

Interaction of perivascular adipose tissue and H₂S in mesenteric artery in experiment

Interakcia perivaskulárneho tukového tkaniva a H₂S v mezenterickej artérii v experimente

Golas S¹, Berényiová A¹, Majzúnová M^{1,2}, Čáčányiová S¹

¹Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Golas S, Berenyiova A, Majzunova M, Cacanyiova S. **Interaction of perivascular adipose tissue and H₂S in mesenteric artery in experiment.** Cardiology Lett. 2021;30(1):42–51

Abstract. *Introduction:* Perivascular adipose tissue (PVAT) and hydrogen sulphide (H₂S) play important role in modulation of vasoactive responses and may interfere with the etiopathogenesis of essential hypertension. The aim of this study was to evaluate the mutual relationship between PVAT and H₂S (endogenously produced and exogenous) in vasoactive responses of isolated mesenteric arteries in adult normotensive (Wistar) and spontaneously hypertensive rats (SHR).

Material and methods: Adult male Wistar and spontaneous hypertensive rats (SHRs) were used. Changes in the isometric tension of MA with or without PVAT were measured after transmural nerve stimulation (TNS), after application of exogenous noradrenaline (NA) and also after exogenously administered H₂S. A cystathionine γ-lyase inhibitor, propargylglycine, was used to inhibit endogenous H₂S production.

Results: In SHR, hypertension was associated with cardiac hypertrophy and increased arterial contractility, but there were no differences in the amount of retroperitoneal fat between the strains. In SHR, unlike in Wistar rats, PVAT exhibited a pro-contractile effect on contractions mediated by endogenous noradrenaline released from arterial sympathetic nerves. On the other hand, PVAT exhibited the anticontractile effect on exogenous noradrenaline-induced vasoconstriction in both rat strains, but more significantly in SHR. The endogenous H₂S produced by both the vascular wall and PVAT demonstrated an anti-contractile effect on the exogenous noradrenaline-induced vasoconstriction in Wistar rats. In SHR, H₂S produced by the vascular wall exhibited a pro-contractile effect that was eliminated by the presence of PVAT but not by H₂S produced by it. Nevertheless, unlike in Wistar rats, the presence of PVAT potentiated the vasorelaxant effect of exogenously applied H₂S in SHR.

Conclusion: Our results confirmed that PVAT of mesenteric artery and endogenously produced H₂S exhibit both pro-contractile and anti-contractile properties depending on the type of activated signaling pathway. In SHR, unlike in Wistar rats, the pro-contractile effect of PVAT was associated with perivascular nerve stimulation and, together with the pro-contractile effect of H₂S produced by the vascular wall, contributed to pathological changes in SHR. On the other hand, the PVAT of the hypertensive mesenteric artery is endowed with compensatory vasoactive mechanisms, which include both its anticontractile effect and potentiation of the vasorelaxant effect of exogenous H₂S. Fig. 5, Tab. 1, Ref. 26, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: H₂S – mesenteric artery – perivascular adipose tissue – normotensive rats – SHR – propargylglycine

Primárna práca bola uverejnená v časopise Journal of Physiology and Pharmacology: S. Cacanyiova, M. Majzunova, S. Golas, A. Berenyiova. The role of perivascular adipose tissue and endogenous hydrogen sulfide in vasoactive responses of isolated mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. JPP 2019;70:295-306

Z¹Ústavu normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava a ²Katedry živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 25. septembra 2019; prijaté dňa 28. novembra 2019

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Soňa Čáčányiová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Sienkiewiczova 1, 813 71 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: sona.cacanyiova@savba.sk

Golas S, Berényiová A, Majzúnová M, Čačányiová S. **Interakcia perivaskulárneho tukového tkaniva a H₂S v mezenterickej artérii v experimente.** *Cardiology Lett.* 2021;30(1):42–51

Abstrakt. *Úvod:* Perivaskulárne tukové tkanivo (PVAT) a sírovodík (H₂S) plnia dôležitú úlohu pri modulácii vazoaktívnych odpovedí a môžu byť zapojené do etiopatogenézy esenciálnej hypertenzie. Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť vzájomný vzťah medzi PVAT a H₂S (endogénne produkovaným a exogénnym) vo vazoaktívnych odpovediach izolovaných mezenterických artérií (MA) u dospelých normotenzných (Wistar) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR).

Materiál a metódika: Použili sa dospelé samce Wistar a spontánne hypertenzných potkanov (SHR). Zmeny izometrického napätia MA so zachovaným alebo odstráneným PVAT sa hodnotili po transmuralnej nervovej stimulácii (TNS), po aplikácii exogénneho noradrenalínu (NA) a taktiež po exogénne podanom H₂S. Na inhibíciu endogénnej produkcie H₂S sa použil inhibítor cystationín γ -lyázy, propargylglycín.

Výsledky: U SHR sa hypertenzia spájala so srdcovou hypertrofiou a zvýšenou cievnou kontraktilitou, avšak medzi kmeňmi neboli žiadne rozdiely v množstve retroperitoneálneho tuku. U SHR, na rozdiel od Wistar potkanov, vykazovalo PVAT prokontraktilný účinok na kontrakcie sprostredkované endogénnym noradrenalínom uvoľňovaným z arteriálnych sympatikových nervov. Na druhej strane, PVAT prejavovalo antikontraktilný účinok na vazokonstrikciu vyvolanú exogénnym noradrenalínom u oboch kmeňoch potkanov, ale výraznejšie u SHR. Endogénny H₂S produkovaný cievnou stenou aj PVAT preukázal antikontraktilný účinok na vazokonstrikciu vyvolanú exogénnym noradrenalínom u Wistar potkanov. U SHR vykazoval H₂S produkovaný cievnou stenou pro-kontraktilný účinok, ktorý bol síce eliminovaný prítomnosťou PVAT, nie však ním produkovaným H₂S. Prítomnosť PVAT zosilňovala vazorelaxačný účinok exogénne aplikovaného H₂S u SHR avšak nie u normotenzných potkanov.

Záver: Naše výsledky potvrdili, že PVAT mezenterickej artérie a endogénne produkovaný H₂S vykazujú prokontraktilné aj antikontraktilné vlastnosti v závislosti od typu aktivovanej signálnej dráhy. U SHR, na rozdiel od potkanov Wistar, je pro-kontraktilný účinok PVAT spojený so stimuláciou perivaskulárnych nervov a spolu s prokontraktilným účinkom H₂S produkovaného cievnou stenou prispel k patologickým zmenám SHR. Na druhej strane, PVAT hypertenznej mezenterickej artérie je vybavené kompenzačnými vazoaktívnymi mechanizmami, ktoré zahŕňajú jednak jeho antikontraktilný účinok, ako aj potenciáciu vazorelaxačného účinku exogénneho H₂S. Obr. 5, Tab. 1, Lit. 26, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: H₂S – mezenterická artéria – perivaskulárne tukové tkanivo – normotenzné potkany – SHR – propargylglycín

