokinů (TNF- α , IL1, IL6, IL-17A,...), podporuje vaskulární fibrózu, snižuje elasticitu cév a v ledvinách ovlivňuje reabsorpci sodíku (Norlander et al. 2016; Xiao and Harrison 2020; Harrison et al. 2021). Cytokiny též stimulují ROS, které inhibují endoteliální syntázu oxidu dusnatého (nitric oxide synthase, NOS) a snižují tak schopnost dilatace krevních cév. (Crowley and Coffman 2014; Zhang et al. 2023). TNF- α a infiltrace makrofágů je spojena také se vznikem aterosklerotických plátů, které způsobují zúžení průsvitu cév a tím rovněž přispívají k rozvoji hypertenze (Renna et al. 2013).

4.1.5 Vybrané vazoaktivní systémy v regulaci kardiovaskulárních funkcí

4.1.5.1 Renin-angiotenzin-aldosteronový systém

RAAS hraje důležitou roli v udržování homeostázy - je aktivován při poklesu TK, sníženém příjmu vody a solí a s tím souvisejícím poklesem OECT nebo při krvácení. Hyperaktivita RAAS se významně podílí na progresi renálních a kardiovaskulárních onemocnění a pravděpodobně hraje hlavní roli v rozvoji esenciální hypertenze.

V posledních letech se zaměřuje pozornost také na roli RAAS v rozvoji neuroimunologických onemocnění jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova. Nedávné studie ukazují, že řada psychiatrických onemocnění je spojena se zvýšenou aktivitou reninu či aldosteronu a že inhibitory RAAS tlumí projevy těchto onemocnění (Wright et al. 2013; Mohite et al. 2020; Yang et al. 2021).

Hlavní komponenty RAAS

RAAS má dvě vzájemně se regulující osy. Klasická osa **ACE/Ang II/AT₁R** (Angiotenzin-konvertující enzym 1/ Ang II / AngII receptor 1) má vazokonstrikční, hypertenzní, proliferativní a fibrotické účinky. Její hyperaktivita je spojena s hypertenzí, srdeční hypertrofií, srdečním selháním, infarktem myokardu nebo selháním ledvin (Carey RM, Siragy HM 2003). Druhá je osa **ACE2/Ang(1-7)/MasR** (Mas receptor), která představuje vnitřní protektivní mechanismus vyvážející působení osy ACE1/AngII/AT₁ (Ferreira et al. 2010).

Renin je jedním z klíčových enzymů RAAS kaskády. Je syntetizován v juxtaglomerulárních buňkách ledvin a po stimulaci je uvolňován do cirkulace, kde štěpí AGT na Ang I. Většina AGT je syntetizována v játrech a uvolňována do cirkulace, kde je jeho koncentrace 1000x větší, než koncentrace Ang I a Ang II. Množství Ang I, respektive Ang II, je tedy limitováno plazmatickou aktivitou reninu a rychlostí jeho uvolňování. Sekrece reninu je stimulována: 1) renálními baroreceptory při poklesu RPP (hypotenze, dehydratace), 2) z macula densa při poklesu koncentrace NaCl (nedostatek sodíku) a 3) β_2 adrenergními receptory juxtaglomerulárních buněk - stimulace sympatikem při hypoxii nebo silném krvácení- (Sequeira López et al. 2004; Ariel Gomez and Sequeira-Lopez 2018; Watanabe et al. 2021). Do popředí zájmu se dostává také PRR, na který se může vázat jak pro-renin, tak renin. Jeho intrarenální účinky jsem zmiňovala již v kapitole 4.1.1.2, ovšem solubilní PRR se nachází i v dalších tkáních a jeho zvýšené hladiny jsou spojované s rozvojem hypertenze, renálního poškození i srdečním selháním (Yang 2023).

RAAS kaskáda zahrnuje množství peptidů s různou účinností, které jsou všechny štěpeny z jednoho prekursoru - AGT. **Ang I** je biologicky málo účinný dekapeptid, který slouží zejména jako substrát pro další enzymy RAAS kaskády. Jedním z nich je **ACE**, který degraduje bradykinin (BK), ale zejména je důležitou komponentou RAAS, která štěpí Ang I na oktapeptid Ang II (Coates, 2003). ACE je vázaný na plazmatickou membránu endotelových buněk většiny tkání a díky tomu může být Ang II tvořen lokálně přímo ve tkáni (Jaspard and Wei 1993; Khurana and Goswami 2022).

Nejúčinnější složkou RAAS je **Ang II**, který je v cirkulaci během několika vteřin degradován peptidázami. Ang II působí přes několik typů angiotenzinových receptorů (AT_1R , AT_2R , AT_4R). Dva hlavní typy receptorů AT_1 a AT_2 jsou transmembránové receptory spřažené s G-proteiny (G-protein coupled receptor, GPCR) (Triebel and Castrop 2024). **AT_1R** zprostředkovávají hlavní fyziologické účinky Ang II. AT_1R se nachází v celé řadě tkání. V srdci zprostředkovávají pozitivní inotropní a chronotropní účinky Ang II na kardiomyocyty (Mehta and Griendling 2007), v mozku uvolňování antidiuretického hormonu (ADH, vazopresin), aktivaci sympatiku, pocit žízně nebo zvýšenou chuť na sůl a v nadledvinách zprostředkovávají uvolňování aldosteronu. Ve VSMC podporují vazokonstrikci, v játrech ovlivňují metabolismus glykogenu (Thomas and Mendelsohn 2003). Signální dráhy AT_1R ovlivňují i další kaskády, jako je dráha epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor, EGF), čímž Ang II ovlivňuje také metabolismus, růst a remodelaci tkáně a podílí se tak např. na rozvoji srdeční hypertrofie (Kagiyama et al. 2002). V ledvinách jsou AT_1R lokalizovány ve VSMC (včetně

aferentní a eferentní arterioly), v proximálním i distálním tubulu, kortikálních i medulárních sběrných kanálcích, mesangiálních buňkách glomerulu a podocytech a zprostředkovávají snížení GFR a reabsorpci sodíku. (Harrison-Bernard et al. 1997; Triebel and Castrop 2024).

Role **AT₂R** není tak jednoznačná, ale za fyziologických podmínek většinou zprostředkovávají opačný účinek než **AT₁R** signalizační dráha. Způsobují vazodilataci přes uvolňování BK a NO, snižují oxidační stres, mají protizánětlivé účinky a inhibují syntézu reninu. V ledvinách snižují natriurézu a zvyšují RBF. V srdci aktivace **AT₂R** redukuje zánět, fibrózu a velikost infarktu (Siragy et al. 2005; Matavelli and Siragy 2015; Muscha Steckelings et al. 2022). **AT₂** receptory jsou hojně exprimovány během vývoje plodu, v dospělosti se pak nachází zejména v ledvinách, srdci, kůře nadledvin, reprodukčních tkáních a cévách (DINH et al. 2001).

Aldosteron je mineralokortikoidní hormon produkovaný v kůře nadledvin. Jeho uvolňování je řízeno Ang II a zvýšenou hladinou draslíku. Jeho hlavní účinek je na úrovni regulace genové exprese, kterou zprostředkovávají mineralokortikoidní receptory (MR). Zvyšuje sekreci K^+ a reabsorpci Na^+ ve sběrném kanálku ledvin i epiteliálních buňkách střeva zabudováním nových ENaC kanálů (Harrison et al. 2021). MR také stimuluje produkci ROS a snižují aktivitu NOS a účastní se i procesů vedoucích k fibróze ledvin, srdce i cév (Jia et al. 2016; Triebel and Castrop 2024). Aldosteron má i přímý vazokonstrikční efekt - zvyšuje renální vaskulární rezistenci (RVR) a glomerulární kapilární tlak (P_{GC}) (Arima et al. 2003; Triebel and Castrop 2024).

Hlavním enzymem vazodilatační dráhy RAAS je **ACE2**, který štěpí Ang I na Ang (1-9), ale zejména Ang II na Ang 1-7, protože k Ang II má až 400x vyšší afinitu. Tím snižuje dostupnost Ang II a naopak zvyšuje tvorbu protektivního Ang 1-7. ACE2 má tak důležitou roli v udržování rovnováhy mezi osami ACE2/Ang 1-7/MasR a ACE/AngII/AT₁R. Nerovnováha mezi těmito osami vede k různým patologiím v kardiovaskulárním, renální, plicním i centrálním nervovém systému. (Ferreira et al. 2010; Khurana and Goswami 2022). ACE2 se v současnosti dostal do popředí zájmu v souvislosti s onemocněním COVID-19. Koronavirus SARS-CoV-2 totiž využívá ACE2 jako receptor pro vstup do buňky (Zhou et al. 2020), ale následně snižuje jeho expresi a nerovnováha v poměru mezi ACE a ACE2 vede ke zvýšení koncentrace Ang II a to je pravděpodobně také důvod častých akutních poškození plic, které bývají vstupní branou infekce koronaviru.

Angiotenzin 1-7 vzniká jak působením ACE2, tak může vznikat i dalšími drahami buď přímo z Ang II působením enzymu neprilysinu (NEP) nebo dalšími oligopeptidázami (Ferrario

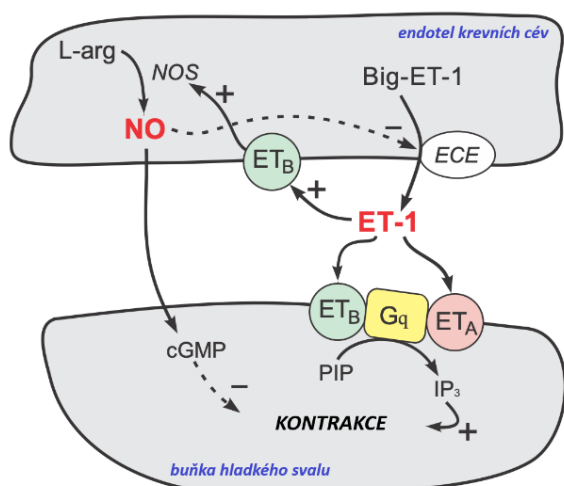
et al. 1997; Iwai and Horiuchi 2009; Kaltenecker et al. 2020). Jeho působení je zprostředkováno zejména aktivací MasR a s menší afinitou i AT₂R. Ang 1-7 má opačné účinky než Ang II (Santos et al. 2003; Bader et al. 2024; Červenka et al. 2024). Působí vazodilatačně na cévní endotel - aktivací bradykininového receptoru B2 dojde k uvolnění NO a prostaglandinů a tím se podílí také na snížení TK (Brosnihan et al. 1996; Almeida et al. 2000). Ang 1-7 také ovlivňuje renální funkce - blokuje zpětné vychytávání Na⁺ a přispívá tak k natriuréze a diuréze (Simões E Silva et al. 1998) a má kardioprotektivní účinky (Santos et al. 2004; De Mello et al. 2004; Bader et al. 2024).

Méně významné komponenty RAAS

RAAS kaskáda zahrnuje řadu dalších receptorů a enzymů, které vytváří další méně významné biologicky aktivní peptidy, které se účastní klasické vazokonstrikční (Ang III) nebo alternativní vazodilatační dráhy (Ang IV, Alamandin) nebo se dle podmínek a tkáňové distribuce mohou vázat na receptory obou drah (Ang A) (Bader et al. 2024). Pro přehled jsou všechny komponenty RAAS znázorněny na obr.4.

4.1.5.2 Endotelinový systém

Endoteliny jsou významné vazoaktivní působky, které se zásadně podílí na regulaci TK, acidobazické rovnováhy a homeostázy vody a solí. Byly popsány tři izoformy: ET-1, ET-2 a ET-3, ale nejvýznamnější z nich je ET-1 (Davenport et al. 2016; Schiffrin and Pollock 2024). Endoteliny jsou produkovány zejména endoteliálními buňkami krevních cév a působí parakrinně nebo autokrinně přes dva typy receptorů spřažených s G proteiny - ET_A a ET_B . ET-1 má vyšší afinitu pro ET_A receptory (Schiffrin 2001), které se nachází převážně na VSMC v aortě, srdci a plicích (Davenport et al. 2016) a jsou zodpovědné především za vazokonstrikci a vzestup TK. ET_A receptory stimulují tvorbu kolagenu, podporují angiogenezi a vaskulární remodelaci, v srdci zvyšují kontraktilitu a srdeční frekvenci. Zároveň stimulují produkci cytokinů a zánětlivých faktorů, zvyšují oxidační stres a podílí se tak na rozvoji endoteliální dysfunkce, zánětu cév a vzniku aterosklerózy (Browatzki et al. 2000; Schiffrin 2001; Piechota et al. 2010; Schiffrin and Pollock 2024). Oproti tomu ET_B receptory jsou více exprimovány na endotelových buňkách a zprostředkovávají uvolnění vazodilatačních látek jako jsou prostacykliny nebo NO, který zpětnovazebně limituje působení ET_A receptorů (Davenport et al. 2016). Produkce ET-1 je stimulována vysokým příjmem soli (Liu et al. 2013), Ang II, adrenalinem, ADH, inzulinem, trombinem nebo hypoxií (Boulanger and Lüscher 1990; Schiffrin 2005; Schiffrin and Pollock 2024). Dlouhodobá aktivace endotelinového systému se významně podílí na orgánovém poškození. V ledvině se vyskytují ET receptory ve všech segmentech a ET systém tak reguluje RBF, exkreci sodíku, buněčnou proliferaci i zánětlivé reakce a není proto překvapením, že jeho úloha je často zmiňována při rozvoji CKD. Zvýšené hladiny ET-1 jsou také přítomné u řady modelů hypertenze (Vaněčková et al. 2006; Kohan et al. 2011; Schiffrin and Pollock 2024).



Obr.5: Působení endotelinu-1

ET-1 je produkován v endotelu krevních cév z prekursoru Big-ET-1 působením Endotelin konvertujícího enzymu (ECE). ET-1 působí přes ET_A a ET_B receptory, které jsou spřažené s G-proteiny a přes produkci inositol-3-fosfátu (IP_3) způsobí uvolnění Ca^{2+} a kontrakci hladkého svalu cév. (Upraveno podle: Richard E. Klabunde, 2021)

4.1.5.3 Systém oxidu dusnatého

NO je již od 80.let intenzivně studován jako významný vazodilatační mediátor (původně popsáný jako endoteliální relaxační faktor, EDRF), který je produkován téměř ve všech tkáních. NO účinkuje přes stimulaci solubilní guanylátcyklázy (sGC), která syntetizuje cyklický guanosin-monofosfát (cGMP) a aktivuje tak dráhy řízené přes cGMP-dependentní proteinkinázy (Murad 1994).

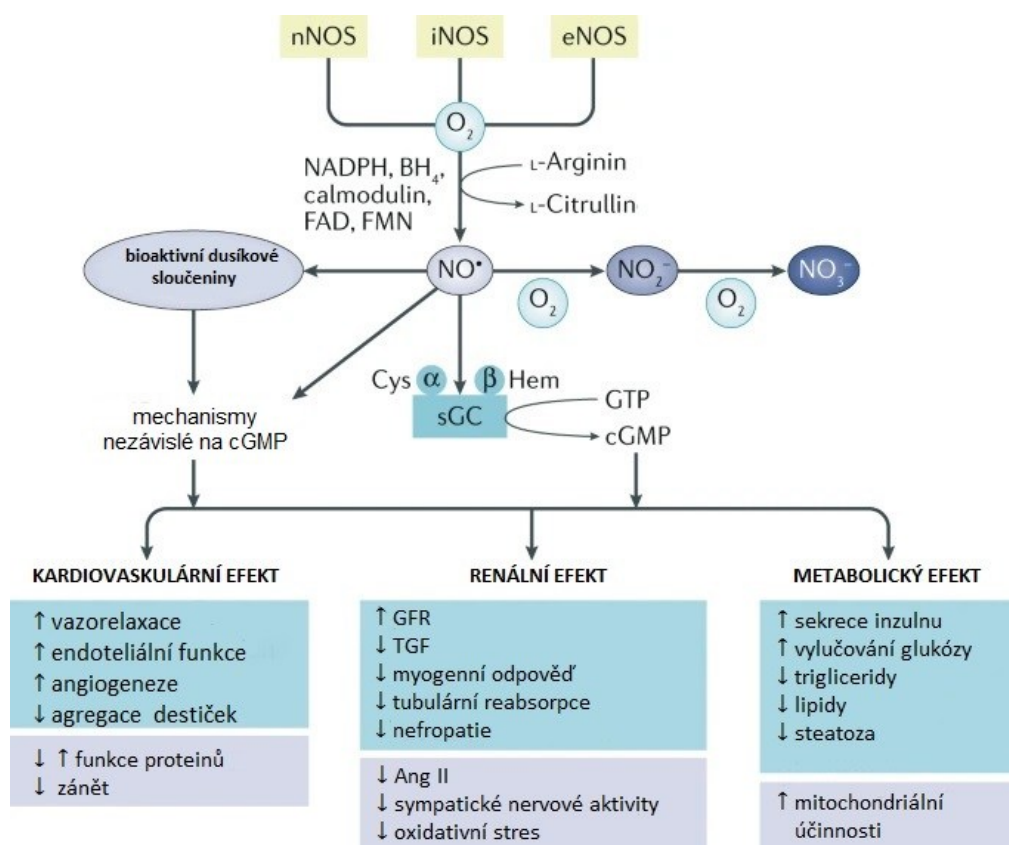
NO může být tvořen dvěma cestami. Jednou možností je redukce dusitanů (nitritů, NO_2^-) a dusičnanů (nitrátů, NO_3^-). Tato dráha se uplatňuje např. během stavů hypoxie nebo acidózy a přispívá tak k fyziologické reakci organismu na ischemický stres (Lundberg et al. 2008). Ale hlavní dráha syntézy NO je cesta enzymatická, která oxiduje L-arginin na L-citrulin za vzniku NO. U savců se NOS vyskytuje v několika izoformách - neuronální (nNOS, NOS I), indukovaná (iNOS, NOS II) a endoteliální (eNOS, NOS III). Jednotlivé izoformy se liší svým zastoupením v různých tkáních, způsobem aktivace, kinetikou a tedy i funkcí. nNOS se vyskytuje především v centrální nervové soustavě, kde NO slouží jako neuromodulátor. NO tvořené iNOS po stimulaci imunitním systémem se podílí na regulaci zánětu a imunitní odpovědi. eNOS hraje významnou roli v regulaci TK a renálních funkcí a interaguje s řadou dalších vazoaktivních systémů (Guzik et al. 2003; Pacher et al. 2007; Zhang et al. 2023).

Působení NO moduluje také aktivitu sympatického nervového systému (Kumagai et al. 1993) a tato interakce je obousměrná, protože snížením aktivity sympatiku pomocí renální denervace se zvyšuje dostupnost NO (Singh et al. 2021). NO ovlivňuje také další systémy - relaxuje hladkou svalovinu střev nebo indukuje vazodilataci v corpus cavernosum a způsobuje erekci (Guzik et al. 2003; Pacher et al. 2007).

V ledvinách se vyskytují všechny tři izoformy NOS, ale největší podíl na tvorbě NO má eNOS. NO je důležitý modulátor renální hemodynamiky a tubulárních funkcí - dilatuje aferentní arteriolu a snižuje reabsorpci Na^+ , čímž snižuje citlivost TGF. Jeho silný vazodilatační efekt také přímo ovlivňuje výši TK (Majid and Navar 2001; Hsu and Tain 2019). Funkční systém NO je tedy nepostradatelný pro udržení homeostázy solí a extracelulárních tekutin a poruchy v produkci NO vedou k rozvoji endoteliální dysfunkce, hypertenze a CKD (Kopkan and Červenka 2009; Singh et al. 2016, 2021).

Nedostatek NO může být způsoben: 1) nedostatkem substrátu NOS (L-argininu), 2) snížením exprese NOS, 3) nižší aktivitou NOS- např. při zvýšení koncentrace endogenního inhibitoru NOS (asymetrický dimethyl arginin (ADMA)) nebo nedostatkem kofaktorů NOS, 4) inaktivací

NOS - např. působením oxidativního stresu (Fleck et al. 2001; Kopkan and Majid 2005; Reddy et al. 2015; Hsu and Tain 2019). Nedostatek NO pak může vést k akumulaci kyslíkových radikálů, které mohou přímo stimulovat reabsorpci sodíku a nárůst TK (Kopkan and Majid 2005; Araujo and Wilcox 2014).



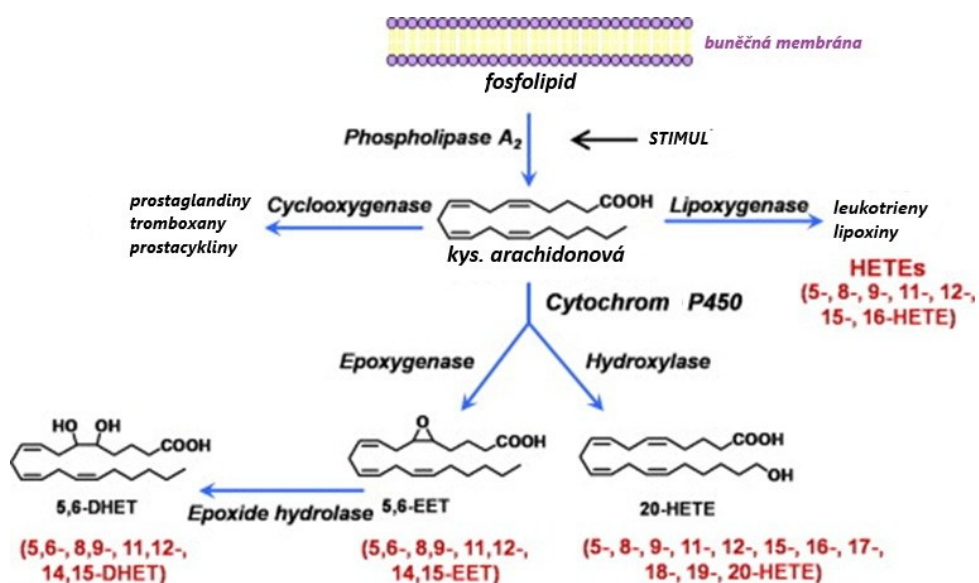
Obr. 6: dráha oxidu dusnatého a jeho vliv na kardiovaskulární a renální funkce

Oxid dusnatý (NO) je syntetizován NO syntázou (NOS), která má tři izoformy: neuronální (nNOS), indukibilní (iNOS) a endoteliální (eNOS) a jejich aktivita závisí na množství substrátu L-argininu a kofaktorů (kalmodulin, nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD) a flavin mononukleotid (FMN)). NO se váže na solubilní guanylátcyklázu (sGC), čímž dojde k její aktivaci a produkci druhého posla - cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) a spuštění dalších signalizačních kaskád pozitivně ovlivňujících nejen kardiovaskulární a renální funkce. NO je signální molekula s krátkou dobou působení - v krvi i ve tkáních je velmi rychle oxidován za vzniku nitritů a nitrátů. Hlavní dráha působení NO je přes cGMP, ale jsou známy i cGMP nezávislé mechanismy. (Upraveno podle: Carlström 2021)

4.1.5.4 Dráha cytochromů P450 (CYP)

Další důležité vazoaktivní látky vznikají z kyseliny arachidonové (arachidonic acid, AA). AA je součástí fosfolipidů plazmatických membrán a slouží také jako substrát pro řadu metabolických drah. Nejvýznamnější jsou cyklooxygenázová dráha, lipoxygenázová dráha a dráha cytochromů P450 (CYP). Cyklooxygenázovou dráhou vznikají prostaglandiny (PG). Lipoxygenázovou dráhou jsou tvořeny hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs), lipoxiny a leukotrieny, které se účastní zánětlivých procesů, buněčné proliferace nebo intracelulární signalizace (Zeldin 2001; Roman 2002).

Dráha CYP dominuje v mozku, plicích, ledvinách a periferním cévním řečišti, kde metabolizuje AA na dvě hlavní skupiny produktů. Činností CYP s epoxigenázovou aktivitou vznikají EETs a CYP s ω -hydrolázovou aktivitou tvoří zejména 19-HETE a 20-HETE. Tyto metabolity mají důležitou roli v regulaci vaskulárního tonu a renálních, plicních a kardiovaskulárních funkcí (Roman 2002; Zhu et al. 2015).



Obr. 7.: Dráha cytochromů P450

Kyselina arachidonová (AA) je fosfolipázou A uvolněna z fosfolipidové vrstvy membrány a může být zpracována dráhou cyklooxygenázovou, lipoxygenázovou nebo dráhou cytochromů P450 (CYP). CYP může AA hydroxylovat za vzniku hydroxyeikosatetraenových kyselin (HETEs) nebo epoxigenázovou dráhu tvoří epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs). EET jsou rychle metabolizovány solubilní epoxid hydrolázou (sEH) na dihydroxyeikosatrienových kyselin (dHETEs/DHETs). (upraveno podle: Zhu et al. 2015)

Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs)

EETs jsou parakrinní látky s vazodilatačními a natriuretickými účinky, dnes jsou označovány za dříve neznámý dilatační faktor EDHF - endothelium-derived hyperpolarising factor (Campbell et al. 1996). Jsou tvořeny několika izoformami CYP (CYP2C-nejvíce v ledvinách, CYP2J v srdci), které tvoří různé regioizomery: 5,6-EETs, 8,9-EETs, 11,12-EETs a 14,15-EETs. Navíc různé izoformy CYP tvoří různé enantiomery R/S a S/R, které jsou v různých tkáních různě aktivní (Gauthier et al. 2007). Jejich účinnost je limitována působením solubilní epoxidové hydrolázy (sEH), která odbourává EETs na biologicky velmi málo účinné dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETEs)(Zeldin 2001; Imig 2016).

EETs jsou syntetizovány zejména v endoteliálních buňkách a jsou uvolňovány působením BK, acetylcholinu (ACh) nebo napětovým stresem. Jejich vazodilatační účinek je zprostředkovaný přes G-proteiny a hyperpolarizaci membrány hladkého svalu a je tak nezávislý na funkci endotelu na rozdíl od působení ACh nebo Bk (Campbell et al. 1996; Huang et al. 2005; Campbell et al. 2017). V ledvinách jsou nejvíce aktivní 11,12-EETs. Snižují reabsorpci Na^+ inhibicí ENaC (Dos Santos et al. 2004; Wang et al. 2014), čímž významně přispívají k natriureze a mají tak velký antihypertenzní potenciál. Celá řada studií prokázala, že snížená dostupnost EETs v důsledku zvýšené aktivity sEH se významně podílí na patofyziologii hypertenze a rozvoji s ní souvisejícího orgánové poškození (Honetschlägerová et al. 2011b; Kujal et al. 2014; Červenka et al. 2018; Vacková et al. 2019b). Aktivita sEH může být například zvýšena působením Ang II a přispívat tak k Ang II indukované srdeční hypertrofii (Ai et al. 2009). EETs mají také významné kardioprotektivní účinky při ischemicko-reperfučním poškození (Chaudhary et al. 2013), zmenšují rozsah infarktu myokardu, mají pozitivní vliv na remodelaci myokardu a jeho regeneraci po ischemicko-reperfučním poškození (Gauthier et al. 2007; Neckář et al. 2018; Lai and Chen 2021). Blokáda degradace EETs inhibicí sEH vedla ke zvýšení dostupnosti EETs a významným antihypertenzním, kardio- a renoprotektivním účinkům (Imig 2018; Vacková et al. 2019b). EETs mají také protizánětlivé účinky (Thomson et al. 2012; Oni-Orisan et al. 2013), ale byla bohužel popsána také jejich schopnost stimulovat nádorový růst (Jiang et al. 2007; Pozzi et al. 2010).

20-dyhydroxyeikosatetraenová kyselina (20-HETE)

Na rozdíl od EETs není účinek 20-HETE tak jednostranný. 20-HETE má dva hlavní typy účinků - vaskulární a renální. Vazokonstrikční efekt 20-HETE je zprostředkován bloádou vápníkem aktivovaného draslíkového kanálu ($K_{Ca}C$), následná depolarizace vede k otevření napět'ových Ca^{2+} kanálů a kontrakci VSMC. 20-HETE také stimuluje expresi ACE a produkci Ang II a přispívají tak k rozvoji hypertenze (Alonso-Galicia et al. 2002; Fan et al. 2013; Roman 2024). Inhibicí NOS přispívají k endoteliální dysfunkci a zvýšení periferní vaskulární rezistence. Naopak v ledvinách zvyšují RPP a inhibují Na^+/K^+ -ATPázu, čímž podporují natriurézu, která pomáhá hypertenzi zmírňovat (Williams et al. 2010; Zhang et al. 2018; Roman 2024). 20-HETE má větší vliv na rozvoj hypertenze u mužů, protože testosteron zvyšuje expresi izoformy CYP4A, která je zodpovědná za její produkci (Wu et al. 2013; Roman 2024). U většiny modelů hypertenze ale převládá jejich pro-hypertenzní účinek potvrzený poklesem TK po inhibici 20-HETE (Roman 2024).

4.1.5.5 Kallikrein-kininový systém

Kallikrein-kininový systém (KKS) patří mezi vazodilatační systémy, které působí proti výše zmíněným vazokonstrikčním systémům, reguluje TK, zánětlivé reakce nebo koagulaci. Účinnou látkou toho systému jsou kininy, zejména BK, který vzniká z kininogenu působením proteázy kallikreinu. U lidí existují dva typy kallikreinů – plazmatický a tkáňový.

Plazmatický KKS je součástí koagulačního systému a vrozené imunitní odpovědi. Plazmatický prekallikrein je faktorem XII přeměněn na kallikrein, který štěpí vysokomolekulární kininogen na BK. BK se účastní koagulace, fibrinolýzy a také aktivace komplementu (Kaplan and Ghebrehiwet 2010; Mohammadi et al. 2024). Ve tkáňovém KKS vzniká bradykinin z nízkomolekulového kininogenu a u lidí se uvolňuje ve formě lys-bradykininu, kterému se říká též kallidin (Alhenc-Gelas et al. 1981). Kininy se tvoří hlavně v srdci, aortě a v ledvinách, kde hrají důležitou roli v regulaci RBF. Ale jejich koncentrace je nízká a působí pouze jako místní hormony, protože jsou rychle hydrolyzovány kininázy. Jednou z těchto kinináz je i ACE (Mahabeer 2000; Kayashima et al. 2012). Kininy působí přes 2 typy receptorů - bradykininový B1 receptor (B1R) a bradykininový B2 receptor (B2R). B2R je exprimován neustále ve většině tkání, zatímco exprese B1R je stimulována při zánětu nebo diabetu. Oba receptory jsou spojené s G-proteiny a zprostředkovávají uvolňování NO, prostaglandinů (PGs), kyseliny arachidonové a zánětlivých mediátorů (Kayashima et al. 2012).

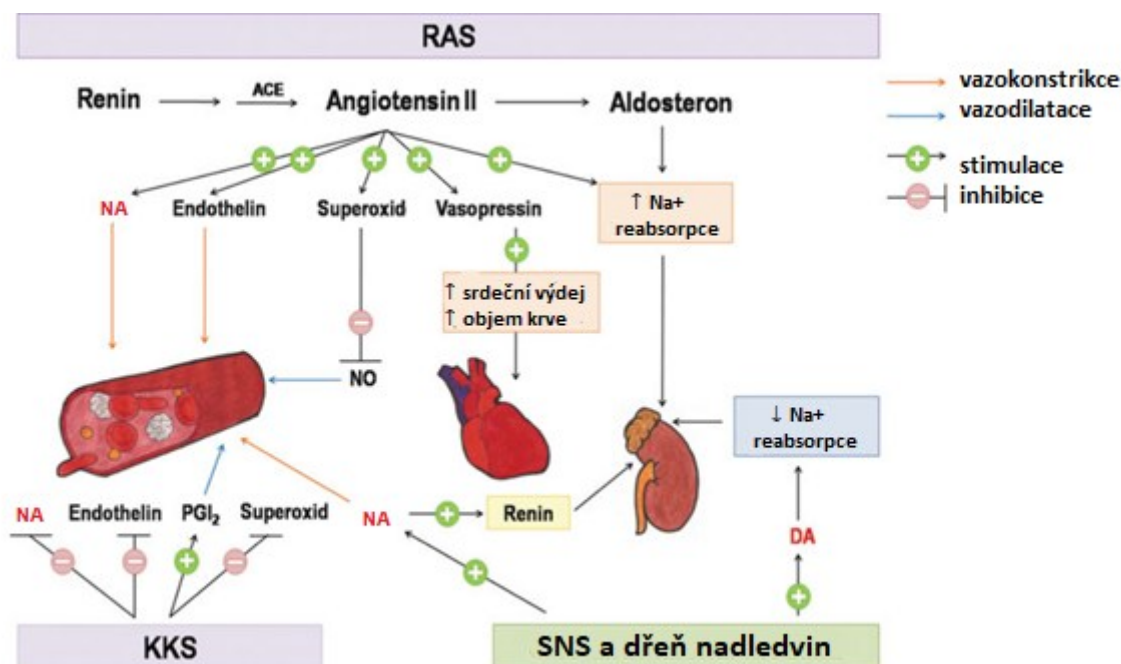
4.1.6 Interakce vybraných vazoaktivních systémů v regulaci kardiovaskulárních funkcí

Výše zmíněné vazoaktivní systémy působí ve vzájemné interakci a udržují tak rovnováhu a stálost vnitřního prostředí. Významně se podílí i na regulaci kardiovaskulárních a renálních funkcí, a proto se narušení rovnováhy těchto systémů může významně podílet na patofyziologii rozvoje jejich onemocnění.

Interakce RAAS a NO systému

Nejvýznamnější systémy - RAAS a systém NO vykazují protichůdné fyziologické účinky a je tedy důležité, aby byly ve funkční rovnováze. Její narušení hraje významnou roli v patogenezi kardiovaskulárních a renálních poruch včetně hypertenze a renálního poškození. Vzájemné interakce těchto systémů se projevují již během prenatálního vývoje. Inhibice NO u březích samic byla u vyvíjejícího se plodu spojena se zvýšenou expresí reninu a vyšší aktivitou ACE a vedla u těchto jedinců k programované hypertenzi v dospělosti (Tain et al. 2016). Ang II se podílí na patogenezi endoteliální dysfunkce snížením aktivity NOS prostřednictvím AT₁R a zvýšením produkce ROS (Mollnau et al. 2002; Ding et al. 2020).

Zatímco vazokonstrikční osa RAAS je s působením NO v opozici, vazodilatační osa využívá NO jako mediátor účinků Ang 1-7 (Heitsch et al. 2001; Semenikhina et al. 2024). Aktivace AT₂R je také spojena s aktivací NOS a produkcí NO, který působí proti vazokonstrikčním účinkům Ang II (Yayama et al. 2006; Yayama and Okamoto 2008). A opačně NO může stimulovat expresi AT₂R přes aktivaci sGC a inhibovat ACE (Dao et al. 2016).



