

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Science



Autoreferát disertační práce

**NEURÁLNÍ MECHANISMY PATOGENEZE SPONTÁNNÍ HYPERTENZE U
POTKANA**

Synopsis of the PhD thesis

**NEURAL MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF RAT SPONTANEOUS
HYPERTENSION**

Mgr. Anna Vavřínová

Praha/Prague, 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

Studijní program:	Fyziologie živočichů
Předseda oborové rady:	doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Školicí pracoviště:	Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Autor:	Mgr. Anna Vavřínová
Školitel:	MUDr. Josef Zicha, DrSc.
Školitel konzultant:	Mgr. Michal Behuliak, Ph.D.

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

Doctoral Study Programs in Biomedicine

*Charles University
and Czech Academy of Sciences*

Study program:	Animal Physiology
President of Subject Area Board:	doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Training center:	Institute of Physiology CAS, v. v. i.
Author:	Mgr. Anna Vavřínová
Supervisor:	MUDr. Josef Zicha, DrSc.
Consultant supervisor:	Mgr. Michal Behuliak, Ph.D.

The Thesis is available in respective libraries of the Faculty of Science of the Charles University.

OBSAH / LIST OF CONTENTS

Abstrakt.....	4
Úvod.....	5
Cíle práce	7
Materiál a metodika	8
Výsledky	10
Projekt 1	10
Projekt 2	12
Projekt 3	15
Diskuse.....	18
Shrnutí a Závěry.....	20
Použitá literatura / References	21
Seznam publikací / List of publications	24
Životopis	25
Abstract	26
Introduction.....	27
Aims	29
Material and Methods	30
Results.....	32
Project 1	32
Project 2	
Project 3	37
Discussion	40
Summary and Conclusions.....	42
Curriculum Vitae.....	43

ABSTRAKT

Sympatický nervový systém a dřeň nadledvin se účastní regulace arteriálního krevního tlaku a hrají významnou úlohu v patogenezi hypertenze. Spontánně hypertenzní potkani (SHR), kteří jsou nejvíce používaný model genetické hypertenze, se vyznačují mnoha molekulárními, morfologickými i funkčními změnami sympatického nervového systému a dřene nadledvin. Cílem této disertační práce bylo popsat tyto abnormality u SHR potkanů za různých podmínek. Zaprvé byly zkoumány ontogenetické rozdíly, které mohou přispívat k rozvoji hypertenze. Zadruhé byly studovány účinky chemické sympatektomie (indukované guanetidinem podávaným v dospělosti) na kardiovaskulární parametry a zapojení kompenzačních mechanismů, které působí proti snížení krevního tlaku. Zatřetí jsme u dospělých SHR popsali stresovou kardiovaskulární odpověď a stresem indukované změny v sympatickém nervovém systému a dřeni nadledvin. Moje dizertační práce přinesla několik důležitých nálezů. Zvýšený obsah katecholaminů v nadledvině a vyšší hustota sympatické inervace cév pozorované u prehypertenzních SHR v porovnání se stejně starými normotenzními WKY potkany mohou přispívat k patogenezi hypertenze. Snížená mRNA exprese genů zapojených do biosyntézy katecholaminů (*Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) je pravděpodobně kompenzační mechanismus působící proti zvýšené aktivitě sympatického nervového systému. Útlum biosyntézy katecholaminů se u SHR rozvíjí souběžně s rozvojem hypertenze. Důsledkem je snížení obsahu katecholaminů v nadledvině, ale ne v sympatické inervaci cév dospělých SHR. Výraznější úloha sympatického nervového systému při udržování krevního tlaku byla prokázána u dospělých SHR v porovnání s WKY potkany. Nicméně chronická sympatektomie guanetidinem není efektivní metodou pro dlouhodobé snížení krevního tlaku u dospělých SHR s rozvinutou hypertenzí. Vysvětlením může být zapojení kompenzačních mechanismů u sympatektomovaných zvířat jako jsou zvýšená citlivost odpovědi krevního tlaku na katecholaminy a vyšší plazmatické hladiny adrenalinu. Ve srovnání s WKY potkany měli dospělí SHR výraznější kardiovaskulární odpověď a nadměrnou aktivaci sympatického nervového systému a dřene nadledvin během stresu vyvolaného akutním omezením pohybu (restraint). Stresování SHR potkani navíc vykazovali větší aktivaci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, což může vést k dalšímu zesílení sympaticky řízené periferní vasokonstrikce a tedy i stresem indukované kardiovaskulární odpovědi. V souladu s hyperaktivitou sympatického nervového systému bylo ve dřeni nadledvin stresovaných SHR potkanů pozorováno výraznější zvýšení exprese *Th* genu v porovnání s WKY potkany. Naopak exprese ostatních genů účastnících se biosyntézy katecholaminů (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) byla nižší ve dřeni nadledvin nestresovaných i stresovaných SHR v porovnání s WKY potkany. Tento náleznaznačuje, že regulace zmíněných enzymů se účastní jiné mechanismy. Možnou příčinou může být menší stimulace chromafinních buněk dřene nadledvin angiotensinem II, která je způsobena utlumenou aktivitou reninu v plasmě a sníženou mRNA expresí receptorů pro angiotensin II u SHR potkanů. Závěrem, data v mé disertační práci potvrzují, že sympatický nervový systém přispívá k rozvoji a udržování vysokého krevního tlaku u SHR potkanů. Jeho vliv na kardiovaskulární systém může být potencován nadměrnou aktivací osy hypotalamus-hypofýza-

nadledviny, kterou jsme také pozorovali u tohoto kmene. Protože podobné mechanismy se podílejí na vzniku a udržování vysokého krevního tlaku u lidí, jejich výzkum u SHR mohou přispět k lepšímu porozumění a léčbě lidské esenciální hypertenze. Odolnost dospělých SHR potkanů k léčbě zaměřené na periferní sympatický nervový systém upozorňuje na existenci kompenzačních mechanismů, které působí proti efektivní léčbě vysokého krevního tlaku. Pro efektivní snížení krevního tlaku tedy mohou být lepší volbou léky působící na centrální regulaci kardiovaskulárního systému, např. ACE inhibitory nebo blokátory angiotensinových receptorů.

ÚVOD

Arteriální krevní tlak (TK) je fyziologický parametr, který závisí na srdečním výdeji a celkovém periferním odporu cév. TK je udržován v optimálním rozmezí, které představuje kompromis mezi potřebou zajistit dostatečný průtok krve tkání a snahou minimalizovat riziko poškození srdce a cév. Jelikož lidská esenciální hypertenze je jedním z hlavních rizikových faktorů pro kardiovaskulární komplikace, je zapotřebí lépe porozumět mechanismům zapojených do udržování TK. Sympatický nervový systém, který je jednou částí autonomního nervového systému, se účastní regulace arteriálního TK i regionálního cévního odporu. Tato disertační práce je zaměřená na neurální mechanismy účastníci se rozvoje a udržování vysokého TK u potkanů s genetickou hypertenzí.

Sympatický nervový systém se skládá ze senzoryckých drah přenášejících signály z viscerálních receptorů (např. z arteriálních baroreceptorů), centrální oblasti autonomní kontroly (určující aktivitu sympatického nervového systému) a eferentních drah regulujících různé tkáně jako jsou cévní hladký sval, myokard nebo dřev nadledvin. Aktivita sympatického nervového systému je určována tonickou aktivitou neuronů nacházejících se v prodloužené míše (rostral ventrolateral medulla, RVLM), které integrují informace přicházející z periferních receptorů a také z dalších oblastí mozku (Guyenet, 2006). Tyto pregangliové neurony tvoří cholinergní synapse s postgangliovými neurony nebo chromafinními buňkami dřev nadledvin (sympato-neurální a sympato-adrenální část sympatického nervového systému). Nervová zakončení postgangliových neuronů uvolňují noradrenalin (účinkující přímo na příslušné kardiovaskulární struktury), zatímco dřev nadledvin uvolňuje adrenalin do krevního oběhu (Brock a Cunnanne, 1993; Flatmark, 2000).

Biosyntéza katecholaminů začíná importem aminokyseliny L-tyrosinu a jeho hydroxylací enzymem tyrosinhydroxylázou (TH, kódovaná *Th* genem; Nagatsu *et al*, 1964). Druhý enzym L-DOPAdekarboxyláza (DDC, kódovaná *Ddc* genem) přeměňuje L-DOPU na dopamin. Následně dopamin- β -hydroxyláza (DBH, kódovaná *Dbh* genem) přemění dopamin na noradrenalin (Flatmark, 2000). Enzym fenylethanolamin-N-metyltransferáza (PNMT, kódovaná *Pnmt* genem), která se nachází hlavně ve dřev nadledvin, syntetizuje z noradrenalinu adrenalin (Wong *et al.*, 1987). Dostupnost katecholaminů v cílové tkáni je ovlivňována nejen rychlostí jejich syntézy ale také změnami jejich skladování, uvolňování, zpětného vstřebávání a degradace (Eisenhofer *et al.*, 2004).

Sympatická vasomotorická aktivita je regulována krátkodobě (tj. v řádu sekund až minut) i dlouhodobě (tj. v rámci hodin až dní). Hlavním krátkodobým mechanismem regulujícím arteriální TK pomocí sympatické vasomotorické aktivity je baroreceptorový reflex. Stručně, vzestup TK vede ke zvýšení množství vzruchů generovaných arteriálními baroreceptory, signály cestují do centrálního nervového systému a přiměřená odpověď autonomního nervového systému je rychle zahájena. Inhibice sympatické nervové aktivity a současná aktivace parasympatického systému vedou ke snížení arteriolárního odporu, poklesu srdečního výdeje (opak se děje v případě sníženého TK) a následně dojde k normalizaci TK. Přesná úloha centrálního nervového systému v dlouhodobé regulaci TK není zatím dobře známá, ale u různých hypertenzních modelů byla popsána zvýšená tonická aktivita mozkových center účastnících se regulace kardiovaskulárního systému a snížení nervové aktivity v těchto oblastech vedlo ke snížení periferní sympatické aktivity a TK (Geraldes *et al.*, 2014; Matsuura *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2002).

Aktivace sympato-neurálního a sympato-adrenálního systému spouští stresovou odpověď kardiovaskulárního systému, která je charakterizovaná zvýšením TK a srdeční frekvence (Dos Reis *et al.*, 2014). Další součástí stresového systému je osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), která produkuje glukokortikoidní hormony (kortikosteron u potkanů, kortizol u lidí). Glukokortikoidy potencují mnohé účinky sympatického nervového systému, včetně periferní vazokonstrikce (Ulrich-Lai a Herman, 2009). Aktivace HPA osy a autonomního nervového systému je vysoce koordinovaná a jejich regulace je vzájemně propojená. Glukokortikoidy i katecholaminy mají krátkodobě prospěšné účinky, ale dlouhodobě jejich vliv může být nepříznivý. Chronický stres nebo nepřiměřená reakce stresového systému se mohou účastnit patogeneze kardiovaskulárních onemocnění (McEwen, 1998).

Spontánně hypertenzní potkani (SHR) jsou nejčastěji používaným modelem genetické hypertenze. SHR vyvíjejí hypertenzi spontánně ve věku 5-12 týdnů a jejich střední arteriální tlak v dospělosti dosahuje 160 - 180 mm Hg. (na rozdíl od 120 mm Hg u dospělých WKY potkanů) (Behuliak *et al.*, 2015; Judy a Farrell, 1979). Sympatický nervový systém je zapojen do patogeneze hypertenze, protože sympatická nervová aktivita vzrůstá ve stejném období, kdy dochází k rozvoji vysokého krevního tlaku (Judy a Farrell, 1979). U SHR byly popsány mnohé molekulární, morfologické a funkční změny na různých úrovních sympato-neurálního a sympato-adrenálního systému, včetně zvýšené aktivity mozkových center regulujících sympatickou nervovou aktivitu (Matsuura *et al.*, 2002), efektivnějšího přenosu vzruchu přes sympatická ganglia (Magee a Schofield, 1992), hustší sympatické inervace cév (Mangiarua a Lee, 1990), zvýšeného výlevu katecholaminů ze dřeně nadledvin (Lim *et al.*, 2002), atd. Rozvoj hypertenze u SHR může být oslaben neonatální sympatektomií (destrukcí periferního sympatického nervového systému, např. podáváním guanetidinu), ale mírné zvýšení TK u sympatektomovaných SHR přetrvává (Lee *et al.*, 1987). Toto reziduální zvýšení TK může být zrušeno kombinací sympatektomie s odstraněním dřeně nadledvin (Lee *et al.*, 1991) nebo s bloádou α_1 -adrenergických receptorů (Korner *et al.*, 1993). Na druhou stranu,

sympatektomie provedená u dospělých SHR je výrazně méně efektivní při snižování TK (Ferrari *et al.*, 1991). Je možné, že cévní tonus může být u dospělých zvířat s porušenou sympatickou inervací cév udržován pomocí různých kompenzačních mechanismů. Studium mladých prehypertenzních SHR nám umožňuje odhalit abnormality předcházející rozvoji hypertenze, zatímco studium dospělých SHR potkanů nabízí lepší model pro léčbu lidské esenciální hypertenze.

CÍLE PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo studovat úlohu sympato-adrenálního a sympato-neurálního systému v rozvoji a udržování vysokého krevního tlaku u spontánně hypertenzních potkanů.

Projekt 1 - porovnání abnormalit sympato-adrenálního a sympato-neurálního systému u mladých prehypertenzních a dospělých spontánně hypertenzních potkanů

Cílem projektu bylo popsat ontogenetické rozdíly sympato-adrenálního a sympato-neurálního systému mezi SHR a WKY potkany. Porovnání prehypertenzních a hypertenzních zvířat (4 a 24 týdnů věku) může odhalit některé důležité abnormality účastnící se rozvoje hypertenze u tohoto modelu.

Projekt 2 - účinky sympatektomie na kardiovaskulární systém: porovnání dospělých normotenzních a spontánně hypertenzních potkanů

Cílem tohoto projektu bylo porovnat účinky chemické sympatektomie indukované guanetidinem na kardiovaskulární parametry u dospělých SHR a WKY potkanů. Byla studována kompenzační úloha adrenálních hormonů, renin-angiotenzinového systému a citlivosti krevního tlaku k podávání vazokonstriktorů.

Projekt 3 - porovnání stresem indukovaných kardiovaskulárních a hormonálních odpovědí u dospělých normotenzních a spontánně hypertenzních potkanů

Cílem projektu bylo porovnat kardiovaskulární odpověď vyvolanou akutním omezením pohybu (restraint stress) a studovat stresem indukované změny sympato-adrenálního a sympato-neurálního systému u dospělých normotenzních a hypertenzních potkanů.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentální skupiny a postupy

V Projektu 1 byli pro experimenty použiti 4týdenní (prehypertenzní) a 24týdenní (s rozvinutou hypertenzí) samci SHR a jejich normotenzní WKY kontroly. Potkanům v sérii 1 bylo provedeno přímé měření TK. Potkani v sérii 2 byli použiti pro odběr vzorků plasmy a tkání.

V Projektu 2 byla u dospělých SHR a WKY potkanů provedena chemická sympatektomie intraperitoneálním podáváním guanetidin hemisulfátu (30 mg/kg tělesné váhy) po dobu dvou týdnů. Kontrolním potkanům byl podáván fyziologický roztok. Potkanům v sérii 1 byl měřen TK pomocí radiotelemetrie. Potkanům v sérii 2 byla měřena odpověď TK na podávání katecholaminů nebo gangliového blokátoru pentolinia. Potkanům v sérii 3 byla měřena odpověď TK na podávání angiotenzinu II. Potkani v sérii 4 byli použiti pro odběr vzorků plasmy a tkání.

