

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**Úloha Rho-kinázové signální dráhy v regulaci krevního tlaku
u normotenzních a hypertenzních potkanů**

The role of Rho-kinase signaling pathway in the regulation of blood
pressure
in normotensive and in hypertensive rats

Aneta Brunová

Praha 2015

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Josef Zicha, DrSc.

Akademie věd České republiky

Fyziologický ústav

Oddělení Experimentální hypertenze

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. 7. 2015

Aneta Brunová

Poděkování

Ráda bych poděkovala MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. za jeho odborné vedení, vstřícnost a trpělivost. Velmi si vážím také pomoci ostatních členů oddělení Experimentální hypertenze, a jsem jim vděčná za přátelskou podporu, kterou mi poskytovali během celého mého studia.

Abstrakt

Vápníková senzitivace představuje mechanismus umožňující buňkám hladké svaloviny cév zvyšovat podle potřeby citlivost kontraktilního aparátu k intracelulárnímu kalciumu. Cílem této práce bylo určit, do jaké míry je vápníková senzitivace ovlivňována působením renin-angiotenzinového systému (RAS), sympatického nervového systému (SNS), oxidu dusnatého (NO) a prostanoidů produkovaných cyklooxygenázou (COX). Za tímto účelem jsme studovali účinek akutní a chronické blokády jednotlivých systémů na změny krevního tlaku vyvolané podáním inhibitoru Rho-kinázy fasudilu u bdělých normotenzních potkanů. Všechny pokusy byly prováděny na chronicky kanylovaných dospělých samcích kmene Wistar. Hlavní zjištění práce jsou následující: 1) Dávkově závislý pokles krevního tlaku vyvolaný inhibicí Rho-kinázy byl zesílen současnou akutní inhibicí NOS pomocí L-NAME. Inhibice NOS měla výrazně větší účinek než inhibice COX pomocí indometacinu (což bylo potvrzeno také za podmínek akutní inhibice SNS a RAS). Tyto nálezy jsou v souladu s hypotézou, že NO má supresivní účinek na vápníkovou senzitivaci. 2) Chronická inhibice NOS vyvolala hypertenzi spojenou s výraznějším poklesem krevního tlaku po podání fasudilu ve srovnání s kontrolou. NO dlouhodobě potlačuje vápníkovou senzitivaci. 3) Chronická inhibice RAS podáváním captoprilu způsobila snížení odpovědi na fasudil. RAS svým dlouhodobým působením podporuje u normotenzních potkanů vápníkovou senzitivaci. 4) Chronické podávání inhibitoru uvolňování katecholaminů guanethidinu nezpůsobilo změnu odpovědi krevního tlaku na fasudil. Nebyl zjištěn žádný dlouhodobý efekt SNS na vápníkovou senzitivaci. Výsledky souhrnně ukazují, že při udržování normálního krevního tlaku je důležitá rovnováha mezi působením NO a RAS na vápníkovou senzitivaci v buňkách hladké svaloviny cév.

Klíčová slova: Hypertenze; Rho-kináza; vápníková senzitivace, oxid dusnatý, renin-angiotenzinový systém, sympatický nervový systém

Abstract

Calcium sensitization represents a mechanism that enables vascular smooth muscle cells to change the sensitivity of the contractile apparatus to intracellular calcium. The aim of this study was to determine to what extent is calcium sensitization modulated by the renin-angiotensin system (RAS), sympathetic nervous system (SNS), nitric oxide (NO) and prostanoids produced by cyclooxygenase (COX). For this purpose we studied the effects of acute and chronic blockade of particular systems on blood pressure changes elicited in conscious normotensive rats by administration of Rho-kinase inhibitor fasudil. Adult male chronically cannulated Wistar rats were used in all experiments. Main findings of this study are as follows: 1) Decrease of blood pressure elicited by Rho-kinase inhibition was enhanced under the conditions of acute NOS inhibition. Inhibition of NOS was shown to have a bigger effect than COX inhibition (this was confirmed under the conditions of acute RAS and SNS inhibition as well). These findings are in agreement with the hypothesis that NO exerts a suppressive effect on calcium sensitization. 2) Chronic NOS inhibition caused hypertension characterized by a more pronounced blood pressure lowering after Rho-kinase inhibition in comparison with control. NO chronically suppresses the calcium sensitization. 3) In contrast chronic inhibition of RAS by captopril led to lowering of the response to fasudil. Thus RAS enhances calcium sensitization through its long-term effects. 4) Chronic administration of inhibitor of catecholamine release guanethidine did not change the blood pressor response to fasudil. Long-term effect of the SNS on calcium sensitization was not found. The results collectively show that balance between RAS and NO is important in maintenance of normal blood pressure.

Key words: Hypertension; Rho-kinase; calcium sensitization, nitric oxide, renin-angiotensin system, sympathetic nervous system

Seznam zkratek

4-AP	4-aminopyridin	4-aminopyridine
AngII	angiotenzin II	angiotensin II
ANOVA	analýza variance	analysis of variance
AT1R	receptor angiotenzinu II typu 1	angiotenzin II type 1 receptor
BK_{Ca}	vápníkem ovládaný draslíkový kanál o velké vodivosti	large conductance calcium- activated potassium channel
BPM	tepů za minutu	beats per minute
Ca²⁺	vápenatý/é iont/y	calcium ion/s
CaM	kalmodulin	calmodulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát	cyclic adenosine monophosphate
CAPTO	captopril	captopril
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát	cyclic guanosine monophosphate
COX	cyklooxygenáza	cyclooxygenase
CPI-17	inhibitor myosinofosfatázy potencovaný proteinkinázou C	protein kinase C -potentiated myosin phosphatase inhibitor
CTRL	kontrola	control
DAG	diacylglycerol	diacyl glycerol
DMSO	dimethylsulfoxid	dimethyl sulfoxide
DS	Dahlovi sůl-senzitivní potkani	Dahl salt-sensitive rats
eNOS	endoteliální NO syntáza	endothelial NO synthase
eNOS^{-/-}	geneticky manipulovaný jedinec s vyřazeným genem pro eNOS	eNOS knock out
FAS	fasudil	fasudil
GEF	nukleotidový výměnný faktor pro guanosinové nukleotidy	guanine nucleotide exchange factor
GPCR	receptor spojený s G-proteinem	G protein-coupled receptor
GUA	guanethidin	guanethidine
G$\alpha_{12/13}$	α podjednotka G-proteinu typu 12/13	G-protein α subunit type 12/13
G$\alpha_{q/11}$	α podjednotka G-proteinu typu q/11	G-protein α subunit type q/11
HR	srdeční frekvence	heart rate
INDO	indometacin	indomethacine
iNOS	inducibilní NO syntáza	inducible NO synthase
IP3	inositoltrisfosfát	inositol trisphosphate
ISO	isoprenalin	isoprenaline
K_v	napětově ovládaný draslíkový kanál	voltage-gated potassium channel
L-NAME	N ^o -nitro-L-argininmethylester	N ^o -nitro-L-arginine methyl ester
L-VDCC	napětově-závislý Ca ²⁺ kanál	voltage-gated Ca ²⁺ channel
MAP	střední arteriální tlak	mean arterial pressure

MLCK	kináza lehkého řetězce myosinu	myosin light chain kinase
MLCP	fosfatáza lehkého řetězce myosinu	myosin light chain phosphatase
mmHg	milimetr rtuti (Torr)	millimeter of mercury (Torr)
MYOSIN-P	fosforylovaný myosin	phosphorylated myosin
Na⁺	sodné ionty	sodium ions
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPHox	NADPH oxidáza	NADPH oxidase
NGF	nervový růstový faktor	nerve growth factor
NIF	nifedipin	nifedipine
NO	oxid dusnatý	nitric oxide
NOS	NO syntáza	NO synthase
PENTO	pentolinium	pentolinium
PGI₂	prostaglandin I ₂ (prostacyclin)	prostaglandin I ₂ (prostacyclin)
PLC-β	fosfolipáza C - β	phospholipase C - β
RAS	renin-angiotenzinový systém	renin-angiotensin system
RhoA	malá GTPáza RhoA	small GTPase RhoA
ROCK	Rho-kináza	Rho kinase
ROS	kyslíkové radikály	reactive oxygen species
SEM	střední chyba průměru	standard error mean
sGC	solubilní guanylatecykláza	soluble guanylate cyclase
SHR	spontánně hypertenzní potkan/i	spontaneously hypertensive rat/s
SM	hladký sval/hladkosvalový	smooth muscle
SNS	sympatický nervový systém	sympathetic nervous system
SR	sarkoplazmatické retikulum	sarcoplasmatic reticulum
TEA	tetraethylamonium	tetraethylamonium
TEM	tempol	tempol
TK	krevní tlak	blood pressure
TRP	kanál přechodného receptorového potenciálu	transient receptor potential channel
TYR	tyramin	tyramine
VSMC	hladkosvalová/é buňka/y cév	vascular smooth muscle cell/s
WKY	potkan/i Wistar-Kyoto	Wistar-Kyoto rat/s
α₁-AR	α ₁ -adrenergní receptor	α ₁ -adrenergic receptor
Δ % MAP	změna středního arteriálního tlaku v procentech	mean arterial pressure change in percentage
Δ HR	změna srdeční frekvence	heart rate change
Δ MAP	změna středního arteriálního tlaku	mean arterial pressure change

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Kontrakce hladkého svalu a úloha vápníkové senzitivace.....	2
2.2	Regulace krevního tlaku – rovnováha vazokonstrikčních a vazodilatačních signálů.....	4
2.2.1	Hormonální systémy působící na VSMC	4
2.2.2	Působení SNS na vápníkovou senzitivaci.....	6
2.2.3	Působení RAS na vápníkovou senzitivaci	8
2.2.4	Působení NO na vápníkovou senzitivaci	9
2.2.5	Působení produktů COX na vápníkovou senzitivaci	11
2.3	NO-deficientní potkani – model hypertenze	13
2.3.1	Základní charakteristika modelu	13
2.3.2	Vápníková senzitivace a úloha ROS.....	14
3	Cíle diplomové práce.....	16
4	Materiál a metody.....	17
5	Výsledky.....	20
5.1	Akutní inhibice vybraných humorálních systémů a její vliv na změny TK po inhibici Rho-kinázy	20
5.1.1	Inhibice humorálních vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů u intaktních potkanů	20
5.1.2	Inhibice Rho-kinázy u intaktních potkanů.....	21
5.1.3	Účinek inhibice vazodilatačních systémů.....	23
5.1.4	Účinek inhibice Rho-kinázy na změny TK po blokádě vazodilatačních systémů.....	24
5.1.5	Účinek inhibice vazopresorických systémů	25
5.2	Dlouhodobá inhibice humorálních systémů a její vliv na změny TK po inhibici Rho-kinázy.....	30
5.2.1	Chronická inhibice sympatického nervového systému časným podáváním guanethidinu	30
5.2.2	Chronická inhibice RAS.....	32
5.2.3	Chronická inhibice NOS.....	33
5.2.4	Vliv snížení hladiny ROS za podmínek chronické inhibice NOS.....	34
6	Diskuze.....	35
6.1	Vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou je významný regulační mechanismus TK u hypertenzních i normotenzních potkanů.	36
6.2	Vzestup krevního tlaku po akutní inhibici vazodilatačních systémů (NOS a COX) je závislý na vápníkové senzitivaci.....	36

6.3	NO-cGMP signální dráha inhibuje u bdělých normotenzních potkanů vápníkovou senzitivaci	37
6.4	Dlouhodobá NO-deficience vyvolává hypertenzi charakterizovanou zvýšeným příspěvkem vápníkové senzitivace k udržování krevního tlaku.....	39
6.5	RAS a SNS se liší svým příspěvkem k udržování vápníkové senzitivace.....	40
7	Závěr.....	43
8	Literatura	44
9	Příloha	50

1 Úvod

Normální krevní tlak je významným předpokladem dobrého zdraví. Studium řízení krevního tlaku je důležité pro pochopení rozvoje hypertenze a onemocnění, která s ní souvisejí.

Je známo, že příspěvek Rho-kinázy k udržování krevního tlaku se může lišit u normotenzních a hypertenzních zvířat (Uehata, 1997). Modely experimentální hypertenze se liší změnami, které prodělávají hormonální systémy regulující kontraktilitu hladké svaloviny cév. Předpokládá se, že vazodilatační látky snižují vápníkovou senzitivitu zprostředkovanou Rho-kinázou, zatímco vazokonstrikční látky jí zvyšují. Cílem experimentální části této diplomové práce bylo ověřit toto tvrzení, a porovnat mezi sebou vliv vybraných vazokonstriktorů a vazodilatátorů na vápníkovou senzitivitu zprostředkovanou Rho-kinázou.

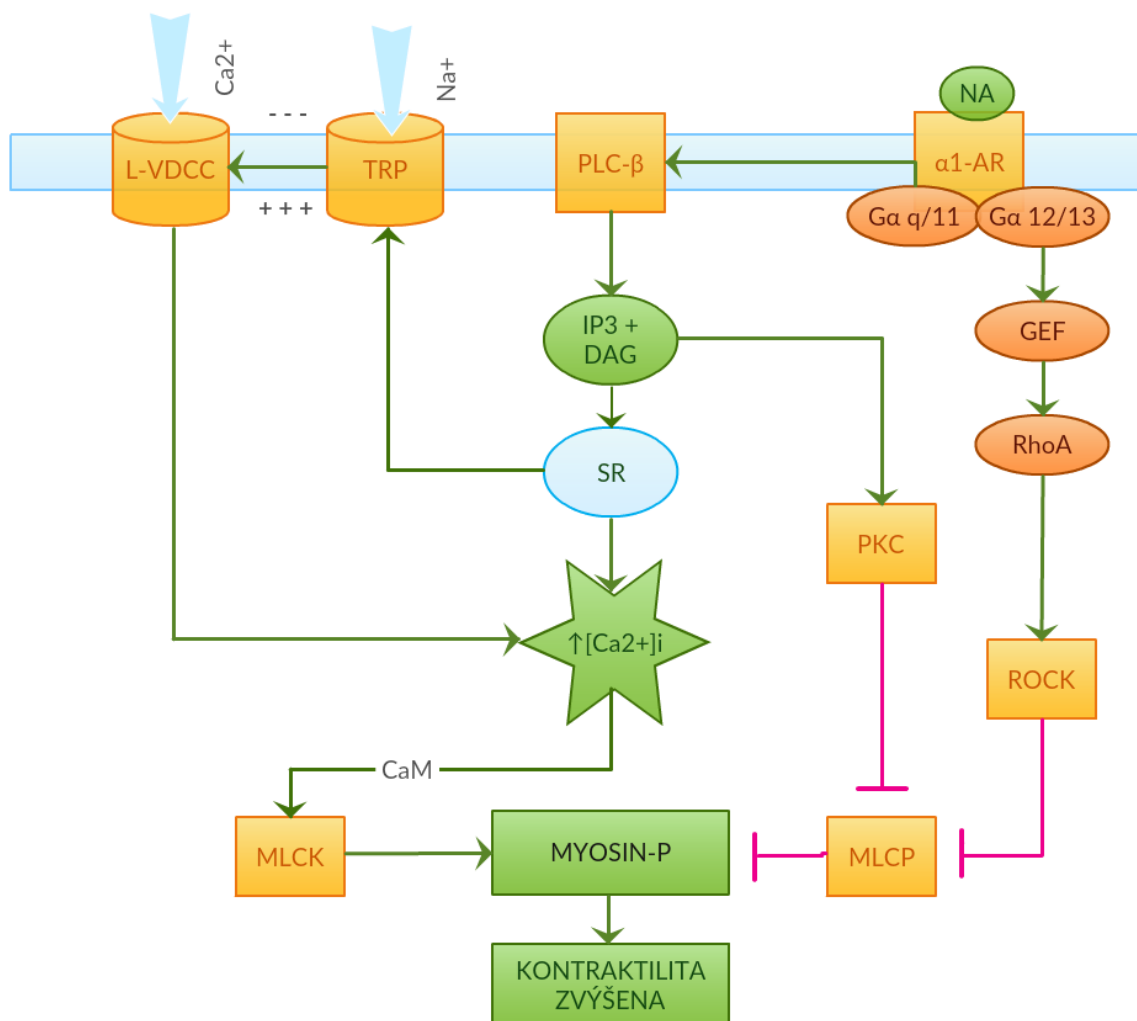
2 Literární přehled

2.1 Kontrakce hladkého svalu a úloha vápníkové senzitivace

Odpor cévního řečiště je řízen vazoaktivními látkami (hormony a neuromediátory), které působí na hladkou svalovinu cév. Jsou dvojího typu: vazokonstrikční látky způsobují kontrakci hladkosvalových buněk ve stěnách cév, vazodilatační látky jejich relaxaci. Při vazokonstrikci dochází k přeměně chemické energie na energii mechanickou, zatímco vazodilatace nevyžaduje přísun energie a působení vazodilatátorů lze vnímat jednoduše jako děj bránící účinku vazokonstriktorů (Hilgers and Webb, 2005).

Mechanismus aktivace kontrakce působením vazokonstrikčních látek je znám již dlouhou dobu. Vazokonstrikční látky se váží na své receptory v buněčné membráně a způsobují influx vápenatých iontů do cytosolu. Při zvýšené intracelulární koncentraci vápníku dochází k jeho vazbě na kalmodulin. To způsobuje konformační změnu, která umožňuje navázání tohoto komplexu na kinázu lehkého řetězce myosinu (MLCK). Kináza je tak aktivována a katalyzuje fosforylaci serinu 19 lehkého řetězce myosinu (MLC20). Hlava myosinu se díky tomu dostává do kontaktu s aktinem (první konformační změna myosinu). Fosforylace zároveň stimuluje štěpení ATP. Uvolněná energie je využita k vzájemnému posunu aktinových a myosinových filament (druhá konformační změna myosinu), čímž dochází ke kontrakci hladkého svalu (Webb, 2003).

O síle kontrakce rozhoduje množství fosforylovaného myosinu ve svalové buňce (Bradley and Morgan, 1987; Fujiwara et al., 1989; Himpens et al., 1990). Fosforylace myosinu je kontrolována činností kinázy lehkého řetězce myosinu MLCK, ale také fosfatázy lehkého řetězce myosinu (MLCP). MLCK fosforyluje myosin a zvyšuje kontraktilitu VSMC. MLCP defosforyluje myosin, čímž působí snížení kontraktility. Inhibice MLCP představuje fyziologický mechanismus, umožňující svalové buňce zvýšení množství fosforylovaného myosinu, jak bylo dokázáno na příkladech agonistů α -adrenergních receptorů (Kitazawa et al., 1991, viz Obrázek 1). Toto zvýšení kontraktility při nezměněné hladině intracelulárního vápníku se nazývá vápníková senzitivace.