Obr.8: Schéma regulace průtoku krve kardiovaskulárním systémem a ledvinami působením Renin-angiotenzin-aldosteronového (RAAS), Kallikrein-kininového (KKS) a sympatického nervového systému (SNS). NA – noradrenalin, DA – dopamin, NO – oxid dusnatý, PGI₂ – prostaglandin I₂, ACE – angiotenzin konvertující enzym.
(upraveno podle: Wiebe and Wägner 2015)

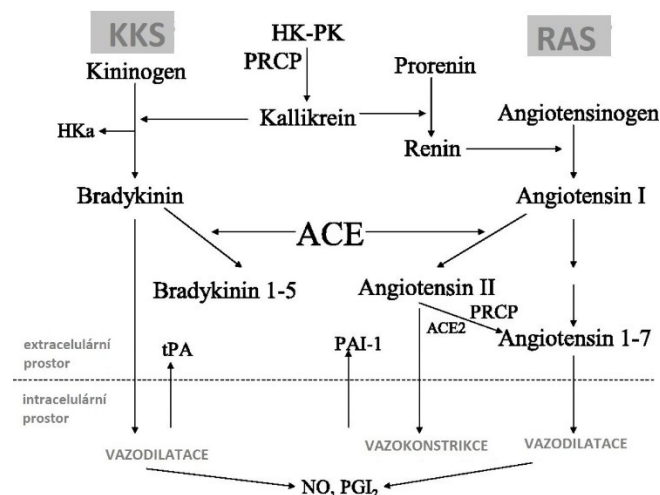
Interakce RAAS a ET systému

RAAS a ET systém jsou nejsilnější vazokonstrikční systémy, které vykazují významné funkční interakce. Ang II potencuje působení ET-1 zvýšením exprese ET_A receptoru a jeho kapacity pro vazbu ET-1 i zvýšením jeho uvolňování (Emori et al. 1991; Lin et al. 2014). Ang II-indukovaná hypertenze je spojena s aktivací ET_A receptorů, jejichž blokáda zmírňuje rozvoj hypertenze a souvisejících poškození (Boesen et al. 2010). Léčba selektivním blokátorem ET_A receptoru má vyšší účinnost na zmírnění Ang II dependentní hypertenze a přidruženého orgánového poškození než kombinovaná blokáda ET_A a ET_B receptoru v preventivním podání (Vaněčková et al. 2006) i při léčbě již rozvinuté hypertenze (Vernerová et al. 2008). U experimentálního modelu CKD byla zjištěna zvýšená aktivita RAAS i ET systému, které významně přispívají k rozvoji CKD (Sedláková et al. 2017). Kombinovaná blokáda RAAS a ET_A systému přispívá k renoprotekci u modelu CKD, zejména při časném podání (Čertíková Chábová et al. 2014), u již rozvinutého CKD se aditivní efekt ET_A blokády nepotvrdil (Sedláková et al. 2017). Účinek renálních ET_B receptorů u Ang II-indukované

hypertenze může být ovlivněn také pohlavním dimorfismem, protože jejich vliv na natriurézu byl narušen pouze u samců (Kittikulsuth et al. 2011). U ET-1 indukované hypertenze bylo pozorováno zvýšení hladin Ang I a Ang II a blokáda AT₁R zabránila rozvoji ET-1 indukované hypertenze (YAO et al. 2004). ET-1 má také přímý stimulační efekt na sekreci aldosteronu z kůry nadledvin (Belloni et al. 1996) a naopak aldosteron může stimulovat expresi ET-1 (Wong et al. 2007). ET-1 může také zpětně tlumit RAAS snížením produkce reninu (Krämer et al. 1994; Komers and Plotkin 2016). Endogenní ET-1 také přispívá k rozvoji Ang II indukované hypertrofie kardiomyocytů (Ito et al. 1993).

Interakce RAAS a KKS

ACE je enzym, který je součástí jak RAAS tak KKS. ACE přeměňuje Ang I na Ang II, ale zároveň může hydrolyzovat BK. Protože má ACE vyšší afinitu k BK, mají nízké hladiny ACE mají spíše protektivní vliv. ACE má dvě aktivní domény: C-doména, která štěpí Ang I i BK a je plně závislá na koncentraci Cl⁻, zatímco N-doména, která hydrolyzuje pouze BK, je aktivní i při nízké nebo žádné koncentraci Cl⁻. (Jaspard and Wei 1993; Khurana and Goswami 2022). Protektivní vliv ACE inhibitorů je dán snížením hladiny Ang II, ale také zvýšením hladiny BK, který může potencovat jejich účinek (Erdös et al. 2010; Kayashima et al. 2012; Mohammadi et al. 2024). Navíc BK také snižuje produkci O₂⁻ ve vaskulárních endoteliálních buňkách (Kakoki et al. 2007). Protektivní efekt AT₁R blokátorů je také částečně zprostředkován KKS - losartan se přímo váže na B2R (Bonde et al. 2011). Vazodilatační osa RAAS rovněž ovlivňuje KKS. Ang 1-7 zvyšuje produkci BK jednak stimulací AT₂R a inhibicí ACE, ale také potencuje působení BK inhibicí desenzitizace B2R (Abbas et al. 1997; Tsutsumi et al. 1999; Iwai and Horiuchi 2009).



Obr.9: Interakce RAAS a KKS

Interakce obou systémů je na několika úrovních. Kallikrein jednak přeměňuje prorenin na renin a zároveň kininogen na bradykinin. Další úrovní je působení ACE, který přeměňuje Ang I na Ang II a zároveň hydrolyzuje bradykinin. Oba systémy mohou vést k vazodilataci a uvolňování NO a PGI₂ (v případě RAAS přes Ang 1-7). HK-PK, vysokomolekulární prekallikrein; PRCP, prolylkarboxypeptidáza; ACE, angiotenzin I konvertující enzym; NO, oxid dusnatý; PGI₂, prostaglandin I₂ (prostacyklin); tPA, tkáňový plasminogenový aktivátor; PAI-1, inhibitor tPA. (upraveno podle: Schmaier 2003)

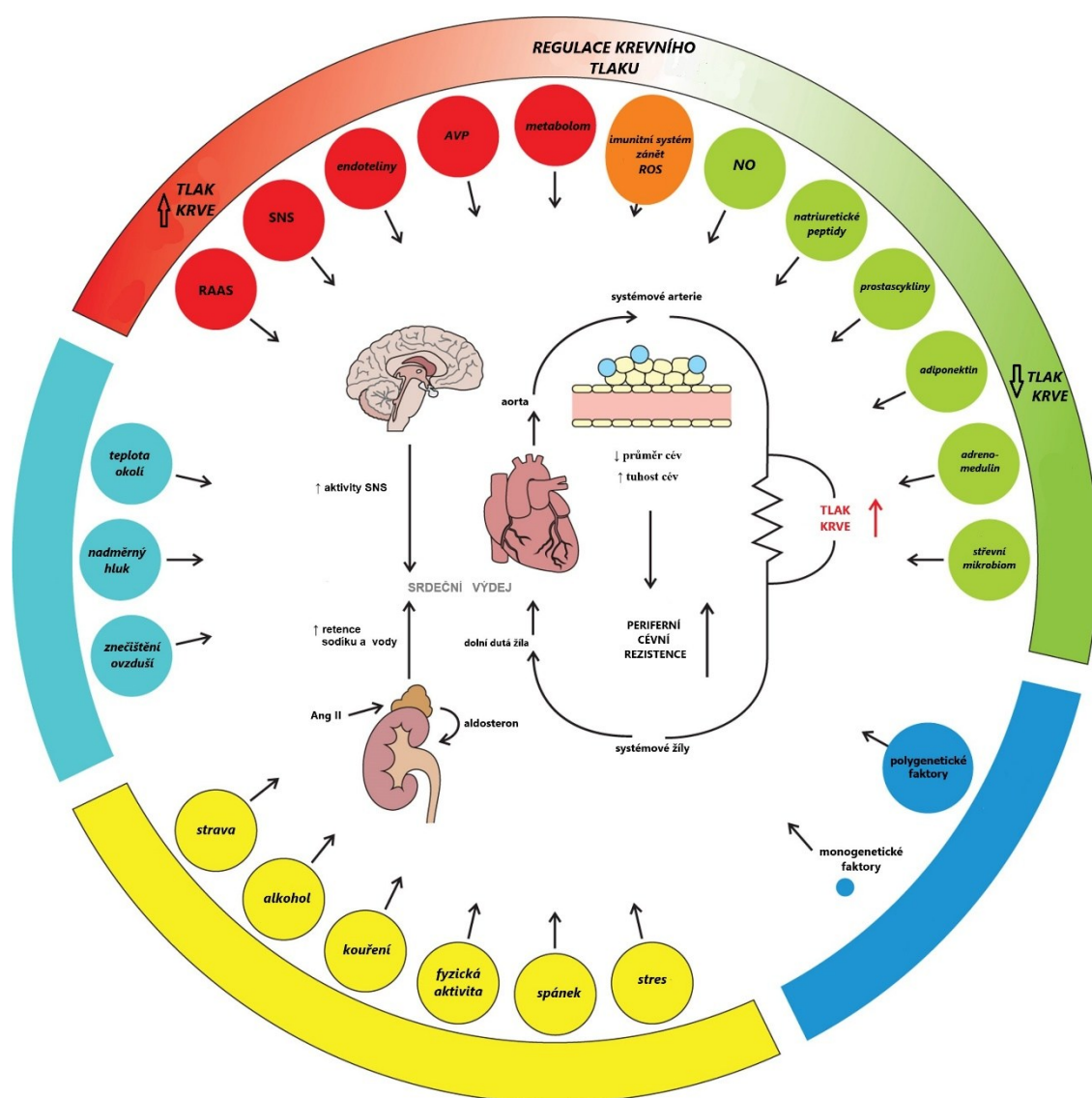
4.2 Patofyziologie kardiovaskulárních onemocnění

4.2.1 Hypertenze

Hypertenze je nejčastější rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) postihuje celosvětově až 1,28 miliard lidí a představuje tak závažný zdravotní problém. Hypertenze je charakterizována jako dlouhodobé zvýšení TK nad hodnoty 140/90 mmHg, ale u maligní hypertenze může tlak dosahovat hodnot až 250/170 mmHg. Krátkodobé zvýšení TK nepředstavuje výrazný problém, ale dlouhodobé působení i mírně zvýšeného TK zvyšuje riziko rozvoje orgánového poškození. Za nejrizikovější je považován kolísavý TK. Mezi orgány nejvíce postižené zvýšeným TK patří srdce, mozek a ledviny, oči a cévní řečiště. Hypertenze je v posledních letech spojována též s rozvojem demence v pokročilém věku (Messerli et al. 2017; Mancia et al. 2023; McEvoy et al. 2024).

Hypertenzi rozlišujeme podle příčin vzniku na primární (esenciální), která představuje až 95% všech případů a sekundární, která vzniká jako následek jiného onemocnění (stenóza renální arterie, genetická mutace, hormonální poruchy, nádorové onemocnění, ...).

Příčinou vzniku primární hypertenze je komplexní interakce genetického pozadí, environmentálních a behaviorálních faktorů a procesu stárnutí. Všechny tyto faktory mohou narušit interakce orgánových systémů (renální, kardiovaskulární a centrální nervový systém) nebo neurohumorální a imunitní mechanismy regulace TK a vést k hemodynamické nerovnováze a zvýšení systémové vaskulární rezistence (Oparil et al. 2018; Mancia et al. 2023). Faktorů, které se podílejí na patofyziologii hypertenze je velké množství a pro přehlednost jsou schematicky znázorněny na obrázku 10.



Obr. 10: Mechanismy podílející se na regulaci TK a patofyziologii hypertenze.
(praveno podle: Mancia et al. 2023)

4.2.1.1 Experimentální modely hypertenze

K výzkumu hypertenze se využívá řada zvířecích modelů umožňujících studovat různé formy hypertenze, zejména různé kmeny laboratorních myší a potkanů. Mezi nejznámější patří Spontánně hypertenzní potkani (SHR), Dahlovi sůl-senzitivní potkani, Milánští hypertenzní potkani, Fawn-Hooded potkani nebo různé transgenní kmeny a knockout modely. Těchto modelů je celá řada a přehledně jsou popsány např. v publikaci Lerman et al. (2019). Existují také metody indukované hypertenze jako jsou různé varianty dnes již klasické Goldblattovské (renovaskulární) hypertenze využívající metodu “sevržené renální arterie”, která vede k sekundární hypertenzi zvýšením hladin reninu a aldosteronu (Pinto et al. 1998). Dále Ang II indukovaní potkani, kteří mají hypertenzi vyvolanou pomalou infuzí Ang II, např. pomocí osmotické minipumpičky implantované pod kůži (Von Thun et al. 1994). Dalším modelem indukované hypertenze jsou DOCA-salt potkani, u kterých podání mineralokortikoidu deoxycortikosteronu způsobuje zvýšenou reabsorpci soli a vody v ledvinách. Při současném zvýšeném příjmu soli dochází u těchto potkanů k hypervolemii (Basting and Lazartigues 2017). Hypertenze může být vyvolána také chronickou inhibicí produkce NO podáváním inhibitoru NOS - L-NAME (*N*^o-nitro-L-arginine) (Kopkan and Majid 2005).

Dále se podrobně zaměřím pouze na modely hypertenze použité v mé disertační práci.

Fawn-Hooded potkani

Fawn-Hooded hypertenzní potkani slouží jako model esenciální hypertenze asociované s rozvojem proteinurie, glomerulosklerózy a CKD (Simons et al. 1993), ale v posledních letech jsou využíváni také ke studiu různých psychiatrických onemocnění, zejména deprese a alkoholismu, protože u nich byly pozorovány poruchy chování související s pozměněným serotoninergním systémem v CNS (Van Dokkum et al. 1999b, a; Fan et al. 2020b). Tento kmen vznikl křížením různých populací potkanů Long-Evans kmene. Poté, co u nich byla pozorována spontánní hypertenze byli následně na univerzitě v Rotterdamu vyselektováni na dva kmeny podle hodnot tlaku a vylučování sodíku močí: varianta s nejvyššími hodnotami (Fawn-Hooded Hypertensive, FHH) a s nejnižšími hodnotami (Fawn-Hooded Low pressure, FHL) sloužící jako normotenzní kontrola (Kuijpers and De Jong 1986).

FHH potkani rozvíjí mírnější hypertenzi mezi 4. a 5. měsícem věku a v jednom roce věku dosahují hodnoty systolického tlaku krve (SBP; systolic blood pressure) 160-170 mmHg, zatímco FHL zůstávají normotenzní s hodnotami 120 -130 mmHg a až ve vyšším věku může

docházet k pozvolnému nárůstu SBP do 140 mmHg (Vavrinec et al. 2013; Doleželová et al. 2016). Důležité je, že se u FHH potkanů progresivně rozvíjí příznaky CKD již ve velmi mladém věku. Tyto změny je možné sledovat již od 3. měsíce věku. Rozvoj proteinurie a glomerulárního poškození u FHH potkanů je spojen s narušenou autoregulací RBF, GFR a P_{GC} (Van Dokkum et al. 1999b, a; Fan et al. 2021).

Hypertenze i CKD má u tohoto modelu genetický podklad a objevují se u nich podobné histopatologické změny jako u pacientů s fokální glomerulosklerózou (FGS) (Kriz et al. 1998). Starší studie u FHH potkanů identifikovaly 5 chromozomových oblastí Rf-1 – Rf-5 (Rf - renal failure) spojených s rozvojem proteinurie. Největší zájem vzbudila oblast Rf-1, která je zodpovědná za narušenou autoregulaci RBF (Provoost et al. 2002; López et al. 2006). Novější práce skupiny profesora Romana (Fan et al. 2020a, 2021) pak ukázaly, že za narušení autoregulace RBF je zodpovědná mutace genu pro γ -adducin (Add3), který se nachází v oblasti chromozomu 1. Tato oblast je homologní s oblastí na lidském chromozomu 10 zodpovědnou za rozvoj diabetické nefropatie. Porovnání genotypu FHH a FHL ukázalo, že mutaci v Rf-1 mají pravděpodobně i FHL potkani a tedy i zvýšenou pravděpodobnost vzniku určitého stupně renálního poškození v porovnání s jinými normotenzními kmeny (van Dokkum et al. 1997). FHH mají také poškozený gen pro protein Rab38 v oblasti Rf-2, který je u nich zodpovědný za časný rozvoj proteinurie. Tento gen se u lidí nachází na chromozomu 11, který je rovněž spojován s onemocněním ledvin (Rangel-Filho et al. 2013).

Protože TGF u FHH potkanů zůstává zachován (Verseput et al. 1998), narušená autoregulace RBF je dána spíše změnami v myogenní odpovědi aferentní arterioly. Již v mladém věku byla u FHH prokázána narušená myogenní konstriktce interlobulárních arteriol, což vede k výraznějšímu přenosu zvýšeného systémového TK do glomerulárních kapilár. Glomerulární hyperfiltrace a zvýšení P_{GC} je významným faktorem, který spouští rozvoj proteinurie a glomerulárního poškození u FHH potkanů (Van Dokkum et al., 1999; Burke et al., 2013; Vavrinec et al., 2013). Myogenní konstriktce renálních arteriol u FHL zůstává zachována až do vysokého věku a k poškození ledvin zvýšením systémového TK (věkem nebo farmakologickou intervencí) dochází až při tlaku 200 mmHg (van Dokkum et al. 1997; Vavrinec et al. 2013). Na rozvoji hypertenze a FGS u FHH potkanů se významně podílí také RAAS. Již starší práce ukázaly příznivý vliv inhibice ACE (ACEi). ACEi má u tohoto modelu výrazný renoprotektivní efekt spojený s normalizací zvýšeného P_{GC} (Westenend et al. 1992; Verseput et al. 1997). Z těchto důvodů byl tento kmen zvolen v mé práci jako vhodný model ke studiu vlivu vazomotorických látek na rozvoj CKD.

TGR(mRen2)27 - genetický model Ang II-dependentní hypertenze

Tento kmen byl vytvořen v roce 1990 a představuje první transgenní kmen potkanů pro výzkum hypertenze (Mullins et al. 1990). TGR(mRen2)27 potkani jsou monogenním modelem hypertenze, kdy byl do genomu normotenzního kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD) potkanů vložen myší Ren-2 reninový gen (Langheinrich et al. 1996).

Homozygotní zvířata mají velmi nízké váhové přírůstky a bez trvalé léčby antihypertenzivy umírají již v raném věku s projevy maligní hypertenze. Hodnoty jejich SBP, totiž dosahují až 290 mmHg u samců a 250 mmHg u samic (Dvořák et al. 2004). Tato zvířata se používají se především jako model levostranného srdečního selhání, které se rozvíjí velmi brzy po dosažení maximálních hodnot TK (De Boer et al. 2004). Z tohoto důvodu se jako model hypertenze obvykle používají heterozygotní potkani, kteří vzniknou křížením transgen-pozitivního potomka s transgen-negativním HanSD potkanem opačného pohlaví. Heterozygotní potkani rozvíjí hypertenzi mezi 4.-5. týdnem věku a maximálních hodnot SBP dosahují v 8.-10. týdnu věku (samci v průměru 240 mmHg, samice 200 mmHg). Mezi 20.-24. týdnem věku dochází často ke spontánnímu poklesu SBP u samců o 20-30 mmHg, u samic až o 40-60 mmHg. TGR(mRen2)27 potkani vykazují výrazný pohlavní dimorfismus nejen ve výši TK, ale také v hladinách komponentů RAAS (prorenin, Ang I, Ang II), protože exprese Ren-2 genu je stimulována androgeny (Tronik and Rougeon 1988).

Tento model je charakterizován zvýšenou aktivitou RAAS. Mají významně zvýšené plazmatické i renální hladiny Ang I a Ang II a velmi dobře reagují na podané ACEi a antagonisty AT₁R (Campbell et al. 1995; Lee et al. 1996; Husková et al. 2006a; Červenka et al. 2015). Naopak hladiny angiotenzinogenu jsou signifikantně sniženy (Campbell et al. 1995; Bohlender et al. 1998). Ren-2 gen je exprimován také v srdeční tkáni, kde zvýšená hladina Ang II souvisí s remodelací srdeční tkáně, zejména pak při chronickém objemovém přetížení (Baker and Aceto 1990). Exprese Ren-2 genu v cévní stěně zase přispívá k hypertrofii hladkých svalů a jejímu zesílení (Lee et al. 1996) a byla pozorována také dysfunkce cévního endotelu spojená se sníženým uvolňováním NO (Tschudi 1994). Také tlakově-natriuretická křivka je u TGR(mRen2)27 potkanů posunuta směrem k vyšším hodnotám TK (Gross et al. 1994).

Tento model byl zvolen zejména ke studiu vlivu zvýšené RAAS aktivity na rozvoj orgánového poškození a možných léčebných postupů, které by efektivně snížily poškození srdce a ledvin.

4.2.2 Srdeční selhání

Chronické srdeční selhání (chronic heart failure, CHF) v posledních desetiletích postihuje stále větší procento obyvatel. Odhaduje se, že celosvětově trpí srdečním selháním až 64 milionů lidí. CHF je způsobeno strukturálními nebo funkčními změnami myokardu a je charakterizováno jako neschopnost srdce čerpat krev (kyslík/živiny) do periferních tkání nebo jen za cenu zvýšení plicních tlaků v komorách. Zvýšené plicní tlaky u levostranného CHF vedou k dilataci levé síně a rozvoji plicní hypertenze a může dojít až ke vzniku plicního edému. Pravostranné CHF je typické zejména příznaky plynoucími ze zvýšeného městnání krve před pravou komorou, tj. periferní otoky, městnání krve v gastrointestinálním traktu, snížená funkce jater a další. V pozdějších fázích se objevuje tachykardie, hypotenze a rozsáhlé periferní otoky (Jogendran et al. 2025).

CHF se rozděluje na:

- a) srdeční selhání se sníženou ejekční frakcí (HF with reduced ejection fraction, HFrEF), kdy je ejekční frakce LV nižší než 40 %
- b) srdeční selhání s mírně sníženou ejekční frakcí (HF with mildly reduced ejection fraction, HFmrEF) s ejekční frakcí LV mezi 41-49 %
- c) srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí (HF with preserved ejection fraction, HFpEF), kdy je ejekční frakce LV > 50 % a dominuje porucha diastolické funkce LV.

U mužů převládá ischemická dysfunkce LV s rozvojem HFrEF, zatímco u žen je častější HFpEF s manifestací v pozdějším věku s více komorbiditami (hypertenze, diabetes, obezita, renální dysfunkce) (Metra and Teerlink 2017; Pfeffer et al. 2019; Bozkurt et al. 2021).

Hypertrofie LV může být dvojího typu: 1) Koncentrická hypertrofie (zvětšení srdeční tkáně bez zvětšení objemu LV) vzniká při zvýšení systémového krevního tlaku. Jako první známka srdeční dysfunkce se objevuje diastolická dysfunkce LV. Později dochází ke koncentrické remodelaci LV, ejekční frakce zůstává zachována - HFpEF. 2) Excentrická hypertrofie (zvětšení objemu srdeční tkáně i objemu komory) vzniká jako následek objemového přetížení, ke kterému dochází např. u obezity, chronického selhání ledvin nebo anemie. Při objemovém přetížení dochází ke ztenčení stěny levé komory a zvětšení jejího objemu a dochází ke snížení ejekční frakce - HFrEF (Messerli 1982).

K rozvoji CHF přispívá mnoho faktorů, včetně genetických predispozic. V posledních desetiletích se projevuje značný vliv civilizačních onemocnění jako je obezita a s ní spojený

metabolický syndrom, diabetes mellitus, hypercholesterolémie. Nejčastější příčinou rozvoje CHF je ischemická choroba srdeční (ISCH), ke které dochází až u 50 % pacientů (Lala and Desai 2014). Dalšími dvěma významnými faktory jsou hypertenze a selhání ledvin (Groenewegen et al. 2020). Při renální dysfunkci nejsou ledviny schopné adekvátně regulovat objem a složení extracelulární tekutiny, což zvyšuje zátěž srdečního svalu a může vést až k CHF. Vzájemnou provázanost systémů, tzv. kardiorenální syndrom, vyjadřuje incidence renálního poškození, která je u pacientů s CHF 40-60 % (Deferrari et al. 2021). Tento vztah funguje i obráceně. U kardiorenálního syndromu 2. typu dochází při primárním CHF k sekundárnímu rozvoji CKD (Di Lullo et al. 2017). Toto onemocnění vzniká v důsledku snížení srdečního výdeje a s tím související aktivací kompenzačních mechanismů jako je RAAS, SNS, ET-1 systém nebo produkce ADH. CHF také narušuje funkci protektivních systémů, zejména systému NO a produkci natriuretických peptidů. Tak dochází k vazokonstrikci, retenci sodíku a vody, zvýšení venózního tlaku a poklesu GFR. Ale dlouhodobá nadměrná aktivace těchto systémů vede k poškození srdečního svalu, orgánové dysfunkci a progresi CHF. Pro zachování stabilní GFR musí ledviny aktivací TGF a RAAS neúměrně snížit RBF. Pokud dojde k dalšímu poklesu RBF, autoregulační kapacita ledviny je vyčerpána. Tyto patofyziologické mechanismy je stále nutné lépe pochopit a nalézt vhodnou cestu k potlačení těchto procesů a tím zmírnit negativní vliv na orgánové funkce a případné nevratné orgánové poškození.

4.2.2.1 Experimentální modely srdečního selhání

Je známa řada zvířecích modelů k výzkumu srdečního selhání, jejichž přehled je sepsán např. v článku Riehle a Bauersachs (2019). V této kapitole stručně zmíním nejběžnější modely CHF a podrobněji se zaměřím na model objemového přetížení, který byl použit ve studiích v této práci.

Ischemický a ischemicko-reperfúzní model CHF lze chirurgicky navodit pomocí trvalého či přechodného podvazu levé koronární tepny a simulovat post-infarktovou etiologii CHF. Na tomto modelu byl prokázán vztah mezi velikostí infarktem zasažené oblasti, post-infarktovou remodelací myokardu, dilatací LV a její dysfunkcí (Pfeffer et al. 1979).

Modelem tlakového přetížení indukovaného transverzální konstrikcí aorty (transverzal aortic constriction, TAC) lze simulovat zatížení srdce při dlouhodobé hypertenzi nebo aortální stenóze, které vede k hypertrofii srdce a rozvoji CHF. Tento model zavedl Rockman a kol.

částečným podvázáním na úrovni ascendentní nebo descendentní aorty (Rockman et al. 1991). Nevýhodou tohoto modelu je okamžitý nárůst afterloadu po TAC oproti dlouhodobému působení vysokého TK nebo vzniku stenózy.

Další možností jsou modely založené na kardiotoxicitě, např. Doxorubicinem-indukované CHF. Doxorubicin je antracyklinové chemoterapeutikum, využívané v onkologii zejména u hematopoetických malignit nebo karcinomu prsu a plic. Doxorubicin je znám svojí pozdní kardiotoxicitou, proto je snaha snížit jeho užívání, ale v některých léčebných schématech má stále svoje místo (Zhang et al. 2024). Po intraperitoneálním nebo intravenózním podání kumulativní dávky doxorubicinu dochází u zvířat k rozvoji CHF s myokardiální atrofií, dilatací obou komor a systolické i diastolické dysfunkci (Hayward and Hydock 2007; Kala et al. 2020).

Chronická β -adrenergní stimulace pomocí izoproterenolu vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu a uvolňování reninu, což vede k rozvoji myokardiální nekrózy a fibrózy podobné srdečnímu infarktu a následně až k dilatovanému kardiomyopatickému CHF (Teerlink et al. 1994; Zhang et al. 2007).

Model objemového přetížení srdce navozený konstrikcí aortálního oblouku sestupné nebo břišní aorty (Rockman 1991, deAlmeida 2010). Tento přístup je poměrně technicky náročný, se značnou variabilitou. Je vhodný jako experimentální model u myších kmenů, kdy nedochází k větším krevním ztrátám ve srovnání s metodou ACF, kterou používáme u laboratorních potkanů.

Model objemového přetížení srdce navozený aorto-kavální píštělí (ACF)

Tento zvířecí model objemového přetížení srdce se v mnoha projevech podobá neléčenému CHF u lidí. Byl zaveden již před více než 40 lety (Hatt et al. 1980) a je doporučován American Heart Association pro výzkum léčebných strategií CHF (Houser et al. 2012). Objemové přetížení je navozeno chirurgickým zásahem, při kterém dojde k vytvoření zkratu mezi abdominální aortou a dolní dutou žílou, tzv. aorto-kavální píštěl (aorto-caval fistula, ACF). Po vytvoření ACF dochází postupně k objemovému přetížení srdce, nárůstu napětí srdeční stěny (wall stress) a zvýšení srdečního výdeje a rozvoji excentrické hypertrofie obou srdečních komor.

Indukce ACF okamžitě vede ke snížení arteriálního tlaku a zvýšení toku venózní krve do pravé komory, což vede k aktivaci kompenzačních neurohumorálních mechanismů jako je

RAAS, SNS, ADH nebo ET-1 prostřednictvím ET_A receptoru. V časně fázi dochází k retenci sodíku a vody. Asi u 20 % zvířat retence vody a solí pokračuje a zvířata brzy umírají na plicní edém a ascites – tzv. dekompenzované CHF. Ale u většiny zvířat následuje zhruba po týdně tzv. kompenzační fáze, díky aktivaci výše zmíněných mechanismů. TK i exkrece sodíku a vody se vrátí na bazální hodnoty a nastává stabilní fáze onemocnění (Winaver et al. 1988; Abassi et al. 2001). Při dlouhodobém působení ale tyto vazokonstrikční a antinatriuretické systémy vedou k maladaptivním změnám a končí dekompenzovaným stavem s vysokou mortalitou (Abassi et al. 2001; Melenovsky et al. 2012).

4.2.3 Léčba hypertenze a srdečního selhání

Prevalence kardiovaskulárních onemocnění se neustále zvyšuje a podle údajů WHO z roku 2019 je jim připisováno téměř 18 milionů úmrtí ročně. Důvodem je nárůst civilizačních chorob a stárnutí populace, protože prevalence kardiovaskulárních onemocnění roste s věkem.

Účinná farmakoterapie hypertenze má velmi často rovněž preventivní vliv na řadu kardiovaskulárních onemocnění nebo zmírňující vliv na již rozvinuté srdeční selhání či renální insuficienci. Tato onemocnění se také velmi často vyskytují společně, proto je snaha o součinnost jednotlivých lékařských odvětví a sjednocení doporučení, které vydala v roce 2018 Evropská hypertenzní společnost (ESH) ve spolupráci s Evropskou kardiologickou společností (ESC) (Williams et al. 2018). V roce 2023 ESH doporučení aktualizovala a byla schválena i Mezinárodní hypertenzní společností (International Society of Hypertension (ISH) a Evropskou renální asociací European Society Association (ERA) (Mancia et al. 2023). ESC vydala nová doporučení v roce 2024 (McEvoy et al. 2024). Důraz byl kladen zejména na prevenci a nefarmakologická opatření a stanovila postupy k určení míry rizika rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Riziko představuje především hypertenze (TK nad 140/90 mmHg pro pacienty s nízkým stupněm ohrožení a 130/80 mmHg u pacientů s přidruženým onemocněním) a dyslipidémie (LDL-C nad 2,6 mmol/l při nízkém ohrožení a 1,4 mmol/l u vysoce rizikových pacientů). Dále se přihlíží k faktorům jako je věk, obezita, kouření a přidružené onemocnění, zejména diabetes mellitus 2. typu a CKD.

Farmakologických možností léčby hypertenze je několik a cílem je snížení hodnot TK pod 130/80 mmHg, u pacientů starších 65 let postačí hodnoty do 140/90 mmHg. V případě pacientů s mírnou hypertenzí bez dalších komplikací je vhodné zahájit léčbu monoterapií. Ale u většiny

hypertoniků se doporučuje zahájit terapii kombinací blokády RAAS systému, tedy ACEi nebo blokátory AT₁R (ARB, tzv. „sartany“) spolu s blokátorem kalciových kanálů (BKK) nebo diuretikem (thiazidové nebo thiazidu podobné). Pokud u dvojkombinace léků nedojde k dostatečnému snížení TK ani při použití maximální doporučené a tolerované dávky, přistupuje se k trojkombinaci ACEi nebo sartany + BKK + diuretikum. U rezistentní hypertenze se užívá zmíněná trojkombinace spolu se spironolaktonem (draslík šetřící diuretikum) nebo alfa či beta blokátorem nebo se přidává další diuretikum. Blokátory β -adrenergních receptorů (β -AR) by měly být preferenčně použity u pacientů s HFrEF, s fibrilací síní nebo ISCH. U rezistentní hypertenze, kde nepomáhá farmakologická léčba může být přistoupeno k léčbě pomocí renální denervace, ovšem její využití v klinické praxi je stále diskutováno pro rozporuplné výsledky, což může být dáno i nevhodným výběrem pacientů.

Hlavním závěrem nových doporučení pro léčbu srdečního selhání je, že jeho rozvoj je výrazně zpomalen snížením TK a všechny hlavní skupiny antihypertenziv je možné u pacientů s CHF a hypertenzí k tomuto účelu použít. Nicméně např. u pacientů, kteří již mají klinicky manifestované HFrEF není zvýšený TK hlavní problém. V tomto případě se doporučují čtyři lékové skupiny: ACEi nebo ARNI (kombinovaný inhibitor neprylizinu a AT₁R), blokátory β -AR, steroidní antagonisté mineralokortikoidních receptorů (MR) a inhibitory sodíko-glukózového transporteru 2 (SGLT2i) u pacientů s diabetes mellitus ale i bez něj. Ke snížení kongesce jsou používána diuretika. S výjimkou ARNI a inhibitorů SGLT2 jsou tyto léky doporučovány i pro léčbu hypertenze. U pacientů s HFpEF je hypertenze nejčastější příčinou a komorbiditou rozvoje HF, stejně jako v případě ISCH, proto je postup léčby stejný jako u hypertoniků. Nemocným se zvýšenou srdeční frekvencí (nad 70 tepů/min), kteří mají kontraindikovány beta-blokátory nebo již užívají maximální dávky se doporučuje přidat ivabradin, tzn. inhibitor sinusového uzlu.

U pacientů s CKD jsou lékem první volby ACE inhibitory nebo sartany, v maximálních tolerovaných dávkách pro optimální nefroprotektci. Kombinace obou léků se nedoporučuje, kvůli zvýšenému riziku nežádoucích účinků (hypotenze, hyperkalémie nebo zhoršení renálních funkcí). Dosažení cílových hodnot obvykle vyžaduje kombinační terapii blokátoru RAAS + BKK nebo diuretika thiazidového typu. Použití RAAS blokátorů zvyšuje riziko hyperkalémie, čemuž lze ve většině případů zabránit podáním thiazidového diuretika nebo při výrazně zvýšené renální funkci kličkového diuretika furosemidu. Další možností kombinace ACEi či sartanů je s inhibitory SGLT2. Ty byly představeny jako perorální antidiabetikum, které inhibuje renální reabsorpci glukózy, ale má i významné renoprotektivní účinky. Jako prospěšné bylo potvrzeno

také přidání steroidního antagonisty MR (spironolakton, eplerenon), ale zde je třeba sledovat riziko hyperkalémie. U nesteroidního inhibitoru MR (finerenon) bylo toto riziko výrazně menší.

(Williams et al. 2018; Mancina et al. 2023; McEvoy et al. 2024)

U některých pacientů ale současná farmakologická léčba nemá dostatečný účinek nebo u nich dochází k projevu nežádoucích vedlejších účinků, proto je zapotřebí vyvíjet nové farmakologické i nefarmakologické terapie.

Novou cestou léčby kardiovaskulárních a renálních onemocnění by mohlo být využití protektivního působení EETs, na které jsem zaměřila se své disertační práci. Jednou z možností je podání jejich orálně aktivního analogu, který nebude tak rychle degradován působením sEH. Skupinou profesora JR. Falcka bylo vytvořeno několik typů analogů EETs, jejichž terapeutický potenciál byl potvrzen v řadě preklinických studiích na zvířecích modelech (Khan et al. 2014a, b; Falck et al. 2014; Jíchová et al. 2016b; Neckář et al. 2018; Imig et al. 2021). Další variantou by mohlo být zvýšení dostupnosti endogenních EETs pomocí inhibitoru sEH (Honetschlägerová et al. 2011b; Kujal et al. 2014; Červenka et al. 2018; Imig 2018), jehož prospěšný vliv na rozvoj CKD a CHF jsem studovala v rámci své disertační práce (Vacková et al. 2019b).

5 Cíle disertační práce

V rámci své disertační práce jsem se zabývala úlohou různých vazoaktivních systémů na modelu CKD a CHF způsobeným objemovým přetížením u potkanů se spontánní nebo indukovanou hypertenzí a přidruženým renálním poškozením. A také změnami v renální vaskulární reaktivitě souvisejícími s rozvojem renálního a srdečního poškození.

Dále jsem studovala vliv protektivních EETs na rozvoj renálního a srdečního poškození za využití inhibitoru sEH na modelech laboratorních potkanů s CKD a CHF jako možného nového přístupu v prevenci a léčbě těchto onemocnění.

Nakonec jsem se zaměřila na změny v citlivosti na vazoaktivní látky u modelu CKD a CHF, vzhledem k možnosti, že by tato zvýšená citlivost mohla hrát roli v rozvoji zmíněných onemocnění.