V Projektu 3 byli pro experimenty použiti dospělí samci SHR a WKY potkanů. Potkanům v sérii 1 byl měřen TK pomocí radiotelemetrie za podmínek volného pohybu nebo za podmínek stresu způsobeného omezením pohybu po dobu 120 min (restraint stress). Potkani v sérii 2 byli použiti pro odběr vzorků plasmy a tkání poté, co byli vystaveni: žádnému stresu (nestresovaní potkani), 10 min stresu, 120 min stresu nebo 120 min stresu následovaných 120 min odpočinku. Potkani v sérii 3 byli použiti pro stanovení plasmatické aktivity reninu.

Radiotelemetrické měření krevního tlaku

Potkanům byly implantovány telemetrické sondy (model HD-S10, Data Sciences International, USA). Po 10 dnech zotavení byl volně se pohybujícím potkanům měřen bazální TK po dobu tří dní a poté byly zahájeny experimenty. Spektrální analýza variability systolického krevního tlaku (SBPV) byla provedena dr. Behuliakem a dr. Bencze pro vyhodnocení nízkofrekvenční komponenty (LF; 0.2 - 0.75 Hz) SBPV, která odpovídá vaskulární sympatické aktivitě (Yoshimoto *et al.*, 2011).

Stres vyvolaný akutním omezením pohybu

Potkani vystavení stresu omezením pohybu byli horizontálně umístěni do průhledného plastového válce (vnitřní průměr 6.5 cm, nastavitelná délka podle velikosti zvířete) vybaveného dýchacími otvory.

Přímé měření krevního tlaku

Potkanům v isofluranové anestezii byly zavedeny katetry do levé karotické tepny (PE-50 pro měření TK) a do jugulární žíly (PE-10 pro podávání látek). Po 24hodinovém odpočinku byla bdělým potkanům (umístěným v malé průhledné kleci) měřena odpověď TK na intravenózní podávání látek za použití systému PowerLab (ADInstruments, Australia).

Histochemická vizualizace monoaminů (SPG metoda)

Femorální arterie byly ponořeny do roztoku kyseliny glyoxalové (1% glyoxalová kyselina, 236 mM KH_2PO_4 a 200 mM sacharóza), připevněny na podložní sklo, usušeny ventilátorem a skla

byla zahřáta na vyhřívané desce (80 °C, 5 min). Poté byl přidán minerální olej a krycí sklíčko a skla byla znovu zahřáta (80 °C, 90 s). Vzorčky byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica LMD6000 s DAPI filtrovou kostkou.

Měření hormonů

Plasmatické hladiny všech hormonů byly měřeny pomocí komerčních kitů: katecholaminy pomocí 3-CAT Research ELISA (LDN, Germany), metanefriny pomocí 2 MET Plasma ELISA Fast Track (LDN), ACTH ELISA (MD Bioproducts, Switzerland), Corticosterone rat/mouse ELISA (LDN), Aldosterone ELISA (LDN). Plasmatická reninová aktivita byla měřena pomocí PRA ELISA (Crystal Chem, USA) založené na stanovení množství angiotenzinu I vytvořeného za 90 min. Absorbance při 450 nm byla odečtena pomocí Microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Switzerland).

Reverzní transkripce a kvantitativní real-time PCR

Izolace celkové RNA byla provedena pomocí komerčních kitů podle instrukcí výrobce. Ve všech vzorcích RNA byla genomická DNA odstraněna použitím RNase-free DNase I (Qiagen, Germany). RNA byla přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) nebo SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Genová exprese byla stanovena na LightCycler® 480 System (Roche, Switzerland) za použití HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (SolisBioDyne, Estonia) a TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies). Exportovaná primární data byla analyzována pomocí softwaru LinRegPCR (version 2013.0; Ruijter *et al.*, 2009) a získané hodnoty byly použity pro relativní kvantifikaci pomocí modifikované $2^{-\Delta\Delta CT}$ metody (Livak a Schmittgen, 2001). Data z jednotlivých tkání a jednotlivých experimentů byla normalizována pomocí nejlepší kombinace dvou referenčních genů, které byly vybrány softwarem NormFinder (Andersen *et al.*, 2004)

Western blot analýza

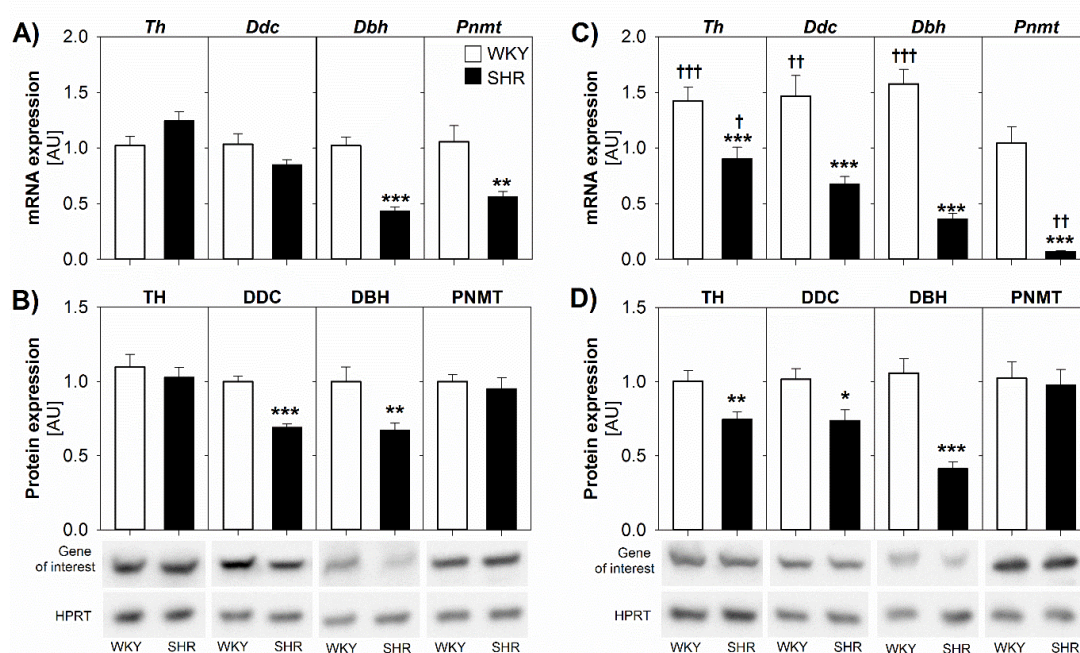
Elektroforéza v SDS polyakrylamidovém gelu za redukujících podmínek byla provedena pomocí Optiblot precast 4-20 % gradient gels (Abcam, UK). Polosuchý přenos proteinů na Polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, USA) byl proveden za použití a Tris Glycine Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA) obsahujícího 10 % metanol. Následně byly membrány blokovány 3 % mlékem v roztoku TBS s Tweenem (TBS-T; 137 mM NaCl, 20 mM Trizma® base a 0.1 % Tween® 20) při pokojové teplotě. Membrány byly inkubovány s primární protilátkou v 3 % mléku TBS-T přes noc při 4 °C. Následně byly membrány inkubovány s Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit sekundární protilátkou (1:5000, Thermo Fisher Scientific) v 3 % mléku rozpuštěném v TBS-T. Křenová peroxidáza byla detekována pomocí SuperSignal West Femto reagent (Thermo Fisher Scientific) a uvolňované světlo bylo zaznamenáno pomocí chemiluminiscenčního analyzátoru LAS 1000 (Fujifilm, Japan).

VÝSLEDKY

Projekt 1 – porovnání abnormalit sympato-adrenálního a sympato-neurálního systému u mladých prehypertenzních a dospělých spontánně hypertenzních potkanů

Expres genů účastnících se biosyntézy katecholaminů v nadledvině

mRNA a proteinová exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů byla nižší v nadledvině 4týdenních SHR v porovnání se stejně starými WKY potkany (Obr. 1A, B). Utlumení exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů bylo ještě výraznější v nadledvině dospělých SHR potkanů (Obr. 1C, D).



Obrázek 1. mRNA (A, C) a proteinová (B, D) exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů v nadledvině 4týdenních (A, B) nebo 24týdenních (C, D) SHR a stejně starých WKY potkanů. * p < 0.05 vs. stejně staří WKY potkani; † p < 0.05 vs. 4týdenní potkani stejného kmene. Vavřínová *et al.*, 2019a

Obsah katecholaminů v nadledvině

Množství noradrenalinu a adrenalinu bylo vyšší v nadledvině 4týdenních SHR potkanů než u WKY potkanů (Tabulka 1). Naproti tomu množství noradrenalinu bylo nižší v nadledvině dospělých SHR potkanů, zatímco množství adrenalinu bylo podobné v nadledvině u obou kmenů.

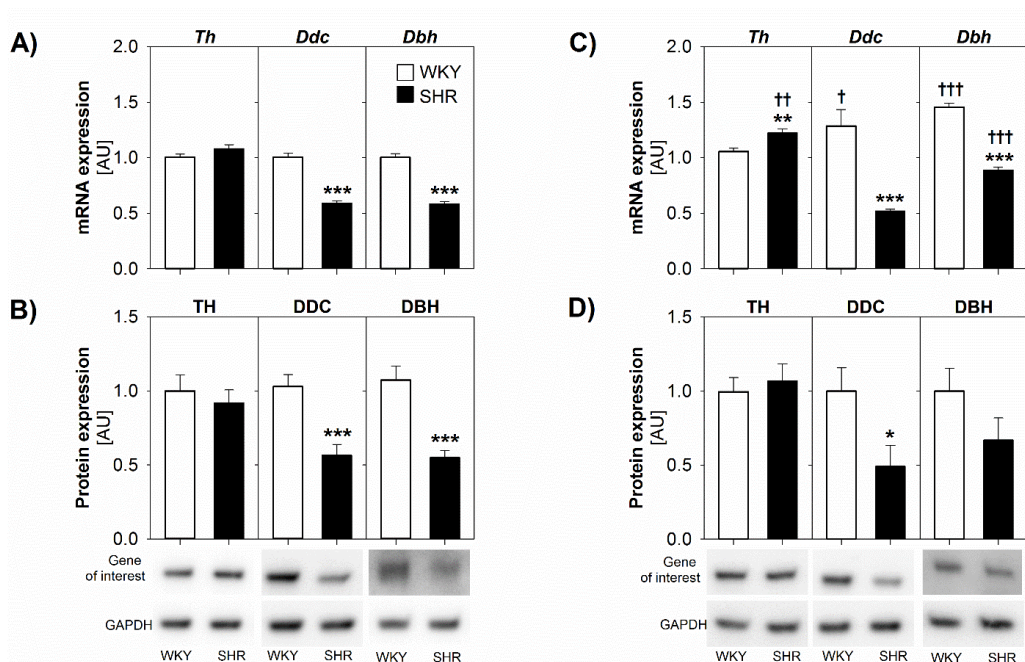
Tabulka 1. Obsah katecholaminů v nadledvině 4týdenních a 24týdenních WKY a SHR potkanů.

	WKY 4 týdny	SHR 4 týdny	WKY 24 týdny	SHR 24 týdny
Noradrenalin (ng/nadledvina)	635 ± 20	782 ± 39 *	4375 ± 277 †	1654 ± 122 * †
Adrenalin (ng/nadledvina)	1734 ± 39	2092 ± 82*	11326 ± 244 †	10522 ± 614 †

* p < 0.05 vs. stejně staří WKY potkani; † p < 0.05 vs. 4týdenní potkani stejného kmene. Vavřínová *et al.*, 2019a

Expresa genů účastnících se biosyntézy katecholaminů v sympatických gangliích

mRNA a proteinová exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů byla nižší v sympatických gangliích 4týdenních SHR v porovnání s WKY potkany (Obr. 2A, B). V sympatických gangliích dospělých SHR byla vyšší mRNA exprese *Th* genu, ale tato změna nebyla pozorována na proteinové úrovni. mRNA exprese *Ddc* a *Dbh* genů byla nižší v sympatických gangliích dospělých SHR v porovnání se stejně starými WKY potkany. Proteinová exprese DDC enzymu byla také nižší, zatímco nebyla pozorována signifikantní změna v proteinové expresi DBH enzymu (Obr. 2C, D).

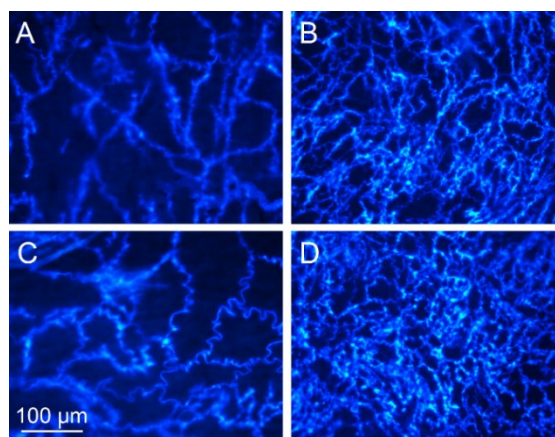


Obrázek 2. mRNA (A, C) a proteinová (B, D) exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů v sympatických gangliích 4týdenních (A, B) nebo 24týdenních (C, D) SHR a stejně starých WKY potkanů. * $p < 0.05$ vs. stejně starí WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. 4týdenní potkani stejného kmene. Vavřínová *et al.*, 2019a

Obsah katecholaminů v sympatické inervaci femorální tepny

Obr. 3 ukazuje obsah katecholaminů v sympatické inervaci femorálních tepen vizualizovaný barvením glyoxalovou kyselinou. Fluorescenční signál byl dvojnásobně vyšší u SHR obou věků v porovnání s WKY potkany (2.16 ± 0.08 u prehypertenzních SHR, 1.99 ± 0.11 u dospělých SHR; $p < 0.001$).

