



AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

Teze dizertace k získání vědeckého titulu „doktor věd“ ve skupině věd biologicko-ekologických

Úloha vybraných vazoaktivních systémů podílejících se na regulaci krevního tlaku u různých modelů experimentální hypertenze

Komise pro obhajoby doktorských dizertací v oboru Zoologie a fyziologie živočichů

Jméno uchazeče: Ivana Vaněčková

Pracoviště uchazeče: Fyziologický ústav AV ČR

Místo a datum: Praha, 26.4.2015

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mě podporovali v někdy nelehkém úsilí, které skýtá práce na poli vědeckém, zejména mé rodině a mým rodičům. Dále bych chtěla vzpomenout na své učitele a mentory (v chronologickém sledu) doc. MUDr. Jiřího Jelínka, CSc., prof. MUDr. Jiřího Hellera, CSc; prof. Luďka Červenku, CSc., MBA a MUDr. Josefa Zichu, DrSc. Těm všem patří můj dík za jejich pomoc. Poděkovat bych chtěla i všem současným a bývalým spolupracovníkům z Fyziologického ústavu AV ČR a z Institutu klinické a experimentální medicíny.

Obsah

Akademie věd České republiky.....	1
Úvod	4
Cíl práce.....	8
1) Metodické přístupy	9
2) Výsledky.....	14
1) Funkce izolované ledviny u vybraných modelů experimentální hypertenze – PHR, DOCA-solná, SHR a Dahl	14
2) Renovaskulární hypertenze 2K1C – úloha angiotenzinových AT ₁ receptorů, kininových B ₂ receptorů, ANG-1-7	15
3) Ren-2 transgenní potkani	16
Úloha vazodilatačních systémů	16
Úloha vazokonstrikčních systémů	17
5/6 nefrektomie - RAS a ET blokáda.....	24
4) Inducibilní Ren-2 transgenní potkan (iTGR)	25
5) Dahlovi potkani	26
6) Úloha vápníkového influxu a vápníkové sensitizace při udržování krevního tlaku u vybraných modelů experimentální hypertenze.....	27
3) Závěr	30
4) Summary.....	32
5) Seznam předkládaných prací autora.....	34
6) Seznam použité literatury (mimo prací autora).....	35

Úvod

Vysoký krevní tlak neboli hypertenze postihuje 30-40 procent dospělé populace, a představuje tak závažný medicínský a ekonomický problém. Ačkoli objev primární hypertenze se datuje do 70. let 19. Století, teprve Framinghamská studie (1) odhalila příčinnou souvislost mezi vysokým krevním tlakem a zvýšeným rizikem infarktu myokardu, mozkové příhody, či srdečního a ledvinného selhání. S postupujícím stárnutím světové populace se mortalita na kardiovaskulární choroby stále zvyšuje. Příčiny hypertenze však z větší části stále nejsou objasněné, zahrnují nejen faktory genetické ale i faktory prostředí (2-4). Hypertenze vzniká v důsledku nerovnováhy vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů v organismu, a to jak na úrovni centrálního nervového systému, tak na periférii (Obr. 1). Následkem převahy vazokonstrikčních a/nebo nedostatku vazodilatačních látek dochází k vzestupu periferního cévního odporu v důsledku zvýšeného odporu a remodelace periferních arteriol. V těchto procesech hrají důležitou úlohu jak ledviny (5), tak mozek (6;7). Zásadní úloha obou orgánů, a především jejich vzájemná koordinace, v regulaci krevního tlaku je nepopíratelná (8). Úloha ledvin v regulaci krevního tlaku a vylučování sodíku byla potvrzena řadou transplantačních studií, které prokázaly jak u animálních modelů, tak v humánních studiích, že hypertenze „cestuje“ s ledvinou (9-13). Její vztah k vylučování sodíku byl precizně popsán Guytonem (14;15), který ukázal, že při správné funkci ledvin stačí malý vzestup krevního tlaku, aby bylo vyloučeno dostatečné množství sodíku a zachována homeostáza organismu.

V poslední době se stále více v souvislosti s hypertenzí hovoří o centrální sympatoexcitaci, neboli aktivaci sympatických drah v mozku, a jejím napojení na oxidativní stres. Bylo zjištěno, že v tomto procesu hrají zásadní úlohu AT_1 receptory a NADP(H) oxidáza (16-18), přičemž bylo prokázáno, že perorálně podávané blokátory AT_1 receptorů působí i centrálně a vedou k sympatoinhibici (19).

Jak již bylo zmíněno, krevní tlak je dán rovnováhou mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními systémy. Renin-angiotenzinový systém (RAS) je spolu se sympatickým nervovým systémem hlavním vazo-konstrikčním systémem, který se podílí na akutní regulaci krevního tlaku. Klasickou kaskádou vzniká hlavní produkt této kaskády - angiotenzin II, jehož vazokonstrikční působení je zprostředkováno přes AT_1 receptory. Blokáda RAS na různých stupních kaskády (přímé reninové inhibitory, inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu a blokátory angiotenzinových receptorů) je proto po řadu let používána jako účinný prostředek antihypertenzní terapie (20-23). V poslední době je však velká pozornost věnována i vazodilatačnímu působení RAS, jehož nejdůležitějším efektoem je angiotenzin-1-7 (23). V řadě studií bylo prokázáno jeho antihypertenzní a organoprotektivní působení (24).

Dalším vazokonstrikčním systémem, který se podílí na dlouhodobé regulaci krevního tlaku, je endotelinový systém. Endotelin-1 spolu s angiotenzinem II představují dva nejsilnější známé vazokonstriktory (25). Mimoto ET-1 působí prozánětlivě a proliferačně. Účinky angiotenzinu II a endotelinu-1 se přitom vzájemně potencují. Četné studie prokázaly, že se ET-1 uplatňuje v patogeneze řady chorob, jako jsou například hypertenze, diabetes, srdeční selhání a ateroskleróza, ale také v procesech stárnutí (26;27). Působení ET-1 je zprostředkováno dvěma typy receptorů, vazokonstrikčně působícími ET_A receptory na hladkosvalových buňkách a ET_B receptory na endoteliálních buňkách, které zprostředkují vazodilataci. Příznivé působení blokátorů ET_A receptorů na zmírnění orgánového poškození je přičítáno především jejich antiproliferativním účinkům. Další výhodou selektivní ET_A blokády je zachování vazodilatačního působení ET_B receptorů.

Další skupinou látek s potenciálními vazoaktivními a natriuretickými/natriumretenčními vlastnostmi jsou metabolity kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je metabolizována jednak cestou cytochromu P450 (28) na kyseliny 20-hydroxytetraenové (HETEs) a kyseliny epoxyeikosatrienové (EETs), a jednak cyklooxygenázovou cestou (cyklooxygenázou 1 nebo 2) na prostacyklin, prostaglandiny a tromboxany, látky s mnohočetnými účinky na kardiovaskulární systém, zánět, srážlivost či bolest (29). Zatímco HETEs jsou silně vazokonstrikční, EETs působí vazodilatačně a jsou považovány za tzv. endoteliální hyperpolarizační faktor (28). Obě skupiny pak inhibují sodíkový transport. Jejich úloha v hypertenzi a chronickém selhání ledvin byla prokázána v řadě studií (30-32). Velká pozornost byla věnována zejména zvýšení biologické dostupnosti EETs pomocí inhibice enzymu solubilní epoxidhydrolázy (konvertuje EETs na neaktivní DiHETEs) a jejímu vlivu na rozvoj hypertenze a orgánové poškození (31).

Zatímco cyklooxygenáza 1 je konstitutivně produkována v různých tkáních, cyklooxygenáza 2, označovaná jako indukibilní, vzniká především při zánětu. V ledvinách je však COX-2 exprimována konstitutivně a je regulována angiotenzinem II. Není proto překvapivé, že blokáda COX-2 vykazovala jak v experimentálních tak v humánních studiích renoprotektivní působení (33). Vzájemné protichůdné působení angiotenzinu II a produktů cyklooxygenázy II, zejména za podmínek sníženého příjmu soli a s tím související aktivace renin-angiotenzinového systému bylo cílem řady experimentálních studií (34).

Hlavním oponentem působení vazokonstrikčních systémů je oxid dusnatý, parakrinně působící regulátor cévního tonu (35), který má navíc i významné účinky antiproliferační a antiagregační. Jeho účinky antagonizují nejen prohypertenzní působení angiotenzinu II, ale také ET-1 a volných kyslíkových radikálů. Jeho úloha v oxidativním stresu je přitom ambivalentní, neboť na jednu stranu

je schopen snižovat tvorbu kyslíkových radikálů inhibicí NADP(H) oxidázy, na druhou stranu při jeho přebytku může reagovat se superoxydy za tvorby peroxynitritu (36). Velmi důležitá je i jeho tlumivá úloha při udržování sympatického tonu ve vazomotorických centrech v mozku (37).

Hypertenze je provázána zvýšeným cévním odporem, který je důsledkem zvýšeného vstupu vápníku do buněk hladkého svalu cév (prostřednictvím napěťově-řízených vápníkových kanálů - L-VDCC) (38) a/nebo zvýšené citlivosti kontraktálního aparátu k vápníku – vápníkové sensitizace (zprostředkované RhoA/Rho kinázovou dráhou). Přitom úlohu těchto dvou drah v regulaci krevního tlaku nelze hodnotit odděleně, protože oba systémy jsou vzájemně propojené a podílejí se na hladkosvalové kontrakci (Ca influx) a jejím udržování (Ca sensitizace) (39). RhoA spolu s Rac1 patří k malým Rho proteinům, které se podílejí na udržování kontrakce prostřednictvím fosforylace/defosforylace myosin light chain fosfatázy. Úloze Rho A/Rho kinázové dráhy v hypertenzi byla věnována značná pozornost, ale chronické pokusy s její inhibicí ukázaly spíše pozitivní vliv na snížení orgánového poškození než na snížení krevního tlaku (40).

Důležitým faktorem podporujícím rozvoj hypertenze je zvýšený příjem soli. Tyto závěry podporuje řada experimentálních studií. Citlivost k prohypertenznímu působení soli je zvýšená zejména u mladých jedinců (41). Hovoří se o tzv. vývojových oknech, v kterých je citlivost k nejrůznějším podnětům zvýšená. Mladá zvířata jsou rovněž velmi citlivá na antihypertenzní působení vápníku (Ca^{2+}) či draslíku (K^+) (42). V rozvinutých zemích je příjem soli mezi 9-12 g/den (43). Na základě různých metaanalýz bylo spočítáno, že jeho snížení o 2-5 g/den by snížilo počet kardiovaskulárních příhod o 20 %, což vedlo Světovou zdravotnickou organizaci k doporučení jejího snížení příjmu NaCl na 4-6 g/den. Velmi dobré výsledky v tomto směru mají ve Velké Británii (44).

Při studiu hypertenze jsou využívány různé modely, genetické, solné, nebo renální hypertenze. Tyto modely umožňují sledovat vliv různých faktorů (například zvýšeného příjmu soli), které se v patogenezi hypertenze uplatňují. V našich studiích jsme používali potkany s geneticky podmíněnou hypertenzí - spontánně hypertenzní potkan a Ren-2 transgenní potkan (TGR)(45), u něhož je hypertenze dána vložením myšího reninového genu. Inducibilní TGR (iTGR) potkani jsou stejně jako TGR potkani modelem angiotenzin II-dependentní hypertenze, přičemž Ren-2 gen je u nich pod kontrolou promotoru a může být „zapínán“ či „vypínán“ přidáním xenobiotika indol-3-karbinolu potravou (46). Dahlovi sůl senzitivní potkani jsou příkladem solné hypertenze, jejíž vznik je spojen se zvýšeným přísunem soli. U potkanů s DOCA-solnou hypertenzí je hypertenze navozena deoxykortikosteron acetátem (47). Zhoršení již existující hypertenze, které vede k selhání ledvin, lze u potkanů navodit částečnou redukcí ledvinné tkáně (5/6 nefrektomie) (48). Jiným modelem

experimentálně navozené hypertenze, který vzniká zúžením jedné renální arterie, je dvouledvinová jednosvorková (two Kidney, one clip) Goldblattova hypertenze, která ve své terminální fázi vede k ledvinnému selhání.

Tento krátký úvod měl pouze nastínit některé vybrané aspekty, které přispívají k rozvoji hypertenze a orgánového poškození a kterým byla věnována pozornost v našich studiích. Vzhledem k tomu, že se jedná o multifaktoriální chorobu, nelze říci, který faktor či systém je zodpovědný za vznik hypertenze. Z uvedeného je patrná vzájemná provázanost a komplexnost systémů, které zajišťují jak krátkodobou tak dlouhodobou regulaci krevního tlaku. Na druhou stranu je třeba říci, výsledky z experimentálních výzkumů nelze jednoduše přenést do humánní praxe, nicméně mohou přispět k poznání patofyziologických procesů a jejich možného ovlivnění.

Cíl práce

Cílem studií předkládaných v této disertaci bylo přispět k objasnění některých otázek, které se týkají regulace krevního tlaku na úrovni jednotlivých vazoaktivních systémů, které se podílejí na patogenezi hypertenze.

Hlavní pozornost byla věnována:

- studiu mechanismů vzniku hypertenze u vybraných modelů experimentální hypertenze pomocí izolované ledviny
- studiu působení vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů, které se podílejí na regulaci krevního tlaku a jejich vlivu na orgánová poškození
- studiu ontogenetických změn v působení jednotlivých vazoaktivních systémů na krevní tlak
- studiu mechanismů, které se podílejí na kontrakci hladkého svalů – vápníkovému influxu a vápníkové sensitizaci

Metodické přístupy

Izolovaná ledvina

Pravá ledvina byla izolována a umístěna do vyhřívané komůrky. Byla nakanylována aorta, kterou byl infundován Krebs-Henseleitův roztok obohacený o polyvinyl pyrrolidon, který jako koloidně osmotická látka udržoval onkotický tlak v ledvině. Dále byla kanylována v. cava abdominální pro stanovení průtoku perfuzátu ledvinou. Do a. femoralis byla zasunuta kanyla pro snímání krevního tlaku. Pro stanovení glomerulární filtrace byl použit vitamin B₁₂. Z ureteru byla kvantitativně sbírána moč. Perfúze byla prováděna při různých úrovních perfuzního tlaku v rozmezí 110-170 mmHg. Byl použit otevřený perfúzní systém bez přídavku erytrocytů. Obsah sodíku byl stanovován pomocí atomové absorpční spektrofotometrie, koncentrace vitamínu B₁₂ spektrofotometricky.

Akutní clearancové studie

Tyto studie umožnily selektivní podávání látek přímo do renálního řečiště. Byla kanylována levá arterie femoralis katetrem, který byl umístěn přímo k odstupu levé a. renalis. Zároveň byl pomocí druhého katetru, který byl kanylován do pravé a. carotis, měřen krevní tlak (model MLT 1050) a odebírána krev pro další analýzy. Další katetr byl umístěn do v. jugularis a byl jím infundován fyziologický roztok s 1 % albuminem. Poté byla zvířata ponechána 45 min v klidu, následoval první kontrolní 30-ti minutový odběr a poté zpravidla 2 experimentální 30-ti minutové periody.