V následujících studiích jsem ověřovala tyto **hypotézy**:

- 1) Nadměrná aktivace RAAS hraje klíčovou úlohu v progresi orgánového poškození a významně ovlivňuje další, zejména protektivní systémy při rozvoji CKD a CHF.
- 2) Inhibice sEH zmírní rozvoj CKD a CHF způsobeného objemovým přetížením u potkanů s geneticky podmíněným rozvojem hypertenze a CKD.
- 3) Zvýšená citlivost na vazoaktivní látky u modelů CKD a CHF hraje významnou roli v rozvoji těchto onemocnění.

6 Experimentální část

Všechny experimentální studie byly posouzeny odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat IKEM a provedeny na základě projektů pokusů schválených rezortní odbornou komisí MZd ČR. Výsledky našich studií byly prezentovány odborné veřejnosti a publikovány v odborných impaktovaných časopisech.

6.1 Studie 1: Progrese hypertenze a CKD v závislosti na věku u FHH potkanů – úloha zvýšené aktivity RAAS a snížené dostupnosti protektivních vasoaktivních látek NO a EETs

6.1.1 Hlavní cíle Studie 1

Cílem této studie bylo sledovat výši TK u bdělých zvířat a stupeň poškození ledvin v průběhu dospívání zvířat a stanovení aktivity RAAS, systému NO a vazodilatačních eikosanoidů (EETs) u tohoto modelu.

6.1.2 Metody Studie 1

6.1.2.1 Zvířata

Tato studie byla provedena jen na samcích potkanů kmene FHH a FHL. Zvířata původem z chovného zařízení UMC Groningen v Holandsku byla chována v Centru experimentální medicíny IKEM za standardních podmínek 12 hod světlo : 12 hod tma. Zvířata měla volný přístup k pitné vodě a standardnímu krmivu (0,45 % NaCl, 19-21% bílkovin; SEMED, Česká republika).

6.1.2.2 Průběh experimentu

V první sérii jsme sledovali stupeň mortality u FHH potkanů ($n = 20$) od narození do 18-ti měsíců věku v důsledku rozvoje CKD v porovnání s FHL kmenem ($n = 20$), u kterého je mírnější progresa renálního poškození pozorována až u starých zvířat.

V druhé sérii byly zvířatům implantovány radiotelemetrické sondy umožňující kontinuální měření arteriálního krevního tlaku u bdělých zvířat. Vzhledem k technickým limitacím radiotelemetrického systému nebylo možné kontinuálně měřit zvířata od 3 do 12 měsíců věku, proto byla zvířata rozdělena podle věku a sondy implantovány u jednotlivých skupin zvlášť týden před samotným měřením.

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. FHL - 3 měsíce ($n = 6$) | 5. FHH – 3 měsíce ($n = 6$) |
| 2. FHL - 6 měsíců ($n = 8$) | 6. FHH - 6 měsíců ($n = 8$) |
| 3. FHL - 9 měsíců ($n = 8$) | 7. FHH - 9 měsíců ($n = 8$) |
| 4. FHL - 12 měsíců ($n = 8$) | 8. FHH - 12 měsíců ($n = 7$) |

Zvířata byla během měření umístěna do metabolických klecí (MK) za účelem 24-hodinového sběru moče pro následné stanovení proteinurie a vyhodnocení polyurie a polydipsie. Po 2 týdnech záznamu byl experiment ukončen, zvířata usmrcena dekapitací a byly odebrány vzorky plazmy a ledvin pro biochemické a histologické analýzy.

Do třetí série byli potkani vybráni na základě výsledků z druhé série - mladí FHH potkani v prehypertenzním období ve věku 3 měsíců a dospělí FHH potkani ve věku 9 měsíců s již rozvinutou hypertenzí a renálním poškozením a věkově odpovídající FHL jako kontrola.

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. FHL - 3 měsíce ($n = 6$) | 3. FHH - 3 měsíce ($n = 6$) |
| 2. FHL - 9 měsíců ($n = 6$) | 4. FHH – 9 měsíců ($n = 7$) |

Zvířatům byly opět implantovány radiotelemetrické sondy a po týdenním zotavení byl zahájen záznam bazálních hodnot. Po dvou dnech záznamu byla zvířata po dobu 28 dní léčena duální blokádou RAAS v pitné vodě – inhibitorem ACE (ACEi; perindopril, Servier Laboratories, Francie; v dávce 5 mg/kg/den) a blokátorem AT₁ receptoru (ARB; losartan, Zentiva, Slovensko; v dávce 50 mg/kg/den), abychom dosáhli maximální blokády RAAS. Na konci experimentu byla zvířata usmrcena dekapitací a byly odebrány vzorky plazmy a ledvin pro biochemické analýzy.

Ve čtvrté sérii byl proveden akutní vaskulární experiment u stejných skupin jako v předchozí sérii a byly sledovány okamžité odpovědi MAP a RBF po intravenózním podání vazoaktivních látek. Po ukončení měření byla zvířata usmrcena předávkováním anestetikem.

1. FHL - 3 měsíce (n = 7)

3. FHH - 3 měsíce (n = 8)

2. FHL - 9 měsíců (n = 8)

4. FHH – 9 měsíců (n = 7)

6.1.2.3 Operační metody

Měření krevního tlaku pomocí telemetrických sond

Zvířata byla uvedena do celkové anestezie intramuskulárním podáním kombinace tiletaminu a zolazepamu v dávce 8 mg/kg (Zoletil 100, Virbac SA, Carros Cedex, Francie) a xylazinu v dávce 4 mg/kg (Rometar, Spofa, ČR). Podélným řezem vedeným středovou linií v abdominální oblasti byla otevřena břišní dutina, zpřístupněna břišní aorta a během krátkého uzavření byl do aorty zasunut katetr radiotelemetrické sondy (TA11PA-C40, Data Science International, USA), zafixován tkáňovým lepidlem (Histoacryl® B.Braun Surgical, Španělsko) a tělo sondy připevněno ke stěně břišní dutiny (Sasser et al. 2002; Doleželová et al. 2016).

Metodika měření vaskulární reaktivity

Zvířata ve věku 3 nebo 9 měsíců byla uvedena do celkové anestezie intraperitoneálním podáním pentobarbitalu (Thiopental 0,5 g VUAB Pharma, ČR v dávce 50-80 mg/kg). Pro zajištění volného dýchání byla provedena tracheostomie. Pravá jugulární žíla byla katetrizována katetrem PE-50 pro infúzi 2% roztoku albuminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) rychlostí 1,2 ml/hod, aplikaci vazoaktivních látek a dodatečnou administraci anestetik. Do pravé femorální arterie byl zaveden katetr PE -50 připojený přes tlakový převodník k systému Power Lab/ 4S (ADI instrument, UK), pro monitorování krevního tlaku během pokusu. Na levou renální arterii byla nasazena sonda pro měření RBF (TS420, Transonic system Inc., Ithaca, USA). Po postoperační ekvilibraci (45 min) byl zvířeti podán bolus vazoaktivní látky o objemu 0,2 ml a zbytek roztoku v katetru byl ihned spláchnut 0,2 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl, B.Braun, Meisungen, Německo). V průběhu měření byly zaznamenány maximální změny MAP a RBF. Po návratu sledovaných parametrů na původní hodnoty (10-15 min) byl podán 2. bolus s vyšší dávkou testované látky. Tento postup byl opakován dle rozpisu: Ang II a NA - 65 a 300 ng/ kg; ACh - 150 a 650 ng/kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Pokus byl ukončen předávkováním zvířete anestetikem (Vacková et al. 2019a).

6.1.2.4 Biochemické a histologické metody

Histologické zpracování ledvin a zhodnocení glomerulosklerózy

Po ukončení experimentu byly odebrány vzorky ledvin na histologické zpracování. Na preparátech byla zhodnocena glomeruloskleróza a hyalinóza (zánik glomerulu hyalinní přeměnou) při 400-násobném zvětšení a podle míry poškození byl vypočítán glomerulosklerotický index (GSI) a index tubuluintersticiálního poškození (TSI) (Nakano et al. 2008; Kujal et al. 2014; Čertíková Chábová et al. 2018).

Stanovení proteinurie

Množství proteinu v moči zvířat bylo stanoveno ze vzorku 24 hodinového sběru moči u bdělých zvířat umístěných v metabolických klecích pomocí komerčního kitu na principu biuretové reakce (Lachema, Brno, Česká Republika).

Stanovení Ang II

Bezprostředně po dekapitaci byla odebrána polovina ledviny, zpracována a přečištěna dle postupu, který byl detailně popsán v našich dřívějších studiích (Čertíková Chábová et al. 2018; Kratky et al. 2018). Pro měření nestabilních angiotensinů byl použit komerční kit využívající radioimunologickou metodu (radioimmunoassay, RIA) s Ang II značeným radioaktivním izotopem jodu (^{125}I) (EURIA-Angiotensin II RIA kit, Euria-Diagnostika AB, Malmö, Švédsko).

Stanovení Ang 1-7

Příprava vzorku pro měření koncentrace Ang 1-7 v plazmě a v ledvině byla obdobná jako v případě měření Ang II. Detailně je postup popsán v našich dřívějších studiích (Čertíková Chábová et al. 2018; Kratky et al. 2018). Stanovení Ang 1-7 bylo provedeno komerčním RIA kitem využívajícím radioaktivně značeného Ang 1-7 (^{125}I -angiotensin 1-7, SoluPharm, Brno, Česká republika).

Stanovení EETs a HETE

Vzorky tkání byly ihned po odběru zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do zpracování a spektrometrického změření obsahu EETs a HETE metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) v laboratoři Lipidomix (Berlín, Německo) (Rivera et al. 2004; Čertíková Chábová et al. 2018).

Stanovení aktivity NOS

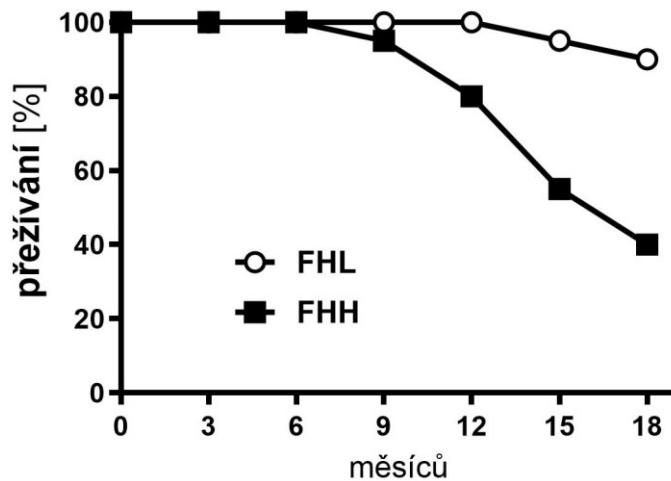
Vzorky byly ihned po odebrání zamraženy v tekutém dusíku a skladovány v - 80°C. Před stanovením byly extrahovány - homogenizací s inhibitory proteáz (viz stanovení Ang II) a aktivita NOS v ledvině byla stanovena RIA metodou komerčním kitem (Cayman Chemical, Michigan, USA) využívající princip konverze radioaktivně značeného L-argininu na L-citrulin působením NOS.

6.1.2.5 Statistické zpracování výsledků

Všechny výsledky byly vyjádřeny jako průměrná hodnota $\pm$ střední chyba průměru (standard error of mean, SEM). Jako statistická analýza byla použita jednocestná analýza (one-way ANOVA) a dvoucestná opakovací analýza (two-way ANOVA) s následnými srovnávacími testy - Wilcoxonův test pro nepárová data, Tukeyho srovnávací test, Newman-Keulsův test. Pro přežívací křivku byl použit Mantel-Coxův test a Gehan-Breslow-Wilcoxonův test v programu Graph pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Za statisticky významné byly považovány výsledky, které překročily 95 % hranici pravděpodobnosti ($P < 0,05$).

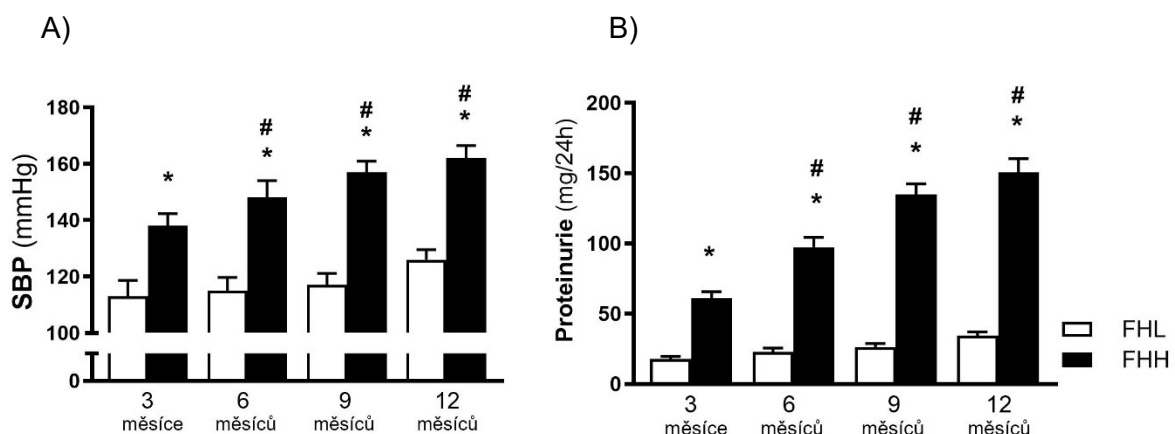
6.1.3 Výsledky Studie 1

Jako první byla provedena základní charakterizace tohoto modelu CKD v našich laboratorních podmínkách a zhodnocena mortalita zvířat až do 18 měsíců věku (graf 1). Od 12-ti měsíců u FHH potkanů výrazně vzrostla mortalita oproti FHL. Ve 12-ti měsících byla mortalita FHH potkanů do 20 %, ale v 18-ti měsících dosáhla 60%. Z tohoto důvodu byla studie navržena do 12 měsíců věku i s ohledem na welfare zvířat. U FHL potkanů přežilo do 18-ti měsíců 90 % zvířat.



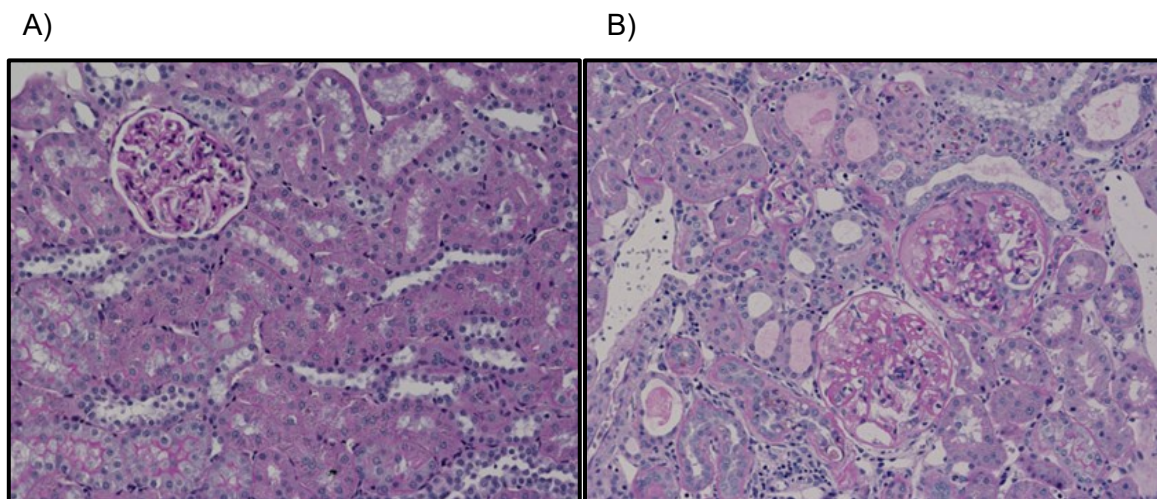
Graf 1: Přezívací křivka FHH a FHL potkanů do 18-ti měsíců věku

Graf 2A ukazuje radiotelemetrické měření SBP u zvířat z druhé série pokusů. Ve všech věkových kategoriích (3, 6, 9 a 12 měsíců) se potvrdilo významné zvýšení SBP u FHH potkanů (ze 138 ± 4 mmHg až na 162 ± 5 mmHg) oproti FHL, kteří zůstali po celou dobu měření v normotenzním rozmezí (113 ± 6 až 126 ± 4 mmHg). Nárůst tlaku byl u FHH potkanů doprovázen rozvojem výrazné proteinurie (graf 2B) ve srovnání s FHL potkany, kteří vykazovali až do dospělosti pouze mírnou proteinurii. U 12-ti měsíčních FHH potkanů byla pozorována také výrazná polydipsie, polyurie a častá hematurie.

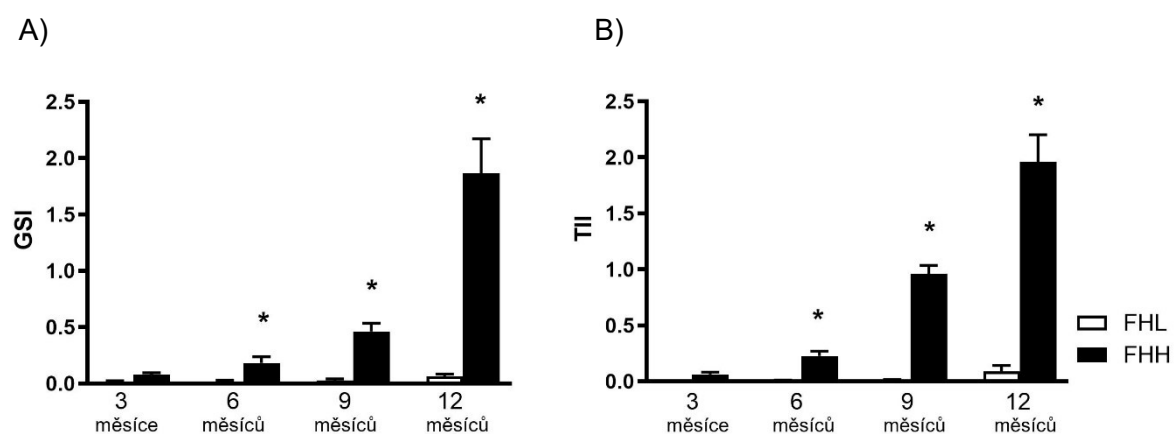


Graf 2: **Systolický tlak krve (SBP)** měřený pomocí radiotelemetrických sond (A) a hodnoty **proteinurie** (B) u FHH a FHL potkanů ve věku 3, 6, 9 a 12 měsíců. * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 měsíce

Poškození ledvin bylo zhodnoceno na histologických preparátech ledvin odebraných ve druhé sérii (obr. 10) stanovením GSI a TII (graf 3). Výsledky u FHH potkanů potvrdily rozvoj CKD závislý na věku zvířat, zatímco normotenzní FHL potkani zůstali v průběhu stárnutí značně rezistentní vůči renálnímu poškození.

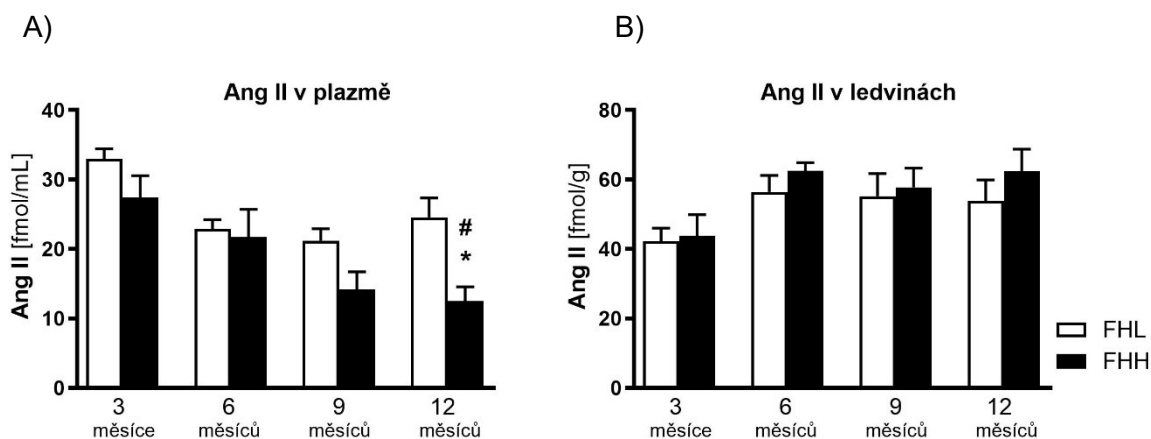


Obr. 10: Histologický preparát zachycující glomerulus v kůře ledvin u 12 měsíců starého FHH potkana (B) ve srovnání se stejně starým FHL (A). Barveno metodou PAS, zvětšení 200x.

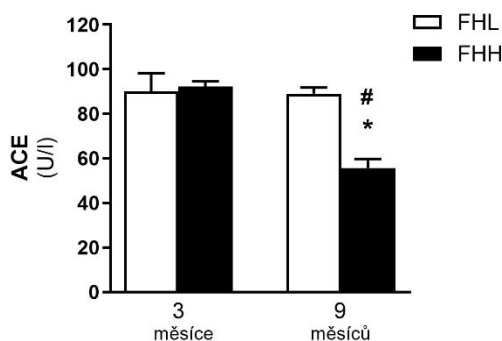


Graf 3: Rozvoj renálního poškození v průběhu stárnutí zvířat vyjádřený pomocí glomerulosklerotického (GSI; A) a tubulointerstiálního indexu (TII; B), * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří

Plazma a ledviny z druhé série byly použity také k měření koncentrace Ang II (graf 4), které ukázalo signifikantně snížené plazmatické hladiny Ang II u dospělých FHH, ale žádné významné změny v renální koncentraci Ang II oproti FHL. Aktivita ACE v séru byla z důvodu nedostatku tkáně změřena na vzorcích ze třetí série, proto srovnáváme jen 3 a 9 měsíců staré FHH a FHL. Dospělí FHH potkani měli aktivitu ACE signifikantně sníženou oproti stejně starým FHL (graf 5).



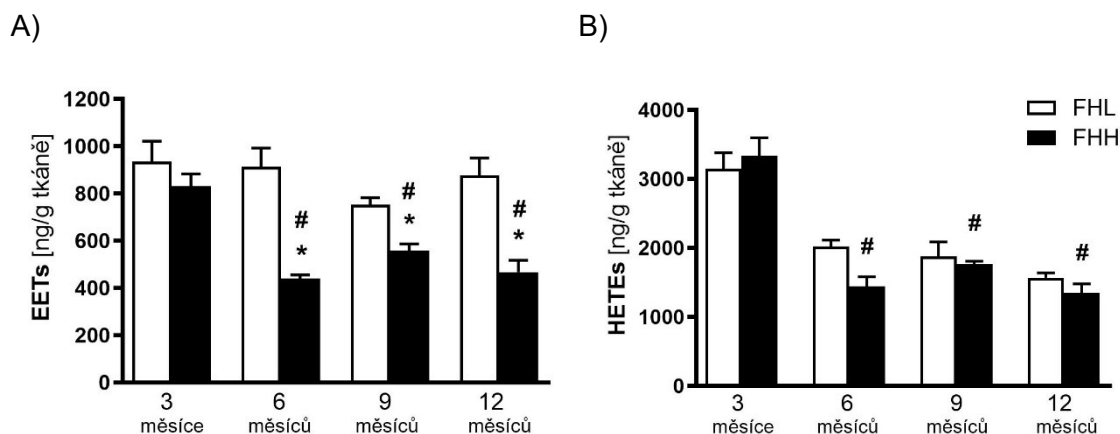
Graf 4: **Koncentrace Ang II** v plazmě (A) a v ledvině (B) u FHH a FHL potkanů ve věku 3, 6, 9 a 12 měsíců. * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 měsíce.



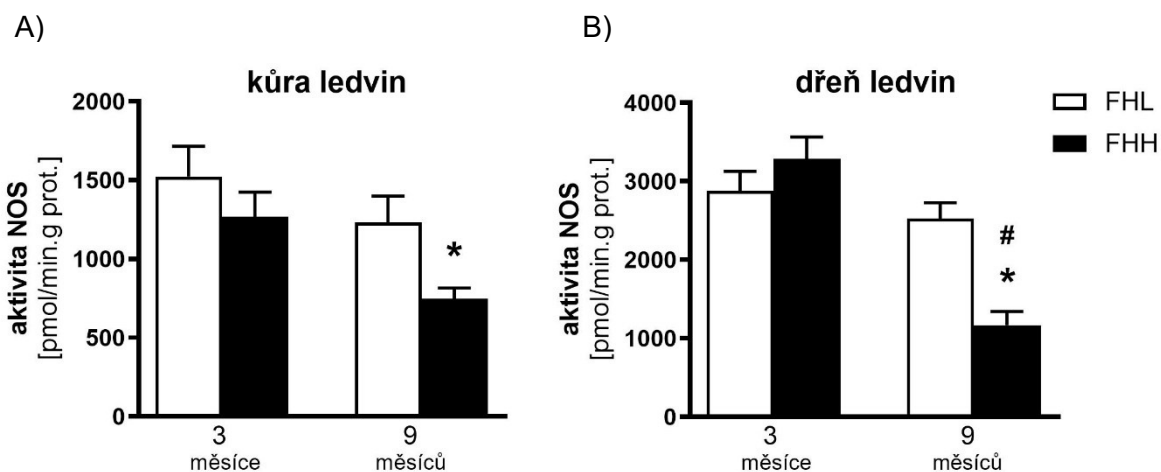
Graf 5: **Aktivita ACE** v séru u mladých a dospělých FHH a FHL potkanů. * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 měsíce.

Dále jsme stanovili koncentraci protektivních EETs v ledvinách, která byla u FHH potkanů již v 6-ti měsících významně snížena oproti FHL, u nichž hladiny EETs zůstaly nezměněny (graf 6-A). Mezi skupinami nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v renální koncentraci HETEs, ale u obou skupin hladiny HETEs s věkem klesaly (graf 6-B).

Graf 7 ukazuje aktivitu NOS u 3 a 9 měsíců starých FHH a FHL stanovenou ve vzorcích ze třetí série, která se u mladých FHH a FHL potkanů nelišila, ale u 9 měsíců starých FHH potkanů byla již signifikantně snížena jak v kůře, tak dřeni ledvin oproti stejně starým FHL.

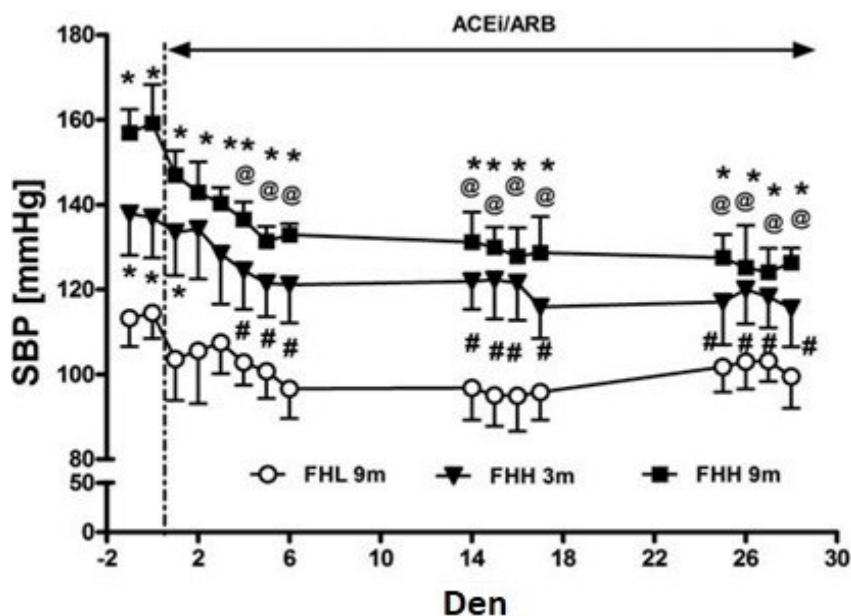


Graf 6: **Koncentrace EETs (A) a HETEs (B) v ledvině FHH a FHL potkanů ve věku 3, 6, 9 a 12 měsíců.** * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 měsíce



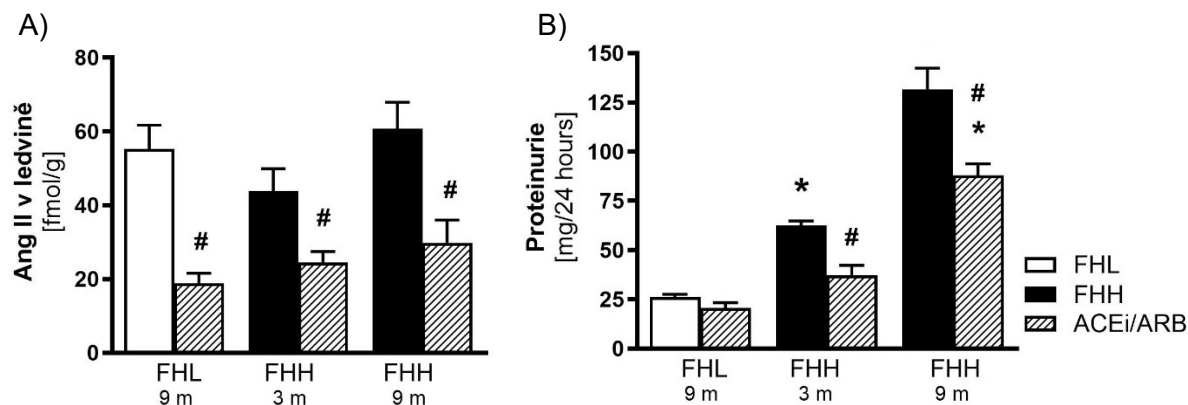
Graf 7: **Aktivita NO syntázy v kůře (A) a dřeni (B) ledvin u mladých a dospělých FHH a FHL potkanů.** * $P < 0,05$ vs. FHL stejného stáří, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 měsíce

Ve třetí sérii jsme sledovali kombinovanou blokádu RAAS s využitím ACEi a ARB, která vedla u 3 měsíčních FHH k významnému snížení SBP (ze 137 ± 9 mmHg na 116 ± 8 mmHg, $P < 0,05$) a tento pokles byl ještě výraznější u 9 měsíců starých FHH (ze 159 ± 8 mmHg na 126 ± 4 mmHg, $P < 0,001$). Ale tato duální blokáda RAAS nesnížila hodnoty SBP u FHH potkanů až na úroveň stejně starých FHL kontrol (graf 8). Kombinovaná terapie nebyla testována u 12-ti měsíčních FHH vzhledem k jejich zvýšené mortalitě.

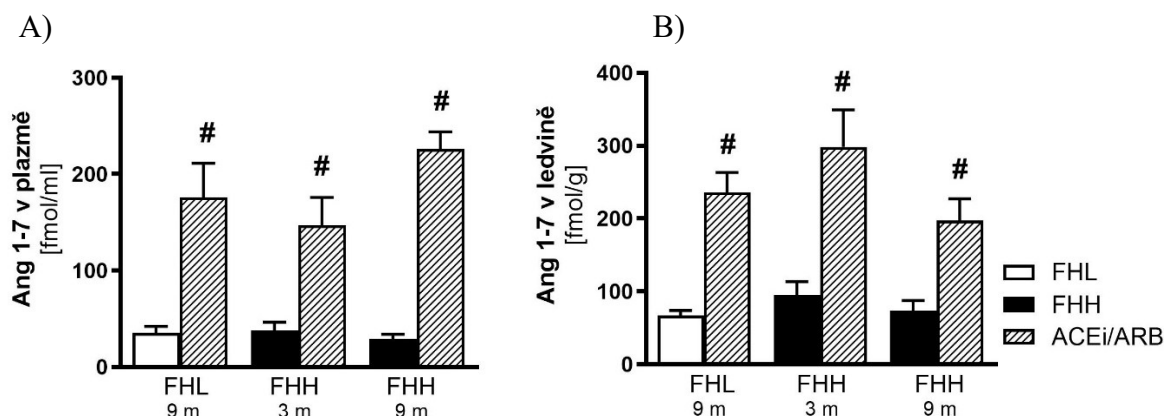


Graf 8: Vliv kombinované léčby pomocí ACE inhibitoru (ACEi) a blokátoru AT_1 receptoru (ARB) na systolický tlak krve (SBP) u mladých (3 měsíce) a dospělých (9 měsíců) FHH ve srovnání s dospělými FHL. Křivka pro mladé i dospělé FHL měla velmi podobný průběh, proto je v grafu pro přehlednost znázorněna pouze křivka starších FHL. * $P < 0,05$ vs. FHL, # $P < 0,05$ vs. bazální SBP, @ $P < 0,001$ vs. bazální SBP.

Bazální hladiny Ang II se mezi FHH a FHL významně nelišily a blokáda RAAS signifikantně snížila renální koncentraci Ang II u obou kmenů (graf 9-A). Inhibice RAAS vedla také k signifikantnímu snížení proteinurie u FHH potkanů (graf 9-B), přesto hodnoty zůstaly signifikantně vyšší oproti FHL kontrole. Dále blokáda RAAS významně zvýšila hladiny protektivního Ang 1-7 v plazmě i v ledvině u obou kmenů (graf 10)



Graf 9: Vliv kombinované léčby pomocí ACE inhibitoru (ACEi) a blokátoru AT_1 receptoru (ARB) na hladiny Ang II v ledvině (A) a hodnoty proteinurie (B) u mladých a dospělých FHH potkanů ve srovnání s dospělými FHL kontrolami. * $P < 0,05$ vs. FHL, # $P < 0,05$ vs. odpovídající neléčená skupina



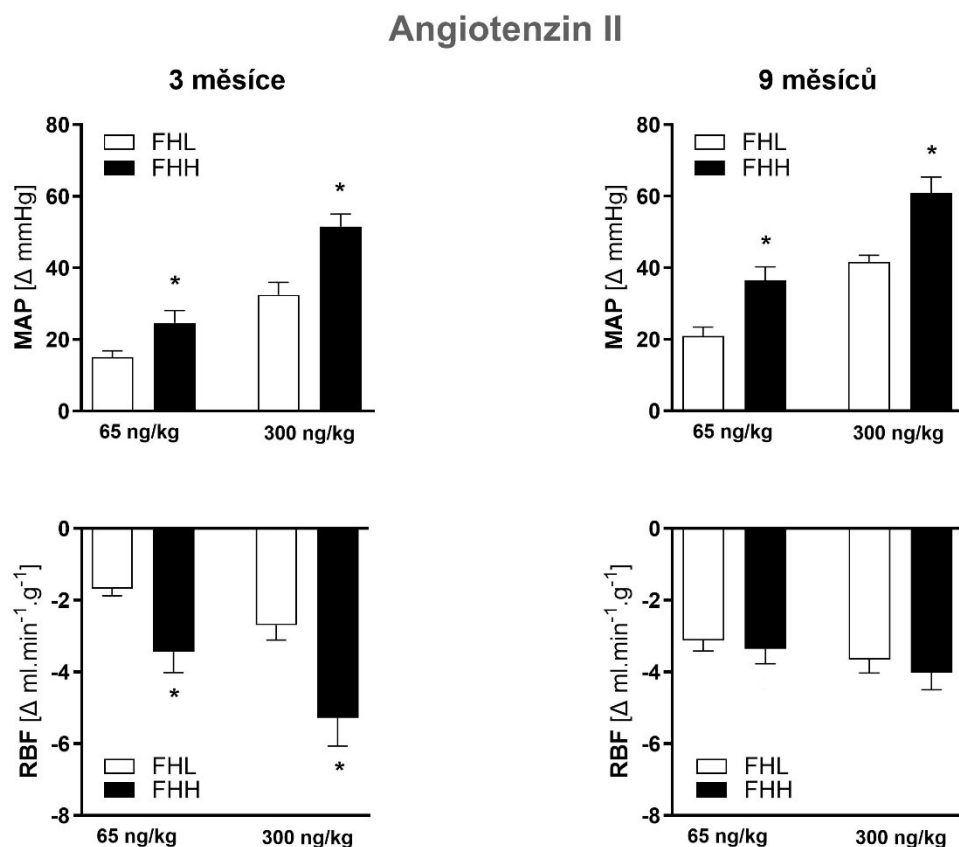
Graf 10: Vliv kombinované léčby pomocí ACE inhibitoru (ACEi) a blokátoru AT_1 receptoru (ARB) na hladiny Ang 1-7 v plazmě (A) a v ledvině (B) u mladých a dospělých FHH potkanů ve srovnání s dospělými FHL kontrolami. # $P < 0,05$ vs. odpovídající neléčená skupina

Ve čtvrté sérii experimentů, které byly zaměřeny na vaskulární reaktivitu u 3 a 9 měsíců starých FHH a FHL potkanů, byla měřena citlivost na intravenózní podání vazoaktivních látek. V tabulce 1 jsou uvedeny bazální hodnoty MAP, RBF a RVR z akutních experimentů před vlastním podáním vazoaktivních látek pro porovnání bazálních hodnot mezi jednotlivými experimentálními skupinami zvířat. Hodnoty RBF byly u mladých FHH potkanů signifikantně vyšší oproti stejně starým FHL ($8,2 \pm 0,6$ vs. $4,8 \pm 0,5$ ml.min⁻¹.g⁻¹, $P < 0,05$). Mladí FHH měli také signifikantně sníženou RVR ve srovnání s FHL kontrolami (15 ± 1 vs. 21 ± 1 mmHg.ml⁻¹.min⁻¹.g⁻¹, $P < 0,05$). Hypertenzní FHH potkani se v hodnotách RBF od kontrolní skupiny významně nelišili ($4,4 \pm 0,5$ vs. $5,7 \pm 0,4$ ml.min⁻¹.g⁻¹, $P < 0,05$), ale měli signifikantně zvýšenou RVR ve srovnání s normotenzními FHL (34 ± 3 vs. 20 ± 2 mmHg.ml⁻¹.min⁻¹.g⁻¹, $P < 0,05$).

	bazální MAP (mmHg)	bazální RBF (ml.min ⁻¹ .g ⁻¹)	bazální RVR (mmHg.ml ⁻¹ .min ⁻¹ .g ⁻¹)
FHL 3 m	101 ± 2	$4,8 \pm 0,5$	21 ± 1
FHH 3 m	124 ± 3 *	$8,2 \pm 0,6$ *	15 ± 1 *
FHL 9 m	101 ± 3	$5,7 \pm 0,4$	20 ± 2
FHH 9 m	141 ± 4 *#	$4,4 \pm 0,5$ #	34 ± 3 *#

Tabulka 1: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP), průtoku krve ledvinou (RBF) a renální vaskulární rezistence (RVR) u mladých (3 měsíce) a dospělých (9 měsíců) FHL a FHH potkanů v anestezii. Průměrné hodnoty $\pm$ SEM, * $P < 0,05$ vs. stejně staří FHL, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 m

Graf 11 ukazuje porovnání akutní odpovědi MAP a RBF na intravenózní podání Ang II u anestezizovaných zvířat. Mladí FHH potkani měli signifikantně větší změnu MAP i RBF po podání Ang II ve srovnání se stejně starými FHL kontrolami. Dospělí FHH potkani měli také zvýšenou odpověď MAP po podání Ang II, ale pokles RBF byl u nich srovnatelný s FHL kontrolami. Tyto změny byly doprovázeny významným zvýšením RVR u FHH potkanů ve srovnání s FHL (tabulka 2).