Perivaskulárne tukové tkanivo (PVAT) predstavuje špecifický depozit tukového tkaniva obklopujúci krvné cievy. Okrem poskytovania mechanickej ochrany je PVAT dôležitým sekrečným orgánom vzhľadom na jeho schopnosti uvoľňovať biologicky účinné molekuly, okrem iných aj vazoaktívne. Výsledky získané v ostatných rokoch potvrdzujú, že PVAT má vo fyziologických podmienkach najmä antikontraktilné účinky, ktoré môžu byť sprostredkované tzv. relaxačným faktorom odvodeným od adipocytov (ADRF). Schleifenbaum et al. (1) považujú za potenciálneho kandidáta ADRF sírovodík (H₂S), ktorý je v súčasnosti známy ako dôležitá signálna molekula. Autori pozorovali, že inhibícia endogénneho H₂S nemala žiadny vazoaktívny účinok na mezenterické artérie a aorty izolované z normotenzných potkanov a myši v prípade, ak mali odstránený perivaskulárny tuk. Na druhej strane, zachované PVAT preukázalo antikontraktilný účinok, ktorý vymizol po inhibícii endogénnej syntézy H₂S. Okrem PVAT(2), môže byť však H₂S produkovaný aj hladkými svalovými (3) a endotelovými bunkami (4). Navyše sa ukázalo, že H₂S má duálny vazoaktívny účinok, keďže okrem vazorelaxačného a antikontraktilného pôsobenia môže mať aj vazokonstriktorický efekt (5). Všetky tieto skutočnosti naznačujú, že signálne dráhy H₂S môžu mať aj komplexnejší charakter.

Literárne údaje potvrdzujú, že oba systémy, PVAT a H₂S, môžu interferovať s etiopatogenézou esenciálnej hypertenzie. Viaceré práce naznačujú, že u spontánne hypertenzných potkanov (SHR) môže byť benefičný účinok bioaktívnych látok produkovaných PVAT na cievnú stenu znížený. Torok et al. (6) potvrdili antikontraktilný účinok PVAT v mezenterických artériách normotenzných Wistar Kyoto potkanov, ktorý bol na druhej strane u SHR významne znížený. Podobne Galvez et al. (7) zistili, že SHR mali v mezenterickom riečisku kvantitatívne menej PVAT, čo viedlo k jeho zníženej funkcii a mohlo tak pri tomto modeli hypertenzie prispievať k zvýšenej cievnej rezistencii. Čo sa týka účasti signálnej dráhy H₂S, pokusy s použitím dospelých SHR potvrdili, že po podávaní exogénneho H₂S hypertenzným potkanom dochádza k čiastočnému zabráneniu hypertenzie a remodelácii tepien (5). Xiao et al. (8) zasa ukázali, že exogénny H₂S bol schopný inhibovať produkciu reaktívnych foriem kyslíka a potlačiť cievny oxidačný stres u hypertenzných zvierat. V našich predchádzajúcich štúdiách sme potvrdili, že exogénne aplikovaný H₂S môže plniť úlohu v kompenzačných mechanizmoch hrudnej aorty u SHR a znižovať zvýšený cievny tonus senzitívnejšie ako u normotenzných zvierat (9, 10). Vzájomný vzťah medzi vazoaktívnym pôsobením PVAT a H₂S endogénne produkovaným v cievnom

systéme v podmienkach esenciálnej hypertenzie však nebol doteraz skúmaný. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať úlohu PVAT a endogénne produkovaného H_2S v kontraktilných odpovediach izolovanej mezenterickej artérie normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov. Pre porovnanie sme testovali aj vazoaktívny účinok exogénneho donora H_2S .

Súbor a metodika

Experimentálne zvieratá

Zvieratá boli chované v súlade so schválenými podmienkami Štátneho veterinárneho a potravinového ústavu Slovenskej republiky a Výboru pre etické postupy na zvieratách, klinické a ďalšie biomedicínske experimenty (číslo povolenia: EC/CEM/2017/4) Centra experimentálnej medicíny, ako aj v súlade s Európskym dohovorom o ochrane stavovcov používaných na pokusné a iné vedecké účely a Smernice 2010/63/EÚ Európskeho parlamentu. Všetky potkany použité v tejto štúdiu boli získané z akreditovaného chovného zariadenia Ústavu normálnej a patologickej fyziológie, Centra experimentálnej medicíny, Slovenskej akadémie vied. Zvieratá boli chované v podmienkach 12 hodín svetlo – 12 hodín tma pri konštantnej vlhkosti (45 – 65 %) a teplote (20 – 22 °C) s voľným prístupom k štandardnej laboratórnej potrave potkanov a pitnej vode (ad libitum).

Základné parametre

Na skúmanie vazoaktívnych vlastností izolovanej mezenterickej artérie sa v tejto štúdiu použili samce potkanov Wistar vo veku 16 týždňov ($n = 8$) a SHR ($n = 8$). Telesná hmotnosť (TH) každého potkana bola stanovená pred dekapitáciou. Systolický krvný tlak (STK) sa meral u predhriatych potkanov neinvazívnou pletyzmografickou metódou na ich chvostových artériách pred začiatkom štúdie *in vitro*. Po krátkej anestézii s CO_2 sa potkany usmrtili dekapitáciou a zväžilo sa ich srdce a retroperitoneálny tuk a merala sa dĺžka holennej kosti (tibia). Na ďalšie funkčné vyšetrenie *in vitro* bola izolovaná *a. mesenterica superior*. Vzorky plazmy sa odobrali ihneď po dekapitácii a zmrazili v alikvótoch na biochemické stanovenie. Bazálne hladiny cholesterolu (Chol), lipoproteínového cholesterolu s vysokou hustotou (HDL), lipoproteínového cholesterolu s nízkou hustotou (LDL), triacylglycerolov (TAG) a glukózy (GLU) komerčne stanovila spoločnosť Laboklin GMBH. Hodnoty parametrov predstavovali postprandiálne koncentrácie. Vyhlí sme sa 24-hodinovému hladovaniu, aby nenastala stimulácia mobilizácie lipidov a následná lipolýza v PVAT mezenterickej artérie, čo by mohlo ovplyvniť sledovanú vazoaktivitu.

Funkčná štúdia

Cievy sme rozdelili do dvoch skupín: s odstráneným PVAT (PVAT⁻) a s intaktným PVAT (PVAT⁺) kvôli rozlíšeniu

vplyvu H_2S produkovaného arteriálnou stenou od účinku celkového H_2S produkovaného arteriálnou stenou aj okolitým PVAT. Následne bola mezenterická artéria s intaktným endotelom očistená od spojivového tkaniva a narezaná na prstence s dĺžkou 3 mm. Prstence sme pripevnili na tenké drôty a vodorovne upevnili. Ponorili sme ich do 10 ml inkubačného orgánového kúpeľa s Krebsovým roztokom (NaCl 118 mmol/l, KCl 5 mmol/l, $NaHCO_3$ 25 mmol/l, $MgSO_4$ 7 H_2O 1,2 mmol/L, KH_2PO_4 1,2 mmol/L, $CaCl_2$ 2,5 mmol/L, glukóza 11 mmol/L, $CaNa_2EDTA$ 0,032 mmol/L). Tento roztok bol okysličený zmesou 95 % O_2 a 5 % CO_2 a udržiavaný pri 37 °C. Zmeny izometrického napätia sa merali pomocou elektromechanického snímača zmien tenzie (MDE, Budapešť, Maďarsko) a registrovali pomocou AD prevodníka a softvéru Dewesoft (Dewetron, Praha, Česká republika). Na každý prstenec sa aplikovalo predpätie 0,7 g a cievy sa nechali ustáliť počas 45 až 60 minút.