Vazoaktivní balance

Jeden den před měřením vazoaktivních balancí byla potkanům v lehké izofluranové anestézii kanylována vena jugularis pro následné podávání farmak a arteria carotis pro měření krevního tlaku. Obě kanyly byly vyvedeny v interskapulární oblasti. Měření změn krevního tlaku po podání farmak bylo prováděno o 24 hodin později u 4 bdělých potkanů umístěných v komůrkách. Schéma experimentálního protokolu vychází z práce Minamiho et al (49), při kterém je provedena postupná blokáda hlavních vazoaktivních systémů podílejících se na regulaci krevního tlaku – renin-angiotenzinového systému (RAS)(captopril 10 mg/kg BW), sympatického nervového systému (SNS)(pentolinium 5 mg/kg BW) a oxidu dusnatého (L-NAME 30 mg/kg BW). Po blokádě tvorby NO pomocí L-NAME bylo dosaženo maximální vazodilatace podáním přímého donoru NO nitroprusidu (20 mg/kg BW).

Vápníková sensitizace a vápníkový influx

Podíl vápníkové sensitizace a vápníkového influxu byl stanovován intravenózním podáním rostoucích dávek fasudilu, inhibitoru Rho-kinázové cesty, resp. nifedipinu, blokátoru napěťově řízených vápníkových kanálů (L-VDCC) bdělým zvířatům. Dále byla vápníková sensitizace stanovována po předchozí blokádě RAS a SNS jako odpověď na podání otvírače vápníkových kanálů BAY K8644 (0,1-80 µg/kg) před a po podání fasudilu.

Renovaskulární Goldblattova 2K1C hypertenze

Tento experimentální zásah navozující hypertenzi je prováděn zúžením průsvitu jedné renální artérie, na kterou je naložena svorka o průměru 0,12 mm (myši). V průběhu 1 týdne dochází k rozvoji hypertenze, která je trvalá.

Navození hypertenze u iTGR potkanů

Potkanům byl do krmné diety přimíchán indol-3-karbinol v koncentraci 0,3 %, který aktivací aryl-hydrokarbonového receptoru spouští CYP1A1 promotor.

Myši

Knockouti AT₁ a Ang-1-7 byli vytvořeni na pozadí C57BL/6, zatímco B₂ knockouti na linii FVB/N.

Měření krevního tlaku

- Pomocí manžety na ocase

Krevní tlak byl měřen pletysmograficky pomocí okluzní manžety na ocase potkanů, později za pomoci poloautomatického přístroje firmy Hatteras MT 4000 (USA), který umožňoval současné měření 4 potkanů s 10 opakováními.

- Přímou metodou v karotidě

Další použitou metodou bylo přímé měření krevního tlaku u bdělých nebo anestetizovaných potkanů kanylací a.carotis. Katetr byl připojen na zapisovač PowerLab (ADInstruments) a data sbírána po dobu cca 15 minut. Současně mohla být měřena až 4 zvířata.

- Telemetrickými sondami

Pletysmografické měření KT bylo později nahrazeno mnohem přesnější metodou telemetrického snímání KT. Zvířata jsou přitom zcela volně pohyblivá, nejsou ničím stresovaná a výsledky mohou být

získávány kontinuálně po dobu několika týdnů - měsíců. Telemetrické sondy jsou umístěny v břišní dutině, přičemž kanyla je zavedena do aorty. Životnost myších sond je přibližně 1 měsíc, potkaních 4-5 měsíců.

Morfologická hodnocení

Ledviny byly zváženy, fixovány v 4 % pufrovaném formaldehydu, dehydrovány a zality do parafinu. Parafinové řezy byly barveny hematoxylinem-eosinem a Schiffovým reagens. Vzorky byly hodnoceny náhodným výběrem, vždy 50 glomerulů v každé ledvině světelným mikroskopem Nikon Eclipse E 600.

Pro hodnocení glomerulárního poškození byla zpočátku použita metodika Yagila a kol. (Physiol Genomics, 2002). Stupeň 0=všechny glomeruly normální; stupeň 1=1-2 glomeruly poškozené; stupeň 2= 3-16 glomerulů poškozených; stupeň 3= 17 a více glomerulů poškozených.

Později bylo glomerulární poškození hodnoceno glomerulosklerózním indexem podle Saita (Kidney Int., 1987) s použitím 100 glomerulů a následující škálou: Stupeň 0=všechny glomeruly normální; stupeň 1= sklerotizovaná plocha v < než 25 % celkové plochy glomerulu; stupeň 2= sklerotizovaná plocha na 25-50 % celkové plochy glomerulu; stupeň 3= sklerotizovaná plocha na >75 % celkové plochy glomerulu; přičemž glomerulosklerotický index (GSI) = $(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$.

Elektronmikroskopické snímky byly pořízeny transmisním elektronovým mikroskopem Philips EM 286/Morgagni.

- Orgánová poškození srdce a ledvin

Poškození srdce bylo hodnoceno poměrem hmotnosti srdce/tělesná hmotnost, resp. levá komora/ tělesná hmotnost jako index srdeční hypertrofie. Poměr hmotnosti ledviny/ tělesná hmotnost ukazuje ledvinovou hypertrofii provázející poškození ledvin.

Biochemické analýzy

Proteinurie (albuminurie) - Zvířata byla na 24 hodin umístěna do metabolických klecí a byla jímána moč. Proteinurie byla stanovována pomocí Biuretovy metody (Lachema, Česká republika), albuminurie pomocí kitu (Biolatest, Česká republika).

Koncentrace angiotenzinu II byly stanoveny pomocí RIA (Euro-Diagnostica, Švédsko).

Koncentrace endothelinu-1 byly stanoveny pomocí ELISA testu (Amersham, Německo).

Farmaka použítá v chronických pokusech

Blokátory renin angiotenzinového systému

- blokátory receptorů pro angiotenzin II – candesartan (5 mg/kg/den), losartan (5 mg/kg/den) v pitné vodě
- blokátory angiotenzin konvertujícího enzymu – captopril (10 mg/kg/den) v pitné vodě
- reninový inhibitor – aliskiren v osmotických minipumpách (10 mg/kg/den)
- blokátor AT₂ receptorů- PD123319 (30 mg/kg/den) v osmotických minipumpách

„RAS-independentní“ terapie – labetalol (400 mg/l), hydrochlorothiazid (50 mg/l) a furosemid (125 mg/l) v pitné vodě

„Triple“ terapie – hydralazin (80 mg/l), hydrochlorothiazid (30 mg/l) a reserpin (5 mg/l) v pitné vodě

Blokátory cytochromu P-450

- neselektivní CYP inhibitor 1-aminobenzotriazol (ABT) (50 mg/kg/den) - intraperitoneálně
- selektivní inhibitor tvorby HETEs – DDMS v osmotických minipumpách (2 mg/den)
- selektivní inhibitor solubilní epoxid hydrolázy – NCND (10 mg/kg/den) intraperitoneálně
- neselektivní CYP inhibitor CoCl₂ (24 mg/kg/ob den) - intraperitoneálně

Blokátory receptorů pro ET_A, resp ET_A/ET_B receptory – atrasentan (5 mg/kg/den) v pitné vodě, bosentan (100 mg/kg/den) v dietě

COX-blokáda – NS-398 (1 mg/kg/den) v pitné vodě

Antisense oligonukleotidy proti AT₁ receptoru

Antisense oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Geneti Biotech jako 15-mery fosforothioáty komplementární k bazím +63 až +77 AT₁ mRNA, dle sekvence udávané v literatuře (Peng, 1998). Byly podávány jednorázově (Vaněčková a kol., 2007) nebo opakovaně (Vaněčková a kol., 2012) v dávce 250 µg/kg BW) do veny jugularis v lehké izofluranové anestézii.

Antioxidační terapie

Zvířatům byl podáván v pitné vodě tempol (2 mmol/l), mimetikum superoxid-dismutázy, po dobu 5 týdnů.

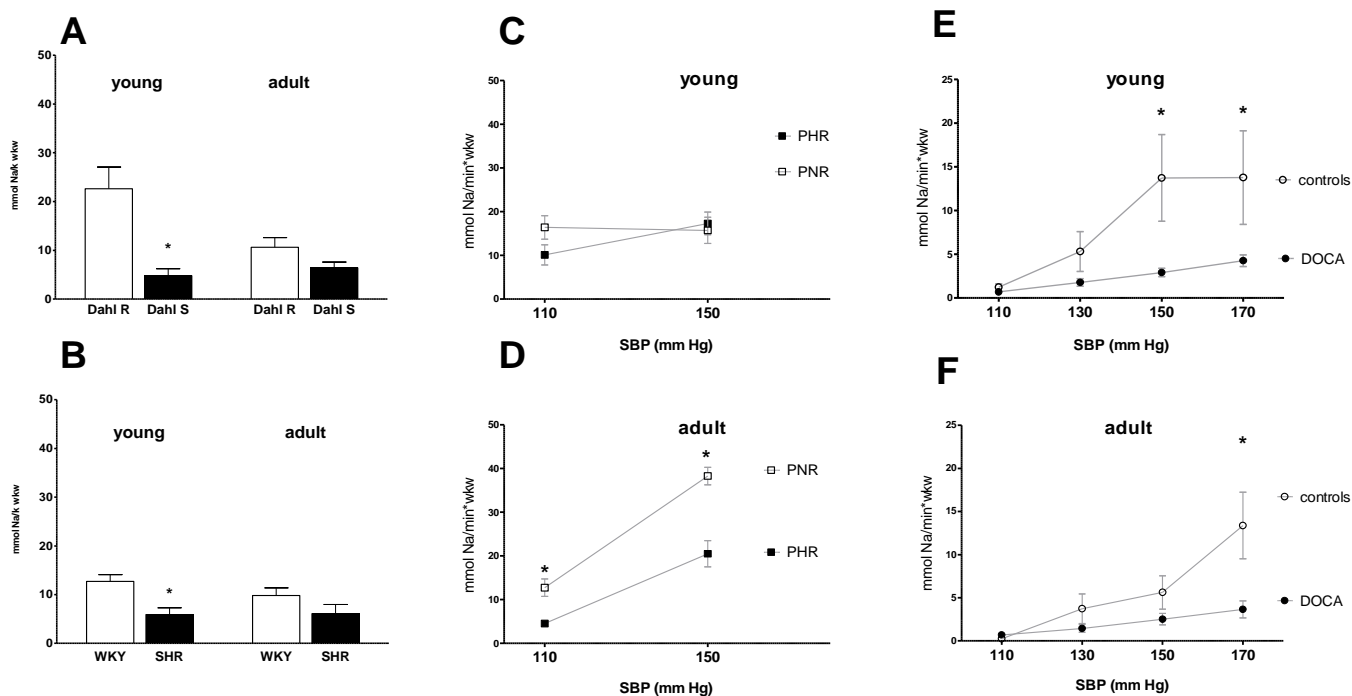
Další používané techniky

Vzhledem ke spolupráci s dalšími pracovišti byly v předložených pracích použity i další experimentální techniky, které zde nejsou detailně popsány. Případné zájemce odkazují na metodické části těchto prací.

Výsledky

1. Funkce izolované ledviny u vybraných modelů experimentální hypertenze – PHR, DOCA-solná, SHR a Dahlovi sůl-senzitivní potkani

Na počátku mé práce v oblasti renální fyziologie byly 3 články využívající techniku izolované ledviny u 4 různých modelů hypertenze – genetické (Spontánně hypertenzní potkan a Pražský hypertenzní potkan) (Vaněčková, 2002; Vaněčková et al, 1997), a solné (Dahlovi sůl-senzitivní potkani) (Vaněčková, 2002) a DOCA-solné hypertenze (Vaněčková et al, 1999), které byly studovány jak u mladých, tak u dospělých potkanů. Společným rysem všech jmenovaných kmenů byla snížená exkrece sodíku, která přispěla k rozvoji hypertenze. U Dahlových potkanů (Obr.2A), spontánně hypertenzních potkanů (Obr.2B) a potkanů s DOCA-solnou hypertenzí (Obr.2D, E) byly patrné tyto změny již u mladých prehypertenzních potkanů, zatímco u Pražského hypertenzního potkana (Obr.2C, D) se projevy až u dospělých zvířat.



Obr. 2 – Exkrece sodíku u Dahlových (A) a SHR potkanů (B) při tlaku 110 mm Hg, exkretorická křivka u Pražských hypertenzních potkanů (C a D) a potkanů s DOCA-solnou hypertenzí (E a F)

Práce vztahující se k problematice:

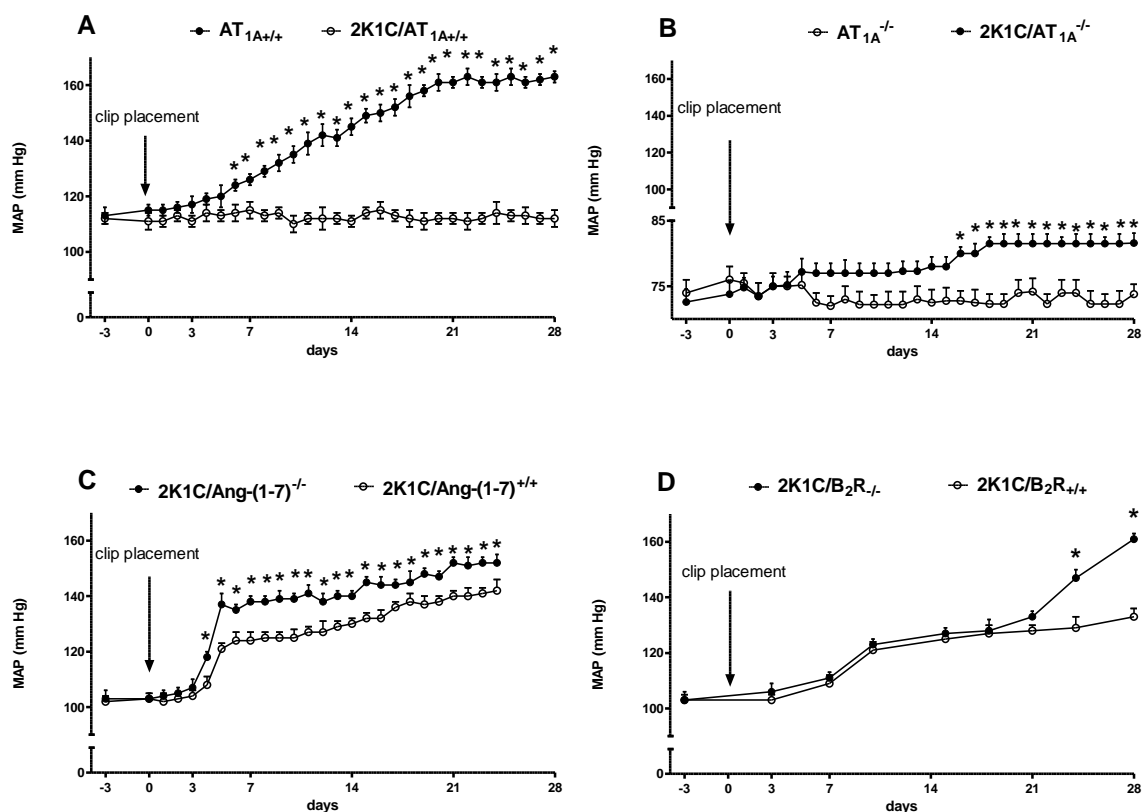
Vaněčková, I., Heller, J., Thurau, K.: Possible contribution of impaired sodium excretion to the development and maintenance of hypertension: a study of the isolated kidneys of the Prague hypertensive rat. Pflugers Arch. 1997 Sep;434(5):587-91, citováno: 1x