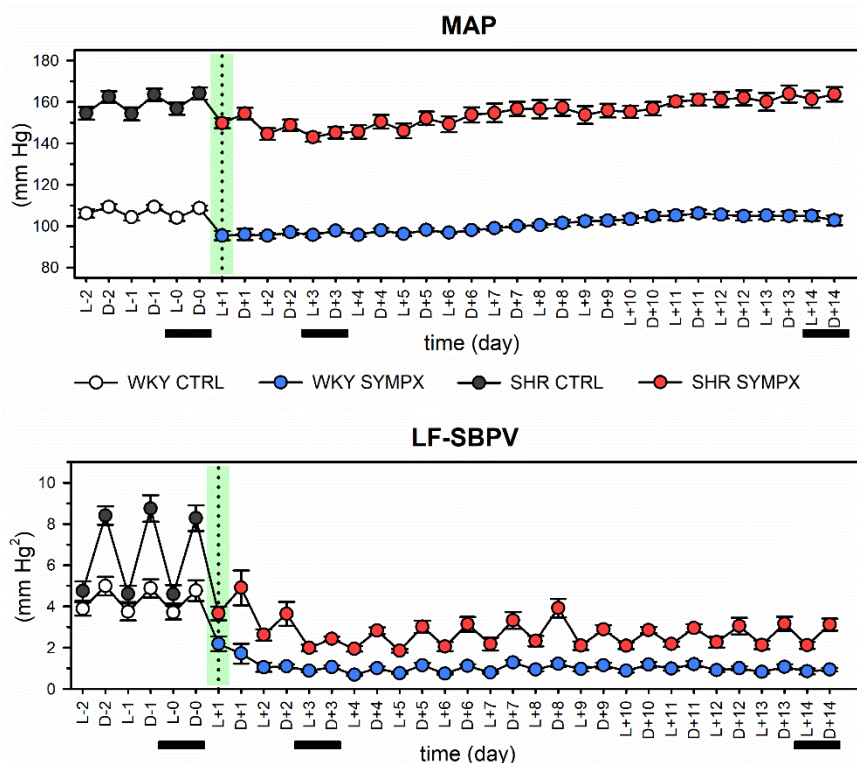
Obrázek 3. Obsah katecholaminů v sympatické inervaci femorální tepny vizualizovaný barvením glyoxalovou kyselinou: 4týdenní WKY potkani (A), 4týdenní SHR (B), 24týdenní WKY potkani (C), 24týdenní SHR (D). Vavřínová *et al.*, 2019a



Projekt 2 – účinky sympatektomie na kardiovaskulární systém: porovnání dospělých normotenzních a spontánně hypertenzních potkanů

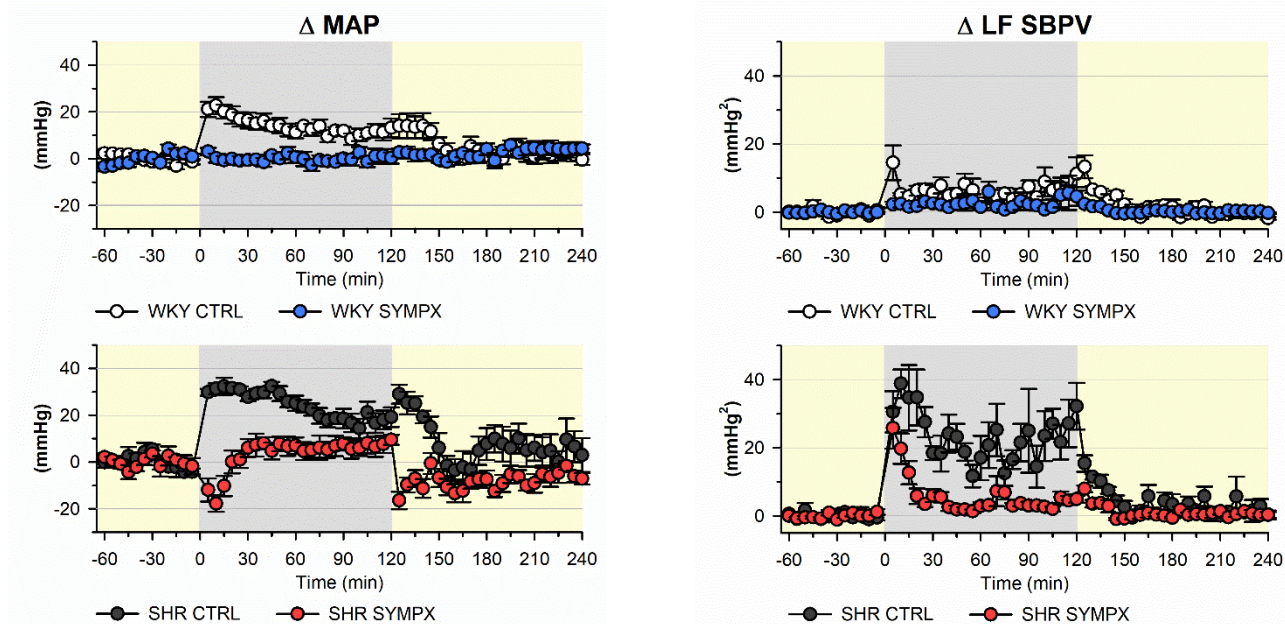
Kardiovaskulární parametry měřené pomocí radiotelemetrie

Kontrolní SHR měli vyšší střední arteriální tlak (MAP) než WKY potkani během světlé i tmavé fáze dne ($p < 0.001$; Obr. 4). MAP byl po 3 dnech podávání guanetidinu nižší u obou kmenů ($p < 0.01$), a vrátil se na kontrolní úroveň po 14 dnech. Nízkofrekvenční komponenta variability systolického krevního tlaku (LF SBPV) byla větší u kontrolních SHR než u WKY potkanů ($p < 0.05$; Obr. 4). LF SBPV byla výrazně snižena po 3 a 14 dnech podávání guanetidinu, což prokazuje přetrvávající efekt sympatektomie ($p < 0.001$).



Obrázek 4. Časový průběh středního arteriálního tlaku (MAP) a nízkofrekvenční komponenty variability systolického krevního tlaku (LF SBPV) u WKY a SHR potkanů měřený radiotelemetrií před a v průběhu podávání guanetidinu. První injekce guanetidinu byla podána během světlé fáze prvního dne (L+1), jak je vyznačeno vertikální tečkovanou čarou.

U SHR jsme pozorovali vyšší odpověď MAP a LF SBPV na působení stresoru v porovnání s WKY potkany ($p < 0.05$; Obr. 5). Stresem indukovaný vzestup obou parametrů byl oslaben sympatektomií u obou kmenů ($p < 0.01$).



Obrázek 5. Časový průběh změn středního arteriálního tlaku (MAP) a nízkofrekvenční komponenty variability systolického krevního tlaku (LF SBPV) před, v průběhu a po stresu navozeném omezením pohybu (0-120 min, označeno šedou) u kontrolních (CTRL) a sympatektomovaných (SYMPX) WKY a SHR potkanů.

Ověření sympatektomie

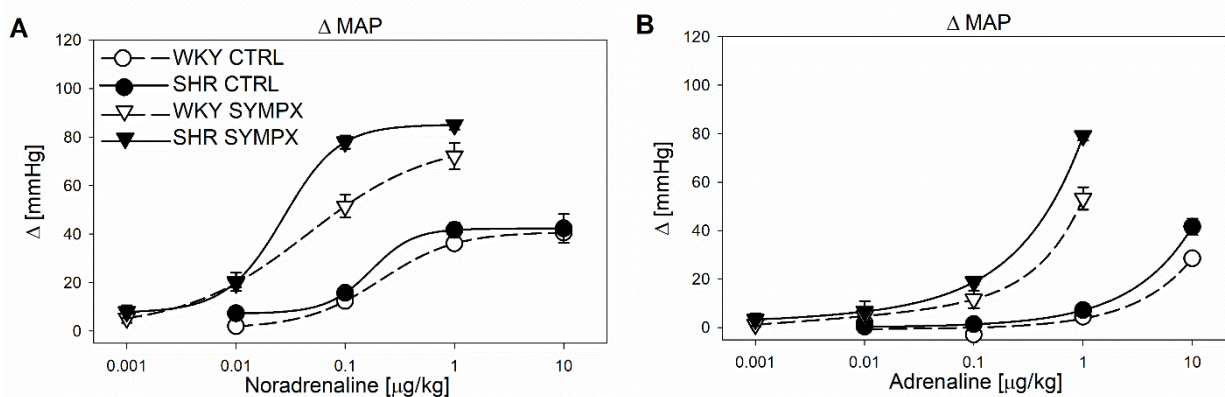
Guanetidinem indukovaná sympatektomie snížila obsah katecholaminů (vizualizovaný barvením kyselinou glyoxalovou) ve femorálních tepnách obou kmenů (-92 % u SYMPX SHR, $p < 0.001$; -88 % u SYMPX WKY potkanů, $p < 0.01$).

Podávání gangliového blokátoru pentolinia snížilo MAP více u kontrolních SHR než u WKY potkanů ($p < 0.05$) a sympatektomie oslabila MAP odpověď na pentolinium u obou kmenů (CTRL SHR, -47 ± 3 mm Hg; CTRL WKY potkani, -38 ± 1 mm Hg; SYMPX SHR, -7 ± 4 mm Hg; SYMPX WKY potkani, -15 ± 4 mm Hg).

Podávání tyraminu (látka uvolňující katecholaminy z nervových zakončení) zvyšovalo MAP v podobné míře u SHR a WKY potkanů a tento účinek byl téměř úplně zrušen sympatektomií (CTRL SHR, 48 ± 4 mm Hg; CTRL WKY potkani, 49 ± 5 mm Hg; SYMPX SHR, 4 ± 1 mm Hg; SYMPX WKY potkani, 6 ± 2 mm Hg; $p < 0.001$).

Kardiovaskulární odpověď na podávání katecholaminů

Sympatektomie vyvolala zvýšení citlivosti odpovědi MAP na podávání noradrenalinu (až 14krát) a adrenalinu (až 10krát) u SHR i WKY potkanů (Obr. 6), jak bylo doloženo posunem "dose-response" křivek doleva u sympatektomovaných zvířat.



Obrázek 6. Odpověď středního arteriálního tlaku (MAP) na intravenózní podávání nekumulativních dávek noradrenalinu (A), nebo adrenalinu (B) u bdělých kontrolních (CTRL) a sympatektomovaných (SYMPX) WKY a SHR potkanů. Vavřínová *et al.*, 2019b

Katecholaminy v plasmě a nadledvině

Sympatektomie snížila plasmatické hladiny noradrenalinu u obou kmenů (Tabulka 2). Podávání guanetidinu zvýšilo plasmatické hladiny adrenalinu a tento efekt byl výraznější u WKY potkanů (4násobný vzestup u SYMPX WKY potkanů vs. 1.5násobný vzestup u SYMPX SHR).

V nadledvině kontrolních SHR byl nižší obsah noradrenalinu v porovnání s WKY potkany. Sympatektomie zvýšila obsah noradrenalinu v nadledvině WKY potkanů ale ne v nadledvině SHR (Tabulka 2). SHR také měli nižší obsah adrenalinu v nadledvině než WKY potkani a sympatektomie zvýšila obsah adrenalinu v nadledvině nezávisle na kmenech.

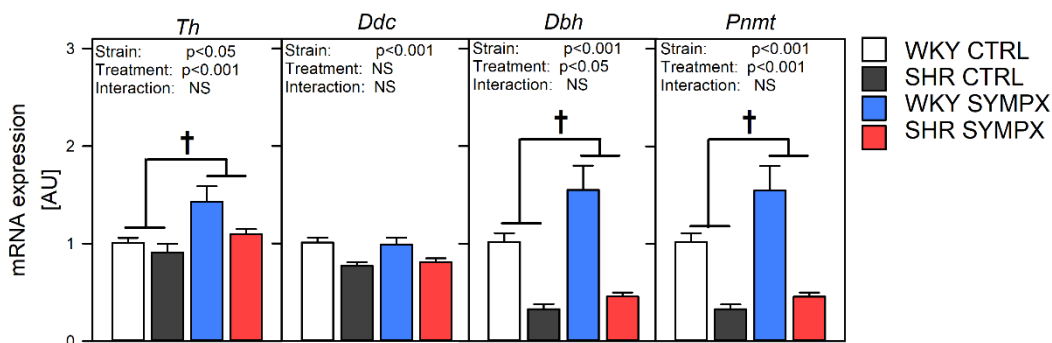
Tabulka 2. Katecholaminy v plasmě kontrolních (CTRL) a sympatektomovaných (SYMPX) WKY a SHR potkanů.

	CTRL		SYMPX		two-way ANOVA		
	WKY	SHR	WKY	SHR	Kmen	Guanetidin	Interakce
Plasma							
Noradrenalin (ng/ml)	0.38 ± 0.06	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	NS	p<0.001	NS
Adrenalin (ng/ml)	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.05	1.24 ± 0.17 †	0.48 ± 0.04 *†	p<0.01	p<0.001	p<0.001
Nadledvina							
Noradrenalin (ng/nadledvina)	4840 ± 282	2388 ± 280 *	7320 ± 847 †	2642 ± 166 *	p<0.001	p<0.05	p<0.05
Adrenalin (ng/nadledvina)	13990 ± 480	12770 ± 370	16060 ± 640	13390 ± 460	p<0.001	p<0.05	NS

* p < 0.05 vs. WKY potkani; † p < 0.05 vs. kontrolní potkani stejného kmene. NS, nesignifikantní. Vavřínová *et al.*, 2019b

Genová exprese ve dřeni nadledvin

mRNA exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů (*Th*, *Ddc*, *Dbh* a *Pnmt*) byla nižší ve dřeni nadledvin SHR ve srovnání s WKY potkany. Podávání guanetidinu zvýšilo mRNA expresi *Th*, *Dbh* a *Pnmt* genů ve dřeni nadledvin (Obrázek 7).



Obrázek 7. mRNA exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů ve dřeni nadledvin kontrolních (CTRL) a sympatektomovaných (SYMPX) WKY a SHR potkanů.

Projekt 3 - porovnání stresem indukovaných kardiovaskulárních a hormonálních odpovědí u dospělých normotenzních a spontánně hypertenzních potkanů

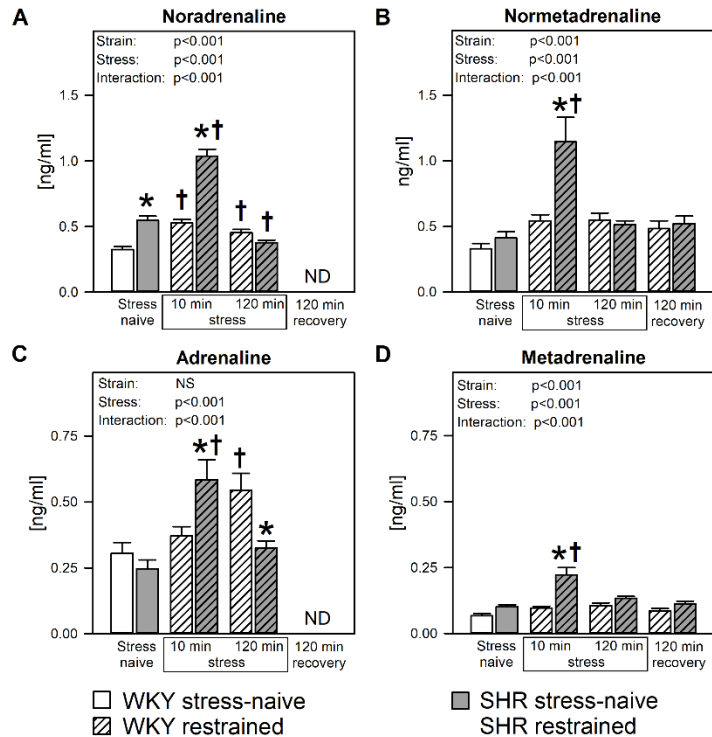
Hormony v plasmě

Plasmatické hladiny noradrenalinu byly zvýšené po 10 min omezení pohybu u SHR i WKY potkanů ($p<0.001$ pro oba kmeny) a stresem indukované plasmatické hladiny noradrenalinu byly vyšší u SHR ve srovnání s WKY potkany (SHR vs. WKY: $p<0.001$; Obr. 8A). Stres vyvolaný akutním omezením pohybu zvýšil hladiny normetadrenalinu, adrenalinu a metadrenalinu po 10 min jen u SHR ale ne u WKY potkanů (SHR vs. WKY: $p<0.01$; Obr. 8B, C, D). Po 120 min omezení pohybu, se hladiny adrenalinu u SHR vrátily zpět na bazální úroveň, ale adrenalin zůstal zvýšený u WKY potkanů (SHR vs. WKY: $p<0.01$; Obr. 8C).