Na začiatku experimentu sa pridal do orgánového kúpeľa KCl (125 mmol/L, fyziologický Krebsov roztok sa vymenil za roztok, v ktorom sa NaCl nahradil za ekvimolárnu koncentráciu KCl) na dve minúty, aby sa potvrdila dostatočná kontraktilita vzorky. Po premytí Krebsovým roztokom a ustálení sa sledovali kontraktilné odpovede. Adrenergne kontrakcie sme sledovali v mezenterických artériách ako odpovede na kumulatívne aplikovaný exogénny noradrenalín (NA 10^{-10} – 10^{-5} mol/L), alebo ako neurogénne odpovede vyvolané elektrickou stimuláciou periarteriálnych sympatikových nervov. Transmurálna nervová stimulácia (TNS) sa uskutočnila pomocou dvoch platinových elektród umiestnených po oboch stranách preparátu, ktoré boli napojené na elektrický stimulátor (MDE, Maďarsko). Krivky závislosti odpovede od frekvencie stimulácie sa získali aplikovaním elektrických impulzov týchto parametrov: šírka 0,2 ms, napätie 35 V, frekvencia 2 – 64 Hz, doba stimulácie 20 sekúnd. Odpovede TNS boli farmakologicky testované v prípravných experimentoch, kde sa potvrdilo, že tieto kontrakcie boli zrušené tetrodotoxínom, čo naznačuje neurogénny charakter odpovedí. Guanetidín alebo fentolamín zrušili odpovede pri všetkých frekvenciách stimulácie, čo poukazuje na uvoľnenie noradrenalínu z depolarizovaných perivaskulárnych nervov a sympatikový nervový prenos.

Na vyhodnotenie vplyvu endogénneho H_2S na vazoaktívne odpovede sa sledovali kontraktilné odpovede vyvolané exogénnym NA pred a 20 minút po akútnom podaní propargylglycínu (PPG, 10 mmol/L), inhibítora cystationín- γ -lyázy (CSE), enzýmu produkujúceho H_2S . Na vyhodnotenie vazoaktívneho účinku exogénneho H_2S sa použil donor Na_2S , ktorý disociuje vo vodnom roztoku na Na^+ a S^{2-} . Následne S^{2-} reaguje s H^+ za vzniku HS^- a H_2S . Termín Na_2S sa používa pre účinok celkovej zmesi H_2S , HS^- a S^{2-} . Priame vazoaktívne účinky Na_2S sa pozorovali podávaním jeho zvyšujúcich sa dávok (20, 40, 80, 100, 200, 400 μ mol/L) na NA (1 μ mol/L) predkontrahovaných prstencoch.

Kontraktilné odpovede sa vyjadrovali v g ako veľkosť rozvinutej tenzie, aby sa preukázala maximálna dosiahnutá kontrakcia. Veľkosť relaxácie bola vyjadrená ako percento úbytku z maximálnej NA-vyvolanej kontrakcie.

Štatistika

Hodnoty boli vyjadrené ako priemerná hodnota \pm SEM. Štatistická významnosť medzi jednotlivými skupinami sa hodnotila jednofaktorovou ANOVA analýzou a následne Bonferroniho testom. Rozdiely medzi priemerami sa považovali za štatisticky významné na hladine významnosti $p < 0,05$.

Použité chemikálie

Použité boli nasledujúce farmakologické látky: propar-gylgycín, nonahydrát sulfidu sodného od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) a noradrenalín zo Zentivy (Praha, Česká republika). Všetky lieky boli rozpustené v destilovanej vode.

Výsledky

Všeobecná charakteristika pokusných zvierat

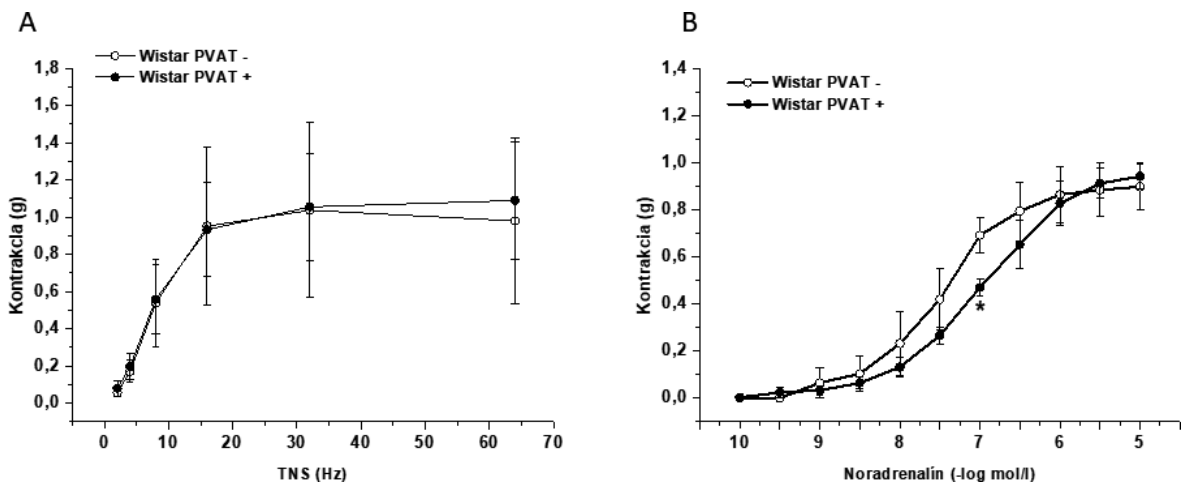
Porovnanie základných kardiovaskulárnych a funkčných parametrov medzi potkanmi Wistar ($n = 8$) a SHR ($n = 8$) sú uvedené v **tabulke 1**. U SHR bolo pozorované významné zvýšenie ($P < 0,01$) v hodnotách STK a taktiež mali zníženú telesnú hmotnosť v porovnaní s Wistar potkanmi ($P < 0,001$). Na druhej strane, v tomto kmeni sa zväčšil pomer hmotnosti srdca k telesnej hmotnosti a taktiež bola zvýšená hmotnosť srdca ku dĺžke holennej kosti ($P < 0,01$ a $P < 0,05$). Tieto výsledky potvrdili, že vysoký krvný tlak u SHR sa v porovnaní s normotenznými potkanmi spája s hypertrofiou srdca,

