

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.
Oddělení experimentální hypertenze
Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences
Department of Experimental Hypertension

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů
Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physiology



Autoreferát disertační práce
**Úloha Ca^{2+} vstupu a Ca^{2+} senzitivace při kontrakci izolovaných
artérií normotenzního a hypertenzního potkana**

Synopsis of the PhD thesis
**The Role of Ca^{2+} Influx and Ca^{2+} Sensitization in Contraction of
Isolated Arteries of Normotensive and Hypertensive Rat**

Mgr. Michal Bencze

Praha/ Prague

2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Doctoral Study Programs in Biomedicine

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Charles University in Prague and Czech Academy of Sciences

Studijní program / Study program:

Fyziologie živočichů / Animal Physiology

Předseda oborové rady / President of Subject Area Board:

doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i. /

Institute of Physiology CAS, v. v. i.

Autor / Author: Mgr. Michal Bencze

Školitel / Supervisor: MUDr. Josef Zicha, DrSc.

S disertací je možné se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

The thesis is available in respective libraries of Faculty of Science of Charles University in Prague.

CZ - Obsah

Abstrakt	4
Seznam skratek	5
Úvod	6
Cíle disertační práce.....	9
Metody.....	10
Výsledky a diskuze	11
Část I: Neselektivní inhibitory TRP kanálů ovlivňují kontrakci artérií potkana	11
Část II: Změněné kontraktilní odpovědi artérií spontánně hypertenzního potkana. 12	
Část III: Příspěvek Ca^{2+} sensitizace (RhoA/Rho kinázové dráhy) a Ca^{2+} vstupu k udržení vysokého krevního tlaku u potkanů s genetickou nebo solnou hypertenzí. 14	
Závěr.....	16
Seznam literatury	17
Seznam publikací pro disertační práci	19
Seznam publikací autora	20
Životopis.....	21

ENG - Table of Contents

Summary.....	22
List of abbreviations	23
Introduction	24
Aims of the thesis	27

Methods	28
Results and Discussion	29
Part I: Non-selective TRP channel inhibitors affect contraction of arteries of rat ..	29
Part II: Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat.....	30
Part III: Contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance mediated by RhoA/Rho kinase pathway in rats with genetic and salt hypertension.....	32
Conclusions	34
References	35
List of publications for Ph.D. thesis.....	37
List of all publications of the author	38
Curriculum vitae	39

Abstrakt

Cévní odpor je dán především kontrakcí hladkého svalu cév, která je regulována fosforylací lehkého řetězce myosinu. Hladkosvalová cévní kontrakce je zahájena vstupem vápníku do buněk, který je zprostředkovaný kanály typu TRP (transient receptor potential) a napětově závislými Ca^{2+} kanály typu L (L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels, L-VDCC). Vápníková sensitizace je mechanismus zvyšující cévní kontraktilitu při dané úrovni intracelulárního vápníku pomocí RhoA/Rho kinázou zprostředkovanou inhibicí fosfatázy lehkého řetězce myosinu. V této disertační práci prezentuji data 1) o úloze TRP kanálů v mechanismu kontrakce hladkého svalu cév, 2) o zvýšené kontraktilitě artérií spontánně hypertenzních potkanů (spontaneously hypertensive rats, SHR) a 3) o rozdílech v kontrakci artérií u normotenzních a hypertenzních potkanů, spojených s úlohou RhoA/Rho kinázové dráhy u třech modelů experimentální hypertenze (SHR, Ren-2 transgenní potkani a sůl-senzitivní Dahlovi potkani).

Ve studii věnující se TRP kanálům jsem porovnával vlivy třech běžně používaných neselektivních inhibitorů TRP kanálů (2-APB, SKF-96365 a FFA) na kontrakci izolované artérie. Z těchto inhibitorů byl nejzajímavější 2-APB, jehož inhibiční působení bylo závislé na typu kontrakčního stimulu a zároveň na přítomnosti sodíku v inkubačním roztoku. Ve studii týkající se zvýšené kontraktility artérií SHR potkana bylo prokázáno několik mechanismů, které za ni mohou být zodpovědné: vliv noradrenalinu uvolněného z vaskulárních varikosit, nedostatečné otevírání K^+ kanálů a především změna membránového potenciálu. Jak vstup vápníku, tak vápníková sensitizace přispívají k adrenergní kontrakci artérií. Vstup vápníku se zdá být důležitější u potkanů s genetickou hypertenzí (SHR a Ren-2 transgenní potkani), zatímco úloha vápníkové sensitizace je u nich snižena. Naopak úloha vápníkové sensitizace je zvýšená při kontrakci artérií u sůl-senzitivních Dahlových potkanů.

Lepší pochopení mechanismů hladkosvalové cévní kontrakce ve zdraví a nemoci je důležité pro vývoj budoucích léčiv.

Seznam skratek

2-APB - 2-aminoethoxydifenyl borát

$[Ca^{2+}]_i$ - intracelulární Ca^{2+} koncentrace

DAG - 1,2-diacylglycerol

HSC – hladký sval cév

IP_3 - inositoltrisfosfát

KPSS - K^+ -indukovaná kontrakce

L-VDCC - L-tyt napětím ovládaných Ca^{2+} kanálů

MLCK - kináza lehkého řetězce myosinu

NIF - nifedipine

NO - oxid dusnatý

SHR - spontánně hypertenzní potkani

Ren-2 TGR - Ren-2 transgenní potkani

SR/Jr - sůl-resistentní Dahlovi potkani

SS/Jr - sůl-sensitivní Dahlovi potkani

TRPC – kanonické kanály typu TRP (transient receptor potential)

WKY – Wistar-Kyoto potkani

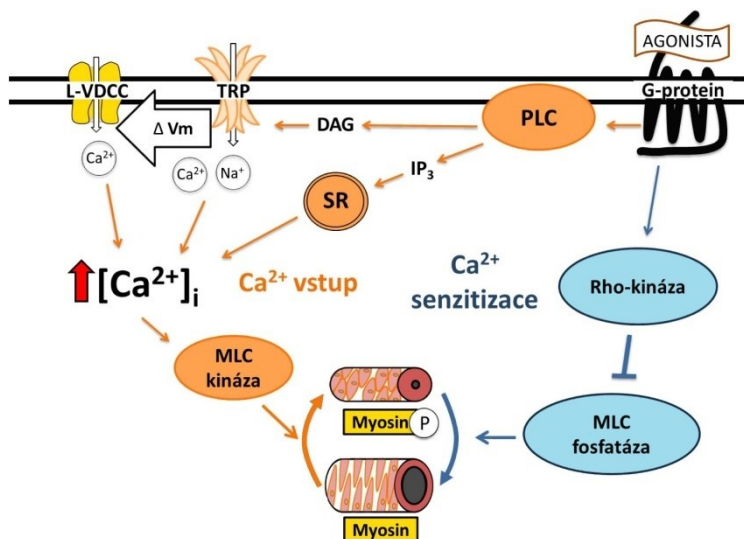
Úvod

Cévní odpor je jedním z hlavních faktorů určujících výši krevního tlaku. Kontraktlní stav artérií, který nejvíce přispívá k cévnímu odporu, je výsledkem vasokonstrikčních a vasodilatačních procesů v hladkém svalu cév. Kontrakce artérií je regulována především sympatickým nervovým systémem. Sympatické neuróny končí v arteriální stěně jako kulovitá zakončení – sympatické varikosity, ze kterých jsou uvolňovány neurotransmitery včetně noradrenalinu (Astrand a Stjärne, 1989). Adrenergní receptory jsou místem působení noradrenalinu a adrenalinu na periferii i v centrálním nervovém systému. α_1 -adrenergní receptory jsou lokalizovány v blízkosti sympatických varikosit, kde je aktivuje noradrenalin uvolňující se ze zakončení, zatímco α_2 -adrenergní receptory se nacházejí mimo synaptické štěrbinu, aby je mohly aktivovat cirkulující katecholaminy.