Vaněčková, I., Jelínek, J., Kuneš, J.: Function of the isolated perfused kidneys from young or adult rats with post-DOCA-salt hypertension. Clin Exp Hypertens. 1999 May;21(4):407-21, citováno: 1x

Vaněčková, I.: Function of the isolated perfused kidney in young and adult spontaneously hypertensive and dahl salt-sensitive rats. Kidney Blood Press Res. 2002;25(5):315-21, citováno: 3x

2. Renovaskulární hypertenze 2K1C – úloha angiotenzinových AT_1 a AT_2 receptorů, Mas receptoru pro Angiotenzin-1-7, a kininových B_2 receptorů

Model renovaskulární hypertenze - 2K1C (two-kidney, one-clip) odpovídá lidské hypertenzi se stenózou jedné renální arterie, a je proto v experimentálním výzkumu hojně využíváný. Dospělým myším byla na jednu renální arterii naložena svorka, která v průběhu týdne indukovala u wild-type myši nárůst krevního tlaku o cca 30 mm Hg (Obr.3A). Tento vzestup však byl výrazně nižší u myši, kterým byl knock-outován gen pro AT_{1A} receptor (Obr.3B) (Červenka et al, 2002; Cervenka et al, 2008). Protože blokáda AT_2 receptoru ani jeho aktivace nevedly u těchto myši ke změně tlakové odpovědi, je zřejmé, že na rozdíl od AT_{1A} receptorů AT_2 receptory nehrají u tohoto modelu zásadní roli. Vyřazení Mas receptoru pro angiotenzin 1-7 vedlo k výraznému nárůstu krevního tlaku u těchto zvířat (2K1C/ANG-1-7 knockout mice) (Obr.3C), což znamená, že tato antihypertenzní osa je významným endogenním oponentem hypertenzogenního působení aktivovaného renin-angiotenzinového systému (Rakušan et al, 2010). Naproti tomu vyřazení kininových B_2 receptorů výrazně zhoršilo průběh až v udržovací fázi 2K1C hypertenze (2K1C/ B_2R -/- knockout mice) (Obr.3D) (Červenka et al, 2003).



Obr. 3 – Rozvoj renovaskulární hypertenze u wild-type myši (A) a knock-outů s vyřazením receptorů pro AT_{1A} (B), Angiotenzin-1-7 (C) a bradykinin (D)

Práce vztahující se k problematice:

Červenka, L., Horáček, V., Vaněčková, I., Hubáček, J., Oliverio, M.I., Coffmann T. M., Navar G.: Essential role of AT_{1A} receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension*. 2002 Nov;40(5):735-41. citováno 54x

Červenka, L., Vaněčková, I., Malý, J., Horáček, V., ElDahr S. S.: Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT2 receptor. *J Hypertens*. 2003 Aug;21(8):1531-8. citováno 13x

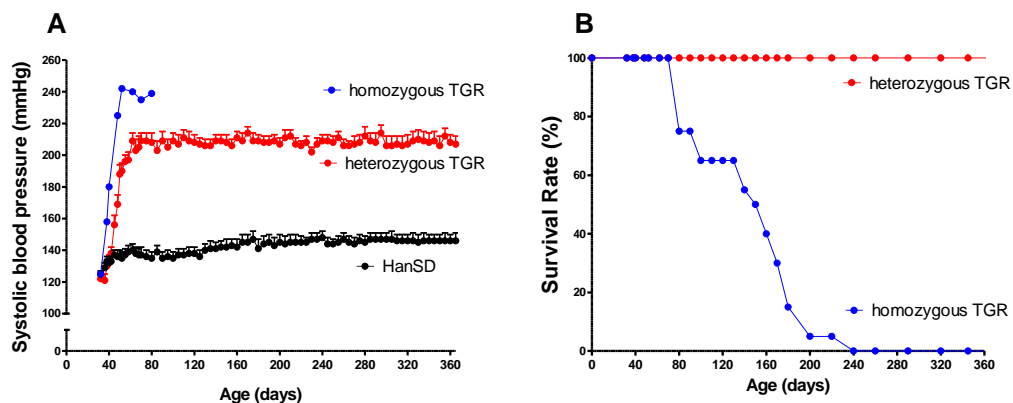
Cervenka L, Vaněčková I, Husková Z, Vaňourková Z, Erbanová M, Thumová M, Skaroupková P, Opočenský M, Malý J, Chábová VC, Tesař V, Bürgelová M, Viklický O, Teplan V, Zelízko M, Kramer HJ, Navar LG.: Pivotal role of angiotensin II receptor subtype 1A in the development of two-kidney, one-clip hypertension: study in angiotensin II receptor subtype 1A knockout mice. *J Hypertens*. 26(7):1379-1389, 2008. citováno 32x

Rakušan D, Bürgelová M, Vaněčková I, Vaňourková Z, Husková Z, Skaroupková P, Mrázová I, Opočenský M, Kramer HJ, Netuka I, Malý J, Alenina N, Bader M, Santos RA, Cervenka L.: Knockout of Angiotensin 1-7 Receptor Mas Worsens the Course of Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension: Roles of Nitric Oxide Deficiency and Enhanced Vascular Responsiveness to Angiotensin II. *Kidney Blood Press Res*. 33(6):476-488, 2010. Citováno 13x

3. Ren-2 transgenní potkani

Ren-2 transgenní potkan (TGR) je modelem experimentální angiotenzin II-dependentní hypertenze, která je důsledkem vložení jediného genu (myšího genu pro renin) potkanům kmene Hannover Sprague Dawley (HanSD), a je spojená s endogenní aktivací renin-angiotenzinového systému.

Heterozygotní zvířata vyvíjejí v průběhu 2. měsíce života hypertenzi, která však na rozdíl od homozygotních potkanů není maligní (Obr.4A, B).



Obr. 4 - Rozvoj hypertenze (A) a přežívání (B) u HanSD a TGR potkanů

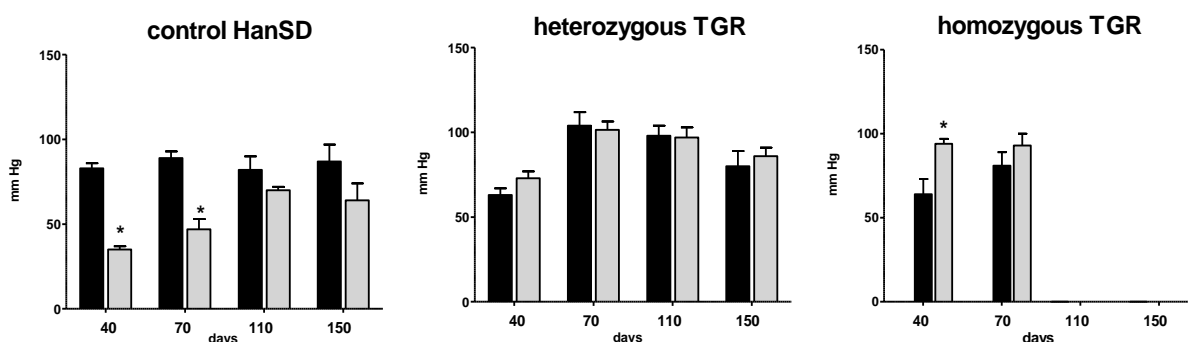
Úloha vazodilatačních systémů

Oxid dusnatý

U prehypertenzních TGR potkanů byla zjištěna zvýšená mRNA exprese neuronální syntázy oxidu dusnatého (nNOS) v renálním kortexu oproti kontrolním HanSD potkanům (Červenka et al, 2002).

Akutní blokáda nNOS pomocí L-SMTC vyvolala výrazný pokles glomerulární filtrace a průtoku u HanSD

zvířat, zatímco u TGR potkanů vedla k řádovému vzestupu exkrece sodíku. Zdá se tedy, že TGR potkani v prehypertenzní fázi mají sice zvýšenou expresi NO syntázy v cévním řečišti ale pravděpodobně sníženou reaktivitu cév k NO. Akutní clearancové studie navíc ukázaly, že neselektivní blokáda NOS vedla k vyššímu vzestupu krevního tlaku u prehypertenzních TGR než u kontrolních zvířat (Vaněčková et al, 2005). Naše pozdější pokusy hodnotící aktivitu jednotlivých vazoaktivních systémů ukázaly (Vaněčková et al, 2012), že podíl NO-dependentní vazodilatace je závislý na věku zvířat - u mladých HanSD potkanů je výrazně zvýšená oproti vazokonstriktori dané renin-angiotenzinovým (RAS) a sympatickým nervovým systémem (SNS), v dospělosti je vazoaktivní rovnováha obou systémů vyrovnaná. Naproti tomu u homozygotních TGR potkanů převažuje podíl vazokonstriktoričních systémů (Obr. 5).



Obr. 5 - Srovnání podílu NO-dependentní vazodilatace (černé sloupce) a vazokonstrukce dané součtem RAS- a SNS-dependentní vazokonstrukce (šedé sloupce)

Práce vztahující se k problematice:

Vaněčková, I., Kramer, H. J., Malý, J., Bäcker, A., Bokemeyer, B., Červenka, L.: Lack of a role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the renal function in rats fed a low-sodium diet. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(4):224-31. citováno 9x

Červenka, L., Kramer, H. J., Herbert, Malý, J., Vaněčková, I., Bäcker, A., Bokemeyer, B., Bader, M., Ganten, D., Mitchell, K. D.: Role of nNOS in regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res.* 2002;51(6):571-80. citováno 7x

Vaněčková, Ivana, Kramer, H. J., Novotná, J., Kazdová L., Opočenský, M., Bader, M., Ganten, D., Červenka, L.: Roles of nitric oxide and oxidative stress in the regulation of blood pressure and renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res.* 2005;28(2):117-26. citováno 8x

Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš J., Zicha J.: The effects of repeated delivery of angiotensin II At1 receptor antisense on distinct vasoactive systems in Ren-2 transgenic rats: young vs. adult animals, *Hypertension Res* 35:761-768, 2012. citováno 3x

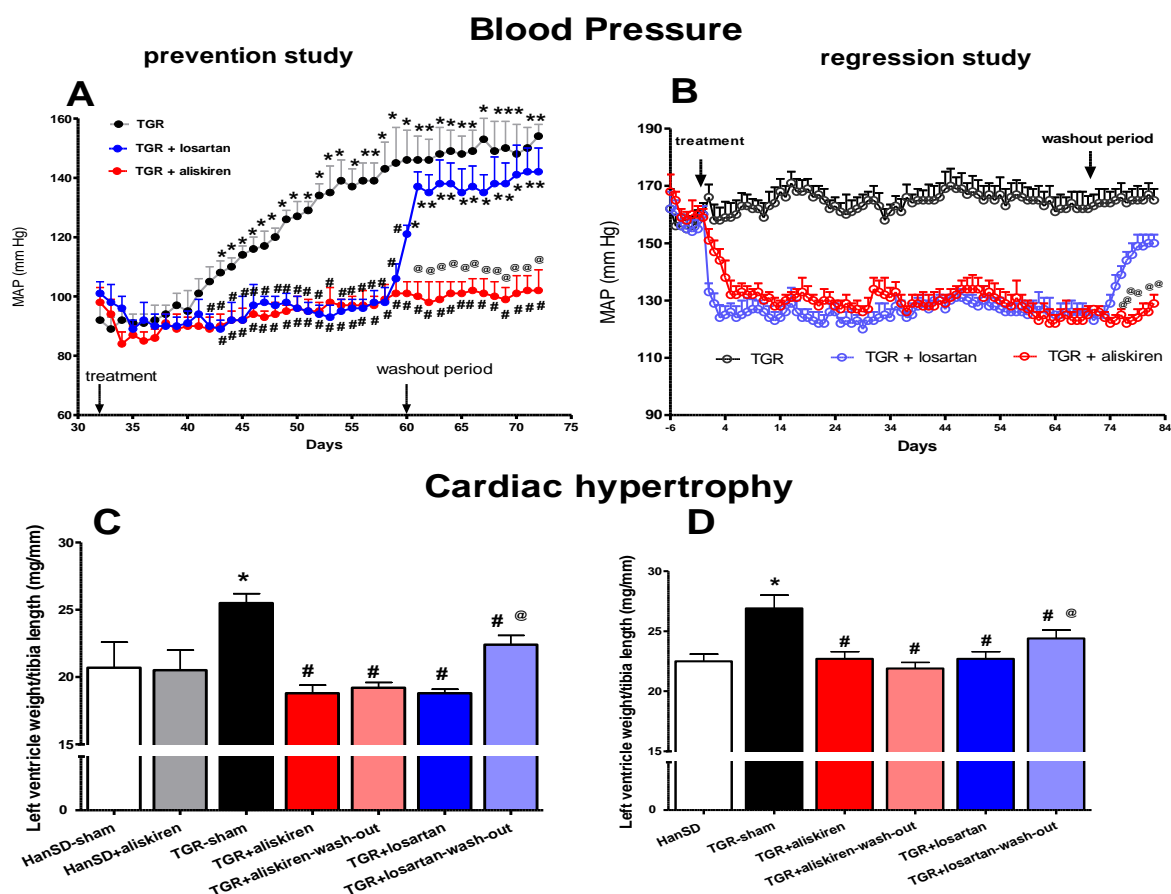
Úloha vazokonstriktoričních systémů

Renin-angiotenzinový systém

Řada studií prokázala pozdní důsledky časně léčby blokátory renin-angiotenzinového systému u geneticky hypertenzních potkanů (41;50). Naše studie na TGR potkanech ukázala, že antihypertenzní a organoprotektivní účinky vykazovala pouze dlouhodobá léčba AT₁ receptorovým antagonistou,

zatímco časná blokáda AT₁ receptorů a blokáda AT₂ receptorů neměla na průběh hypertenze ani na orgánové poškození žádný vliv (Vaněčková et al, 2007).