Tabulka 1 Charakteristika experimentálnych zvierat

Parametre	Wistar	SHR
STK (mmHg)	128,14 \pm 2,82	172,68 \pm 2,22**
TH (g)	424,5 \pm 10,77	335,5 \pm 7,30***
HS (mg)	1240 \pm 28,81	1275 \pm 26,47
T	39,48 \pm 0,51	37,16 \pm 0,47
HS/TH (mg/g)	2,92 \pm 0,05	3,80 \pm 0,04**
HS/T (mg/mm)	31,42 \pm 0,66	34,17 \pm 0,88*
NA _{max} (g)	0,8 \pm 0,1271	1,11 \pm 0,12*
GLU (mmol/L)	7,48 \pm 0,36	7,36 \pm 0,41
Chol (mg/dL)	2,05 \pm 0,18	2,19 \pm 0,10
HDL (mg/dL)	56,92 \pm 5,44	64,98 \pm 2,69
TAG (mmol/L)	2,23 \pm 0,13	1,39 \pm 0,18**
LDL (mg/dL)	10,33 \pm 1,42	13,1 \pm 0,56
RPT (mg)	3320,38 \pm 547,13	3 060,25 \pm 132,91
RPT/T (mg/mm)	83,68 \pm 12,98	81,29 \pm 3,95

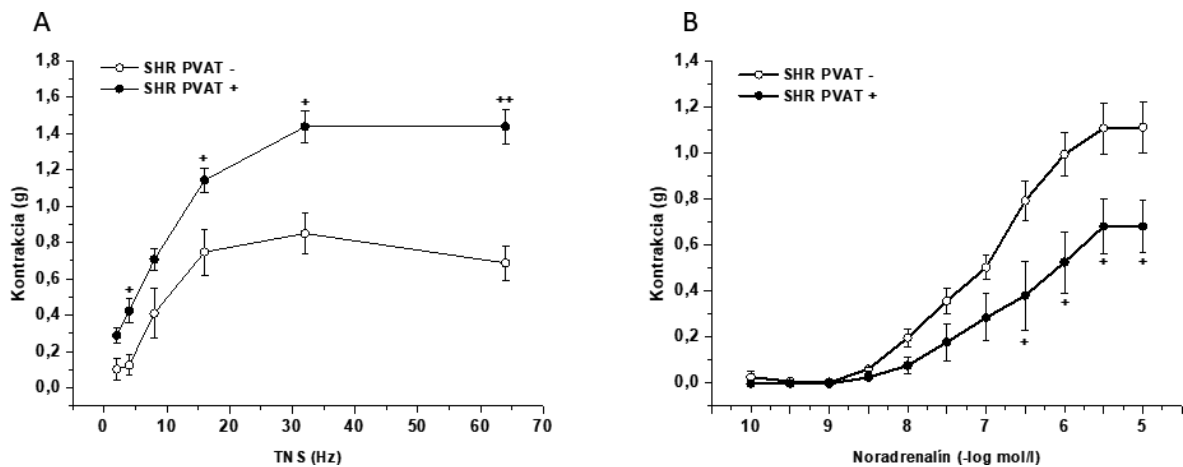
STK – systolický tlak krvi, TH – telesná hmotnosť, HS – hmotnosť srdca, HS/TH – hmotnosť srdca/telesná hmotnosť, NA_{max} – maximálna kontraktilná odpoveď vyvolaná noradrenalínom (NA 10^{-5} mol/L), Chol – celkový cholesterol, HDL – cholesterol s vysokou hustotou, TAG – triacylglyceroly, LDL – cholesterol s nízkou hustotou, GLU – glukóza, T – dĺžka holennej kosti (tibia), RPT – hmotnosť retroperitoneálneho tuku, RPT/T – hmotnosť retroperitoneálneho tuku/dĺžka tibie. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Wistar

čo je v súlade s pôvodným opisom kmeňa SHR. Taktiež sa zaznamenala zväčšená kontraktilita mezenterickej artérie u SHR, ako to dokumentuje významne väčšia maximálna adrenergna vazokonstriktorická odpoveď. Medzi potkanmi Wistar a SHR sme nezaznamenali rozdiel v množstve retroperitoneálneho tuku, hladinách glukózy a základnom lipidovom profile s výnimkou TAG, ktoré boli významne znížené u SHR v porovnaní s potkanmi Wistar ($P < 0,01$).



Obrázok 1 Vplyv PVAT na kontraktilné odpovede u Wistar potkanov

Kontraktilné odpovede izolovanej mezenterickej artérie so zachovaným (PVAT+) alebo odstráneným (PVAT-) perivaskulárnym tukovým tkanivom vyvolané endogénnym noradrenalínom uvoľneným z perivaskulárnych sympatikových nervov (A) a exogénnym noradrenalínom (B). * $p < 0,05$ vs Wistar PVAT-



Obrázok 2 Vplyv PVAT na kontraktívne odpovede u SHR

Kontraktívne odpovede izolovanej mezenterickej artérie so zachovaným (PVAT+) alebo odstráneným (PVAT-) perivaskulárnym tukovým tkanivom vyvolané endogénnym noradrenalinom uvoľneným z perivaskulárných sympatikových nervov (A) a exogénnym noradrenalinom (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs SHR PVAT -

Účinok perivaskulárneho tukového tkaniva

Transmurálna nervová stimulácia (TNS, 2-64 Hz) vyvolala uvoľnenie endogénneho NA z nervových zakončení v arteriálnej stene, ktorý prostredníctvom adrenergých receptorov vyvolal kontrakcie hladkých svalových buniek. Kým prítomnosť PVAT neovplyvnila kontraktívne odpovede u normotenzných potkanov ($n = 8$, **obrázok 1A**), u SHR boli kontraktívne odpovede prstencov so zachovaným PVAT významne zväčšené v rozsahu frekvencií 4 Hz a 16 – 64 Hz ($n = 8$, $P < 0,05$, $P < 0,01$, **obrázok 2A**).

Kumulatívna aplikácia exogénneho NA (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) vyvolala od koncentrácie závislú vazokonstrikciu. U Wistar potkanov prítomnosť PVAT zmenšila NA-vyvolané kontrakcie pri koncentráciách 10^{-7} mol/L ($n = 8$, $P < 0,05$, **obrázok 1B**), čo dokazuje antiktraktívny účinok PVAT, hoci skôr na úkor zníženej citlivosti arteriálnej steny na exogénny NA a nie na úkor zmenenej maximálnej odpovede. U SHR sa prekvapujúco prejavil inhibičný účinok PVAT na NA-vyvolané kontraktívne odpovede vo väčšom rozsahu koncentrácií, aj na úrovni zmenšenia maximálnej odpovede (3×10^{-7} – 10^{-5} mol/L, $n = 8$, $P < 0,05$, **obrázok 2B**).