Kontrakce hladkého svalu cév (HSC) je regulována aktivací kontraktlních proteinů myosinu a aktinu. Adrenergní vasokonstrikce u artérií zahrnuje vstup vápenatých iontů skrze napětím- a receptory-ovládané iontové kanály. Vazba vápenatých iontů na kalmodulin vede k aktivaci kinázy lehkého řetězce myosinu (myosin light chain kinase (MLCK) a tudíž k fosforylaci lehkého řetězce myosinu, co umožňuje molekulární interakci myosinu a aktinu. Energie uvolněná z ATP myosinovou ATPázou umožňuje tvorbu aktin-myosinového komplexu nezbytného pro kontrakci hladkého svalu (Webb 2003).

Transmembránový vstup Ca^{2+} je podporován agonisty-aktivovanými, na napětí-nezávislými kanály propustnými pro vápenaté ionty, které jsou aktivované fosfolipázou C signální dráhou - tyto kanály se nazývají receptorem-ovládané Ca^{2+} kanály. Primární podnět pro vzestup intracelulárního Ca^{2+} a tudíž i pro vznik HSC kontrakce je membránová depolarizace s následným otevřením napětím-ovládaných Ca^{2+} kanálů (McFadzean a kol., 2002). Aktivace receptorů spřažených s G-proteiny vede k aktivaci fosfolipázy C, která produkuje inositol 1,4,5-trisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). Poté následuje bifázický nárůst intracelulární Ca^{2+} koncentrace ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) - IP_3 způsobuje uvolnění vápenatých iontů z intracelulárních zásob, zatímco DAG přispívá k tvorbě membránové depolarizace a ke kontinuálnímu vstupu vápenatých iontů přes plazmatickou membránu (Berridge, 2008; Obrázek 1). Kanály

kanonické TRP podskupiny (TRPC) jsou jedny z molekulárních kandidátů na neselektivní kationtové kanály aktivované receptory spřaženými s G-proteiny v hladkém svalu (Early a Brayden 2015). Napětím ovládané Ca^{2+} kanály L-typu (L-VDCC) zprostředkují tok Ca^{2+} do buněk v reakci na membránovou depolarizaci. Vysoký krevní tlak zvyšuje expresi L-VDCC podjednotky $\alpha 1\text{C}$ v hladkosvalových buňkách cév. Membránová depolarizace je potenciálním signálem pro tuto interakci, která může přispět k vývoji abnormálně vysokého cévního tonu (Pescic a kol., 2004).



Obrázek 1. Schematická reprezentace kontrakce hladkého svalu cév. L-VDCC - L-typ napětím ovládaných Ca^{2+} kanálů; TRP – “transient receptor potential” kanály, V_m – membránový potenciál; DAG – diacylglycerol; PLC – fosfolipáza C; G-protein – receptory spřažené s G proteinem; SR – sarkoplasmatické retikulum; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – intracelulární Ca^{2+} koncentrace; P – fosforylace; MLC - lehký řetězec myosinu.

Kontrakce HSC je také ovlivněná Ca^{2+} sensitizací, která mění citlivost kontraktálního aparátu přes Rho/Rho kinázovou dráhu. Ca^{2+} sensitizace odráží úroveň inhibice fosfatázy lehkého řetězce myosinu, která defosforyluje lehký řetězec myosinu a vede k relaxaci HSC. Kontraktilní síla je tedy hlavně určena množstvím

fosforylované formy lehkého řetězce myosinu, který je regulovaný aktivitou kinázy lehkého řetězce myosinu a jeho fosfatázou (Somlyo a Somlyo, 2003).

Hypertenze je multifaktoriální onemocnění zahrnující komplexní interakce mezi genetickými mechanismy a faktory prostředí. Byly vyvinuté různé modely experimentální hypertenze. Genetická hypertenze u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) je obecně charakterizována zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému a změnami ve Ca^{2+} homeostáze hladkosvalových buněk (Head a kol., 1989). Naše skupina v předcházejících pokusech potvrdila zvýšenou aktivitu sympatického nervového systému přispívající k udržení hypertenze u SHR přes G_i -protein/cAMP-spřáženou dráhu způsobující zvýšený vstup vápenatých iontů cestou L-VDCC (Pintérová a kol. 2010). Ren-2 transgenní potkani (Ren-2 TGR) jsou charakterizováni těžkou hypertenzí vytvořenou vložením myšího genu pro renin; tato hypertenze je smrtelná pro homozygotní Ren-2 TGR (Lee a kol., 1996). Naše studie ukázaly zvýšenou odpověď krevního tlaku na akutní blokádu L-VDCC nifedipinem u heterozygotních Ren-2 TGR, naznačující zvýšený vstup vápenatých iontů cestou L-VDCC v rezistentních cévách těchto hypertenzních zvířat (Vaněčková a kol. 2015). Zvýšený příjem soli u Dahlových sůl-senzitivních potkanů (SS/Jr) vede k hypertenzi, zatímco u Dahlových sůl-rezistentních potkanů zůstávají zachovány normální hodnoty krevního tlaku (Dahl a kol., 1962). Solná hypertenze u mladých SS/Jr potkanů je charakterizována zvýšenou sympatickou aktivitou, relativní NO deficiencí, sníženou funkcí baroreflexu a také výrazným zvýšením reziduálního krevního tlaku naznačujícím remodelaci cév (Zicha a kol., 2012).

Cíle disertační práce

Disertační práce může být rozdělena na studium mechanismů kontrakce hladkého svalu cév (HSC) a studium změn HSC v hypertenzi. Studium kontrakce HSC bylo zaměřeno na studium vstupu vápenatých iontů přes neselektivní kationtové kanály. Studium změn HSC bylo zaměřeno na charakterizaci zvýšené kontraktility artérií spontánně hypertenzních potkanů. Závěrem bylo provedeno detailní prozkoumání úlohy Ca^{2+} sensitizace v artériích třech hypertenzních modelů (SHR, Ren-2 TGR, Dahlovi potkani).

Jednotlivé cíle:

1. Popsat účinky běžně používaných inhibitorů TRP kanálů na kontraktilitu izolovaných artérií.
2. Charakterizovat zvýšenou kontraktilitu izolovaných femorálních artérií SHR.
3. Popsat účast Ca^{2+} sensitizace a Ca^{2+} vstupu na arteriální kontraktilitě u vybraných modelů hypertenze.

Metody

Myografické měření

Femorální artérie byly izolované z krevního řečiště zadní nohy. Kruhové segmenty o délce 2 mm byly izolované z femorální artérie (průměr $\approx 1000 \mu\text{m}$) a z větve femorální artérie (průměr $\approx 250 \mu\text{m}$). Arteriální segmenty byly umístěny do Mulvany-Halpernova izometrického čtyřkanálového myografu a inkubované v modifikovaném Krebs-Henseleitově roztoku při 37°C , probublávaném 95 % O_2 a 5 % CO_2 . Cévy byly normalizované podle protokolu výrobce myografu.

Na začátku každého experimentu byly provedeny dvě K^+ -vyvolané kontrakce, které byly oddělené promytím. K vyvolání K^+ -indukované kontrakce (KPSS) bylo NaCl v inkubačním mediu nahrazeno KCl (124 mM). Relativní hodnoty byly vyjádřeny jako procenta maximální K^+ -indukované kontrakce (% KPSS) a nebo fenylefrinem-indukované kontrakce (% PE). Kumulativní křivky dávkové závislosti byly stanovené pro různé kontrakční stimuly (fenylefrin 10 nM – 30 mM; U-46619 1 nM – 1 μM ; K^+ 10 mM – 120 mM). Bezvodíkové médium bylo vytvořené nahrazením 119 mM NaCl a 25 mM NaHCO_3 pomocí 144 mM N-methyl-D-glukaminu (NMDG^+).