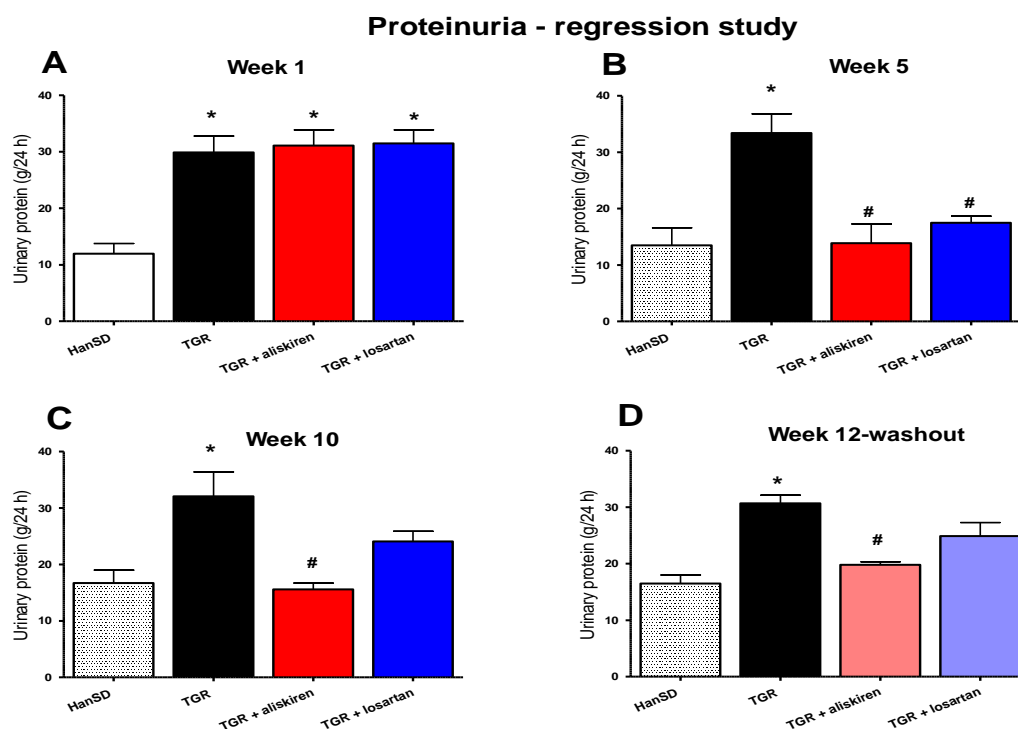
Až do vyhodnocení velkých klinických studií a zjištění nepříznivých vedlejších účinků léčby se jevil aliskiren (přímý reninový inhibitor), perorálně podávané antihypertenzivum zasahující renin-angiotenzinový systém v jeho prvním kroku, tj. konverzi angiotenzinogenu na angiotenzin I, jako optimální lék snižující krevní tlak, který měl navíc výrazné nefroprotektivní účinky. Naše studie na TGR potkanech k tomuto poznání rovněž přispěla. Navíc jsme ukázali, že antihypertenzní a kardioprotektivní účinek aliskirenu přetrvává ještě týden po vysazení léčby (Obr. 6), a to jak u mladých zvířat (preventivní studie), tak u potkanů s rozvinutou hypertenzí (regresní studie).



Obr. 6 – Vliv preventivní a regresní léčby aliskirenem na krevní tlak a srdeční hypertrofii

Jeho nefroprotektivní účinky v podobě snížení proteinurie byly dány mimo jiné jeho vlivem na obnovu struktury glomerulů (Obr. 7) (Rakušan et al, 2010). Provedli jsme i srovnání jeho účinků s losartanem a zjistili jsme, že přes stejné renální koncentrace angiotenzinu II a endotelinu-1 pouze aliskiren normalizoval proteinurii (Vaňourková et al, 2010).

Potenciální výhody genové terapie proti různým receptorům byly prokázány u řady chorob. V našich dvou studiích jsme použili antisense oligonukleotidy proti AT₁ receptoru.



Obr. 7 - Proteinurie u zvířat v regresním protokolu

Po jejich časném jednorázovém podání došlo u TGR potkanů k mírnému snížení krevního tlaku (30 mm Hg), které přetrvávalo přibližně 14 dní, ale nemělo dlouhodobý vliv na orgánové poškození (Vaněčková et al, 2007). Při opakovaném podávání (4x po 10 dnech) došlo u mladých zvířat ke snížení krevního tlaku doprovázenému redukcí srdeční hypertrofie. Při studiu mechanismů, které vedou ke snížení krevního tlaku při léčbě antisense, jsme zjistili, že u mladých TGR zvířat je tento efekt dán snížením sympatické vazokonstrikce, zatímco u zvířat s rozvinutou hypertenzí je to dáno zmenšením angiotenzin-dependentní složky krevního tlaku (Vaněčková et al, 2012).

Práce vztahující se k problematice:

Vaněčková, I., Kopkan, L., Husková, Z., Vaňourková, Z., Schejbalová, S., Cervenka, L., Kramer H.J.: Long-Term Prevention of Hypertension and End-Organ Damage in Ren-2 Transgenic Rats Is Achieved Only with Persistent but Not Transient AT(1) Receptor Blockade. *Kidney Blood Press Res.* 30:38-44, 2007. citováno 3x

Vaněčková I., Kopkan L., Husková Z., Vaňourková Y., Schejbalová S., Červenka L., Kramer H.J.: AT1 receptor antisense therapy transiently lowers blood pressure in Ren-2 transgenic rats, *Vascular Pharmacology* 47:63-67, 2007. citováno 5x

Vaňourková Z, Kramer HJ, Husková Z, Červenka L, **Vaněčková I:** Despite similar reduction of blood pressure and renal ANG II and ET-1 levels aliskiren but not losartan normalizes albuminuria in hypertensive Ren-2 rats, *Physiol Res*, 2010, 59(3):339-345. citováno 5x

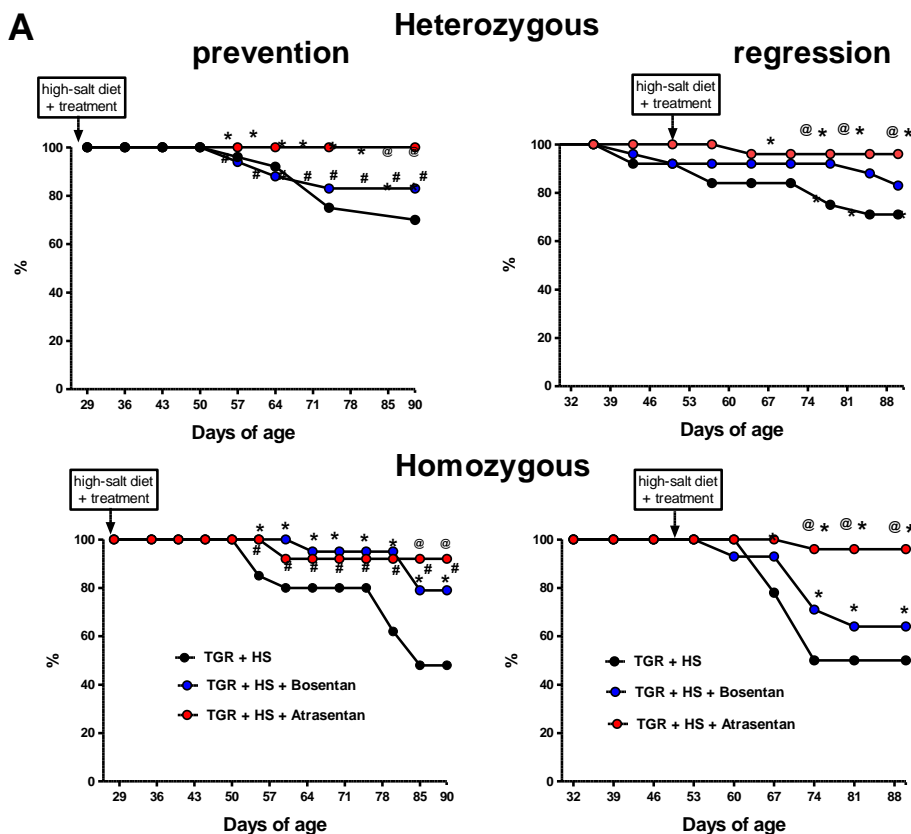
Rakušan D, Kujal P, Kramer HJ, Husková Z, Vaňourková Z, Vernerová Z, Mrázová I, Thumová M, Červenka L, and **Vaněčková I:** Persistent antihypertensive effect of aliskiren is accompanied by reduced proteinuria and normalization of glomerular area in Ren-2 transgenic rats, *Am J Physiol*, 2010, F-758-F766. citováno 9x

Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš J., Zicha J.: The effects of repeated delivery of angiotensin II At1 receptor antisense on distinct vasoactive systems in Ren-2 transgenic rats: young vs. adult animals, *Hypertension Res* 35:761-768, 2012. citováno 3x

Endotelinový systém

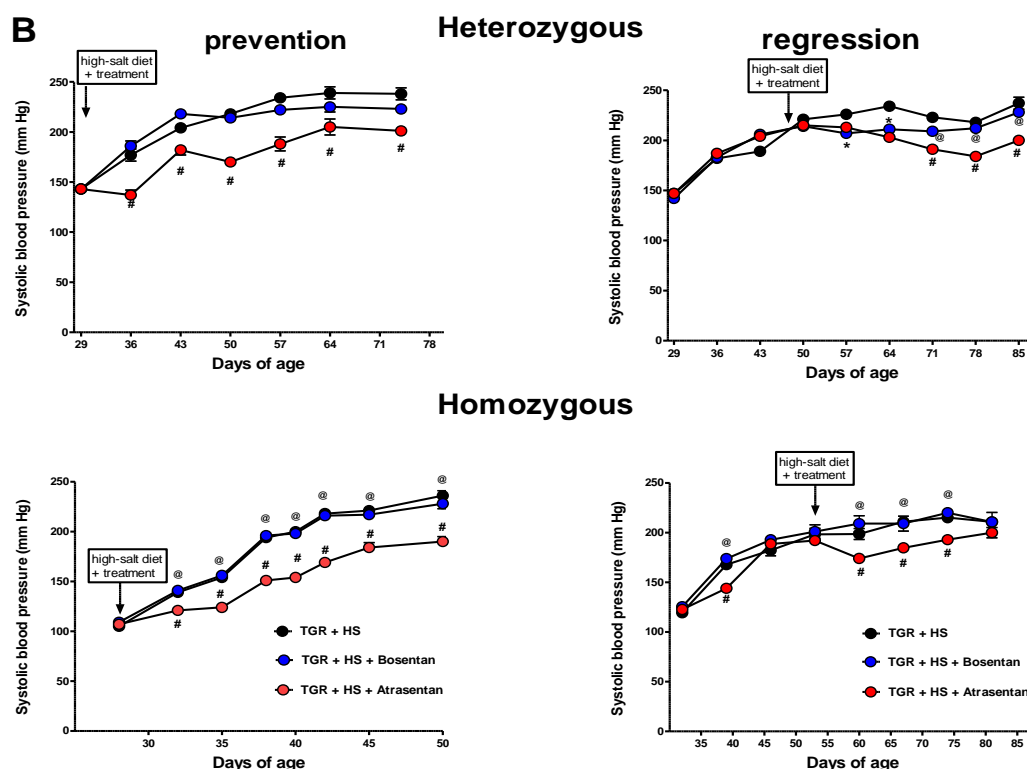
Endotelin-1 a angiotenzin II jsou dva nejsilnější vazokonstriktory. Endotelin-1 působí na 2 typy receptorů - ET_A , které zprostředkují vazokonstrikci a ET_B receptory, které zprostředkují vazodilataci. Naše pokusy s heterozygotními a homozygotními TGR potkany byly zpočátku zaměřeny na bosentan, neselektivní blokátor ET_A/ET_B receptorů. Pokusy jsme prováděli při zvýšeném příjmu soli (2 % NaCl), o němž je známo, že aktivuje endotelinový systém. Zjistili jsme, že bosentan sice nemá antihypertenzní účinky, ale má výrazný nefroprotektivní potenciál, čímž výrazně přispěl ke snížení mortality zvířat a to jak u homozygotních samců (Dvořák et al, 2004), tak heterozygotních samců a samic (Opočenský et al, 2004).

U samců bylo patrné výraznější poškození ledvin v důsledku rychlejšího rozvoje hypertenze oproti samicím, v důsledku čehož byly i jejich hodnoty proteinurie mnohem vyšší. V další sérii pokusů jsme srovnávali účinky neselektivní ET_A/ET_B blokády bosentanem a selektivní ET_A blokády atrasentanem u zvířat léčených od odstavu (preventivní protokol) oproti zvířatům léčeným až v dospělosti (regresní protokol).



Obr. 8 - Vliv preventivní a regresní léčby blokátory ET receptorů na přežívání TGR potkanů

Prokázali jsme, že na rozdíl od bosentanu je atrasentan schopen u TGR potkanů léčených od mládí snížit krevní tlak, což spolu s jeho nefroprotektivními a kardioprotektivními účinky ukazuje na možnost jeho lepšího využití v léčbě hypertenze a souvisejícího orgánového poškození (Vaněčková et al, 2005; Vaněčková et al, 2006). U zvířat léčených atrasentanem v dospělosti bylo snížení krevního tlaku výrazně menší, u homozygotních potkanů se na konci pokusu tlak dokonce nelišil od neléčených zvířat. Nicméně jeho účinky sahaly dále, za hranici danou prostým snížením TK, protože atrasentan výrazně snížil poškození podocytů (filtrační bariéry ledvin), které významně korelovalo s přežíváním zvířat (Opočenský et al, 2006; Vernerová et al 2008 a review Vernerová et al, 2009) (Obr. 8, 9).



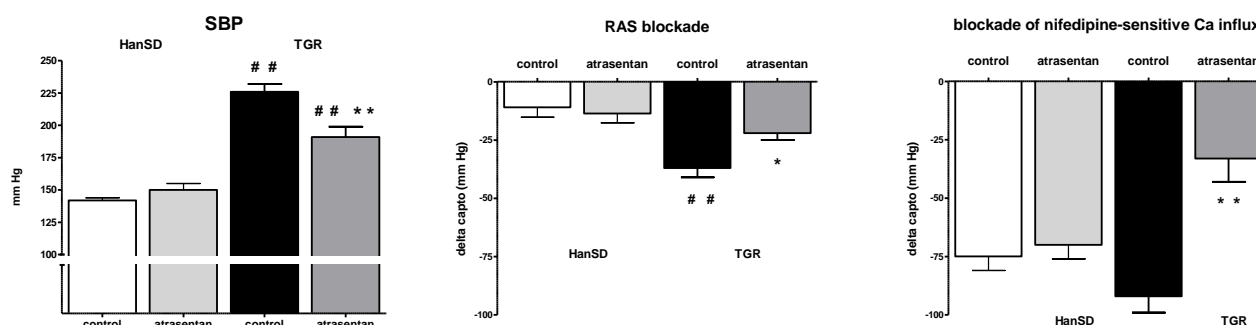
Obr. 9 - Vliv preventivní a regresní léčby blokátory ET receptorů na krevní tlak TGR potkanů

V poslední době je naše studium zaměřeno na mechanismy působení blokátorů ET_A receptorů v regulaci krevního tlaku. Naše výsledky ukazují, že antihypertenzní účinek chronické léčby atrasentanem je dán sníženým influxem vápníku napětově-řízenými vápníkovými kanály v důsledku oslabené angiotenzin II-dependentní vazokonstrikce spolu s chybějící ET_A -dependentní vazokonstrikcí (Obr.10) (Vaněčková et al, 2015).