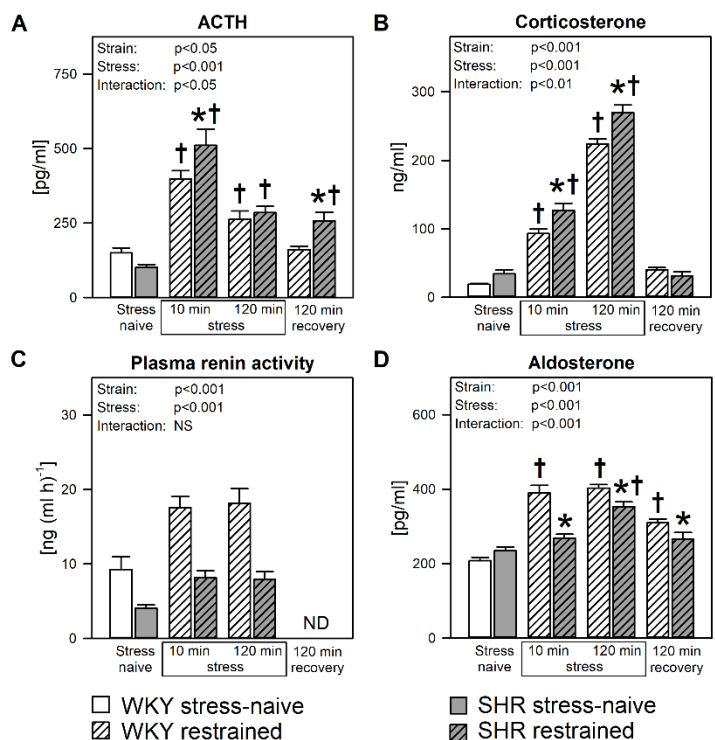
Zvýšení plasmatických hladin ACTH po 10 min omezení pohybu bylo výraznější u SHR (SHR vs. WKY: $p<0.001$; Obr. 9A). Po 120 min odpočinku, se hladiny ACTH u WKY potkanů vrátily na bazální úroveň, ale zůstaly zvýšené u SHR (SHR vs. WKY: $p<0.05$). Podobně, stresem vyvolaný vzestup kortikosteronu byl výraznější u SHR než u WKY potkanů (SHR vs. WKY: $p<0.01$ po 10 min stresu, $p<0.001$ po 120 min stresu; Obr. 9B).

Plasmatická reninová aktivita byla snížena u SHR v porovnání s WKY potkany ($p < 0.001$ v celém průběhu pokusu; Obr. 9C). Stresem vyvolané hladiny aldosteronu byly nižší u SHR než u WKY potkanů ($p < 0.001$ po 10 min stresu; $p < 0.01$ po 120 min stresu; $p < 0.05$ po 120 min odpočinku; Obr. 9D).

Obrázek 8. Plasmatické hladiny noradrenalinu (A), normetadrenalinu (B), adrenalinu (C) a metadrenalinu u nestresovaných (stress-naive) a stresovaných (restrained) WKY a SHR potkanů. * $p < 0.05$ vs. WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. nestresovaní potkani. ND, nestanoveno.

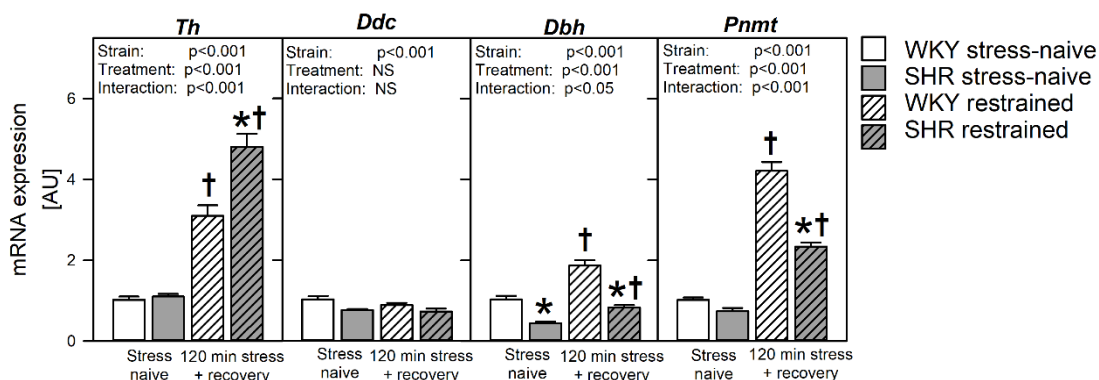


Obrázek 9. Plasmatické hladiny adrenokortikotropního hormonu (ACTH; A) a kortikosteronu (B), plasmatická reninová aktivita (C) a plasmatická hladina aldosteronu (D) u nestresovaných (stress-naive) a stresovaných (restrained) WKY a SHR potkanů. * $p < 0.05$ vs. WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. nestresovaní potkani. ND, nestanoveno.



Genová exprese ve dřeni nadledvin

Stres vyvolaný akutním omezením pohybu způsobil čtyřnásobný vzestup mRNA exprese *Th* genu u SHR i WKY potkanů ($p < 0.001$ pro oba kmeny) a *Th* exprese byla vyšší u stresovaných SHR než u stresovaných WKY potkanů ($p < 0.001$; Obr. 10). mRNA exprese *Ddc*, *Dbh* a *Pnmt* genů byla nižší ve dřeni nadledvin nestresovaných i stresovaných SHR ve srovnání s WKY potkany.



Obrázek 10. mRNA exprese genů účastnících se syntézy katecholaminů ve dřeni nadledvin nestresovaných a stresovaných (120 min omezení pohybu+120 min odpočinku) WKY a SHR potkanů. * $p < 0.05$ vs. WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. nestresovaní potkani stejného kmene.

mRNA exprese *Agtr2* genu byla podobná u SHR a WKY potkanů a u obou kmenů se významně snížila po stresu indukovaném omezením pohybu (Tabulka 3). mRNA exprese *Agtr1a* genu byla nižší u SHR a nebyla ovlivněna stresem. *Agtr1b* gen byl také méně exprimovaný u SHR a jeho mRNA exprese se snížila stresem u obou kmenů.

Tabulka 3. mRNA exprese genů pro receptory pro angiotenzin II ve dřeni nadledvin nestresovaných a stresovaných (120 min omezení pohybu+120 min odpočinku) WKY a SHR potkanů.

Gen	Poměr průměru SHR/ průměr WKY (a.u.)				two-way ANOVA		
	Nestresovaní		Po 120 min omezení pohybu a 120 min odpočinku				
	WKY	SHR	WKY	SHR	Kmen	Stres	Interakce
<i>Agtr1a</i>	1.02 ± 0.07	0.69 ± 0.07	1.16 ± 0.07	0.84 ± 0.09	$p < 0.001$	NS	NS
<i>Agtr1b</i>	1.10 ± 0.17	0.57 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.29 ± 0.08	$p < 0.01$	$p < 0.001$	NS
<i>Agtr2</i>	1.06 ± 0.13	0.95 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.42 ± 0.16	NS	$p < 0.001$	NS

* $p < 0.05$ vs. WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. nestresovaní potkani stejného kmene. NS, nesignifikantní.

DISKUSE

V Projektu 1 jsme pozorovali zásadní protiklad mezi sníženou expresí genů účastnících se syntézy katecholaminů (v sympato-neurálním a sympato-adrenálním systému) a zvýšenou hustotou sympatické inervace cév a také vyšším obsahem katecholaminů v nadledvině prehypertenzních SHR. Zvýšená sympatická inervace cév byla popsána již dříve (Mangiarua a Lee, 1990). V souladu s tímto nálezem jsme u prehypertenzních SHR naměřili vyšší plasmatické hladiny noradrenalinu v porovnání s WKY potkany, což je také v souladu s literaturou (Grobecke *et al.*, 1976). V nadledvinách SHR s rozvinutou hypertenzí byla biosyntetická dráha katecholaminů utlumena na více úrovních, tj. na úrovni mRNA i proteinové exprese. To vedlo ke snížení obsahu katecholaminů, což je v souladu s předchozími studiemi (Grundt *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2005). Podobné utlumení exprese bylo nalezeno i v sympatických gangliích dospělých SHR potkanů, ale nebylo doprovázené snížením obsahu katecholaminů v cévní stěně. Krevní tlak (TK) je u 4týdenních SHR podobný nebo jen lehce zvýšený v porovnání s normotenzními potkany, ale již v tomto období SHR vykazují vyšší sympatickou aktivitu a zvýšenou srdeční frekvenci (Behuliak *et al.*, 2015; Judy *et al.*, 1979). Utlumení exprese genů účastnících se syntézy katecholaminů může být kompenzačním mechanismem, který působí proti hyperfunkci sympato-neurálního systému a který se rozvíjí zároveň se vzestupem TK u SHR.

V Projektu 2 sympatektomie vyvolaná chronickým podáváním guanetidinu vedla po třech dnech ke snížení TK a nízkofrekvenční komponenty variability systolického krevního tlaku (LF SBPV; marker cévní sympatické aktivity) u SHR i WKY potkanů. LF SBPV byla stále snížena po 14 dnech podávání guanetidinu, ale TK se u sympatektomovaných potkanů vrátil na úroveň kontrolních neléčených zvířat. Podobně našemu nálezu Johnson a O'Brien (1976) popsali, že chronická léčba guanetidinem nevedla k signifikantní změně klidového TK u Sprague-Dawley potkanů. Naopak Benarroch *et al.* (1990) pozoroval snížení bazálního TK u Sprague-Dawley potkanů léčených guanetidinem. V našem experimentu jsme u potkanů léčených guanetidinem po dobu 14 dní také pozorovali snížení TK, ale pouze za podmínek stresu vyvolaného akutním omezením pohybu. Návrat TK k původním hodnotám pozorovaný u volně se pohybujících zvířat nemůže být připsán nedostatečnému stupni sympatektomie, což bylo u sympatektomovaných potkanů dokumentováno snížením fluorescenčního signálu katecholaminů ve femorálních arteriích, sníženou LF SBPV a utlumenou odpovědí TK na podávání gangliového blokátoru pentolinia resp. tyraminu (látky uvolňující katecholaminy z nervových zakončení). Ukázali jsme, že u SHR i WKY potkanů dochází při sympatektomii ke zvýšení citlivosti odpovědi TK na podávání noradrenalinu (až 14krát) a adrenalinu (až 10krát), což je v souladu s větší odpovědí TK na podávání α_1 -adrenergního agonisty fenylefrinu pozorovanou u dospělých WKY potkanů léčených 6-hydroxydopaminem (Rizzoni *et al.*, 2000). Navíc jsme u potkanů vystavených opakovanému podávání guanetidinu pozorovali zvýšení plasmatických hladin adrenalinu, což může být připsáno zvětšení nadledvin a zvýšené expresi genů účastnících se syntézy katecholaminů. Toto je v souladu s dosavadními nálezy týkajícími se vlivu

sympatektomie na Sprague-Dawley potkany (Kvetnansky *et al.*, 1979b; Qiu *et al.*, 1999). Nicméně sympatektomie nevedla k normalizaci utlumené exprese genů účastnících se syntézy katecholaminů v nadledvině dospělých SHR, což naznačuje, že tento útlum není způsoben přímou negativní zpětnou vazbou, která by kompenzovala hyperaktivitu sympatického nervového systému u tohoto kmene.

V Projektu 3 jsme prokázali, že výraznější kardiovaskulární odpověď SHR potkanů na akutní omezení pohybu (restraint) je doprovázeno vyššími plasmatickými hladinami katecholaminů a jejich metabolitů. Tyto nálezy jsou ve shodě s předchozím pozorováním u SHR vystavených silnější formě znehybnění tj. imobilizaci (Kvetnansky *et al.*, 1979a). Navíc jsme popsali výraznější zvýšení mRNA exprese *Th* genu ve dřeni nadledvin stresovaných SHR ve srovnání s WKY potkany, což je také ve shodě s předchozími studiemi (Grundt *et al.*, 2009). Aktivace exprese *Th* genu v nadledvině je zprostředkováno hlavně vyšší sympatickou nervovou aktivitou (Axelrod a Reisine, 1984). Bylo popsáno, že sympatická aktivita v splachnických a renálních nervech je u SHR zvýšená (Judy *et al.*, 1979; Judy a Farrell, 1979). Také v našich experimentech jsme pozorovali výrazně zvýšenou sympatickou aktivitu (dokumentovanou zvětšením LF SBPV) u SHR za podmínek stresu. Na druhou stranu jsme pozorovali nižší expresi ostatních genů účastnících se syntézy katecholaminů (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) ve dřeni nadledvin u nestresovaných i stresovaných SHR. Výlev katecholaminů a také exprese enzymů účastnících se syntézy katecholaminů jsou regulovány angiotenzinem II (Sabban, 1997). U dospělých SHR jsme naměřili sníženou plasmatickou reninovou aktivitu, což je v souladu s dosavadní literaturou (Freeman *et al.*, 1975; Sen *et al.*, 1972). Navíc exprese receptorů pro angiotenzin II byla také snížena u SHR. Tyto nálezy naznačují, že snížená stimulace chromafinních buněk nadledvin angiotenzinem II u SHR by mohla být příčinou útlumu exprese enzymů účastnících se syntézy katecholaminů pozorovanou u tohoto kmene. U SHR vystavených akutnímu omezení pohybu jsme také našli zvýšené plasmatické hladiny kortikosteronu a ACTH, což je v souladu s předchozími nálezy jiných laboratoří (Djordjevic *et al.*, 2007; Kvetnansky *et al.*, 1979a). Nedávno jsme v naší laboratoři ukázali, že glukokortikoidy mají významný permisivní a/nebo stimulační účinek při udržování periferní cévní rezistence řízené sympatickým nervovým systémem a také pro adekvátní odpověď kardiovaskulárního systému na vystavení akutnímu stresoru (Bencze *et al.*, 2020). Takže lze konstatovat, že odpověď kardiovaskulárního systému SHR na zvýšenou aktivaci sympato-neurálního a sympato-adrenálního systému může být u tohoto kmene ještě zesílená nadbytkem glukokortikoidů.

SHRNUTÍ A ZÁVĚRY

Ve své disertační práci jsem se zabývala úlohou sympato-neurálního a sympato-adrenálního systému při rozvoji a udržování vysokého krevního tlaku u spontánně hypertenzních potkanů (SHR). U prehypertenzních SHR jsme našli zvýšený obsah katecholaminů v nadledvině a vyšší hustotu sympatické inervace, což může přispívat k patogenezi vysokého krevního tlaku. Utlumení exprese genů účastnících se biosyntézy katecholaminů (*Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) je pravděpodobně kompenzační mechanismus, který se rozvíjí postupně s rozvojem hypertenze a působí proti hyperfunkci sympato-neurálního systému. Potlačení produkce katecholaminů vede k jejich nižšímu obsahu v nadledvinách dospělých SHR. U dospělých SHR jsme dokumentovali výraznější úlohu sympatického nervového systému při udržování krevního tlaku než u WKY potkanů. Nicméně sympatektomie vyvolaná chronickým podáváním guanetidinu není efektivní pro dlouhodobé snížení krevního tlaku u dospělých SHR. To může být vysvětleno zapojením kompenzačních mechanismů, jako jsou víc než desetinásobné zvýšení citlivosti odpovědi krevního tlaku na podávání katecholaminů resp. zvýšení plasmatických hladin adrenalinu u sympatektomovaných zvířat. Také jsme ukázali, že kardiovaskulární odpověď a aktivace sympato-neurálního a sympato-adrenálního systému při stresu vyvolaném akutním omezením pohybu jsou výraznější u dospělých SHR než u WKY potkanů. SHR také vykazovali větší aktivaci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, což může dále zesilovat sympaticky řízený vzestup periferní cévní rezistence. V souladu se sympatickou hyperaktivitou jsme pozorovali výraznější zvýšení exprese *Th* genu u stresovaných SHR ve srovnání s WKY potkany. Naopak exprese ostatních genů účastnících se syntézy katecholaminů (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) zůstala snižená u stresovaných SHR. Možným vysvětlením může být menší stimulace chromafinních buněk dřeně nadledvin angiotenzinem II, která je daná nižší plasmatickou reninovou aktivitou a sníženou expresí adrenálních receptorů pro angiotenzin II u SHR. Závěrem, data v mé disertační práci potvrzují, že sympatický nervový systém přispívá k rozvoji a udržování vysokého krevního tlaku u SHR potkanů. Jeho vliv na kardiovaskulární systém může být potencován nadměrnou aktivací osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, kterou jsme také pozorovali u tohoto kmene. Protože podobné mechanismy se podílejí na vzniku a udržování vysokého krevního tlaku u lidí, jejich výzkum u SHR mohou přispět k lepšímu porozumění a léčbě lidské esenciální hypertenze. Odolnost dospělých SHR potkanů k léčbě zaměřené na periferní sympatický nervový systém upozorňuje na existenci kompenzačních mechanismů, které působí proti efektivní léčbě vysokého krevního tlaku. Pro efektivní snížení krevního tlaku tedy mohou být lepší volbou léky působící na centrální regulaci kardiovaskulárního systému, např. ACE inhibitory nebo blokátory angiotensinových receptorů.