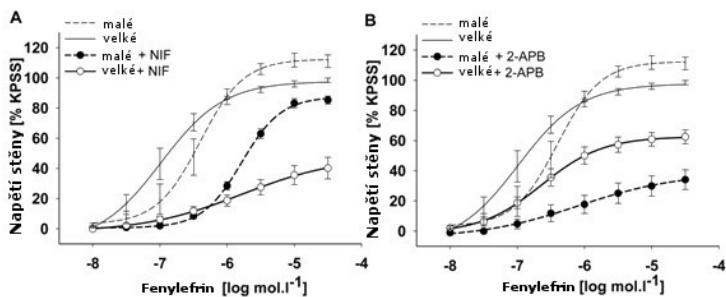
Histochemická vizualizace katecholaminů

Roztok kyseliny glyoxylové, připravovaný denně, se skládal z 1% kyseliny glyoxylové, 236 mM KH_2PO_4 a 200 mM sacharózy. Femorální artérie byly rozřezané podélně a ponořené 3x do tohoto roztoku. Poté byly arteriální řezy natažené na podložní sklička, sušené 5 minut ventilátorem a pak přenesené na horkou desku (80°C) na 5 minut. Pár kapek minerálního oleje bylo přidáno na podložní sklička a řezy byly opět zahřáté na (80°C) po dobu 90 minut. Fluorescence byla pozorována mikroskopem za požití DAPI filtru.

Výsledky a diskuze

Část I: Neselektivní inhibitory TRP kanálů ovlivňují kontrakci artérií potkana

Inhibitor L-VDCC kanálů nifedipin měl signifikantně větší efekt na maximální kontrakci velkých cév v porovnání s malými cévami, zatímco 2-APB (příklad neselektivního TRP inhibitoru) ovlivnilo kontrakci více u malých artérií (Obrázek 2B). V nepřítomnosti extracelulárního sodíku jsme pozorovaly snížení inhibičních efektů 2-APB na kontrakci cév indukovanou α_1 -adrenergním agonistou fenylefrinem.



Obrázek 2. Relativní dávkově závislá kontrakce malých a velkých izolovaných artérií α_1 -adrenergním agonistou fenylefrinem (10 nM – 30 μM) v přítomnosti inhibitorů: **A** nifedipin (NIF 1 μM), **B** - 2-APB (2-aminoethoxydiferyl borát, 100 μM). Data jsou uvedena jako průměry ± S.E.M.; n=6. Adaptované z Bencze a kol., 2015.

Účinky L-VDCC inhibitoru (nifedipin) na arteriální kontrakci se lišily od účinků neselektivních inhibitorů TRP kanálů. Nifedipin měl výraznější účinky na K^+ -indukovanou kontrakci než použité inhibitory TRP kanálů, což je v souladu s předpokladem, že K^+ -indukovaná kontrakce otevírá přímo L-VDCC a ne receptorem-ovládané kanály jako jsou např. TRP kanály. Inhibiční efekt vybraných inhibitorů TRP kanálů na α_1 -adrenergní kontrakci vyvolanou fenylefrinem byl srovnatelný s účinky nifedipinu u malých i velkých artérií. Fakt, že v kontrastu s účinky na K^+ -indukovanou kontrakci nifedipin nezabránil zcela vzniku α_1 -adrenergní

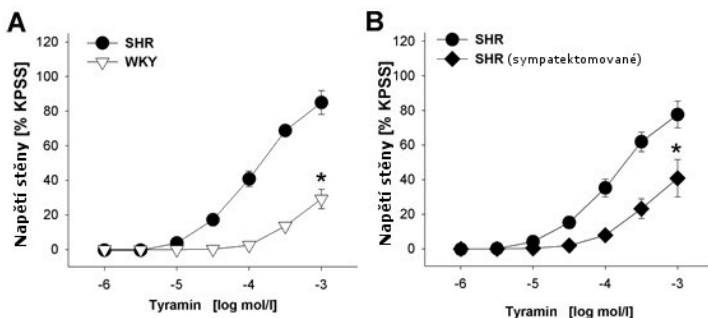
kontrakce, naznačuje, že při tvorbě α_1 -adrenergní kontrakce jsou důležité další mechanismy kromě otevírání L-VDCC kanálů. To je v souladu s teorií, že kontrakce HSC je generována otevíráním neselektivních kationtových kanálů, což vede k membránové depolarizaci umožňující následné otevírání L-VDCC kanálů (Obrázek 1).

Inhibiční efekty 2-APB byly závislé na přítomnosti extracelulárního Na^+ . Signifikantní závislost 2-APB na přítomnosti Na^+ je v souladu s úlohou neselektivních TRP kanálů při tvorbě membránové depolarizace u α_1 -adrenergní kontrakce HSC. Pozorovaná ztráta inhibičních účinků 2-APB po odstranění Na^+ z inkubačního media dělá z 2-APB zajímavý farmakologický nástroj.

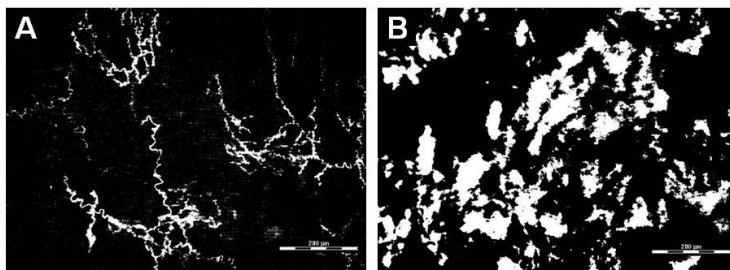
Část II: Změněné kontraktilní odpovědi artérií spontánně hypertenzního potkana

Tyramin uvolňuje endogenní noradrenalin z nervových varikosit ve stěně cévní (Miyahara and Suzuki 1986). Tyraminem-indukované kontrakce byly signifikantně větší u femorálních artérií izolovaných z SHR v porovnání s kontrolními WKY artériemi (Obrázek 3A). Tyraminem-indukovaná kontrakce WKY cév v přítomnosti mírně zvýšené extracelulární koncentrace K^+ (20 mM), která ještě nepůsobí kontrakci, vyvolala částečnou depolarizaci buněk hladkého svalu a tyraminem-indukované kontrakce se zvýšily na úroveň SHR artérií (Bencze a kol., 2016).

Navíc jsme studovali artérie izolované z SHR, jimž byl chronicky podáván guanetidin, který vylévá katecholaminy z nervových zakončení. Pozorovali jsme signifikantní snížení tyraminem-indukované kontrakce u těchto artérií, potvrzující, že endogenní noradrenalin přispívá ke zvýšené tyraminem-indukované kontrakci u SHR. U artérií sympatektomovaných zvířat byla odpověď artérií na tyramin snížena (Obrázek 3B) a nepozorovali jsme přítomnost katecholaminů v jejich cévní stěně (Obrázek 4).



Obrázek 3. Tyraminem-indukovaná dávkově závislá kontrakce. **A** – kontrakce SHR a WKY artérií **B** – kontrakce artérií u SHR s guanetidinem-indukovanou sympatektomií Data jsou uvedena jako průměry ± SEM; n=6. Adaptované z Benzze a kol., 2016.

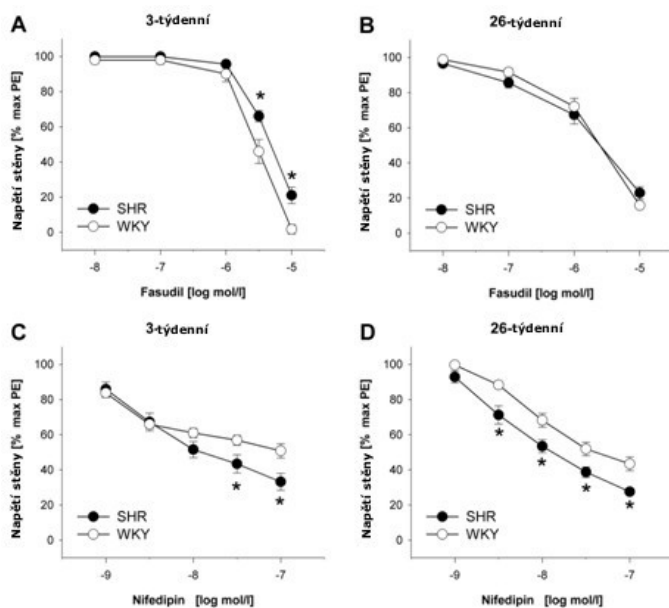


Obrázek 4. Přítomnost katecholaminů v cévní stěně. **A** - femorální artérie WKY. **B** – femorální artérie SHR. Horizontální úsečka = 200 µm, n=6. Adaptované z Benzze a kol., 2016.