Obrázek 1 Kontrakce vyvolaná noradrenalinem. Kontraktální stav buněk hladké svaloviny cév je dán dynamickou rovnováhou mezi fosforylací a defosforylací myosinu, resp. jeho lehkého regulačního řetězce. Tuto rovnováhu zajišťují kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK) a fosfatáza lehkého řetězce myosinu (MLCP). Navázání noradrenalinu na $\alpha 1$ -receptor způsobuje aktivaci asociovaných G-proteinů.

Aktivace podjednotky $G\alpha_{q/11}$ vede k aktivaci fosfolipázy C- β , tvorbě inositoltrisfosfátu a diacylglycerolu. To má za následek tři události: 1) aktivaci proteinkinázy C 2) výlev iontů Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula 3) aktivaci TRP kanálů. Aktivace TRP kanálů vede ke změně membránového napětí a otevření L-VDCC. Skrze L-VDCC vstupuje do buňky velké množství vápníku. Zvýšená koncentrace vápníku vede k jeho vazbě na kalmodulin. Komplex kalmodulinu s vápenatými ionty aktivuje kinázu lehkého řetězce myosinu.

Aktivace podjednotky $G\alpha_{12/13}$ způsobuje aktivaci GTPázy RhoA skrze její regulátory GEF (guanosine exchange factors). RhoA potom aktivuje Rho-kinázu. Rho-kináza inhibuje fosfatázu lehkého řetězce myosinu. Tato cesta zvýšení kontraktility se nazývá vápníková senzitivace. K inhibici fosfatázy lehkého řetězce myosinu dochází alternativně také proteinkinázou C (skrze aktivaci proteinu CPI-17, upraveno podle Behuliak, M. 2015 nepublikované sdělení).

Vysvětlivky: Ca^{2+} - vápenaté ionty, CaM – kalmodulin, CPI-17 – inhibitor myosinfosfatázy potencovaný proteinkinázou C, DAG – diacylglycerol, GEF – nukleotidový výměnný faktor pro guanosinové nukleotidy, $G\alpha_{12/13}$ - α podjednotka G-proteinu typu 12/13, $G\alpha_{q/11}$ - α podjednotka G-proteinu typu q/11, IP3 - inositoltrisfosfát, L-VDCC – napěťově – závislý Ca^{2+} kanál, MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu, MYOSIN-P – fosforylovaný myosin, Na^+ - sodné ionty, PKC – proteinkináza C, PLC- β – fosfolipáza C – β , RhoA – GTPáza Rho, ROCK – Rho-kináza, SR – sarkoplazmatické retikulum, TRP – kanál přechodného receptorového potenciálu, α_1 -AR – α_1 adrenergní receptor

Stimulem pro vápníkovou senzitivaci je aktivace membránových receptorů spojených s $G_{12/13}$ proteiny. $G_{12/13}$ proteiny aktivují RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPase), způsobující na regulačním enzymu RhoA výměnu GDP za GTP (Suzuki et al., 2009). Následně se RhoA přesouvá do plazmatické membrány, kde aktivuje Rho-kinázu (Leung et al., 1995, Amano et al. 1996, Ishizaki et al., 1996). Rho-kináza fosforyluje, a tím deaktivuje fosfatázu lehkého řetězce myosinu (MLCP, Kimura et al., 1996).

Uehata a kol. (1997) ukázal, že změny vápníkové senzitivace ovlivňují periferní odpor cévního řečiště a krevní tlak. Vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou je důležitým prvkem regulace kontraktility hladké svaloviny cév.

2.2 Regulace krevního tlaku – rovnováha vazokonstrikčních a vazodilatačních signálů

2.2.1 Hormonální systémy působící na VSMC

Pro udržení normálního krevního tlaku je nezbytné, aby existovala rovnováha mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními hormonálními signály. Mezi intenzivně zkoumané hormony regulující krevní tlak patří především noradrenalin (postsynaptický mediátor sympatického nervového systému, NA), oxid dusnatý (produkt endotelu, NO) a angiotenzin II (hlavní vazoaktivní produkt renin-angiotenzinového systému, AngII). Tyto hormony mají významné akutní účinky a zásadním způsobem přispívají k udržování stálého krevního tlaku. Po akutním zablokování jejich účinku dochází k výrazným změnám krevního tlaku, způsobeným především změnou periferního odporu cévního v důsledku změn kontraktility VSMC.

NA, NO a AngII významně ovlivňují koncentraci vápenatých iontů v cytosolu VSMC. Noradrenalin se váže na α -adrenergní receptory v buněčné membráně a způsobuje v hladkosvalových buňkách cév depolarizaci, influx vápníku skrze L-VDCC a mobilizaci intracelulárních zásob Ca^{2+} . Angiotenzin II rovněž zvyšuje kontraktilitu VSMC tím,

že podporuje vstup vápníku do cytosolu (Hilgers and Webb, 2005). Oxid dusnatý naopak způsobuje vazodilataci skrze aktivaci guanylátcyklázy a tvorbu cGMP, který působí proti zvyšování intracelulární hladiny vápníku ve VSMC (Pinterova et al., 2009).

NA, NO a AngII jsou významné také v dlouhodobé regulaci krevního tlaku. Tato skutečnost byla doložena mnoha studii, zabývajícími se úlohou vazokonstrikčních a vazodilatačních látek ve vzniku hypertenze. Z těchto prací vyplývá, v dlouhodobé regulaci krevního tlaku se významně uplatňuje nejen kontrola sekrece vazokonstriktorů/vazodilatátorů, ale také změny strukturálních vlastností kardiovaskulární soustavy, adaptace vylučovací funkce ledvin a adaptace centrálního nervového systému. Komplexní charakter dlouhodobé hormonální regulace krevního tlaku lze demonstrovat na příkladu spontánně hypertenzních potkanů (SHR) nebo Dahlových potkanů citlivých na zvýšený příjem soli (Zicha et al., 2012; Zicha and Kunes, 1999).

Prominentní postavení v dlouhodobé regulaci krevního tlaku má sympatický nervový systém. Spontánně hypertenzní potkani trpí hyperaktivitou SNS, která vzniká spolupůsobením genetických predispozic a podmínek prostředí. Pokud u kmene SHR provedeme časnou sympatektomii s adrenální demedulací, zabráníme tím rozvoji hypertenze (Lee et al., 1991). Kombinace časně sympatektomie a blokády α_1 -adrenergických receptorů pomocí prazosinu dokáže zamezit rozvoji srdeční hypertrofie a remodelace cév. To ukazuje na klíčovou roli sympatického nervového systému pro rozvoj fenotypu SHR (Korner et al., 1993). Také u Dahlových potkanů citlivých na sůl představuje působení sympatického nervového systému důležitý regulační prvek. V tomto případě je hyperaktivita SNS podnícena vzestupem koncentrace sodíku v cerebrospinální tekutině, která vzniká v důsledku příjmu vysokého množství soli (Leenen, 2010).

Oxid dusnatý produkovaný endotelem představuje protiváhu vazopresorickému působení SNS. Dostupnost oxidu dusnatého je nezbytná pro normální ontogenezi cév a regulaci krevního tlaku. Podáváním L-argininu (prekurzoru NO) lze u sůl-senzitivních Dahlových potkanů (DS) zabránit rozvoji hypertenze (Chen and Sanders, 1991). Význam NO-signální dráhy lze také demonstrovat jejím narušením u normotenzních potkanů. Dlouhodobé podávání inhibitoru NO syntázy L-NAME normotenzním potkanům WKY vede k rozvoji závažné hypertenze, spojené se zvýšením periferní rezistence a poškozením ledvin (Ribeiro et al., 1992).

Důležitým rysem některých forem hypertenze je aktivace renin-angiotenzinového systému, ke které dochází v souvislosti s poškozením ledvin. RAS je důležitý systém informující centrální složku řízení krevního tlaku o činnosti ledvin a hospodaření elektrolyty.

Angiotenzin II, na který je antihypertenzní terapie nejčastěji zacílena, je dlouhodobě velmi efektivní regulátor krevního tlaku, ačkoli jeho přímý účinek na kontraktilitu VSMC je menší než účinek NA či NO. Je známo, že útlum RAS podáváním inhibitoru ACE captoprilu vede u hypertenzních potkanů SHR k normalizaci sympatické vazokonstrikce, zlepšení endoteliální dysfunkce (zvýšení dostupnosti NO) a potlačení remodelace cév (Adams et al., 1990; Berecek et al., 1983; Dohi et al., 1994). Také u sůl-senzitivních Dahlových potkanů tlumí chronické podávání ACE inhibitorů hypertenzi (Fernandez et al., 1988). Chronická blokáda angiotenzinových receptorů typu 1 (AT1R) v mládí (ve věku 3-10 týdnů) účinně zabraňuje rozvoji solné hypertenze (Dejima et al., 2011). Naopak podávání angiotenzinu II normotenzním potkanům vede k rozvoji hypertenze (Mehta and Griendling, 2007).

Modely genetické hypertenze (SHR) i hypertenze indukované podmínkami prostředí (Dahl) jsou charakteristické porušenou rovnováhou mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními signály, zprostředkovanými SNS, RAS a NOS (Kunes et al., 2004; Zicha et al., 2001).

2.2.2 Působení SNS na vápníkovou senzitivizaci

U genetických modelů experimentální hypertenze, u nichž byla prokázána zvýšená aktivita sympatiku, byly popsány protichůdné změny vápníkové senzitivizace (Behuliak et al., 2013; Ying et al., 2004). Do jaké míry jsou dlouhodobé změny vápníkové senzitivizace důsledkem přímého působení noradrenalinu na receptory VSMC zatím nebylo doloženo.

Sympatický nervový systém představuje velmi důležitý faktor ve vývoji hladké svaloviny cév. Noradrenalin vylučovaný z nervových zakončení sympatiku je stimulem, který depolarizuje VSMC a aktivuje napětově ovládané L-VDCC. Jak bylo dokázáno, aktivace L-VDCC a následný vzestup intracelulární hladiny vápníkových iontů stimuluje expresi markerových genů hladké svaloviny (Wamhoff et al., 2004) Pod vlivem SNS postupně dochází k vývinu dospělého fenotypu hladké svaloviny cév (Fisher, 2010).

V průběhu vývoje dochází vlivem trofického působení SNS ke snížení podílu vápníkové senzitivizace na kontraktilní odpovědi cév. Puzdrová (2014) popsala, že klesá citlivost kontrakce vyvolané methoxaminem (agonistou α_1 -adrenergních receptorů) na extracelulární hladinu vápníku. Denervace cév dospělých potkanů způsobuje návrat k fenotypu s vyšším podílem vápníkové senzitivizace, což je provázeno změnami exprese na vápníku závislých regulačních proteinů (MLCK, MYPT1, h-caldesmon) a exprese proteinů zprostředkujících vápníkovou senzitivizaci (ERK1/2, p38 MAPK, Puzdrova et al., 2014).

Na souvislost mezi ontogenezí sympatické inervace cév a vápníkovou senzitivizací poukazuje také studie Reho a kol. (2014). V tomto případě byla zkoumána vápníková

senzitivace zprostředkovaná CPI-17. Studie ukázala, že neonatální chemická sympatektomie pomocí 6-hydroxydopaminu indukuje vznik „pomalejší“ (tonické) hladké cévní svaloviny, charakteristické sníženou expresí CPI-17 (inhibitor MLCP), větší citlivostí kontrakčního aparátu k cGMP (oxidu dusnatému, Reho et al., 2014). Naopak intaktní cévy, které procházejí normální maturací, mají charakteristickou vyšší expresi CPI-17 (Reho et al., 2014).

Zdá se být nepochybné, že sympatický nervový systém dlouhodobě ovlivňuje vápníkovou senzitivaci ve VSMC. Nabízí se otázka, zda má vyšší úroveň vápníkové senzitivace ve VSMC mladých potkanů nějakou roli v jejich diferenciaci. Jsou mechanismy vápníkové senzitivace nezbytné pro zprostředkování vývojového působení sympatiku? Studie Wamhoffa a kol. (2004) ukazuje, že exprese některých markerových genů hladkého svalu je závislá nejen na aktivitě L-VDCC, ale také na aktivitě Rho-kinázy (SM α -aktin nebo SM těžký řetězec myosinu). Expresi těchto genů je možné potlačit jak inhibicí L-VDCC tak inhibicí Rho-kinázy.

Častěji než úloha Rho-kinázy v diferenciaci VSMC je studována její role v regulaci kontraktility. Vliv Rho-kinázy na kontraktilitu VSMC je nejčastěji měřen jako změna napětí izolované cévy po aplikaci inhibitoru Rho-kinázy. Bylo zjištěno, že účinek inhibice Rho-kinázy na kontraktilitu VSMC je určen nejen inaktivací specifické signální dráhy spojené s aktivací G12/13 proteinů, aktivací Rho-kinázy a inhibicí MLCP, ale i stávající cytosolickou koncentrací vápníku. Účinek inhibitoru Rho-kinázy na vápníkovou senzitivaci lze *in vivo* dobře pozorovat, pokud jsou vápníkové kanály L-VDCC „otevřeny“ pomocí BAY K8644 (Behuliak et al., 2013) Tímto způsobem je výhodné srovnávat efekt inhibice ROCK u hypertenzních a normotenzních kmenů potkanů, zbavených endogenního RAS a SNS.

Výsledky experimentů *in vivo*, kdy je inhibitor Rho-kinázy podán intaktním zvířatům mohou být zkresleny abnormalitami vápníkového iunfluxu. Účinek inhibice Rho-kinázy na krevní tlak je obvykle větší u hypertenzního než u normotenzního kmene (Behuliak et al., 2013; Jin et al., 2006). Pokud jsou pozorované změny krevního tlaku po podání inhibitoru Rho-kinázy vyjádřeny v procentech výchozího KT, může být u hypertenzních potkanů pozorována jak větší, tak menší odpověď než u kontrolních potkanů, závislosti na typu experimentální hypertenze.

Spontánně hypertenzní potkani (SHR) a Dahlovi potkani jsou příkladem hypertenzních kmenů, u kterých vede zvýšená aktivita sympatického nervového systému k patologickým změnám kardiovaskulární soustavy spojeným s hypertenzí (Zicha et al., 2012; Zicha and Kunes, 1999). Přesto se liší relativní velikostí vápníkové senzitivace. Zatímco u potkanů SHR je účinek inhibice Rho-kinázy procentuálně menší než u jejich normotenzních

kontrol (Behuliak et al., 2013), Dahlovi sůl-senzitivní hypertenzní potkani mají větší podíl vápníkové senzitivizace na udržování krevního tlaku než sůl-rezistentní zvířata (Zicha, nepublikovaná data).

2.2.3 Působení RAS na vápníkovou senzitivizaci

Mezi hormony renin-angiotenzinového systému je svým působením na kardiovaskulární soustavu nejdůležitější angiotenzin II. Je to vazokonstrikční hormon a zároveň mocný růstový faktor (Vukelic and Griendling, 2014). Angiotenzin II skrze působení na AT1R dlouhodobě ovlivňuje široké spektrum mechanismů, podílejících se na řízení krevního tlaku (Mehta and Griendling, 2007). Dlouhodobé podávání angiotenzinu II vede k rozvoji závažné „angiotenzin-dependentní“ hypertenze u potkanů normotenzních kmenů. Naopak dlouhodobé blokování účinku AngII u některých hypertenzních kmenů zabraňuje rozvoji hypertenze (review Vukelic and Griendling, 2014).

Zásahy do funkce renin-angiotenzinového systému ovlivňují ontogenetický vývoj sympatického nervového systému a jeho funkce. Bylo zjištěno, že podávání antagonistů AT1R receptorů normalizuje u mladých SHR množství nervového růstového faktoru (NGF), podněcujícího tvorbu nervových zakončení (Jefferson et al., 1995). Senzitivita VSMC k α_1 -adrenergním agonistům může být u SHR normalizována podáváním ACE inhibitoru ramiprilu (Mervaala et al., 1997). Inhibitory ACE (např. captopril) navíc působí na mozková centra řízení baroreflexu, a stimulují jeho funkci (Berecek et al., 1983). Terapeutické účinky zásahů proti RAS jsou tedy částečně způsobeny ovlivněním sympatického nervového systému.

Renin-angiotenzinový systém také dlouhodobě ovlivňuje funkci endotelu, zejména tzv. na endotelu závislou vazorelaxaci. U potkanů SHR, kterým byl chronicky podáván inhibitor ACE, dochází k potlačení endoteliální dysfunkce (zvýšení dostupnosti oxidu dusnatého, Dohi et al., 1994). Tato skutečnost je často dávana do vztahu s nižší produkcí kyslíkových radikálů (van der Giet et al., 2002). Zdroji ROS jsou zejména xanthinoxidáza, NADH/NADPH oxidáza a endoteliální NO syntáza (při nedostatku L-argininu či kofaktoru tetrahydrobiopteridinu, Cai and Harrison, 2000). Není jasné, jakými mechanismy působí ROS snížení dostupnosti NO. Velmi často se uvádí, že superoxidové radikály reaguje s oxidem dusnatým za vzniku peroxinitrátu, čímž se snižuje biologická dostupnost oxidu dusnatého jako vazodilatátoru (Cai and Harrison, 2000).

Je známo, že angiotenzin-dependentní hypertenze se projevuje upregulací Rho-kinázové signální dráhy. Jin a kol. (2006) prokázali, že izolovaná aorta potkanů s hypertenzí vyvolanou

angiotenzinem II reaguje zvýšeně na inhibici Rho-kinázy ve srovnání s kontrolní aortou. Jejich studie rovněž odhalila zvýšenou expresi Rho-kinázy v aortě potkanů s angiotenzin-dependentní hypertenzí. Později byla potvrzena zvýšená exprese Rho-kinázy a jejích aktivátorů (monomerního G-proteinu RhoA a PDZ-RhoGEF) také v menších cévách, které jsou pro regulaci periferní rezistence rozhodující (Hilgers et al., 2007). Angiotenzin II tedy jednoznačně způsobuje upregulaci vápníkové senzitivace v buňkách VSMC.