Práce vztahující se k problematice:

Dvořák, P., Kramer, H. J., Bäcker, A., Malý, J., Kopkan, L., Vaněčková, I., Vernerová, Z., Opočenský, M., TESÁŘ, Vladimír., Bader, M., Ganten, D., JANDA, Jan, Červenka, L.: Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res*, 2004, roč. 27, č. 4, s. 248-258. citováno 11x

Opočenský, M., Dvořák, P., Malý, J., Kramer, H. J., Bäcker, A., KOPKAN, Libor, Vernerová, Z., Tesař, V., Zima, T., Bader, M., Ganten, D., Janda, J., **Vaněčková, I.**: Chronic endothelin receptor blockade reduces end - organ damage independently of blood pressure effects in salt - loaded heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res*, 2004, 53(6):581-593. citováno 7x



Obr. 10 – Vliv ET_A receptorové blokady na krevní tlak, RAS-dependentní vazokonstrikci a vstup vápníku

Vaněčková, Ivana, Kramer, H. J., Bäcker, A., Vernerová, Z., Opočenský, M., Červenka, L.: Early endothelin-A receptor blockade decreases blood pressure and ameliorates end-organ damage in homozygous Ren-2 rats. *Hypertension*. 2005 Oct;46(4):969-74. citováno 15x

Vaněčková, Ivana, Kramer, H. J., Bäcker, A., Schejbalová S., Vernerová, Z., Eis, V., Opočenský, M., Dvořák Pavel, Červenka, L.: Early-Onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 rats, *Vascular Pharmacol* 45:163-171, 2006. citováno 2x

Opočenský, M., Kramer, H. J., Bäcker, A., Vernerová, Z., Eis, V., Čertíková Chábová, V., Tesař V., **Vaněčková, I.**: Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension, *Hypertension* 48:965-971, 2006. citováno 18x

Vernerová Z, Kramer HJ, Bäcker A, Cervenka L, Opočenský M, Husková Z, Vaňourková Z, Eis V, Chábová VC, Tesař V, Malý J, **Vaněčková I.**: Late-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous REN-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol*. 48:165-173, 2008. citováno 7x

Vernerová Z, Kujal P, Kramer HJ, Bäcker A, Červenka L, **Vaněčková I.**: End-organ damage in hypertensive transgenic Ren-2 rats: influence of early and late endothelin receptor blockade, *Physiol Res*, 58:S69-78, 2009. citováno 3x review

Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš, 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 Hypertension*, 33(1):161-169, 2015.

Metabolity kyseliny arachidonové

Cyklooxygenáza-2

Cyklooxygenáza-2 je konstitutivně exprimovaný enzym, jehož vazodilatačně působící produkty antagonizují účinky angiotenzinu II. Je známo, že za podmínek sníženého příjmu soli je aktivita cyklooxygenázy-2 (COX-2) v ledvinách zvýšená. Chronické pokusy však ukázaly, že inhibice COX-2 u mladých TGR potkanů neměla vliv na rozvoj hypertenze, proteinurii ani srdeční hypertrofii, a to ani za normálního ani za sníženého příjmu sodíku ([Vaněčková et al, 2005](#)). Akutní pokusy sice prokázaly vysokou expresi COX-2 proteinu a vysoké koncentrace prostaglandinu E2 v ledvinách za podmínek sníženého příjmu soli, ale blokáda COX-2 neměla žádný vliv na renální hemodynamiku nebo vylučování sodíku. To naznačuje, že metabolity kys.arachidonové vznikající cestou COX-2 nehrají

výraznou kompenzační úlohu v regulaci krevního tlaku a renálních funkcí u TGR potkanů (Vaněčková et al, 2004).

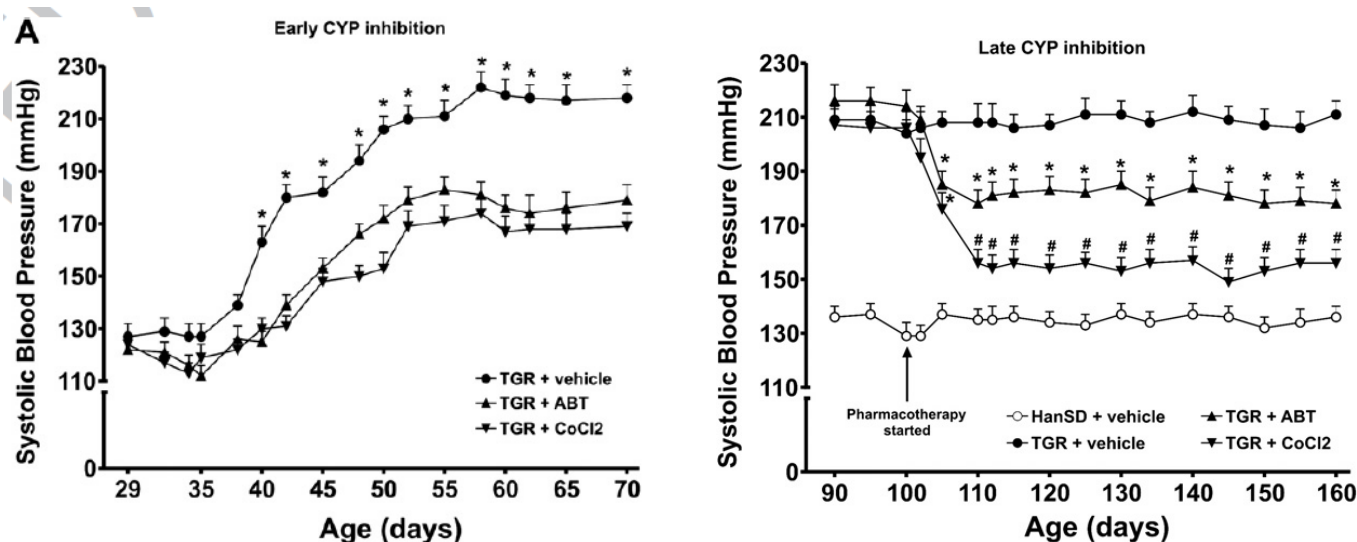
Práce vztahující se k problematice:

Vaněčková, I., Cahová, M., Kramer, H. J., Husková, Z., Škaroupková, P., Komers, R., Bader, M., Ganten, D., Červenka, L.: Acute effects of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in heterozygous Ren-2-transgenic rats on normal or low sodium intake. *Kidney Blood Press Res*, 2004, 27(4):203-210. citováno 6x

Vaněčková, I., Škaroupková, P., Dvořák, P., Čertíková Chábová, V., Tesař, V., Bader, M., Ganten, D., Kramer, H. J.: Effects of sodium restriction and cyclooxygenase-2 inhibition on the course of hypertension, proteinuria and cardiac hypertrophy in Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res*. 2005;54(1):17-24. citováno 7x

Cytochrom P-450

Cestou cytochromu P-450 (CYP-450) vznikají dvě skupiny látek – vazokonstrikčně působící HETEs a vazodilatačně působící EETs. HETEs mimo jiné působí natriuretický, čímž oponují svým vazokonstrikčním účinkům. Naše pokusy ukázaly, že chronická neselektivní blokáda CYP-450 vede ke zmírnění rozvoje hypertenze, snížení srdeční hypertrofie a poškození ledvin, a to více u zvířat, u kterých byla léčba zahájena již před rozvinutím hypertenze (Obr. 11) (Chábová et al, 2007). Zvýšené renální vylučování HETEs spolu se sníženou aktivitou epoxygenázy (enzymu zvyšujícího produkci EETs) zřejmě přispívají k rozvoji hypertenze u TGR potkanů (Čertíková Chábová et al, 2007). Chronická selektivní blokáda tvorby HETEs při současné inhibici solubilní epoxidhydrolázy (vedoucí ke zvýšené biologické dostupnosti EETs) zmírnila rozvoj hypertenze a orgánové poškození TGR potkanů (Čertíková Chábová et al, 2010).



Obr. 11 – Vliv časně a pozdní neselektivní blokády cytochromu P450 na krevní tlak

Práce vztahující se k problematice:

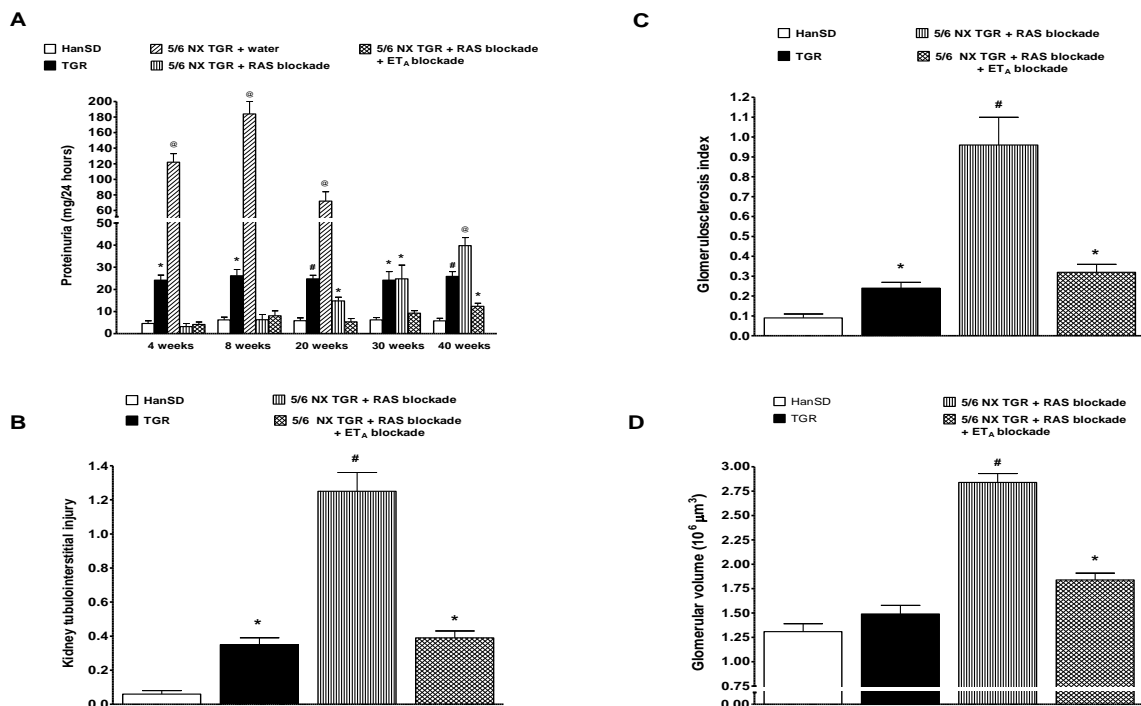
Chabova VC, Kramer HJ, Vaneckova I, Vernerova Z, Eis V, Tesar V, Skaroupkova P, Thumova M, Schejbalova S, Huskova Z, Vanourkova Z, Kolsky A, Imig JD, Cervenka L.: Effects of chronic cytochrome P-450 inhibition on the course of hypertension and end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol*. 47(2-3):145-159, 2007. citováno 26x

Čertíková Chábová V., Kramer Herbert J., Vaněčková I., Thumová M., Škaroupková P., Tesař V., Falck J.R., Imig JD., Červenka L.: The roles of Intrarenal 20-Hydroxyeicosatetraenoic and Epoxyeicosatrienoic acids in the regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats, *Kidney Blood Pressure Res* 30:335-346, 2007. citováno 7x

Certíková Chábová V, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kujal P, Vernerová Z, Vaňourková Z, Kopkan L, Kramer HJ, Falck JR, Imig JD, Hammock BD, Vaněčková I, Cervenka L.: Combined inhibition of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation and of epoxyeicosatrienoic acids degradation attenuates hypertension and hypertension-induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats, *Clin Sci (Lond)*. 2010, 118(10):617-32. citováno 17x

5/6 nefrektomie - RAS a ET blokáda

Experimentální zásah spočívající v redukci renální hmotnosti odpovídá chronickému ledvinnému selhání, což je choroba, která postihuje miliony lidí na celém světě. Pokusili jsme se srovnat účinky RAS-dependentní terapie (inhibitor angiotenzin konvertujícího enzymu - ACE a blokátor angiotenzinových receptorů - ARB) a RAS-independentní terapie (adrenergní antagonisty v kombinaci s diuretiky hydrochlorothiazidem a furosemidem). Zjistili jsme, že obě terapie normalizovaly krevní tlak a přežívání zvířat, zabránily rozvoji srdeční hypertrofie a glomeruloskleróze, ale RAS-dependentní terapie měla navíc zřejmé antiproteinurické účinky (Kujal et al, 2010). Nefroprotektivní účinky vykazuje i selektivní ET_A blokáda, která byla proto použita v další studii, a to právě v kombinaci s RAS blokádou. U dospělých zvířat, která byla léčena po dobu 20 týdnů, se však aditivní účinky ET_A blokády neprojevily (Vaněčková et al, 2012). Ty byly zaznamenány, až když byla léčba prodloužena o dalších 6 měsíců. U takto dlouhodobě léčených zvířat byla na konci pokusu výrazně snížena mortalita, zřejmě v důsledku snížené proteinurie a poškození glomerulů (Obr. 12) (Čertíková Chábová et al, 2014).



Obr. 12 – Rozvoj proteinurie a indexy renálního poškození u modelu 5/6 nefrektomie

Práce vztahující se k problematice:

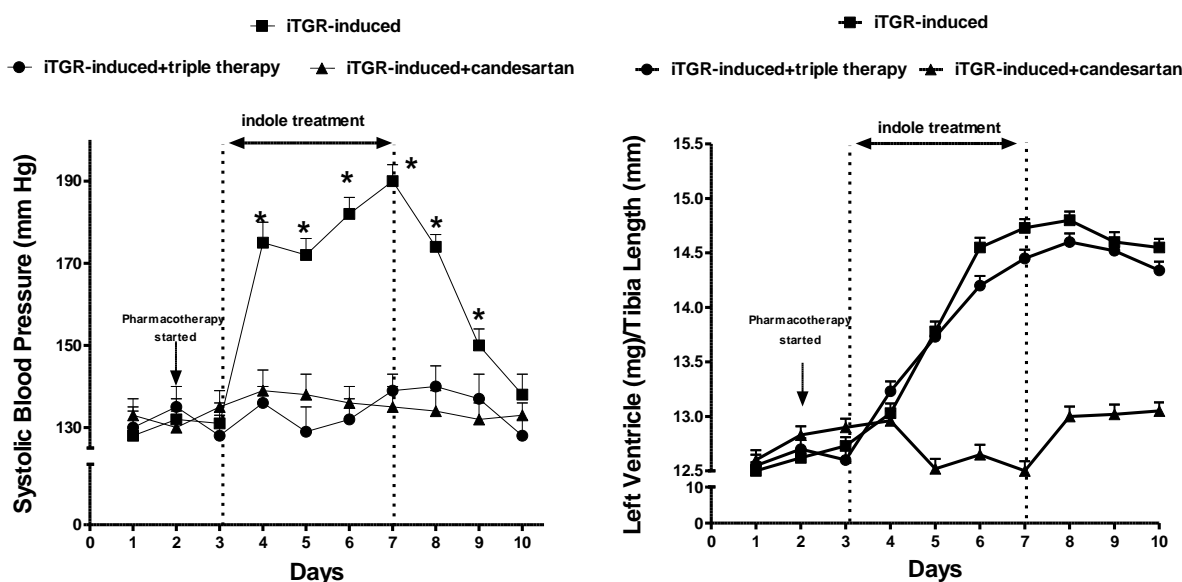
Kujal P, Chábová VC, Vernerová Z, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Vaňourková Z, Husková Z, Opočenský M, Škaroupková P, Schejbalová S, Kramer HJ, Rakušan D, Malý J, Netuka I, Vaněčková I, Kopkan L, Cervenka L.: Similar renoprotection after renin-angiotensin-dependent and -independent antihypertensive therapy in 5/6-nephrectomized Ren-2 transgenic rats: are there blood pressure-independent effects, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 37:1159-1169, 2010. citováno 9x

Vaněčková I., Kujal P., Husková Z., Vaňourková Z., Vernerová Z., Čertíková Chábová V., Škaroupková P., Kramer HJ., Tesař V., Červenka L., Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats, *Kidney Blood Press Res*, 35:382-392, 2012. citováno 8x

Věra Čertíková Chábová, Zdenka Vernerová, Petr Kujal, Zuzana Husková, Petra Škaroupková, Vladimír Tesař, Herbert J Kramer, Elzbieta Kompanowska-Jeziarska, Agnieszka Walkowska, Janusz Sadowski, Luděk Červenka and Ivana Vaněčková: Addition of ET_A receptor blockade increases renoprotection provided by renin-angiotensin system blockade in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic rats, *Life Sciences*, 2014, 118:297-305.