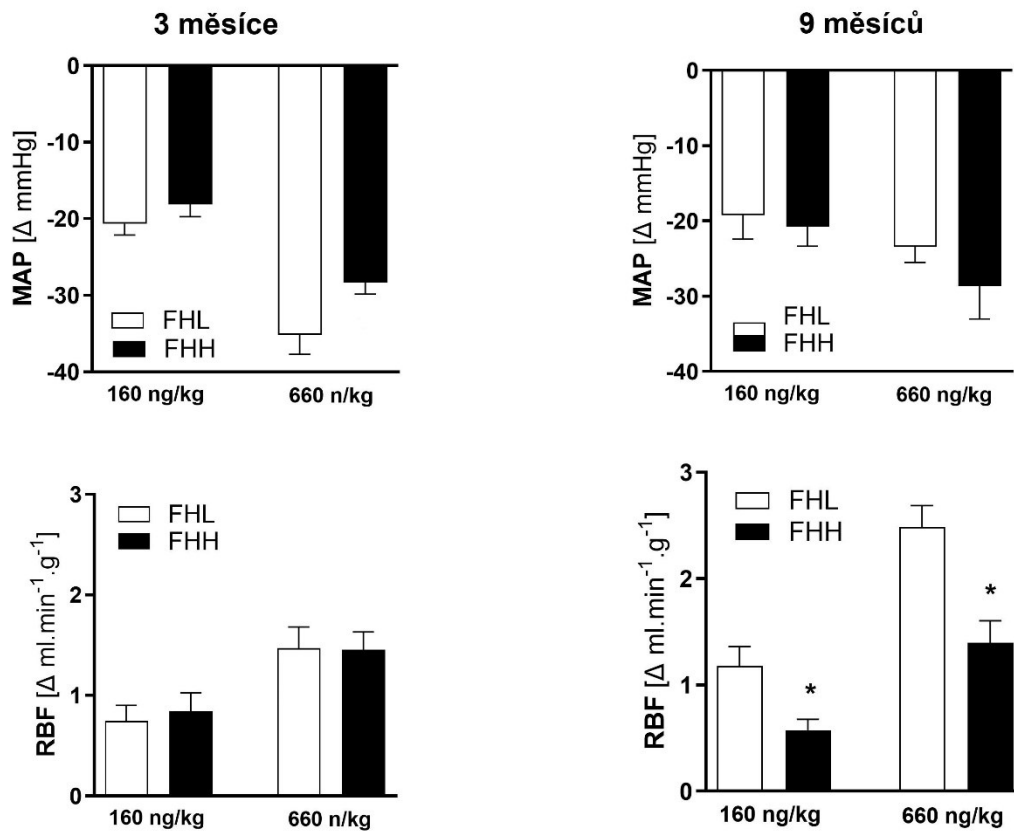


Graf 11: Systémová (MAP) a renální vaskulární (RBF) odpověď po intravenózním podání angiotenzinu II (Ang II) u mladých (A) a dospělých FHH potkanů (B) ve srovnání se stejně starými FHL kontrolami. * $P < 0,05$ vs. stejně starí FHL

Odpovědi MAP a RBF po intravenózním podání NA se u mladých ani dospělých FHH potkanů významně nelišily od stejně starých FHL kontrol (data nejsou graficky znázorněna).

Změny v MAP po podání ACh se u FHH a FHL potkanů významně nelišily. Ale u dospělých FHH potkanů vedlo podání ACh k signifikantně menšímu vzestupu RBF ve srovnání s FHL kontrolami (graf 12), který byl doprovázen signifikantně menší změnou RVR (tab. 2), což naznačuje rozvoj endoteliální dysfunkce v ledvinách u starších FHH potkanů.

Acetylcholin



Graf 12: Systémová (MAP) a renální vaskulární odpověď (RBF) po intravenózním podání acetylcholinu (ACh) u mladých (A) a dospělých FHH potkanů (B) ve srovnání se stejně starými FHL kontrolami. * $P < 0,05$ vs. stejně staří FHL

RVR	Ang II (65 ng / kg)	Ang II (300 ng / kg)	ACh (150 ng / kg)	ACh (650 ng / kg)
FHL 3 m	79 ± 8	211 ± 23	-31 ± 2	-48 ± 4
FHH 3 m	119 ± 15 *	336 ± 21 *	-26 ± 2	-39 ± 3
FHL 9 m	92 ± 15	279 ± 26	-29 ± 2	-45 ± 2
FHH 9 m	197 ± 22 *#	524 ± 43 *#	-18 ± 3 *	-27 ± 4 *

Tabulka 2: Relativní (%) změna renální vaskulární rezistence (RVR) po intravenózním podání angiotenzinu II (Ang II) a acetylcholinu (ACh) u mladých (3 měsíce) a dospělých (9 měsíců) FHH a FHL potkanů. Průměrné hodnoty ± SEM, * $P < 0,05$ vs. stejně staří FHL, # $P < 0,05$ vs. FHH 3 m

6.1.4 Diskuze ke Studii 1

Fawn-Hooded potkani jsou unikátním genetickým modelem hypertenze spojené s rozvojem výrazného renálního poškození, které vede k předčasné mortalitě těchto zvířat. Tato studie detailně popisuje postupný rozvoj hypertenze a poškození ledvin a výsledky naznačují souvislost mezi nárůstem arteriální hypertenze a rozvojem CKD, které bylo charakterizováno postupným zhoršováním proteinurie, orgánového poškození ledvin - glomerulosklerózy a tubulointersticiálního poškození v průběhu stárnutí těchto zvířat. Naším hlavním cílem bylo zaměřit se na charakterizaci patogenetických a protektivních mechanismů u tohoto modelu a popsat tyto komplexní mechanismy přímo ovlivňující rozvoj onemocnění u FHH potkanů. Zaměřili jsme se zejména na roli RAAS v rozvoji hypertenze a poškození ledvin, protože u tohoto modelu nebyly dosud známy žádné informace o změnách renálních a plazmatických koncentrací Ang II v průběhu stárnutí stejně jako o aktivitě významných komponent RAAS.

Tato studie prokázala, že koncentrace cirkulujícího i renálního Ang II se v průběhu života FHH potkanů relativně nemění a je srovnatelná s FHL kontrolami až do 1 roku života, což by naznačovalo, že RAAS nehraje tak významnou roli v patogenezi hypertenze a CKD u tohoto modelu. Ale na druhou stranu systémová i renální vaskulární reaktivita po podání exogenního Ang II byla u FHH potkanů zvýšená, zejména u mladých FHH. To by mohlo ukazovat na zvýšenou aktivitu na úrovni intracelulární signalizace zahrnující aktivaci AT_1 receptorů. Studie na izolované perfundované ledvině Fawn-Hooded potkanů sice pozorovala sníženou reaktivitu preglomerulárních arteriol na Ang II (van Rodijnen et al. 2002), ale na druhou stranu je nutné dodat, že odpověď izolovaných arteriol se může výrazně lišit od vaskulární rezistence celé ledviny při systémovém podání, jako bylo provedeno v našem experimentu. Navíc výše zmiňovaná studie pozorovala sníženou reaktivitu na Ang II i sníženou tlakem indukovanou odpověď a to nejen u hypertenzních, ale i u normotenzních Fawn-Hooded potkanů ve srovnání s Wistar potkany. Další studie zase ukazují na porušenou myogenní odpověď FHH ve srovnání s FHL (Van Dokkum et al. 1999b, a; Vavrínek et al. 2013). Také v přehledné práci Harrison et al. (2021) autoři zmiňují studie na izolovaných cévách, které prokázaly, že cévy hypertenzních zvířat vykazují zvýšenou vazokonstrikční reaktivitu po podání různých vazoaktivních látek. Burke a kol. (2013) zase poukazuje na to, že v izolovaných buňkách renální hladké svaloviny nebyla nedostatečná myogenní odpověď u FHH potkanů dána zvýšenou vaskulární rezistencí, protože odstranění Ca^{2+} iontů nemělo žádný vliv na průměr aferentní arterioly, naopak tok K^+ iontů byl v aferentních arteriolách zvýšený.

K tvrzení, že FHH potkani mají narušenou signalizaci RAAS přispívá také další fakt. Přestože jsme u FHH potkanů nezjistili zvýšenou hladinu Ang II, vedla duální inhibice RAAS (ACEi + AT₁R blokátor) ke snížení hladiny Ang II v ledvině a významně snížila MAP. Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími pracemi, které ukazují na zmírnění hypertenze u mladých i starších FHH potkanů po podání ACE inhibitoru (Verseput et al. 1997, 2000). Nicméně již rozvinuté strukturální a funkční poškození ledvin u dospělých FHH je nevratné a kombinovaná blokáda RAAS stav již výrazně nezlepšila. Došlo jen k jeho zmírnění, které mohlo být způsobeno snížením koncentrace Ang II v ledvině a zvýšením aktivity protektivní osy RAAS (zvýšení koncentrace Ang 1-7) nebo jen jako důsledek snížení TK, protože FHH mají narušenou autoregulaci RBF a zvýšený TK je tak přenášen i do glomerulárních kapilár (Burke et al. 2013; Vavrínek et al. 2013; Fan et al. 2021). Dále lze předpokládat i snížení koncentrace aldosteronu, nicméně jeho hladiny jsme v této studii neměřili.

Rozvoj CKD je pravděpodobně dán i dalšími faktory než jen vysokým TK, protože FHH potkani rozvíjí určitý stupeň renálního poškození již v časném prehypertenčním období, narozdíl od SHR potkanů, kteří dosahují vyšších hodnot TK, ale poškození ledvin se u nich objevuje až v pozdějším věku (Zhou et al. 2002). Podíl na rozvoji CKD u tohoto modelu by mohlo mít také oslabení protektivních mechanismů, které se podílí na regulaci TK, což může přispívat k rozvoji endoteliální dysfunkce a poškození ledvin. Výsledky této práce ukazují na snížení produkce vazodilatačních látek jako je NO a EETs a oslabení protektivní osy RAAS, které potvrdila snížená produkce Ang 1-7.

NO je známý svým vazodilatačním účinkem, který vyvažuje vazokonstrikční působení dalších látek, významně ovlivňuje vaskulární tonus v reakci na zvýšený tlak. V ledvinách hraje klíčovou roli v autoregulaci a moduluje tubulární transport (Carlström 2021). U FHH potkanů bylo prokázáno, že inhibice NOS výrazně urychluje rozvoj hypertenze a CKD (Provoost et al. 2002; Mattson et al. 2007; Vavrínek et al. 2013). Také bylo již dříve popsáno, že produkce NO v ledvinách s věkem klesá, zejména u samců (Baylis 2009). To jsme pozorovali také v této studii u FHH potkanů, kteří měli již ve věku 9 měsíců signifikantně sníženou aktivitu NOS ve srovnání se stejně starými normotenzními FHL, zatímco v prehypertenčním období byla aktivita NOS u FHH i FHL srovnatelná. Tvrzení, že funkční integrita intrarenálního systému NO u FHH potkanů s věkem klesá, podporuje i tato studie, kde jsme ukázali, že vazodilatační odpověď po podání ACh (měřena jako změna v RVR) byla u mladých FHH zachována, zatímco u dospělých FHH byla výrazně snížena. Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími *in vitro* studiemi na izolovaných renálních arteriích (Ochodnický et al. 2010; Vavrínek et al. 2013). Je

ale nutné podotknout, že k plnému potvrzení významnosti role endoteliálního vazodilatačního systému by bylo dobré porovnat vaskulární odpovědi na ACh s odpověďmi na jinou vazodilatační látku nezávislou na uvolňování endoteliálního NO, jehož produkce je u dospělých FHH snížena, např. EETs, které jsme později použili v dalších studiích.

Významnými vazodilatačními a organoprotektivními látkami jsou také metabolity epoxigenázy CYP450 (Zeldin 2001; Honetschlägerová et al. 2011a; Kopkan et al. 2012), proto jsme se zaměřili také na produkci EETs. Koncentrace EETs v ledvině byla u mladých FHH a FHL srovnatelná, ale s věkem jsme u FHH potkanů pozorovali pokles intrarenálních hladin EETs. Toto zjištění má velký význam, protože řada studií (včetně našich) potvrdila, že deficit EETs v ledvinách se významně podílí na patofyziologii hypertenze a renálního poškození u řady zvířecích modelů (Imig 2005; Honetschlägerová et al. 2011a; Sporková et al. 2011; Kopkan et al. 2012; Kujal et al. 2014; Čertíková Chábová et al. 2018). Tyto výsledky naznačují, že postupný nárůst deficitu intrarenálních vazodilatačních faktorů jako je NO a EETs spolu s renální endoteliální dysfunkcí FHH potkanů může u toho modelu významně přispívat k rozvoji CKD.

Dalším významnou dráhou je vazodilatační osa RAAS [ACE2 (NEP) / Ang 1-7 / MasR], která může za určitých podmínek působit proti vazokonstričnímu působení hlavní osy RAAS [ACE / AngII / AT₁R] (Bürgelová et al. 2009; Kaltenecker et al. 2020; Alves et al. 2021). Zjistili jsme, že hladiny Ang1-7 se v průběhu života FHH potkanů neliší a jsou srovnatelné s FHL, takže deficit Ang1-7 pravděpodobně nebude faktor ovlivňující rozvoj hypertenze a CKD u tohoto modelu. Ale na druhou stranu duální blokáda RAAS systému (ACEi + blokátor AT₁R) vedla k signifikantnímu zvýšení plazmatických i renálních koncentrací Ang 1-7 u prehypertenčních i dospělých FHH potkanů. Významný nárůst protektivní osy RAAS by se mohl podílet na zmírnění hypertenze a proteinurie, kterou jsme pozorovali po RAAS blokadě.

Zajímavé je také zjištění, že FHH potkani mají v prehypertenčním období signifikantně vyšší RBF a nižší RVR v porovnání s mladými FHL, takže i mírně zvýšený arteriální tlak vede ke zvýšení RBF. Tato nedostatečná konstrikce renálních odporových arterií potvrzuje závěry dřívějších studií, které popisovaly narušení myogenní odpovědi renálních arteriol (zejména aferentních) a autoregulace RBF u mladých FHH (Van Dokkum et al. 1999b, a; Ochodnický et al. 2010; Vavrínek et al. 2013). V naší studii měli dospělí FHH potkani významně vyšší TK, ale RBF byl téměř srovnatelný s normotenzními FHL potkany a měli tedy významně vyšší RVR. Zvýšená RVR také koresponduje s rozvojem glomerulárního poškození u FHH potkanů. Je nutné přiznat, že autoregulační studie, která by sledovala odpověď RBF na zvyšující se RPP,

by pomohla potvrdit naše zjištění, nicméně naše data ukazují přinejmenším narušenou regulaci RVR u dospělých FHH potkanů, která může přispívat k rozvoji renálního poškození u tohoto modelu.

6.1.5 Závěr Studie 1

Tato studie sledovala průběh rozvoje hypertenze a progresi poškození ledvin u experimentálního modelu - FHH potkanů. Patofyziologické mechanismy, které se podílejí na těchto změnách, ale nejsou tak jednoznačné a jsou v těsné vzájemné interakci. Výsledky ukazují, že u tohoto modelu dochází v průběhu dospívání ke změnám RAAS, které by se mohly významně podílet na rozvoji hypertenze. Přestože dospělí FHH potkani nevykazují zvýšenou plazmatickou ani renální aktivitu RAAS ve srovnání s normotenzními FHL kontrolami, mají zvýšenou vaskulární odpověď na Ang II. Navíc blokáda RAAS u nich vedla k efektivnímu snížení TK spojenému se snížením hladin Ang II a zvýšením hladin Ang 1-7 v ledvině a tím by mohla pravděpodobně přispět k oddálení či zpomalení rozvoje CKD u tohoto modelu. Naopak aktivita antihypertenzních a protektivních faktorů jako NO a EETs u FHH potkanů s věkem klesá, což by mohlo souviset s rozvojem endoteliální dysfunkce a CKD u tohoto modelu. Proto by terapeutické ovlivnění aktivity těchto protektivních systémů, vedle inhibice RAAS, mohlo být prospěšné v léčbě renálního selhání asociovaného s hypertenzí.

6.2 Studie 2: Farmakologická blokáda solubilní epoxid hydrolázy zmírňuje progresi CHF u modelu CKD

6.2.1 Hlavní cíle Studie 2

Cílem této studie bylo prokázat, zda renální poškození významně zhoršuje rozvoj CHF způsobeného objemovým přetížením, které je indukováno aorto-kavální píštělí a zda zvýšená dostupnost protektivních EETs pomocí inhibice sEH zmírní projevy CHF u potkanů s geneticky podmíněným rozvojem hypertenze a CKD.

6.2.2 Metody Studie 2

6.2.2.1 Průběh experimentu

Tato studie byla provedena na samcích potkanů kmene FHH a FHL ve věku 12 týdnů. Podrobněji o původu a chovu zvířat viz kapitola 6.1.2.1 – Studie 1.

V první sérii experimentů byla sledována přežívající křivka u FHH a FHL potkanů po rozvoji chronického srdečního selhání a vliv léčby inhibitorem sEH na testované parametry (viz níže). Na začátku experimentu byla zvířata umístěna do MK a změřeny bazální hodnoty albuminu a angiotenzinogenu. Týden po odběrech moče v MK bylo u potkanů ve vybraných skupinách indukováno srdeční selhání pomocí ACF (podrobnější popis viz níže). Zvířata byla ponechána bez léčby po dobu 4 týdnů. Naše předchozí studie potvrdily, že za tuto dobu dojde u zvířat k rozvoji CHF, ale stále jsou ještě v kompenzované fázi srdečního selhání (Melenovsky et al. 2012; Červenka et al. 2015; Kala et al. 2017). Po 4 týdnech od ACF (týden 0) byla zvířata rozdělena do 6-ti skupin:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Sham FHL + placebo (n = 10) | 4. Sham FHH + placebo (n = 10) |
| 2. ACF FHL + placebo (n = 26) | 5. ACF FHH + placebo (n = 29) |
| 3. ACF FHL + sEH inhibitor (n = 26) | 6. ACF FHH + sEH inhibitor (n = 27) |

Inhibitor sEH (*cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido) cyclohexyloxy]-benzoová kyselina (*c*-AUCB)) byl podáván v pitné vodě v dávce 3 mg/l. Dávka byla určena na základě našich

předchozích experimentů tak, aby bylo dosaženo zvýšení tkáňové koncentrace EETs bez ovlivnění aktivity RAAS (Sporková et al. 2014; Červenka et al. 2015; Kala et al. 2017). Roztok byl připraven rozpuštěním 30 mg c-AUCB v 5 ml ethanolu se 75 mg cyklodextrinu a 10 minut sonikován při amplitudě 35 a cyklu 0,5. Roztok byl poté přidán do 10 litrů pitné vody a upraveno pH.

Potkani byli sledováni po dobu 20-ti týdnů a ke stanovení množství albuminu a angiotenzinogenu v moči byli opakovaně umístěni do MK ve 4, 6, 8, 10 a 20-ti týdnech od začátku léčby za účelem 24 hodinového sběru moče.

Druhá série experimentů sledovala vliv 10-ti týdenní léčby sEH inhibitorem na koncentraci Ang II, EETs, dHETEs a HETEs a váhu orgánů. Potkani byli ve 12. týdnu věku rozděleni do stejných skupin jako v první sérii (n = 10 v každé skupině). U vybraných skupin byla vytvořena ACF nebo provedena sham operace. Z toho byl u části zvířat podán inhibitor sEH po 4 týdnech od ACF. Po 10-ti týdnech léčby byl pokus ukončen dekapitací zvířat, zaznamenány váhy orgánů (srdce – pravá a levá komora, ledviny, játra a plíce) a zhodnocena srdeční hypertrofie a městnání krve v plicích. Krevní plazma a tkáň byly odebrány na biochemické analýzy.

6.2.2.2 Operační metody

Aorto-kavální fistula (ACF)

CHF bylo indukováno objemovým přetížením způsobeným ACF punkční cestou dle Garcii a Diebloda. Ve věku 12-ti týdnů byla zvířata uvedena do celkové anestézie kombinací anestetik tiletamin a zolazepam (Virbac SA, Francie, 8 mg/kg, i.m) a xylazin (Spofa, Česká republika, 4 mg/kg i.m.). Po otevření břišní dutiny podélným řezem byla preparací zpřístupněna dolní dutá žíla a aorta. Následně byla na aortu umístěna cévní svorka a jehlou mezi nimi byla vytvořena komunikace jehlou o velikosti 18G skrz obě stěny břišní aorty až do dolní duté žíly. Poté bylo místo vpichu uzavřeno tkáňovým lepidlem a uvolněna cévní svorka. Vytvoření ACF je možno ověřit vizuálně - lze pozorovat pulzující jasný průtok krve dolní dutou žílou. Nakonec byla břišní dutina uzavřena. Jedná se o miniinvazivní výkon (délka trvání zákroku cca 10-15 min). U kontrolních zvířat byla provedena sham operace, tj. bez vytvoření ACF. (Kala et al. 2017; Vacková et al. 2019a, Vacková et al. 2019b).

6.2.2.3 Biochemické metody

Stanovení albuminu

Množství albuminu v moči zvířat bylo stanoveno ze vzorku 24-hodinového sběru moči v metabolických klecích pomocí komerčního ELISA kitu (AssayPro, USA).

Stanovení angiotenzinogenu

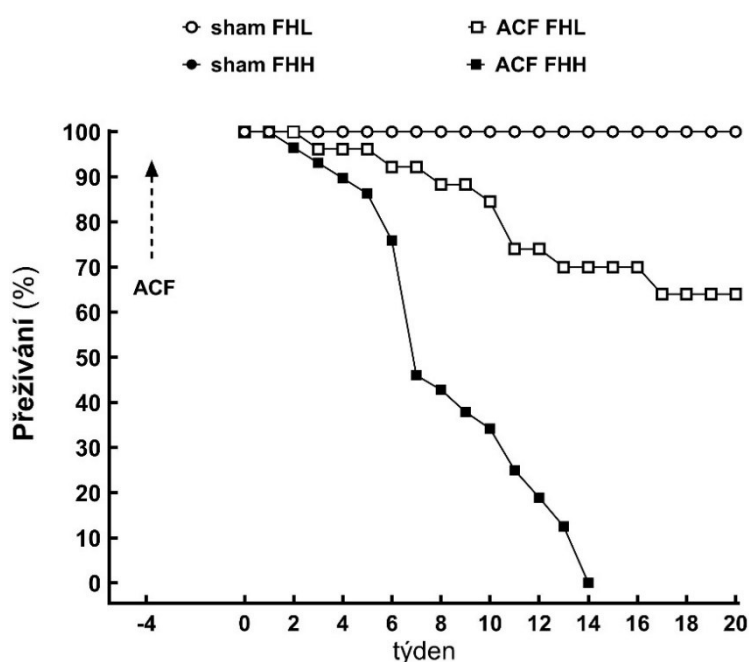
Množství celkového angiotenzinogenu v moči zvířat bylo stanoveno ze vzorku 24-hodinového sběru moči v metabolických klecích za využití komerčního ELISA kitu (IBL America, USA).

Stanovení Ang II a EETs, HETEs a DHETEs

Podrobný popis viz kapitola 6.1.2.4 Biochemické a histologické metody.

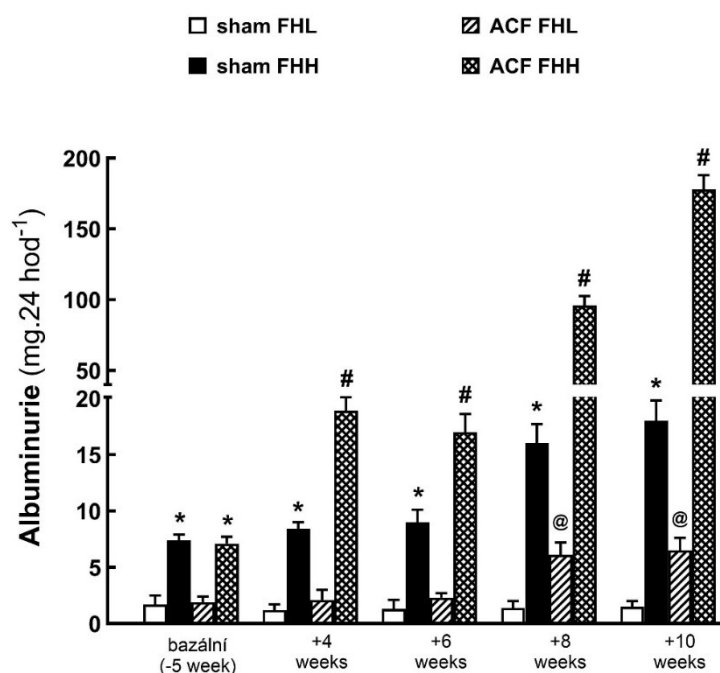
6.2.3 Výsledky Studie 2

Graf 13 znázorňuje přežívací křivku neléčených sham-operovaných FHL a FHH potkanů, kde všechna zvířata přežila až do konce experimentu. ACF FHL měli na konci experimentu 36% úmrtnost. V kontrastu s tím jsme u ACF FHH pozorovali úmrtnost již od 2.týdne, v 7.týdnu dosáhla 50% a do 14.týdne experimentu byla úmrtnost 100%.



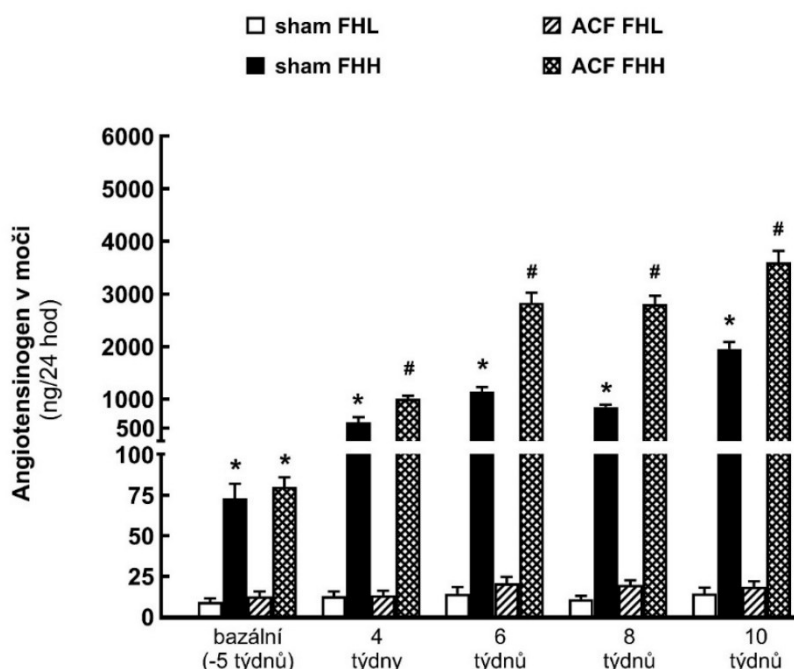
Graf 13: **Přežívací křivka** u zdánlivě-operovaných (sham) FHH a FHL potkanů a u FHH a FHL potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). U sham operovaných FHL a FHH přežilo 100% zvířat, proto se jejich křivky překrývají a jsou obě znázorněny bílým symbolem.

Jak ukazuje graf 14, sham FHH měli dle očekávání již na začátku experimentu třikrát větší albuminurii ve srovnání sham FHL skupinou a tyto hodnoty se nadále zvyšovaly a po 10-ti týdnech dosáhly u sham FHH 12x vyššího hodnot oproti sham FHL. U ACF FHL albuminurie rovněž postupně narůstala, ale byla signifikantně nižší ve srovnání s ACF FHH. Ve srovnání s kontrolními sham-FHH potkany měli ACF FHH albuminurii až desetinásobně vyšší a to i navzdory tomu, že zvířata s nejvyššími hodnotami do 10.týdne uhynula.



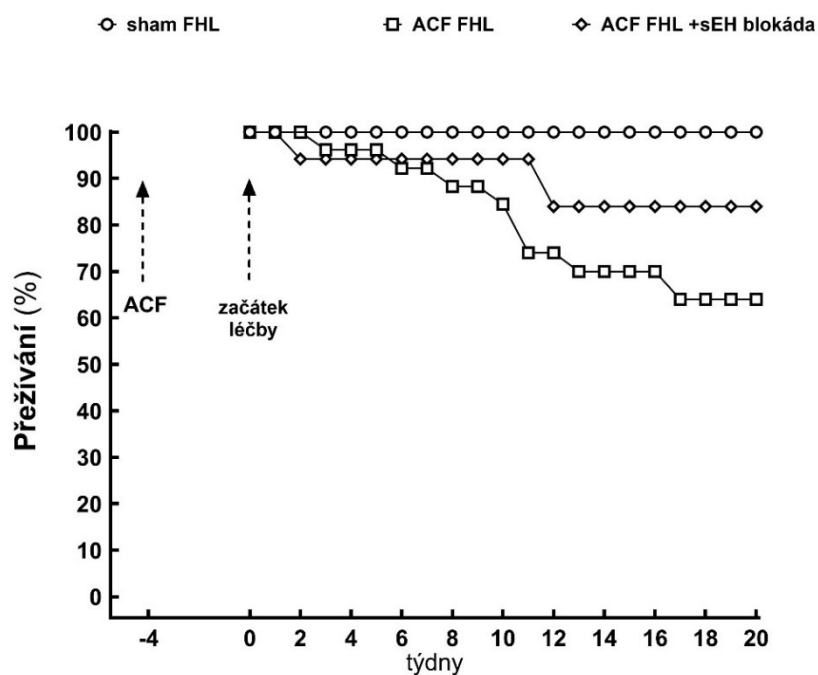
Graf 14: Hodnoty **albuminurie** u zdánlivě-operovaných (sham) FHH a FHL potkanů a u FHH a FHL potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). * $P < 0,05$ pro sham FHH ve srovnání s sham FHL ve stejném časovém bodě, # $P < 0,05$ pro ACF FHH ve srovnání s sham FHH, @ $P < 0,05$ pro ACF FHL ve srovnání s sham FHL

Z grafu 15 je patrné, že produkce angiotenzinogenu v moči byla u sham FHH potkanů již před provedením ACF 7x vyšší než u sham FHL. Po indukci ACF u nich došlo k výraznému nárůstu jeho exkrece, která byla u ACF FHH na konci experimentu 140 krát vyšší než u ACF FHL. Indukce ACF vedla k významnému nárůstu exkrece angiotenzinogenu i u FHL skupiny.

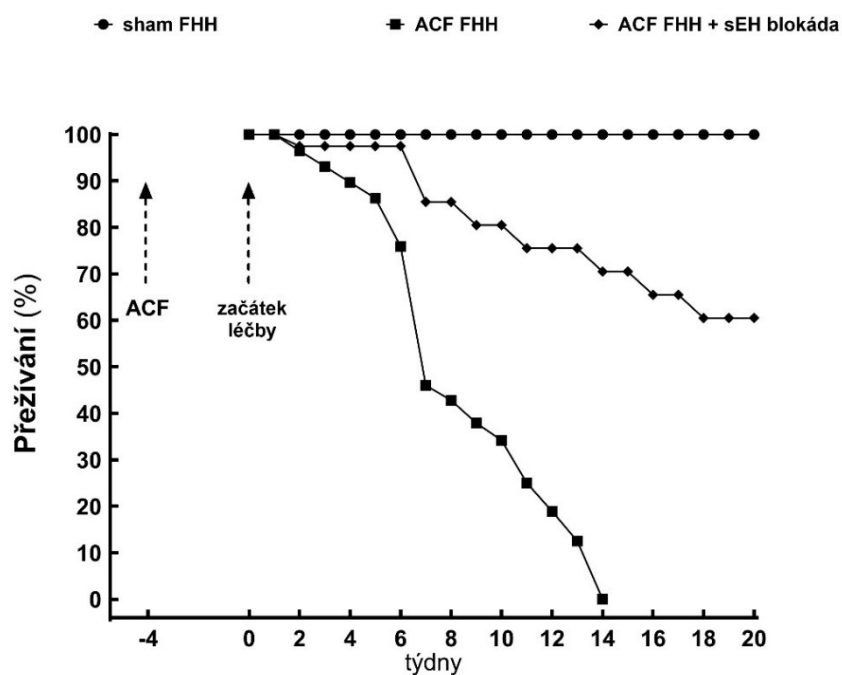


Graf 15: Hodnoty **exkrece angiotenzinogenu** v moči u zdánlivě-operovaných (sham) FHH a FHL potkanů a u FHH a FHL potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). * $P < 0,05$ pro sham FHH ve srovnání s sham FHL ve stejném časovém bodě, # $P < 0,05$ pro ACF FHH ve srovnání s sham FHH, @ $P < 0,05$ pro ACF FHL ve srovnání s sham FHL

Léčba inhibítorem sEH u rozvinutého CHF významně zlepšila přežívání u obou skupin s ACF, přičemž u ACF FHL léčba zlepšila přežívání o 20 % oproti skupině bez léčby (graf 16). U ACF FHH bez léčby byla 100% mortalita, zatímco u léčené skupiny (ACF FHH + sEH) se výrazně zvýšila míra přežití na 60 % (graf 17).