Na základě našich předcházejících výsledků (Obrázek 3) a histologické analýzy, která odhalila zvýšenou přítomnost katecholaminů v cévní stěně SHR (Obrázek 4), potvrzujeme že zvýšená odpověď SHR na tyramin může být způsobená částečnou depolarizací buněčné membrány SHR a zvýšenou přítomností noradrenalinu v cévní stěně.

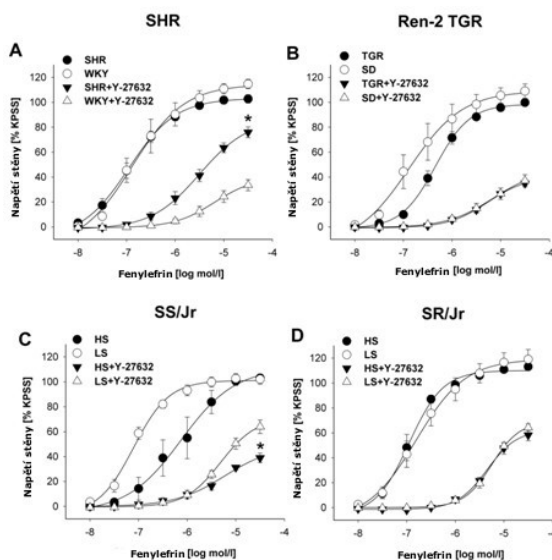
Část III: Příspěvek Ca^{2+} sensitizace (RhoA/Rho kinázové dráhy) a Ca^{2+} vstupu k udržení vysokého krevního tlaku u potkanů s genetickou nebo solnou hypertenzí

Fasudilem-indukovaná vaskulární relaxace (10^{-8} – 10^{-5} mol/l) byla snížena u prehypertenzních 3-týdenních SHR, ale ne u 26-týdenních SHR s rozvinutou hypertenzí (Obrázek 5). Tato data naznačují sníženou úlohu Rho kinázové dráhy u prehypertenzních, zatímco úloha této dráhy při arteriální kontrakci u 26-týdenních hypertenzních SHR se zdá být podobná jako u WKY. Vaskulární relaxace vyvolaná zvyšující se dávkou nifedipinu (10^{-9} – 10^{-7} mol/l) byla zvětšena jak u prehypertenzních tak u hypertenzních SHR (Obrázky 5C a 5D). Naše data ukazují zvýšenou úlohu Ca^{2+} vstupu cestou L-VDCC jak u prehypertenzních tak u hypertenzních SHR.



Obrázek 5. Dávkově závislé relaxační efekty fasudilu (A, B) a nifedipinu (C, D) na napětí cévní stěny v fenylefrinem prekontrahovaných femorálních artérií izolovaných z 3- a 26-týdenních WKY a SHR. Data jsou uvedena jako průměry \pm SEM; $n=6-8$; * signifikantně rozdílné ($p < 0.05$) od WKY. Adaptováno z Behuliak a kol., 2015.

U artérií z 16-týdenních SHR způsobila inhibice Rho kinázy menší posun než u normotenzních WKY (Obrázek 6A). Důležitost Rho/Rho kinázové dráhy pro krevní tlak a cévní napětí je snižena u SHR v prehypertenzivních fázích, pravděpodobně jako část kompenzačního mechanismu zvýšeného Ca^{2+} vstupu cestou L-VDCC do buněk HSC. Příspěvek Rho/Rho kinázové dráhy k fenylefrinem vyvolaných arteriálních kontrakcí je také relativně snížený u 18-týdenních Ren-2 TGR v porovnání s jejich HanSD kontrolami (Obrázek 6B; Behuliak a kol., 2017). Naopak inhibice Rho kinázy vyvolává větší snížení maximálních kontraktálních odpovědí u femorálních artérií 20-týdenních hypertenzních Dahlových sůl-senzitivních potkanů (SS/Jr) na vysokosolné dietě (Obrázek 6C), zatímco nebyly pozorovány rozdíly u 20-týdenních normotenzních Dahlových sůl-rezistentních potkanů (SR/Jr) jak na vysokosolné tak na nízkosolné dietě (Obrázek 6D).



Obrázek 6. Účinek inhibice Rho kinázy (Y-27632) na fenylefrinem-indukované kontrakce artérií WKY a SHR (A), HanSD a Ren-2 TGR (B) resp Dahlových sůl-senzitivních (SS/Jr) (C) a sůl-rezistentních (SR/Jr) potkanů (D) na nízkosolné (LS) nebo vysokosolné (HS) dietě. Data jsou uvedena jako průměry \pm SEM; n=5; * signifikantně rozdílné ($p < 0.05$) od příslušných kontrol. Adaptováno z Behuliak a kol., 2017.

Závěr

Ve své disertační práci jsem shrnul informace týkající se mechanismu kontrakce hladkého svalu cév a také data týkající se rozdílů v kontrakci izolovaných arterií normotenzních a hypertenzních zvířat. Pochopení mechanismů kontrakce hladkého svalu cév u zdravých resp. hypertenzních jedinců může mít význam pro budoucí vývoj léčiv proti vysokému krevnímu tlaku. Ca^{2+} vstup do buněk hladkého svalu cév umožňuje kontrakci a studium účinků vybraných neselektivních inhibitorů TRP kanálů přispělo k podrobnějšímu pochopení tohoto mechanismu. Z třech užitých TRP inhibitorů, 2-APB byl se zdál být nejzajímavější. Pozorované inhibiční efekty 2-APB byly závislé na typu kontrakce a také na přítomnosti Na^+ v inkubačním mediu. Zvýšená kontraktilita arterií izolovaných ze spontánně hypertenzního potkana byla studována za účelem rozšířit naše pochopení mechanismů zapříchujících vznik hypertenze u tohoto modelu. Úloha Ca^{2+} sensitizace byla studována u třech různých modelů hypertenze za účelem určení role tohoto mechanismu u různých modelů hypertenze. Jak Ca^{2+} vstup tak i Ca^{2+} sensitizace přispívají k udržování krevního tlaku a k adrenergní vazokonstrikci u těchto tří kmenů, Ca^{2+} vstup je důležitější u genetické hypertenze (SHR a Ren-2 TGR), u nichž je úloha RhoA/Rho kinázové dráhy snížena. Na druhé straně, úloha Ca^{2+} sensitizace je zvýšená u hypertenzních sůl-senzitivních Dahlových potkanů.

Ca^{2+} signalizace hraje velice důležitou roli v udržování krevního tlaku. Zatímco napětím-ovládané Ca^{2+} kanály jsou v zájmu výzkumníků už dlouhou dobu a inhibitory těchto kanálů jsou široce používány pro léčbu hypertenze, v předložených pracích jsme se pokusili doplnit některé chybějící informace o TRP kanálech a Ca^{2+} sensitizaci. Pro budoucí výzkum zůstalo množství nezodpověděných otázek o úloze specifických TRP kanálů v regulaci krevního tlaku. Úloha TRP kanálů u modelů hypertenze jako jsou SHR, Ren-2 TGR a Dahlovi potkani je ještě méně probádána.

Seznam literatury

Astrand P, Stjärne L. On the secretory activity of single varicosities in the sympathetic nerves innervating the rat tail artery. *J Physiol.* 1989; 409: 207-220.

Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med.* 1962; 115: 1173-1190.

Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev.* 2015; 95: 645-690.

Head RJ. Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels.* 1989; 26: 1-20.

Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Am J Physiol.* 1996; 270: E919-929.

McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1-13.

Miyahara H, Suzuki H. Effects of tyramine on noradrenaline outflow and electrical responses induced by field stimulation in the perfused rabbit ear artery. *Br J Pharmacol.* 1985; 86: 405-416.

Pesic A, Madden JA, Pesic M, Rusch NJ. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca^{2+} channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res.* 2004; 94: 97-104.

Pintérová M, Karen P, Kuneš J, Zicha J: Role of nifedipine-sensitive sympathetic vasoconstriction in maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effect of Gi-protein inactivation by pertussis toxin. *J Hypertens.* 2010; 28: 969-978.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 1325-1358.

Vaněčková I, Dobešová Z, Kuneš J, Vernerová Z, Zicha J. Endothelin A receptor blocker atrasentan lowers blood pressure by the reduction of nifedipine-sensitive

calcium influx in Ren-2 transgenic rats fed a high-salt diet. *J Hypertens.* 2015; 33: 161-169.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003; 27: 201-206.