6.4. Inducibilní Ren-2 transgenní potkan (iTGR)

Kmen iTGR se liší od Ren-2 transgenního potkana tím, že myší Ren-2 gen je pod kontrolou promotoru, který je spouštěn příjmem xenobiotika indol-3-karbinolu (I3C). Hypertenzi lze tedy jednoduše „zapínat“ či „vypínat“ přidávkem I3C do potravy. Potkani dostávali buď léčbu namířenou proti RAS (AT₁ receptorový blokátor candesartan), nebo tzv. „triple terapii“ (hydralazin, hydrochlorothiazid a reserpin), která nezasahuje do RAS. Oba typy léčby normalizovaly krevní tlak, ale pouze léčba candesartanem měla kardioprotektivní účinky (Obr.13) (Vaňourková et al, 2006). Naproti tomu selektivní blokáda ET_A receptorů neměla na rozvoj hypertenze u iTGR potkanů žádný vliv (Vaňourková et al, 2009).



Obr.13 – Systolický krevní tlak a srdeční hypertrofie u iTGR potkanů

Akutní studie renální hemodynamiky využívající krátkodobou 24-hodinovou indukci Ren-2 genu potvrdily zhoršenou autoregulaci renální hemodynamiky spolu se snížením sklonu natriuretické

křivky, což odpovídá Guytonově představě o zhoršeném vylučování sodíku pozorovaném u řady dalších hypertenzních modelů (Erbanová et al, 2009).

Práce vztahující se k problematice:

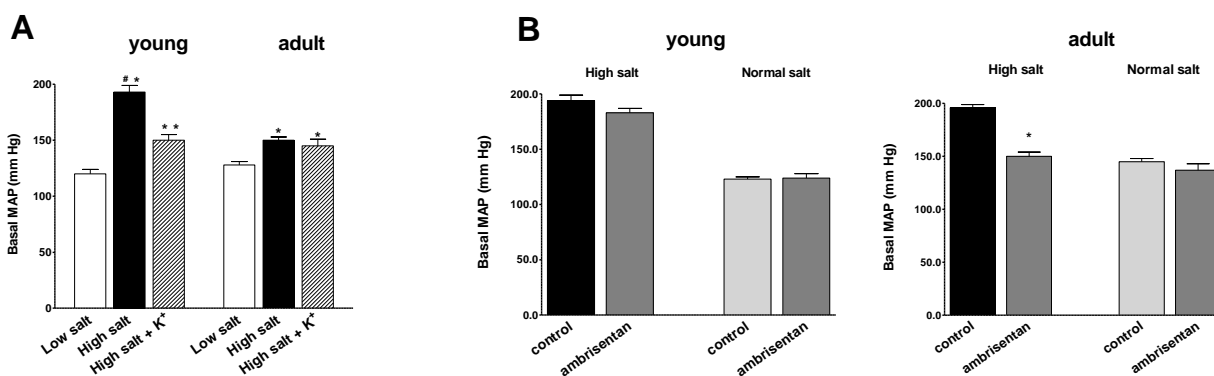
Vaňourková, Z., Kramer, H. J., Husková, Z., Vaněčková, I., Čertíková Chábová, V., Opočenský, M., Tesař, V., Škaroupková, P., Thumová, M., Dohnalová, M., Mullins, J., Červenka, L.: AT1 receptor blockade is superior to conventional triple therapy in protecting against end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Hypertens.* 24(12):2465-72, 2006. citováno 25x

Erbanová M., Thumová M., Husková Z., Vaněčková I., Vaňourková Z., Mullins JJ., Kramer H.J., Bürgelová M., Rakušan D., Červenka L.: Impairment of pressure-natriuresis precedes the development of angiotensin II-dependent malignant hypertension in Cyp1a1-REN-2 transgenic rats, *J Hypertens* 27: 575-86, 2009. citováno 13x

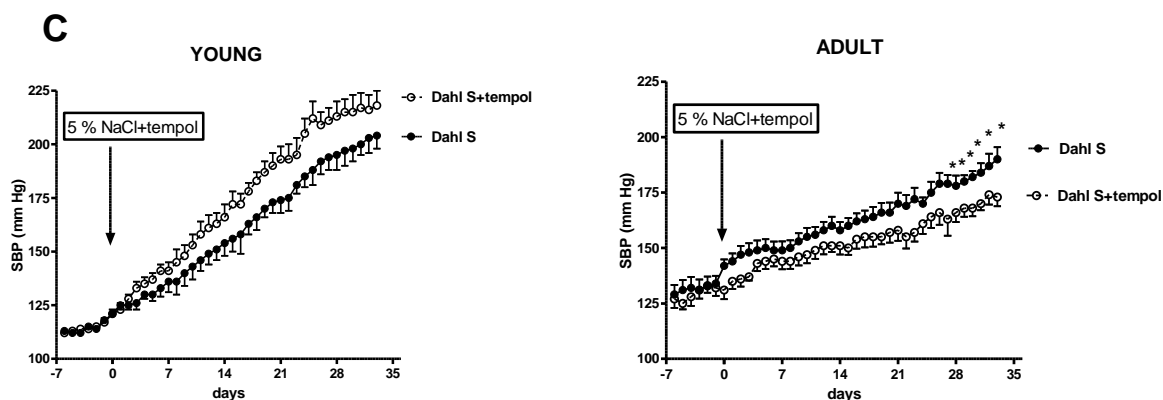
Vaňourková Z., Kramer H.J., Erbanová M., Bäcker A., Červenka L., Husková Z., Čertíková Chábová V., Tesař V., Dvořák P., Malý J., **Vaněčková I.**: Endothelin receptor blockade does not affect blood pressure or angiotensin II levels in Cyp1A1-Ren-2 transgenic rats with acutely induced hypertension, *Vasc Pharmacol* 50:194-199, 2009. citováno 3x

5. Dahlovi potkani

Dahlovi potkani jsou typickým příkladem experimentální hypertenze, jejíž vývoj je závislý na zvýšeném příjmu soli. Sůl-senzitivní jedinci (DS) reagují rozvojem hypertenze, zatímco sůl-rezistentní potkani (DR) ji nevyvinou. Je známo, že rozvoji hypertenze lze zabránit přidáním draslíku do potravy. Z našich pokusů vyplývá, že rozvoji hypertenze lze takto zabránit pouze u mladých DS potkanů (Obr.14A). Snížení krevního tlaku zvýšeným příjmem draslíku je dáno oslabením sympatické vazokonstrikce. U dospělých DS potkanů neměl draslík žádný vliv na krevní tlak ani na vazoaktivní systémy podílející se na jeho regulaci (Zicha et al, 2011). Naproti tomu dospělí DS potkani na vysokoslané dietě byli na rozdíl od mladých jedinců citliví jak na blokádu ET_A receptorů (Obr. 14B)(Zicha et al, 2012) tak na antioxidační terapii (Obr.15) (Vaněčková et al, 2013), přičemž tyto antihypertenzní účinky byly rovněž zprostředkovány oslabením sympatické vazokonstrikce. To naznačuje výraznou věkovou odlišnost Dahlových potkanů v citlivosti jednotlivých vazoaktivních systémů.



Obr.14 - Léčba draslíkem (A) a ambrisentanem (B) u Dahlových sůl-senzitivních potkanů



Obr.15 - Léčba tempolem u Dahlových potkanů

S ohledem na dlouhodobé zaměření oddělení Experimentální hypertenze na tento model hypertenze byla u příležitosti 50. výročí vyšetření tohoto kmene Lewisem K. Dahlem sepsána rozsáhlá review uveřejněná v časopise *Physiological Research*, zahrnující poznatky o ontogenetických aspektech, iontovém transportu, membránových poruchách, inzulinové rezistenci, tělesných tekutinách, hemodynamice, vazoaktivních systémech a úloze intracelulárního vápníku (Zicha et al, 2012).

Práce vztahující se k problematice:

J. Zicha, Z. Dobešová, M. Behuliak, J. Kuneš, I. Vaněčková: Preventive dietary potassium supplementation attenuates development of salt hypertension by decreasing sympathetic vasoconstriction in young salt-sensitive Dahl rats, *Acta Physiol* 202:29-38, 2011. citováno 4x

Zicha J., Dobešová Z., Kuneš J., Vaněčková I.: Chronic endothelin A receptor blockade attenuates contribution of sympathetic nervous system to salt hypertension development in adult but not in young Dahl rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 205:124-132, 2012, citováno 7x

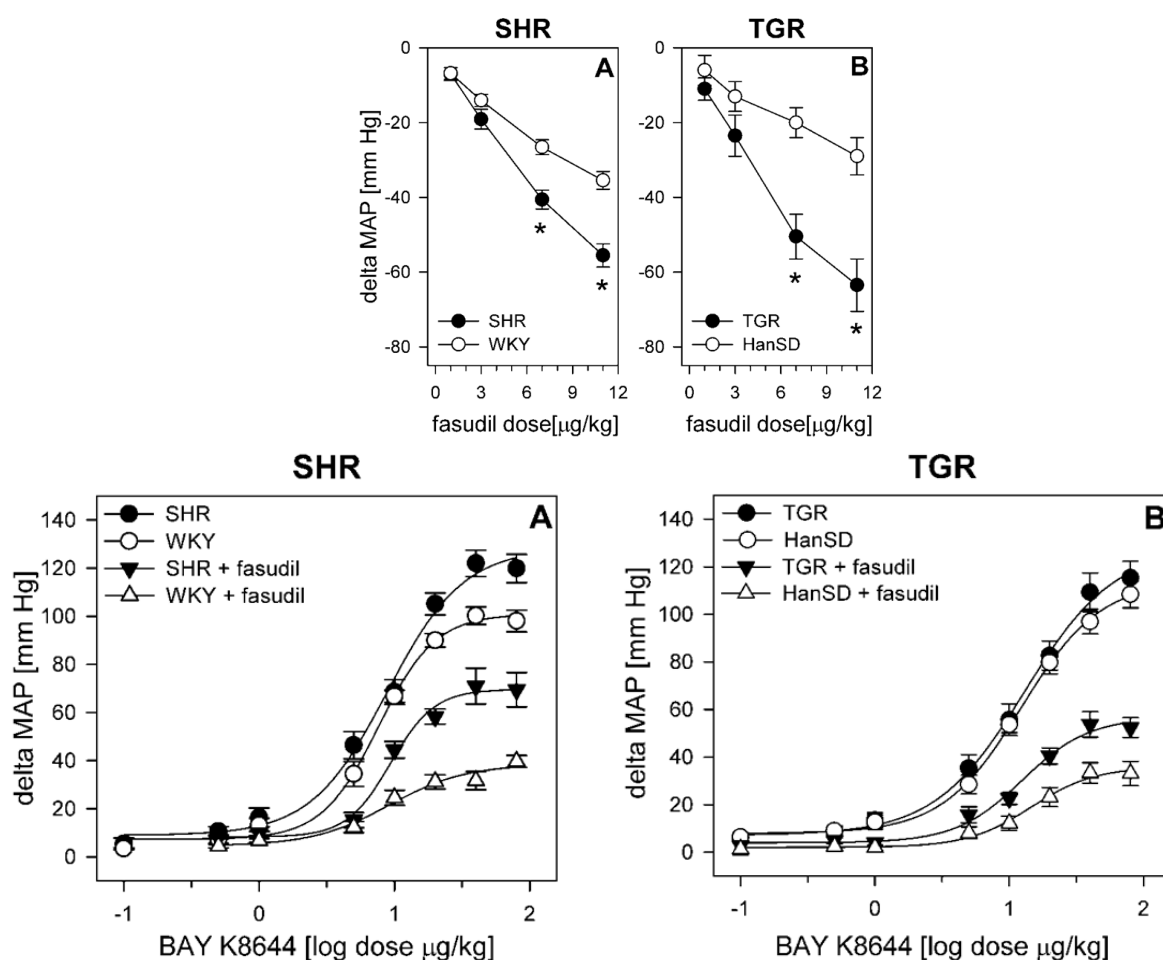
Vaněčková I., Vokurková I., Rauchová H., Dobešová Z., Pecháňová O., Kuneš J., Vorlíček J., Zicha J.: Chronic antioxidant therapy lowers BP in adult but not in young Dahl salt hypertensive rats: the role of sympathetic nervous system, *Acta Physiologica*, 208(4):340-9, 2013. citováno 8x

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* 61(Suppl 1):S35-S87, 2012. citováno 5x - review

6. Úloha vápníkového influxu a vápníkové senzitivace při udržování krevního tlaku u vybraných modelů experimentální hypertenze

Naše pozornost byla zpočátku zaměřena na úlohu vstupu vápníku L-VDCC kanály, které byly blokovány nifedipinem. Jak modely s aktivovaným RAS (TGR potkani a pertusis-toxinem léčení SHR potkani) tak modely se zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému (SHR) reagovaly na podání nifedipinu změnou TK úměrnou výši bazálního krevního tlaku (Zicha et al, 2014). Později jsme se zaměřili na úlohu vápníkové senzitivace a ukázali jsme, že zatímco u normotenzních WKY potkanů převažuje podíl vápníkové senzitivace, u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) je vyšší podíl vápníkového influxu (Behuliak et al, 2013). Mimoto jsme zjistili, že endogenní vazoaktivní systémy modulují vápníkovou senzitivaci; presorické systémy (RAS a SNS) ji posilují, zatímco vazodilatační

systémy (NO) ji oslabují (Zicha et al, 2014). Pozornost jsme věnovali také úloze vápníkového influxu a vápníkové senzitivace a molekulárně-biologické analýze některých komponent této dráhy za vývoje hypertenze u SHR potkanů [tato práce je nyní v recenzním řízení v Journal of Hypertension (Behuliak, submitted to J Hypertens) a srovnání úlohy těchto drah podílejících se na vazokonstrikci u vybraných modelů experimentální hypertenze (Behuliak, submitted to Am J Hypertens). Z našich výsledků vyplývá, že u obou kmenů je výrazně nižší podíl vápníkové senzitivace na udržování krevního tlaku u intaktních normotenzních zvířat (WKY, HanSD) (Obr.16 A, B). Naproti tomu u zvířat, kterým byly zablokovány hlavní vazokonstrikční systémy (RAS a SNS) je bazální Ca senzitivace snižená u hypertenzních potkanů (SHR, TGR) (Obr.16 C, D). Z uvedeného tedy vyplývá, že je vápníková senzitivace významným způsobem ovlivňována jednotlivými vazoaktivními systémy.