Účinok endogénnej inhibície H_2S

Podiel endogénne produkovaného H_2S na adrenergých kontrakciách vyvolaných exogénnym NA sa testoval po akútnom predradení PPG (10 mmol/L, 20 minút) na prstencoch mezenterickej artérie s intaktným alebo odstráneným PVAT. Samotné podanie PPG normotenzným potkanom ($n = 8$) vyvolalo zvýšenie bazálnej tenzie v prstencoch s odstráneným PVAT o $0,33 \pm 0,10$ g a v prstencoch so zachovaným PVAT o $0,24 \pm 0,10$ g. U SHR ($n = 8$) nebola po podaní PPG zaznamenaná významná zmena bazálnej tenzie (pri prstencoch

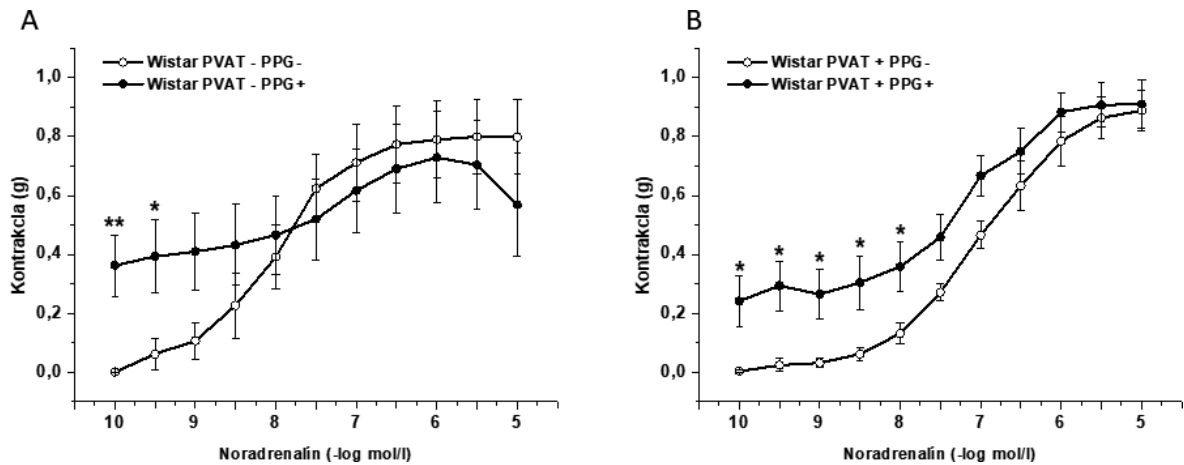
s odstráneným PVAT pokles o $0,02 \pm 0,03$ g a v prstencoch so zachovaným PVAT o $0,04 \pm 0,02$ g).

U Wistar potkanov inhibícia CSE významne zväčšila kontraktívne odpovede vyvolané exogénnym NA v prstencoch s odstráneným PVAT (10^{-10} a 3×10^{-10} mol/L, $P < 0,01$, $P < 0,05$), avšak maximálna sila kontraktívnych odpovedí sa nezmenila (**obrázok 3A**). Pri prstencoch so zachovaným PVAT pôsobilo akútne predradenie PPG podobným spôsobom. Aplikácia PPG významne zväčšila adrenergné kontrakcie v rozpätí koncentrácií 10^{-10} – 10^{-8} mol/L ($P < 0,05$) bez ovplyvnenia maximálne dosiahnutej kontrakcie (**obrázok 3B**).

U SHR vyvolala inhibícia CSE významné zmenšenie kontraktívnych odpovedí pri prstencoch s odstráneným PVAT v rozmedzí koncentrácií 10^{-8} – 3×10^{-7} ($P < 0,05$, $P < 0,01$), avšak maximálna sila kontraktívnych odpovedí sa nezmenila (**obrázok 4A**). Pri prstencoch so zachovaným PVAT nebol rozdiel v odpovedi na exogénny NA medzi prstencami so zachovaným a odstráneným PVAT (**obrázok 4B**).

Účinok exogénneho H_2S

Aplikácia Na_2S na NA-predkontrahované prstence mezenterickej artérie vyvolala v oboch experimentálnych skupinách duálny účinok. Nižšie koncentrácie Na_2S vyvolali kontrakciu (5 μ mol/L v prstencoch Wistar PVAT⁻, 5 – 40 μ mol/L v prstencoch Wistar PVAT⁺, 5 – 40 μ mol/L v prstencoch SHR PVAT⁻, 40 μ mol/L v prstencoch SHR PVAT⁺), kým vyššie koncentrácie vyvolali vazorelaxáciu arteriálnej steny (**obrázok 5**). U normotenzných Wistar potkanov prítomnosť PVAT významne neovplyvnila vazoaktívne odpovede vyvolané Na_2S (**obrázok 5A**). Na druhej strane u SHR prítomnosť PVAT významne zmenšila kontraktívnu časť Na_2S vyvolaných vazomotorických odpovedí (40 μ mol/L,



Obrázok 3 Vplyv inhibície endogénnej produkcie H₂S na kontraktívne odpovede u Wistar potkanov

Kontraktívne odpovede izolovanej mezenterickej artérie s odstráneným (A) alebo zachovaným (B) perivaskulárnym tukovým tkanivom vyvolané exogénnym noradrenalinom pred a po aplikácii propargylglycínu (PPG, 10 mmol/L), inhibítora enzýmu produkujúceho H₂S. *p < 0,05, **p < 0,01 vs PVAT- PPG - v rámci kmeňa

P < 0,05) a zväčšila relaxačné odpovede (100 – 400 μmol/L, P < 0,05, **obrázok 5B**).

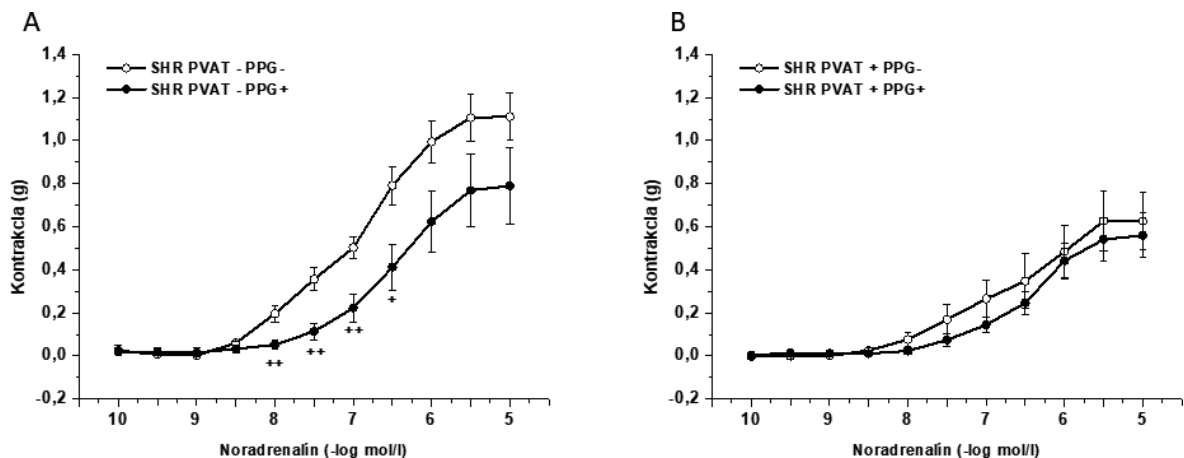
Diskusia

Naše výsledky ukazujú, že PVAT a H₂S sú prepojené systémy, ktoré sa v spolupráci s ďalšími regulačnými jednotkami môžu v artériách podieľať tak na fyziologických, ako aj na patologických procesoch. Zmeny v oboch systémoch môžu prispievať k zvýšenému cievnemu tonusu pri hypertenzii. Naše nové zistenia však ukazujú, že v podmienkach esen-

ciálnej hypertenzie sa spúšťajú aj kompenzačné vazoaktívne mechanizmy spojené so silnejším antikontraktívnym účinkom PVAT a zosilneným vazorelaxačným účinkom exogénneho H₂S, ktorý je podmienený taktiež prítomnosťou PVAT.