Jaký podíl má aktivace Rho-kinázy na udržování angiotenzin-dependentní hypertenze? Jin a kol. (2004) pozorovali odpověď izolované aorty na aplikaci angiotenzinu II před a po podání inhibitoru Rho-kinázy. Inhibice Rho-kinázy vedla k úplnému potlačení kontrakce vyvolané akutním podáním AngII. Dalším významným zjištěním bylo, že aktivace RhoA (jeho translokace do membrány) v rámci odpovědi VSMC na stimulaci angiotenzinem II může být potlačena inhibitorem NADPH. To naznačuje, že aktivace Rho-kinázy působením angiotenzinu II může být v buňkách VSMC značně závislá na produkci ROS NADPH oxidázou.

ROS mohou působit jako specifický druhý posel, zprostředkující účinek angiotenzinu na VSMC (Vukelic and Griendling, 2014). To platí nejen pro krátkodobé účinky angiotenzinu, ale také pro jeho dlouhodobé účinky na hypertrofii hladké svaloviny cév. Hypertrofie je výrazným znakem většiny forem hypertenze, který přispívá k udržování vysokého krevního tlaku. Inhibice Rho-kinázy potlačuje hypertrofii VSMC způsobenou předchozím podáváním angiotenzinu II (Higashi et al., 2003). Inhibitor Rho-kinázy rovněž potlačil produkci ROS. Za hlavní zdroj ROS tato studie označila endoteliální NADPH oxidázu, neboť po odstranění endotelu velmi výrazně poklesla produkce superoxidu, a kontrakce vyvolaná AngII byla inhibicí NADPH oxidázy výrazně utlumena.

Zatím nebyl popsán význam dlouhodobé regulace Rho-kinázy angiotenzinem II u normotenzních potkanů.

2.2.4 Působení NO na vápníkovou senzitivaci

Výše bylo popsáno, jak Rho-kinázová signální dráha reaguje na vazokonstrikční podněty. Mnohé studie potvrzují, že aktivita Rho-kinázové signální dráhy má vztah také k produkci oxidu dusnatého. Tato regulace je patrně jak akutní, tak dlouhodobá.

Některé studie upozorňují na ovlivnění produkce NO skrze Rho-kinázu aktivovanou v endotelu. Inhibice Rho-kinázy vede u kultivovaných endoteliálních buněk ke zvýšené aktivaci eNOS a vyšší produkci oxidu dusnatého (Wolfrum et al., 2004). Aktivace RhoA

a Rho-kinázy navíc snižuje v endotelu expresi endoteliální NO syntázy cestou destabilizace její mRNA (Laufs and Liao, 1998).

Bylo posáno, že v kultuře hladkosvalových buněk NO inhibuje RhoA skrze aktivaci cGMP-dependentní proteinkinázy, která RhoA fosforyluje a tím inaktivuje (Sauzeau et al., 2000). Kromě přímé fosforylace RhoA kinázou se může cGK na inhibici vápníkové senzitivace podílet také aktivací telokinů nebo přímo heterodimerizací s MYPT1 (Surks et al., 1999; Wu et al., 1998). Chitaley a Webb (Chitaley and Webb, 2002) potvrdili, že inhibice Rho-kinázy oxidem dusnatým může mít fyziologický význam. Popsali, že inhibice NOS významně snižuje vliv inhibitoru Rho-kinázy na kontrakci vyvolanou fenylefrinem.

Jak bylo zmíněno výše, Rho-kináza ve VSMC se zdá být aktivována přítomností kyslíkových radikálů. Přítomnost ROS zvyšuje množství fosforylovaného MYPT1 (Jin et al., 2004). Tento efekt může být *in vivo* ovlivněn dostupností oxidu dusnatého, produkovaného endotelem. Je nutné brát v úvahu možnou interakci NO s kyslíkovými radikály, zejména superoxidem, která vede ke snížení biologické dostupnosti obou látek (Halliwell, 1997). Zvýšená inaktivace NO reakcí s kyslíkovými radikály byla popsána u spontánně hypertenzních potkanů (Tschudi et al., 1996; Vaziri et al., 2000). Dlouhodobé podávání antioxidantu lazaroidu potlačuje upregulaci eNOS (a iNOS) v cévách mladých SHR a potlačuje rozvoj hypertenze (Vaziri et al., 2000).

Mezi další způsoby, jakými může NO ovlivňovat aktivitu Rho-kinázy, patří inhibice L-VDCC a následné snížení intracelulární hladiny vápníkových iontů (Sauzeau et al., 2000). Pintérová popsala, že odpověď normotenzních potkanů WKY na současnou inhibici NOS a Rho-kinázy je vyšší než na současnou inhibici NOS a L-VDCC. (Pintérová, nepublikovaná data). To svědčí ve prospěch ovlivnění činnosti Rho-kinázy oxidem dusnatým, produkovaným NOS u potkanů WKY.

Změny propustnosti iontových kanálů vyvolané působením NO jsou zprostředkovány zejména cestou zvýšení cytosolické koncentrace cGMP a následnou aktivací specifických kináz, jako je PKG (Lucas et al., 2000).

2.2.5 Působení produktů COX na vápníkovou senzitivaci

V mnoha buněčných typech jsou změny membránového potenciálu (a aktivačního stavu buňky) kontrolovány také přítomností cAMP. Převaha jednoho cyklického nukleotidu nad druhým pak určuje výsledek signalizace. Mezi signálními látkami ovlivňujícími intracelulární hladinu cAMP jsou významné metabolity kyseliny arachidonové.

Je známo, že podání inhibitoru COX indometacinu způsobuje pokles kontraktility izolovaných cév (Gluais et al., 2005). Hlavním metabolitem cyklooxygenázy (COX) je z hlediska regulace kontraktility prostacyklin (PGI₂), jak bylo ukázáno na potkaních SHR a WKY (Gluais et al., 2005). PGI₂ může působit na dva typy receptorů – vazokonstrikční TP a vazodilatační IP receptory. U mladých jedinců normotenzních kmenů však převládá vazodilatační působení metabolitů COX. PGI₂ indukuje ve VSMC zvýšení tvorby cAMP (Gluais et al., 2005).

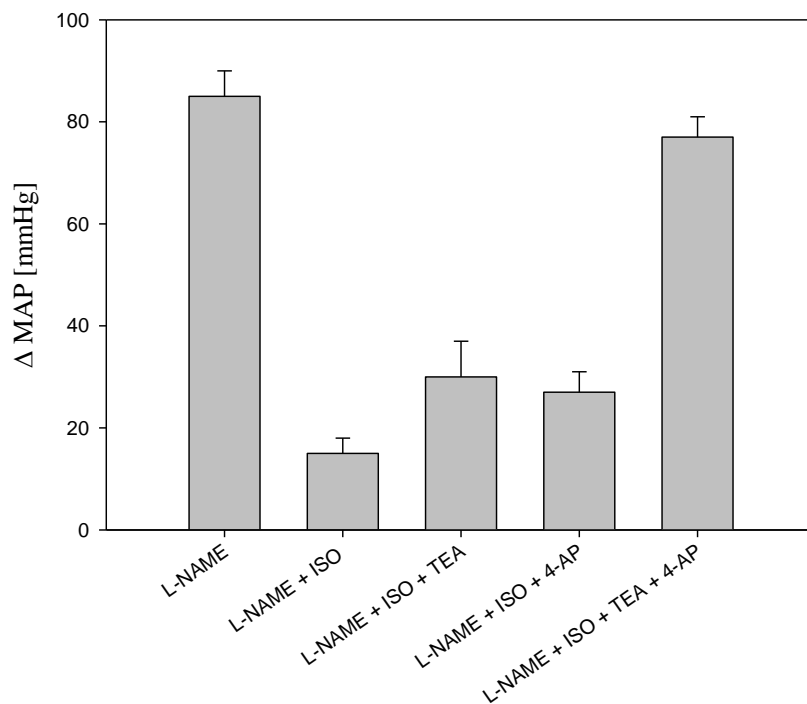
Častým experimentálním přístupem ve výzkumu cAMP-signální dráhy je aktivace či inhibice β -adrenergických receptorů. cAMP je poslem, který zprostředkuje aktivaci draslíkových kanálů ovládaných vápníkem (BK_{Ca}) či ovládaných napětím (K_v). V souladu s tím Chadha a kol. (2012) uvádí, že inhibice K_v7.4 kanálů oslabuje β -adrenergní vazodilataci v renální arterii. Zvýšení intracelulární hladiny cAMP po stimulaci β -adrenergických receptorů tedy zřejmě působí dilataci skrze aktivaci K_v7.4 kanálů (Chadha et al., 2012). Dilatace zprostředkovaná aktivací těchto kanálů je u SHR oproti normotenzním kontrolám oslabena (Chadha et al., 2012).

Mezi mechanismy zodpovědné za rychlou aktivaci draslíkových kanálů patří především fosforylace regulačních míst a ovlivnění transportu podjednotek. Tyto jevy jsou dobře popsány u kanálů BK_{Ca}. Zvýšení intracelulární hladiny cAMP (a/nebo cGMP) působí snížení kontraktility VSMC skrze rychlý transport BK_{Ca} do membrány a jejich aktivaci. (Leo et al., 2014) Kanály BK_{Ca} jsou zároveň regulovány cGMP-dependentní fosforylací (Kyle et al., 2013).

Kromě aktivace draslíkových kanálů ovlivňují cyklické nukleotidy také prokonstrikční kanály L-VDCC. Zatímco cGMP i cAMP mají na tyto kanály inhibiční vliv (Liu et al., 1997; Taguchi et al., 1997).

Máme poměrně málo dokladů o spolupráci cAMP- a cGMP-signálních drah v regulaci kontraktility VSMC. Pintérová a kol. (2014) popsali, že β -adrenergní stimulace potlačuje u potkanů WKY a SHR nárůst krevního tlaku vyvolaný inhibicí endoteliální NO syntázy. Naopak blokáda β -adrenergní stimulace zvyšuje nárůst krevního tlaku po inhibici eNOS cAMP a cGMP signální kaskády se ve svých vazodilatačních účincích doplňují (Pinterova

et al., 2014). Blokáda buď BK_{Ca} nebo K_v kanálů umožňuje u SHR vzestup tlaku po podání inhibitoru eNOS (blokovatelné aktivací β-adrenergní signalizace). U normotenzních potkanů WKY dochází ke zvýšení účinku inhibice jedině při kombinované blokádě BK_{Ca} a K_v kanálů (viz Obrázek 2). Schopnost BK_{Ca} a K_v kanálů zprostředkovat cAMP-závislou (β-adrenergní) vazodilataci je tudíž u SHR oproti normotenzním potkanům oslabena (Pinterova et al., 2014).



Obrázek 2 Účinek inhibice NOS na β-adrenergní vazodilataci zprostředkovanou K_v a BK_{Ca} kanály u potkanů Wistar. Inhibice NOS pomocí L-NAME vyvolává u normotenzních potkanů nárůst krevního tlaku. Pokud je současně podán agonista β-adrenergních receptorů isoprenalin, je tento nárůst výrazně omezen. Přidání TEA (blokátor kanálů K_v) či 4-AP (blokátor kanálů BK_{Ca}) nepůsobí za těchto podmínek významné zvýšení krevního tlaku. Přidání obou dvou blokátorů draslíkových kanálů způsobuje návrat plné odpovědi krevního tlaku na inhibici NOS (upraveno podle Pintérová et al., 2014).

Vysvětlivky: 4-AP – 4-aminopyridin, ISO – isoprenalin, L-NAME – N^o-nitro-L-argininmethylester, NOS – NO syntáza, TEA – tetraethylamonium..

Málo je také známo o spolupráci cAMP - signální dráhy a Rho-kinázové signální dráhy v regulaci kontraktility VSMC. Teixeira a kol. (2005) zkoumali účinek inhibitoru Rho-kinázy na kontrakci izolované arterie, která byla vyvolána fenylefrinem. Výsledky ukazují, že účinek inhibitoru Rho-kinázy nezávisí na přítomnosti metabolitů COX, avšak je ovlivněn přítomností NO. Inhibice COX podle této studie nezpůsobuje u izolovaných cév změnu odpovědi na inhibici Rho-kinázy (Teixeira et al., 2005).

2.3 NO-deficientní potkani – model hypertenze

2.3.1 Základní charakteristika modelu

Dlouhodobé podávání L-NAME vyvolává u potkanů normotenzních kmenů vysoký krevní tlak. Podávání L-argininu (prekurzoru NO) způsobuje návrat k normálnímu TK pouze v raných stádiích hypertenze. Model je charakteristický zvýšenou periferní rezistencí, renální vazokonstrikcí a hypoperfuzí (Ribeiro et al., 1992). Bylo popsáno také oslabení baroreflexu, zvýšená aktivita nadledvin a zvýšená aktivita renálních nervů (Lantelme et al., 1994; Scrogin et al., 1993).

Hypertenze je spojena s aktivací renin-angiotenzinového systému, neboť podáváním losartanu je rozvoj hypertenze významně potlačen (Ribeiro et al., 1992). Významnou úlohu hraje v rozvoji L-NAME hypertenze také sympatický nervový systém (Qiu et al., 1994; Sander et al., 1995). Oxid dusnatý není jen vazodilatátorem, ale také modulátorem aktivity sympatického nervového systému. Presorický účinek dlouhodobého podávání L-NAME se zdá být do značné míry závislý na inhibici NOS v mozkových centrech řídících krevní tlak (Zanchi et al., 1995).

Inhibice výlevu katecholaminů pomocí guanethidinu výrazně snižuje TK u L-NAME hypertenze (Sander et al., 1995). Ačkoli dlouhodobě je důležité působení SNS i RAS, akutní blokáda SNS je v porovnání s akutní blokádou RAS výrazně účinnější (Pechanova et al., 2004).

U L-NAME hypertenze se projevuje neschopnost NO vyvážit presorické působení sympatického nervového systému. Stejně jako potkani SHR či Dahlovi potkani tak patří mezi experimentální modely s relativním nedostatkem NO (neschopností vyvážit presorické působení SNS). Zajímavým aspektem L-NAME hypertenze je indukce citlivosti na sůl. Při nízkých dávkách L-NAME se krevní tlak stává citlivým na zvýšený příjem soli. Dochází k posunu pressure-natriuresis křivky, což může být způsobeno sníženou schopností ledvin vylučovat sodík (tento děj je ovlivňován NO, Yamada et al., 1996).

Dlouhodobé podávání L-NAME snižuje účinek akutní inhibice NOS pomocí L-NAME na krevní tlak zhruba o 60 – 80 %. Zvyšuje se však odpověď krevního tlaku na specifickou inhibici inducibilní NOS (iNOS). Odpověď zhruba dosahuje velikosti odpovědi na L-NAME u intaktních potkanů. Produkce NO je v L-NAME hypertenzi značná. Dominantním zdrojem NO se stává iNOS (Pechanova et al., 2004). Kompenzace snížené činnosti eNOS indukcí iNOS semůže objevovat také u dalších forem experimentální

hypertenze, jako jsou např. Dahlovi potkani citliví na sůl. To zatím nebylo studováno, ačkoli jsou k dispozici mnohá data podporující tuto hypotézu (Pechanova et al., 2004).

2.3.2 Vápníková senzitivace a úloha ROS

Mezi příčinami rozvoje L-NAME hypertenze má důležité místo inhibice endoteliální NO syntázy (eNOS) a následný nedostatek vazodilatačně působícího oxidu dusnatého (NO). Lohn a kol. (2005) se zabývali otázkou, zda knockout eNOS ovlivní vápníkovou senzitivaci v aortě. Popsali, že aorta eNOS^{-/-} myši prekontrahovaná fenylefrinem odpovídala na inhibici Rho-kinázy stejnou změnou kontraktility jako aorta intaktních myši. Dále popsali, že exprese ROCK II nebyla knockoutem eNOS změněna. Tyto výsledky naznačují, že činnost Rho-kinázy patrně není závislá přímo na aktivitě eNOS (Lohn et al., 2005).

Chronické podávání L-NAME způsobuje v srdci potkanů WKY zvýšení aktivity Rho-kinázy (Kataoka et al., 2002). Pokud byl L-NAME podáván spolu s inhibítorem ROCK Y27632, došlo u L-NAME hypertenzních potkanů k potlačení zánětu a následné arteriosklerózy. Zvýšené aktivity Rho-kinázy lze podle výsledků této studie zabránit blokováním AT1R. Autoři navrhuji, že na zánětu cév a jejich remodelaci se může podílet zvýšená aktivita Rho-kinázové signální dráhy, zprostředkovaná aktivací AT1R (Kataoka et al., 2002).

Jak bylo popsáno výše, aktivace AT1R způsobuje aktivaci Rho-kinázové signální dráhy. Aktivace RhoA (translokace do membrány) v odpovědi na stimulaci VSMC angiotenzinem II může být potlačena inhibítorem NADPH. To naznačuje, že aktivace Rho-kinázy působením angiotenzinu II může být v buňkách VSMC značně závislá na produkci ROS NADPH oxidázou (Jin et al., 2004). Zda ROS způsobují aktivaci Rho-kinázy v L-NAME hypertenzi není známo. Je však zřejmé, že potkani s L-NAME hypertenzí mají stejně jako SHR či hypertenzní Dahlovi potkani oproti kontrolám výrazně zvýšenou hladinu ROS (Wilcox and Pearlman, 2008).

Mnoho studií upozornilo na potenciální využití mimetika superoxid dismutázy tempolu v léčbě hypertenze a souvisejících onemocnění (Wilcox and Pearlman, 2008). Zvýšená hladina ROS (superoxidu) je zřejmě důvodem, proč akutní podání tempolu u mladých Dahlových potkanů se solnou hypertenzí účinněji snižuje TK (Zicha et al., 2001). Studium účinků tempolu na vápníkovou senzitivaci ve VSMC by mohlo významně přispět k porozumění úlohy ROS (zejména superoxidu) v rozvoji hypertenze.

L-NAME hypertenzní potkani představují experimentální model, který má významné místo ve výzkumu endoteliální dysfunkce. Výhodou oproti ostatním modelům je možnost

kontrolovat stupeň inhibice eNOS. Rozvoj L-NAME hypertenze však provází komplexní změny ostatních hormonálních systémů, zejména RAS a SNS. Dostupnost množství dat činí tento model vhodným pro výzkum vápníkové senzitivace zprostředkované Rho-kinázovou signální dráhou u potkanů s projevy deficiencie oxidu dusnatého.

3 Cíle diplomové práce

1) Objasnit, zda platí že vazodilatační a vazokonstrikční systémy ovlivňují u potkanů Wistar vápníkovou senzitivizaci zprostředkovanou Rho-kinázou.