POUŽITÁ LITERATURA / REFERENCES

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5245-5250.

Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. 1984; 224(4648):452-459.

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(12):2443-2454.

Benarroch EE, Schmelzer JD, Ward KK, Nelson DK, Low PA. Noradrenergic and neuropeptide Y mechanisms in guanethidine-sympathectomized rats. *Am J Physiol*. 1990; 259(2 Pt 2):R371-375.

Bencze M, Vavřínová A, Zicha J, Behuliak M. Pharmacological suppression of endogenous glucocorticoid synthesis attenuated blood pressure and heart rate response to acute restraint in Wistar rats. *Physiol Res*. 2020; 69(3): in press.

Brock JA, Cunnane TC. Neurotransmitter release mechanisms at the sympathetic neuroeffector junction. *Exp Physiol*. 1993; 78(5):591-614.

Djordjevic J, Vuckovic T, Jasnic N, Cvijic G. Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. *Gen Comp Endocrinol*. 2007; 153(1-3):217-220.

Dos Reis DG, Fortaleza EA, Tavares RF, Corrêa FM. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress*. 2014; 17(4):362-372.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(3):331-349.

Ferrari AU, Daffonchio A, Franzelli C, Mancina G. Potentiation of the baroreceptor-heart rate reflex by sympathectomy in conscious rats. *Hypertension*. 1991; 18(2):230-235.

Flatmark T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand*. 2000; 168(1):1-17.

Freeman RH, Davis JO, Aharon NV, Ulick S, Weinberger MH. Control of aldosterone secretion in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1975; 37(1):66-71.

Geraldes V, Goncalves-Rosa N, Liu B, Paton JF, Rocha I. Essential role of RVL medullary neuronal activity in the long term maintenance of hypertension in conscious SHR. *Auton Neurosci*. 2014; 186:22-31.

- Grobecker H, Saavedra JM, Roizen MF, Weise V, Kopin IJ, Axelrod J. Peripheral and central catecholaminergic neurons in genetic and experimental hypertension in rats. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976; 3:377s-380s.
- Grundt A, Grundt C, Gorbey S, Thomas MA, Lemmer B. Strain-dependent differences of restraint stress-induced hypertension in WKY and SHR. *Physiol Behav.* 2009; 97(3-4):341-346.
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(5):335-346.
- Johnson EM Jr, O'Brien F. Evaluation of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976; 196(1):53-61.
- Judy WV, Farrell SK. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1979; 1(6):605-614.
- Judy WV, Watanabe AM, Murphy WR, Aprison BS, Yu PL. Sympathetic nerve activity and blood pressure in normotensive backcross rats genetically related to the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1979 Nov-Dec;1(6):598-604.
- Korner P, Bobik A, Oddie C, Friberg P. Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension.* 1993; 22(2):243-252.
- Kvetnansky R, McCarty R, Thoa NB, Lake CR, Kopin IJ. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. *Am J Physiol.* 1979a; 236(3):H457-462.
- Kvetnansky R, Weise VK, Thoa NB, Kopin IJ. Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979b; 209(2):287-91.
- Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, Coughlin M. Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1991; 69(3):714-721.
- Lee RM, Triggler CR, Cheung DW, Coughlin MD. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1987; 10(3):328-338.
- Lim DY, Jang SJ, Park DG. Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002; 22(4):225-232.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- Magee JC, Schofield GG. Neurotransmission through sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1992; 20(3):367-373.
- Mangiarua EI, Lee RM. Increased sympathetic innervation in the cerebral and mesenteric arteries of hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990; 68(4):492-499.

- Matsuura T, Kumagai H, Kawai A, Onimaru H, Imai M, Oshima N, Sakata K, Saruta T. Rostral ventrolateral medulla neurons of neonatal Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002; 40(4):560-565.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*. 1998; 338(3):171-179.
- Moura E, Pinho Costa PM, Moura D, Guimarães S, Vieira-Coelho MA. Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2005; 76(25):2953-2964.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*. 1964; 239:2910-2917.
- Rizzoni D, Perlini S, Mircoli L, Porteri E, Franzelli C, Castellano M, Agabati Rosei E, Ferrari AU. Enhanced vascular reactivity in the sympathectomized rat: studies in vivo and in small isolated resistance arteries. *J Hypertens*. 2000; 18(8):1041-1049.
- Qiu J, Nelson SH, Speth RC, Wang DH. Regulation of adrenal angiotensin receptor subtypes: a possible mechanism for sympathectomy-induced adrenal hypertrophy. *J Hypertens*. 1999; 17(7):933-940.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(6): e45.
- Sabban EL. Control of tyrosine hydroxylase gene expression in chromaffin and PC12 cells. *Semin Cell Dev Biol*. 1997 ;8(2):101-111.
- Sato MA, Colombari E, Morrison SF. Inhibition of neurons in commissural nucleus of solitary tract reduces sympathetic nerve activity in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282(5):H1679-1684.
- Sen S, Smeby RR, Bumpus FM. Renin in rats with spontaneous hypertension. *Circ Res*. 1972; 31(6):876-880.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10(6):397-409.
- Wong DL, Yamasaki L, Ciaranello RD. Characterization of the isozymes of bovine adrenal medullary phenylethanolamine N-methyltransferase. *Brain Res*. 1987; 410(1):32-44.
- Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Ohmichi M, Morimoto A, Yamaguchi Y, Ushida T, Iwase S, Sugenoja J, Kumazawa T. Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. *J Physiol Sci*. 2011; 61(5):373-383.

SEZNAM PUBLIKACÍ / LIST OF PUBLICATIONS

Publikace pro disertační práci / List of publications for PhD thesis

Vavřínová A, Behuliak M, Zicha J. **The importance of the selection of appropriate reference genes for gene expression profiling in adrenal medulla or sympathetic ganglia of spontaneously hypertensive rat.** *Physiol Res.* 2016; 65(3):401-411. (IF = 1.646)

Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Zicha J. **Which sympathoadrenal abnormalities of adult spontaneously hypertensive rats can be traced to a prehypertensive stage?** *Hypertens Res.* 2019; 42(7):949-959. (IF=3.217)

Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, Vodička M, Ergang P, Vaněčková I, Zicha J. **Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors.** *Hypertens Res.* 2019; 42(12):1872-1882. (IF=3.217)

Bencze M, Vavřínová A, Zicha J, Behuliak M. **Pharmacological suppression of endogenous glucocorticoid synthesis attenuated blood pressure and heart rate response to acute restraint in Wistar rats.** *Physiol Res.* 2020; 69(3): 415-426. (IF = 1.646)

Další publikace autorky / Other publications of the author

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)

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(12):2443-2454. (IF = 5.062)

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)

Vodička M, Vavřínová A, Mikulecká A, Zicha J, Behuliak M. **Hyper-reactivity of HPA axis in Fischer 344 rats is associated with impaired cardiovascular and behavioral adaptation to repeated restraint stress.** *Stress.* 2020; In Press. (IF = 2.310)

ŽIVOTOPIS

Anna Vavřínová, narozena 15. července 1989

Vzdělání

- 2013 – současnost **doktorské studium, program Fyziologie živočichů**
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
- 2011 – 2013 **magisterské studium, program Biologie**
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
- 2008 – 2011 **bakalářské studium, Speciální chemicko-biologické obory**
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Projekty

- 2016 - 2018 hlavní řešitel studentského projektu GAUK 1071416 s názvem **Úloha sympatického nervového systému a dřeně nadledvin při udržování vysokého krevního tlaku SHR potkanů** (Grantová agentura Univerzity Karlovy)
- 2014 - 2016 hlavní řešitel studentského projektu GAUK 966214 **Úloha sympatického nervového systému při vývoji genetické hypertenze** (Grantová agentura Univerzity Karlovy)

Ocenění

- 2016 Investigators' Travel Grants from the Organizing Committee of Hypertension Seoul 2016
- 2014 The SHR Society Award

ABSTRACT

Both sympathoneural and sympathoadrenal systems are involved in the regulation of arterial blood pressure and in the pathogenesis of hypertension. Spontaneously hypertensive rats (SHR), the mostly used animal model of genetic hypertension, is characterized by multiple molecular, morphological and functional alterations at different levels of sympathoneural and sympathoadrenal systems. The study of young prehypertensive SHR allows to reveal the abnormalities preceding hypertension development, whereas adult SHR with established hypertension offers a better model for the treatment of human essential hypertension. The aim of my PhD Thesis was to describe abnormalities in sympathoneural and sympathoadrenal systems in SHR under different conditions. Firstly, ontogenetic differences which might contribute to hypertension development were determined. Secondly, the effect of chemical sympathectomy induced by guanethidine in adulthood on cardiovascular parameters and on the compensatory mechanisms counteracting the reduction of blood pressure were studied. Thirdly, stress-induced cardiovascular response and stress-induced changes of sympathoneural and sympathoadrenal systems were described in adult SHR. My Thesis brought several important results. The increased adrenal catecholamine content and the increased density of sympathetic innervation observed in prehypertensive SHR compared to age-matched normotensive WKY rats could be involved in the pathogenesis of high blood pressure. The downregulation of the expression of genes involved in catecholamine biosynthesis (*Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) is probably a compensatory mechanism counteracting the hyperfunction of the sympathoneural system. The suppression of catecholamine biosynthesis develops concurrently with the progress of hypertension in SHR. It results in the lower catecholamine content in the adrenal glands but not in the lower vascular sympathetic innervation of adult SHR. A greater role of sympathetic nervous system in blood pressure maintenance was documented in adult SHR compared to WKY rats. However, chronic sympathectomy by guanethidine is not an effective method for permanent blood pressure lowering in adult SHR with established hypertension. This might be explained by the involvement of compensatory mechanisms in sympathectomized rats, such as the enhanced blood pressure sensitivity to catecholamines and the increased plasma levels of adrenaline. Adult SHR showed an exaggerated cardiovascular response and excessive activation of sympathoneural and sympathoadrenal systems during the acute restraint compared to WKY rats. Furthermore, SHR subjected to restraint exhibited the overactivation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis which might intensify sympathetically mediated rise in peripheral vascular resistance and stress-induced cardiovascular response. In line with sympathetic hyperactivity, a greater elevation of mRNA expression of *Th* gene was observed in the adrenal medulla of stressed SHR compared to WKY rats. In contrast, the mRNA expression of other genes involved in catecholamine biosynthesis (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) was lower in adrenal medulla of stress-naive as well as stressed SHR in comparison to WKY. This finding suggests the involvement of other mechanisms in the regulation of these enzymes. The possible cause might be a lower stimulation of adrenal chromaffin cells by angiotensin II resulting

from the attenuated plasma renin activity and the decreased mRNA expression of adrenal angiotensin II receptors observed in SHR. In conclusion, the data presented in my PhD Thesis confirmed that the sympathetic nervous system contributes to the development and maintenance of high blood pressure in SHR. Its effects on cardiovascular system might be potentiated by the excessive activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis observed in this rat strain. Similar mechanisms are involved in the development and maintenance of high blood pressure in humans. Therefore, the investigation of abovementioned phenomena in SHR can contribute to a better understanding and treatment of human essential hypertension. The resistance of adult SHR to the treatment targeting the peripheral sympathetic nervous system can provide an insight into the compensatory mechanisms which counteract the effective treatment of high blood pressure. Therefore, the drugs affecting central regulation of cardiovascular system (e.g. ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers) might be better for the effective lowering of blood pressure in hypertension.

INTRODUCTION

Arterial blood pressure (BP) is the physiological parameter depending on both cardiac output and total peripheral vascular resistance. BP is maintained within an optimal range which represents a compromise between the need to ensure a sufficient tissue perfusion and the effort to minimize the risk of structural damage of the heart and blood vessels. Since human essential hypertension is one of the major risk factors for cardiovascular complications, better understanding the mechanisms involved in the regulation of BP is desirable. Sympathetic nervous system, which is a part of the autonomic nervous system, is involved in the regulation of both arterial BP and regional vascular resistance. This thesis is focused on the neural mechanisms involved in the pathogenesis and maintenance of high BP in rats with genetic hypertension.

The sympathetic nervous system consists of sensory pathways conveying the signals from the visceral receptors (e.g., from the arterial baroreceptors), central region of autonomic control determining the sympathetic outflow and efferent pathways regulating various targets, such as vascular smooth muscles, heart or adrenal medulla. The sympathetic outflow is determined by a tonic activity of neurons located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) which integrate the information coming from peripheral receptors and from various brain regions (Guyenet, 2006). These preganglionic neurons form cholinergic synapses with postganglionic neurons or chromaffin cells of adrenal medulla (sympathoneural and sympathoadrenal subdivision of sympathetic nervous system). The nerve endings of postganglionic sympathetic neurons release noradrenaline (acting directly on the respective cardiovascular targets), whereas the adrenal medulla releases adrenaline into the blood stream (Brock and Cunanne, 1993; Flatmark, 2000).

The catecholamine biosynthesis starts with an import of aminoacid L-tyrosine and its hydroxylation by the enzyme tyrosine hydroxylase (TH, encoded by *Th* gene; Nagatsu *et al*, 1964). The second enzyme L-DOPA decarboxylase (DDC, encoded by *Ddc* gene) converts L-DOPA to

dopamine. Subsequently, dopamine β -hydroxylase (DBH, encoded by *Dbh* gene) converts dopamine to noradrenaline (Flatmark, 2000). The enzyme phenylethanolamine N-methyl transferase (PNMT, encoded by *Pnmt* gene) is found primarily in adrenal medulla where it synthesizes adrenaline from noradrenaline (Wong *et al.*, 1987). Apart from the rate of synthesis, catecholamine availability in target tissues can also be influenced by the changes in their storage, release, reuptake and degradation (Eisenhofer *et al.*, 2004).

The sympathetic vasomotor activity is regulated in a short-term manner (i.e. seconds to minutes) as well as in a long-term manner (i.e. over hours or days). The major short-term mechanism regulating arterial BP via sympathetic vasomotor activity is the baroreceptor reflex. Briefly, the elevated BP increases firing rate of the arterial baroreceptors, the signals travel to the central nervous system and an appropriate response is initiated rapidly. The inhibition of sympathetic efferents and the concurrent activation of parasympathetic efferents lead to a decrease in arteriolar resistance and cardiac output (the inverse response occurs when BP is lowered) and to a subsequent restoration of BP. The exact role of the central nervous system in the long-term BP control is not well understood yet, but the enhanced tonic activity of brain centers involved in cardiovascular regulation was described in various hypertensive models and the reduction of neural activity in these areas decreased peripheral sympathetic activity and BP (Geraldes *et al.*, 2014; Matsuura *et al.*, 2002; Sato, 2002).

The activation of sympathoneural and sympathoadrenal systems triggers stress response of cardiovascular system, characterized by the increased BP and heart rate (Dos Reis *et al.*, 2014). Another component of the stress system is the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis which produces glucocorticoid hormones (corticosterone in rats, cortisol in humans). Glucocorticoids potentiate numerous sympathetically mediated effects, including peripheral vasoconstriction (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Moreover, the activation of HPA axis and autonomic nervous system is highly coordinated and their regulation is interconnected. Both glucocorticoids and catecholamines have short-term beneficial effects but they can also have long-term deteriorating effects. Chronic stress or the inappropriate reaction of the stress system can participate in the pathogenesis of cardiovascular diseases (McEwen, 1998).