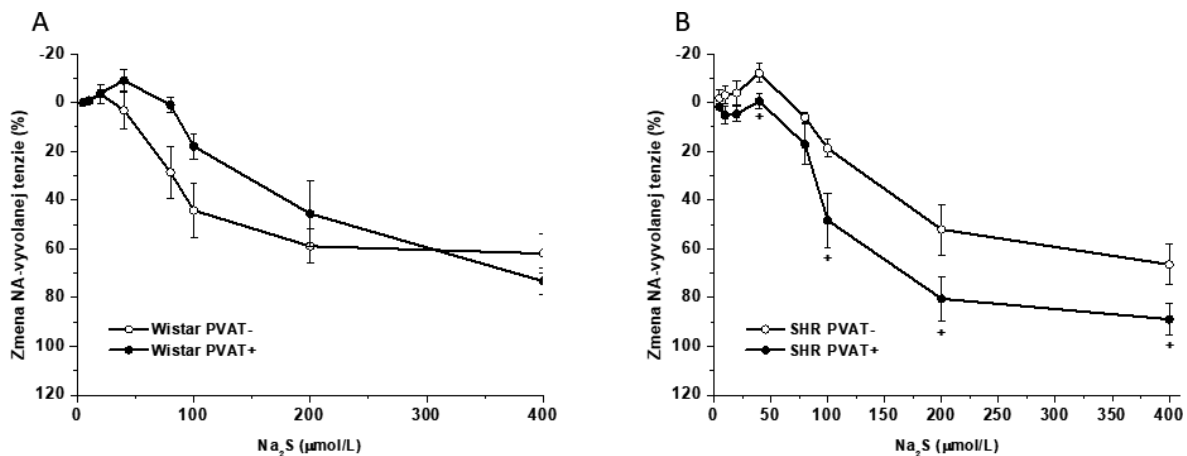
Prokontraktívny účinok perivaskulárneho tukového tkaniva

Počas nášho experimentu sme u Wistar potkanov a SHR zaznamenali rozdiel v účinku PVAT, keď sa testovali odlišné zdroje noradrenalínu. Na rozdiel od použitia exogénneho noradrenalínu sme po transmuralnej nervovej stimulácii, ktorá stimuluje uvoľnenie endogénneho NA, preukázali pro-kontraktívne vlastnosti PVAT, ktorého prítomnosť potenciovala



Obrázok 4 Vplyv inhibície endogénnej produkcie H₂S na kontraktívne odpovede u SHR

Kontraktívne odpovede izolovanej mezenterickej artérie s odstráneným (A) alebo zachovaným (B) perivaskulárnym tukovým tkanivom vyvolané exogénnym noradrenalinom pred a po aplikácii propargylglycínu (PPG, 10 mmol/L), inhibítora enzýmu produkujúceho H₂S. *p < 0,05, **p < 0,01 vs PVAT- PPG - v rámci kmeňa



Obrázok 5 Vazoaktívne odpovede exogénneho H₂S

Vazoaktívne odpovede izolovanej mezenterickej artérie u normotenzných Wistar potkanov (A) a SHR (B) vyvolané podaním exogénneho donoru H₂S na NA-predkontrahované prstence mezenterickej artérie s odstráneným (PVAT-) alebo zachovaným (PVAT+) perivaskulárnym tukovým tkanivom. *p < 0,05 vs SHR PVAT-

kontraktilnú odpoveď u SHR. Török et al. (11) ukázali u dospělých normotenzných potkanov, že väčšina sympatických nervových zakončení je sústredená v povrchových vrstvách samotnej steny mezenterickej artérie. V našej štúdiu sme zdokumentovali, že prokontraktilný účinok PVAT sa u SHR prejavil počas neurogénnych kontrakcií, čo naznačuje, že aktívna inervácia by mohla byť prítomná aj v PVAT. Okrem toho môže byť nervová stimulácia v arteriálnej stene spojená s nadprodukciou prokontraktilných faktorov. Lu et al. (12) a Gao et al. (13) preukázali, že PVAT mezenterickej artérie zosilňovalo vazokonstrikciu vyvolanú aktiváciou perivaskulárných nervov prostredníctvom tvorby angiotenzínu II a superoxidu. Knapp a Klann (14) zasa potvrdili, že prítomnosť superoxidu by mohla vyvolať dlhodobé potencovanie synaptického prenosu. Alvarez et al. (15) preukázali zvýšenú tvorbu superoxidu z NADPH oxidázy v cievach SHR v porovnaní s normotenznými potkanmi. Zdá sa, že zvýšená denzita sympatickej inervácie v arteriálnej stene a PVAT spolu so zvýšeným oxidačným stresom, ktoré sú charakteristické pre SHR (16, 17), by mohli viesť k silnejšiemu prokontraktilnému účinku PVAT vyvolanému po stimulácii nervových zakončení mezenterickej artérie.

Antikontraktilné vlastnosti perivaskulárneho tukového tkaniva

V tejto štúdiu sme potvrdili, že PVAT u Wistar potkanov inhibovalo kontraktilné odpovede mezenterickej artérie na exogénny NA, hoci maximálna absolútna kontrakcia nebola ovplyvnená. Tieto výsledky sú v súlade s dobre zdokumentovanými antikontraktilnými účinkami PVAT v normotenzných podmienkach (6). U SHR, kde sa hypertenzia spájala so srdcovou hypertrofiou a zväčšenou maximálnou adrenerg-