Zicha J, Dobešová Z, Vokurková M, Rauchová H, Hojná S, Kadlecová M, Behuliak M, Vaněčková I, Kuneš J. Age-dependent salt hypertension in Dahl rats: fifty years of research. *Physiol. Res.* 2012; 61 (Suppl 2): S35-87.

Seznam publikací pro dizertační práci

Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Petrová M, Lišková S, Karen P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. **Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats.** J Hypertens. 2013; 31: 2025-2035. IF=5.062

Behuliak M, Vavřínová A, Bencze M, Polgárová K, Ergang P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. **Ontogenetic changes in contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats.** J Hypertens. 2015; 33: 2443-2454. IF=5.062

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. **Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat.** Eur J Pharmacol. 2015; 765: 533-540. IF=2.730

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. **Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization.** Life Sci. 2016; 166: 46-53. IF=2.685

Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Kuneš J, Zicha J **Basal and activated calcium sensitization in three different forms of experimental hypertension.** Biomed Res Int. 2017, ID 8029728, <https://doi.org/10.1155/2017/8029728>. IF=2.134

Seznam publikací autora

Bencze M, Behuliak M, Zicha J. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2013; 62: 471-478. IF=1.643

Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Petrová M, Lišková S, Karen P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2013; 31: 2025-2035. IF=5.062

Zicha J, Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Kuneš J, Vaněčková I. The interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res*. 2014; 63: 19-27. IF=1.643

Behuliak M, Vavřínová A, Bencze M, Polgárová K, Ergang P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. Ontogenetic changes in contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2015; 33: 2443-2454. IF=5.062

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat. *Eur J Pharmacol*. 2015; 765: 533-540. IF=2.730

Brunová A, Bencze M, Behuliak M, Zicha J. Acute and chronic role of nitric oxide, renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in the modulation of calcium sensitization in Wistar rats. *Physiol Res*. 2015; 64: 447-457. IF=1.643

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization. *Life Sci*. 2016; 166: 46-53. IF=2.685

Misárková E, Behuliak M, Bencze M, Zicha J. Excitation-contraction coupling and excitation-transcription coupling in blood vessels: their possible interactions in hypertensive vascular remodeling. *Physiol Res*. 2016; 65: 173-191. IF=1.643

Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Kuneš J, Zicha J. Basal and activated calcium sensitization in three different forms of experimental hypertension. *Biomed Res Int*. 2017, ID 8029728. IF=2.134

Životopis

Narozen 17.10. 1986 v Žiari nad Hronom, Slovensko.

Vzdělání:

09/2012 - současnost

Doktorandské studium v oboru Fyziologie živočichů, Univerzita Karlova v Praze

10/2015 – 07/2016

Erasmus+ praktická stáž, Brain Microvascular Research Group,
Maastrich University

09/2010 – 05/2012

Magisterské studium v oboru Fyziologie živočichů, Univerzita Karlova v Praze

09/2006 – 05/2010

Bakalářské studium v oboru Biologie, Univerzita Karlova v Praze

Speciální kurzy (v anglickém jazyce)

Advances in drug discovery

(Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2016)

From human neuroanatomy to psycho-pathology

(Univerzita Maastricht, 2016)

Scientific writing and presentation

(Univerzita Karlova v Praze, 2015)

Microscopy methods in biomedicine

(Ústav molekulární genetiky AV ČR, 2014)

Elements of science

(Akademie věd České republiky, 2014)

How to analyze scientific data and write high quality publication

(Alzheimer nadační fond, 2013)

Vědecké zaměření

- Kardiovaskulární systém
- Autonomní nervový systém
- Farmakologie
- Iontové kanály
- Ca²⁺ signalizace

Summary

Vascular resistance is mainly determined by the contraction of vascular smooth muscle (VSM), which is regulated by the phosphorylation of myosin light chain (MLC). VSM contraction is initiated by Ca^{2+} influx into the VSM cells, which is mediated by transient receptor potential (TRP) channels and L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (L-VDCC). On the other hand, Ca^{2+} sensitization is a mechanism enhancing vascular contractile response at a given level of intracellular Ca^{2+} by RhoA/Rho kinase pathway-mediated inhibition of myosin light chain phosphatase. In this thesis I present the data about i) the role of TRP channels in the mechanisms of vascular smooth muscle contraction, ii) the enhanced contractility of arteries from spontaneously hypertensive rats (SHR), and iii) the differences in contraction of arteries from normotensive and hypertensive rats related to the role of RhoA/Rho kinase pathway in three types of experimental hypertension (SHR, Ren-2 transgenic rats and salt-sensitive Dahl rats).

In the study concerning TRP channels, I compared the effects of three commonly used non-selective TRP channels inhibitors (2-APB, SKF-96365, FFA) on the contraction of isolated arteries. Among them 2-APB was the most interesting because the observed inhibitory effects of 2-APB were dependent on the type of contraction stimulus and also on Na^+ presence in bathing solution. In the study on enhanced contractility of SHR arteries the participation of several mechanisms was suggested to be responsible: the increased influence of norepinephrine released from vascular varicosities, insufficient opening of K^+ channels and especially altered membrane potential. Both Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization contribute to the adrenergic vasoconstriction of arteries. Ca^{2+} entry seems to be more important in rats with genetic hypertension (SHR and Ren-2 TGR), in which the role of Ca^{2+} sensitization is attenuated. On the other hand, the role of Ca^{2+} sensitization is enhanced in the contraction of arteries in hypertensive salt-sensitive Dahl rats.

Better understanding of mechanisms of vascular smooth muscle contraction in health and disease is important for future drug development.

List of abbreviations

2-APB - 2-aminoethoxydiphenyl borate

$[Ca^{2+}]_i$ - intracellular Ca^{2+} concentration

DAG - diacylglycerol

IP₃ - inositol trisphosphate

KPSS - physiological saline solution with Na⁺ substituted by K⁺

L-VDCC - L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels

MLCK - myosin light chain kinase

NIF - nifedipine

NO - nitric oxide

Ren-2 TGR - Ren-2 transgenic rat

SHR - spontaneously hypertensive rat

SS/Jr - Dahl salt-sensitive rat

SR/Jr - Dahl salt-resistant rat

TRPC - canonical transient receptor potential channel

VSM - vascular smooth muscle

WKY – Wistar Kyoto

Introduction

Vascular resistance is one of the main denominators of blood pressure. Contractile state of arteries, result of vasoconstrictor and vasodilator processes in vascular smooth muscle, most importantly contributes to vascular resistance. The contraction of arteries is highly regulated by the sympathetic nervous system. Sympathetic neurons end in arterial wall as globular endings – sympathetic varicosities from which neurotransmitters including norepinephrine are released (Astrand and Stjärne, 1989). Adrenergic receptors are the sites through which norepinephrine and epinephrine act both in the periphery and in the central nervous system. α_1 -adrenoceptors are located in the vicinity of sympathetic nerve terminals to be activated by norepinephrine coming out from the nerves, whereas α_2 -adrenoceptors are situated extrajunctionally to be activated preferentially by circulating catecholamines. Vascular smooth muscle (VSM) contraction is regulated by the activation of contractile proteins myosin and actin. Adrenergic vasoconstriction in arteries involves entry of Ca^{2+} through voltage-dependent channels and receptor-operated ion channels. Binding of Ca^{2+} to calmodulin leads to the activation of myosin light chain kinase (MLCK) and phosphorylation of myosin light chain, which enables molecular interaction of myosin and actin. Energy released from ATP by myosin ATPase enables the creation of the actin-myosin complex essential for contraction (Webb 2003).