Obr.16 – Tlaková odpověď na podání fasudilu (inhibitor Rho kinázy) u intaktních SHR a TGR potkanů (A, B) a u potkanů se zablokovanými presorickými systémy (SNS a RAS) (C, D)

Práce vztahující se k problematice:

Behuliak M., Pintérová M., Bencze M., Petrová M., Líšková 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, 31:2025-2035, 2013. citováno 2x

Zicha J., Dobešová Z., Behuliak M., Pintérová M., Kuneš J., Vaněčková I.: Nifedipine-sensitive blood pressure component in hypertensive models characterized by high activity of either sympathetic nervous system or renin-angiotensin system, *Phys Res*, 63:13-26, 2014. citováno 1x

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, *PhysRes* 63 (S1):S19-S27, 2014. citováno 1x – review

Behuliak M., Bencze M., Polgárová K., Loučková A., Kuneš J., Vaněčková I., Zicha J.: Ontogenetic changes in the contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rat, submitted to *J Hypertension*

Behuliak M., Bencze M., Vaněčková I., Kuneš J., Zicha J.: Basal and activated calcium sensitization in three different forms of experimental Hypertension, submitted to *Am J Hypertension*

Závěr

Naše výsledky, předkládané v této práci, objasnily řadu otázek týkajících se jak působení jednotlivých vazoaktivních systémů při vzniku, rozvoji či udržování hypertenze a jejich vlivu na orgánové poškození, tak věku, ve kterém jsou intervence do těchto systémů prováděné.

Nejdůležitější výsledky lze shrnout následovně:

- změna exkretorické schopnosti ledvin přispívá k rozvoji hypertenze a u některých experimentálních modelů jí dokonce předchází
- AT_1 receptory mají zásadní úlohu při vzniku a rozvoji renovaskulární (dvouledvinové jednosvorkové) hypertenze, oponují jim receptory Ang-(1-7), zatímco receptory AT_2 nemají významnou úlohu; B_2 receptory mají roli až v udržovací fázi tohoto typu hypertenze
- u potkanů s angiotenzin II-dependentní hypertenzí (Ren-2 transgenní potkan; TGR) je úloha oxidu dusnatého závislá na věku zvířat: u prehypertenzních TGR potkanů je výrazně snížena oproti normotenzním kontrolám (HanSD), u kterých tato vazodilatační složka výrazně převažuje nad úlohou vazokonstrikčních systémů
- renin-angiotenzinový systém (RAS) hraje zásadní úlohu v regulaci krevního tlaku u TGR potkanů, přičemž jeho úloha je významnější u homozygotních než u heterozygotních potkanů
- blokáda AT_1 receptorů pro angiotenzin II pomocí candesartanu byla účinná pouze při dlouhodobém podávání, pozdní účinky časně léčby nebyly zaznamenány
- blokáda RAS na jeho počátečním stupni – konverzi angiotenzinogenu na angiotenzin I pomocí přímého reninového inhibitoru aliskirenu měla u TGR potkanů kromě antihypertenzních účinků i účinky nefro- a kardioprotektivní; antihypertenzní a nefroprotektivní účinky na rozdíl od blokády ARB losartanem přetrvávaly téměř 14 dní po vysazení léčby
- léčba mladých heterozygotních TGR zvířat pomocí antisense proti AT_1 receptoru snížila krevní tlak a to poklesem sympatické vazokonstrikce, u dospělých byla daná oslabením angiotenzin-dependentní vazokonstrikce
- u TGR potkanů je léčba selektivními ET_A receptorovými antagonisty lepší než neselektivní ET_A/ET_B receptorová blokáda - má výrazný vliv jak na snížení renálního, tak kardiálního poškození, částečně je schopná i snížit krevní tlak

- účinek léčby atrasentanem, selektivním ET_A antagonistou, je dán sníženým influxem vápníku napětově řízenými vápníkovými kanály v důsledku oslabené angiotenzin II-dependentní vazokonstrikce a chybějící ET_A-dependentní vazokonstrikce
 - metabolity kyseliny arachidonové vznikající cyklooxygenázovou cestou nehrají úlohu v rozvoji hypertenze u TGR potkanů
 - naproti tomu metabolity kyseliny arachidonové vznikající cestou cytochromu P450 – kyseliny EETs a HETEs mají u TGR potkanů významné antihypertenzní a organoprotektivní účinky
 - u TGR potkanů s chronickým ledvinným selháním (CHLS) navozeným 5/6 nefrektomií jsme zjistili, že léčba zasahující RAS je výrazně lepší než léčba na RAS nezávislá (kombinace β-adrenergního antagonisty labetalolu a diuretik furosemidu a hydrochlorothiazidu)
 - přidáním ET_A receptorové blokády k blokádě RAS bylo u TGR potkanů s CHLS zvýšeno přežívání a snížena proteinurie, ale pouze v dlouhodobém pokusu (10 měsíců), u potkanů léčených poloviční dobu (5 měsíců) jsme žádné zlepšení nezaznamenali
 - u potkanů s indukovatelnou hypertenzí byla terapie pomocí RAS mnohem účinnější než tzv. triple terapie sestávající z hydralazinu, hydrochlorothiazidu a reserpinu
 - suplementace Dahl sůl-senzitivních (DS) potkanů draslíkem měla antihypertenzní účinky, ale pouze v případě že byla zahájena v mládí
 - naproti tomu dospělí DS potkani byli citliví jak na léčbu ET_A receptorovým antagonistou ambrisentanem tak i na antioxidační terapii pomocí tempolu, přičemž antihypertenzní účinky obou terapií byly dány oslabením sympatické vazokonstrikce
 - námi zkoumané modely experimentální hypertenze reagovaly na podání nifedipinu (blokátor napětově řízených vápníkových kanálů – L-VDCC) změnou krevního tlaku úměrnou výši bazálního krevního tlaku
 - vápníkový influx je u hypertenzních potkanů (SHR, TGR) zvýšený, zatímco u kontrolních normotenzních potkanů (WKY, HanSD) je vyšší podíl vápníkové senzitivizace; mimoto obě dráhy jsou výrazně modulovány vazoaktivními systémy (oxidem dusnatým arenin-angiotenzinovým systémem)
- Přestože se jedná především o výsledky základního výzkumu, některé z nich mohou přispět k lepšímu pochopení patofyziologických procesů, které se podílejí na vzniku a rozvoji lidské hypertenze a souvisejícího orgánového poškození. Z těchto bych ráda upozornila na renoprotektivní působení aliskirenu, přímého reninového inhibitoru, či ET_A receptorového antagonisty atrasentanu.

Summary

Our studies presented in this thesis aimed at solving the questions related to the influence of distinct vasoactive systems on hypertension onset, development and maintenance, and also on the impact of these factors on organ damage and to the age at which the interventions to these systems are applied. The main results could be summarized as followed:

- the changes in the excretory ability of kidney contribute to hypertension development and in some experimental models they even precede hypertension
- AT_1 receptors play a major role in the onset and development of renovascular (two kidney, one clip) hypertension and are opposed by ANG-(1-7) receptors, while AT_2 receptors play no substantial role in this process; on the other hand, B_2 receptors are important only in the maintenance phase of hypertension
- in a model of angiotensin II-dependent hypertension – Ren-2 transgenic rats (TGR) we have found that the role of nitric oxide is dependent on the age of animals, being substantially attenuated in prehypertensive TGR in comparison with control HanSD rats; in young HanSD the nitric oxide-dependent vasodilation is significantly enhanced compared to the vasoconstrictor effects of renin-angiotensin and sympathetic nervous systems
- RAS system plays an essential role in blood pressure regulation of TGR, being even more important in homozygous than in heterozygous TGR
- the blockade of RAS with angiotensin AT_1 receptor blocker (ARB) candesartan was effective only when given over the long period; late effects of early therapy on BP were not demonstrated
- RAS blockade at the first step – the conversion of angiotensinogen to angiotensin I blocked with direct renin inhibitor aliskiren – had apart from antihypertensive effects also substantial nephro- and cardioprotective effects, which in contrast with the treatment with ARB losartan persisted for almost two weeks after the withdrawal of the therapy
- antisense therapy directed against AT_1 receptor decreased BP in young heterozygous TGR due to the attenuation of sympathetic vasoconstriction, while in adult rats, it was due to the diminished angiotensin-dependent vasoconstriction
- in TGR the treatment with selective ET_A receptor antagonists is superior over non-selective ET_A/ET_B antagonists and had substantial effects on amelioration of renal and cardiac damage;

its antihypertensive effect is due to the reduced calcium influx through voltage-dependent calcium channels (L-VDCC)

- metabolites of arachidonic acid produced by cyclooxygenase pathway do not have a role in hypertension development in TGR
- in contrast, metabolites of arachidonic acid produced by cytochrome P450 (EETs and HETs) have significant antihypertensive and organoprotective effects in TGR
- TGR rats with chronic kidney disease (CKD) induced by 5/6 nephrectomy were more sensitive to RAS-dependent than to RAS-independent therapy (β -adrenergic antagonist labetalol and diuretics furosemide and hydrochlorothiazide)
- in addition, the addition of ET_A receptor blockade to RAS therapy was successful in increasing survival due to the diminished proteinuria, however only if the therapy was given over a long period of time (10 months), while 5-month treatment did not show any positive effects
- RAS therapy was also more effective in comparison with „triple“ therapy (composed of hydralazine, hydrochlorothiazide and reserpine) in inducible TGR rats
- potassium supplementation in Dahl salt-sensitive (DS) rats had antihypertensive effects only in young animals; in contrast, adult DS rats were sensitive to ET_A receptor blockade and to antioxidant therapy with tempol, the antihypertensive effect of both treatments being due to the attenuated sympathetic vasoconstriction
- in various experimental hypertensive models, the blockade of voltage-dependent calcium channels (L-VDCC) induced BP decrease proportional to basal blood pressure
- while calcium influx was increased in hypertensive models (SHR, TGR), normotensive rats (WKY, HanSD) had increased calcium sensitization; calcium sensitization being substantially modulated by vasoactive systems (nitric oxide and renin-angiotensin system)

Although the main part of the experimental data is of basic research, some of them could contribute to the better understanding of pathophysiological processes connected with human hypertension and accompanying organ damage. In this context, I would like to stress the nephroprotective effects of aliskiren (direct renin inhibitor), and atrasentan (endothelin A receptor blocker).

Seznam předkládaných prací autora

Vaněčková, I., Heller, J., Thureau, K.: Possible contribution of impaired sodium excretion to the development and maintenance of hypertension: a study of the isolated kidneys of the Prague hypertensive rat. *Pflugers Arch.* 1997;434(5):587-91., **IF-1,453**

Vaněčková, I., Jelínek, J., Kuneš, J.: Function of the isolated perfused kidneys from young or adult rats with post-DOCA-salt hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1999 May;21(4):407-21. **IF-1,456**

Vaněčková, I., Kramer, H. J., Malý, J., Bäcker, A., Bokemeyer, B., Červenka, L.: Lack of a role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the renal function in rats fed a low-sodium diet. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(4):224-31. **IF-1,596**

Červenka, L., Horáček, V., Vaněčková, I., Hubáček, J., Oliverio, M.I., Coffmann T. M., Navar G.: Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension.* 2002 Nov;40(5):735-41. **IF-6,873**

Vaněčková, I.: Function of the isolated perfused kidney in young and adult spontaneously hypertensive and Dahl salt-sensitive rats. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(5):315-21. **IF-1,596**

Červenka, L., Kramer, H. J., Herbert, Malý, J., Vaněčková, I., Bäcker, A., Bokemeyer, B., Bader, M., Ganten, D., Mitchell, K. D.: Role of nNOS in regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res.* 2002;51(6):571-80. **IF-1,531**

Červenka, L., Vaněčková, I., Malý, J., Horáček, V., Eidahr S. S.: Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT2 receptor. *J Hypertens.* 2003 Aug;21(8):1531-8. **IF-3,806**

Vaněčková, I., Cahová, M., Kramer, H. J., Husková, Z., Škaroupková, P., Komers, R., Bader, M., Ganten, D., Červenka, L.: Acute effects of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in heterozygous Ren-2-transgenic rats on normal or low sodium intake. *Kidney Blood Press. Res.*, 2004, 27(4):203-210. **IF-1,596**

Dvořák, P., Kramer, H. J., Bäcker, A., Malý, J., Kopkan, L., Vaněčková, I., Vernerová, Z., Opočenský, M., TESAŘ, Vladimír., Bader, M., Ganten, D., JANDA, Jan, Červenka, L.: Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press. Res.*, 2004, roč. 27, č. 4, s. 248-258. **IF-1,596**

Opočenský, M., Dvořák, P., Malý, J., Kramer, H. J., Bäcker, A., KOPKAN, Libor, Vernerová, Z., Tesař, V., Zima, T., Bader, M., Ganten, D., Janda, J., **Vaněčková, I.:** Chronic endothelin receptor blockade reduces end - organ damage independently of blood pressure effects in salt - loaded heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res*, 2004, 53(6):581-593. **IF-1,531**

Vaněčková, I., Škaroupková, P., Dvořák, P., Čertíková Chábová, V., Tesař, V., Bader, M., Ganten, D., Kramer, H. J.: Effects of sodium restriction and cyclooxygenase-2 inhibition on the course of hypertension, proteinuria and cardiac hypertrophy in Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res.* 2005;54(1):17-24. **IF-1,531**

Vaněčková, I., Kramer, H. J., Novotná, J., Kazdová L., Opočenský, M., Bader, M., Ganten, D., Červenka, L.: Roles of nitric oxide and oxidative stress in the regulation of blood pressure and renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res.* 2005;28(2):117-26. **IF-1,596**

Vaněčková, I., Kramer, H. J., Bäcker, A., Vernerová, Z., Opočenský, M., Červenka, L.: Early endothelin-A receptor blockade decreases blood pressure and ameliorates end-organ damage in homozygous Ren-2 rats. *Hypertension.* 2005 Oct;46(4):969-74. **IF-6,873**

Vaněčková, I., Kramer, H. J., Bäcker, A., Schejbalová S., Vernerová, Z., Eis, V., Opočenský, M., Dvořák Pavel, Červenka, L.: Early-Onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 rats, *Vascular Pharmacol* 45:163-171, 2006. **IF-2,174**

Opočenský, M., Kramer, H. J., Bäcker, A., Vernerová, Z., Eis, V., Čertíková Chábová, V., Tesař V., **Vaněčková, I.:** Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension, *Hypertension* 48:965-971, 2006. **IF-6,873**