2) Zodpovědět otázku, do jaké míry je vápníková senzitivizace krátkodobě a dlouhodobě ovlivněna působením jednotlivých vybraných vazodilatačních a vazokonstrikčních systémů. Porovnat systémy mezi sebou.

3) Zjistit, zda je možné dlouhodobě ovlivnit vápníkovou senzitivizaci pomocí podávání inhibitoru eNOS L-NAME. Ověřit, že Rho-kináza přispívá k udržování tohoto typu hypertenze.

4 Materiál a metody

Samci potkanů kmene Wistar (Fyziologický ústav AV ČR, Praha, Česká republika) byli chováni za standardních laboratorních podmínek. Byla jim poskytnuta voda a peletová strava *ad libitum*. Měření TK bylo prováděno ve věku mezi 8 a 14 týdny. Všechny procedury a experimentální postupy byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

Hlavním experimentálním přístupem bylo měření účinku akutní inhibice Rho-kinázy na krevní tlak a srdeční frekvenci u potkanů podrobených akutní či chronické blokádě různých vazoaktivních systémů. Kanulace *arteria carotis* a *vena jugularis* byla provedena za isofluranové anestezie 24 hodin před začátkem měření. Před měřením byli bdělí potkani umístěni do průhledných boxů, umožňujících pohyb pouze v omezeném rozsahu. Arteriální kanyla byla napojena na měřicí systém PowerLab (AD Instruments Ltd., Bella Vista, NSW, Austrálie). Měření začalo 30 min. stabilizační dobou před podáním první látky.

Před započítáním vlastního experimentu byli potkani podrobeni akutní blokádě širokého spektra vazoaktivních systémů, podle experimentálního protokolu (viz Tabulka 1). Změny krevního tlaku vyvolané použitím jednotlivých blokátorů byly sledovány až do ustálení krevního tlaku – 15 min po captoprilu, 5 min po pentolinia, 10 min po L-NAME nebo indometacinu, a 5 min po každé dávce fasudilu. Fasudil byl podán ve čtyřech kumulativních dávkách (1 mg/kg, 2 mg/kg, a dvakrát 4 mg/kg, protokoly č. 1-8 a 11-18) nebo v jedné dávce o velikosti 10 mg/kg (protokoly č. 9 a 10, Behuliak et al. 2013). Captopril (inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu) byl podán v dávce 10 mg/kg, pentolinium (gangliový blokátor) v dávce 5 mg/kg, L-NAME (inhibitor NO syntázy) v dávce 30 mg/kg, indometacin (inhibitor cyklooxygenázy) v dávce 10 mg/kg, nifedipin (blokátor L-VDCC) v dávce 0,4 mg/kg (Zicha et al. 2006, Behuliak et al. 2011).

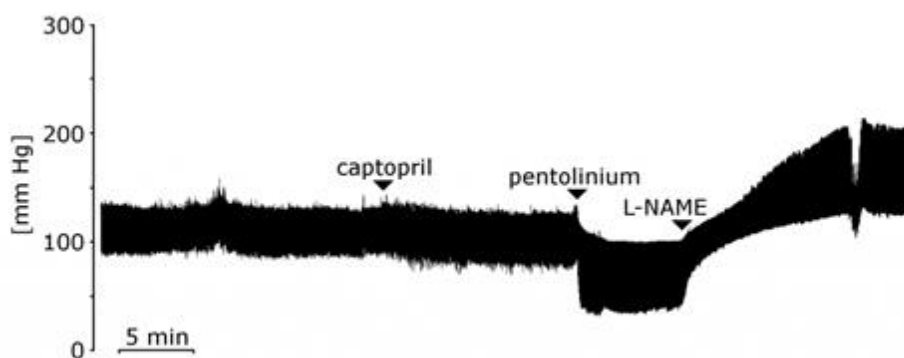
V pokusech podle protokolů 15 až 18 byla provedená chronická inhibice vybraných vazoaktivních systémů (viz Tabulka 1). Inhibice renin-angiotenzinového systému pomocí captoprilu (protokol č. 15) byla provedena pomocí inhibitoru angiotenzin-konvertujícího enzymu captoprilu (50 mg/kg den) podávaného v pitné vodě po dobu dvou týdnů. Chronická inhibice NOS (protokoly č. 16 a 17) byla indukována L-NAME (40 mg/kg v pitné vodě) po dobu dvou týdnů. Podávání těchto látek trvalo až do měření TK ve věku 14 týdnů. Sympatektomie (protokol č. 18) byla provedena časným podáním guanethidinu (50 mg/kg subkutánně ve věku 7-28 dní, Johnson *et al.* 1976). Za účelem ověření kvality sympatektomie byl proveden kontrolní pokus. Potkanům byly po provedení protokolu 1 promyty a zataveny kanyly a následující den byla u nich měřena odpověď na pentolinium, tyramin a fenylefrin.

Tyramin (aktivátor výlevu katecholaminů) byl podán v dávkách 0,1 mg/kg, 0,25 mg/kg a 1 mg/kg; fenylefrin v dávkách 1 mg/kg a 5mg/kg.

Všechny chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma (St. Louis, MO, USA), s výjimkou fasudilu (HA-1077, LC Laboratories, Woburn, MA, USA). Látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (nebo v případě nifedipinu v DMSO) a podány jako intravenózní bolus (1 ml/kg).

Kontrolní skupiny (protokol č. 1) byly sestaveny s ohledem na věk a tělesnou hmotnost potkanů v experimentálních skupinách. Jedna kontrolní skupina sloužila pro experimentální protokoly 1 až 14 (akutní inhibice vazoaktivních systémů). Další kontrolní skupina sloužila ke srovnání s experimentálními skupinami s chronickou inhibicí RAS a NOS, zatímco pro sympatektomovanou skupinu byla sestavena samostatná skupina.

Záznam středního arteriálního tlaku (viz Obrázek 3) byl spolu se zaznamenanými změnami systolického tlaku, diastolického tlaku a srdeční frekvence vyhodnocen v programu LabChart. Prvním krokem bylo vyhodnocení tvaru křivek, aby mohl být vyloučen rušivý vliv prostředí nebo pohybu zvířat. Rovněž bylo důležité odlišit specifický účinek inhibitoru/účinné látky na krevní tlak a srdeční frekvenci od nespecifického účinku, např. u některých jedinců citlivých na dráždivé účinky podaných roztoků (např. indometacin). Krevní tlak a srdeční frekvence byly odečteny vždy při dosažení stabilního stavu, nejdříve však 30 s po podání látky. Data byla vynesena jako průměrná hodnota \pm SEM. Statistické rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny pomocí dvojcestné analýzy variance (two-way ANOVA, faktory skupina a dávka) následované Bonferroniho post-hoc testem (Duncanovým post-hoc testem v případě změn srdeční frekvence). Výsledky byly považovány za statisticky významné při $P < 0,05$. Testy byly provedeny v programu SigmaPlot 11.0.



Obrázek 3 Příklad záznamu středního arteriálního tlaku. Na začátku pokusu byl podán captopril (inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu), který způsobil pozvolný mírný pokles tlaku. Následné podání pentolinia

(gangliového blokátoru) způsobilo prudký a výrazný pokles tlaku. Inhibitor NOS L-NAME vyvolal nárůst krevního tlaku vysoko nad výchozí hodnoty (upraveno podle Zichy, 2015).

Vysvětlivky: L-NAME - N^ω-nitro-L-argininmethylester, NOS – NO syntáza, mmHg – milimetrů rtuti (Torr),

Tabulka 1 Přehled experimentálních protokolů – podání blokátorů a inhibitorů

Vysvětlivky: CAPTO – captopril (inhibitor angiotenzin-konvertujícího enzymu, GUA – guanethidin (inhibitor výlevu katecholaminů), INDO – indometacin (inhibitor cyklooxygenázy), L-NAME - N^ω-nitro-L-argininmethylester, NIF – nifedipin (blokátor napětově-závislých vápníkových kanálů), PENTO – pentolinium (gangliový blokátor), PR. – protokol, ROCK – Rho-kináza, TEM – tempol (mimetikum superoxid dismutázy)

PR.	CHRONICKY	AKUTNĚ PŘED INHIBICÍ ROCK						AKUTNĚ PO INHIBICI ROCK			
1											NIF
2					L-NAME						NIF
3						INDO					
4			CAPTO	PENTO	L-NAME	INDO					NIF
5			CAPTO	PENTO		INDO	L-NAME				NIF
6			CAPTO								NIF
7				PENTO	L-NAME						NIF
8			CAPTO		L-NAME						NIF
9			CAPTO	PENTO				L-NAME	INDO		
10			CAPTO	PENTO					INDO	L-NAME	
11			CAPTO	PENTO	L-NAME						NIF
12			CAPTO	PENTO		INDO					NIF
13				PENTO	L-NAME						NIF
14			CAPTO		L-NAME						NIF
15	CAPTO										NIF
16	L-NAME										NIF
17	L-NAME	TEM									NIF
18		TEM									NIF
19	GUA										NIF

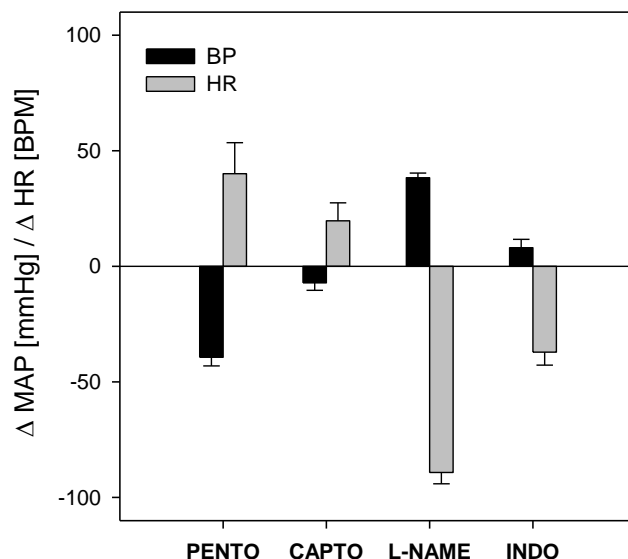
5 Výsledky

5.1 Akutní inhibice vybraných humorálních systémů a její vliv na změny TK po inhibici Rho-kinázy

5.1.1 Inhibice humorálních vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů u intaktních potkanů

Inhibice vybraných vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů způsobila charakteristické změny středního arteriálního tlaku (viz Obrázek 4). Blokáda sympatického nervového systému pomocí pentolinia a inhibice NO syntázy pomocí L-NAME měly poměrně velký účinek (-39 ± 4 mmHg, 38 ± 2 mmHg). Naopak inhibice renin-angiotenzinového systému (captopril) a cyklooxygenázy (indometacin) měly malý účinek (-7 ± 3 mmHg, 8 ± 4 mmHg).

Změny srdeční frekvence působí proti změnám krevního tlaku.

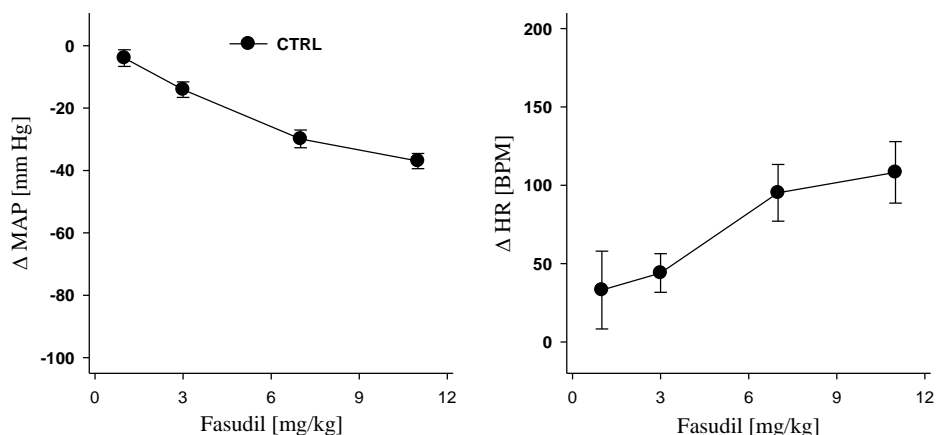


Obrázek 4 Změny středního tlaku a srdeční frekvence po akutní inhibici humorálních systémů u intaktních potkanů. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{PENTO})=5$, $n(\text{CAPTO})=8$, $n(\text{LN})=4$, $n(\text{INDO})=8$

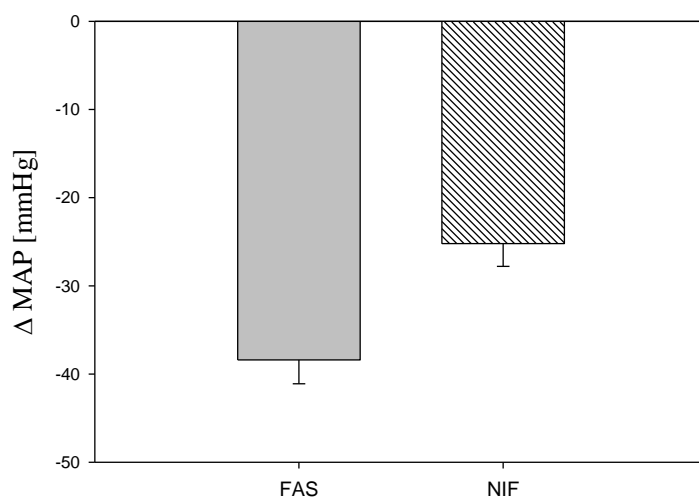
Jak bylo pozorováno, projevuje se u inhibitorů vazodilatačních a vazokonstrikčních systémů určitá aditivita. Účinek pentolinia byl zvýšen předchozím podáním inhibitoru captoprilu (-51 ± 3 oproti -39 ± 4 mmHg, protokoly č. 7,11). Účinek L-NAME může být zvýšen podáním indometacinu ($+19 \pm 8$ mmHg za podmínek současné inhibice SNS a RAS, protokol č. 4).

5.1.2 Inhibice Rho-kinázy u intaktních potkanů

Výchozí krevní tlak kontrolní skupiny pro pokusy s akutní inhibicí vazoaktivních systémů (protokoly 1 až 14) byl 121 ± 4 mmHg a výchozí tlak ostatních skupin se ani v jenom případě signifikantně neodlišoval. Účinek inhibice Rho-kinázy závisel na dávce použitého inhibitoru (viz Obrázek 5). Odpověď středního arteriálního tlaku na dávku fasudilu 1 mg/kg byla -6 ± 2 mmHg. Po podání další dávky (2 mg/kg) se celková změna krevního tlaku zvýšila na -15 ± 3 mmHg. Následující podání dvou dávek o velikosti 4 mg/kg zvýšilo odpověď nejprve na -30 ± 4 mmHg a potom na -38 ± 3 mmHg. Výchozí srdeční frekvence intaktní skupiny byla 371 ± 19 BPM, a při maximální dávce fasudilu dosáhlo její zvýšení v průměru 110 ± 27 BPM (viz Obrázek 5).



Obrázek 5 Vliv inhibitoru Rho-kinázy fasudilu na výši středního arteriálního tlaku (MAP) a srdeční frekvence (HR) u intaktních potkanů. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n=6$



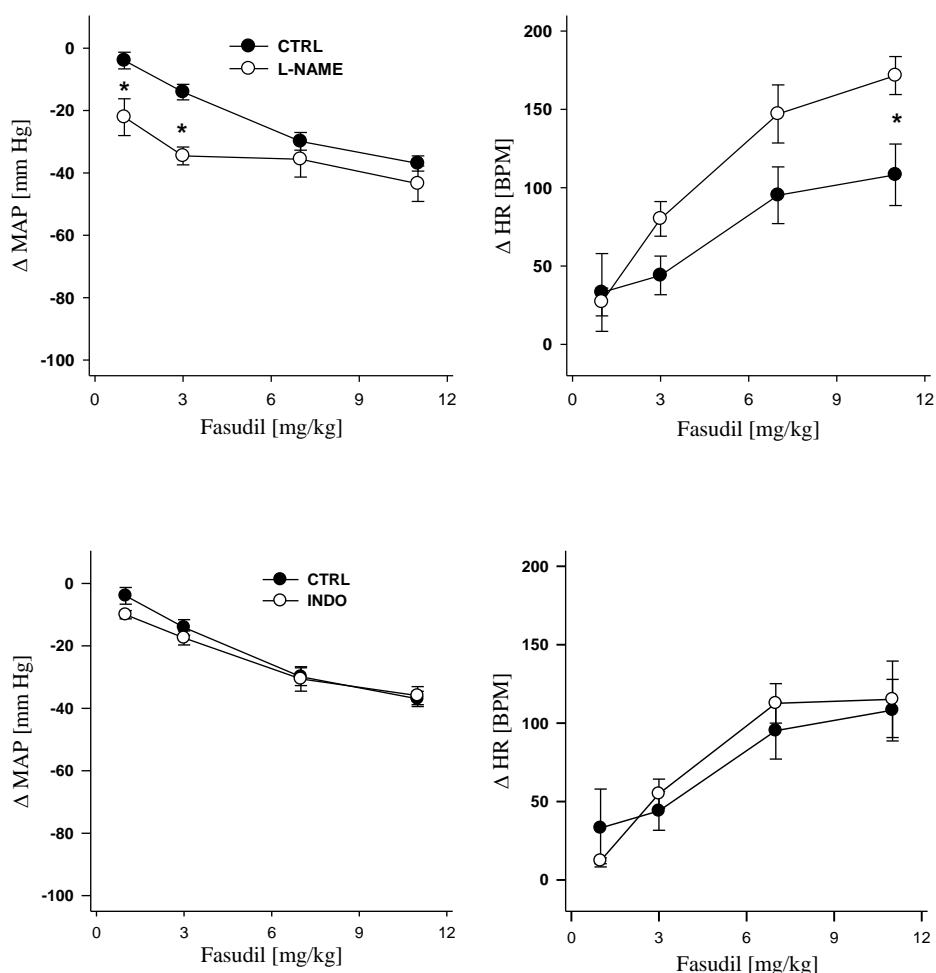
Obrázek 6 Změna středního tlaku vyvolaná fasudilem a následným nifedipinem u intaktních potkanů. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n = 6$

Po fasudilové řadě byl podán inhibitor L-VDCC nifedipin. Nifedipin vyvolal u intaktní skupiny potkanů další pokles krevního tlaku o -25 ± 3 mmHg (viz Obrázek 6). U srdeční frekvence nedošlo k významným změnám ($+19 \pm 11$ BPM). Pokles krevního tlaku po podání nifedipinu ukazuje, že při oslabení vápníkové senzitivace inhibicí Rho-kinázy zůstává částečně zachována schopnost hladkosvalových buněk relaxovat po zablokování vápníkového influxu, tj. buňky jsou schopny měnit svůj kontraktilní stav.