Transmembrane Ca^{2+} entry is supported by agonist-activated non-voltage-gated Ca^{2+} permeable channels that are activated either by phospholipase C signaling cascade - these channels are named receptor-operated Ca^{2+} channels. The primary drive for the rise in intracellular Ca^{2+} and thus for VSM contraction is membrane depolarization, with the consequent opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels (McFadzean et al., 2002). Activation of receptors coupled with G-proteins leads to the activation of phospholipase C, which produces inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG). Biphasic increase of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) then follows - IP_3 causes the release of Ca^{2+} from intracellular stores, while DAG contributes to the membrane depolarization and continuous Ca^{2+} entry across the plasma membrane (Berridge, 2008; see also Figure 1). Channels of the canonical TRP

subfamily (TRPC) are one of molecular candidates for non-selective cationic channels activated by G-protein-coupled receptors in smooth muscle (Early and Brayden 2015). L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (L-VDCC) mediate the influx of Ca^{2+} into the cell in response to membrane depolarization. High blood pressure upregulates the L-VDCC $\alpha_1\text{C}$ subunit in VSMCs. Membrane depolarization is a potential signal involved in this interaction that may contribute to the development of abnormal vascular tone (Pestic et al., 2004).

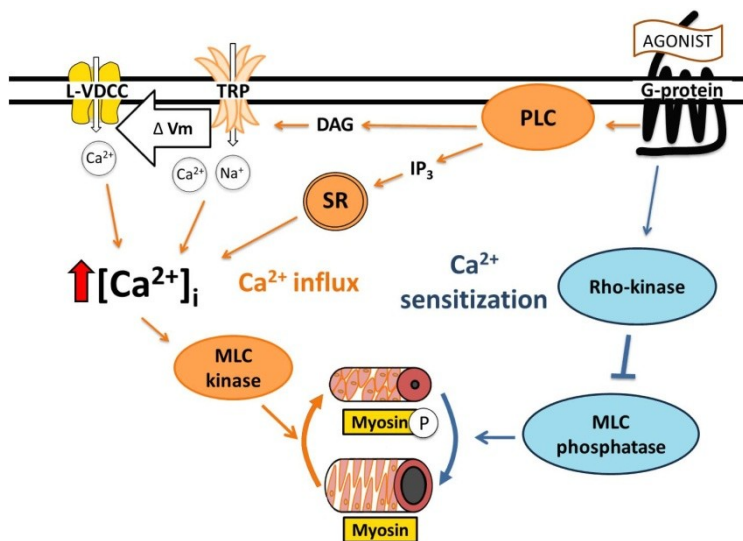


Figure 1. The schematic representation of VSM contraction. L-VDCC – L-type voltage-dependent calcium channel; TRP – transient receptor potential channel; V_m – membrane potential; DAG – diacylglycerol; PLC – phospholipase C; G-protein – G protein-coupled receptor; SR – sarcoplasmic reticulum; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - intracellular Ca^{2+} concentration; P – phosphorylation.

VSM contraction is also influenced by Ca^{2+} sensitization that acts by altering the Ca^{2+} sensitization of the contractile system by Rho/Rho kinase signaling pathway. Ca^{2+} sensitization reflects the level of inhibition of myosin light chain phosphatase, which dephosphorylates myosin light chain and leads to the relaxation of

VSM. Thus, the contractile force is mainly determined by the amount of phosphorylated myosin light chain which is regulated by the balance between the activities of the MLC kinase and the MLC phosphatase (Somlyo & Somlyo, 2003).

Hypertension is a multifactorial disease involving complex interactions between genetically determined mechanisms and environmental factors. Different experimental models of hypertension have been developed. The genetic hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) is generally characterized by an increased activity of sympathetic nervous system (SNS) and by alterations in Ca^{2+} homeostasis in VSM cells (Head et al., 1989). Our group previously confirmed enhanced activity of SNS contributing to the maintenance of hypertension in SHR through G_i -protein/cAMP-coupled pathway resulting in the increased Ca^{2+} ions influx through L-VDCC (Pintérová et al. 2010). Ren-2 transgenic rats (Ren-2 TGR) are characterized by severe hypertension created by the introduction of the murine renin gene, lethal for the homozygous rats Ren-2 TGR (Lee et al. 1996). Our studies demonstrated increased blood pressure response to acute L-VDCC blockade by nifedipine in Ren-2 TGR, suggesting enhanced Ca^{2+} influx through L-VDCC in resistance vessels of these hypertensive animals (Vaněčková et al. 2015). High salt intake in Dahl salt-sensitive rats (SS/Jr) leads to hypertension, while Dahl salt-resistant (SR/Jr) maintain normal values of blood pressure (Dahl et al., 1962). Salt hypertension in young SS/Jr rats is characterized by augmented sympathetic activity, relative NO deficiency, attenuated baroreflex function as well as by a major increase of residual blood pressure indicating remodeling of blood vessels (Zicha et al. 2012).

Aims of the thesis

The thesis can be divided into the study of mechanisms of vascular smooth muscle (VSM) contraction and the study of VSM alterations in hypertension. The study of VSM contraction was focused on study of Ca^{2+} influx through non-selective cationic channels. The study of VSM alterations was focused on the characterization of enhanced contractile properties of spontaneously hypertensive rats (SHR) arteries. Finally, detailed examination of the role of Ca^{2+} sensitization in arteries of three hypertensive rat models (SHR, Ren-2 TGR, Dahl rats) have been performed.

Particular goals:

1. To describe the effects of commonly used inhibitors of TRP channels on the contractility of isolated femoral arteries.
2. To characterize the enhanced contractility of isolated SHR femoral arteries.
3. To describe the participation of Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} entry in arterial contractility in selected rat models of hypertension.

Methods

Myography measurement

Femoral arteries were dissected from hind limb vascular bed. Ring segments 2 mm in length of large femoral artery (diameter $\approx 1000 \mu\text{m}$) or femoral artery branch (diameter $\approx 250 \mu\text{m}$) were dissected. Arterial segments were placed in four-channel Mulvany-Halpern isometric myograph and incubated in a modified Krebs-Henseleit solution at 37°C , bubbled with 95 % O_2 and 5 % CO_2 . Blood vessels were normalized according to the manufacturer's protocol.

At the onset of each experiment two K^+ -induced contractions separated by a washout were performed. To produce K^+ -induced contraction (KPSS) NaCl was substituted in bathing solution for KCl (124 mM). Relative values were expressed as percentage of maximal K^+ -induced contraction (% KPSS) or phenylephrine-induced contraction (% PE). Cumulative concentration-response curves were established for various agonists (phenylephrine 10 nM – 30 mM; U-46619 1 nM – 1 μM ; K^+ 10 mM – 120 mM). Na^+ -free solution was created by a replacement of 119 mM NaCl and 25 mM NaHCO_3 with 144 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG⁺).

Histochemical visualization of catecholamines

Glyoxylic acid solution, prepared fresh every day, consisted of 1% glyoxylic acid, 236 mM KH_2PO_4 and 200 mM sucrose. Femoral arteries were cut longitudinally and dipped three times in the glyoxylic acid solution. Then, they were mounted on glass slides and dried 5 min by air cooler, transferred to hot plate (80°C) and heated for 5 min. Few drops of Mineral Oil was added on glass slides and the slides were again heated on hot plate (80°C) for 90 seconds. Fluorescence was observed in microscope with DAPI filter cube.

Results and Discussion

Part I: Non-selective TRP channel inhibitors affect contraction of arteries of rat

L-VDCC blocker nifedipine had significantly greater effect on maximal contraction in large than in small arteries, while 2-APB (example of non-selective TRP blockers) influenced contraction maximum more in small arteries (Fig. 2B). In the absence of external Na^+ we observed the attenuation of inhibitory effects of 2-APB on phenylephrine-induced contraction.

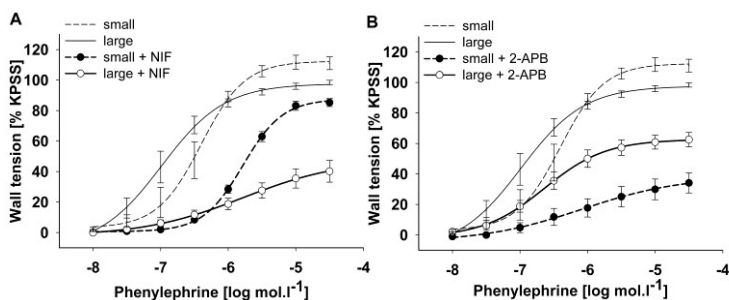


Figure 2. Relative concentration-dependent contraction of isolated small and large femoral arteries induced by phenylephrine (10 nM – 30 μM) in the presence of particular inhibitors: **A** - NIF (Nifedipine, 1 μM), **B** - 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate, 100 μM), Data are mean \pm S.E.M.; n = 6. Adapted from Bencze et al., 2015.