Spontaneously hypertensive rats (SHR) are the mostly used animal model of genetic hypertension. The SHR develop hypertension spontaneously at the age of 5–12 weeks and their mean arterial pressure in adulthood achieves 160-180 mm Hg (in contrast to 120 mm Hg in adult WKY rats) (Behuliak *et al.*, 2015; Judy and Farrell, 1979). The sympathetic nervous system is considered to be involved in the pathogenesis of hypertension in SHR since the sympathetic activity rises concomitantly as high BP develops (Judy and Farrell, 1979). Multiple molecular, morphological and functional alterations at different levels of sympathoneural and sympathoadrenal systems were described in SHR, including enhanced activity of brain centers involved in regulation of sympathetic outflow (Matsuura *et al.*, 2002), more effective transmission through sympathetic ganglia (Magee

and Schofield, 1992), the denser sympathetic innervation in the arteries (Mangiarua and Lee, 1990), enhanced catecholamine release from adrenal medulla (Lim *et al.*, 2002), etc. The development of hypertension in SHR can be attenuated by neonatal sympathectomy (destruction of peripheral sympathetic nervous system, e.g. by guanethidine administration), but moderately elevated BP still persists in sympathectomized SHR (Lee *et al.*, 1987). The residual BP elevation can be abolished by a combination of sympathectomy with adrenal demedullation (Lee *et al.*, 1991) or with α_1 -adrenergic blockade (Korner *et al.*, 1993). On the other hand, the sympathectomy performed in adult SHR is markedly less efficient in reducing BP (Ferrari *et al.*, 1991). It is possible that after the disruption of sympathetic innervation in the vasculature of adult animals, vascular tone could be maintained by several compensatory mechanisms. The study of young prehypertensive SHR allows to reveal the abnormalities preceding hypertension development. On the other hand, the study of adult SHR with established hypertension offers a better model for the treatment of human essential hypertension.

AIMS

The goal of the thesis was to study the role of sympathoadrenal and sympathoneural systems in the development and maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rat.

Project 1 - the comparison of sympathoneural and sympathoadrenal abnormalities in young prehypertensive and adult spontaneously hypertensive rats

The aim of this project was to describe ontogenetic differences in the sympathoneural and sympathoadrenal systems between SHR and WKY rats. A comparison of prehypertensive and hypertensive animals (4 and 24 weeks of age) may reveal some important abnormalities underlying the development of hypertension in this model.

Project 2 - the effects of sympathectomy on cardiovascular system: the comparison of adult normotensive and spontaneously hypertensive rats

The aim of this project was to compare the effect of chemical sympathectomy induced by guanethidine on cardiovascular parameters in adult SHR and WKY rats. The compensatory role of adrenal hormones, renin-angiotensin system and blood pressure sensitivity to vasoconstrictors was studied.

Project 3 - the comparison of stress-induced cardiovascular and hormonal responses in adult normotensive and spontaneously hypertensive rats

The aim of this project was to compare stress-induced cardiovascular response of adult SHR and WKY rats evoked by the acute restraint and to study stress-induced changes of sympathoneural and sympathoadrenal systems in normotensive and hypertensive rats.

MATERIAL AND METHODS

Experimental groups and procedures

In Project 1, prehypertensive 4-week-old and 24-week-old (with established hypertension) male SHR rats and aged-matched WKY rats were used for experiments. Series 1 was used for direct BP measurement. Series 2 was utilized for the collection of plasma and tissue samples.

In Project 2, chemical sympathectomy was performed in adult SHR and WKY rats by a daily intraperitoneal administration of guanethidine hemisulfate (30 mg/kg of body weight; b.w.) for two weeks. Control rats were injected with saline. Series 1 was used for BP measurement by radiotelemetry. Series 2 was used for a measurement of mean arterial pressure (MAP) response to administration of catecholamines or ganglionic blocker pentolinium. Series 3 was used for a measurement of MAP response to administration of angiotensin II. Series 4 was utilized for a collection of tissue and plasma samples.

In Project 3, adult SHR and WKY rats were used for the experiment. Series 1 was used for BP measurement by radiotelemetry in freely moving animals and under the conditions of restraint stress (120 min). The rats in series 2 were subjected to either no stressor exposure (stress-naive rats), 10 min of restraint, 120 min of restraint or 120 min of restraint followed by 120 min recovery period and utilized for a collection of tissue and plasma samples. Series 3 was used for determination of plasma renin activity.

Radiotelemetric measurement of blood pressure

The rats were implanted with telemetry devices (model HD-S10, Data Sciences International, USA). Following a 10-day recovery period, basal BP was measured in freely moving rats for three days and then the experiments were started. Power spectral analysis of systolic blood pressure variability (SBPV) was done by dr. Behuliak and dr. Bencze to evaluate the low-frequency (LF; 0.2 - 0.75 Hz) component of SBPV which was reported to reflect vascular sympathetic activity (Yoshimoto *et al.*, 2011).

Restraint stress

The rats subjected to restraint were horizontally placed into transparent plastic cylinders (6.5 cm inner diameter; adjustable in length depending on animal size) equipped with ventilation holes.

Direct blood pressure measurement

Catheters were inserted into the left carotid artery (PE-50 for BP measurements) and jugular vein (PE-10 for infusion of drugs) of rats under the isoflurane anesthesia. After 24-h recovery, BP responses to intravenous drug administration were measured in conscious rats placed in small transparent cages using PowerLab system (ADInstruments, Australia).

Histochemical visualization of monoamines (SPG method)

The arteries were dipped in the glyoxylic acid solution (1% glyoxylic acid, 236 mM KH_2PO_4 and 200 mM sucrose), mounted on glass slides, dried by air cooler and the slides were heated on a

hot plate (80 °C, 5 min). Mineral oil and cover glass were added and the slides were heated again (80 °C, 90 s). The specimens were observed using fluorescent microscope Leica LMD6000 with DAPI filter cube.

Hormone assays

Plasma levels of all hormones were measured by commercial kits: catecholamines using 3-CAT Research ELISA (LDN, Germany), metanephrines using 2 MET Plasma ELISA Fast Track (LDN), ACTH ELISA (MD Bioproducts, Switzerland), Corticosterone rat/mouse ELISA (LDN), Aldosterone ELISA (LDN). Plasma renin activity was measured by PRA ELISA (Crystal Chem, USA) based on the measurement of the amount of angiotensin I generated over a specific period. The absorbance at 450 nm was read using Microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Switzerland).

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNA isolation was performed by commercial kits according to the manufacturer's instructions. In all isolated RNA samples, genomic DNA was removed with RNase-free DNase I (Qiagen, Germany). RNA was transcribed to cDNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) or SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The gene expression was determined on the LightCycler® 480 System (Roche, Switzerland) using HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (SolisBioDyne, Estonia) and TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies). Exported raw data were analyzed by software LinRegPCR (version 2013.0; Ruijter *et al.*, 2009) and the obtained values were used for relative quantification by a modified $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The data from particular tissues and under particular experimental conditions were normalized to the best combination of two reference genes which were selected by NormFinder software (Andersen *et al.*, 2004)

Western blot analysis

The reducing SDS polyacrylamide gel electrophoresis was performed using Optiblot precast 4-20 % gradient gels (Abcam, UK). Semi-dry transfer of proteins to Polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, USA) was performed with a Tris Glycine Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA) containing 10 % methanol. Subsequently, membranes were blocked with 3 % milk diluted in Tris-buffered saline with Tween (TBS-T; 137 mM NaCl, 20 mM Trizma® base and 0.1 % Tween® 20) at room temperature. Membranes were incubated with primary antibody diluted in 3 % milk TBS-T at 4 °C overnight. Subsequently, the membranes were incubated with Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit secondary antibody (1:5000, Thermo Fisher Scientific) in 3 % milk TBS-T. The horseradish peroxidase was detected using a SuperSignal West Femto reagent (Thermo Fisher Scientific) and the emitted light was captured with a chemiluminescence imaging analyzer LAS 1000 (Fujifilm, Japan).

RESULTS

Project 1 – The comparison of sympathoneural and sympathoadrenal abnormalities in young prehypertensive and adult spontaneously hypertensive rats

The expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in adrenal glands

The mRNA and protein expression of genes involved in catecholamine biosynthesis was lower in the adrenals of 4-week-old SHR compared to the age-matched WKY rats (Fig. 1A, B). The downregulation of genes involved in catecholamine biosynthesis was even more pronounced in adrenals of adult SHR (Fig. 1C, D).

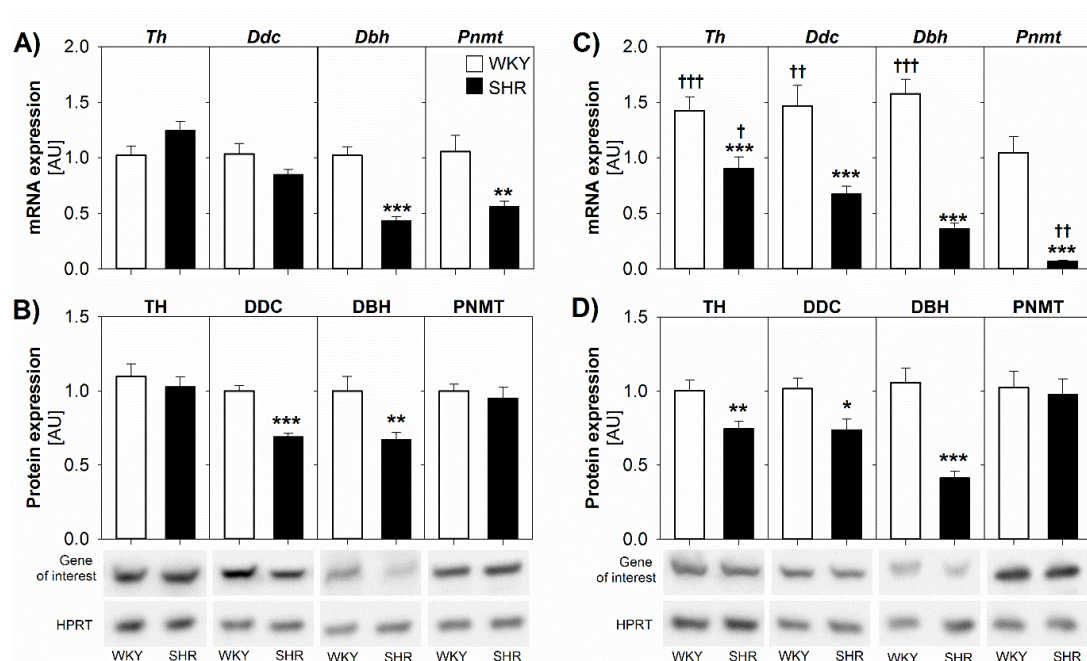


Figure 1. mRNA (A, C) and protein (B, D) expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in the adrenal glands of 4-week-old (A, B) or 24-week-old (C, D) SHR and age-matched WKY rats. * p < 0.05 vs. age-matched WKY; † p < 0.05 vs. 4-week-old rats of the same strain. Vavřínová *et al.*, 2019a

Catecholamine content in the adrenal glands

The amounts of noradrenaline and adrenaline were greater in the adrenal glands of 4-week-old SHR than in those of WKY rats (Table 1). In contrast, the amount of noradrenaline was decreased in the adrenals of adult SHR, while the amount of adrenaline was similar in comparison to WKY rats.

Table 1. Catecholamine content in adrenal gland of 4-week and 24-week-old WKY rats and SHR.

	WKY 4 weeks	SHR 4 weeks	WKY 24 weeks	SHR 24 weeks
Noradrenaline (ng/adrenal gland)	635 ± 20	782 ± 39 *	4375 ± 277 †	1654 ± 122 * †
Adrenaline (ng/adrenal gland)	1734 ± 39	2092 ± 82*	11326 ± 244 †	10522 ± 614 †

* p < 0.05 vs. age-matched WKY; † p < 0.05 vs. 4-week-old rats of the same strain. Vavřínová *et al.*, 2019a

The expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in sympathetic ganglia

The mRNA and protein expression of genes involved in catecholamine biosynthesis was lower in the sympathetic ganglia of 4-week-old SHR compared to the age-matched WKY rats (Fig. 2A, B). In the sympathetic ganglia of adult SHR, mRNA expression of *Th* gene was higher, but this change was not observed at the protein level. The mRNA expressions of *Ddc* and *Dbh* genes were lower in sympathetic ganglia of adult SHR compared to age-matched WKY rats. The protein expression of DDC enzyme was also lower, while there was no significant change in protein expression of DBH enzyme (Fig. 2C, D).

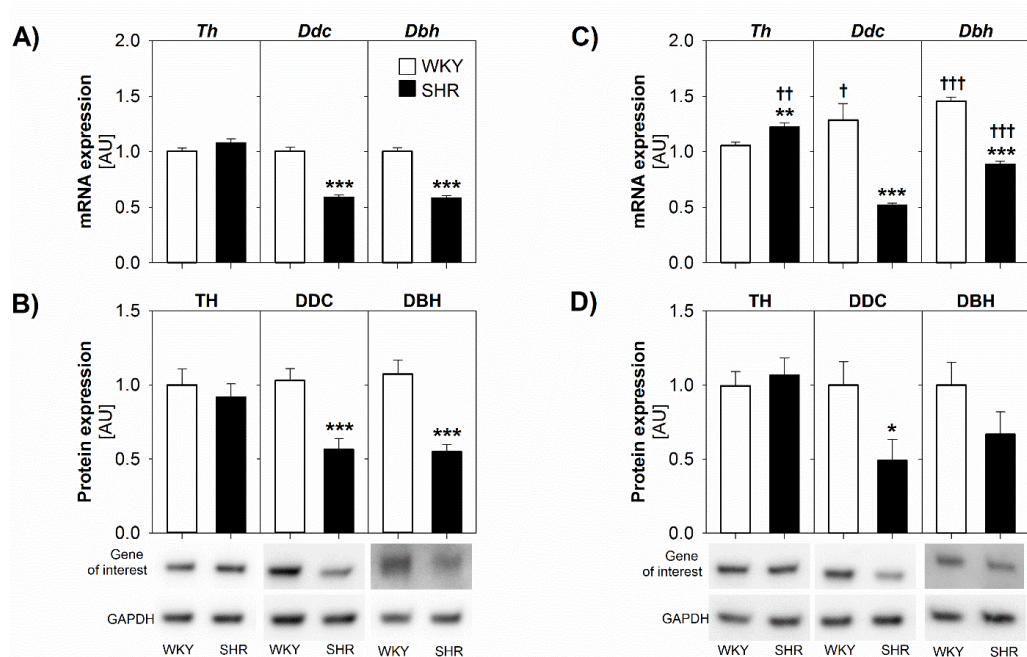
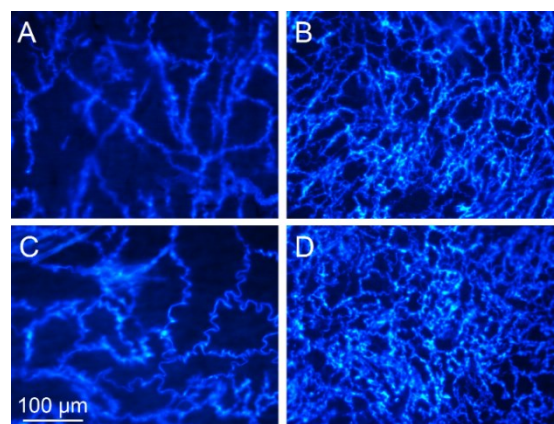


Figure 2. mRNA (A, C) and protein (B, D) expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in the sympathetic ganglia of 4-week-old (A, B) or 24-week-old (C, D) SHR and age-matched WKY rats. * $p < 0.05$ vs. WKY; † $p < 0.05$ vs. 4-week-old rats of the same strain. Vavřínová *et al.*, 2019a

Catecholamine content in the sympathetic innervation of femoral artery

Fig. 3 shows the catecholamine content in sympathetic innervation of the femoral arteries visualized by glyoxylic acid staining. The fluorescent signal was twofold higher in SHR of both ages compared to WKY rats (2.16 ± 0.08 in prehypertensive SHR, 1.99 ± 0.11 in adult SHR; $p < 0.001$).