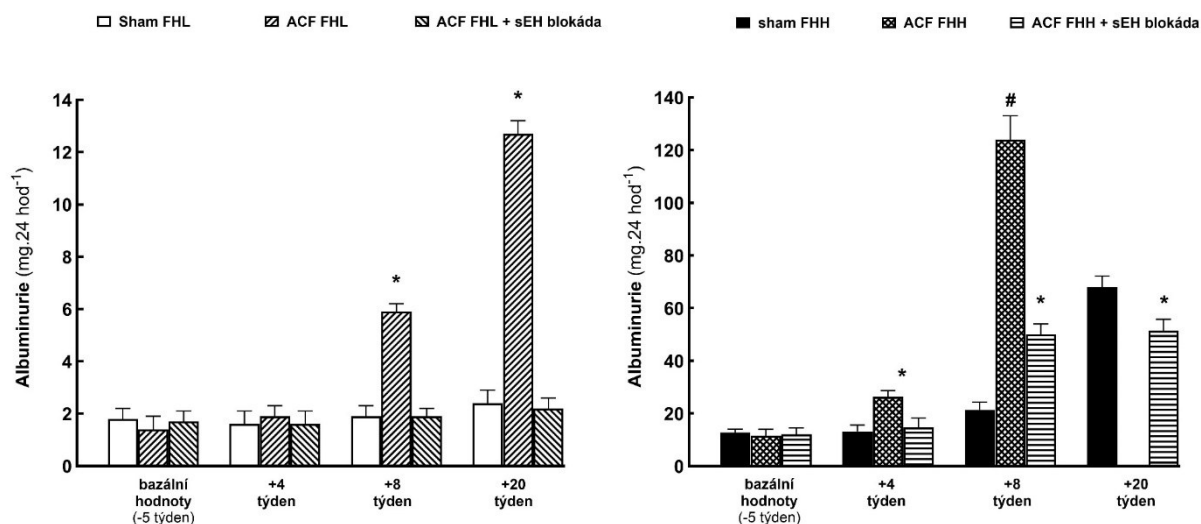


Graf 16: *Přeživací křivka u zdánlivě-operovaných FHL potkanů (sham FHL) a FHL potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF FHL) ve srovnání se ACF FHL léčenou inhibitorem sEH.*



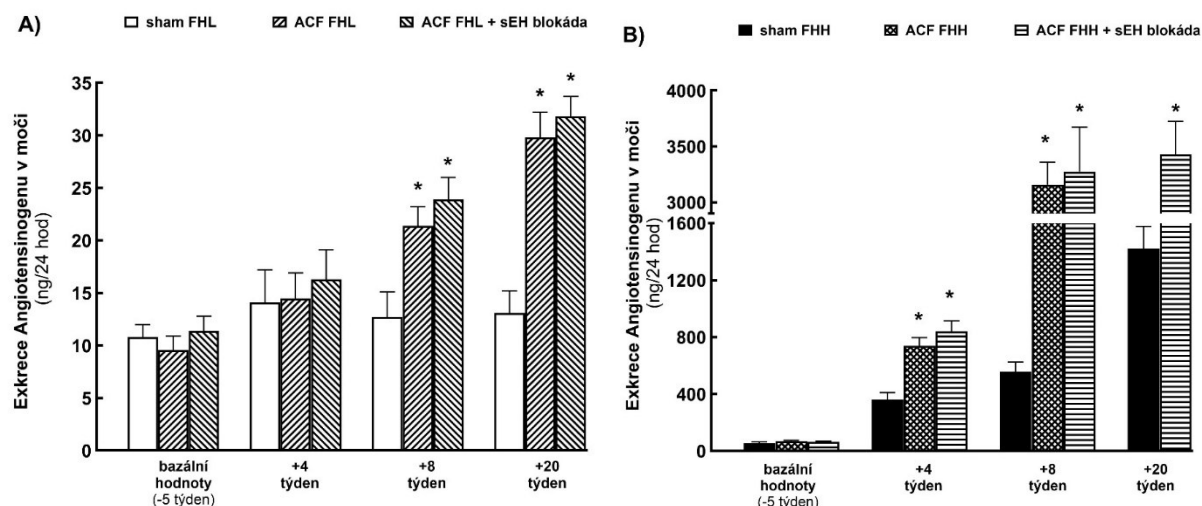
Graf 17: *Přeživací křivka u zdánlivě-operovaných FHH potkanů (sham FHH) a FHH potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF FHH) ve srovnání s ACF FHH léčenými inhibitorem sEH.*

Inhibice sEH významně snížila produkci albuminu u obou skupin s výraznějším efektem u ACF FHL, kde byla albuminurie snížena na hodnoty kontrolní sham FHL skupiny (graf 18A), ale k významnému poklesu došlo i u ACF FHH léčené sEH inhibítorem (graf 18B).



Graf 18: (A) Albuminurie u zdánlivě-operovaných (sham) FHL potkanů a FHL s aorto-kavální píštělí (ACF FHL) ve srovnání se ACF FHL léčenou inhibítorem sEH. (B) Albuminurie u zdánlivě-operovaných (sham) FHH potkanů a FHH s aorto-kavální píštělí (ACF FHH) ve srovnání ACF FHH léčenými inhibítorem sEH. * $P < 0,05$ ve srovnání s sham skupinou ve stejném časovém bodě, # $P < 0,05$ pro ACF FHH ve srovnání se skupinu léčenou sEH inhibítorem ve stejném časovém bodě.

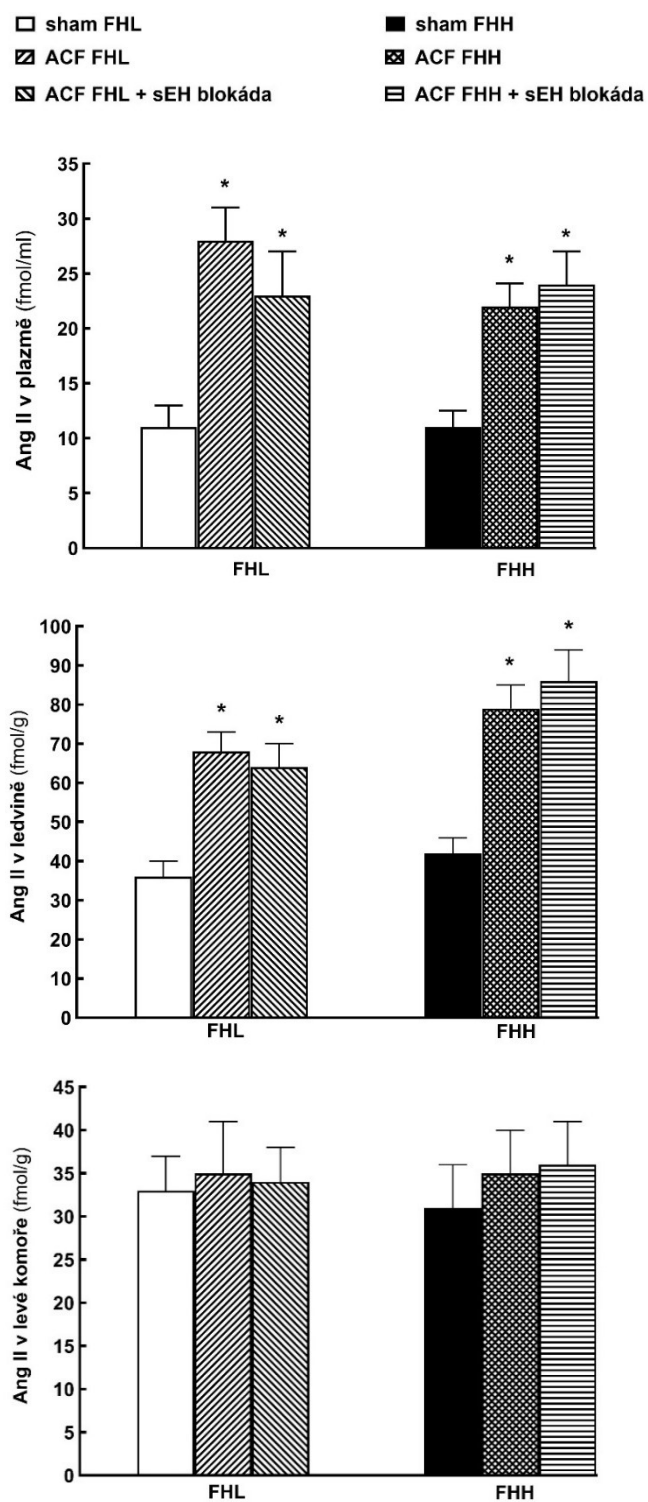
Graf 19 znázorňuje narůstající hodnoty exkrece angiotenzinogenu v moči v průběhu experimentu u obou ACF skupin. Léčba inhibitorem sEH tento nárůst nijak neovlivnila.



Graf 19: (A) Hodnoty exkrece angiotenzinogenu v moči u zdánlivě-operovaných (sham) FHL potkanů a FHL s aorto-kavální píštělí (ACF FHL) a ACF FHL léčenými inhibitorem sEH (ACF FHL + sEHi). (B) Hodnoty exkrece angiotenzinogenu v moči u zdánlivě-operovaných (sham) FHH potkanů a FHH s aorto-kavální píštělí (ACF FHH) a ACF FHH léčených inhibitorem sEH (ACF FHH + sEHi). * $P < 0,05$ ve srovnání s sham skupinou ve stejném časovém bodě.

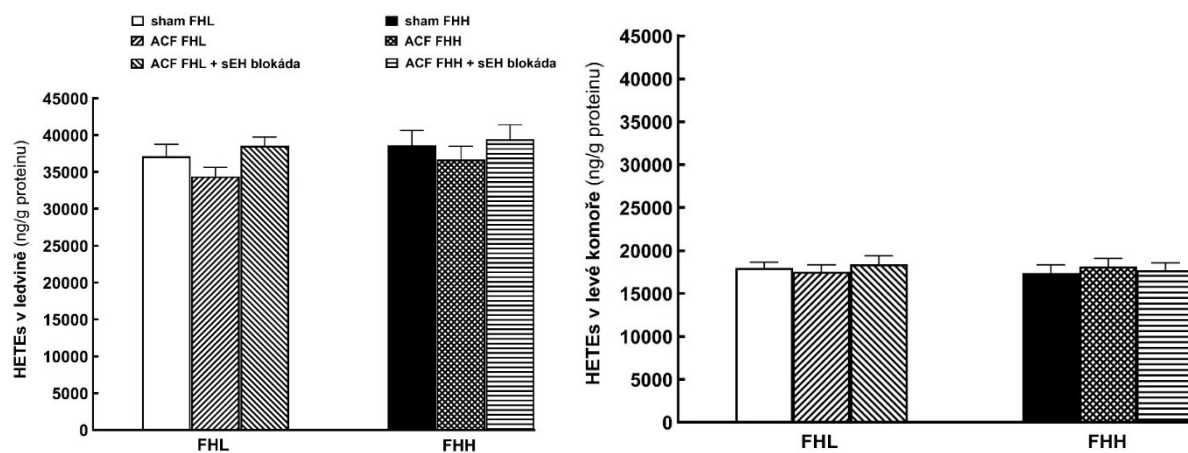
Vzhledem k výrazné mortalitě neléčených FHH potkanů po 10. týdnu od indukce ACF jsme v druhé sérii experimentů zjišťovali vliv léčby inhibitorem sEH na další parametry jako jsou váhy orgánů a koncentrace Ang II, EETs, dHETEs a HETEs po 10-ti týdenní léčbě.

Z grafu 20 je patrné, že koncentrace Ang II v plazmě, ledvině ani levé srdeční komoře se u sham FHH a FHL nelišily. Indukce ACF vedla k výraznému vzestupu plazmatické a renální koncentrace Ang II u obou skupin. Nicméně koncentrace Ang II v levé komoře se nezměnila. Léčba sEH inhibitorem nevedla u ACF FHH ani ACF FHL k výrazným změnám v koncentraci Ang II v plazmě, ledvině nebo levé komoře.



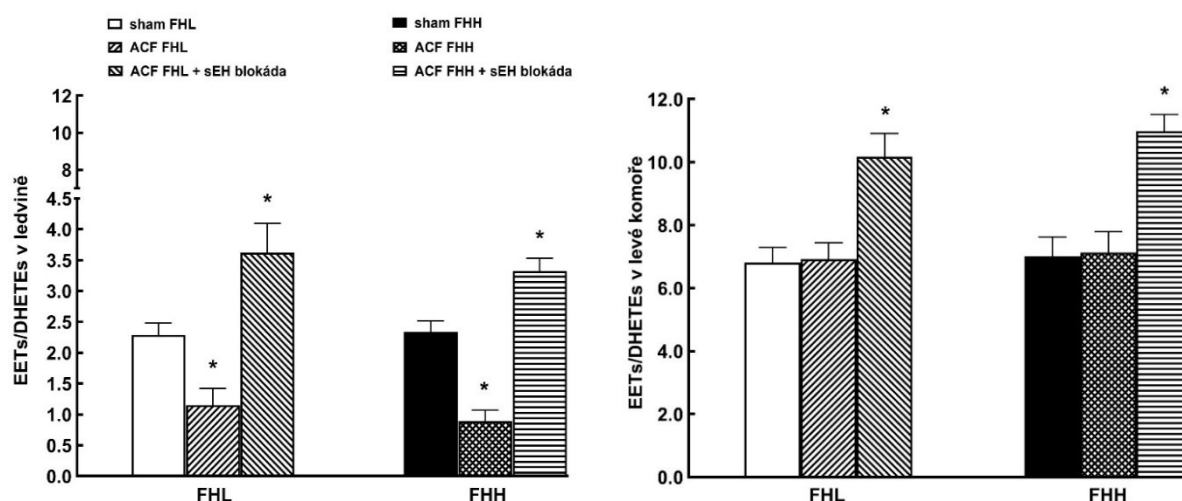
Graf 20: Hodnoty plazmatických (A) a renální (B) koncentrací Ang II a **koncentrace Ang II** v levé komoře (C) u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, FHL a FHH s aorto-kavální pištělí (ACF) a FHL a FHH potkanů s ACF léčených inhibítozem sEH (sEHi). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou.

Tkáňové koncentrace HETEs se v ledvině ani v levé komoře mezi FHH a FHL potkany nelišily, v levé komoře byly přibližně o 40 % nižší než v ledvině (graf 21).



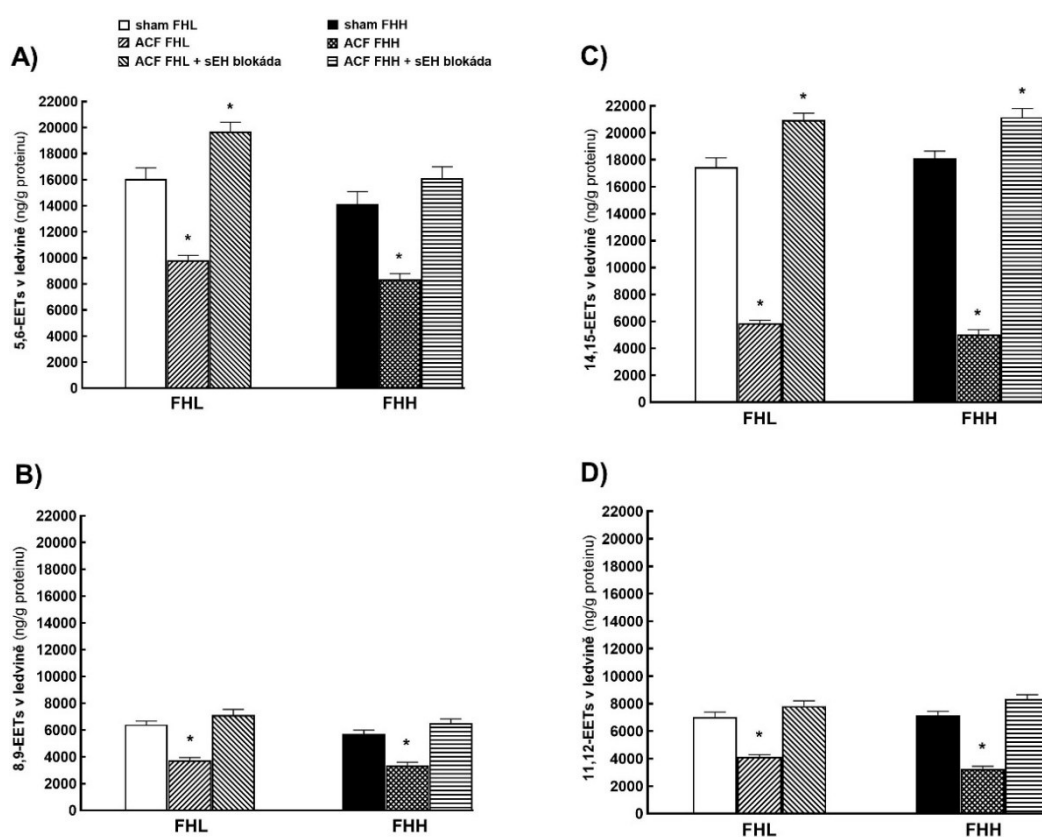
Graf 21: Koncentrace hydroxyeikosatetraenových kys. (HETEs) v ledvině (A) a levé komoře (B) u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, FHL a FHH s aorto-kavální pištělí (ACF) a FHL a FHH potkanů s ACF léčených inhibitorem sEH (sEHi). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou.

Nelišila se ani dostupnost epoxyeikozatrienových biologicky aktivních metabolitů AA - vyjádřená jako poměr EETs / DHETEs (graf 22). Nicméně indukce ACF vedla u FHL i FHH k signifikantnímu poklesu EETs / DHETEs pouze v ledvině, v levé komoře k žádným změnám nedošlo. Inhibice sEH vedla u ACF FHL i ACF FHH k signifikantnímu zvýšení poměru EETs / DHETEs nejen ve srovnání s neléčenou skupinou, ale hodnoty byly významně vyšší i ve srovnání s odpovídající sham skupinou. Inhibice sEH vedla u ACF FHL i ACF FHH také k signifikantnímu zvýšení poměru EETs / DHETEs v levé komoře oproti odpovídající sham skupině. Navíc jsme zjistili, že poměr EETs / DHETEs v levé komoře je přibližně 3-krát vyšší, než v ledvině.



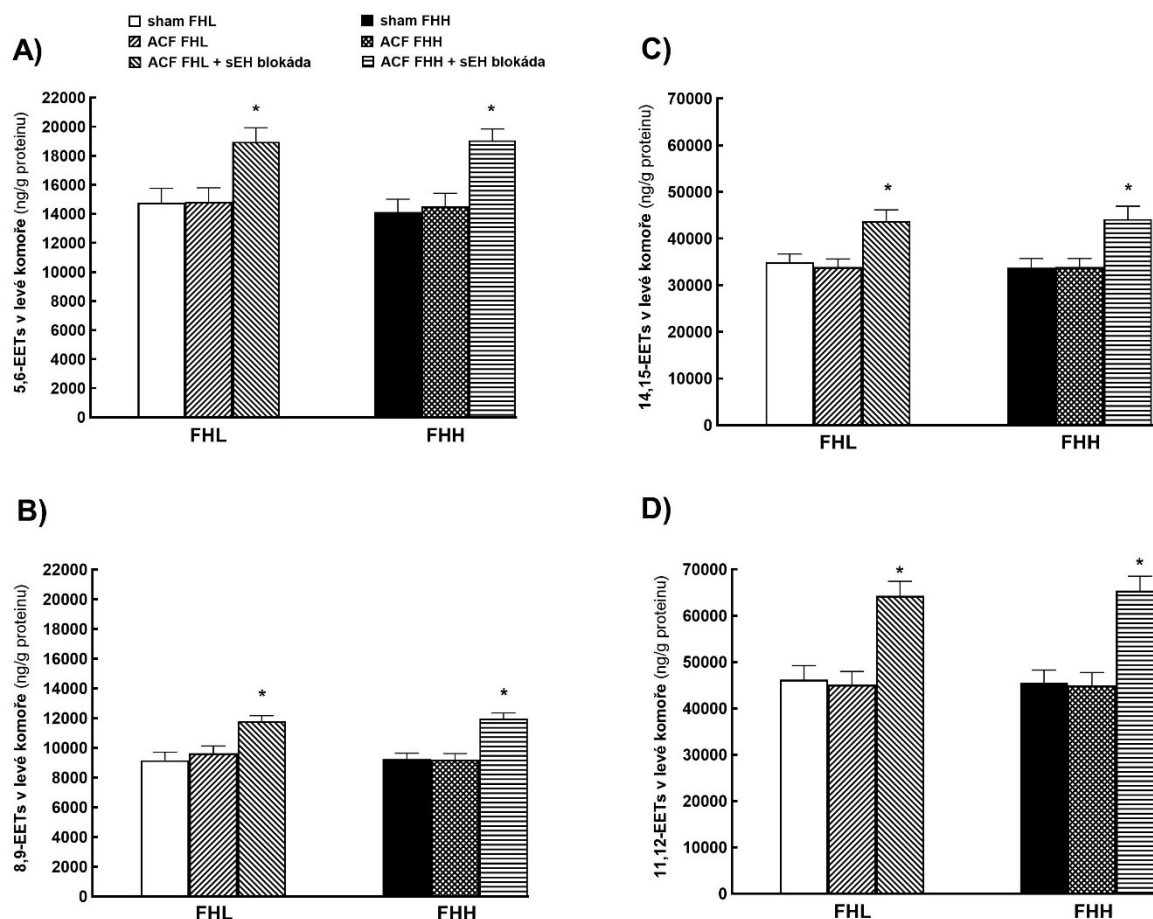
Graf 22: Poměr koncentrace epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) a hydroxeikosatrienových kys. (DHETEs) v ledvině (A) a levé komoře (B) u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, u FHL a FHH s aorto-kavální píštělí (ACF) a FHL a FHH potkanů s ACF léčených inhibitorem sEH (sEHi).
 * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou.

Graf 23 zobrazuje renální koncentrace čtyř biologicky aktivních produktů, které vznikají z AA působením epoxxygenázy. Jak je z grafu patrné, indukce ACF signifikantně snižuje hladiny všech EET regioizomerů v ledvině na obdobné hodnoty u FHL i FHH potkanů. Léčba pomocí sEHi normalizovala tyto hodnoty na úroveň zdánlivě-operovaných zvířat u obou skupin. Navíc jsme ukázali, že v ledvině byla vyšší dostupnost 5,6-EETs a 14,15-EETs. Výsledky předchozích studií naznačují důležitost zejména 14,15-EETs, které se nejvíce podílí na vazodilataci způsobené zvýšeným průtokem a namáháním stěny cév, tzv. shear stresem. Vyšší koncentrace 5,6-EETs může být dána jejich pomalejší degradací, protože sEH má k 5,6-EETs nejnižší afinitu (Jíchová et al., 2016; Imig, 2018).



Graf 23: Renální koncentrace různých regioizomerů epoxyeikosatrienových kyselin EETs - (A) 5,6-EETs, (B) 8,9-EETs, (C) 14,15-EETs a (D) 11,12-EETs u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, u FHL a FHH s aorto-kavální píštělí (ACF) a FHL a FHH potkanů s ACF léčených inhibitorem sEH (sEHi). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou.

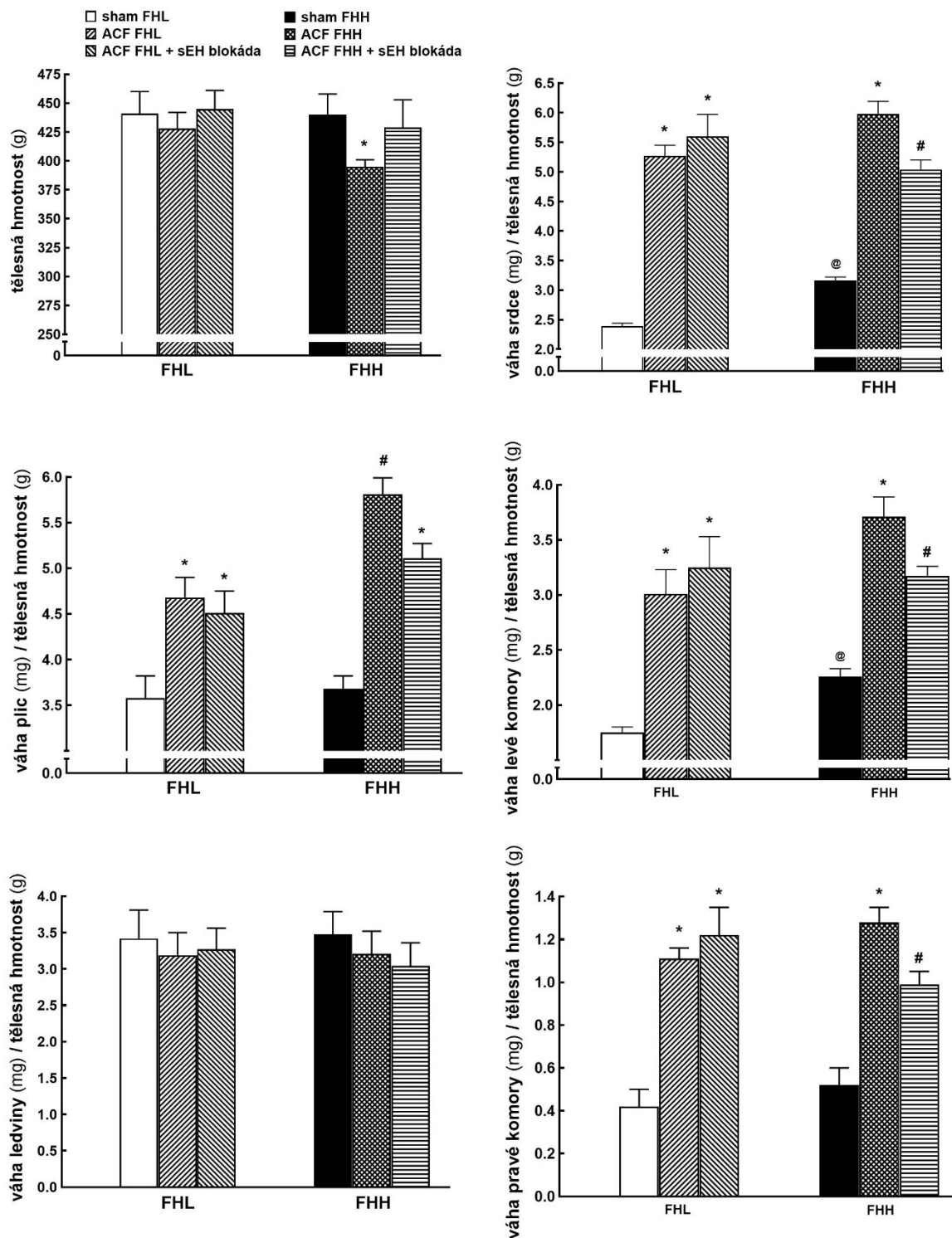
Z grafu 24 je patrné, že v levé komoře nebyly signifikantní rozdíly v koncentraci EET regioizomerů mezi FHL a FHH potkany a indukce ACF nevedla ke změnám hladin EETs u těchto zvířat. Ale léčba inhibitory sEH signifikantně zvýšila hladiny všech EET regioizomerů u ACF FHL i FHH potkanů ve srovnání s sham skupinou.



Graf 24: Koncentrace regioizomerů epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) v levé srdeční komoře - (A) 5,6-EETs, (B) 8,9-EETs, (C) 14,15-EETs a (D) 11,12-EETs u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, u FHL a FHH s aorto-kavální píštělí (ACF) a FHL a FHH s ACF léčených inhibitory sEH (sEHi). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou.

Graf 25 ukazuje, že neléčení ACF FHH potkani signifikantně ztráceli na tělesné hmotnosti ve srovnání s ostatními skupinami. Poměr váhy plic ku hmotnosti celého těla se po indukci ACF signifikantně zvyšoval jak u FHL tak zejména u FHH potkanů, což naznačuje rozvoj plicní kongesce u zvířat s ACF. Inhibice sEH u ACF FHL nevedla k významným změnám, ale u ACF FHH potkanů došlo k signifikantnímu snížení poměru váhy plic ke hmotnosti zvířete. V hmotnosti ledvin vztažené k hmotnosti těla nebyly mezi skupinami zaznamenány žádné rozdíly.

Z grafu 25 je také patrné, že FHH potkani vykazovali signifikantní srdeční hypertrofii (vyjádřena jako poměr váhy celého srdce ku tělesné hmotnosti zvířete), s výraznou hypertrofií levé komory (váha levé komory vztažená k tělesné hmotnosti) ve srovnání s FHL potkany. Rozdíl v hmotnosti pravé komory nebyl u FHH a FHL pozorován. Indukce ACF pak vedla u FHL i FHH potkanů k výrazné srdeční hypertrofii ve srovnání s odpovídající sham skupinou. Poměr váhy pravé a levé komory po indukci ACF vzrostl u FHL z $0,237 \pm 0,06$ na $0,359 \pm 0,01$ a u FHH z $0,23 \pm 0,08$ na $0,347 \pm 0,01$, což naznačuje, že u ACF skupin dochází k rozvoji většího stupně hypertrofie u pravé srdeční komory. Léčba inhibitorem sEH u ACF FHL potkanů neovlivnila rozvoj srdeční hypertrofie, zatímco u ACF FHH inhibice sEH rozvoj hypertrofie částečně zmírnila.



Graf 25: Tělesná hmotnost (A) a hmotnost plic (B), ledvin (C), srdce (D), levé komory (E) a pravé komory (F) normalizovaná na tělesnou hmotnost zvířete u zdánlivě operovaných (sham) FHL a FHH potkanů, u FHL a FHH potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF) a FHL a FHH potkanů s ACF léčených inhibítorem sEH (sEHi). @ < 0,05 pro sham FHH ve srovnání s sham FHL. * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou. # $P < 0,05$ pro ACF FHH léčených sEHi ve srovnání s ACF FHH.

6.2.4 Diskuze ke Studii 2

Cílem této studie bylo porovnat rozvoj CHF u FHL a FHH potkanů po indukci ACF.

V této studii ACF u FHH potkanů vedla k dramatické úmrtnosti i přes to, že jim bylo CHF indukováno ve 3 měsících věku, tedy ještě v prehypertenzním období a neměli ještě tak výraznou albuminurii oproti FHL potkanům. Naše předchozí studie ukázala, že FHH potkani mají v tomto období oproti FHL jen mírně zvýšený TK, který dosahuje hodnot SBP od 138 ± 4 mmHg (ve 3 měsících) do 148 ± 6 mmHg (v 6 měsících) (Doleželová et al. 2016). Během této dlouhodobé pozorovací studie byl patrný výrazný nárůst albuminurie – 14 týdnů od ACF měli ACF FHH potkani až 30-ti násobně vyšší albuminurii ve srovnání s ACF-FHL.

I přes metodické limitace této studie výsledky ukazují, že i mírnější stupeň renálního poškození u FHH potkanů vede k podstatně horšímu průběhu CHF indukovaného pomocí ACF s vysokou mortalitou, což potvrzuje důležitou funkční interakci mezi ledvinami a srdcem v patofyziologii rozvoje CHF.

Přestože indukce ACF zvýšila plazmatické i renální koncentrace Ang II u FHL i FHH, mezi skupinami nebyl v těchto parametrech pozorován signifikantní rozdíl. Nicméně exkrece angiotenzinogenu, která může sloužit jako index dynamiky intrarenální aktivity RAAS (Kobori et al. 2003, 2010; Urushihara et al. 2010), byla u ACF FHH potkanů téměř 90-tinásobně zvýšená oproti ACF FHL. ACF rovněž vedla ke snížené renální dostupnosti biologicky aktivních metabolitů AA - vyjádřená jako poměr EETs/DHETEs a to až o 60% u obou experimentálních skupin. V srdečním svalu dostupnost biologicky aktivních AA metabolitů u skupin s ACF snížena nebyla.

I přes nižší mortalitu u ACF FHL vedla indukce ACF u obou skupin k podobným strukturálním i funkčním změnám srdečního svalu, které byly pozorovány i v řadě dalších studií tohoto modelu objemového přetížení na různých potkaních kmenech (Oliver-Dussault et al. 2010; Melenovsky et al. 2012; Kala et al. 2017; Miklovič et al. 2024). V důsledku objemového přetížení došlo u ACF FHL i ACF FHH k excentrické remodelaci LV a výrazné srdeční hypertrofii obou komor, která byla spojena s plicní kongescí. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky mých kolegů, kteří v rámci této studie měřili echokardiografické a hemodynamické parametry a potvrdili snížený end-diastolický objem a menší frakční zkrácení LV u obou ACF skupin, což ukazuje na signifikantní poruchu systolické funkce. Navíc u ACF FHL i ACF FHH

zjistili prodlouženou dobu relaxace LV, což naznačuje také poruchu časné diastolické funkce (Vacková et al. 2019a).

Zcela novým zjištěním této práce je účinek léčby sEH inhibitorem u tohoto unikátního modelu, která velmi významně zvýšila přežívání potkanů po indukci ACF. I přesto, že mezi ACF FHL a ACF FHH potkany nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v strukturních a funkčních změnách myokardu ani rozdíly v biologické dostupnosti prospěšných metabolitů AA, léčba sEH inhibitorem signifikantně zvýšila dostupnost EETs v levé komoře, i když neovlivnila morfologii ani výkonost srdce (výsledky mých kolegů z publikace Vacková et al. (2019b) neuvedené v této práci). Takže prospěšný vliv léčby sEH inhibitorem bude pravděpodobně zprostředkován jiným mechanismem, než je ovlivnění tlaku a dysfunkce LV. Na druhou stranu je třeba zmínit, že tato část studie hodnotila vliv sEH na TK a srdeční funkce pouze v jednom časovém bodu (6 týdnů po indukci ACF) a je tedy možné, že zhodnocení pozdější fáze rozvoje CHF by ukázalo výraznější rozdíly u ACF FHH skupiny. K získání vypovídajících dat by byla zapotřebí dlouhodobá telemetrická studie, která by zhodnotila záznam TK a LV funkcí. Bohužel taková studie je limitována životností implantovaných sond a také požadavky na poměrně velké počty zvířat.

Inhibice sEH kromě zlepšení přežívání také zabránila nárůstu albuminurie po indukci ACF u obou skupin s větším efektem u hypertenzních FHH potkanů. Inhibice sEH také u ACF FHH výrazně zmírnila rozvoj srdeční hypertrofie a plicní kongesce. Stanovení biologické dostupnosti EETs potvrdilo, že léčba pomocí sEH výrazně zvýšila poměr EETs/DHETEs v srdci i v ledvině u ACF FHL i ACF FHH. Toto zjištění je v souladu s naší předchozí studií, kde jsme ukázali renoprotektivní efekt intrarenálních EETs u potkanů s 5/6 nefrektomií - běžně používaného modelu CKD, kdy je potkanům redukováno 5/6 ledvinové tkáně (Čertíková Chábová et al. 2018). Je nutné zmínit, že tato studie nehodnotila dlouhodobý vliv léčby sEH na rozvoj hypertenze a CKD u sham FHH potkanů. Nicméně ve studii č.1 bylo prokázáno, že renální koncentrace EET je u mladých FHL a FHH potkanů srovnatelná, zatímco u starších FHH potkanů koncentrace EETs s věkem výrazně klesá, čímž se může částečně podílet na rozvoji hypertenze a CKD u tohoto modelu. EETs jsou dnes velmi dobře známy svým organoprotektivním působením (Elmarakby 2012; Imig 2018; Lai and Chen 2021). Bylo potvrzeno, že nedostatek renálních EETs přispívá k patofyziologii hypertenze a renálního poškození u řady modelů (Honetschlägerová et al. 2011a, b; Kopkan et al. 2012; Imig 2018).