The effects of L-VDCC blocker (nifedipine) on arterial contractions were different from those of non-selective TRP channel inhibitors. Nifedipine had a more pronounced effect on K^+ -induced contraction than all used TRP channel inhibitors, which is in agreement with the assumption that K^+ -induced contraction opens directly L-VDCC but not receptor-operated channels such as TRP. The inhibitory effects of particular TRP channel inhibitors on $\alpha 1$ -adrenergic contraction elicited by

phenylephrine were comparable to those of nifedipine in small and large arteries. The fact that nifedipine did not prevent completely the development of α_1 -adrenergic contraction indicates the participation of additional mechanisms to L-VDCC in the generation of phenylephrine-induced contraction, in contrast to K^+ -induced contraction. It is in agreement with the theory that VSM contraction is generated by the opening of non-selective cationic channels creating depolarization and consequently the opening of L-VDCC (Fig. 1).

Inhibitory effects of 2-APB were dependent on the presence of extracellular Na^+ . The significant Na^+ -dependence of 2-APB effect is compatible with the role of non-selective TRP channels in membrane depolarization during α_1 -adrenergic VSM contraction. The observed loss of inhibitory effects after Na^+ removal from bathing solution makes 2-APB an interesting pharmacological tool.

Part II: Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat

Tyramine release endogenous norepinephrine from neuronal varicosities present in blood vessels (Miyahara and Suzuki 1986). Tyramine-induced contractions were significantly greater in femoral arteries isolated from SHR compared to control WKY arteries (Fig. 3). Tyramine-induced contraction in WKY vessels pretreated with increased non-contracting extracellular K^+ concentration (20 mM) induced partial depolarization of smooth muscle cells, tyramine-induced contractions were similar to those of SHR (Bencze et al., 2016).

Furthermore, we studied the arteries isolated from SHR chronically treated with guanethidine which was administered to deplete catecholamines from neuronal varicosities. We observed a significant reduction of tyramine-induced contractions in these arteries, confirming that endogenous norepinephrine is participating in the enhanced tyramine-induced contraction in SHR. Catecholamines were not present in blood vessel wall of sympathectomized animals in contrast to untreated animals.

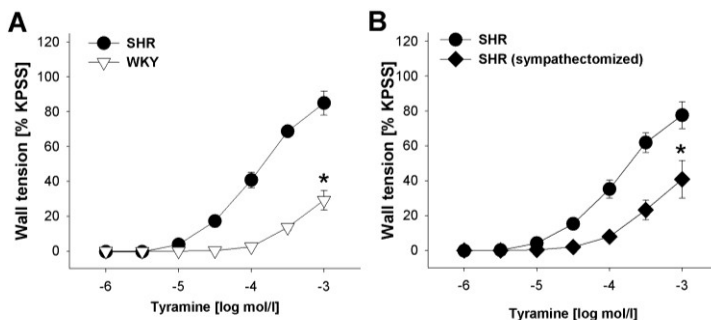


Figure 3. Tyramine-induced concentration-dependent contraction. **A** - contraction of SHR and WKY arteries. **B** - the effect of guanethidine-induced sympathectomy on SHR arteries. Data are means \pm SEM; n = 6. Adapted from Bencze et al., 2016.

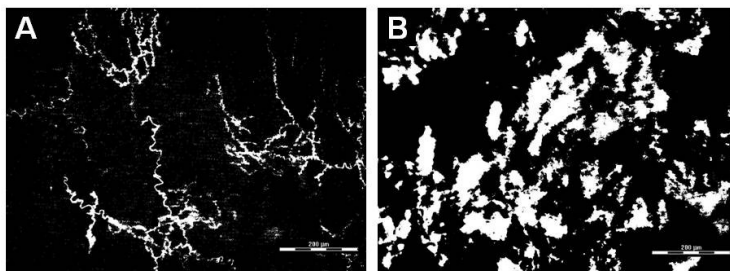


Figure 4. Vascular catecholamine content. **A** - example of WKY femoral artery. **B** - example of SHR femoral artery. Scale bar = 200 μ m, n = 6. Significantly different ($P < 0.05$) * from WKY femoral arteries. Adapted from Bencze et al., 2016.

Based on our previous results (Fig. 3) and the histochemical analysis (Fig. 4) which revealed augmented presence of catecholamines in vascular wall of SHR, we confirm that enhanced SHR tyramine response might be caused by both partial depolarization of SHR cell membrane as well as augmented presence of norepinephrine in SHR vascular wall.

Part III: Contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance mediated by RhoA/Rho kinase pathway in rats with genetic and salt hypertension

Fasudil-induced vascular relaxation (10^{-8} – 10^{-5} mol/l) was attenuated in arteries from prehypertensive 3-week-old SHR, but not in those from hypertensive 26-week-old SHR (Fig. 5). These data suggest a lower role of Rho kinase pathway in prehypertensive SHR, while Rho kinase participation in contractile force of arteries from 26-week-old hypertensive SHR seems to be similar as in WKY. Vascular relaxation elicited by increasing concentration of nifedipine (10^{-9} – 10^{-7} mol/l) was enhanced in both prehypertensive and hypertensive SHR (Fig. 5C, D). Our data show enhanced role of Ca^{2+} influx through L-VDCC in both prehypertensive and hypertensive stage of SHR.

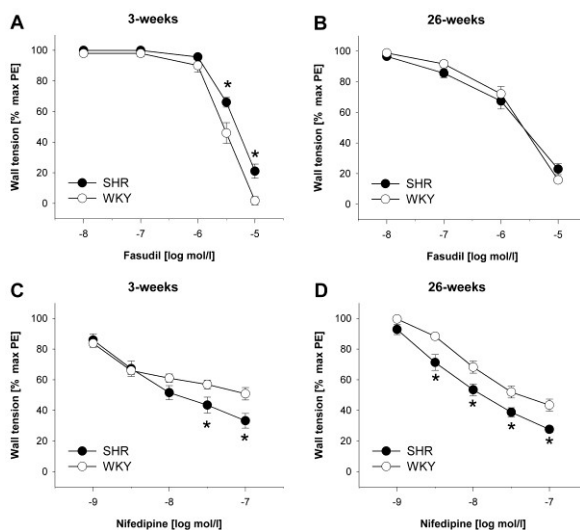


Figure 5. Dose-dependent relaxation effects of fasudil - **A, B** - or nifedipine - **C, D** - on the wall tension established in phenylphrine-precontracted femoral arteries isolated from 3- and 26- week-old WKY and SHR. Data are mean \pm SEM; n=6-8; * significantly different ($p < 0.05$) from WKY. Adapted from Behuliak et al., 2015.

In arteries of 16-week-old SHR Rho kinase inhibition caused smaller shift arteries than in those from normotensive WKY (Fig. 6A). The importance of RhoA/Rho kinase pathway for BP and vascular tone control is attenuated in SHR from prehypertensive stages, probably as a part of compensatory mechanisms to augmented Ca^{2+} influx through L-VDCC to VSM. The contribution of Rho kinase to arterial contractility is also relatively attenuated in phenylephrine concentrations of 18-week-old Ren-2 TGR compared to their HanSD controls (Fig. 6B; more detailed data can be found in Behuliak et al., 2017). On the contrary, Rho kinase inhibition elicited a greater attenuation of maximal contractile responses in femoral arteries of 20-week-old hypertensive Dahl salt-sensitive rats (SS/Jr) on high-salt diet (Fig. 6C), while there was no difference in normotensive 20-week-old Dahl salt-resistant rats (SR/Jr) on either high- or low-salt diet (Fig. 6D).