nou kontraktilitou (**tabuľka 1**), môžu byť vlastnosti PVAT determinované súhrou viacerých faktorov. U SHR sa zvyčajne vyskytuje nižšie množstvo PVAT (7), v dôsledku čoho by mohlo byť uvoľňovanie antikontraktilných látok znížené. To môže následne uľahčiť kontraktilnú odpoveď ciev. Na druhej strane, Zemančíková a Török (19) preukázali, že mierny nárast telesného tuku nezodpovedal zväčšeniu antikontraktilného účinku PVAT u SHR. V našej štúdiu sme nepozorovali významné zníženie retroperitoneálneho tuku, navyše analogicky k iným štúdiám (7, 19), sme zistili zníženú hladinu triacylglycerolov v plazme u SHR v porovnaní s normotenznými potkanmi. Pri týchto podmienkach sme potvrdili, že mezenterická artéria SHR s intaktným PVAT odpovedala s výrazne nižšou intenzitou na exogénny noradrenalín v porovnaní s cievami bez PVAT, a to aj v porovnaní s Wistar potkanmi. Predpokladáme, že vysvetlenie týchto výsledkov by sa mohlo spájať skôr s nastavením bazálneho napätia ciev než s obsahom telesného tuku a/alebo lipidového profilu. Török et al. (6) použili rovnakú hodnotu predpätia mezenterickej artérie pri oboch kmeňoch (1 g) a preukázali slabší antikontraktilný účinok PVAT u SHR v porovnaní s WKY potkanmi. V našej štúdiu sme použili taktiež rovnaké predpätie u oboch kmeňov, avšak s nižšou hodnotou (0,7 g) predpätia u oboch kmeňov potkanov, čo mohlo spôsobiť posilnenie intenzity antikontraktilného účinku u SHR. Galvez et al. (7) totiž ukázali, že u SHR, avšak nie u Wistar potkanov, ovplyvnila hodnota použitého predpätia antikontraktilný účinok PVAT mezenterickej artérie. Autori potvrdili, že u SHR vymizli antikontraktilné vlastnosti PVAT, keď sa použila vyššia hodnota (2 mN/mm) predpätia cievnej steny ako nižšia (1,2 mN/mm). Zdá sa, že u SHR môže napätie cievnej steny ovplyvniť antikontraktilný účinok PVAT. V experimentálnych postupoch je preto potrebné byť opatrný

pri výbere predpätia, keďže použitie predpätia príliš odlišného napätia steny in vivo by mohlo modifikovať antikotraktilný účinok PVAT. Na druhej strane, neočakávaný nález zachovaného antikotraktilného pôsobenia PVAT u SHR by mohol mať aj iné vysvetlenie. Je možné, že podobne ako pri iných regulačných systémoch, aj charakter aktivity PVAT môže závisieť od typu spúšťanej signálnej dráhy. Prokontraktilný efekt PVAT po aktivácii sympatikového nervového systému môže predstavovať patologickú dráhu, ktorú sa snaží PVAT kompenzovať antikotraktilným pôsobením v prípade exogénne aplikovaného vazokonstriktora. Táto otázka si však vyžaduje ďalšie preskúmanie.

Interakcia perivaskulárneho tukového tkaniva a H₂S u Wistar potkanov

Literatúra poskytuje veľa údajov o látkach, ktoré sú produkované PVAT a sú schopné ovplyvňovať cievnú reaktivitu. My sme sa zamerali na úlohu H₂S, ktorý môže byť produkovaný okrem PVAT (2) aj hladkými svalovými (3) a endotelovými bunkami (4). Niekoľko autorov potvrdilo, že endogénny H₂S sa podieľa na regulácii bazálneho tonusu a krvného tlaku. Yan et al. (21) potvrdili, že endogénny H₂S sa podieľal na regulácii bazálneho cievného tonusu u normotenzných potkanov. Autori podávali PPG (35 mg/kg) intraperitoneálne, čo sa spájalo so zvýšením krvného tlaku a zaznamenala sa aj inhibícia endogénnej produkcie H₂S v hrudnej aorte. V našej štúdii viedla aplikácia PPG k zvýšeniu bazálneho tonusu u Wistar potkanov a zväčšeniu vazokonstriktorických odpovedí pri začiatkových koncentráciách NA, avšak maximálna vyvinutá sila zostala nedotknutá. Na základe toho predpokladáme, že práve bazálne uvoľňovanie H₂S by mohlo byť zodpovedné za jeho antikotraktilný účinok. Čo sa týka postavenia PVAT, viacerí autori potvrdili antikotraktilný účinok H₂S produkovaného PVAT v normotenzných podmienkach. Schleifenbaum et al. (1) ukázali, že inkubácia hrudnej aorty s PPG významne zvrátila antikotraktilný účinok PVAT, čo naznačuje, že H₂S môže pôsobiť ako ADRF. Na druhej strane, Kohn et al. (21) dokázali, že inhibícia CSE pomocou PPG v myších aortách s intaktným PVAT nemala vplyv na kontrakcie indukované serotonínom, čo naznačuje, že H₂S sa nezúčastňoval na antikotraktilnom účinku perivaskulárneho tuku. Autori pokladajú H₂S skôr za modulátora ADRF než za primárny ADRF. V našej štúdii sme potvrdili antikotraktilný účinok H₂S produkovaného PVAT aj arteriálnou stenou, čo potvrdzuje význam PVAT v antikotraktilnom účinku H₂S v normotenzných mezenterických artériách potkana. Možno však predpokladať druhovú heterogenitu a tkanivovú špecifitu vo vzájomnej interakcii PVAT a H₂S.

Interakcia perivaskulárneho tukového tkaniva a H₂S u SHR

U SHR sme pozorovali, že aplikácia PPG neovplyvnila bazálny tonus artérie. To možno vysvetliť nálezom Yana et al. (20), ktorí zistili u SHR zníženú génovú expresiu a aktivitu

CSE v arteriálnej stene a ďalšia down-regulácia H₂S po aplikácii PPG už nemala efekt. Avšak H₂S produkovaný arteriálnym tkanivom, ale nie PVAT, prispel prokontraktilným účinkom k adrenergnej kontraktilnej odpovedi. Okrem mechanizmov nezávislých od NO, vazokonstriktorický účinok H₂S môže závisieť od prítomnosti endogénne syntetizovaného NO (22). Zistilo sa, že nízke koncentrácie H₂S vyvolávajú down-reguláciu L-arginín/NO dráhy v kultivovaných aj izolovaných cievných tkanivách prostredníctvom niekoľkých mechanizmov (22, 23). Obdobne naše predchádzajúce experimenty s použitím izolovanej hrudnej aorty preukázali u Wistar a SHR, že inkubácia ciev s L-NAME, inhibítorom NO-syntázy, zmenšila kontraktilné účinky nízkych koncentrácií donora H₂S (9, 10). Szijarto et al. (24) zasa dokázali, že v cievnom systéme myši je jednou z hlavných úloh endogénneho H₂S zníženie biologickej dostupnosti endotelového NO jeho priamou interakciou s NO. Predpokladáme, že prokontraktilný efekt H₂S pri jeho nízkej produkcii v arteriálnej stene u SHR by mohol byť spojený s inhibičným účinkom na NO signalizáciu.