Na druhou stranu naše výsledky ukázaly, že koncentrace produktů ω -hydroxylázové aktivity CYP (HETEs) nebyla indukcí ACF ovlivněna u FHL ani FHH potkanů a neovlivnila ji ani

inhibice sEH. Toto zjištění je důležité, protože řada prací uvádí, že zvýšená aktivita CYP ω -hydroxylázy a produkce HETEs (zejména 20-HETEs) významně přispívá k patofyziologii kardiovaskulárních onemocnění (Roman 2002; Alonso-Galicia et al. 2002; Rocic and Schwartzman 2018). Naše výsledky tato tvrzení u tohoto modelu CKD s rozvojem CHF nepotvrdily. CYP ω -hydroxylázová dráha kys. arachidonové nejspíše nehraje významnější roli v patofyziologii rozvoje CHF u ACF FHH potkanů. Navíc účinky 20-HETE zejména v ledvinách jsou protichůdné. V renálních tubulech inhibuje reabsorpci Na^+ a tím zvyšuje natriurézu a působí proti zvyšování TK (Williams et al. 2010; Zhang et al. 2018; Roman 2024).

Na rozvoji CHF po vytvoření ACF se podílí i zvýšená aktivace systémové i renální vazokonstrikční osy RAAS, jak potvrdily výsledky měření koncentrace Ang II v plazmě i v ledvině 14 týdnů po ACF. Obě ACF skupiny měli podobný nárůst koncentrace Ang II, přestože exkrece angiotenzinogenu do moči byla u ACF FHH mnohonásobně vyšší oproti ACF FHL. To naznačuje, že rozvoj CHF indukovaného pomocí ACF je u FHH potkanů charakterizován výraznou aktivací intrarenálního RAAS a že tento efekt je u FHH výraznější než u normotenzních kontrol rezistentních k renálnímu poškození a rozvoji CKD.

Otázkou zůstává, proč jsme pozorovali výrazný rozdíl v aktivaci renálního RAAS mezi ACF FHL a ACF FHH pouze v exkreci angiotenzinogenu do moči a ne v renální koncentraci Ang II. Je nutné zmínit, že vzorky na stanovení Ang II byly odebrány pouze v jednom časovém bodě a odebrání a manipulace se vzorky a jejich následné zpracování může ovlivnit koncentraci Ang II i přes to, že jsme toto v naší laboratoři dobře zdokumentovali (Husková et al. 2006 a, b) a metodiku měření máme rutinně zavedenou. Na druhou stranu řada studií potvrdila, že zhodnocení vylučování angiotenzinogenu do moči je relevantním neinvazivním ukazatelem aktivity RAAS i u lidí (Kobori et al. 2003, 2010; Urushihara et al. 2010). Také naše předchozí studie na modelu 5/6 nefrektomie potvrdily korelaci mezi renální koncentrací Ang II a exkreací angiotenzinogenu (Sedláková et al., 2017; Čertíková Chábová et al., 2018). Ale navzdory rozporům v renální koncentraci Ang II a exkreci angiotenzinogenu tyto výsledky ukazují, že indukce ACF aktivuje RAAS a že inhibice sEH tyto hodnoty neovlivnila a to jak u ACF FHL tak u ACF FHH. Z toho vyplývá, že prospěšný vliv inhibice sEH není dán ovlivněním klasické osy RAAS, která je zodpovědná za vazokonstrikci a retenci Na^+ . Toto zjištění podporuje povědomí o tom, že CHF není jen hemodynamický problém, ale během rozvoje CHF se nejspíše aktivují i další kompenzační systémy, které hrají důležitou roli v rozvoji CHF. Je zřejmé, že nadměrná aktivace RAAS nebo naopak nedostatečná aktivace kompenzačních mechanismů jako CYP epoxigenázová dráha mohou výrazně ovlivňovat progresi tohoto onemocnění.

6.2.5 Závěr Studie 2

Tato studie ukázala, že i mírné renální poškození má významný negativní vliv na rozvoj objemového přetížení srdce indukovaného pomocí ACF a rozvoj CHF a že je tento negativní vliv spojen se sníženou dostupností renálních EETs. Léčba inhibítorem sEH normalizovala dostupnost renálních EETs, zmírnila rozvoj renálního poškození a srdeční hypertrofie a zlepšila dlouhodobé přežívání zvířat a to i bez ovlivnění RAAS. Zvýšení biologické dostupnosti EETs, například snížením jejich degradace v organismu, by tedy mohlo být slibnou možností nového přístupu léčby CHF, zejména u forem srdečního selhání, které jsou spojené s CKD. Podle našeho názoru by sEH v kombinaci s klasickými přístupy léčby CHF mohla vést k efektivnější protekci orgánového poškození a zmírnění další progresu těchto onemocnění.

6.3 Studie 3: Porušená renální vaskulární reaktivita na vazoaktivní látky u modelu potkanů s Ang II-dependentní hypertenzí po rozvoji CHF

6.3.1 Hlavní cíle Studie 3

Cílem této studie bylo zjistit, jestli je u potkanů s Ang II dependentní formou hypertenze rozvoj srdečního selhání způsobeného objemovým přetížením spojený s narušenou vaskulární reaktivitou na různé vazoaktivní látky jako je Ang II, NA, ACh, BK nebo EETs.

6.3.2 Metody Studie 3

6.3.2.1 Zvířata

Tato studie byla provedena na heterozygotních samcích Ren-2 transgenního kmene potkanů (TGR), kteří mají zvýšenou aktivaci RAAS a slouží jako Ang II dependentní model hypertenze. Tito potkani byli kříženi v chovném zařízení Centra experimentální medicíny IKEM křížením homozygotních TGR samců a samic normotenzního kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD). Zvířata byla chována za standardních podmínek 12 hod světlo : 12 hod tma a měla volný přístup k pitné vodě a dietě (0,45 % NaCl, 19-21% bílkovin; SEMED, Česká republika).

U TGR potkanů dochází plnému rozvoji hypertenze okolo 8. týdne věku, proto jsme použili experimentální protokol, kdy byl rozvoj srdečního selhání indukován v 8. týdnu vytvořením ACF. Po 5-ti týdnech od indukce ACF dochází u TGR potkanů k dekompenzované fázi CHF (Oliver-Dussault et al. 2010; Melenovsky et al. 2012; Červenka et al. 2015). Jako kontrolní skupina byli použiti stejně staří samci normotenzního kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD).

6.3.2.2 Průběh experimentu

První série experimentů sledovala aktivitu RAAS a sympatického nervového systému u TGR potkanů po rozvoji CHF. Tato série byla provedena zvlášť, protože je známo, že anestezie ovlivňuje plazmatickou a tkáňovou koncentraci Ang II (Husková et al. 2006a, 2006b). V 8. týdnu věku byli potkani náhodně rozděleni do skupin a byla jim vytvořena ACF nebo

provedena sham operace. Po 5-ti týdnech od ACF/sham byl experiment ukončen dekapitací zvířat a byly odebrány vzorky krevní plazmy a tkání na stanovení koncentrace Ang II, Ang 1-7, aldosteronu a katecholaminů.

1. sham HanSD (n = 7)

3. sham TGR (n = 7)

2. ACF HanSD (n = 7)

4. ACF TGR (n = 7)

V druhé sérii experimentů byli potkani rozděleni do čtyř skupin jako v první sérii a v 8. týdnu věku jim byla provedena ACF nebo sham operace. Po 5-ti týdnech od operace byl proveden akutní vaskulární experiment, kdy byly sledovány okamžité odpovědi RBF po intrarenálním podání vazoaktivních látek a po ukončení měření byla zvířata usmrcena předávkováním anestetikem.

1. sham HanSD (n = 9)

3. sham TGR (n = 9)

2. ACF HanSD (n = 9)

4. ACF TGR (n = 9)

6.3.2.3 Operační metody

Aorto-kavální fistula (ACF)

CHF bylo indukováno objemovým přetížením způsobeným aorto-kavální fistulí (ACF) stejným postupem jako v předchozí studii – viz kapitola 6.2.2.2.

Měření renální vaskulární reaktivity

Metodický postup - uvedení zvířete do celkové anestezie a průběh operace byl stejný jako v první studii (postup viz kapitola 6.1.2.3) s tím rozdílem, že v této studii byly vazoaktivní látky podávány lokálně přímo do ledviny pomocí zúženého katetru PE-10 (intrarenální podání látky), který byl přes levou femorální arterii zaveden do aorty a následně zasunut 1-2 mm do levé renální arterie pod přímou vizuální kontrolou pomocí mikroskopu. Aby nedošlo ke sražení krve v katetru byla nastavena kontinuální infuze fyziologického roztoku s heparinem rychlostí 0,1 ml/hod. Po postoperační ekvilibraci (45min) byl zvířeti podán bolus vazoaktivní látky o objemu 20 μ l a zbytek roztoku v katetru byl ihned spláchnut 100 μ l fyziologického roztoku. Byla zaznamenána maximální změna RBF a po návratu sledovaných parametrů na původní hodnoty (10-15 min) byl podán 2.bolus s vyšší dávkou. Schéma podávání látek probíhalo dle rozpisu: Ang II – 2 a 8 ng/kg; NA – 6 a 20 ng/kg; ACh - 20 a 60 ng/kg; Bk – 100 a 300 ng/kg, 11,12-

EETs – 300 a 600 ng/kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a analog 14,15-EETs – 400 a 800 ng/kg, který byl vyvinut a syntetizován skupinou prof. Falcka na Univerzitě v Texasu, USA (Falck et al. 2014). Pokus byl ukončen předávkováním zvířete vysokou dávkou Thiopentalu.

6.3.2.4 Biochemické metody

Stanovení Ang II a Ang 1-7

Podrobný popis viz kapitola 6.1.2.4 Biochemické a histologické metody

Stanovení noradrenalinu

Vzorky ledvinné tkáně byly nejprve upraveny - přibližně 100 mg tkáně bylo odebráno do chlazené zkumavky s 0,05 M fosfátovým pufrem (pH 7,4), kys. askorbovou a inhibitory proteáz (Sigma-Aldrich, USA), zhomogenizováno a zpracováno dle postupu uvedeném v našich dřívějších studiích (Kratky et al. 2018; Miklovič et al. 2024). Koncentrace NA ve vzorcích krevní plazmy a ledvin byla následně stanovena metodou ELISA pomocí komerčního kitu (TriCat TM ELISA, IBL International, Německo).

Stanovení aldosteronu

Koncentrace aldosteronu v plazmě byla změřena RIA metodou stejně jako v případě stanovení Ang II v kap. 6.1.2.4 za použití komerčního kitu (RIA Aldosteron, Immunotech, Česká republika).

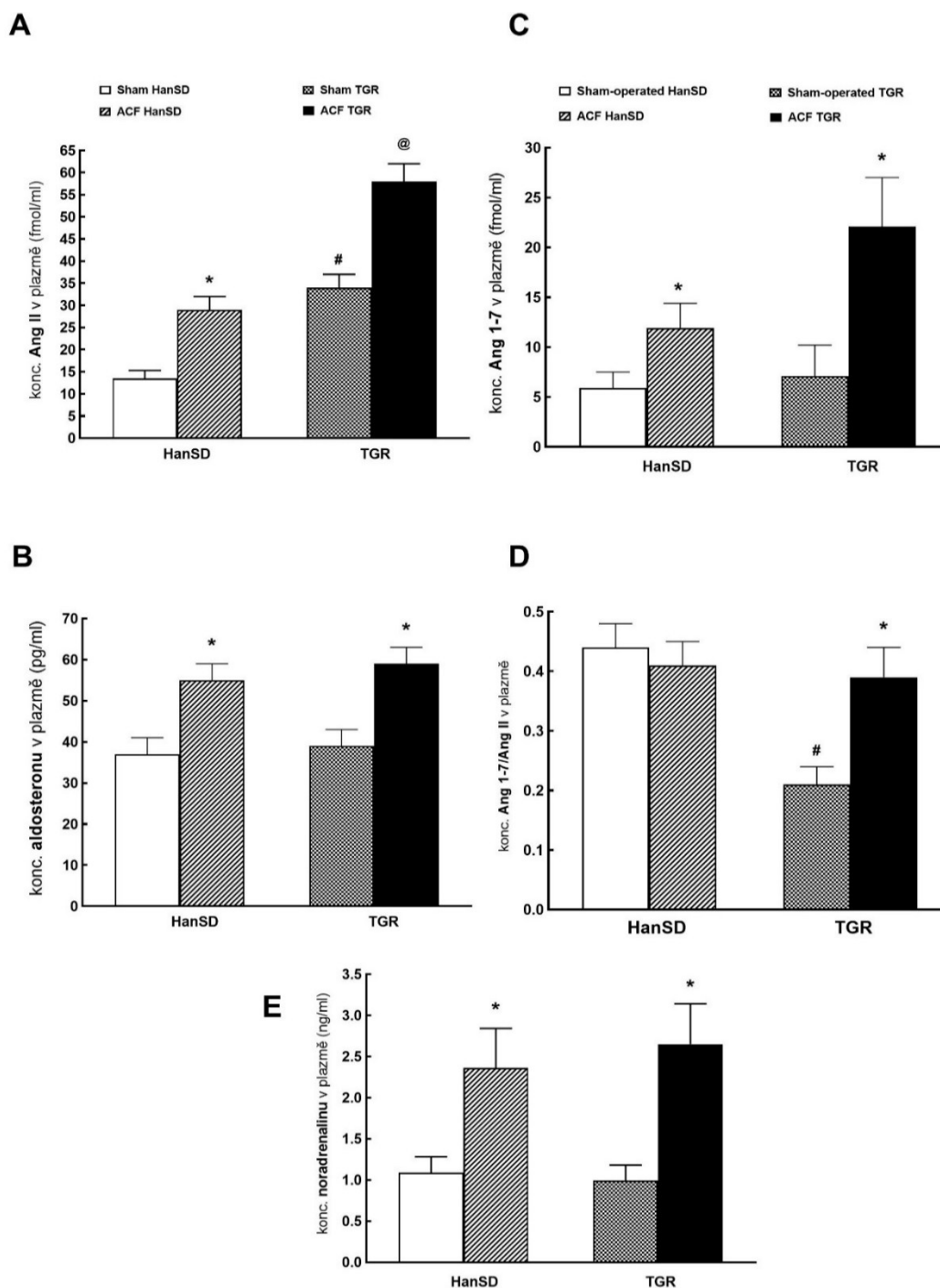
6.3.3 Výsledky Studie 3

Posouzení vlivu ACF na rozvoj srdeční hypertrofie vycházelo z porovnání hmotnosti levé srdeční komory (včetně srdečního septa) a oddělené pravé srdeční komory uvedené v tabulce č.3. Výsledky ukazují, že již 5 týdnů po vytvoření ACF dochází u HanSD i TGR potkanů ve srovnání s odpovídající sham skupinou k významné srdeční hypertrofii. Váha plic u ACF skupin pak ukazuje na výraznou plicní kongesci ve srovnání se sham skupinami. Srdeční hypertrofie i plicní kongesce byla dle očekávání výraznější u hypertenzních ACF TGR oproti ACF HanSD. Poměr váhy pravé a levé komory naznačuje, že u ACF skupin dochází k rozvoji většího stupně hypertrofie u pravé srdeční komory.

	sham HanSD	sham TGR	ACF HanSD	ACF TGR
Tělesná hmotnost (g)	486 ± 9	472 ± 11	483 ± 8	473 ± 8
srdce (g)	1,510 ± 0,078	2,307 ± 0,081*	1,759 ± 0,056 #	2,893 ± 0,089 #@
levá komora (LV) (g)	1,012 ± 0,071	1,344 ± 0,069 *	1,268 ± 0,049 #	1,899 ± 0,059 #@
pravá komora (RV) (g)	0,301 ± 0,027	0,299 ± 0,029	0,49 ± 0,037 #	0,571 ± 0,029 #@
poměr váhy RV/LV	0,297 ± 0,006	0,223 ± 0,009	0,386 ± 0,007	0,301 ± 0,005 #@
pľíce (g)	1,836 ± 0,097	1,815 ± 0,099	2,239 ± 0,119 #	3,12 ± 0,127 #@
ledviny (g)	1,802 ± 0,099	1,795 ± 0,081	1,729 ± 0,106	1,773 ± 0,113
játra (g)	17,04 ± 0,23	16,56 ± 0,028	16,99 ± 0,027	17,55 ± 0,025

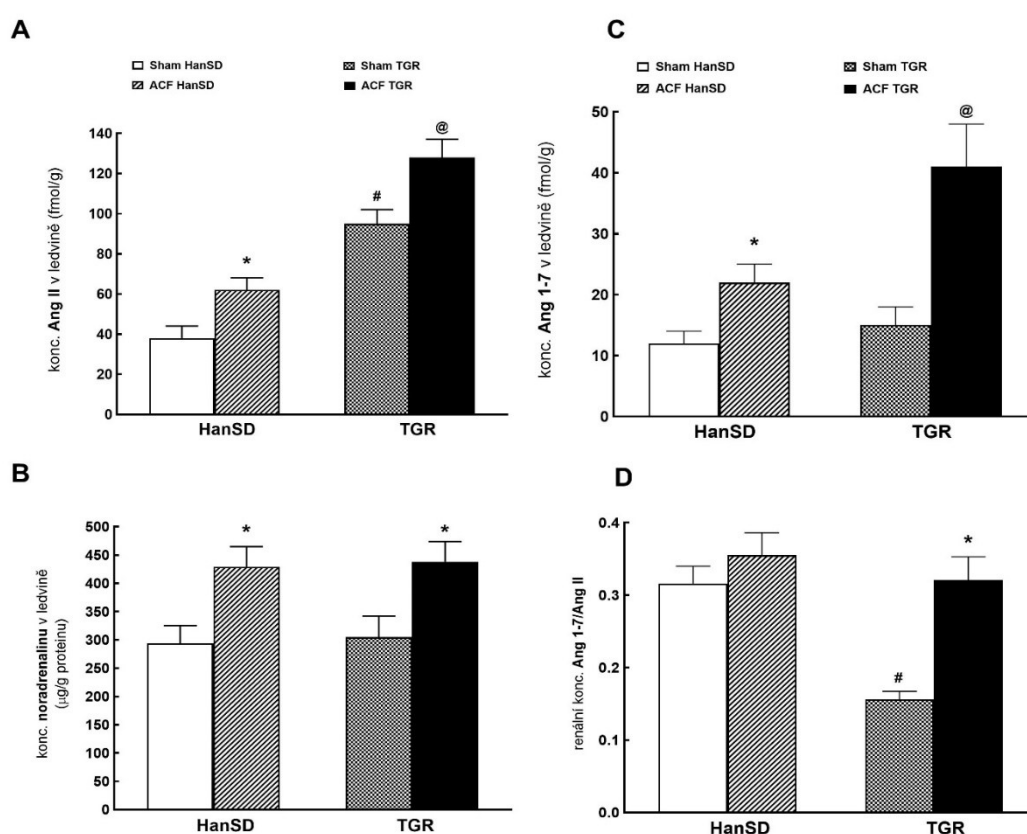
Tabulka 3: základní charakterizace jednotlivých skupin - **tělesná hmotnost a hmotnost orgánů** u HanSD a TGR potkanů 5 týdnů po indukci ACF nebo zdánlivé (sham) operaci. * $P < 0,05$ sham TGR vs. Sham HanSD. # $P < 0,05$ ACF skupina ve srovnání s odpovídající sham skupinou, @ $< 0,05$ ACF TGR vs. ACF HanSD.

V následujících grafech jsou znázorněny plazmatické a renální koncentrace vazoprotektivních látek a rozdíly jejich koncentrací po indukci ACF. Z grafu 26A je jasné patrná zvýšená plazmatická koncentrace Ang II u sham TGR potkanů ve srovnání s HanSD skupinou. Vytvoření ACF vedlo u obou skupin k signifikantnímu nárůstu plazmatických hladin Ang II, nicméně opět s výraznějším vzestupem u ACF TGR skupiny. V plazmatických hladinách aldosteronu (26B) nebyl mezi kmeny zaznamenán žádný rozdíl. Indukce ACF vedla u HanSD i TGR potkanů k výraznému nárůstu plazmatických koncentrací aldosteronu, srovnatelnému u obou kmenů. Plazmatické hladiny Ang 1-7 se u sham HanSD i sham TGR rovněž nelišily (26C). Indukce ACF vedla u obou skupin k signifikantnímu nárůstu koncentrace Ang 1-7 v plazmě, u ACF TGR byl tento nárůst vyšší, ale nedosahoval statisticky signifikantního významu. Graf 26-D vyjadřuje rovnováhu mezi vazodilatační a vazokonstriční osou RAAS jako poměr plazmatických koncentrací Ang 1-7 a Ang II. Tento poměr je u sham TGR poloviční oproti sham HanSD, což ukazuje na vyšší účast vazokonstriční osy u tohoto kmene. Indukce ACF u HanSD potkanů tento poměr nezměnila, ale u TGR došlo po vytvoření ACF k výraznému zvýšení poměru Ang 1-7/Ang II na hodnoty srovnatelné s sham HanSD a ACF HanSD. Graf 26E ukazuje, že v hladinách NA nebyl mezi sham HanSD a sham TGR žádný rozdíl a že indukce ACF vedla u obou skupin ke srovnatelnému signifikantnímu vzestupu.



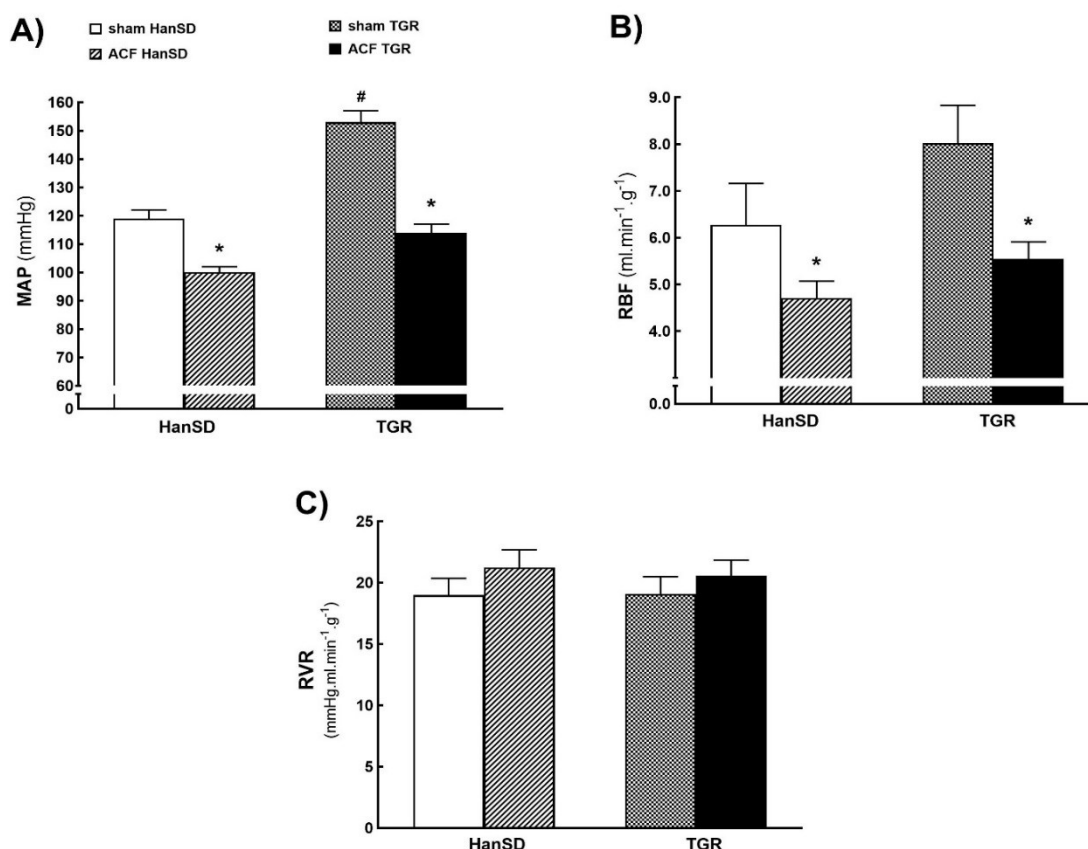
Graf 26: Plazmatické koncentrace Ang II (A), aldosteronu (B), Ang 1-7 (C), poměr plazmatických koncentrací Ang 1-7: Ang II (D) a plazmatické koncentrace NA (E) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální pištělí (ACF). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou. # $P < 0,05$ ve srovnání s sham HanSD, @ $P < 0,05$ ve srovnání se všemi skupinami.

Jak je znázorněno v grafu 27A, koncentrace Ang II v ledvině byla dle očekávání u sham TGR dvakrát vyšší, než u sham HanSD. Vytvoření ACF vedlo z výraznému nárůstu u obou skupin, ale u ACF TGR byla tento nárůst opět signifikantně vyšší než u ACF HanSD. Graf 27B ukazuje, že v renálních koncentracích NA nebyl mezi sham HanSD a sham TGR žádný rozdíl a že indukce ACF vedla u obou skupin k podobnému nárůstu těchto hodnot. V koncentraci Ang 1-7 v ledvině (27C) nebyl mezi sham HanSD a sham TGR žádný rozdíl. Indukce ACF vedla u obou skupin k signifikantnímu zvýšení koncentrace Ang 1-7 v ledvině, přičemž u ACF TGR byl tento nárůst výrazně vyšší. Graf 27D vyjadřuje rovnováhu mezi vazodilatační a vazokonstriční osou RAAS v ledvině jako poměr renálních koncentrací Ang 1-7 a Ang II. Tento poměr je (stejně jako u plazmatických hodnot) u sham TGR poloviční oproti sham HanSD, což ukazuje na vyšší podíl intrarenální vazokonstriční osy RAAS u tohoto kmene. Indukce ACF u HanSD potkanů tento poměr nezměnila, ale u ACF TGR došlo k výraznému zvýšení tohoto poměru na hodnoty srovnatelné s sham HanSD a ACF HanSD.



Graf 27: Renální koncentrace Ang II (A), NA (B), Ang 1-7 (C) a poměr renálních koncentrací Ang 1-7: Ang II (D) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou. # $P < 0,05$ ve srovnání s sham HanSD, @ $P < 0,05$ ve srovnání se všemi skupinami.

Graf 28 ukazuje srovnání bazálních hodnot MAP, RBF a RVR u potkanů po 5-ti týdnech od indukce ACF nebo sham operace. Sham TGR měli již signifikantně vyšší MAP ve srovnání s sham HanSD. Indukce ACF vedla k významnému poklesu tlaku u obou kmenů, ale u ACF TGR zůstaly tyto hodnoty vyšší oproti ACF HanSD (28A). RBF byl u sham TGR lehce vyšší ve srovnání s sham HanSD, ale tento rozdíl nebyl signifikantní. Indukce ACF pak vedla k významnému poklesu RBF u obou skupin (28B). V hodnotách RVR nebyl mezi jednotlivými skupinami pozorován rozdíl (28C).



Graf 28: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP) (A), průtoku krve ledvinou (RBF) (B) a renální vaskulární rezistence (RVR) (C) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). * $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou, @ $< 0,05$ ve srovnání se všemi skupinami.

Vazoaktivní látky (Ang II, NE, ACh, BK, nativní 11,12-EETs a analog EETs) byly podávány intrarenálně tak, aby neovlivnily výši MAP. Procentuální změny MAP byly v maximálním rozsahu $-0,9 \pm 0,8$ až $1,1 \pm 1,1$, což odpovídalo změnám po intrarenálním podání bolusu fyziologického roztoku.

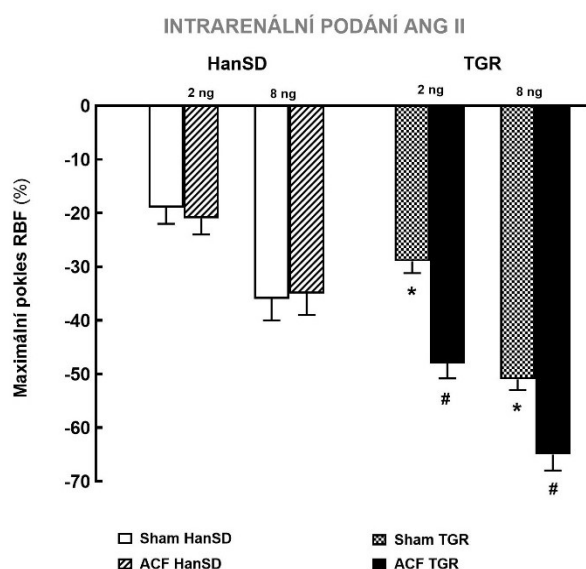
Graf 29A znázorňuje maximální pokles RBF po intrarenálním podání 2 a 8 ng Ang II, který byl u sham TGR výraznější ve srovnání sham HanSD. Navíc u HanSD potkanů byla odpověď na Ang II téměř totožná u sham i ACF skupiny, zatímco u TGR potkanů došlo u ACF TGR k signifikantně většímu poklesu RBF ve srovnání s sham TGR.

Z grafu 29B je patrné, že intrarenální podání NA v dávkách 6 a 20 ng vedlo u sham HanSD i sham TGR k podobným poklesům RBF v závislosti na dávce, zatímco u ACF HanSD došlo po podání NA k signifikantně většímu poklesu RBF. U TGR potkanů vyvolalo intrarenální podání NA podobný pokles RBF u sham i ACF skupiny.

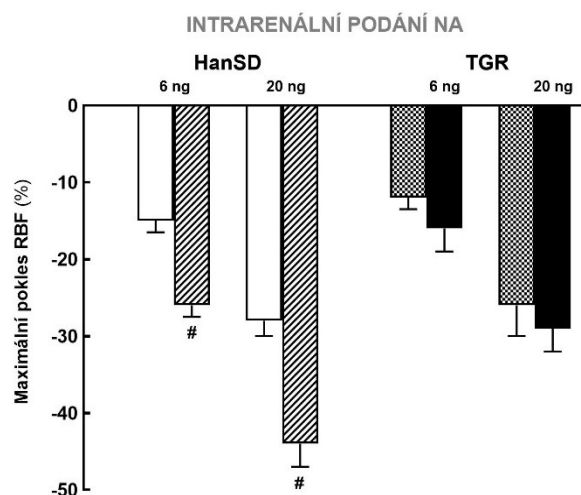
Odpověď na intrarenální podání endotelium-dependentních vazodilatačních látek (ACh a Bk) je ukázána v grafu 30. Podání ACh v dávkách 20 a 60 ng (graf 30A) vyvolalo u sham HanSD i sham TGR podobný vzestup RBF. Po indukci ACF byl tento vzestup u obou skupin signifikantně vyšší ve srovnání s odpovídající sham skupinou. Graf 30B znázorňuje intrarenální podání BK v dávkách 100 a 300 ng, které vyvolalo u obou sham skupin podobný vzestup RBF a stejně jako při podání ACh došlo u ACF TGR i ACF HanSD k signifikantně vyššímu vzestupu RBF ve srovnání s sham skupinami.

Graf 31 pak ukazuje odpovědi RBF na intrarenální podání vazodilatačních EETs (nativních 11,12-EETs a syntetického analogu 14,15-EETs (EETs-A)). Podání 11,12-EETs v dávkách 300 a 600 ng (graf 31A) vedlo k podobnému nárůstu RBF u sham TGR i sham HanSD. U HanSD potkanů nebyl pozorován rozdíl v odpovědi na 11,12 EETs ani po indukci ACF, zatímco u ACF TGR došlo po intrarenálním podání 11,12-EETs k signifikantně menšímu vzestupu ve srovnání s sham TGR. Po intrarenálním podání EETs-A v dávce 400 a 800 ng došlo k podobnému vzestupu RBF jako při podání nativních 11,12-EETs (graf 31B).

A)

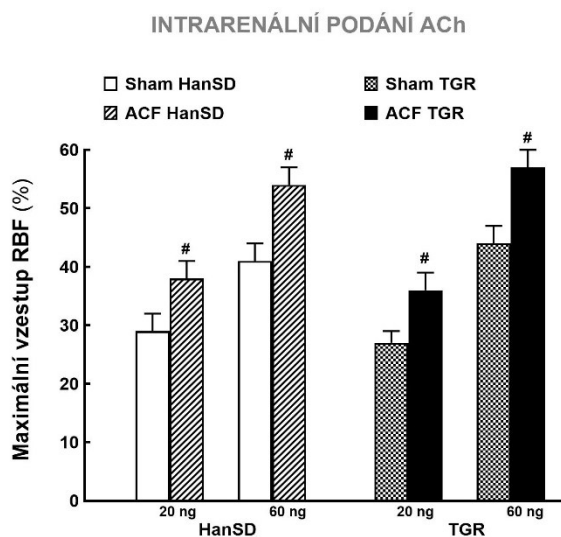


B)

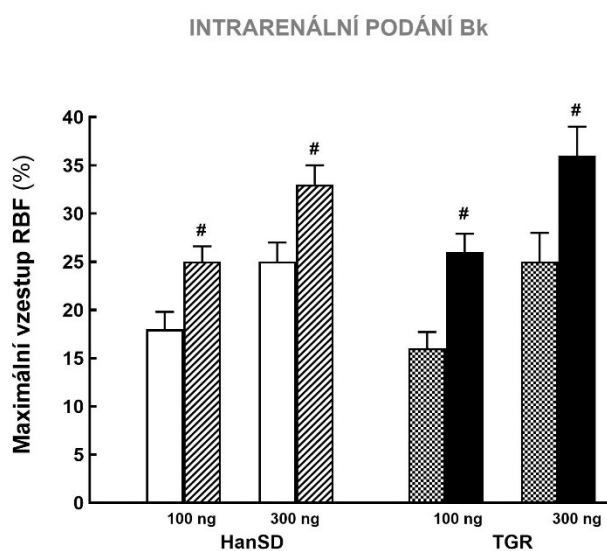


Graf 29: Maximální změna v RBF po intrarenálním podání bolusu Ang II v dávce 2 a 8 ng (A) a NA v dávce 6 a 20 ng (B) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). * $P < 0,05$ ve srovnání s sham HanSD (pro stejnou dávku AngII /NA). # $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou (pro stejnou dávku Ang II /NA)

A)

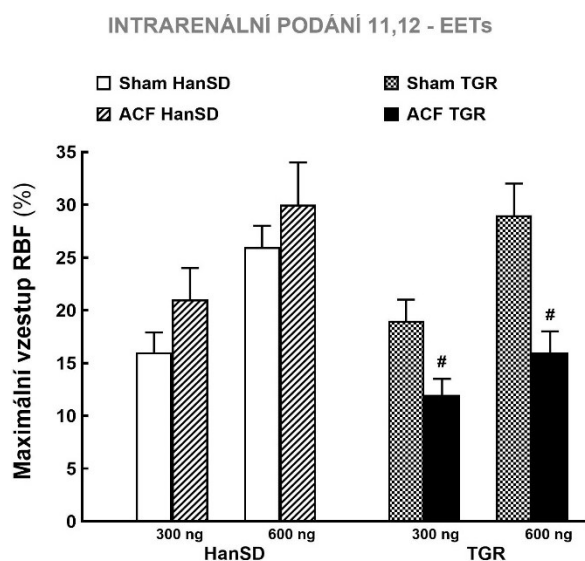


B)

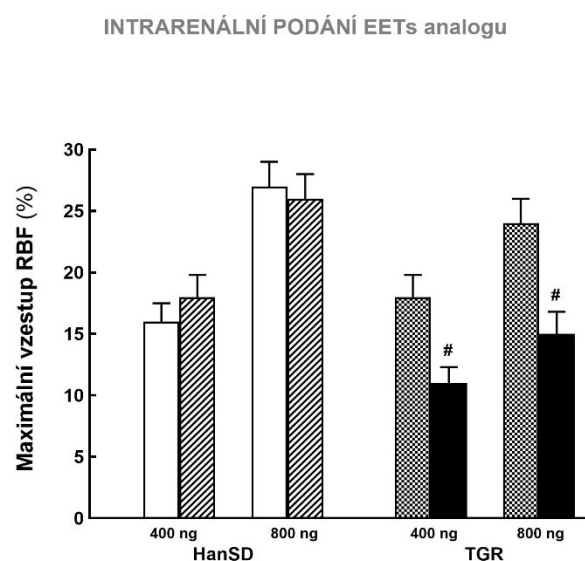


Graf 30: Maximální změna v RBF po intrarenálním podání bolusu ACh v dávce 20 a 60 ng (A) a BK v dávce 100 a 300 ng (B) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). # $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou (pro stejnou dávku ACh/Bk)

A)



B)



Graf 31: Maximální změna v RBF po intrarenálním podání bolusu nativních 11,12-EETs v dávce 300 a 600 ng (A) a analogu 14,15-EETs v dávce 400 a 800 ng (B) u zdánlivě operovaných (sham) HanSD a TGR potkanů a u HanSD a TGR potkanů s aorto-kavální píštělí (ACF). # $P < 0,05$ ve srovnání s odpovídající sham skupinou (pro stejnou dávku 11,12-EETs /EETs-A)

6.3.4 Diskuze ke Studii 3

Nejdůležitějším zjištěním této studie je, že intrarenální podání Ang II (v dávce, která neovlivňuje MAP) vedlo u ACF TGR potkanů v dekompenzované fázi CHF k většímu poklesu RBF. Oproti tomu u ACF HanSD, kteří byli stále v kompenzované fázi CHF, byl pokles RBF srovnatelný s kontrolní sham HanSD skupinou. Naopak intrarenální podání 11,12-EETs a analogu EET vedlo k významně menší odpovědi RBF u ACF TGR ve srovnání s ACF HanSD, zatímco odpovědi na NA, ACh a BK byly u obou skupin srovnatelné. Ale indukce ACF vedla u TGR potkanů k signifikantně větší odpovědi na endotelium-dependentní vazodilatační látky (ACh a BK) ve srovnání s sham TGR i sham HanSD. Tyto výsledky ukazují, že ACF TGR potkani vykazují zvýšenou vazokonstrikční intrarenální odpověď na Ang II a naopak sníženou vazodilatační reakci na EETs. Toto zjištění odpovídá naší hypotéze, že selektivně zvýšená renální vaskulární reaktivita na Ang II v kombinaci s narušenou schopností renální vazodilatační odpovědi na EETs se objevuje v dekompenzované fázi rozvoje CHF a že významně přispívá k rozvoji renální dysfunkce u Ang II dependentní formy hypertenze. Toto narušení renální vaskulární reaktivity a renální dysfunkce může být důvodem urychlení rozvoje dekompenzované fáze CHF s velmi špatnou prognózou.

