

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Dalia Rancevienė

**ŠIRDIES SIENOS NERVINIO REZGINIO
STRUKTŪRINIS REMODELIAVIMASIS,
NULEMTAS ARTERINĖS
HIPERTENZIJOS**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
medicina (M 001)

Kaunas, 2024

Disertacija rengta 2017–2023 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Anatomijos institute.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Neringa Paužienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Jurgita Plisienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Ingrida Balnytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Rimantas Jankauskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

doc. dr. Mindaugas Račkauskas (Floridos universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

doc. dr. Vacis Tatarūnas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija bus ginama viešajame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2024 m. lapkričio 27 d. 15 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto prof. J Žilinsko auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Dalia Rancevienė

**STRUCTURAL REMODELATION
OF INTRINSIC CARDIAC NERVOUS
SYSTEM DUE TO LONG-TERM
ARTERIAL HYPERTENSION**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Medicine (M 001)

Kaunas, 2024

Dissertation has been prepared at the Institute of Anatomy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2017–2023 year.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Neringa Paužienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Jurgita Plisienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Ingrida Balnytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Rimantas Jankauskas (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Assoc. Prof. Dr. Mindaugas Račkauskas (University of Florida, Natural Sciences, Biology – N 010).

Assoc. Prof. Dr. Vacis Tatarūnas (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on 27th of November 2024 at 3 p.m. in prof. J. Žilinskas auditorium of the Lithuanian University of Health Sciences.

Address: prof. J. Žilinskas classroom, A. Mickevičiaus 9, Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	9
MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR REIKŠMĖ	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Arterinė hipertenzija ir širdies nepakankamumas	13
1.2. Širdies nepakankamumo charakteristika	14
1.3. Eksperimentinio gyvūninio modelio pasirinkimas širdies ir kraujagyslių ligų tyrimui	14
1.3.1. Populiarūs modeliai širdies nepakankamumui tirti	15
1.3.2. Žiurkių, kaip eksperimentinių modelių širdies ir kraujagyslių ligoms tirti, privalumai ir trūkumai	16
1.4. Žiurkės, kaip arterinės hipertenzijos modeliai	17
1.4.1. Druskai jautrios Dahl veislės žiurkės	17
1.4.2. Spontaniškai hipertenzinės žiurkės	17
1.4.3. Spontaniškai hipertenziškos, širdies nepakankamumu sergančios žiurkės	18
1.5. Autonominės nervų sistemos įtaka arterinės hipertenzijos išsivystymui	18
2. TYRIMŲ METODIKA.....	22
2.1. Tyrimo medžiaga	22
2.2. Tyrimo struktūra	22
2.3. Fiziologiniai tyrimai	23
2.3.1. Arterinio kraujo spaudimo matavimas	23
2.3.2. Gyvūnų širdies echoskopijos tyrimas	25
2.4. Morfologiniai tyrimai	26
2.4.1. Audinių paruošimas imunohistocheminiams tyrimams.....	26
2.4.2. Mėginių paruošimas transmisinei elektroninei mikroskopijai.....	29
2.4.3. Mikroskopavimas ir duomenų rinkimas	31
2.5. Statistinė analizė.....	32
3. REZULTATAI.....	34
3.1. Fiziologinių parametrų charakteristika.....	34
3.1.1. Arterinis kraujo spaudimas ir širdies susitraukimų dažnis	34
3.1.2. Širdies ultragarsinis tyrimas	34
3.2. Širdies nervinio rezginio charakteristika.....	35
3.2.1. Mazgų ir neuronų morfologija.....	35
3.2.2. Prieširdžių ir skilvelių nervų morfologiniai pokyčiai.....	49
3.2.3. Miokardo inervacijos pokyčiai	66
4. DISKUSIJA	70
4.1. Savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės – arterinės hipertenzijos modelis.....	70
4.2. Savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės širdies nervinio rezginio pokyčiai	71
4.2.1. Intrakardiniai mazgų pokyčiai	72
4.2.2. Prieširdžių ir skilvelių nervų morfologiniai ir fenotipiniai pokyčiai.....	76
4.2.3. Miokardo inervacijos pokyčiai	80
4.3. Tyrimo trūkumai.....	81

IŠVADOS.....	82
PRAKTINĖ REKOMENDACIJA	83
SUMMARY	84
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	98
STRAIPSNIAI, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI.....	110
MOKSLINĖS KONFERENCIJOS, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI	111
STRAIPSNIŲ KOPIJOS	113
PRIEDAI.....	168
CURRICULUM VITAE	170
PADĖKA.....	172