Pokiaľ ide o účinky PVAT v podmienkach hypertenzie, je veľmi málo poznatkov o funkcii H₂S produkovaného z PVAT. U SHR a potkanov s NO-deficitnou hypertenziou sa zistila znížená expresia génu CSE v aorte a produkcia H₂S v aorte a plazme (20, 25, 26). Avšak autori nehodnotili úlohu PVAT. U potkanov s hypertenziou vyvolanou podviazaním brušnej aorty sa tvorba H₂S a expresia CSE proteínu významne zvýšila v PVAT, ale nie v aortálnej stene (2). Autori ukázali, že transplantácia PVAT do periadventície stenotických aort viedla k redukcii zvýšeného arteriálneho tlaku a znížila hladinu angiotenzínu II v aorte, pravdepodobne v dôsledku zvýšeného účinku H₂S. V našej štúdii prítomnosť PVAT síce eliminovala prokontraktilný účinok H₂S, avšak inkubácia ciev s PPG ďalej neovplyvnila kontrakcie vyvolané noradrenalinom. Predpokladáme, že PVAT mezenterickej artérie izolovanej z SHR bolo schopné spustiť produkciu antikotraktilného faktora, ktorým ale pravdepodobne nie je H₂S. Podobne Kohn et al. (21) preukázali, že inhibícia CSE pomocou PPG v aortách izolovaných z myši nemala vplyv na antikotraktilné účinky PVAT, na druhej strane, exogénny H₂S bol schopný vyvolať silnú vazorelaxáciu. Naše výsledky sú v súlade s ich pozorovaniami. U SHR sme, na rozdiel od Wistar potkanov potvrdili, že prítomnosť PVAT významne redukovala kontraktilnú časť vazomotorických odpovedí vyvolaných Na₂S a zväčšovala vazorelaxačné reakcie, čo naznačuje úzky vzťah medzi vazorelaxačným účinkom H₂S a PVAT u SHR. V našej predchádzajúcej štúdii sme zistili, že u SHR exogénny donor H₂S významne viac redukoval zvýšený tonus hrudnej aorty v porovnaní s normotenznými potkanmi, čo sme pokladali za súčasť kompenzačných odpovedí v podmienkach hypertenzie (9). Okrem toho, tento účinok vyvolaný v skorom období ontogenézy, bol v dospelosti zosilnený. To naznačuje, že vývoj hypertenzie by mohol zosilňovať kompenzačné schopnosti H₂S (10, 26). Výsledky tejto štúdie obohatili našu pôvodnú hypotézu o kompenzačnej úlohe H₂S v pod-

mienkach esenciálnej hypertenzie: znížená bazálna produkcia H_2S a prokontraktilný účinok H_2S produkovaného z arteriálnej steny môžu byť vyvážené pôsobením PVAT a od neho závislou potenciáciou H_2S vazorelaxácie. Aký je mechanizmus a či existuje interakcia medzi antikonalnými vlastnosťami PVAT a up-reguláciou účinku H_2S , je potrebné ďalej preskúmať. Jednu z možných zainteresovaných signálnych dráh by mohla predstavovať špecifická skupina napätových káliových kanálov (KCNQ kanály), ktoré sa otvárajú prostredníctvom ADRE, čo následne vedie k vazorelaxácii. Súčasne však môžu byť aktivované aj exogénnym H_2S (21). Exogénne donory H_2S by tak mohli predstavovať vhodný kompenzačný terapeutický prostriedok, ktorý by slúžil na otváranie týchto kanálov v patologických stavoch spojených s poruchou ADRE.

Zhrnutie

Súhrnne naše zistenia naznačujú, že interakcia PVAT- H_2S môže mať dôležitú úlohu pri modulácii cievej funkcie. Tak PVAT, ako aj endogénne produkovaný H_2S môžu prejavovať prokontraktilné aj antikonaltilné vlastnosti v závislosti od typu aktivovanej signálnej dráhy. U SHR, na rozdiel od Wistar potkanov, sa prokontraktilný účinok PVAT úzko spája s perivaskulárnou nervovou stimuláciou a spolu s prokontraktilným účinkom H_2S produkovaného cievnou stenou sa pravdepodobne podieľal na patologických zmenách SHR. Na druhej strane, PVAT hypertenznej mezenterickej artérie je pravdepodobne vybavené kompenzačnými vazoaktívnymi mechanizmami, ktoré zahŕňajú tak jeho antikonaltilný účinok, ako aj potenciáciu vazorelaxačného účinku exogénneho H_2S .

Podakovanie

Práca bola podporená projektmi APVV-15-0565 a VEGA 2/103/18.

Literatúra

- Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens* 2010;28:1875-1882.
- Fang LP, Zhao J, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens* 2009;27:2174-2185.
- Zhao WM, Zhang J, Lu YJ, et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K-ATP channel opener. *EMBO J* 2001;20:6008-6016.
- Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res* 2011;109:1259-1268.
- Liu YH, Lu M, Hu LF, et al. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal* 2012;17:141-185.
- Torok J, Zemancikova A, Kocianova Z. Interaction of perivascular adipose tissue and sympathetic nerves in arteries from normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res* 2016;65:S391-S399.
- Galvez B, de Castro J, Herold D, et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:12971302.
- Xiao L, Dong JH, Jin S, et al. Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction via downregulating BMP4/COX-2 pathway in rats with hypertension. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:8128957. doi: 10.1155/2016/8128957.
- Cacanyiova S, Berenyiova A, Kristek F, et al. The adaptive role of nitric oxide and hydrogen sulphide in vasoactive responses of thoracic aorta is triggered already in young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2016;67:501-512.
- Berenyiova A, Drobna M, Cebova M, et al. Changes in the vasoactive effects of nitric oxide, hydrogen sulfide and the structure of the rat thoracic aorta: the role of age and essential hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2018;69:535-546.
- Torok J, Koprdoval R, Cebova M, et al. Functional and structural pattern of arterial responses in hereditary hypertriglyceridemic and spontaneously hypertensive rats in early stage of experimental hypertension. *Physiol Res* 2006;55:S65-S71.
- Lu C, Su LY, Lee RM, et al. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 2010;634:107-112.
- Gao YJ, Takemori K, Su LY, et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 2006;71:363-373.
- Knapp LT, Klann E. Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C. *J Neurosci* 2002;22:674-683.
- Alvarez Y, Briones AM, Hernandez R, et al. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 2008;153:926-935.
- Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, et al. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci* 2013;20:69. doi: 10.1186/1423-0127-20-69.
- Wu R, Millette E, Wu LY, et al. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001;19:741-748.
- Zemancikova A, Torok J. Effect of perivascular adipose tissue on arterial adrenergic contractions in normotensive and hypertensive rats with high fructose intake. *Physiol Res* 2017;66:S537-S544.
- Peres FF, Diana MC, Levin R, et al. Cannabidiol administered during peri-adolescence prevents behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. *Front Pharmacol* 2018;9:901. doi: 10.3389/fphar.2018.00901.
- Yan H, Du JB, Tang CS. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:22-27.
- Kohn C, Schleifenbaum J, Szijarto IA, et al. Differential effects of cystathionine- γ -lyase-dependent vasodilatory H_2S in period-

- ventitial vasoregulation of rat and mouse aortas. PLoS One 2012;7:e41951. doi: 10.1371/journal.pone.0041951
22. Ali MY, Ping CY, Mok YY, et al. Regulation of vascular nitric oxide *in vitro* and *in vivo*; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Br J Pharmacol 2006;149:625-634.
 23. Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, et al. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. Toxicology 2007;232:138-146.
 24. Szijarto IA, Marko L, Filipovic MR, et al. Cystathionine γ -lyase-produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. Hypertension 2018;71:1210-1217.
 25. Zhong GZ, Chen FR, Cheng YQ, et al. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. J Hypertens 2003;21:1879-1885.
 26. Cacanyiova S, Berenyiova A, Kristek F. The role of hydrogen sulphide in blood pressure regulation. Physiol Res 2016;65:S273-S289.