Figure 3. The catecholamine content in the sympathetic innervation of femoral artery visualized by glyoxylic acid staining in: 4-week-old WKY rats (A), 4-week-old SHR (B), 24-week-old WKY rats (C), 24-week-old SHR (D). Vavřínová *et al.*, 2019a



Project 2 – The effects of sympathectomy on cardiovascular system: the comparison of adult normotensive and spontaneously hypertensive rats

Cardiovascular parameters measured by radiotelemetry

Control SHR had higher MAP than WKY rats during both the dark and the light phase ($p < 0.001$; Fig. 4). MAP was lowered after three days of guanethidine treatment in both strains ($p < 0.01$), and it returned back to the control level after 14 days. The low-frequency of systolic blood pressure variability (LF SBPV) was higher in control SHR than in WKY rats ($p < 0.05$; Fig. 4). The LF SBPV was markedly attenuated in both strains after 3 days and 14 days of guanethidine treatment, demonstrating the persistent effect of sympathectomy ($p < 0.001$).

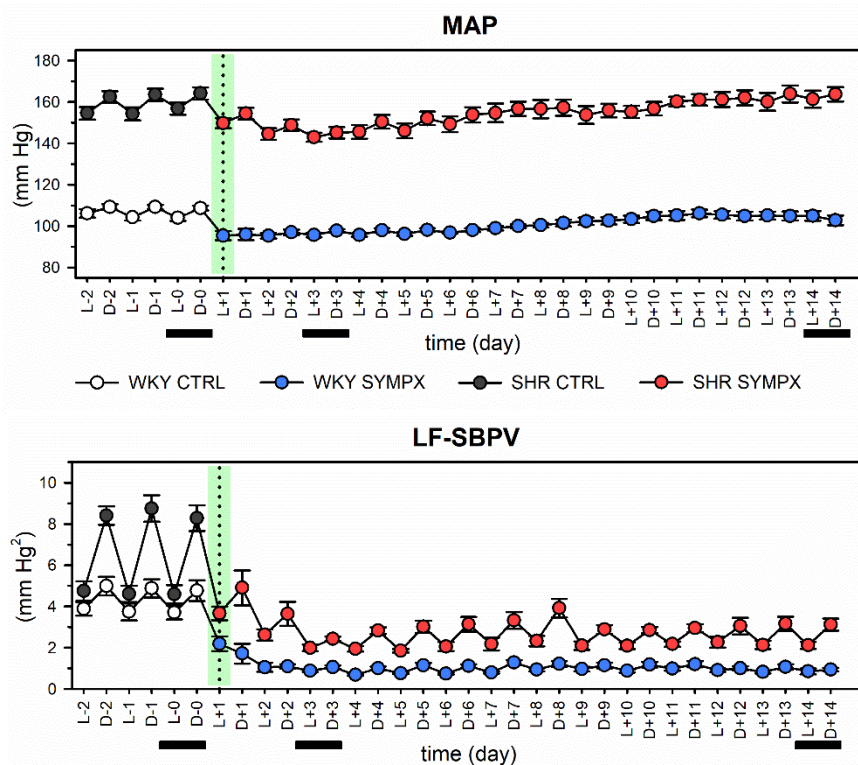


Figure 4. The time-course of mean arterial pressure (MAP) and low-frequency component of systolic blood pressure variability (LF SBPV) of WKY rats and SHR measured by telemetry before and during guanethidine administration. The first guanethidine injection was given during light phase of the first day (L+1) indicated by vertical dotted line.

We observed a higher MAP and LF SBPV response to stressor exposure in SHR than in WKY rats ($p < 0.05$; Fig. 5). The stress-induced rises of both parameters were attenuated by sympathectomy in rats of both strains ($p < 0.01$).

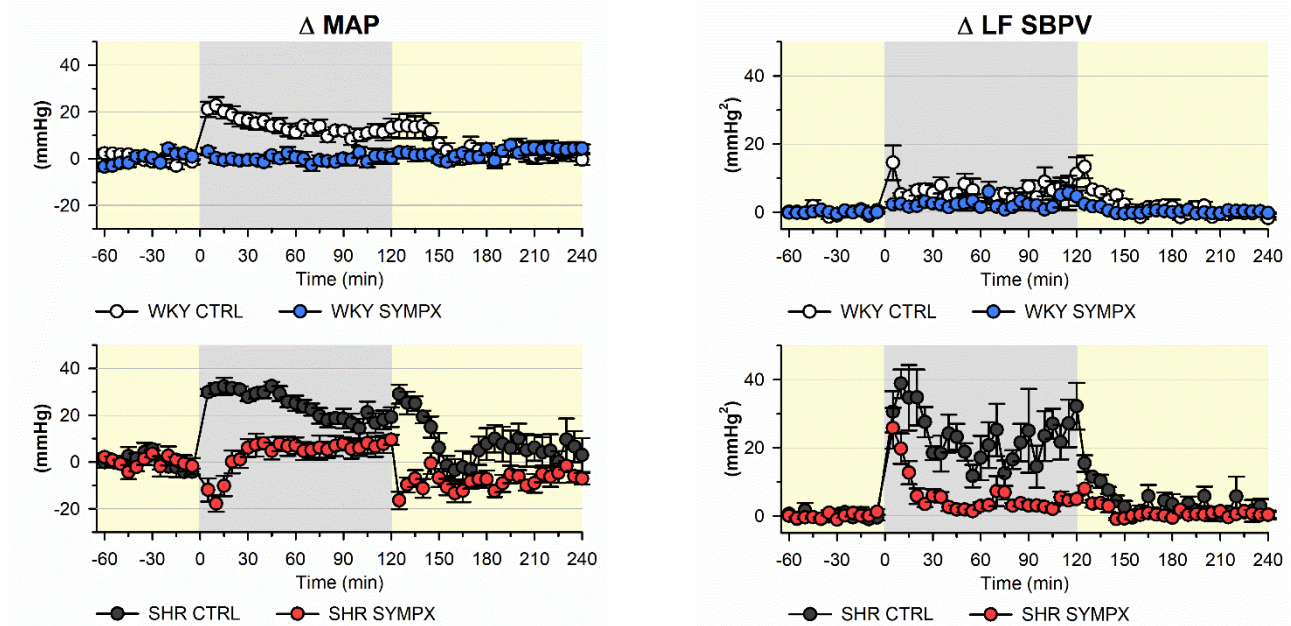


Figure 5. The time-course of changes in mean arterial pressure (MAP) and low-frequency component of systolic blood pressure variability (LF SBPV) before, during and after restraint stress (0-120 min, marked in grey) in control (CTRL) and sympathectomized (SYMPX) WKY rats and SHR.

Verification of the sympathectomy

Guanethidine-induced sympathectomy reduced the catecholamine content (visualized by glyoxylic acid staining) in the femoral arteries of both strains (-92 % in SYMPX SHR, $p < 0.001$; -88 % in SYMPX WKY rats, $p < 0.01$).

The administration of ganglionic blocker pentolinium decreased the MAP more in control SHR than WKY rats ($p < 0.05$) and sympathectomy attenuated MAP response to pentolinium in both strains (CTRL SHRs, -47 ± 3 mm Hg; CTRL WKY rats, -38 ± 1 mm Hg; SYMPX SHRs, -7 ± 4 mm Hg; SYMPX WKY rats, -15 ± 4 mm Hg).

The catecholamine releasing agent tyramine increased MAP similarly in SHR and WKY rats, and the effect was almost completely abolished by sympathectomy (CTRL SHRs, 48 ± 4 mm Hg; CTRL WKY rats, 49 ± 5 mm Hg; SYMPX SHRs, 4 ± 1 mm Hg; SYMPX WKY rats, 6 ± 2 mm Hg; $p < 0.001$).

Cardiovascular responses to catecholamines

Sympathectomy induced the enhancement of MAP sensitivity to noradrenaline (up to 14-fold) and adrenaline (up to 10-fold) in both SHR and WKY rats (Fig. 6) as was documented by the leftward shift of the dose-response curves in sympathectomized animals.

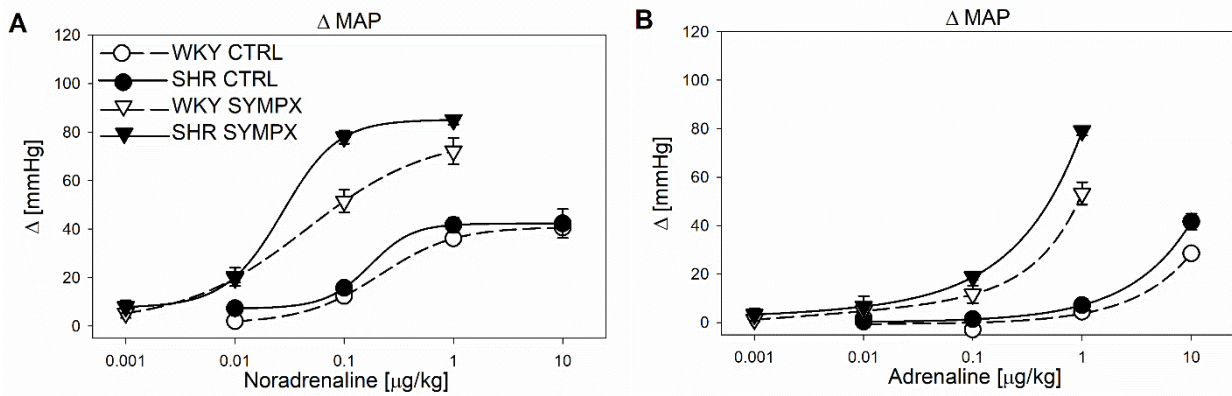


Figure 6. Mean arterial pressure (MAP) response to the intravenous administration of noncumulative doses of noradrenaline (A), or adrenaline (B) in conscious control (CTRL) and sympathectomized (SYMPX) WKY rats and SHR. Vavřínová *et al.*, 2019b

Plasma and adrenal catecholamines

Sympathectomy decreased plasma levels of noradrenaline in both strains (Table 2). Guanethidine treatment elevated plasma levels of adrenaline and this effect was more pronounced in WKY rats (4-fold increase in SYMPX WKY rats vs. 1.5-fold increase in SYMPX SHR).

There was a lower noradrenaline content in the adrenal glands of control SHR than in those of WKY rats, and sympathectomy increased the noradrenaline content in the adrenal glands of WKY rats but not in those of SHR (Table 2). Moreover, SHR exhibited a lower adrenal content of adrenaline than WKY rats, and sympathectomy increased the adrenaline content in the adrenal glands irrespective of the strain.

Table 2. Catecholamines in plasma and adrenal gland of control (CTRL) and sympathectomized (SYMPX) WKY rats and SHR.

	CTRL		SYMPX		two-way ANOVA		
	WKY	SHR	WKY	SHR	Strain	Treatment	Interaction
Plasma							
Noradrenaline (ng/ml)	0.38 ± 0.06	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	NS	p<0.001	NS
Adrenaline (ng/ml)	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.05	1.24 ± 0.17 †	0.48 ± 0.04 *†	p<0.01	p<0.001	p<0.001
Adrenal gland							
Noradrenaline (ng/adrenal gland)	4840 ± 282	2388 ± 280 *	7320 ± 847 †	2642 ± 166 *	p<0.001	p<0.05	p<0.05
Adrenaline (ng/adrenal gland)	13990 ± 480	12770 ± 370	16060 ± 640	13390 ± 460	p<0.001	p<0.05	NS

* p < 0.05 vs. WKY; † p < 0.05 vs. CTRL rats of the same strain. NS, nonsignificant. Vavřínová *et al.*, 2019b

Gene expression in the adrenal medulla

The mRNA expression of genes involved in catecholamine biosynthesis (*Th*, *Ddc*, *Dbh* and *Pnmt*) was lower in the adrenal medulla of SHR compared to WKY rats. Guanethidine treatment increased the mRNA expression of *Th*, *Dbh* and *Pnmt* genes in the adrenal medulla (Fig. 7).

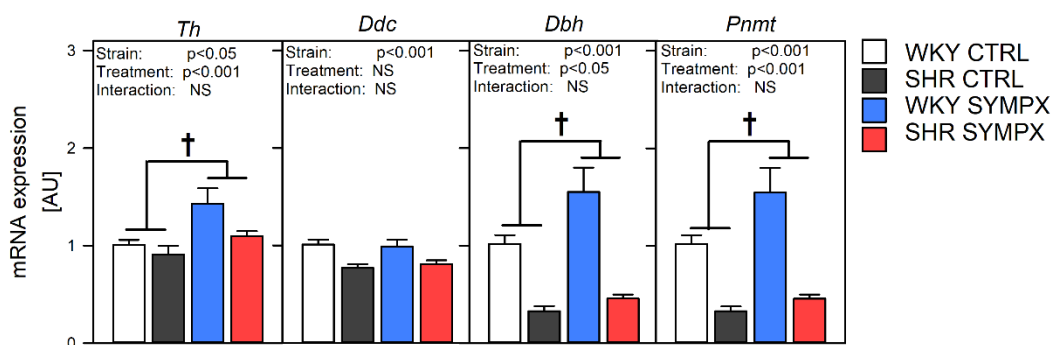


Figure 7. mRNA expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in adrenal medulla of control (CTRL) a sympathectomized (SYMPX) WKY a SHR rats.

Project 3 – The comparison of stress-induced cardiovascular and hormonal responses in adult normotensive and spontaneously hypertensive rats

Plasma hormones

Plasma noradrenaline levels were increased after 10 min of restraint in both SHR and WKY rats ($p<0.001$ for both strains) and stress-induced noradrenaline level was higher in SHR compared to WKY rats (SHR vs. WKY rats: $p<0.01$; Fig. 8A). Restraint increased normetadrenaline, adrenaline and metadrenaline levels after 10 min only in SHR but not in WKY rats (SHR vs. WKY rats: $p<0.01$; Fig. 8B, C, D). After 120 min of restraint, adrenaline levels returned back to basal levels in SHR, but they were increased in WKY rats (SHR vs. WKY rats: $p<0.01$; Fig. 8C).

ACTH increase after 10 min of restraint was more pronounced in SHR (SHR vs. WKY rats: $p<0.001$; Fig. 9A). After 120 min recovery, ACTH levels returned back to the basal level in WKY rats but remained increased in SHR (SHR vs. WKY rats: $p<0.05$). Similarly, restraint-induced corticosterone increase was more pronounced in SHR than in WKY rats (SHR vs. WKY rats: $p<0.01$ after 10 min, $p<0.001$ after 120 min; Fig. 9B).

Plasma renin activity was lower in SHR than in WKY rats ($p<0.001$ for all time-points; Fig. 9C). Stress-induced aldosterone levels were lower in SHR than those observed in WKY rats ($p<0.001$ after 10 min, $p<0.01$ after 120 min and $p<0.05$ after recovery; Fig. 9D).

Figure 8. Plasma levels of noradrenaline (A), normetadrenaline (B), adrenaline (C) and metadrenaline in stress-naive and restrained WKY rats and SHR. * $p < 0.05$ vs. WKY rats; † $p < 0.05$ vs. CTRL rats. ND, not determined.