5.1.3 Účinek inhibice vazodilatačních systémů

Akutní inhibice NO syntázy vyvolává u intaktních potkanů vzestup krevního tlaku o 38 ± 2 mmHg. Bylo pozorováno, že inhibice syntázy NO způsobuje zvýšení odpovědi TK na malé dávky fasudilu (při 1 mg fasudilu/kg ve skupině L-NAME - 22 ± 7 oproti -6 ± 3 mmHg v kontrolní skupině, protokol č. 2, viz Obrázek 7). Při vyšších dávkách fasudilu rozdíl mezi oběma skupinami zaniká, což může být spojeno se signifikantně vyšší odpovědí srdeční frekvence u skupiny s inhibovanou NOS (v dávce fasudilu 11 mg/kg ve skupině L-NAME 172 ± 14 oproti 110 ± 27 BPM v kontrolní skupině).

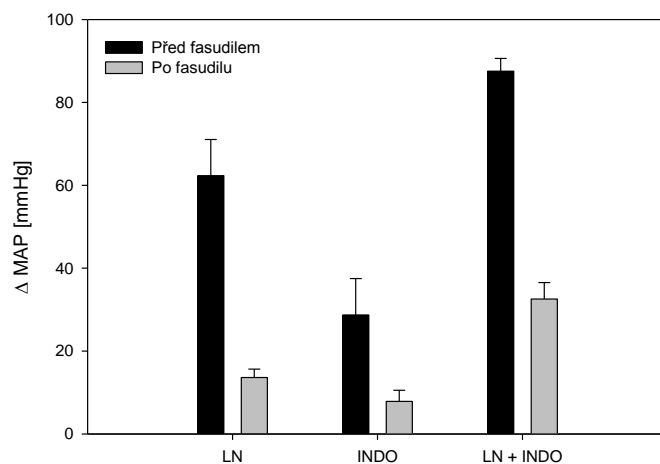
Blokáda cyklooxygenázy (COX) indometacinem vyvolala zvýšení krevního tlaku pouze o 8 ± 3 mmHg. Inhibice COX neovlivnila významně efekt fasudilu na krevní tlak a srdeční frekvenci (protokol č. 3, viz Obrázek 7).



Obrázek 7 Vliv inhibice NOS (L-NAME) a inhibice COX (INDO) na změny krevního tlaku po podání fasudilu. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(L-NAME) = 4$, $n(INDO) = 4$, $n(CTRL) = 6$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 122 ± 4 mmHg ve skupině CTRL, 151 ± 4 mmHg ve skupině L-NAME a 132 ± 4 mmHg ve skupině INDO. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

5.1.4 Účinek inhibice Rho-kinázy na změny TK po blokadě vazodilatačních systémů

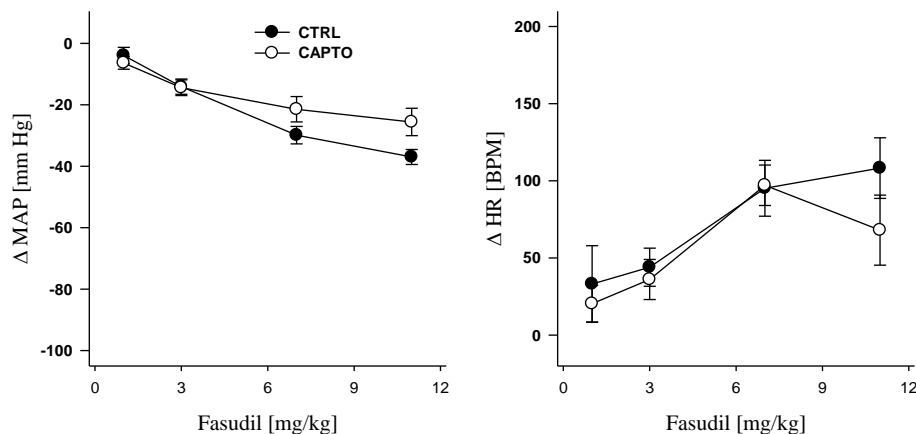
V předchozí kapitole byly popsány účinky inhibice NOS či COX na změny vyvolané inhibicí Rho-kinázy. V navazujících pokusech byl sledován účinek inhibice Rho-kinázy na změny TK vyvolané inhibicí NOS a COX. Odpověď TK na L-NAME byla inhibicí Rho-kinázy snížena o 78 % a odpověď na indomethacin o 73 %. Odpověď krevního tlaku vyvolaná kombinovanou inhibicí NOS a COX poklesla o 60 % u zvířat, jejichž Rho-kináza byla inhibována fasudilem (protokoly č. 4, 5, 9 a 10, viz Obrázek 8).



Obrázek 8 Změny krevního tlaku pozorované po inhibici NOS (LN) a/nebo COX (INDO) při intaktní či inhibované Rho-kináze (před fasudilem/po fasudilu). Experiment byl proveden při současné inhibici SNS a RAS. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot, $n(LN) = 5 + 5$, $n(INDO) = 5 + 5$, $n(LN+INDO) = 10 + 10$

5.1.5 Účinek inhibice vazopresorických systémů

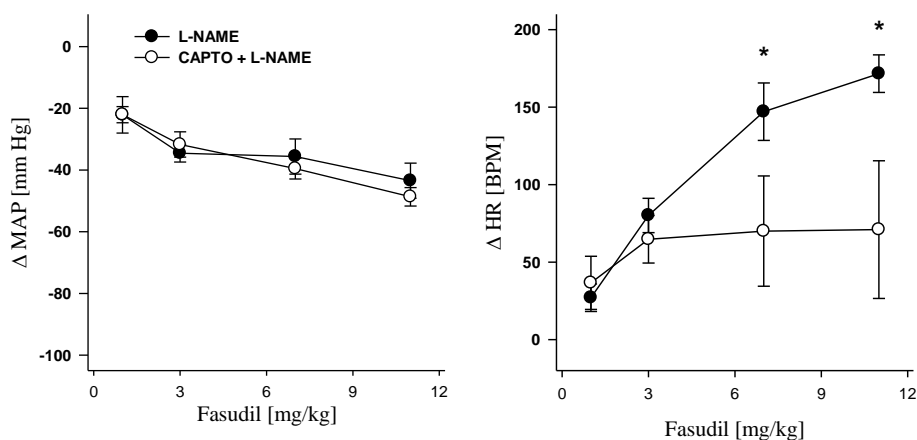
U potkanů s inhibicí RAS nebyla pozorována odlišná odpověď na fasudil oproti kontrolní skupině (protokol č. 6, viz Obrázek 9).

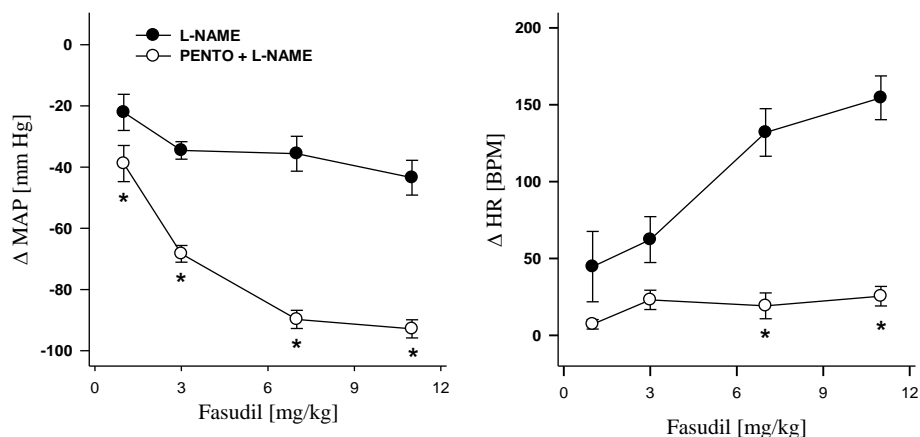


Obrázek 9 Účinek inhibice RAS captoprilem na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané podáním fasudilu. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO})=4$, $n(\text{CTRL})=6$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 122 ± 4 mm Hg ve skupině CTRL a 106 ± 9 mmHg ve skupině CAPTO.

Další pokusy měly za cíl zjistit, zda mohou být změny úlohy Rho-kinázy vyvolané inhibicí jednotlivých vazodilatačních systémů ovlivněny současnou inhibicí vazopresorických systémů. Z výsledků experimentu, kdy byl před L-NAME podán captopril vyplývá, že inhibice RAS neovlivňuje efekt L-NAME na změny TK po fasudilu (protokol č. 8, viz Obrázek 10).

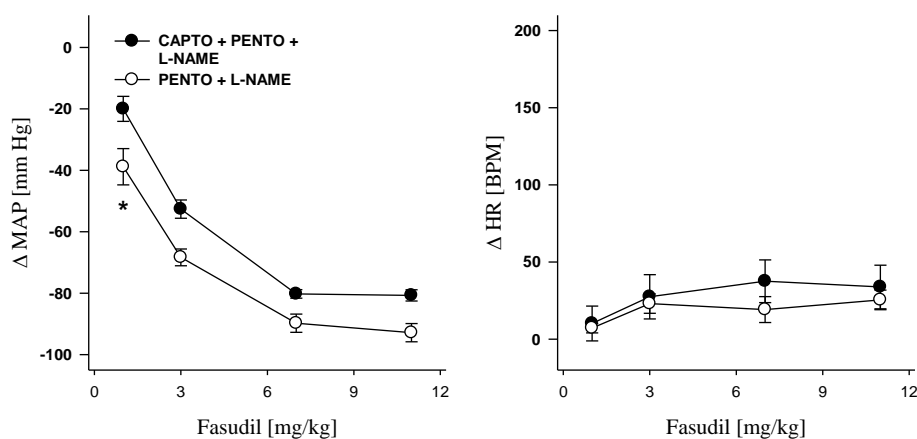
Dále bylo zjištěno, že inhibice SNS podáním pentolinia za současné inhibice NOS zvyšuje účinek fasudilu na krevní tlak (protokol č. 7, viz Obrázek 10). Pentolinium za těchto podmínek výrazně oslabuje změny srdeční frekvence po podání fasudilu, což přispívá k poklesu TK.





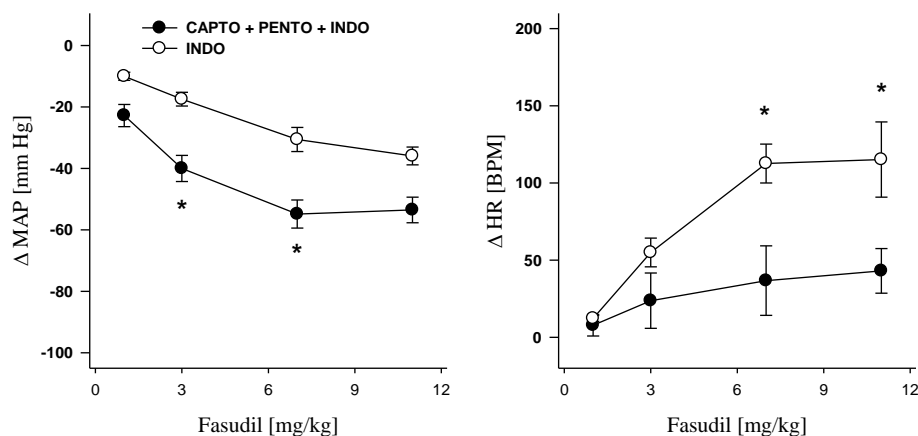
Obrázek 10 Vliv blokády SNS pomocí pentolinia a RAS pomocí captoprilu na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem při současně inhibované NOS. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{L-NAME}) = 4$, $n(\text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$, $n(\text{L-NAME}) = 4$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 151 ± 4 mmHg ve skupině L-NAME, 157 ± 3 mmHg ve skupině PENTO + L-NAME a 106 ± 9 mmHg ve skupině CAPTO + L-NAME. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

Kombinovaná inhibice SNS + RAS má za daných podmínek (inhibice NOS) signifikantně odlišný účinek na změny TK po podání fasudilu než má samotná inhibice SNS (v dávce fasudilu 1 mg/kg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME -20 ± 5 oproti -40 ± 6 mmHg ve skupině PENTO + L-NAME, protokol č. 11, viz Obrázek 11).



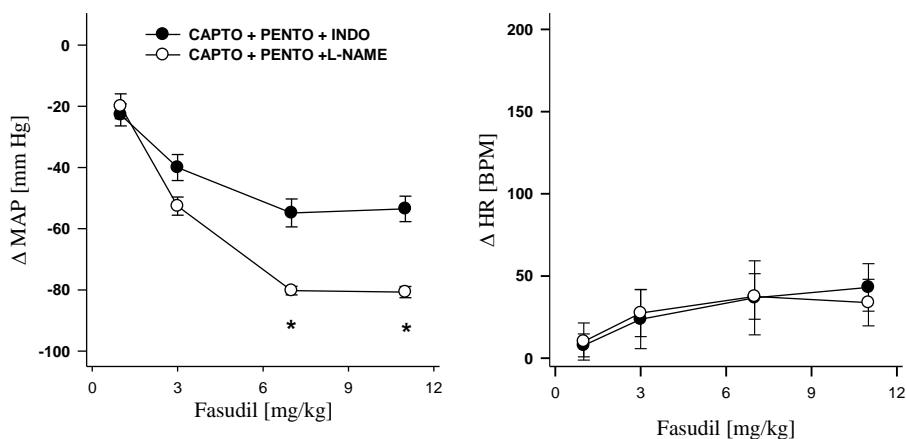
Obrázek 11 Vliv blokátoru SNS pentolinia na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem za podmínek inhibice NOS. Srovnání skupin s/bez současné inhibice RAS pomocí captoprilu. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$, $n(\text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 152 ± 1 mmHg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME a 157 ± 3 mmHg ve skupině PENTO + L-NAME. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

U potkanů s inhibovanou COX způsobila kombinovaná inhibice SNS + RAS posílení efektu fasudilu na krevní tlak (při 7 mg fasudilu/kg ve skupině CAPTO + PENTO + INDO -55 ± 5 oproti -31 ± 3 mmHg ve skupině INDO, protokol č. 12, viz Obrázek 12). Ve skupině s inhibicí SNS + RAS byl pozorován nižší nárůst srdeční frekvence po podání fasudilu (při 11 mg fasudilu/kg ve skupině CAPTO + PENTO + INDO $+43 \pm 15$ oproti $+115 \pm 27$ BPM ve skupině INDO).

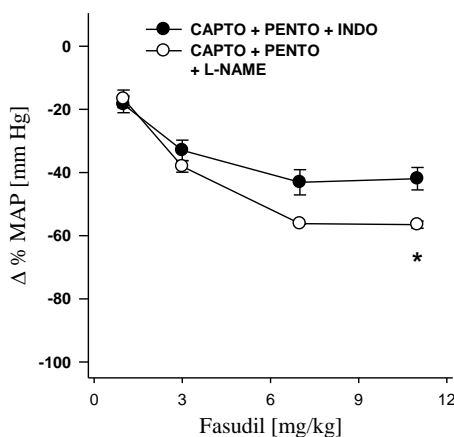


Obrázek 12 Vliv kombinované inhibice SNS a RAS na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem u potkanů s inhibovanou COX. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{INDO}) = 8$, $n(\text{INDO}) = 4$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 118 ± 6 mm Hg ve skupině CAPTO + PENTO + INDO a 132 ± 4 mmHg ve skupině INDO. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

Kombinovaná inhibice SNS + RAS způsobila menší posílení efektu fasudilu na krevní tlak u potkanů s inhibovanou COX než u potkanů s inhibovanou NOS (při 11 mg fasudilu/kg ve skupině CAPTO + PENTO + INDO -54 ±4 oproti -85 ±16 mmHg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME, protokoly č. 11 a 12, viz Obrázek 13), ačkoli se obě skupiny nelišily v odpovědi srdeční frekvence na podání fasudilu. Také při vyjádření v procentech výchozího tlaku byl mezi oběma skupinami signifikantní rozdíl v efektu fasudilu na krevní tlak (viz Obrázek 14).

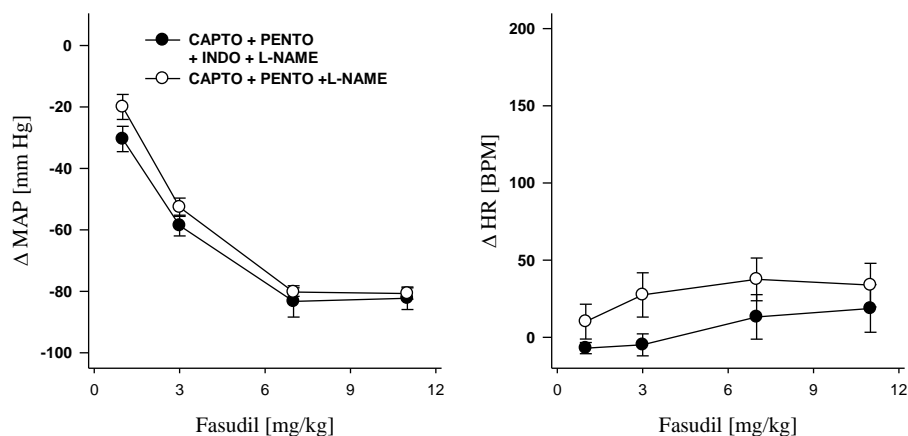


Obrázek 13 Vliv kombinované inhibice SNS, RAS, NOS nebo COX na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot ± SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{INDO}) = 8$, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 118 ± 6 mm Hg ve skupině CAPTO+ PENTO + INDO a 152 ± 1 mmHg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$



Obrázek 14 Vliv kombinované inhibice SNS, RAS, NOS nebo COX na procentuální změny krevního tlaku vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot ± SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{INDO}) = 5$. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

Pokud byly v obdobném pokusu inhibovány oba dva vazodilatační systémy zároveň, odpověď krevního tlaku a srdeční frekvence na podání fasudilu se významně nelišila od situace, kdy byla inhibována pouze NOS (při 11 mg fasudilu/kg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME -81 ± 2 mmHg, ve skupině CAPTO + PENTO + INDO + L-NAME -82 ± 4 mmHg, protokol č.5, viz Obrázek 15).