Vaňourková, Z., Kramer, H. J., Husková, Z., Vaněčková, I., Čertíková Chábová, V., Opočenský, M., Tesař, V., Škaroupková, P., Thumová, M., Dohnalová, M., Mullins, J., Červenka, L.: AT1 receptor blockade is superior to conventional triple therapy in protecting against end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Hypertens.* 24(12):2465-72, 2006. **IF-3,806**

Vaněčková, I., Kopkan, L., Husková, Z., Vaňourková, Z., Schejbalová, S., Červenka, L., Kramer H.J.: Long-Term Prevention of Hypertension and End-Organ Damage in Ren-2 Transgenic Rats Is Achieved Only with Persistent but Not Transient AT(1) Receptor Blockade. *Kidney Blood Press Res.* 30:38-44, 2007. **IF-1,596**

Vaněčková I., Kopkan L., Husková Z., Vaňourková Y., Schejbalová S., Červenka L., Kramer H.J.: AT1 receptor antisense therapy transiently lowers blood pressure in Ren-2 transgenic rats, *Vascular Pharmacology* 47:63-67, 2007. **IF-2,174**

Chabova VC, Kramer HJ, Vaneckova I, Vernerova Z, Eis V, Tesar V, Skaroupkova P, Thumova M, Schejbalova S, Huskova Z, Vanourkova Z, Kolsky A, Imig JD, Cervenka L.: Effects of chronic cytochrome P-450 inhibition on the course of hypertension and end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol.* 47(2-3):145-159, 2007. **IF-2,174**

Čertíková Chábová V., Kramer Herbert J., Vaněčková I., Thumová M., Škaroupková P., Tesař V., Falck J.R., Imig J.D., Červenka L.: The roles of Intrarenal 20-Hydroxyeicosatetraenoic and Epoxyeicosatrienoic acids in the regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats, *Kidney Blood Pressure Res* 30:335-346, 2007. **IF-1,596**

Vernerová Z, Kramer HJ, Bäcker A, Červenka L, Opočenský M, Husková Z, Vaňourková Z, Eis V, Chábová VC, Tesař V, Malý J, **Vaněčková I.**: Late-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous REN-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol.* 48:165-173, 2008. **IF-2,174**

Červenka L, Vaněčková I, Husková Z, Vaňourková Z, Erbanová M, Thumová M, Skaroupková P, Opočenský M, Malý J, Chábová VC, Tesař V, Bürgelová M, Viklický O, Teplan V, Zelízko M, Kramer HJ, Navar LG.: Pivotal role of angiotensin II receptor subtype 1A in the development of two-kidney, one-clip hypertension: study in angiotensin II receptor subtype 1A knockout mice. *J Hypertens.* 26(7):1379-1389, 2008. **IF-3,806**

Erbanová M., Thumová M., Husková Z., Vaněčková I., Vaňourková Z., Mullins J.J., Kramer H.J., Bürgelová M., Rakušan D., Červenka L.: Impairment of pressure-natriuresis precedes the development of angiotensin II-dependent malignant hypertension in Cyp1a1-REN-2 transgenic rats, *J Hypertens* 27: 575-86, 2009. **IF-3,806**

Vaňourková Z., Kramer H.J., Erbanová M., Bäcker A., Červenka L., Husková Z., Čertíková Chábová V., Tesař V., Dvořák P., Malý J., **Vaněčková I.**: Endothelin receptor blockade does not affect blood pressure or angiotensin II levels in Cyp1A1-Ren-2 transgenic rats with acutely induced hypertension, *Vasc Pharmacol* 50:194-199, 2009. **IF-2,174**

Vernerová Z., Kujal P., Kramer H.J., Bäcker A., Červenka L., **Vaněčková I.**: End-organ damage in hypertensive transgenic Ren-2 rats: influence of early and late endothelin receptor blockade, *Physiol Res*, 58:S69-78, 2009. **IF-1,531 review**

Vaňourková Z, Kramer HJ, Husková Z, Červenka L, **Vaněčková I.**: Despite similar reduction of blood pressure and renal ANG II and ET-1 levels aliskiren but not losartan normalizes albuminuria in hypertensive Ren-2 rats, *Physiol Res*, 2010, 59(3):339-345. **IF-1,531**

Čertíková Chábová V, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kujal P, Vernerová Z, Vaňourková Z, Kopkan L, Kramer HJ, Falck JR, Imig JD, Hammock BD, Vaněčková I, Červenka L.: Combined inhibition of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation and of epoxyeicosatrienoic acids degradation attenuates hypertension and hypertension-induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats, *Clin Sci (Lond)*. 2010, 118(10):617-32. **IF-4,859**

Rakušan D., Kujal P., Kramer H. J., Husková Z., Vaňourková Z., Vernerová Z., Mrázová I., Thumová M., Červenka L., **Vaněčková I.**: Persistent antihypertensive effect of aliskiren is accompanied by reduced proteinuria and normalization of glomerular area in Ren-2 transgenic rats,

Am J Physiol, 2010, F-758-F766. **IF-3,612**

Kujal P, Chábová VC, Vernerová Z, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Vaňourková Z, Husková Z, Opočenský M, Skaroupková P, Schejbalová S, Kramer HJ, Rakušan D, Malý J, Netuka I, Vaněčková I, Kopkan L, Cervenka L.: Similar renoprotection after renin-angiotensin-dependent and -independent antihypertensive therapy in 5/6-nephrectomized Ren-2 transgenic rats: are there blood pressure-independent effects, Clin Exp Pharmacol Physiol. 37:1159-1169, 2010. **IF-1,96**

Rakušan D, Bürgelová M, Vaněčková I, Vaňourková Z, Husková Z, Skaroupková P, Mrázová I, Opočenský M, Kramer HJ, Netuka I, Malý J, Alenina N, Bader M, Santos RA, Cervenka L.: Knockout of Angiotensin 1-7 Receptor Mas Worsens the Course of Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension: Roles of Nitric Oxide Deficiency and Enhanced Vascular Responsiveness to Angiotensin II. Kidney Blood Press Res. 33(6):476-488, 2010. **IF-1,596**

J. Zicha, Z. Dobešová, M. Behuliak, J. Kuneš, I. Vaněčková: Preventive dietary potassium supplementation attenuates development of salt hypertension by decreasing sympathetic vasoconstriction in young salt-sensitive Dahl rats, Acta Physiol 202:29-38, 2011. **IF-3,13**

Zicha J, Dobešová Z, Kuneš J, Vaněčková I.: Chronic endothelin A receptor blockade attenuates contribution of sympathetic nervous system to salt hypertension development in adult but not in young Dahl rats. Acta Physiol (Oxf) 205:124-132, 2012. **IF-3,13**

Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš J., Zicha J.: The effects of repeated delivery of angiotensin II At1 receptor antisense on distinct vasoactive systems in Ren-2 transgenic rats: young vs. adult animals, Hypertension Res 35:761-768, 2012. **IF-2,936**

Vaněčková I., Kujal P., Husková Z., Vaňourková Z., Vernerová Z., Čertíková Chábová V., Škaroupková P., Kramer HJ., Tesař V., Červenka L., Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats, Kidney Blood Press Res, 35:382-392, 2012. **IF-1,596**

Vaněčková I., Vokurková I., Rauchová H., Dobešová Z., Pecháňová O., Kuneš J., Vorlíček J., Zicha J.: Chronic antioxidant therapy lowers BP in adult but not in young Dahl salt hypertensive rats: the role of sympathetic nervous system, Acta Physiologica, 208(4):340-9, 2013. **IF-3,13**

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 61(Suppl 1):S35-S87, 2012. **IF-1,531 - review**

Behuliak M., Pintérová M., Bencze M., Petrová M., Líšková 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, 31:2025-2035, 2013. **IF-3,806**

Věra Čertíková Chábová, Zdenka Vernerová, Petr Kujal, Zuzana Husková, Petra Škaroupková, Vladimír Tesař, Herbert J Kramer, Elzbieta Kompanowska-Jeziarska, Agnieszka Walkowska, Janusz Sadowski, Luděk Červenka, **Vaněčková I.**: Addition of ET_A receptor blockade increases renoprotection provided by renin-angiotensin system blockade in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic rats, Life Sciences, 2014, 118:297-305. **IF-2,296**

Zicha J., Dobešová Z., Behuliak M., Pintérová M., Kuneš J., Vaněčková I.: Nifedipine-sensitive blood pressure component in hypertensive models characterized by high activity of either sympathetic nervous system or renin-angiotensin system, Phys Res, 63:13-26, 2014. **IF-1,531**

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, PhysRes 63 (S1):S19-S27, 2014 **IF-1,531 - review**

Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš., 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 Hypertension, 33(1):161-169, 2015. **IF-3,806**

Seznam použité literatury (mimo prací autora)

- (1) KAGAN A, DAWBER TR, KANNEL WB, REVOTSKIE N. The Framingham study: a prospective study of coronary heart disease. *Fed Proc* 1962; 21(4)Pt 2:52-57.
- (2) Padmanabhan S, Caulfield M, Dominiczak AF. Genetic and molecular aspects of hypertension. *Circ Res* 2015; 116(6):937-959.
- (3) Poulter NR, Prabhakaran D, Caulfield M. Hypertension. *Lancet* 2015.
- (4) Leow MK. Environmental origins of hypertension: phylogeny, ontogeny and epigenetics. *Hypertens Res* 2015.
- (5) Crowley SD, Coffman TM. In hypertension, the kidney rules. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9(2):148-153.
- (6) Hirooka Y, Kishi T, Ito K, Sunagawa K. Potential clinical application of recently discovered brain mechanisms involved in hypertension. *Hypertension* 2013; 62(6):995-1002.
- (7) Gabor A, Leenen FH. Central neuromodulatory pathways regulating sympathetic activity in hypertension. *J Appl Physiol* (1985) 2012; 113(8):1294-1303.
- (8) Nishi EE, Bergamaschi CT, Campos RR. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. *Exp Physiol* 2014.
- (9) Dahl LK, Heine M, Thompson K. Genetic influence of renal homografts on the blood pressure of rats from different strains. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140(3):852-856.
- (10) Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Giovanetti AM, Pagetti D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47(5):435-448.
- (11) Rettig R, Unger T. The role of the kidney in the aetiology of hypertension: renal transplantation studies in rats. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12(7):243-245.
- (12) Sander S, Rettig R, Ehrig B. Role of the native kidney in experimental post-transplantation hypertension. *Pflugers Arch* 1996; 431(6):971-976.
- (13) Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kashgarian M, Whelchel JD, Jones P, Diethelm AG. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983; 309(17):1009-1015.
- (14) Guyton AC. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol* 1990; 259(5 Pt 2):R865-R877.
- (15) Guyton AC. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta Physiol Scand Suppl* 1990; 591:107-113.
- (16) Hirooka Y, Kishi T, Sakai K, Takeshita A, Sunagawa K. Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300(4):R818-R826.
- (17) Hamlyn JM, Linde CI, Gao J, Huang BS, Golovina VA, Blaustein MP, Leenen FH. Neuroendocrine humoral and vascular components in the pressor pathway for brain angiotensin II: a new axis in long term blood pressure control. *PLoS One* 2014; 9(9):e108916.

- (18) Fujita M, Fujita T. The role of CNS in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2013; 15(4):390-394.
- (19) Leenen FH, Yuan B. Prevention of hypertension by irbesartan in Dahl S rats relates to central angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension* 2001; 37(3):981-984.
- (20) Azizi M. Renin inhibition. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15(5):505-510.
- (21) Viazzi F, Leoncini G, Pontremoli R. Antihypertensive treatment and renal protection: the role of drugs inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone system. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2013; 20(4):273-282.
- (22) Mercier K, Smith H, Biederman J. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibition: overview of the therapeutic use of angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, mineralocorticoid receptor antagonists, and direct renin inhibitors. *Prim Care* 2014; 41(4):765-778.
- (23) Santos RAS, Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(14):8258-8263.
- (24) Van Twist DJ, Kroon AA, De Leeuw PW. Angiotensin-(1-7) as a strategy in the treatment of hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; 23(5):480-486.
- (25) Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(12):1877-1883.
- (26) Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2014; 86(5):896-904.
- (27) Barton M. Aging and endothelin: determinants of disease. *Life Sci* 2014; 118(2):97-109.
- (28) Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):131-185.
- (29) Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* 2004; 43(3):525-530.
- (30) Fan F, Muroya Y, Roman RJ. Cytochrome P450 eicosanoids in hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015; 24(1):37-46.
- (31) Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(10):794-805.
- (32) Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acids, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, and renal microvascular function. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013; 104-105:2-7.
- (33) Rios A, Vargas-Robles H, Gamez-Mendez AM, Escalante B. Cyclooxygenase-2 and kidney failure. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; 98(3-4):86-90.
- (34) Green T, Gonzalez AA, Mitchell KD, Navar LG. The complex interplay between cyclooxygenase-2 and angiotensin II in regulating kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21(1):7-14.
- (35) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789):373-376.

- (36) Pechanova O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res* 2007; 56 Suppl 2:S7-S16.
- (37) Ramchandra R, Barrett CJ, Malpas SC. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(5-6):440-446.
- (38) Pinterova M, Liskova S, Dobesova Z, Behuliak M, Kunes J, Zicha J. Impaired control of L-type voltage-dependent calcium channels in experimental hypertension. *Physiol Res* 2009; 58 Suppl 2:S43-S54.
- (39) Loirand G, Pacaud P. The role of Rho protein signaling in hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7(11):637-647.
- (40) Ishikawa Y, Nishikimi T, Akimoto K, Ishimura K, Ono H, Matsuoka H. Long-term administration of rho-kinase inhibitor ameliorates renal damage in malignant hypertensive rats. *Hypertension* 2006; 47(6):1075-1083.
- (41) Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 1999; 79(4):1227-1282.
- (42) Zicha J, Dobesova Z, Behuliak M, Kunes J, Vaneckova I. Preventive dietary potassium supplementation in young salt-sensitive Dahl rats attenuates development of salt hypertension by decreasing sympathetic vasoconstriction. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 202(1):29-38.
- (43) Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol* 2009; 38(3):791-813.
- (44) He FJ, Brinsden HC, MacGregor GA. Salt reduction in the United Kingdom: a successful experiment in public health. *J Hum Hypertens* 2014; 28(6):345-352.
- (45) Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344(6266):541-544.
- (46) Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 2001; 276(39):36727-36733.
- (47) Sesoko S, Pegram BL, Willis GW, Frohlich ED. DOCA-salt induced malignant hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1984; 2(1):49-54.
- (48) Kujal P, Vernerova Z. [5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number]. *Cesk Fysiol* 2008; 57(4):104-109.
- (49) Minami N, Imai Y, Hashimoto J, Abe K. Contribution of vascular nitric oxide to basal blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89(2):177-182.
- (50) Lundie MJ, Friberg P, Kline RL, Adams MA. Long-term inhibition of the renin-angiotensin system in genetic hypertension: analysis of the impact on blood pressure and cardiovascular structural changes. *J Hypertens* 1997; 15(4):339-348.