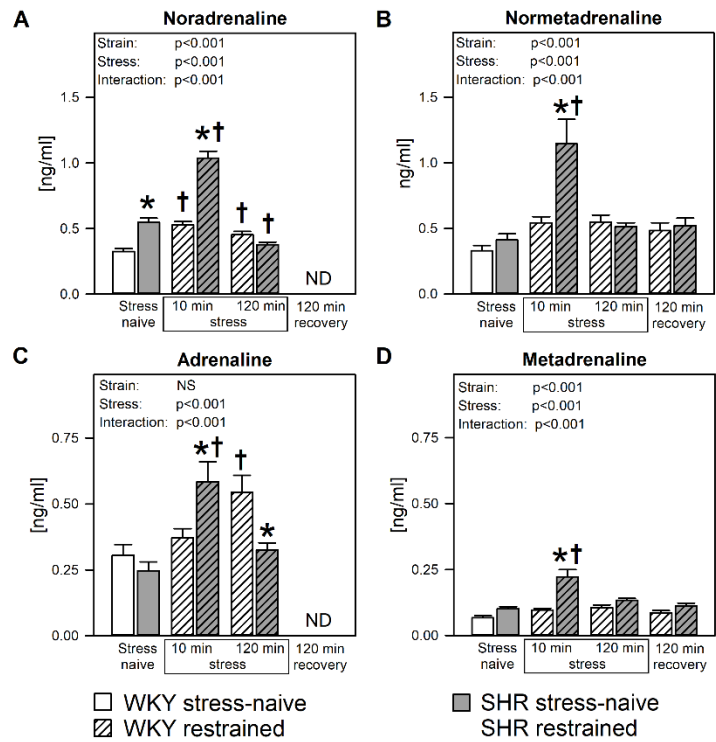
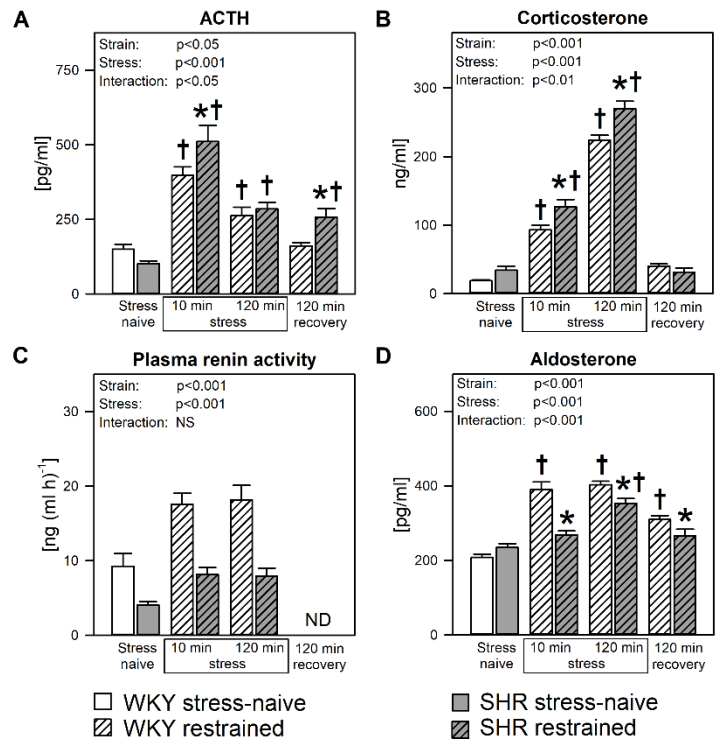
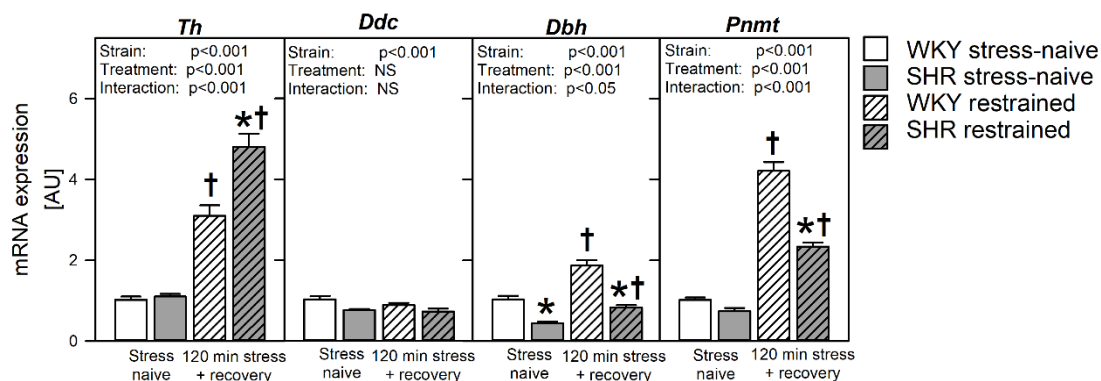


Figure 9. Plasma levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH; A) and corticosterone (B), as well as plasma renin activity (C) and aldosterone plasma levels (D) in stress-naive and restrained WKY rats and SHR. * $p < 0.05$ vs. WKY rats; † $p < 0.05$ vs. CTRL rats. ND, not determined.



Gene expression in the adrenal medulla

The restraint stress caused 4-fold increase in mRNA expression of *Th* gene in both SHR and WKY rats ($p < 0.001$ for both strains) and *Th* expression was higher in restrained SHR than in restrained WKY rats ($p < 0.001$; Fig. 10). The mRNA expression of *Ddc*, *Dbh* and *Pnmt* genes was lower in adrenal medulla of stress-naive as well as restrained SHR compared to WKY rats.



Obrázek 10. The mRNA expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in adrenal medulla of stress-naive and restrained (120 min of restraint + 120 min recovery) WKY rats and SHR. * $p < 0.05$ vs. WKY potkani; † $p < 0.05$ vs. nestresovaní potkani stejného kmene.

The mRNA expression of *Agtr2* gene was similar in SHR and WKY rats and it was substantially decreased after the restraint stress in both strains (Table 3). The mRNA expression of *Agtr1a* gene was lower in SHR and it was not affected by stress. *Agtr1b* gene was also underexpressed in SHR and its mRNA expression decreased after the restraint stress in rats of both strains.

Table 3. The mRNA expression of genes for angiotensin II receptors in adrenal medulla of stress-naive and restrained (120 min of restraint + 120 min recovery) WKY rats and SHR.

Gene symbol	Ratio mean SHR/ mean WKY (arbitrary units)				two-way ANOVA		
	Stress-naive		After 120 min restraint and 120 min recovery				
	WKY	SHR	WKY	SHR	Strain	Restraint	Interaction
<i>Agtr1a</i>	1.02 ± 0.07	0.69 ± 0.07	1.16 ± 0.07	0.84 ± 0.09	$p < 0.001$	NS	NS
<i>Agtr1b</i>	1.10 ± 0.17	0.57 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.29 ± 0.08	$p < 0.01$	$p < 0.001$	NS
<i>Agtr2</i>	1.06 ± 0.13	0.95 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.42 ± 0.16	NS	$p < 0.001$	NS

* $p < 0.05$ vs. WKY; † $p < 0.05$ vs. stress-naive rats of the same strain. NS, nonsignificant.

DISCUSSION

In the Project 1, we observed a dissociation between the decreased expression of genes involved in catecholamine biosynthesis (in both sympathoneural and sympathoadrenal system) and the elevated density of vascular sympathetic innervation as well as increased adrenal content of catecholamines in prehypertensive SHR. The higher density of vascular sympathetic innervation in prehypertensive SHR was reported earlier (Mangiarua and Lee, 1990). In line with this finding, we found a higher plasma level of noradrenaline in prehypertensive SHR compared to WKY rats which is also consistent with previous report (Grobeck *et al.*, 1976). In the adrenal glands of SHR with established hypertension, the pathway of catecholamine biosynthesis was downregulated at the various levels, i.e. mRNA expression, protein expression and the catecholamine content which is in accordance with previous studies (Grundt *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2005). Such downregulated expression was also present in the sympathetic ganglia of adult SHR, but it was not associated with a decrease of catecholamine content in vascular wall. At the age of 4 weeks, SHR are still normotensive or their blood pressure (BP) is only slightly increased but they already show higher sympathetic activity and increased heart rate (Behuliak *et al.*, 2015; Judy *et al.*, 1979). The downregulation of the expression of genes involved in catecholamine biosynthesis might be a compensatory mechanism counteracting the hyperfunction of the sympathoneural system and which develops concurrently with the progression of hypertension in SHR.

In the Project 2, sympathectomy by chronic guanethidine administration reduced BP and low-frequency of systolic blood pressure variability (LF SBPV; marker of vascular sympathetic activity) in both SHR and WKY rats after three days of treatment. LF SBPV was still decreased after 14 days of guanethidine treatment, but BP in sympathectomized animals returned back to the level observed in untreated animals. Similarly to our finding, Johnson and O'Brien (1976) reported that chronic guanethidine treatment of adult Sprague-Dawley rats did not significantly change the resting BP. In contrast, Benarroch *et al.* (1990) observed the lowering of basal BP in adult Sprague-Dawley rats treated with guanethidine. Nevertheless, we also found BP reduction in rats treated with guanethidine for 14 days but this was observed only under the conditions of acute restraint stress. BP recovery to the control values in freely moving animals cannot be ascribed to an insufficient degree of sympathectomy, as indicated by the decreased catecholamine fluorescent signal in femoral arteries, attenuated LF SBPV and reduced BP response to ganglionic blocker pentolinium and catecholamine releasing agent tyramine in sympatectomized rats. We demonstrated the enhancement of BP sensitivity to noradrenaline (up to 14-fold) and adrenaline (up to 10-fold) following sympathectomy in both SHR and WKY rats which is in accordance with the increased BP response to the α_1 -adrenergic agonist phenylephrine observed in adult WKY rats treated with 6-hydroxydopamine (Rizzoni *et al.*, 2000). Moreover, we observed the elevation of plasma adrenaline in guanethidine-treated rats which can be ascribed to adrenal enlargement and to enhanced expression of genes involved in catecholamine biosynthesis. This is in agreement with previous data concerning

sympathectomy in Sprague-Dawley rats (Kvetnansky *et al.*, 1979b; Qiu *et al.*, 1999). However, the sympathectomy did not restore the downregulated expression of genes involved in catecholamine biosynthesis in adrenal gland of adult SHR which suggests that this downregulation is not caused by a direct negative feedback compensating sympathetic hyperactivity in this strain.

In the Project 3, we demonstrated that exaggerated cardiovascular response to restraint in SHR is accompanied by higher stress-induced plasma levels of catecholamines and their metabolites. These findings are in a good agreement with previous observations concerning immobilization stress in SHR (Kvetnansky *et al.*, 1979a). Moreover, we observed a greater elevation of mRNA expression of *Th* gene in adrenal medulla of stressed SHR compared to WKY rats which is consistent with previous studies (Grundt *et al.*, 2009). The induction of *Th* gene in adrenal gland is considered to be primarily mediated by sympathetic neural activity (Axelrod and Reisine, 1984). It was reported that the sympathetic activity is increased in splanchnic and renal nerves of SHR (Judy *et al.*, 1979; Judy and Farrell, 1979) and we also observed markedly elevated sympathetic activity (documented by LF SBPV) in SHR under the stress conditions. On the other hand, we observed a lower expression of other genes involved in catecholamine biosynthesis (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) in adrenal medulla of stress-naive as well as stressed SHR. Catecholamine release as well as the expression of enzymes involved in catecholamine biosynthesis are also regulated by angiotensin II (Sabban, 1997). We observed an attenuated plasma renin activity in adult SHR which is consistent with the previous reports (Freeman *et al.*, 1975; Sen *et al.*, 1972). Moreover, the expression of receptors for angiotensin II was also reduced in SHR. These findings suggest that the decreased stimulation of adrenal chromaffin cells by angiotensin II in SHR might underlie the decreased expression of enzymes involved in catecholamine biosynthesis in this hypertensive strain. Furthermore, we found higher plasma corticosterone and ACTH levels in SHR subjected to restraint which is in accordance with previous papers concerning SHR subjected to immobilization (Djordjevic *et al.*, 2007; Kvetnansky *et al.*, 1979a). We have recently demonstrated an important permissive and/or stimulating role of glucocorticoids in the maintenance of sympathetically mediated peripheral vascular resistance and in the adequate response of cardiovascular system to stressor exposure (Bencze *et al.*, 2020). Thus, the response of cardiovascular system to the enhanced activation of sympathoneural and sympathoadrenal systems in SHR might be even intensified by glucocorticoid excess found in this strain.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In my PhD Thesis, I studied the role of sympathoneural and sympathoadrenal systems in the development and maintenance of high blood pressure of the spontaneously hypertensive rats (SHR). We found increased adrenal catecholamine content and increased density of sympathetic innervation in prehypertensive SHR that might contribute to the pathogenesis of high blood pressure. The downregulation of the expression of genes involved in catecholamine biosynthesis (*Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) is probably a compensatory mechanism developing concurrently with the progression of hypertension and counteracting the hyperfunction of the sympathoneural system. The suppression of catecholamine biosynthesis leads to a lower catecholamine content in the adrenal glands in adult SHR. We documented a greater role of sympathetic nervous system in blood pressure maintenance in adult SHR compared to WKY rats. However, chemical sympathectomy by guanethidine is not an effective method for permanent blood pressure lowering in adult SHR. This might be explained by the involvement of compensatory mechanisms in sympathectomized rats, such as the more than tenfold increase in BP sensitivity to catecholamines and the increased plasma levels of adrenaline. Finally, we demonstrated exaggerated cardiovascular response and excessive activation of sympathoneural and sympathoadrenal systems during the acute restraint in adult SHR compared to WKY rats. SHR also showed the overactivation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis which might intensify sympathetically mediated rise in peripheral vascular resistance. In line with sympathetic hyperactivity, we observed a greater elevation of mRNA expression of *Th* gene in the adrenal medulla of stressed SHR compared to WKY rats. In contrast, the expression of other genes involved in catecholamine biosynthesis (*Ddc*, *Dbh*, *Pnmt*) remained lower in adrenal medulla of stressed SHR. The possible explanation might be a lower stimulation of adrenal chromaffin cells by angiotensin II resulting from the attenuated plasma renin activity and the decreased expression of adrenal angiotensin II receptors observed in SHR. In conclusion, the data presented in my PhD Thesis confirmed that the sympathetic nervous system contributes to the development and maintenance of high blood pressure in SHR. Its effects on cardiovascular system might be potentiated by the excessive activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis observed in this rat strain. Similar mechanisms are involved in the development and maintenance of high blood pressure in humans. Therefore, the investigation of abovementioned phenomena in SHR can contribute to a better understanding and treatment of human essential hypertension. The resistance of adult SHR to the treatment targeting the peripheral sympathetic nervous system can provide an insight into the compensatory mechanisms which counteract the effective treatment of high blood pressure. Therefore, the drugs affecting central regulation of cardiovascular system (e.g. ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers) might be better for the effective lowering of blood pressure in hypertension.

CURRICULUM VITAE

Anna Vavřínová, born July 15, 1989

Education

- 2013 – Present Doctoral study, programme Animal Physiology
Faculty of Science, Charles University
- 2011 – 2013 Master study, programme Biology
Faculty of Science, Charles University
- 2008 – 2011 Bachelor study, programme Special Chemical and Biological Programmes
Faculty of Science, Charles University

Projects

- 2016 - 2018 principal investigator of student project GAUK 1071416 The role of sympathetic nervous system and adrenal medulla in high blood pressure maintenance of SHR rats (The Charles University Grant Agency)
- 2014 - 2016 principal investigator of student project GAUK 966214 The contribution of sympathetic nervous system in the development of genetic hypertension (The Charles University Grant Agency)

Awards

- 2016 Investigators' Travel Grants from the Organizing Committee of Hypertension Seoul 2016
- 2014 The SHR Society Award