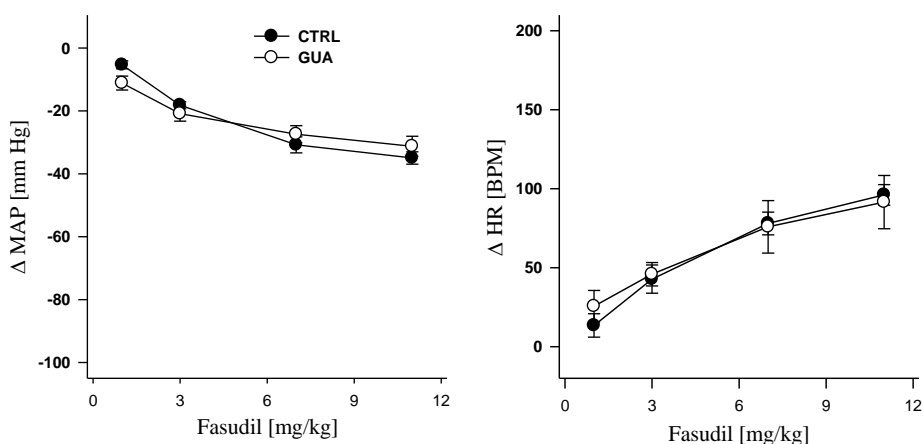
Obrázek 15 Vliv kombinované inhibice SNS, RAS, NOS a/nebo COX na změny krevního tlaku vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{L-NAME}) = 5$, $n(\text{CAPTO} + \text{PENTO} + \text{INDO} + \text{L-NAME}) = 5$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 151 ± 2 mm Hg ve skupině CAPTO + PENTO + INDO + L-NAME a 152 ± 1 mmHg ve skupině CAPTO + PENTO + L-NAME.

5.2 Dlouhodobá inhibice humorálních systémů a její vliv na změny TK po inhibici Rho-kinázy

5.2.1 Chronická inhibice sympatického nervového systému časným podáváním guanethidinu

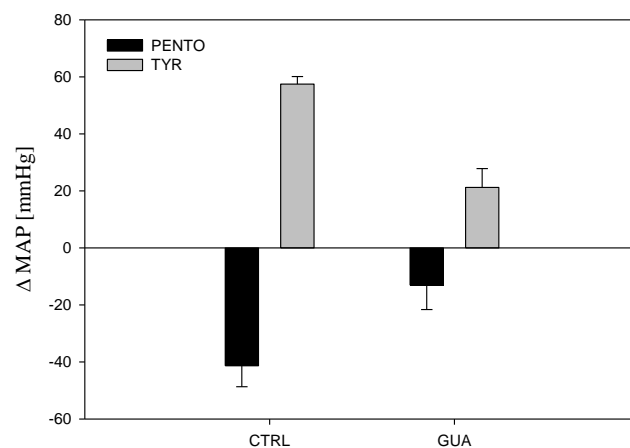
Dlouhodobá inhibice sympatického nervového systému způsobila signifikantní snížení bazálního krevního tlaku oproti kontrolní skupině (102 ± 4 oproti 122 ± 3 mmHg, protokol č. 19).

Změna krevního tlaku při inhibici Rho-kinázy nebyla u sympatektomovaných potkanů odlišná od kontrol (a to ani v procentuálním vyjádření viz Obrázek 16).

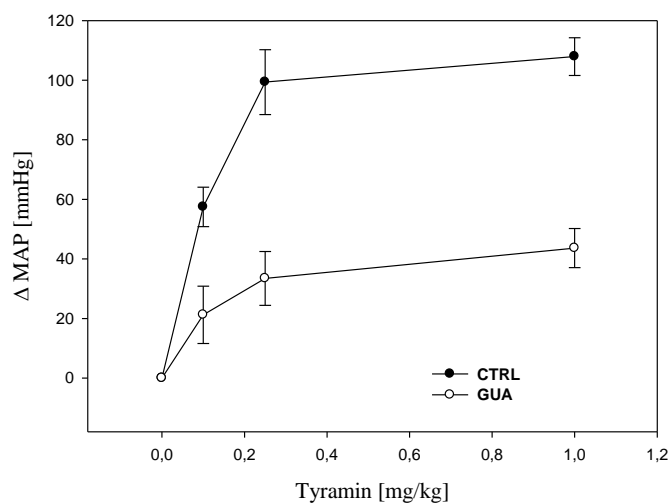


Obrázek 16 Vliv chronického podávání inhibitoru uvolňování katecholaminů guanethidinu na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{GUA}) = 6$, $n(\text{CTRL}) = 7$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 122 ± 3 mm Hg ve skupině CTRL a 102 ± 4 mmHg ve skupině GUA.

Úspěšnost sympatektomie byla ověřena dodatečným kontrolním experimentem. Odpověď TK na pentolinium se u sympatektomovaných potkanů zmenšila o 70 % (viz Obrázek 17). Dále byla sledována dávkově závislá odpověď na tyramin. Při dávkách 0,1 a 1 mg tyraminu/kg byla odpověď sympatektomovaných potkanů snížena o 60 %. Při dávce 0,25 mg/kg byla odpověď sympatektomovaných potkanů snížena o 70 % (viz Obrázek 18). Sympatektomie byla proto vyhodnocena jako úspěšná s počínající mírnou regenerací SNS.



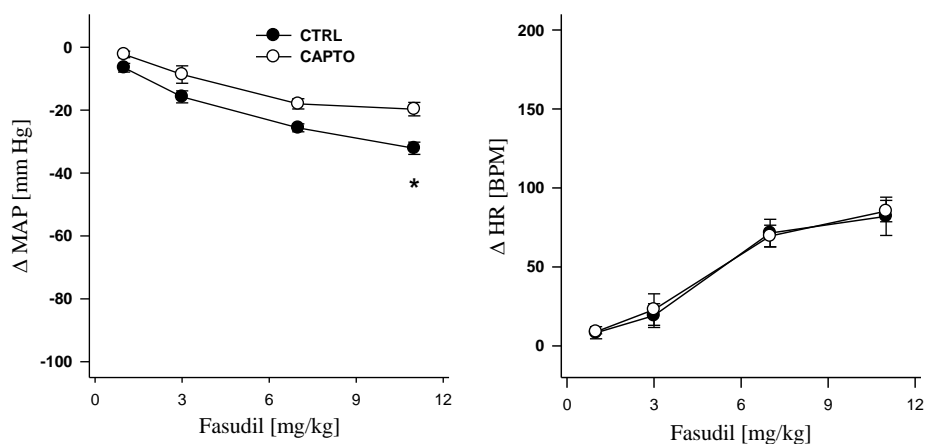
Obrázek 17 Vliv chronického podávání guanethidinu na změny krevního tlaku vyvolané podáním pentolinia a tyraminu. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{GUA}) = 4$, $n(\text{CTRL}) = 4$



Obrázek 18 Vliv chronického podávání guanethidinu na změny krevního tlaku vyvolané podáním různých dávek tyraminu. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{GUA}) = 4$, $n(\text{CTRL}) = 4$

5.2.2 Chronická inhibice RAS

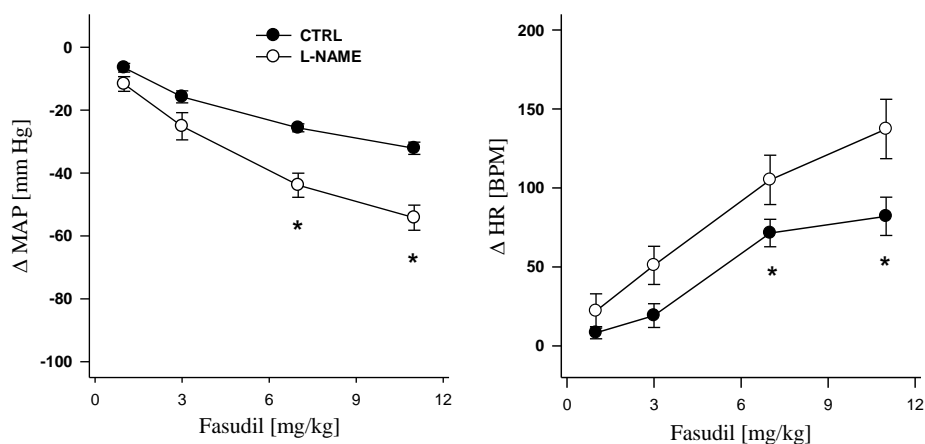
Dlouhodobá inhibice renin-angiotenzinového systému způsobila snížení krevního tlaku oproti kontrole (105 ± 3 oproti 114 ± 2 mmHg, protokol č. 15). Došlo také ke snížení odpovědi krevního tlaku na podání fasudilu (při 11 mg fasudilu/kg ve skupině CAPTO -20 ± 2 oproti -32 ± 2 mmHg v kontrolní skupině, viz Obrázek 19). Toto snížení je patrné i v procentuálním vyjádření (ve skupině CAPTO -19 ± 2 oproti -28 ± 2 % v kontrolní skupině).



Obrázek 19 Vliv chronického podávání inhibitoru RAS captoprilu na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{CAPTO}) = 7$, $n(\text{CTRL}) = 8$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 114 ± 2 mm Hg ve skupině CTRL a 105 ± 3 mmHg ve skupině CAPTO. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

5.2.3 Chronická inhibice NOS

Dlouhodobé podávání inhibitoru NO syntázy L-NAME vedlo k rozvoji zvýšeného krevního tlaku (ve skupině L-NAME 142 ± 3 mmHg oproti 114 ± 2 mmHg v kontrolní skupině, protokol č. 16). Došlo také k navýšení odpovědi na fasudil (při 11 mg fasudilu/kg ve skupině L-NAME -55 ± 5 oproti -32 ± 2 mmHg v kontrolní skupině, viz Obrázek 20). Toto navýšení je signifikantní i při procentuálním vyjádření (ve skupině L-NAME -38 ± 3 oproti -28 ± 2 mmHg v kontrolní skupině).

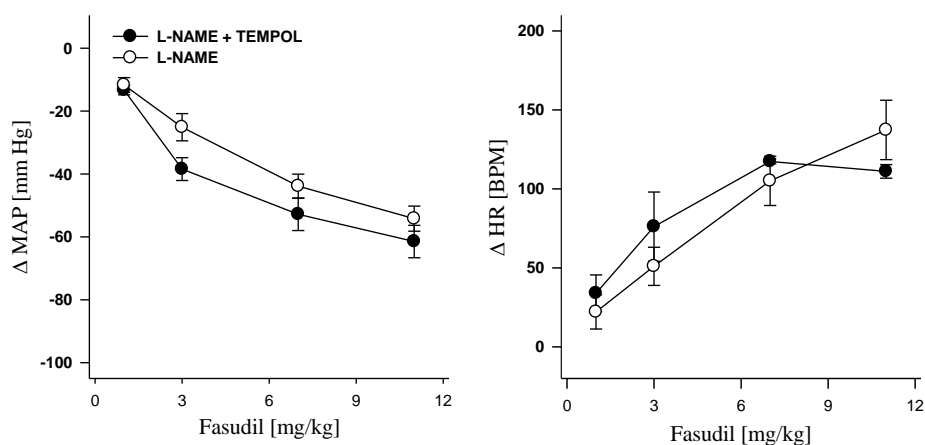


Obrázek 20 Vliv chronického podávání inhibitoru NOS L-NAME na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{L-NAME}) = 8$, $n(\text{CTRL}) = 8$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 114 ± 2 mmHg ve skupině CTRL a 142 ± 3 mmHg ve skupině L-NAME. *: signifikantní rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

5.2.4 Vliv snížení hladiny ROS za podmínek chronické inhibice NOS

Podáním mimetika superoxid dismutázy tempolu způsobuje u L-NAME hypertenzních potkanů výrazný pokles tlaku (ve skupině L-NAME + TEMPOL -19 ± 3 oproti 6 ± 2 mmHg v kontrolní skupině, protokoly 17 a 18). Po deseti minutách od podání tempolu bylo snížení TK stále výrazné (-15 ± 2 mmHg oproti 4 ± 1 mmHg v kontrolní skupině).

Nebyly pozorovány významné rozdíly v odpovědi krevního tlaku na fasudil způsobené u L-NAME hypertenzních potkanů podáním tempolu (protokoly 16 a 17, viz Obrázek 21).



Obrázek 21 Účinek jednorázového podání mimetika superoxid dismutázy tempolu (50 mg/kg) na změny krevního tlaku a srdeční frekvence vyvolané fasudilem ve skupině s/bez chronické inhibice NOS pomocí L-NAME. Zobrazen je aritmetický průměr hodnot \pm SEM, $n(\text{L-NAME} + \text{TEMPOL}) = 4$, $n(\text{L-NAME}) = 8$. Střední tlak před podáním fasudilu byl 134 ± 8 mmHg ve skupině L-NAME + TEMPOL a 142 ± 3 mm Hg ve skupině L-NAME.

6 Diskuze

Vápníková senzitivace je již dlouhou dobu předmětem zájmu fyziologie. Inhibice vápníkové senzitivace zprostředkované Rho-kinázou se experimentálně používá k léčbě arteriosklerózy, cerebrálního vazospasmu či v prevenci ischemisko-reperfuzního poškození srdce (Shimokawa and Takeshita, 2005). Potenciální využití inhibitorů Rho-kinázy v léčbě hypertenze je stále předmětem diskuze (Takeshima et al., 2012). Zejména zůstává nevyřešena otázka úlohy Rho-kinázy v jednotlivých typech hypertenze, které se liší příspěvkem různých vazokonstrikčních a vazodilatačních mechanismů k regulaci TK.

Cílem mojí diplomové práce bylo ověřit význam vápníkové senzitivace v regulaci TK u normotenzních a hypertenzních potkanů, zjistit jaký je vztah klíčových systémů regulace krevního tlaku k vápníkové senzitivaci.

Zkoumané vazokonstrikční a vazodilatační mechanismy byly vybrány s ohledem na jejich akutní a chronický význam pro regulaci krevního tlaku. Sympatický nervový systém je důležitý činitel ve vývoji cév a noradrenalin vylučovaný ze sympatických zakončení představuje nejvýznamnější vazokonstrikční systém působící na cévy (Mancia et al., 1999). Renin-angiotenzinový systém a jeho hlavní efektor endogenní angiotenzin II má méně výrazné účinky při udržování TK normotenzních zvířat než endogenní noradrenalin. Jeho dlouhodobé účinky jsou však velmi výrazné. Oba vybrané vazokonstrikční systémy aktivují v hladkosvalových buňkách cév vápníkovou senzitivaci (Jin et al., 2006; Uehata et al., 1997).

Z vazodilatačních systémů byla vybrán oxid dusnatý a prostacyklin. Oxid dusnatý produkovaný eNOS je velmi významný vazodilatační faktor, spojený s cGMP-signální dráhou. Jeho role v rozvoji hypertenze je obecně přijímána (Huang et al., 1995). Jako druhý vazodilatační systém byl vybrán prostacyklin tvořený COX jako metabolit kyseliny arachidonové. Prostacyklin aktivuje cAMP-signální dráhu (Gluais et al., 2005). Existují některé doklady o inhibičním účinku NO/cGMP signální dráhy na vápníkovou senzitivaci zprostředkovanou Rho-kinázou, ale není známo, zda také aktivace cAMP-signální dráhy může *in vivo* způsobovat stejný efekt na Rho-kinázu (Chitaleey and Webb, 2002; Sauzeau et al., 2000).

V mojí diplomové práci jsem sledovala vliv jednotlivých vazodilatačních a vazokonstrikčních systémů na účinky inhibice Rho-kinázy na krevní tlak a srdeční frekvenci bdělých potkanů. Potkani byly rozděleni do pokusných skupin, z nichž v každé byly inhibovány jiné vazodilatační či vazokonstrikční mechanismy. Inhibice probíhala buď akutně nebo chronicky (viz Tabulka 1).

Předpokladem pro srovnání účinku inhibice Rho-kinázy na krevní tlak v jednotlivých skupinách bylo, že inhibitory vybraných hormonálních systémů působí na krevní tlak především změnami periferního odporu cévního danými změnami kontraktility VSMC, a nikoli cestou změn srdeční frekvence, které do jisté míry odrážejí změny minutového srdečního výdeje. Výsledky pozorování změn TK a srdeční frekvence po akutní inhibici vybraných vazoaktivních systémů tento předpoklad potvrzují. Změny minutového výdeje srdečního působí vždy proti změnám krevního tlaku (kompenzačně), a velikost odpovědi srdeční frekvence je úměrná poklesu krevního tlaku (viz Obrázek 3).

6.1 Vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou je významný regulační mechanismus TK u hypertenzních i normotenzních potkanů.

Průkopnická práce Uehaty a kol. se zabývá účinky inhibice Rho-kinázy na TK potkanů. Popisuje výrazný účinek inhibice ROCK na TK hypertenzních potkanů, ale pouze minimální účinky na TK normotenzních potkanů (Uehata et al., 1997). Experimenty provedené v naší laboratoři však ukázaly, že inhibice Rho-kinázy vede k významnému snížení TK jak u hypertenzních, tak u normotenzních potkanů (Behuliak et al., 2013). Moje práce potvrdila, že inhibice Rho-kinázy fasudilem způsobuje významnou, dávkově závislou odpověď krevního tlaku na fasudil u normotenzních skupin, tak u hypertenzních potkanů (NO-deficientní hypertenze). Vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou je významný regulační mechanismus udržování krevního tlaku jak u hypertenzních, tak u normotenzních potkanů.

6.2 Vzestup krevního tlaku po akutní inhibici vazodilatačních systémů (NOS a COX) je závislý na vápníkové senzitivaci

Akutní inhibice vybraných vazodilatačních systémů (NOS a COX) způsobuje vzestup krevního tlaku, který je omezen předchozím podáním inhibitoru Rho-kinázy. V případě COX inhibice je nárůst TK snížen o 73 % , v případě NOS inhibice o 78 %. Inhibice vazodilatačních systémů tedy zvyšuje vápníkovou senzitivaci zprostředkovanou Rho-kinázou, a to u obou vybraných systémů zhruba stejnou měrou.

Kombinovaná inhibice NOS a COX rovněž způsobuje nárůst krevního tlaku. Předchozí podání inhibitoru Rho-kinázy vyvolalo snížení odpovědi TK na kombinovanou inhibici NOS a COX o 60 %.