Tyto závěry by však bylo dobré podpořit ještě zhodnocením intrarenální aktivace RAAS a sympatorenální osy. V souladu s dalšími studiemi naší laboratoře (Kopkan et al. 2005; Husková et al. 2006a; Varcabova et al. 2013) jsme potvrdili, že TGR potkani mají zvýšenou plazmatickou i renální koncentraci Ang II ve srovnání s normotenzními HanSD potkany. Plazmatické hladiny aldosteronu u sham TGR zvýšené nebyly, stejně jako v dalších studiích (Lee et al. 1996; Peters and Ganten 1998). To ukazuje, že exprese Ren-2 genu u TGR potkanů ovlivňuje hladiny aldosteronu zřejmě jen lokálně bez výrazných změn cirkulujících hladin. Navíc ani intrarenální a cirkulující hladiny NA nebyly u sham TGR potkanů zvýšené, což podporuje názor, že zvýšená aktivita SNS není primární důvod rozvoje hypertenze u tohoto modelu (Lee et al. 1996). Dalším důležitým poznatkem je, že i když plazmatické a renální koncentrace Ang 1-7 jsou u TGR a HanSD potkanů srovnatelné, rovnováha mezi vazodilatační a vazokonstrikční osou RAAS (poměr Ang 1-7: Ang II) je posunuta směrem k vazokonstrikční straně.

Dále naše výsledky ukázaly, že indukce ACF u toho modelu vede k dalšímu významnému nárůstu plazmatických hladin Ang II, aldosteronu a NA a také zvýšení intrarenální koncentrace Ang II a NA. Toto zjištění je v souladu s řadou nedávných studií (Abassi et al. 2011; Honetschlagerová et al. 2021b, a; Kratky et al. 2021; Kala et al. 2022; Miklovič et al. 2024) a potvrzuje, že u tohoto modelu CHF způsobeného objemovým přetížením dochází k aktivaci vazokonstrikční /Na⁺ retenční osy RAAS spolu s aktivací sympatorenální osy. Tyto výsledky podporují názor, že CHF není jen hemodynamická porucha, ale jedná se o neurohormonální syndrom (Abassi et al. 2011; Dube et al. 2011; Jönsson et al. 2014; Antoine et al. 2017). Indukce ACF u TGR potkanů je tedy doprovázena další výraznější aktivací vazokonstrikční osy RAAS, ke které u normotenzních potkanů nedošlo. Hladiny aldosteronu byly sice u obou ACF skupin zvýšeny podobně, ale u ACF TGR potkanů byla více aktivovaná vazodilatační a natriuretická osa RAAS (vyjádřená jako poměr Ang 1-7: Ang II v plazmě i v ledvině). To jednoznačně ukazuje na aktivaci kompenzačních mechanismů, které by mohly vyvažovat působení vazokonstrikční osy RAAS. Z těchto výsledků usuzujeme, že hyperaktivita vazokonstrikční / Na⁺ retenční osy RAAS je jedním z hlavních determinantů brzkého rozvoje dekompenzované fáze CHF u modelu ACF TGR.

Zhodnocení váhy orgánů ukázalo, v souladu s dalšími studiemi (Oliver-Dussault et al. 2010; Abassi et al. 2011; Melenovsky et al. 2012; Kala et al. 2017; Honetschlagerová et al. 2024), že 5 týdnů po vytvoření ACF potkani rozvíjí výraznou srdeční hypertrofii a plicní kongesci bez zvýšení váhy jater, která ukazuje na LV selhání. Novým poznatkem této studie je, že tyto změny jsou mnohem výraznější u ACF TGR než u ACF HanSD – ACF TGR potkani měli 72% nárůst

váhy plic oproti 22 % nárůstu u HanSD a 41% nárůst váhy LV proti HanSD s 25% nárůstem. Ačkoli jsou váhy orgánů považovány za nesofistikované a méně průkazné zhodnocení rozvoje srdečního selhání, řada studií, které hodnotily vztah mezi váhou orgánů a srdečními funkcemi pomocí echokardiografie a přímé tlakově objemové analýzy prokázala, že změny ve váze orgánů jsou relevantním ukazatelem rozvoje dekompenzované fáze srdečního selhání u experimentálních modelů CHF, zejména u modelů objemového přetížení (Oliver-Dussault et al. 2010; Hutchinson et al. 2011; Červenka et al. 2015; Miklovič et al. 2024). Tato data tedy ukazují, že ACF TGR potkanů měli již v 5. týdnu od vytvoření ACF rozvinuté srdeční selhání a že na rozdíl od HanSD potkanů velmi brzy přechází do dekompenzované fáze CHF.

Dalším zajímavým zjištěním této studie jsou odpovědi na intrarenální podání endothelium-dependentních vazodilatačních látek (ACh a BK). V souladu s dřívějšími pracemi (Jacinto et al. 1999; Kopkan et al. 2005) jsme u sham TGR potkanů nepozorovali zvýšenou renální vazodilatační odpověď na ACh a BK ve srovnání s HanSD potkany, takže zvýšená renální vaskulární odpověď TGR potkanů na Ang II nemůže být dána narušenou vaskulární reaktivitou na endogenní vazodilatační látky. U zvířat s ACF naše výsledky naznačují, že by jejich zvýšená reaktivita na vazodilatační látky mohla kompenzovat vazokonstrikční působení Ang II a zmírňovat tak pokles RBF u zvířat s ACF. Jsme si vědomi toho, že některé dřívější studie na lidech i zvířatech se srdečním selháním ukázaly naopak narušené odpovědi po podání endothelium-dependentních vazodilatačních látek a vysvětlovaly to jako jeden z důvodů rozvoje renální dysfunkce u CHF podílející se na rozvoji tohoto onemocnění (Kubo et al. 1991; Katz et al. 1993, 2005; Abassi et al. 2011). Tyto studie však hodnotily odpovědi RBF na systémové podání vazoaktivních látek, které vede k signifikantním změnám MAP a je známo, že změny v MAP vedou k aktivaci kompenzačních mechanismů, které mohly ovlivnit odpovědi v RBF, jak také ukázaly studie, které porovnávaly rozdíl v intrarenálním a intravenózním podání vazoaktivních látek u potkanů s CHF. Intravenózní podání ACh vedlo u zvířat s ACF ke snížené reaktivitě na ACh, zatímco při intrarenálním podání ACh byla reaktivita zvýšená nebo nebyl pozorován rozdíl. Vliv na vaskulární odpověď může mít také fáze rozvoje CHF a pohlaví (Kratky et al. 2018; Krátký et al. 2019). Proto se v současné době doporučuje hodnotit renální vaskulární reaktivitu na základě přímého intrarenálního podání vazoaktivních látek (Jacinto et al. 1999; Majid and Navar 2001; Kopkan et al. 2005; Honetschlagerová et al. 2021a).

Cílem této studie primárně nebylo odhalit všechny mechanismy odpovědné za signifikantně pozměněnou reaktivitu ACF TGR potkanů na Ang II a EETs, nicméně jistě může poskytnout další poznatky související s těmito změnami. Zvýšená vaskulární reaktivita na Ang II může být

dána zvýšením počtu AT₁R a AT₂R nebo jejich zvýšenou afinitou k Ang II. Již dříve bylo publikováno, že infuze Ang II u normotenzních (Harrison-Bernard et al. 2002) i TGR potkanů (Kopkan et al. 2005) neovlivnila množství AT₁R oproti kontrolním skupinám, přestože měli signifikantně zvýšenou koncentraci Ang II v cirkulaci i v ledvině. Zvýšená vaskulární reaktivita na Ang II by mohla být dána také zvýšenou citlivostí signální dráhy AT₁R v hladkých svalech cévní stěny ACF TGR potkanů. Vliv AT₂R se nezdá pravděpodobný, vzhledem k tomu, že exprese AT₂R je u TGR potkanů i Ang II indukovaných hypertenzních potkanů velmi nízká a neliší se od hodnot normotenzních kontrol (Pieruzzi et al. 1995; Harrison-Bernard et al. 2002; Kopkan et al. 2005). U modelu CHF indukovaného pomocí doxorubicinu rovněž nedošlo k ovlivnění exprese AT₂R u TGR potkanů (Jíchová et al. 2021). Také nedávná vazebná studie na ACF TGR potkanech ukázala, že v renálním kortexu je Ang II vázán pouze na AT₁R (Honetschlägerová et al. 2021). Proto zvýšená renální koncentrace Ang II, která působící pouze přes dráhu AT₁R negativně ovlivňuje renální hemodynamiku a tubulární reabsorpci a přispívá k rozvoji kardiorenálního syndromu u TGR s CHF.

Sníženou vazodilatační odpověď po podání EETs u ACF TGR potkanů není tak snadné vysvětlit jako v případě Ang II. EETs působí jako endoteliální hyperpolarizační faktor a jejich vazodilatorní působení je ovlivňováno řadou interakcí s hormonálními a parakrinními systémy jako je RAAS, SNS, endotelinový a NO systém (Imig 2016, 2019). Vzhledem k tomu, že výše zmíněné systémy jsou u CHF chronicky aktivované (Dube et al. 2011; Imig 2016; Patel et al. 2016; Antoine et al. 2017; Rossi et al. 2017; Packer and McMurray 2017; Miyauchi and Sakai 2019), je možné, že dochází k jejich interakcím a zapojení kompenzačních mechanismů, které pak mohou ovlivňovat renální vaskulární odpovědi na podání EETs, ať už nativních nebo jejich syntetického analogu. K vysvětlení interakcí těchto systémů by bylo potřeba další studie, které by se na toto téma zaměřily. Osvětlit tuto problematiku by mohly například studie využívající inhibitor sEH v kombinaci s farmakologickou bloádou RAAS, SNS nebo ET-1 systémů jako u nedávných studií na hypertenzních potkanech a potkanech s CKD (Honetschlägerová et al. 2013; Kala et al. 2017; Čertíková Chábová et al. 2018, 2019). Tyto práce ukázaly příznivý vliv kombinace sEH inhibitoru a RAAS blokády. Ale v případě přidání blokády ET_A receptoru ke kombinované blokádě RAAS a sEH došlo naopak ke zhoršení rozvoje CKD ve srovnání s použitím dvojkombinační léčby (Čertíková Chábová et al. 2019).

Je nutno zmínit také limitace této studie. Zvířata musí kvůli měření renálních vaskulárních odpovědí podstoupit operační proceduru, která je v naší laboratoři standardně zavedena (Jacinto et al. 1999; Kopkan et al. 2005; Kratky et al. 2018; Honetschlagerová et al. 2021a). Ale

vzhledem k tomu, že se jedná o značně invazivní zákrok, je možné, že ACF TGR a ACF HanSD potkani mohou odlišně reagovat na anestezii a chirurgický stres, což může ovlivnit výsledky *in vivo* studií. Jako druhou věc je nutno zmínit limitaci našeho modelu hypertenze a CHF. TGR potkani představují uměle vytvořený model hypertenze založený na inzerci myšího reninového genu (Ren-2) do genomu normotenzního zvířete, což vede ke zvýšené aktivaci RAAS (Mullins et al. 1990). ACF zase představuje specifický model CHF způsobeného objemovým přetížením, zatímco u většiny pacientů je důvod rozvoje CHF odlišný. Přesto se tento model v mnoha znacích shoduje s pacienty s neléčeným CHF, zejména neurohumorální aktivací a rozvojem renální dysfunkce (Oliver-Dussault et al. 2010; Abassi et al. 2011; Hutchinson et al. 2011; Melenovsky et al. 2012). Také naše dřívější studie (Červenka et al. 2015), která popisovala rozvoj ACF indukovaného u TGR potkanů ukázala, že pokles MAP (pod hodnoty sham HanSD potkanů) se po vytvoření ACF do 56 hodin vrátí na hodnoty srovnatelné s sham HanSD. Takže tyto hodnoty jsou stále v rozmezí autoregulační kapacity a normální funkce ledvin a poskytují tak vhodné bazální podmínky pro studium ACF u TGR potkanů. Proto považujeme ACF u TGR potkanů za vhodný model pro studium role hypertenze a RAAS v rozvoji CHF, zejména u forem CHF spojených s renální dysfunkcí.

6.3.5 Závěr Studie 3

Tato práce ukazuje, že indukce ACF vedla k výrazné aktivaci RAAS jak u normotenzních HanSD potkanů tak u TGR, u kterých navíc došlo k významným změnám renální vaskulární reaktivity. ACF TGR potkani vykazovali zvýšenou citlivost na Ang II a naopak sníženou citlivost na vazodilatační působení EETs. Tyto změny mohou hrát důležitou roli v rozvoji renální dysfunkce a spolu s hyperaktivitou vazokonstrikční osy RAAS a naopak sníženou aktivitou vazodilatační osy RAAS, by mohly být jedním z hlavních determinantů brzkého rozvoje dekompenzované fáze CHF u tohoto hypertenzního modelu. Tato zjištění by mohla přispět k rozvoji nových farmakologických přístupů pro léčbu renální dysfunkce u pacientů s CHF, zejména u pacientů s rozvinutou hypertenzí a rovněž u pacientů s rozvíjejícím se CHF.

7 Shrnutí

Tato práce, která se zabývala úlohou významných vazoaktivních systémů na experimentálních modelech CKD a CHF způsobeným objemovým přetížením u potkanů se spontánní nebo indukovanou hypertenzí, prokázala celou řadu důležitých patofyziologických interakcí mezi těmito systémy u výše zmíněných modelů.

Naše výsledky potvrdily hypotézu, že nadměrná aktivace vazokonstrikční osy RAAS se významně podílí na rozvoji hypertenze a orgánového poškození u CKD a CHF a souvisí se sníženou aktivitou protektivních systémů u těchto modelů, zejména systému NO, EETs a protektivní osy RAAS.

Dále tato práce ukázala, že u modelů CKD a CHF použitých v našich studiích dochází ke zvýšené citlivosti na vazokonstrikční látky, a že tyto změny mohou hrát důležitou roli v rozvoji renální dysfunkce a spolu se zvýšenou aktivitou RAAS urychlit rozvoj CHF. Výše studované modely CKD a CHF, jež vykazují nerovnováhu mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními substancemi a rovněž změny vaskulární citlivosti na tyto substance, by tak mohly být využity v dalším výzkumu s dostatečným impaktem pro potenciální využití i v klinické medicíně.

Potvrdily jsme i hypotézu, že inhibice sEH zmírní rozvoj CKD a CHF způsobeného objemovým přetížením u potkanů s geneticky podmíněným rozvojem hypertenze a CKD. Inhibice sEH, která zvyšuje biologickou dostupnost protektivních EETs ve tkáních, se tak jeví jako nová potenciální léčba vedle standardních doporučených léčebných postupů pro hypertenzi, CKD a CHF. Výsledky řady prací ukazují, že tyto inhibitory mají stále lepší farmakokinetiku a tím i vyšší účinnost. Vedle jejich antihypertenzního účinku mají inhibitory sEH také protektivní vliv proti rozvoji orgánového poškození a přímý vliv na zlepšení orgánových funkcí, zejména ledvin. Jako další krok budou nutné další studie, které by ověřili vliv dlouhodobého podávání těchto inhibitorů, zejména pak v kombinaci se standardní antihypertenzní léčbou.

Otázka možného klinického využití protektivních EETs analogů zůstává nadále otevřená vzhledem k jejich omezenému biologickému účinku a dostupnosti. Zásadní posun by mohl nastat díky novým stabilním variantám, které by se rovněž mohly podávat perorálně (Campbell et al. 2017; Imig et al. 2021).

8 Podpora

Studie č.1 byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-25396A, NV-18-02-00053 a NT/12171-5 a grantem Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 806314. Studie č.2 byla podpořena zejména z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. Č. 17-28220A. Spoluautoři studie byli též podporováni granty amerického National Institute of Health č. R01ES002710, P42ES004699 a R01DK103616. Studie č.3 byla primárně podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. Č. NMV-18-02-00053. Tato práce byla podpořena též projektem Národního institutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, číslo projektu: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

9 Použitá literatura

- Abassi Z, Goltsman I, Karram T, et al (2011) Aortocaval Fistula in Rat: A Unique Model of Volume-Overload Congestive Heart Failure and Cardiac Hypertrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011:1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/729497>
- Abassi ZA, Brodsky S, Karram T, et al (2001) Temporal changes in natriuretic and antinatriuretic systems after closure of a large arteriovenous fistula. *Cardiovasc Res* 51:567–576. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00245-0/2/51-3-567-GR5.GIF](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00245-0/2/51-3-567-GR5.GIF)
- Abbas A, Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG (1997) Angiotensin-(1-7) Induces Bradykinin-Mediated Hypotensive Responses in Anesthetized Rats. *Hypertension* 30:217–221. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.2.217>
- Ai D, Pang W, Li N, et al (2009) Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:564–569. https://doi.org/10.1073/PNAS.0811022106/SUPPL_FILE/0811022106SI.PDF
- Alhenc-Gelas F, Marchetti J, Allegrini J, et al (1981) Measurement of urinary kallikrein activity species differences in kinin production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 677:477–488. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90262-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90262-2)

- Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR (2017) Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 12:2032–2045. <https://doi.org/10.2215/CJN.11491116>
- Almeida AP, Frábregas BC, Madureira MM, et al (2000) Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:709–713. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000600012>
- Alonso-Galicia M, Maier KG, Greene AS, et al (2002) Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in the renal and vasoconstrictor actions of angiotensin II. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283:R60–R68. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00664.2001>
- Alves DT, Mendes LF, Sampaio WO, et al (2021) Hemodynamic phenotyping of transgenic rats with ubiquitous expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. *Clin Sci* 135:2197–2216. <https://doi.org/10.1042/CS20210599>
- Antoine S, Vaidya G, Imam H, Villarreal D (2017) Pathophysiologic Mechanisms in Heart Failure: Role of the Sympathetic Nervous System. *Am J Med Sci* 353:27–30. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.06.016>
- Araujo M, Wilcox CS (2014) Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid Redox Signal* 20:74–101. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5259>
- Ariel Gomez R, Sequeira-Lopez MLS (2018) Renin cells in homeostasis, regeneration and immune defence mechanisms. *Nature Reviews Nephrology* 2018 14:4 14:231–245. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.186>
- Arima S, Kohagura K, Xu H-L, et al (2003) Nongenomic Vascular Action of Aldosterone in the Glomerular Microcirculation. *Journal of the American Society of Nephrology* 14:2255–2263. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000083982.74108.54>
- Bader M, Steckelings UM, Alenina N, et al (2024) Alternative Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 81:964–976. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21364>
- Baker KM, Aceto JF (1990) Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 259:H610–H618. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.2.H610>

- Basting T, Lazardtignes E (2017) DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr Hypertens Rep* 19:32. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0731-4>
- Baylis C (2009) Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nat Rev Nephrol* 5:384–396. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2009.90>
- Bekassy Z, Lopatko Fagerström I, Bader M, Karpman D (2022) Crosstalk between the renin–angiotensin, complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. *Nat Rev Immunol* 22:411–428. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00634-8>
- Belloni AS, Rossi GP, Andreis PG, et al (1996) Endothelin Adrenocortical Secretagogue Effect Is Mediated by the B Receptor in Rats. *Hypertension* 27:1153–1159. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.27.5.1153>
- Boesen EI, Pollock JS, Pollock DM (2010) Contrasting effects of intervention with ET A and ET B receptor antagonists in hypertension induced by angiotensin II and high-salt diet This article is one of a selection of papers published in the two-part special issue entitled 20 Years of Endothelin Research. *Can J Physiol Pharmacol* 88:802–807. <https://doi.org/10.1139/Y10-051>
- Bohlender J, Ménard J, Edling O, et al (1998) Mouse and rat plasma renin concentration and gene expression in (mRen2)²⁷ transgenic rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274:H1450–H1456. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1450>
- Bonde MM, Olsen KB, Erikstrup N, et al (2011) The angiotensin II type 1 receptor antagonist Losartan binds and activates bradykinin B2 receptor signaling. *Regul Pept* 167:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.11.003>
- Boulanger C, Lüscher TF (1990) Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation* 85:587–590. <https://doi.org/10.1172/JCI114477>
- Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, et al (2021) Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure. *Eur J Heart Fail* 23:352–380. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2115>

- Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM (1996) Angiotensin-(1-7) Dilates Canine Coronary Arteries Through Kinins and Nitric Oxide. *Hypertension* 27:523–528. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.27.3.523>
- Browatzki M, Schmidt J, Kübler W, Kranzhöfer R (2000) Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF- κ B in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 95:98–105. <https://doi.org/10.1007/s003950050170>
- Bürgeľová M, Vaňourková Z, Thumová M, et al (2009) Impairment of the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin-(1-7)-Mas axis contributes to the acceleration of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. *J Hypertens* 27:1988–2000. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832f0d06>
- Burke M, Pabbidi M, Fan F, et al (2013) Genetic basis of the impaired renal myogenic response in FHH rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 304:. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00404.2012>
- Campbell DJ, Rong P, Kladis A, et al (1995) Angiotensin and Bradykinin Peptides in the TGR(mRen-2)27 Rat. *Hypertension* 25:1014–1020. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.25.5.1014>
- Campbell WB, Falck JR (2007) Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension* 49:590–596. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc>
- Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR (1996) Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ Res* 78:415–423. <https://doi.org/10.1161/01.RES.78.3.415>
- Campbell WB, Imig JD, Schmitz JM, Falck JR (2017) Orally Active Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 70:211–224. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000523>
- Campese VM, Kogosov E (1995) Renal Afferent Denervation Prevents Hypertension in Rats With Chronic Renal Failure. *Hypertension* 25:878–882. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.25.4.878>
- Cao W, Li A, Wang L, et al (2015) A salt-induced reno-cerebral reflex activates renin-angiotensin systems and promotes CKD progression. *Journal of the American Society of*

- Carey RM, Siragy HM (2003) Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocr Rev* 24:261–271. <https://doi.org/10.1210/ER.2003-0001>
- Carlström M (2021) Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nat Rev Nephrol* 17:575–590. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00429-z>
- Čertíková Chábová V, Vernerová Z, Kujal P, et al (2014) Addition of ETA receptor blockade increases renoprotection provided by renin–angiotensin system blockade in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic rats. *Life Sci* 118:297–305. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.018>
- Čertíková Chábová V, Kujal P, Škaroupková P, et al (2018) Combined Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase and Renin-Angiotensin System Exhibits Superior Renoprotection to Renin-Angiotensin System Blockade in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats with Established Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 43:329–349. <https://doi.org/10.1159/000487902>
- Čertíková Chábová V, Kujal P, Vaňourková Z, et al (2019) Addition of Endothelin A-Receptor Blockade Spoils the Beneficial Effect of Combined Renin-Angiotensin and Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition: Studies on the Course of Chronic Kidney Disease in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res* 44:1493–1505. <https://doi.org/10.1159/000504137>
- Červenka L, Bíbová J, Husková Z, et al (2015) Combined Suppression of the Intrarenal and Circulating Vasoconstrictor Renin-ACE-ANG II Axis and Augmentation of the Vasodilator ACE2-ANG 1-7-Mas Axis Attenuates the Systemic Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats Exposed to Chronic Hypoxia. *Physiol Res* 11–24. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932842>
- Červenka L, Husková Z, Kikerlová S, et al (2024) Transgenic rat with ubiquitous expression of angiotensin-(1-7)-producing fusion protein: a new tool to study the role of protective arm of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardio-renal diseases. *Hypertension Research*. <https://doi.org/10.1038/s41440-024-01995-y>

- Červenka L, Husková Z, Kopkan L, et al (2018) Two pharmacological epoxyeicosatrienoic acid-enhancing therapies are effectively antihypertensive and reduce the severity of ischemic arrhythmias in rats with angiotensin II-dependent hypertension. *J Hypertens* 36:1326–1341. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001708>
- ČERVENKA L, MELENOVSKÝ V, HUSKOVÁ Z, et al (2015) Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Does Not Improve the Course of Congestive Heart Failure and the Development of Renal Dysfunction in Rats With Volume Overload Induced by Aorto-Caval Fistula. *Physiol Res* 857–873. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932977>
- Cervenka L, Šimová M, Malý J, Heller J (2000) Úloha ledvin v dlouhodobé regulaci krevního tlaku a rozvoji hypertenze. *Cesk Fysiol* 49:116–33
- Chachaj A, Stanimirova I, Chabowski M, et al (2023) Sodium accumulation in the skin is associated with higher density of skin lymphatic vessels in patients with arterial hypertension. *Adv Med Sci* 68:276–289. <https://doi.org/10.1016/J.ADVMS.2023.08.001>
- Chaudhary KR, Cho WJ, Yang F, et al (2013) Effect of ischemia reperfusion injury and epoxyeicosatrienoic acids on caveolin expression in mouse myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 61:258–263. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E31827AFCEE>
- Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 35:769–773. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00309-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00309-6)
- Crowley SD, Coffman TM (2014) The inextricable role of the kidney in hypertension. *J Clin Invest* 124:2341–2347. <https://doi.org/10.1172/JCI72274>
- Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, et al (2005) Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *Journal of Clinical Investigation* 115:1092. <https://doi.org/10.1172/JCI200523378>
- Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, et al (1983) Remission of Essential Hypertension after Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine* 309:1009–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJM198310273091702>
- Dahl LK, Heine M (1975) Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res* 36:692–696. <https://doi.org/10.1161/01.RES.36.6.692>
- Dao VTV, Medini S, Bisha M, et al (2016) Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors. *Biochem Pharmacol* 112:24–36. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2016.05.011>

- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, et al (2016) Endothelin. *Pharmacol Rev* 68:357–418.
<https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>
- Davis MJ, Hill MA (1999) Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev* 79:387–423. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1999.79.2.387>
- De Boer RA, Pokharel S, Flesch M, et al (2004) Extracellular signal regulated kinase and SMAD signaling both mediate the angiotensin II driven progression towards overt heart failure in homozygous TGR(mRen2)27. *J Mol Med* 82:678–687.
<https://doi.org/10.1007/S00109-004-0579-3/FIGURES/6>
- De Mello WC, Walmor D, De Mello C (2004) Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. <http://dx.doi.org/103317/jraas2004041> 5:203–208.
<https://doi.org/10.3317/JRAAS.2004.041>
- Deferrari G, Cipriani A, La Porta E (2021) Renal dysfunction in cardiovascular diseases and its consequences. *J Nephrol* 34:137–153. <https://doi.org/10.1007/S40620-020-00842-W/TABLES/2>
- Di Lullo L, Bellasi A, Barbera V, et al (2017) Pathophysiology of the cardio-renal syndromes types 1–5: An uptodate. *Indian Heart J* 69:255–265.
<https://doi.org/10.1016/J.IHJ.2017.01.005>
- DiBona GF (2000) Neural control of the kidney: Functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:.
<https://doi.org/10.1152/AJPREGU.2000.279.5.R1517/ASSET/IMAGES/LARGE/H61100203005.JPEG>
- Ding J, Yu M, Jiang J, et al (2020) Angiotensin II Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A Pathway. *Front Physiol* 11:.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.566410>
- DINH DT, FRAUMAN AG, JOHNSTON CI, FABIANI ME (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100:481–492.
<https://doi.org/10.1042/CS1000481>
- Doleželová Š, Jíchová Š, Husková Z, et al (2016) Progression of hypertension and kidney disease in aging fawn-hooded rats is mediated by enhanced influence of renin–angiotensin

- system and suppression of nitric oxide system and epoxyeicosanoids. *Clin Exp Hypertens* 38:644–651. <https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1182182>
- D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, et al (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81:503–510. <https://doi.org/10.1139/y03-032>
- Dos Santos EA, Dahly-Vernon AJ, Hoagland KM, Roman RJ (2004) Inhibition of the formation of EETs and 20-HETE with 1-aminobenzotriazole attenuates pressure natriuresis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287:R58–R68. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00713.2003>
- Dube P, Weber KT, Weber KT (2011) Congestive Heart Failure: Pathophysiologic Consequences of Neurohormonal Activation and the Potential for Recovery: Part I. *Am J Med Sci* 342:348–351. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318232750d>
- Dvořák P, Kramer HJ, Bäcker A, et al (2004) Blockade of Endothelin Receptors Attenuates End-Organ Damage in Homozygous Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats. *Kidney Blood Press Res* 27:248–258. <https://doi.org/10.1159/000080052>
- Elks CM, Mariappan N, Haque M, et al (2009) Chronic NF-κB blockade reduces cytosolic and mitochondrial oxidative stress and attenuates renal injury and hypertension in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:298–305. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.90628.2008/SUPPL_FILE/SUPP_MAT.PDF
- Elmarakby AA (2012) Reno-protective mechanisms of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302:R321–R330. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00606.2011>
- Emori T, Hirata Y, Ohta K, et al (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* 18:165–170. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.18.2.165>
- Erdős EG, Tan F, Skidgel RA (2010) Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* 55:214–220. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144600/ASSET/C9A5C3B4-263F-4AB7-88FD-6AA23B3DA392/ASSETS/GRAPHIC/11FF1.JPEG>
- Evans LC, Dayton A, Osborn JW (2024) Renal nerves in physiology, pathophysiology and interoception. *Nature Reviews Nephrology* 2024 21:1 21:57–69. <https://doi.org/10.1038/s41581-024-00893-3>

- Falck JR, Koduru SR, Mohapatra S, et al (2014) 14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic Acid (14,15-EET) Surrogates: Carboxylate Modifications. *J Med Chem* 57:6965–6972. <https://doi.org/10.1021/jm500262m>
- Fan F, Geurts AM, Pabbidi MR, et al (2020a) A Mutation in γ -Adducin Impairs Autoregulation of Renal Blood Flow and Promotes the Development of Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 31:687–700. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019080784>
- Fan F, Sun C-W, Maier KG, et al (2013) 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Contributes to the Inhibition of K⁺ Channel Activity and Vasoconstrictor Response to Angiotensin II in Rat Renal Microvessels. *PLoS One* 8:e82482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082482>
- Fan L, Gao W, Liu Y, et al (2021) Knockout of γ -Adducin Promotes NG-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester–Induced Hypertensive Renal Injury. *J Pharmacol Exp Ther* 377:189–198. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000408>
- Fan L, Gao W, Nguyen B V., et al (2020b) Impaired renal hemodynamics and glomerular hyperfiltration contribute to hypertension-induced renal injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 319:F624–F635. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00239.2020>
- Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, et al (1997) Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). *Hypertension* 30:535–541. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.3.535>
- Ferreira AJ, Santos RAS, Bradford CN, et al (2010) Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Hypertension* 55:207–213. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140145>
- Fleck C, Janz A, Schweitzer F, et al (2001) Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. *Kidney Int Suppl* 59:S14–S18. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.59780014.x>
- Gauthier KM, Yang W, Gross GJ, Campbell WB (2007) Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids in Vascular Regulation and Cardiac Preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:601–608. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318159cbe3>
- Goulopoulou S, Webb RC (2014) The symphony of vascular contraction: How smooth muscle cells lose harmony to signal increased vascular resistance in hypertension. *Hypertension* 63:e33. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02444>

- Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW (2020) Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* 22:1342–1356. <https://doi.org/10.1002/ehhf.1858>
- Gross V, Roman RJ, Cowley AW (1994) Abnormal pressure-natriuresis in transgenic renin gene rats. *J Hypertens* 12:1029–34
- Guyton AC (1987) Renal function curve--a key to understanding the pathogenesis of hypertension. *Hypertension* 10:1–6. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.10.1.1>
- Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, et al (1972) Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 52:584–594. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(72\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(72)90050-2)
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II–induced hypertension and vascular dysfunction. *Journal of Experimental Medicine* 204:2449–2460. <https://doi.org/10.1084/JEM.20070657>
- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 54:469–487
- Hansen PB, Castrop H, Briggs J, Schnermann J (2003) Adenosine induces vasoconstriction through Gi-dependent activation of phospholipase C in isolated perfused afferent arterioles of mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 14:2457–2465. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000086474.80845.25>
- Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS (2021) Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circ Res* 128:847–863. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318082>
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, et al (1997) Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 273:F170–F177. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.1997.273.1.F170>
- Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, et al (2002) Intrarenal AT1 receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 282:F19–F25. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.0335.2000>
- Hatt PY, Rakusan K, Gastineau P, et al (1980) Aorto-caval fistula in the rat. An experimental model of heart volume overloading. *Basic Res Cardiol* 75:105–108. <https://doi.org/10.1007/BF02001401>

- Hayward R, Hydock DS (2007) Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46:20–32
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G (2001) Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* 37:72–76. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.1.72>
- Heller J, Schubert G, Havlíčková J, Thureau K (1993) The role of the kidney in the development of hypertension a transplantation study in the prague hypertensive rat. *Pflugers Arch* 425:208–212. <https://doi.org/10.1007/BF00374168>/METRICS
- Hering D, Marusic P, Duval J, et al (2017) Effect of renal denervation on kidney function in patients with chronic kidney disease. *Int J Cardiol* 232:93–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.047>
- Honetschlagerová Z, Gawrys O, Jíchová Š, et al (2021a) Renal Sympathetic Denervation Attenuates Congestive Heart Failure in Angiotensin II-Dependent Hypertension: Studies with Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats with Aortocaval Fistula. *Kidney Blood Press Res* 46:95–113. <https://doi.org/10.1159/000513071>
- Honetschlägerová Z, Hejnová L, Novotný J, et al (2021) Effects of Renal Denervation on the Enhanced Renal Vascular Responsiveness to Angiotensin II in High-Output Heart Failure: Angiotensin II Receptor Binding Assessment and Functional Studies in Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats. *Biomedicines* 9:1803. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121803>
- Honetschlägerová Z, Husková Z, Kikerlová S, et al (2024) Renal sympathetic denervation improves pressure-natriuresis relationship in cardiorenal syndrome: insight from studies with Ren-2 transgenic hypertensive rats with volume overload induced using aorto-caval fistula. *Hypertension Research* 47:998–1016. <https://doi.org/10.1038/s41440-024-01583-0>
- Honetschlägerová Z, Husková Z, Vaňourková Z, et al (2011a) Renal mechanisms contributing to the antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Physiol* 589:207–219. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199505>
- Honetschlägerová Z, Kitada K, Husková Z, et al (2013) Antihypertensive and renoprotective actions of soluble epoxide hydrolase inhibition in ANG II-dependent malignant