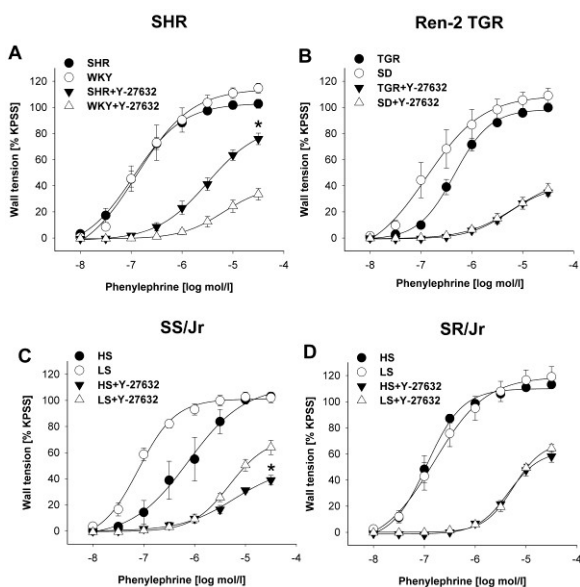


Figure 6. The effects of Rho kinase inhibition (Y-27632) on phenylephrine-induced contractions of arteries from **A** - WKY and SHR, **B** - Ren-2 TGR, **C** - Dahl salt-sensitive (SS/Jr) and **D** - salt-resistant (SR/Jr) rats fed a low-salt (LS) or high-salt (HS) diet. Data are mean \pm SEM; n=5; * significantly different ($p < 0.05$) from control. Adapted from Behuliak et al., 2017.

Conclusions

In the thesis I summarized the data concerning the mechanisms of vascular smooth muscle contraction, as well as the data related to the differences in contraction of isolated arteries from normotensive and hypertensive animals. The understanding of vascular smooth muscle contraction mechanisms in healthy individuals as well as in hypertension might be important for future hypertension drug development. Ca^{2+} entry into the vascular smooth muscle cells enables vascular contraction and the study of selected non-selective TRP inhibitors contributed to the understanding of this mechanism in more detail. Among three non-selective TRP inhibitors used, 2-APB has been suggested as the most interesting. The observed inhibitory effects of 2-APB were dependent on the type of contraction stimulus and also on Na^+ presence in bathing solution. The enhanced contractility of arteries isolated from spontaneously hypertensive rats was studied in order to extend our understanding of the mechanisms causing hypertension in this model. The role of Ca^{2+} sensitization was studied in three different models of hypertension in order to assess the role of this mechanism in different forms of hypertension. Both Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization contribute to the actual maintenance of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in these three rat strains, Ca^{2+} entry is more important in genetically hypertensive rats (SHR and Ren-2 TGR), in which the role of RhoA/Rho kinase pathway is attenuated. On the other hand, the role of Ca^{2+} sensitization is enhanced in hypertensive salt-sensitive Dahl rats.

Ca^{2+} signaling plays a very important role in blood pressure maintenance. While voltage-dependent Ca^{2+} channels are in focus of researchers for a long time and their inhibitors are widely used in hypertension treatment, in the present studies we attempted to describe some missing information about the TRP channels and Ca^{2+} sensitization. For the future investigations, there are still many unanswered questions mainly about the role of specific TRP channels in blood pressure regulation. The role of TRP channels in SHR, Ren-2 TGR and Dahl rat models of hypertension is even less understood.

References

Astrand P, Stjärne L. On the secretory activity of single varicosities in the sympathetic nerves innervating the rat tail artery. *J Physiol.* 1989; 409: 207-220.

Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J Exp Med.* 1962; 115: 1173-1190.

Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev.* 2015; 95: 645-690.

Head RJ. Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels.* 1989; 26: 1-20.

Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Am J Physiol.* 1996; 270: E919-929.

McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1-13.

Miyahara H, Suzuki H. Effects of tyramine on noradrenaline outflow and electrical responses induced by field stimulation in the perfused rabbit ear artery. *Br J Pharmacol.* 1985; 86: 405-416.

Pesic A, Madden JA, Pesic M, Rusch NJ. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca^{2+} channels: is membrane depolarization the signal? *Circ Res.* 2004; 94: 97-104.

Pintérová M, Karen P, Kuneš J, Zicha J: Role of nifedipine-sensitive sympathetic vasoconstriction in maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effect of Gi-protein inactivation by pertussis toxin. *J Hypertens.* 2010; 28: 969-978.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 1325-1358.

Vaněčková I, Dobešová Z, Kuneš J, Vernerová Z, Zicha J. Endothelin A receptor blocker atrasentan lowers blood pressure by the reduction of nifedipine-sensitive

calcium influx in Ren-2 transgenic rats fed a high-salt diet. *J Hypertens.* 2015; 33: 161-169.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003; 27: 201-206.

Zicha J, Dobešová Z, Vokurková M, Rauchová H, Hojná S, Kadlecová M, Behuliak M, Vaněčková I, Kuneš J. Age-dependent salt hypertension in Dahl rats: fifty years of research. *Physiol. Res.* 2012; 61 (Suppl 2): S35-87.

List of publications for Ph.D. thesis

Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Petrová M, Lišková S, Karen P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. **Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats.** J Hypertens. 2013; 31: 2025-2035. IF= 5.062

Behuliak M, Vavřínová A, Bencze M, Polgárová K, Ergang P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. **Ontogenetic changes in contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats.** J Hypertens. 2015; 33: 2443-2454. IF= 5.062

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. **Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat.** Eur J Pharmacol. 2015; 765: 533-540. IF=2.730

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. **Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization.** Life Sci. 2016; 166: 46-53. IF=2.685

Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Kuneš J, Zicha J **Basal and activated calcium sensitization in three different forms of experimental hypertension.** Biomed Res Int. 2017, ID 8029728, <https://doi.org/10.1155/2017/8029728>. IF=2.134

List of all publications of the author

Bencze M, Behuliak M, Zicha J. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*. 2013; 62: 471-478. IF=1.643

Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Petrová M, Lišková S, Karen P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. Ca^{2+} sensitization and Ca^{2+} entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2013; 31: 2025-2035. IF= 5.062

Zicha J, Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Kuneš J, Vaněčková I. The interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res*. 2014; 63: 19-27. IF=1.643

Behuliak M, Vavřínová A, Bencze M, Polgárová K, Ergang P, Kuneš J, Vaněčková I, Zicha J. Ontogenetic changes in contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2015; 33: 2443-2454. IF= 5.062

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. Broad-range TRP channel inhibitors (2-APB, flufenamic acid, SKF-96365) affect differently contraction of resistance and conduit femoral arteries of rat. *Eur J Pharmacol*. 2015; 765: 533-540. IF=2.730

Brunová A, Bencze M, Behuliak M, Zicha J. Acute and chronic role of nitric oxide, renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in the modulation of calcium sensitization in Wistar rats. *Physiol Res*. 2015; 64: 447-457. IF=1.643

Bencze M, Behuliak M, Vavřínová A, Zicha J. Altered contractile responses of arteries from spontaneously hypertensive rat: The role of endogenous mediators and membrane depolarization. *Life Sci*. 2016; 166: 46-53. IF=2.685

Misárková E, Behuliak M, Bencze M, Zicha J. Excitation-contraction coupling and excitation-transcription coupling in blood vessels: their possible interactions in hypertensive vascular remodeling. *Physiol Res*. 2016; 65: 173-191. IF=1.643

Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Kuneš J, Zicha J. Basal and activated calcium sensitization in three different forms of experimental hypertension. *Biomed Res Int*. 2017, ID 8029728. IF=2.134

Curriculum vitae

Born at 17.10. 1986 in Žiar nad Hronom, Slovakia.

Education:

09/2012 - present

PhD in Animal Physiology, Charles University in Prague

10/2015 – 07/2016

Erasmus+ practical training, Brain Microvascular Research Group, Maastrich University

09/2010 – 05/2012

Master of Science, Animal Physiology, Charles University in Prague

09/2006 – 05/2010

Bachelor of Science, Biology, Charles University in Prague

Special Courses

Advances in drug discovery

(Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS 2016)

From human neuroanatomy to psycho-pathology

(Maastricht University 2016)

Scientific writing and presentation

(Charles University in Prague 2015)

Microscopy methods in biomedicine

(Institute of Molecular Genetics of the CAS 2014)

Elements of science

(The Czech Academy of Sciences 2014)

How to analyze scientific data and write high quality publication

(Alzheimer Foundation 2013)

Scientific Interest:

- Cardiovascular system
- Autonomic nervous system
- Pharmacology
- Ion channels
- Ca²⁺ signaling