Snížení odpovědi TK na inhibici vazodilatačních systémů v důsledku inhibice Rho-kinázy může být dáno specifickým účinkem těchto vazodilatačních drah na Rho-kinázovou dráhu či snížením cytosolické koncentrace vápníku.

6.3 NO-cGMP signální dráha inhibuje u bdělých normotenzních potkanů vápníkovou senzitivaci

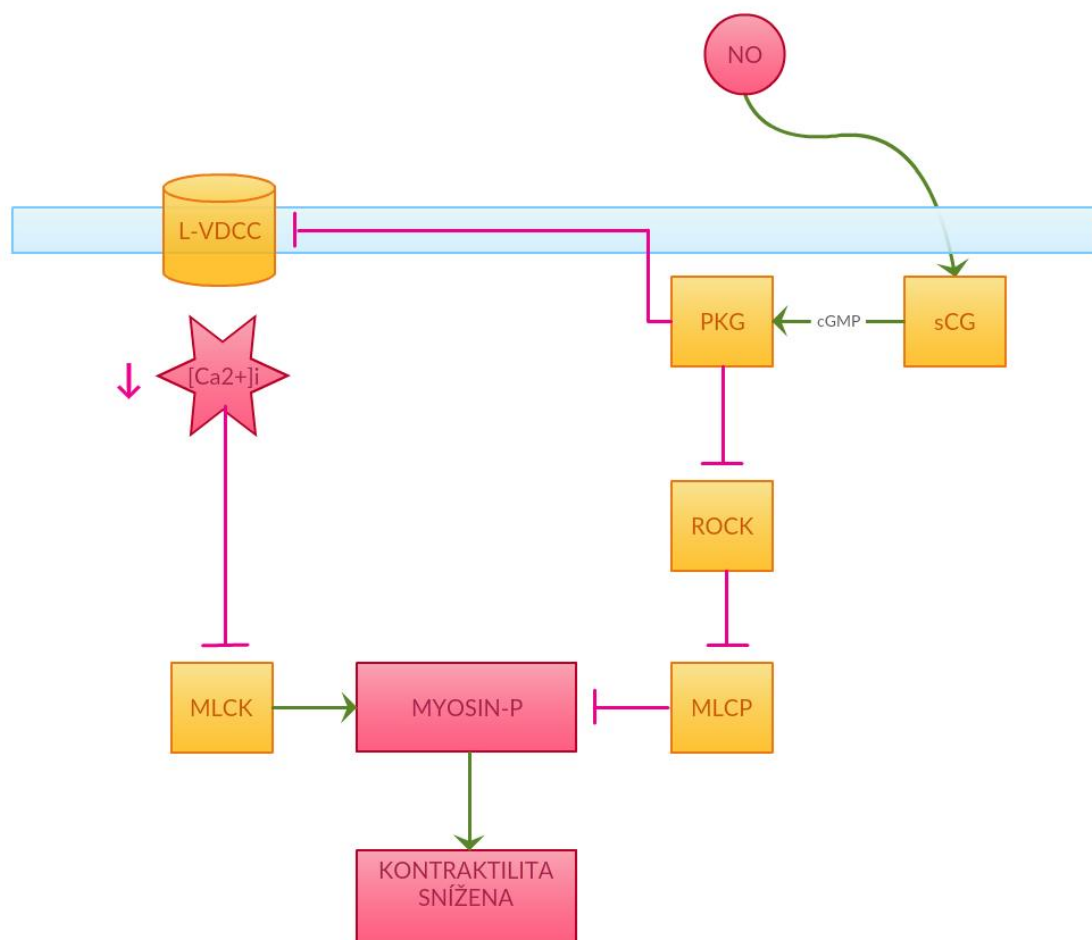
Inhibice Rho-kinázy za podmínek inhibované NOS vedla ke snížení TK, které bylo v případě malých dávek fasudilu větší než u kontrolní skupiny. Toto zjištění podporuje hypotézu o inhibičním vlivu NO/cGMP signální dráhy na vápníkovou senzitivaci, kterou formulovali Sauzeau a kol. (2000). Popsali, že NO inaktivuje RhoA skrze cGMP-dependentní proteinkinázu. Chitaleý a Webb (2002) následně potvrdili, že tento mechanismus může mít fyziologický význam, když ukázali, že inhibice NOS významně snižuje vliv inhibitoru Rho-kinázy na kontrakci izolované cévy vyvolanou fenylefrinem.

Absolutní či relativní nedostatek oxidu dusnatého byl popsán v řadě patologických stavů kardiovaskulárního systému a je společným znakem modelů genetické i indukované hypertenze. Snížená NO-zprostředkovaná inhibice Rho-kinázy se může podílet na rozvoji některých typů hypertenze (Chen and Sanders, 1991; Ribeiro et al., 1992). Při nedostatku NO nedochází k dostatečné inhibici Rho-kinázy, což může vést ke zvýšené kontraktilitě cév a vysokému krevnímu tlaku.

Cílem experimentální části této práce bylo mj. ověřit, zda platí, že endogenní vazodilatační systémy atenuují vápníkovou senzitivaci, zatímco presorické systémy jí podporují. V dalších pokusech byl proto inhibitor NOS (L-NAME) nahrazen inhibitorem COX (indometacinem). V kontrastu k výsledku pokusu s inhibicí NOS nebyl zjištěn významný účinek inhibice COX na změny TK po inhibici Rho-kinázy. Výsledky nepodporují hypotézu, že metabolity COX ovlivňují vápníkovou senzitivaci zprostředkovanou Rho-kinázou.

Pro ověření byly pokusy prováděny také za současné inhibice vazopresorických systémů RAS a SNS. Kompenzační působení těchto presorických systémů může v některých případech zastírat účinky vazoaktivních látek na krevní tlak. Při inhibici RAS a SNS byla také pozorována zvýšená odpověď na inhibici Rho-kinázy u NO-deficientních potkanů. Tato odpověď byla významně větší než v případě inhibice cyklooxygenázy COX (jak v abs. hodnotách tak v % výchozího krevního tlaku). Inhibice NOS má zřetelně tlumivý účinek na vápníkovou senzitivaci (viz Obrázek 22).

Přestože metabolity cyklooxygenázy i oxid dusnatý působí jako vazodilatátory, jejich účinky na vápníkovou senzitivaci jsou odlišné. NO/cGMP signální dráha působí ovlivnění vápníkové senzitivace, zatímco vliv PGI₂/cAMP signální dráhy nebyl prokázán.



Obrázek 22 Dilatace vyvolaná oxidem dusnatým. Oxid dusnatý stimuluje v hladkosvalových buňkách cév produkci cGMP skrze aktivaci solubilní guanylátacyklázy. Produkce cGMP vede ke zvýšení aktivity proteinkinázy G. To má za následek inaktivaci vápníkových kanálů L-VDCC. Proteinkináza G také zprostředkuje inhibici vápníkové senzitivace, čímž snižuje kontraktilitu hladké svaloviny cév. Zároveň dochází kvůli změněné propustnosti iontových kanálů ke snížení cytosolické koncentrace vápníkových iontů a potlačení činnosti kinázy lehkého řetězce myosinu.

Vysvětlivky: cGMP – cyklický guanosinmonofosfát, L-VDCC – napěťově – závislý Ca²⁺ kanál, MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu, NO – oxid dusnatý, MYOSIN-P –fosforylovaný myosin, PKG – proteinkináza G, sGC – solubilní guanylátacykláza, ROCK – Rho-kináza

6.4 Dlouhodobá NO-deficience vyvolává hypertenzi charakterizovanou zvýšeným příspěvkem vápníkové senzitivace k udržování krevního tlaku

Dlouhodobá inhibice NOS pomocí L-NAME způsobila zvýšení tlaku oproti normotenzním kontrolám. U potkanů s inhibicí NOS byla pozorována zvýšená odpověď krevního tlaku na inhibici Rho-kinázy, což naznačuje dlouhodobé posílení vápníkové senzitivace u tohoto modelu hypertenze. Výsledek pokusu je v souladu s hypotézou o inhibičním působení oxidu dusnatého na Rho-kinázovou dráhu.

Pozorované zvýšení vápníkové senzitivace při dlouhodobé inhibici NOS může být dáno buď přímo nedostatkem inhibičně působícího NO nebo zprostředkovaně, např. v důsledku upregulace renin-angiotenzinového systému, která je pro tento experimentální model charakteristická (Kataoka et al., 2002). Kataoka a kol. pozorovali, že efektu inhibitoru Rho-kinázy na rozvoj hypertenze bylo možné zabránit chronickým blokováním AT1 receptorů.

Hypotézu o inhibičním působení NO na Rho-kinázovou dráhu lze posuzovat na základě výsledků akutních experimentů (viz výše). Akutní inhibice NOS způsobila u normotenzních potkanů zvýšení odpovědi na malé dávky inhibitoru Rho-kinázy. Dostupnost oxidu dusnatého ovlivňuje vápníkovou senzitivaci ve VSMC a krevní tlak. Dlouhodobá inhibice NOS má však mnohem výraznější účinek na vápníkovou senzitivaci než akutní inhibice (i v % TK). Zdá se být pravděpodobné, že zvýšený příspěvek Rho-kinázy k udržování TK u NO-deficientních potkanů není pouze důsledkem nedostatečného inhibičního působení NO na Rho-kinázu.

Některé studie naznačují, že zvýšená odpověď na inhibici Rho-kinázy (při současné inhibici NOS) může být zčásti vysvětlena přítomností kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály působí na Rho-kinázovou dráhu aktivačně. Oxid dusnatý reaguje s kyslíkovými radikály a tím snižuje jejich dostupnost (Tschudi et al., 1996; Vaziri et al., 2000). Za účelem testování této hypotézy bylo NOS-deficientním potkanům podáno mimetikum superoxid dismutázy tempol. Oproti kontrolní skupině normotenzních potkanů způsobil tempol výrazný akutní pokles krevního tlaku, který přetrval minimálně po dobu deseti minut. Tento pokles nebyl u kontrolní skupiny přítomen. To naznačuje, že ROS se podílejí na udržování krevního tlaku u NO-deficientních potkanů výrazněji než je tomu u normotenzních kontrol. Dále byla studována odpověď na fasudil ve skupině NO-deficientních potkanů po podání tempolu. V odpovědi krevního tlaku na fasudilu nebyly zjištěny signifikantní rozdíly oproti NO-deficientním potkanům bez tempolu. Experiment nepotvrdil akutní regulační účinek ROS na Rho-kinázu u NO-deficientních potkanů.

Výsledky naznačují, že akutní působení ROS na ROCK není příčinou zvýšené odpovědi na její inhibici.

6.5 RAS a SNS se liší svým příspěvkem k udržování vápníkové senzitivace

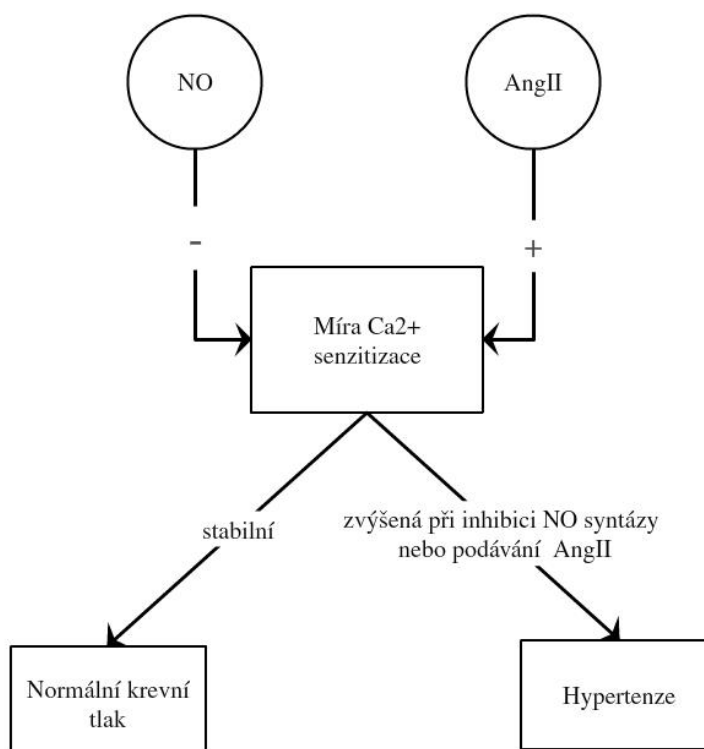
Kromě účinku inhibice vazodilatačních systémů byl studován také účinek inhibice vybraných vazopresorických systémů na vápníkovou senzitivaci. Akutní inhibice RAS nevyvolala žádnou změnu odpovědi na fasudil. Naproti tomu akutní inhibice sympatického nervového systému způsobila výrazné zvýšení odpovědi krevního tlaku na inhibici Rho-kinázy. Vzhledem k vazopresorickému působení sympatického nervového systému bylo očekáváno snížení odpovědi TK na fasudil. Studie fosforylace MLCP, polymerace aktinu a vztahu těchto veličin k vápníkové senzitivaci potvrdila, že působení SNS na α_1 -adrenergní receptory podporuje vápníkovou senzitivaci zprostředkovanou Rho-kinázou (Tsai and Jiang, 2006). Možným vysvětlením pokusů je působení SNS na srdeční frekvenci, a tím i minutový výdej srdeční, ale i na periferní odpor cévního řečiště (viz Obrázek 10).

Dlouhodobá sympatektomie pomocí guanethidinu podávaného v mládí způsobila snížení klidového TK dospělých potkanů oproti normotenzním kontrolám. Nezpůsobila však změnu odpovědi TK a HR na podání inhibitoru Rho-kinázy. Výsledky naznačují, že u sympatektomovaných potkanů nedochází ke změnám ve vápníkové senzitivaci. Naměřená data ukazují, že ačkoli se sympatický nervový systém významně podílí na akutní regulaci vápníkové senzitivace (skrze sekreci NA), její dlouhodobou regulaci neovlivňuje. Tento závěr je v souladu s dalšími experimenty provedenými v naší laboratoři na skupině dospělých potkanů, jimž byl podáván guanethidin po dobu 14 dnů. Ani u této skupiny nedošlo ke změně odpovědi na fasudil. Odpověď krevního tlaku na inhibici Rho-kinázy se u sympatektomovaných potkanů nelišila od odpovědi kontrol ani za podmínek současné blokády SNS, NOS a RAS (Brunova et al., 2015).

V průběhu života potkana dochází pod vlivem SNS k významným fenotypovým změnám VSMC. Na cestě k dospělému kontraktilnímu fenotypu VSMC pravděpodobně dochází k vývojovému snížení významu vápníkové senzitivace při udržování krevního tlaku (Puzdrova et al., 2014). Podle některých autorů dochází k přepnutí z tonického k fázickému fenotypu (Puzdrova et al., 2014; Reho et al., 2014). Naměřená data však nepodporují domněnku, že tyto fenotypové změny se projevují v příspěvku Rho-kinázové dráhy k udržování TK.

Dále byla zkoumána úloha renin-angiotenzinového systému v dlouhodobé regulaci vápníkové senzitivace. Dlouhodobá inhibice RAS pomocí captoprilu způsobila snížení

klidového TK oproti kontrolám. U skupiny s dlouhodobou inhibicí RAS také došlo k výraznému snížení odpovědi TK na podání fasudilu. Inhibice RAS snižuje vápníkovou senzitivaci. Výsledky jsou v souladu se studií Jin a kol. (2006), kteří upozornili na význam Rho-kinázy v hypertenzi vyvolané dlouhodobým podáváním angiotenzinu II. Jin a kol. prokázali, že izolovaná aorta potkanů s hypertenzí vyvolanou angiotenzinem II oproti kontrole silněji reaguje na inhibici Rho-kinázy. Rovněž byla zjištěna zvýšená exprese Rho-kinázy v aortě (Jin et al., 2006). Deregulace renin-angiotenzinového systému může vést ke zvýšení vazokonstrikce závislé na vápníkové senzitivaci a tím ke zvýšenému krevnímu tlaku. Renin-angiotenzinový systém má významnou úlohu v regulaci vápníkové senzitivace u normotenzních i hypertenzních potkanů. Jeho působení na vápníkovou senzitivaci představuje protiváhu působení NO (viz Obrázek 23).



Obrázek 23 Dlouhodobé působení NO a AngII na vápníkovou senzitivaci a krevní tlak. Naše pokusy ukázaly, že chronická inhibice NO syntázy (pomocí L-NAME) vede k rozvoji hypertenze charakterizované zvýšenou vápníkovou senzitivací. Dlouhodobé inhibiční působení NO na vápníkovou senzitivaci je zřejmě důležité v udržování normálního krevního tlaku. Dále se nám podařilo ukázat, že regulace vápníkové senzitivace se účastní také angiotenzin II, který svým působením dlouhodobě podporuje vápníkovou senzitivaci u normotenzních potkanů. Lze se tedy domnívat, že také působení AngII na vápníkovou senzitivaci je důležité v udržování normálního krevního tlaku. V literatuře byla popsána zvýšená vápníková senzitivace u potkanů

s hypertenzí závislou na podávání angiotenzinu II (Jin et al., 2006). V udržování angiotenzin-dependentní hypertenze má zřejmě stejně jako v udržování L-NAME hypertenze význam zvýšená vápníková senzitivace v buňkách hladké svaloviny cév.

Vysvětlivky: AngII – angiotenzin II, NO – oxid dusnatý

SNS a RAS představují dva velice významné vazopresorické systémy, podílející se na vzniku a udržování hypertenze. Liší se však svým vztahem k vápníkové senzitivaci. Poznání vztahu těchto dvou vazokonstrikčních systémů k vápníkové senzitivaci ve VSMC je důležité pro porozumění jejich úlohy při vzniku hypertenze. Charakteristické změny vápníkové senzitivace ve VSMC jsou pozorovány u experimentálních modelů hypertenze, jako je L-NAME hypertenze, angiotenzin II-dependentní hypertenze nebo hypertenze vyvolaná zvýšeným příjmem soli (Dahlovi potkani citliví na sůl). Moje výsledky naznačují, že vápníková senzitivace ve VSMC je dlouhodobě více ovlivněna působením RAS než působením SNS.