- hypertension are abolished by pretreatment with L-NAME. *J Hypertens* 31:321–332. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32835b50aa>
- Honetschlagerová Z, Škaroupková P, Kikerlová S, et al (2021b) Effects of renal sympathetic denervation on the course of congestive heart failure combined with chronic kidney disease: Insight from studies with fawn-hooded hypertensive rats with volume overload induced using aorto-caval fistula. *Clin Exp Hypertens* 43:522–535. <https://doi.org/10.1080/10641963.2021.1907398>
- Honetschlägerová Z, Sporková A, Kopkan L, et al (2011b) Inhibition of soluble epoxide hydrolase improves the impaired pressure–natriuresis relationship and attenuates the development of hypertension and hypertension-associated end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 29:1590–1601. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328349062f>
- Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, et al (2012) Animal Models of Heart Failure. *Circ Res* 111:131–150. <https://doi.org/10.1161/RES.0b013e3182582523>
- Hsu C-N, Tain Y-L (2019) Regulation of Nitric Oxide Production in the Developmental Programming of Hypertension and Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 20:681. <https://doi.org/10.3390/ijms20030681>
- Huang A, Sun D, Jacobson A, et al (2005) Epoxyeicosatrienoic Acids Are Released to Mediate Shear Stress–Dependent Hyperpolarization of Arteriolar Smooth Muscle. *Circ Res* 96:376–383. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000155332.17783.26>
- Husková Z, Kopkan L, Červenková L, et al (2016) Intrarenal alterations of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin 1–7 complex of the renin-angiotensin system do not alter the course of malignant hypertension in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43:438–449. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12553>
- Husková Z, Kramer HJ, Thumová M, et al (2006a) Effects of Anesthesia on Plasma and Kidney ANG II Levels in Normotensive and ANG II-Dependent Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res* 29:74–83. <https://doi.org/10.1159/000092981>
- Husková Z, Kramer HJ, Vaňourková Z, Červenka L (2006b) Effects of changes in sodium balance on plasma and kidney angiotensin II levels in anesthetized and conscious Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 24:517–527. <https://doi.org/10.1097/01.HJH.0000209988.51606.C7>

- Hutchinson KR, Guggilam A, Cismowski MJ, et al (2011) Temporal pattern of left ventricular structural and functional remodeling following reversal of volume overload heart failure. *J Appl Physiol* 111:1778–1788. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00691.2011>
- Imig JD (2019) Epoxyeicosanoids in hypertension. *Physiol Res* 68:695–704. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.934291>
- Imig JD (2016) Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function. pp 105–141
- Imig JD (2018) Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics. *Pharmacol Ther* 192:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.015>
- Imig JD (2005) Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 289:F496–F503. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00350.2004>
- Imig JD, Khan MAH, Burkhan A, et al (2021) Kidney-Targeted Epoxyeicosatrienoic Acid Analog, EET-F01, Reduces Inflammation, Oxidative Stress, and Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Int J Mol Sci* 22:1–14. <https://doi.org/10.3390/IJMS22062793>
- Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 92:398–403. <https://doi.org/10.1172/JCI116579>
- Iwai M, Horiuchi M (2009) Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT1 receptor axis vs. ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. *Hypertension Research* 32:533–536. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.74>
- Jacinto SM, Mullins JJ, Mitchell KD (1999) Enhanced renal vascular responsiveness to angiotensin II in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 276:F315–F322. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.276.2.F315>
- Jaspard E, Wei L (1993) DIFFERENCES IN THE PROPERTIES AND ENZYMATIC SPECIFICITIES OF THE 2 ACTIVE-SITES OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME (KININASE-II)-STUDIES WITH BRADYKININ AND OTHER NATURAL PEPTIDE Bioinformatics analysis of the structure-function relationship of dehydration stress proteins View project. Article in *Journal of Biological Chemistry*

- Jia G, Habibi J, Aroor AR, et al (2016) Endothelial Mineralocorticoid Receptor Mediates Diet-Induced Aortic Stiffness in Females. *Circ Res* 118:935–943. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308269>
- Jiang J-G, Ning Y-G, Chen C, et al (2007) Cytochrome P450 Epoxygenase Promotes Human Cancer Metastasis. *Cancer Res* 67:6665–6674. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3643>
- Jichová Š, Doleželová Š, Kopkan L, et al (2016a) Fenofibrate Attenuates Malignant Hypertension by Suppression of the Renin-angiotensin System: A Study in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats. *American Journal of the Medical Sciences* 352:. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.09.008>
- Jichová Š, Gawryś O, Kompanowska-Jezierska E, et al (2021) Kidney Response to Chemotherapy-Induced Heart Failure: mRNA Analysis in Normotensive and Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats. *Int J Mol Sci* 22:8475. <https://doi.org/10.3390/ijms22168475>
- Jichová Š, Kopkan L, Husková Z, et al (2016b) Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates the development of malignant hypertension, but does not reverse it once established: a study in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 34:2008. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001029>
- Jogendran R, Upagupta C, Pankiw M, et al (2025) TOWARDS A UNIVERSAL DEFINITION FOR RIGHT HEART FAILURE:A WORK IN PROGRESS. *Canadian Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/J.CJCA.2025.01.035>
- Jönsson S, Agic MB, Narfström F, et al (2014) Renal neurohormonal regulation in heart failure decompensation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307:R493–R497. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00178.2014>
- Kagiyama S, Eguchi S, Frank GD, et al (2002) Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 106:909–912. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000030181.63741.56>
- Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O (2007) Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7576–7581. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0701617104>

- Kala P, Bartušková H, Piřha J, et al (2020) Deleterious Effects of Hyperactivity of the Renin-Angiotensin System and Hypertension on the Course of Chemotherapy-Induced Heart Failure after Doxorubicin Administration: A Study in Ren-2 Transgenic Rat. *Int J Mol Sci* 21:9337. <https://doi.org/10.3390/ijms21249337>
- Kala P, Gawrys O, Miklovič M, et al (2022) Endothelin type A receptor blockade attenuates aorto-caval fistula-induced heart failure in rats with angiotensin II-dependent hypertension. *J Hypertens*. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003307>
- Kala P, Sedláková L, Škaroupková P, et al (2017) Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Blockade, Alone or Combined With Blockade of Soluble Epoxide Hydrolase, on the Course of Congestive Heart Failure and Occurrence of Renal Dysfunction in Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats With Aorto-Caval Fistula. *Physiol Res* 401–415. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933757>
- Kaltenecker CC, Domenig O, Kopecky C, et al (2020) Critical Role of Neprilysin in Kidney Angiotensin Metabolism. *Circ Res* 127:593–606. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316151>
- Kaplan AP, Ghebrehiwet B (2010) The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 47:2161–2169. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.05.010>
- Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, et al (2005) Vascular Endothelial Dysfunction and Mortality Risk in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 111:310–314. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000153349.77489.CF>
- Katz SD, Schwarz M, Yuen J, LeJemtel TH (1993) Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation* 88:55–61. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.1.55>
- Kaur J, Young B, Fadel P (2017) Sympathetic Overactivity in Chronic Kidney Disease: Consequences and Mechanisms. *Int J Mol Sci* 18:1682. <https://doi.org/10.3390/ijms18081682>
- Kawabe K, Watanabe TX, Shiono K, Sokabe H (1978) Influence on Blood Pressure of Renal Isografts between Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats, Utilizing the F1 Hybrids. *Jpn Heart J* 19:886–894. <https://doi.org/10.1536/IHJ.19.886>

- Kayashima Y, Smithies O, Kakoki M (2012) The kallikrein–kinin system and oxidative stress. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21:92–96. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32834d54b1>
- Khan MAH, Falck JR, Manthathi VL, et al (2014a) Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates angiotensin II hypertension and kidney injury. *Front Pharmacol* 5:. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00216>
- Khan MAH, Pavlov TS, Christain S V., et al (2014b) Epoxyeicosatrienoic acid analogue lowers blood pressure through vasodilation and sodium channel inhibition. *Clin Sci (Lond)* 127:463. <https://doi.org/10.1042/CS20130479>
- Khurana V, Goswami B (2022) Angiotensin converting enzyme (ACE). *Clinica Chimica Acta* 524:113–122. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2021.10.029>
- Kittikulsuth W, Pollock JS, Pollock DM (2011) Sex Differences in Renal Medullary Endothelin Receptor Function in Angiotensin II Hypertensive Rats. *Hypertension* 58:212–218. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.172734>
- Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Bernard LM, Navar LG (2003) Urinary Angiotensinogen as an Indicator of Intrarenal Angiotensin Status in Hypertension. *Hypertension* 41:42–49. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000050102.90932.CF>
- Kobori H, Urushihara M, Xu JH, et al (2010) Urinary angiotensinogen is correlated with blood pressure in men (Bogalusa Heart Study). *J Hypertens* 28:1422–1428. <https://doi.org/10.1097/HJH.0B013E3283392673>
- Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM (2011) Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 91:1–77. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00060.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011125650012.JPEG>
- Komers R, Plotkin H (2016) Dual inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system and endothelin-1 in treatment of chronic kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310:R877–R884. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00425.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60101690090002.JPEG>

- Kopkan L, Červenka L (2009) Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. *Physiol Res* S55–S68. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931917>
- Kopkan L, Husková Z, Sporková A, et al (2012) Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Exhibits Antihypertensive Actions Independently of Nitric Oxide in Mice with Renovascular Hypertension. *Kidney Blood Press Res* 35:595–607. <https://doi.org/10.1159/000339883>
- Kopkan L, Kramer HJ, Husková Z, et al (2005) The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 23:1531–1539. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000174972.46663.5e>
- Kopkan L, Majid DSA (2005) Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension* 46:1026–1031. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000174989.39003.58>
- Krämer BK, Ritthaler T, Ackermann M, et al (1994) Endothelium-mediated regulation of renin secretion. *Kidney Int* 46:1577–1579. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.451>
- Krátký V, Kikerlová S, Husková Z, et al (2019) Enhanced Renal Vascular Responsiveness to Angiotensin II and Norepinephrine: A Unique Feature of Female Rats with Congestive Heart Failure. *Kidney Blood Press Res* 44:1128–1141. <https://doi.org/10.1159/000502379>
- Kratky V, Kopkan L, Kikerlova S, et al (2018) The Role of Renal Vascular Reactivity in the Development of Renal Dysfunction in Compensated and Decompensated Congestive Heart Failure. *Kidney Blood Press Res* 43:1730–1741. <https://doi.org/10.1159/000495391>
- Kratky V, Vanourkova Z, Sykora M, et al (2021) AT1 receptor blocker, but not an ACE inhibitor, prevents kidneys from hypoperfusion during congestive heart failure in normotensive and hypertensive rats. *Sci Rep* 11:4271. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83906-6>
- Kriz W, Hosser H, Hähnel B, et al (1998) From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrology Dialysis Transplantation* 13:2781–2798. <https://doi.org/10.1093/NDT/13.11.2781>
- Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, et al (1991) Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84:1589–1596. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.84.4.1589>

- Kuijpers MHM, De Jong W (1986) Spontaneous hypertension in the fawn-hooded rat: a cardiovascular disease model. *J Hypertens Suppl* 4:S41-4
- Kujal P, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, et al (2014) Inhibition of soluble epoxide hydrolase is renoprotective in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:227–237. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12204>
- Kumagai H, Averill DB, Khosla MC, Ferrario CM (1993) Role of nitric oxide and angiotensin II in the regulation of sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21:476–484. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.21.4.476>
- Kumar G, Dey SK, Kundu S (2020) Functional implications of vascular endothelium in regulation of endothelial nitric oxide synthesis to control blood pressure and cardiac functions. *Life Sci* 259:118377. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118377>
- Lai J, Chen C (2021) The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Front Physiol* 12:. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.642470>
- Lala A, Desai AS (2014) The Role of Coronary Artery Disease in Heart Failure. *Heart Fail Clin* 10:353–365. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2013.10.002>
- Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, et al (1996) The Hypertensive Ren-2 Transgenic Rat TGR (mREN2) 27 in Hypertension Research Characteristics and Functional Aspects. *Am J Hypertens* 9:506–512. [https://doi.org/10.1016/0895-7061\(95\)00400-9](https://doi.org/10.1016/0895-7061(95)00400-9)
- Langstan JB, Guyton AC, Douglas BH, et al (1963) Effect of Changes in Salt Intake on Arterial Pressure and Renal Function in Partially Nephrectomized Dogs. *Circ Res* 12:508–513. <https://doi.org/10.1161/01.RES.12.5.508>
- Lee MAE, Böhm M, Paul M, et al (1996) Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. <https://doi.org/10.1152/ajpendo19962706E919> 270:. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1996.270.6.E919>
- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, et al (2019) Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension* 73:e87–e120. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>
- Lin Y-J, Kwok C-F, Juan C-C, et al (2014) Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 451:263–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.119>

- Liu Z, Peng J, Lu F, et al (2013) Salt Loading and Potassium Supplementation: Effects on Ambulatory Arterial Stiffness Index and Endothelin-1 Levels in Normotensive and Mild Hypertensive Patients. *The Journal of Clinical Hypertension* 15:485–496. <https://doi.org/10.1111/jch.12109>
- López B, Ryan RP, Moreno C, et al (2006) Identification of a QTL on chromosome 1 for impaired autoregulation of RBF in fawn-hooded hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290:F1213–F1221. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00335.2005>
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7:156–167. <https://doi.org/10.1038/NRD2466>
- Machnik A, Dahlmann A, Kopp C, et al (2010) Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor c expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension* 55:755–761. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143339/SUPPL_FILE/SUP_ZHY143339-S1.PDF
- Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, et al (2009) Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C–dependent buffering mechanism. *Nature Medicine* 2009 15:5 15:545–552. <https://doi.org/10.1038/nm.1960>
- Mahabeer R (2000) Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* 88:77–89. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00080-2)
- Majid DSA, Navar LG (2001) Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 14:74S–82S. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(01\)02073-8/2/AJH.74S.F5.JPEG](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(01)02073-8/2/AJH.74S.F5.JPEG)
- Mancia G, Kreutz R, Brunström M, et al (2023) 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension: Endorsed by the International Society of Hypertension (ISH) and the European Renal Association (ERA). *J Hypertens* 41:1874–2071. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000003480>

- Matsuda K, Lozinskaya I, Cox RH (1997) Augmented contributions of voltage-gated Ca²⁺ channels to contractile responses in spontaneously hypertensive rat mesenteric arteries. *Am J Hypertens* 10:1231–1239. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(97\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(97)00225-2)
- Mattson DL, Dwinell MR, Greene AS, et al (2007) Chromosomal mapping of the genetic basis of hypertension and renal disease in FHH rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 293:F1905–F1914. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00012.2007>
- McEvoy JW, McCarthy CP, Bruno RM, et al (2024) 2024 ESC Guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension: Developed by the task force on the management of elevated blood pressure and hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and endorsed by the European Society of Endocrinology (ESE) and the European Stroke Organisation (ESO). *Eur Heart J* 45:3912–4018. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHAE178>
- Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00287.2006>
- Melenovsky V, Skaroupkova P, Benes J, et al (2012) The Course of Heart Failure Development and Mortality in Rats with Volume Overload due to Aorto-Caval Fistula. *Kidney Blood Press Res* 35:167–173. <https://doi.org/10.1159/000331562>
- Mendelsohn ME (2005) In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. *J Clin Invest* 115:840–844. <https://doi.org/10.1172/JCI24806>
- Messerli FH (1982) CARDIOVASCULAR EFFECTS OF OBESITY AND HYPERTENSION. *The Lancet* 319:1165–1168. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)92234-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)92234-6)
- Messerli FH, Rimoldi SF, Bangalore S (2017) The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail* 5:543–551. <https://doi.org/10.1016/J.JCHF.2017.04.012>
- Metra M, Teerlink JR (2017) Heart failure. *The Lancet* 390:1981–1995. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31071-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31071-1)
- Miklovič M, Gawryś O, Honetschlägerová Z, et al (2024) Renal denervation improves cardiac function independently of afterload and restores myocardial norepinephrine levels in a rodent heart failure model. *Hypertension Research*. <https://doi.org/10.1038/s41440-024-01580-3>

- Miyauchi T, Sakai S (2019) Endothelin and the heart in health and diseases. *Peptides* (NY) 111:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.10.002>
- Mohammadi K, Shafie D, Ghomashi N, et al (2024) Kinin-kallikrein system: New perspectives in heart failure. *Heart Fail Rev* 29:729–737. <https://doi.org/10.1007/S10741-024-10393-Y/METRICS>
- Mohite S, Sanches M, Teixeira AL (2020) Exploring the Evidence Implicating the Renin-Angiotensin System (RAS) in the Physiopathology of Mood Disorders. *Protein Pept Lett* 27:449–455. <https://doi.org/10.2174/0929866527666191223144000>
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, et al (2002) Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circ Res* 90:. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000012569.55432.02>
- Mullins JJ, Peters J, Ganten D (1990) Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344:541–544. <https://doi.org/10.1038/344541a0>
- Murad F (1994) Regulation of Cytosolic Guanylyl Cyclase by Nitric Oxide: The NO-Cyclic GMP Signal Transduction System. *Adv Pharmacol* 26:19–33. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60049-6](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60049-6)
- Nakano Y, Hirano T, Uehara K, et al (2008) New rat model induced by anti-glomerular basement membrane antibody shows severe glomerular adhesion in early stage and quickly progresses to end-stage renal failure. *Pathol Int* 58:361–370. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2008.02237.x>
- Navar LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA (2011) Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension* 57:355–362. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163519/ASSET/DF6730EC-3253-41D7-A383-A9BCD2A13E94/ASSETS/GRAPHIC/ZHY0031112690006.JPEG>
- Neckář J, Hsu A, Hye Khan MdA, et al (2018) Infarct size-limiting effect of epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B is mediated by hypoxia-inducible factor-1 α via downregulation of prolyl hydroxylase 3. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 315:H1148–H1158. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00726.2017>
- Norlander AE, Saleh MA, Kamat N V., et al (2016) Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* 68:167–174. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493>

- Ochodnický P, Henning RH, Buikema HJ, et al (2010) Renal vascular dysfunction precedes the development of renal damage in the hypertensive Fawn-Hooded rat. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 298:F625–F633. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00289.2009>
- Oliver-Dussault C, Ascah A, Marcil M, et al (2010) Early predictors of cardiac decompensation in experimental volume overload. *Mol Cell Biochem* 338:271–282. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0361-5>
- Oni-Orisan A, Deng Y, Schuck RN, et al (2013) Dual modulation of cyclooxygenase and CYP epoxygenase metabolism and acute vascular inflammation in mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 104–105:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.09.003>
- Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, et al (2018) Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 4:18014. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2018.14>
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87:315. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00029.2006>
- Packer M, McMurray JJ V (2017) Importance of endogenous compensatory vasoactive peptides in broadening the effects of inhibitors of the renin-angiotensin system for the treatment of heart failure. *The Lancet* 389:1831–1840. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30969-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30969-2)
- Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY (2016) Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. *Circ Res* 118:1313–1326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307708>
- Persson AEG, Lai EY, Gao X, et al (2013) Interactions between adenosine, angiotensin II and nitric oxide on the afferent arteriole influence sensitivity of the tubuloglomerular feedback. *Front Physiol* 4:. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2013.00187>
- Peters J, Ganten D (1998) Adrenal Renin Expression and its Role in ren-2 Transgenic Rats TGR(mREN2)27. *Hormone and Metabolic Research* 30:350–354. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978897>
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44:503–512. <https://doi.org/10.1161/01.RES.44.4.503>

- Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA (2019) Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res* 124:1598–1617. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.313572>
- Piechota A, Polańczyk A, Gorąca A (2010) Role of endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and oxidative stress. *Pharmacological Reports* 62:28–34. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70240-1](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70240-1)
- Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR (1995) Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Heart, Kidneys, and Lungs of Rats With Experimental Heart Failure. *Circulation* 92:3105–3112. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.10.3105>
- Pinto YM, Paul M, Ganten D (1998) Lessons from rat models of hypertension: From Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39:77–88. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00077-7/2/39-1-77-FIG4.GIF](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00077-7/2/39-1-77-FIG4.GIF)
- Pozzi A, Popescu V, Yang S, et al (2010) The Anti-tumorigenic Properties of Peroxisomal Proliferator-activated Receptor α Are Arachidonic Acid Epoxygenase-mediated. *Journal of Biological Chemistry* 285:12840–12850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081554>
- Provoost AP, Shiozawa M, Van Dokkum RPE, Jacob HJ (2002) Transfer of the *Rf-1* region from FHH onto the ACI background increases susceptibility to renal impairment. *Physiol Genomics* 8:123–129. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00030.2000>
- Rangel-Filho A, Lazar J, Moreno C, et al (2013) Rab38 Modulates Proteinuria in Model of Hypertension-Associated Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 24:283. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012090927>
- Reddy YS, Kiranmayi VS, Bitla AR, et al (2015) Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. *Indian J Nephrol* 25:287–291. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.147376>
- Ren YL, D'Ambrosio MA, Garvin JL, et al (2009) Possible mediators of connecting tubule glomerular feedback. *Hypertension* 53:319–323. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.124545>
- Renna NF, De Las Heras N, Miatello RM (2013) Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. *Int J Hypertens* 2013:808353. <https://doi.org/10.1155/2013/808353>
- Richard E. Klabunde (2021) *Cardiovascular Physiology Concepts*, 3rd edn. Wolters Kluwer

- Riehle C, Bauersachs J (2019) Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res* 115:1838–1849. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVZ161>
- Rocic P, Schwartzman ML (2018) 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacol Ther* 192:74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.004>
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, et al (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:8277–8281. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8277>
- Roman RJ (2002) P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function. *Physiol Rev* 82:131–185. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2001>
- Roman RJ (2024) 20-HETE and Hypertension. *Hypertension* 81:2012–2015. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.124.21718/ASSET/C19506E5-EDCA-454A-A717-AE27C099EABF/ASSETS/GRAPHIC/HYPERTENSIONAHA.124.21718.FIG01.JPG>
- Romero CA, Carretero OA (2019) Tubule-vascular feedback in renal autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 316:F1218–F1226. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00381.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20041987670005.JPEG>
- Rossi F, Mascolo A, Mollace V (2017) The pathophysiological role of natriuretic peptide-RAAS cross talk in heart failure. *Int J Cardiol* 226:121–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.03.080>
- Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, et al (2003) Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:8258–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, et al (2004) Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 17:292–299. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00227.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH70230405490008.JPEG>
- Sasser JM, Pollock JS, Pollock DM (2002) Renal endothelin in chronic angiotensin II hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283:R243–R248. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00086.2002>

- Schiffrin E (2001) Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14:S83–S89. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(01\)02074-X](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(01)02074-X)
- Schiffrin EL (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2005.03.004>
- Schiffrin EL, Pollock DM (2024) Endothelin System in Hypertension and Chronic Kidney Disease. *Hypertension* 81:691–701. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.21716>
- Schmaier AH (2003) The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00535.2002>
- Sedláková L, Čertíková Chábová V, Doleželová Š, et al (2017) Renin–angiotensin system blockade alone or combined with ETA receptor blockade: effects on the course of chronic kidney disease in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 39:183–195. <https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1235184>
- Selvarajah V, Mäki-Petäjä KM, Pedro L, et al (2017) Novel Mechanism for Buffering Dietary Salt in Humans: Effects of Salt Loading on Skin Sodium, Vascular Endothelial Growth Factor C, and Blood Pressure. *Hypertension* 70:930–937. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10003/SUPPL_FILE/HYP_HYPE2_01710003D_SUPP1.PDF
- Semenikhina M, Bohovyk R, Fedoriuk M, et al (2024) Renin-angiotensin system-mediated nitric oxide signaling in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 327:F532–F542. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00316.2023/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPRENAL.00316.2023_F008.JPEG
- Sequeira López MLS, Pentz ES, Nomasa T, et al (2004) Renin Cells Are Precursors for Multiple Cell Types that Switch to the Renin Phenotype When Homeostasis Is Threatened. *Dev Cell* 6:719–728. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00134-0)
- Shinohara K (2024) Renal denervation: a key approach to hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension Research* 2024 47:10 47:2671–2677. <https://doi.org/10.1038/s41440-024-01776-7>
- Simões E Silva AC, Bello APC, Baracho NCV, et al (1998) Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive

- and hypertensive rats. *Regul Pept* 74:177–184. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00038-X)
- Simons JL, Provoost AP, Anderson S, et al (1993) Pathogenesis of glomerular injury in the fawn-hooded rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 3:1775–1782. <https://doi.org/10.1681/ASN.V3111775>
- Singh RR, Easton LK, Booth LC, et al (2016) Renal Nitric Oxide Deficiency and Chronic Kidney Disease in Young Sheep Born with a Solitary Functioning Kidney. *Scientific Reports* 2016 6:1 6:1–11. <https://doi.org/10.1038/srep26777>
- Singh RR, McArdle ZM, Booth LC, et al (2021) Increase in Bioavailability of Nitric Oxide after Renal Denervation Improves Kidney Function in Sheep with Hypertensive Kidney Disease. *Hypertension* 77:1299–1310. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16718>
- Siragy HM, Xue C, Abadir P, Carey RM (2005) Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension* 45:133–137. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000149105.75125.2a>
- Sporková A, Jichová Š, Husková Z, et al (2014) Different mechanisms of acute versus long-term antihypertensive effects of soluble epoxide hydrolase inhibition: Studies in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:1003–1013. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12310>
- Sporková A, Kopkan L, Varcabová Š, et al (2011) Role of cytochrome P-450 metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300:R1468–R1475. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00215.2010>
- Tain YL, Lee C Te, Chan JYH, Hsu CN (2016) Maternal melatonin or N-acetylcysteine therapy regulates hydrogen sulfide-generating pathway and renal transcriptome to prevent prenatal NG-Nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME)-induced fetal programming of hypertension in adult male offspring. *Am J Obstet Gynecol* 215:636.e1-636.e72. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2016.07.036>
- Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA (1994) Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res* 75:105–113. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.1.105>

- Thomas WG, Mendelsohn FAO (2003) Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol* 35:774–779. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00263-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00263-7)
- Thomson SJ, Askari A, Bishop-Bailey D (2012) Anti-Inflammatory Effects of Epoxyeicosatrienoic Acids. *Int J Vasc Med* 2012:605101. <https://doi.org/10.1155/2012/605101>
- Totoń-Żuranska J, Mikolajczyk TP, Saju B, Guzik TJ (2024) Vascular remodelling in cardiovascular diseases: hypertension, oxidation, and inflammation. *Clin Sci* 138:817–850. <https://doi.org/10.1042/CS20220797>
- Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, et al (2018) Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res* 114:529. <https://doi.org/10.1093/CVR/CRY023>
- Triebel H, Castrop H (2024) The renin angiotensin aldosterone system. *Pflugers Arch* 476:705–713. <https://doi.org/10.1007/S00424-024-02908-1/FIGURES/2>
- Tronik D, Rougeon F (1988) Thyroxine and testosterone transcriptionally regulate renin gene expression in the submaxillary gland of normal and transgenic mice carrying extra copies of the Ren2 gene. *FEBS Lett* 234:336–340. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80111-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80111-X)
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, et al (1999) Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *Journal of Clinical Investigation* 104:925–935. <https://doi.org/10.1172/JCI7886>
- Urushihara M, Kagami S (2017) Role of the intrarenal renin–angiotensin system in the progression of renal disease. *Pediatric Nephrology* 32:1471–1479. <https://doi.org/10.1007/S00467-016-3449-7/TABLES/1>
- Urushihara M, Kondo S, Kagami S, Kobori H (2010) Urinary Angiotensinogen Accurately Reflects Intrarenal Renin-Angiotensin System Activity. *Am J Nephrol* 31:318–325. <https://doi.org/10.1159/000286037>
- Vacková Š, Kikerlová S, Melenovsky V, et al (2019a) Altered Renal Vascular Responsiveness to Vasoactive Agents in Rats with Angiotensin II-Dependent Hypertension and Congestive Heart Failure. *Kidney Blood Press Res* 44:. <https://doi.org/10.1159/000501688>
- Vacková Š, Kopkan L, Kikerlová S, et al (2019b) Pharmacological Blockade of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates the Progression of Congestive Heart Failure Combined

With Chronic Kidney Disease: Insights From Studies With Fawn-Hooded Hypertensive Rats. *Front Pharmacol* 10:. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00018>

van Dokkum RP, Jacob HJ, Provoost AP (1997) Difference in susceptibility of developing renal damage in normotensive fawn-hooded (FHL) and August x Copenhagen Irish (ACI) rats after N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester induced hypertension. *Am J Hypertens* 10:1109–16. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(97\)00163-5](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(97)00163-5)

Van Dokkum RPE, Alonso-Galicia M, Provoost AP, et al (1999a) Impaired autoregulation of renal blood flow in the fawn-hooded rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276:R189–R196. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.1.R189>

Van Dokkum RPE, Sun CW, Provoost AP, et al (1999b) Altered renal hemodynamics and impaired myogenic responses in the fawn- hooded rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276:. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1999.276.3.R855/ASSET/IMAGES/LARGE/AREG70314007X.JPEG>

van Rodijnen WF, van Lambalgen TA, Tangelder G-J, et al (2002) Reduced Reactivity of Renal Microvessels to Pressure and Angiotensin II in Fawn-Hooded Rats. *Hypertension* 39:111–115. <https://doi.org/10.1161/hy1201.096817>

Vaněčková I, Kramer HJ, Bäcker A, et al (2006) Early-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 rats. *Vascul Pharmacol* 45:163–170. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.05.003>

Varcabova S, Huskova Z, Kramer HJ, et al (2013) Antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats is mediated by suppression of the intrarenal renin–angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40:273–281. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12018>

Vavrinec P, Henning RH, Goris M, et al (2013) Renal myogenic constriction protects the kidney from age-related hypertensive renal damage in the Fawn-Hooded rat. *J Hypertens* 31:1637–1645. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328361d506>

Vernerová Z, Kramer HJ, Bäcker A, et al (2008) Late-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous REN-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol* 48:165–173. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.01.009>

- Verseput GH, Braam B, Provoost AP, Koomans HA (1998) Tubuloglomerular feedback and prolonged ACE-inhibitor treatment in the hypertensive fawn-hooded rat. *Nephrol Dial Transplant* 13:893–899. <https://doi.org/10.1093/NDT/13.4.893>
- Verseput GH, Koomans HA, Braam B, et al (2000) ACE inhibition delays development of terminal renal failure in the presence of severe albuminuria. *American Journal of Kidney Diseases* 35:202–210. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(00\)70327-1](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(00)70327-1)
- Verseput GH, Provoost AP, Braam BB, et al (1997) Angiotensin-converting enzyme inhibition in the prevention and treatment of chronic renal damage in the hypertensive fawn-hooded rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 8:249–259. <https://doi.org/10.1681/ASN.V82249>
- Von Thun AM, Vari RC, el-Dahr SS, Navar LG (1994) Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 266:F120–F128. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1994.266.1.F120>
- Wang H, Romero CA, Juncos JXM, et al (2017) Effect of salt intake on afferent arteriolar dilatation: role of connecting tubule glomerular feedback (CTGF). *Am J Physiol Renal Physiol* 313:F1209–F1215. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00320.2017>
- Watanabe H, Belyea BC, Paxton RL, et al (2021) Renin Cell Baroreceptor, a Nuclear Mechanotransducer Central for Homeostasis. *Circ Res* 129:262–276. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318711>
- Weber MA, Mahfoud F, Schmieder RE, et al (2019) Renal Denervation for Treating Hypertension. *JACC Cardiovasc Interv* 12:1095–1105. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2019.02.050>
- Westenend PJ, Nooyen YA, van der Krogt JA, et al (1992) The effect of a converting enzyme inhibitor upon renal damage in spontaneously hypertensive Fawn Hooded rats. *J Hypertens* 10:417–422. <https://doi.org/10.1097/00004872-199205000-00003>
- Wiebe JC, Wagner AM (2015) Endocrine Regulatory Mechanisms of Blood Flow: Vasoactive Peptides. In: *PanVascular Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 4597–4606
- Wiig H, Schroder A, Neuhofer W, et al (2013) Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *Journal of Clinical Investigation* 123:2803–2815. <https://doi.org/10.1172/JCI60113>

- Williams B, Mancia G, Spiering W, et al (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 39:3021–3104. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHY339>
- Williams JM, Murphy S, Burke M, Roman RJ (2010) 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid: A New Target for the Treatment of Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 56:336–344. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181f04b1c>
- Winaver J, Hoffman A, Burnett JC, Haramati A (1988) Hormonal determinants of sodium excretion in rats with experimental high-output heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 254:R776–R784. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.254.5.R776>
- Wong S, Brennan FE, Young MJ, et al (2007) A Direct Effect of Aldosterone on Endothelin-1 Gene Expression *in Vivo*. *Endocrinology* 148:1511–1517. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0965>
- Wu CC, Mei S, Cheng J, et al (2013) Androgen-sensitive hypertension associates with upregulated vascular CYP4A12-20-HETE synthase. *J Am Soc Nephrol* 24:1288–1296. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070714>
- Wu LL, Zhang Y, Li XZ, et al (2022) Impact of Selective Renal Afferent Denervation on Oxidative Stress and Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants (Basel)* 11:. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11051003>
- Xiao L, Harrison DG (2020) Inflammation in Hypertension. *Can J Cardiol* 36:635. <https://doi.org/10.1016/J.CJCA.2020.01.013>
- Yang T (2023) Soluble (Pro)Renin Receptor in Hypertension. *Nephron* 147:234–243. <https://doi.org/10.1159/000525635>
- Yang T, Gao ZX, Mao ZH, Wu P (2025) Soluble (pro)renin receptor as a novel regulator of renal medullary Na⁺ reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 328:F239–F247. https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00156.2024/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AJPRENAL.00156.2024_F0-1.PNG
- Yang Z, Wang Q, Liu Y, et al (2023) Gut microbiota and hypertension: association, mechanisms and treatment. *Clin Exp Hypertens* 45:. <https://doi.org/10.1080/10641963.2023.2195135>

- YAO L, KOBORI H, RAHMAN M, et al (2004) Olmesartan Improves Endothelin-Induced Hypertension and Oxidative Stress in Rats. *Hypertension Research* 27:493–500. <https://doi.org/10.1291/hypres.27.493>
- Yayama K, Hiyoshi H, Imazu D, Okamoto H (2006) Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. *Hypertension* 48:958–964. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000244108.30909.27>
- Yayama K, Okamoto H (2008) Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 8:312–318. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2007.06.012>
- Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Campese VM (2002) Renal injury caused by intrarenal injection of phenol increases afferent and efferent renal sympathetic nerve activity. *Am J Hypertens* 15:717–724. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(02\)02959-X](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(02)02959-X)
- Yip KP, Balasubramanian L, Kan C, et al (2018) Intraluminal pressure triggers myogenic response via activation of calcium spark and calcium-activated chloride channel in rat renal afferent arteriole. *Am J Physiol Renal Physiol* 315:F1592–F1600. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00239.2018/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH20101886150006.JPEG>
- Zeldin DC (2001) Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 276:36059–36062. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100030200>
- Zhang C, Booz GW, Yu Q, et al (2018) Conflicting roles of 20-HETE in hypertension and renal end organ damage. *Eur J Pharmacol* 833:190–200. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.010>
- Zhang G-X, Ohmori K, Nagai Y, et al (2007) Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol* 42:804–811. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.01.012>
- Zhang H, Xie S, Deng W (2024) Mitophagy in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: Insights into Molecular Biology and Novel Therapeutic Strategies. *Biomolecules* 14:1614. <https://doi.org/10.3390/biom14121614>

- Zhang Z, Zhao L, Zhou X, et al (2023) Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Front Immunol* 13:1098725. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1098725>
- Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, et al (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2012-7>
- Zhou XJ, Vaziri ND, Zhang J, et al (2002) Association of renal injury with nitric oxide deficiency in aged SHR: Prevention by hypertension control with AT1 blockade. *Kidney Int* 62:914–921. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1755.2002.00516.X>
- Zhu Q-F, Hao Y-H, Liu M-Z, et al (2015) Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid by stable isotope probe labeling coupled with ultra high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1410:154–163. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.100>