7 Závěr

Důležitým činitelem při vzniku hypertenze jsou hormonální změny, které vedou ke změnám kontraktilních vlastností cévní svaloviny. Schopnost hladké svaloviny cév udržovat normální napětí a reagovat na kontraktilní podněty je závislá na buněčném hospodaření s vápníkem. Svalové buňky regulují nejen hladinu vápníku v cytosolu, ale také citlivost kontraktilního aparátu k tomuto iontu skrze mechanismus vápníkové senzitivace. Změněná vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou byla zjištěna u genetických i indukovaných forem experimentální hypertenze. Objasnění mechanismů, které vedou ke změnám vápníkové senzitivace ve svalovině cév je důležité pro pochopení příčin vedoucích k rozvoji hypertenze - jednoho z nejčastějších onemocnění.

Výsledky experimentální části této diplomové práce ukazují, že vápníková senzitivace zprostředkovaná Rho-kinázou je velkou měrou zodpovědná za udržování krevního tlaku, a to jak u normotenzních, tak u hypertenzních potkanů. Velikost odpovědi krevního tlaku na inhibici Rho-kinázy je závislá na přítomnosti vazoaktivních signálních látek jako jsou noradrenalin, angiotenzin II, oxid dusnatý a produkty cyklooxygenázy (prostacyklin).

Výsledky pokusů s akutní inhibicí vazodilatačních systémů potvrzují současnou představu, že NO působí inhibicí vápníkové senzitivace cestou PKG. Na rozdíl od výrazného účinku inhibice NOS na vápníkovou senzitivaci neměla inhibice COX významný efekt. Úloha metabolitů COX v regulaci vápníkové senzitivace se zdá být méně významná než úloha NO. Chronická inhibice NOS vedla k hypertenzi charakterizované vyšší odpovědí krevního tlaku na inhibici Rho-kinázy, než jaká byla pozorována u kontrol. Tato skutečnost může být vysvětlena nepřítomností inhibičního vlivu NO na Rho-kinázu či upregulací renin-angiotenzinového systému, která je pro tento model charakteristická.

Klíčem k porozumění úlohy vazokonstrikčních systémů SNS a RAS v regulaci vápníkové senzitivace se ukázaly být pokusy s chronickou gangliovou blokádou a podáváním inhibitoru ACE captoprilu. Zatímco gangliová blokáda nezpůsobila žádnou změnu odpovědi krevního tlaku na inhibitor Rho-kinázy, inhibice ACE měla výrazný efekt. V dlouhodobé regulaci vápníkové senzitivace zaujímá významnější místo spíše působení renin-angiotenzinového systému než sympatického nervového systému.

Je zapotřebí dalších pokusů, aby bylo objasněno, jaké molekulární mechanismy jsou zodpovědné za dlouhodobé změny vápníkové senzitivace vyvolané působením daných humorálních systémů.

8 Literatura

- Adams, M. A., A. Bobik, and P. I. Korner, 1990, Enalapril can prevent vascular amplifier development in spontaneously hypertensive rats: *Hypertension*, v. 16, p. 252-260.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi, 1996, Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase): *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 20246-20249.
- Behuliak, M., M. Pinterova, J. Kunes, and J. Zicha, 2011, Vasodilator efficiency of endogenous prostanoids, Ca²⁺-activated K⁺ channels and nitric oxide in rats with spontaneous, salt-dependent or NO-deficient hypertension: *Hypertension Research*, v. 34, p. 968-975.
- Behuliak, M., M. Pinterova, M. Bencze, M. Petrova, S. Liskova, P. Karen, J. Kunes, I. Vaneckova, and J. Zicha, 2013, Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats: *Journal of Hypertension*, v. 31, p. 2025-2035.
- Berecek, K. H., T. Okuno, S. Nagahama, and S. Oparil, 1983, Altered vascular reactivity and baroreflex sensitivity induced by chronic central administration of captopril in the spontaneously hypertensive rat: *Hypertension*, v. 5, p. 689-700.
- Bradley, A. B., and K. G. Morgan, 1987, Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary-artery contractions as detected by aequorin: *Journal of Physiology-London*, v. 385, p. 437-448.
- Brunova, A., M. Bencze, M. Behuliak, J. Zicha, 2015, Acute and chronic role of nitric oxide, renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in the modulation of calcium sensitization in Wistar rats, *Physiological Research*, 64: p. 447-457 (v tisku).
- Cai, H., and D. G. Harrison, 2000, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases - The role of oxidant stress: *Circulation Research*, v. 87, p. 840-844.
- Chadha, P. S., F. Zunke, H.-L. Zhu, A. J. Davis, T. A. Jepps, S. P. Olesen, W. C. Cole, J. D. Moffatt, and I. A. Greenwood, 2012, Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired beta-adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension: *Hypertension*, v. 59, p. 877-U274.
- Chen, P. Y., and P. W. Sanders, 1991, L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl Rapp rats: *Journal of Clinical Investigation*, v. 88, p. 1559-1567.
- Chitale, K., and R. C. Webb, 2002, Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of Rho-kinase signaling: *Hypertension*, v. 39, p. 438-442.
- Dejima, T., K. Tamura, H. Wakui, A. Maeda, M. Ohsawa, T. Kanaoka, S. Haku, A. Kengo, S.-i. Masuda, A.-i. Shigenaga, K. Azuma, M. Matsuda, M. Yabana, T. Hirose, K. Uchino, K. Kimura, Y. Nagashima, and S. Umemura, 2011, Prepubertal angiotensin blockade exerts long-term therapeutic effect through sustained ATRAP activation in salt-sensitive hypertensive rats: *Journal of Hypertension*, v. 29, p. 1919-1929.
- Dohi, Y., L. Criscione, K. Pfeiffer, and T. F. Luscher, 1994, Angiotensin blockade or calcium-antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension – studies in perfused mesenteric arteries: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 24, p. 372-379.
- Fernandez, D., P. Bolli, W. Snedden, S. Vasdev, and P. G. Fernandez, 1988, Modulation of left-ventricular hypertrophy by dietary salt and inhibition of angiotensin-converting enzyme: *Journal of Hypertension*, v. 6, p. S145-S147.
- Fisher, S. A., 2010, Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function: *Physiological Genomics*, v. 42A, p. 169-187.

- Fujiwara, T., T. Itoh, Y. Kubota, and H. Kuriyama, 1989, Effects of guanosine nucleotides on skinned smooth-muscle tissue of the rabbit mesenteric artery: *Journal of Physiology-London*, v. 408, p. 535-547.
- Gluais, P., M. Lonchamp, J. D. Morrow, P. M. Vanhoutte, and M. Feletou, 2005, Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin: *British Journal of Pharmacology*, v. 146, p. 834-845.
- Halliwell, B., 1997, What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?: *Febs Letters*, v. 411, p. 157-160.
- Higashi, M., H. Shimokawa, T. Hattori, J. Hiroki, Y. Mukai, K. Morikawa, T. Ichiki, S. Takahashi, and A. Takeshita, 2003, Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo - effect on endothelial NAD(P)H oxidase system: *Circulation Research*, v. 93, p. 767-775.
- Hilgers, R. H. P., J. Todd, and R. C. Webb, 2007, Increased PDZ-RhoGEF/RhoA/Rho kinase signaling in small mesenteric arteries of angiotensin II-induced hypertensive rats: *Journal of Hypertension*, v. 25, p. 1687-1697.
- Hilgers, R. H. P., and R. C. Webb, 2005, Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: Focus on Rho: *Experimental Biology and Medicine*, v. 230, p. 829-835.
- Himpens, B., T. Kitazawa, and A. P. Somlyo, 1990, Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary-artery smooth-muscle: *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 417, p. 21-28.
- Huang, P. L., Z. H. Huang, H. Mashimo, K. D. Bloch, M. A. Moskowitz, J. A. Bevan, and M. C. Fishman, 1995, Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric-oxide synthase: *Nature*, v. 377, p. 239-242.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii, and S. Narumiya, 1996, The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase: *Embo Journal*, v. 15, p. 1885-1893.
- Jefferson, S., R. Rush, C. Zettler, D. B. Frewin, and R. J. Head, 1995, The Influence of the renin-angiotensin system on abnormal expression of nerve growth-factor in the spontaneously hypertensive rat: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 22, p. 478-480.
- Jin, L. M., Z. K. Ying, R. H. P. Hilgers, J. Yin, X. Y. Zhao, J. D. Imig, and R. C. Webb, 2006, Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 318, p. 288-295.
- Jin, L. M., Z. K. Ying, and R. C. Webb, 2004, Activation of RhoA/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 287, p. H1495-H1500.
- Kataoka, C., K. Egashira, S. Inoue, M. Takemoto, W. H. Ni, M. Koyanagi, S. Kitamoto, M. Usui, K. Kaibuchi, H. Shimokawa, and A. Takeshita, 2002, Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats: *Hypertension*, v. 39, p. 245-250.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. H. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi, 1996, Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase): *Science*, v. 273, p. 245-248.
- Kitazawa, T., M. Masuo, and A. P. Somlyo, 1991, G-protein mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 9307-9310.

- Korner, P., A. Bobik, C. Oddie, and P. Friberg, 1993, Sympatoadrenal system is critical for structural-changes in genetic hypertension: *Hypertension*, v. 22, p. 243-252.
- Kunes, J., S. Hojna, M. Kadlecova, Z. Dobesova, H. Rauchova, M. Vokurkova, J. Loukotova, O. Pechanova, and J. Zicha, 2004, Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: The role of relative NO deficiency: *Physiological Research*, v. 53, p. S23-S34.
- Kyle, B. D., S. Hurst, R. D. Swayze, J. Z. Sheng, and A. P. Braun, 2013, Specific phosphorylation sites underlie the stimulation of a large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel by cGMP-dependent protein kinase: *Faseb Journal*, v. 27, p. 2027-2038.
- Lantelme, P., M. Lo, and J. Sassard, 1994, Decreased cardiac baroreflex sensitivity is net due to cardiac-hypertrophy in N-G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: *Journal of Hypertension*, v. 12, p. 791-795.
- Laufs, U., and J. K. Liao, 1998, Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by rho GTPase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24266-24271.
- Lee, R., K. R. Borkowski, F. H. H. Leenen, J. Tsoporis, and M. Coughlin, 1991, Combined effects of neonatal sympathectomy and adrenal demedulation on blood –pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats: *Circulation Research*, v. 69, p. 714-721.
- Leenen, F. H. H., 2010, The central role of the brain aldosterone-"ouabain" pathway in salt-sensitive hypertension: *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, v. 1802, p. 1132-1139.
- Leo, M. D., J. P. Bannister, D. Narayanan, A. Nair, J. E. Grubbs, K. S. Gabrick, F. A. Boop, and J. H. Jaggar, 2014, Dynamic regulation of beta 1 subunit trafficking controls vascular contractility: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, p. 2361-2366.
- Leung, T., E. Manser, L. Tan, and L. Lim, 1995, A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 29051-29054.
- Liu, H. Y., Z. L. Xiong, and N. Sperelakis, 1997, Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 29, p. 1411-1421.
- Lohn, M., K. Steioff, M. Bleich, A. E. Busch, and Y. Ivashchenko, 2005, Inhibition of Rho-kinase stimulates nitric oxide-independent vasorelaxation: *European Journal of Pharmacology*, v. 507, p. 179-186.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. P. Chepenik, and S. A. Waldman, 2000, Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP: *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 375-413.
- Mancia, G., C. Grassi, C. Giannattasio, and G. Seravalle, 1999, Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage: *Hypertension*, v. 34, p. 724-728.
- Mehta, P. K., and K. K. Griendling, 2007, Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system: *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 292, p. C82-C97.
- Mervaala, E. M. A., T. L. Teravainen, L. Malmberg, J. Laakso, H. Vapaatalo, and H. Karppanen, 1997, Cardiovascular effects of a low-dose combination of ramipril and felodipine in spontaneously hypertensive rats: *British Journal of Pharmacology*, v. 121, p. 503-510.

- Pechanova, O., Z. Dobesova, J. Cejka, A. Kunes, and J. Zicha, 2004, Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase: *Journal of Hypertension*, v. 22, p. 167-173.
- Pinterova, M., M. Behuliak, J. Kunes, and J. Zicha, 2014, Involvement of BKCa and K-V potassium channels in cAMP-induced vasodilatation: Their insufficient function in genetic hypertension: *Physiological Research*, v. 63, p. 275-285.
- Pinterova, M., S. Liskova, Z. Dobesova, M. Behuliak, J. Kunes, and J. Zicha, 2009, Impaired control of L-type voltage-dependent calcium channels in experimental hypertension: *Physiological Research*, v. 58, p. S43-S54.
- Puzdrova, V. A., Kudryashova, D. K. Gaynullina, S. V. Mochalov, C. Aalkjaer, H. Nilsson, A. V. Vorotnikov, R. Schubert, and O. S. Tarasova, 2014, Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca²⁺ sensitivity during early post-natal development in rats: *Acta Physiologica*, v. 212, p. 128-141.
- Qiu, C. B., K. Engels, and C. Baylis, 1994, Angiotensin-II and alpha(1)-adrenergic tone in chronic nitric-oxide blockade-induced hypertension: *American Journal of Physiology*, v. 266, p. R1470-R1476.
- Reho, J. J., X. Zheng, J. E. Benjamin, and S. A. Fisher, 2014, Neural programming of mesenteric and renal arteries: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 307, p. H563-H573.
- Ribeiro, M. O., E. Antunes, G. Denucci, S. M. Lovisolo, and R. Zatz, 1992, Chronic inhibition of nitric-oxide synthesis – a new model of arterial hypertension: *Hypertension*, v. 20, p. 298-303.
- Sander, M., P. G. Hansen, and R. G. Victor, 1995, Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric-oxide: *Hypertension*, v. 26, p. 691-695.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S. M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud, and G. Loirand, 2000, Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 21722-21729.
- Scrogin, K. E., R. Veelken, and F. C. Luft, 1993, Sympathetic baroreceptor responses following chronic nitric-oxide (NO) inhibition in conscious rats: *Hypertension*, v. 22, p. 416-416.
- Shimokawa, H., and A. Takeshita, 2005, Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine: *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 25, p. 1767-1775.
- Surks, H. K., N. Mochizuki, Y. Kasai, S. P. Georgescu, K. M. Tang, M. Ito, T. M. Lincoln, and M. E. Mendelsohn, 1999, Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I alpha: *Science*, v. 286, p. 1583-1587.
- Suzuki, N., N. Hajicek, and T. Kozasa, 2009, Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways: *Neurosignals*, v. 17, p. 55-70.
- Taguchi, K., M. Ueda, and T. Kubo, 1997, Effects of cAMP and cGMP on L-type calcium channel currents in rat mesenteric artery cells: *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 74, p. 179-186.
- Takeshima, H., N. Kobayashi, W. Koguchi, M. Ishikawa, F. Sugiyama, and T. Ishimitsu, 2012, Cardioprotective effect of a combination of Rho-kinase inhibitor and P38 MAPK inhibitor on cardiovascular remodeling and oxidative stress in Dahl rats: *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, v. 19, p. 326-336.
- Teixeira, C. E., L. M. Jin, Z. K. Ying, T. Palmer, F. B. M. Priviero, and R. C. Webb, 2005, Expression and functional role of the RhoA/Rho-kinase pathway in rat coeliac artery: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 32, p. 817-824.

- Tsai, M.-H., and M. J. Jiang, 2006, Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction: *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 453, p. 223-232.
- Tschudi, M. R., S. Mesaros, T. F. Luscher, and T. Malinski, 1996, Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension: *Hypertension*, v. 27, p. 32-35.
- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, and S. Narumiya, 1997, Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension: *Nature*, v. 389, p. 990-994.
- van der Giet, M., M. Erinola, W. Zidek, and M. Tepel, 2002, Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species: *European Journal of Clinical Investigation*, v. 32, p. 732-737.
- Vaziri, N. D., Z. M. Ni, F. Oveisi, and D. L. Trnavsky-Hobbs, 2000, Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats: *Hypertension*, v. 36, p. 957-964.
- Vukelic, S., and K. K. Griendling, 2014, Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor A Paradigm shift: *Circulation Research*, v. 114, p. 754-757.
- Wamhoff, B. R., D. K. Bowles, O. G. McDonald, S. Sinha, A. P. Somlyo, A. V. Somlyo, and G. K. Owens, 2004, L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism: *Circulation Research*, v. 95, p. 406-414.
- Webb, R. C., 2003, Smooth muscle contraction and relaxation: *Advances in Physiology Education*, v. 27, p. 201-206.
- Wilcox, C. S., and A. Pearlman, 2008, Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides: *Pharmacological Reviews*, v. 60, p. 418-469.
- Wolfrum, S., A. Dendorfer, Y. Rikitake, T. J. Stalker, Y. L. Gong, R. Scalia, P. Dominiak, and J. K. Liao, 2004, Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase protein kinase Akt and cardiovascular protection: *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 24, p. 1842-1847.
- Wu, X. Q., T. A. J. Haystead, R. K. Nakamoto, A. V. Somlyo, and A. P. Somlyo, 1998, Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin - Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 11362-11369.
- Yamada, S. S., A. L. Sasaki, C. K. Fujihara, D. Malheiros, G. DeNucci, and R. Zatz, 1996, Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade: *Hypertension*, v. 27, p. 1165-1172.
- Ying, Z. K., L. M. Jin, A. M. Dorrance, and R. C. Webb, 2004, Increased expression of mRNA for regulator of G protein signaling domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors in aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats: *American Journal of Hypertension*, v. 17, p. 981-985.
- Zanchi, A., N. C. Schaad, M. C. Osterheld, E. Grouzmann, J. Nussberger, H. R. Brunner, and B. Waeber, 1995, Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous-system: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 268, p. H2267-H2273.
- Zicha, J., and J. Kunes, 1999, Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat: *Physiological Reviews*, v. 79, p. 1227-1282.
- Zicha, J., Z. Dobesova, and J. Kunes, 2001, Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions: *Journal of Hypertension*, v. 19, p. 247-254.

- Zicha, J., Z. Dobesova, and J. Kunes, 2006, Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats: *Hypertension Research*, v. 29, p. 1021-1027.
- Zicha, J., Z. Dobesova, M. Vokurkova, H. Rauchova, S. Hojna, M. Kadlecova, M. Behuliak, I. Vaneckova, and J. Kunes, 2012, Age-dependent salt hypertension in Dahl rats: Fifty years of research: *Physiological Research*, v. 61, p. S35-S87.
- Zicha, J., Fyziologicky ustav AV CR [online]. [cit. 2015-08-02]. Dostupné z: <http://www.fgu.cas.cz/departments/experimentalni-hypertenze>

9 Příloha

Přikládám kopii článku, který byl přijat do odborného časopisu *Physiological Research*. Obsah článku vychází z výsledků předložených v této diplomové práci.