SANTRUMPOS

ACh	– acetilcholinas
AH	– arterinė hipertenzija
ChAT	– cholino acetiltransferazė
CGRP	– kalcitonino geno peptidas (angl. <i>calcitonin gene-related peptide</i>)
SIF ląstelės	– mažos intensyviai fluorescensuojančios ląstelės (angl. <i>small intensely fluorescent cells</i>)
PGP 9,5	– bendrasis nervinio audinio žymuo, proteino geno produktas 9,5 (angl. <i>protein gene product 9.5</i>)
SHR	– savaimine hipertenzija serganti žiurkė (angl. <i>spontaneously hypertensive rat</i>)
ŠN	– širdies nepakankamumas
TH	– tirozino hidroksilazė
WKY	– Wistar Kyoto žiurkė
TEM	– transmisinė elektroninė mikroskopija

ĮVADAS

Pirminė arterinė hipertenzija (AH) yra įgimta lėtinė liga, kuri metams bėgant nepastebimai keičia miokardo sandarą, sukelia jo hipertrofiją, fibrozę ir ilgainiui – širdies nepakankamumą. Visuotinis ligų naštos (angl. *global burden of disease*) tyrimas yra išsamiausias, iki šiol visame pasaulyje atliekamas epidemiologinis tyrimas [1]. Jame analizuojamas mirtingumas, sveikatos praradimas dėl pagrindinių ligų, traumų ir rizikos veiksnių pasauliniu, nacionaliniu ir regioniniu mastu. Kaip rodo kitų šalių praktika, tokie ligų naštos rodikliai galėtų prisidėti prie efektyvesnio profilaktikos priemonių taikymo ir nukreipti politikus palankia kryptimi priimant visuomenės sveikatos sprendimus [1]. Taigi, remiantis šiuo tyrimu, arterinė hipertenzija yra vienas pirminių mirtingumo priežasčių būtent senstančioje – amžėjančioje – populiacijos dalyje [1]. Žinoma, kad AH paveikia širdies audinius: sukelia miokardo remodeliavimąsi [2–4], todėl daugėja išeminių širdies ligų ir aritmijų [5].

Nauji duomenys apie AH sukeliamus širdies nervinių struktūrų (širdies vidusieninių nervinių mazgų, nervų, širdį kontroliuojančių simpatinių, parasimpatinių ir juntamųjų neuronų) pokyčius yra svarbūs klinikinei kardiologijai. Galbūt dėl AH atsiranda kompensacinis mechanizmas: adrenerginių neuronų transdiferenciacija į cholinergines nervines ląsteles, išskiriančias ant kardiomiocitų neuromediatorių acetilcholiną. Acetilcholiną slopina miokardo hipertrofijos vystymąsi ir reikšmingai sumažina mirtingumą nuo miokardo infarkto. Daug žadantis ir galimas kompensacinis peptiderginių neuromediatorių, pvz., kalcitonino geno peptido, CGRP, angl. *calcitonin gene-related peptide*, vazodilacinis poveikis kraujagyslėms.

Lėtinės negydomos AH sukeliami morfologiniai padariniai nervų sistemai itin subtilūs ir lėtai kinta dėl organizmo gebos prisitaikyti prie ligos [6]. Mūsų tyrimas unikalus tuo, kad buvo ištirta širdies vidusieninio nervinio rezginio mazgų ir nervų morfologija, morfometriniai pokyčiai, ultrastruktūra, apimant visą savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės gyvenimo ciklą. Išskirti esminiai laikotarpiai:

1. juvenilinės žiurkės iki lytinės brandos, turinčios prehipertenzinę būklę, kai kraujospūdis dar tik pradeda didėti;
2. subrendę gyvūnai, turintys stabilią, jau išsivysčiusią AH;
3. senos žiurkės, turinčios ilgalaikę, negydytą AH, ir labai senos žiurkės jau savo gyvenimo pabaigoje.

Šiuo darbu buvo siekiama ištirti pasaulyje svarbiausio AH modelio, savaiminę hipertenziją turinčių žiurkės (angl. *spontaneously hypertensive rat*, SHR) širdies vidusieninį nervinį rezginį, kiekybiškai bei kokybiškai įvertinti morfologiją, neuronų fenotipus, sinapses amžiaus tarpsniais visą gyvenimą ir palyginti su normotenzinių gyvūnų.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: įvertinti ilgalaikės negydomos arterinės hipertenzijos poveikį širdies vidusieniniam nerviniam rezginiui, naudojant skirtingų amžiaus tarpinių eksperimentinės hipertenzijos modelį – savaiminę hipertenziją turinčias žiurkes.

Uždaviniai:

1. Įvertinti ir palyginti turinčių hipertenziją ir kontrolinių žiurkių arterinį kraujospūdį bei jo kitimą visą gyvenimą.
2. Įvertinti ir palyginti turinčių hipertenziją ir kontrolinių žiurkių širdies fiziologinius parametrus skirtingais amžiaus tarpniais.
3. Nustatyti ir palyginti turinčių hipertenziją ir kontrolinių žiurkių širdies vidusieninio nervinio rezginio – nervinių mazgų, nervų ir miokardo inervacijos – struktūrinius pokyčius skirtingais amžiaus tarpniais.
4. Nustatyti ir palyginti pagrindinių autonominės nervų sistemos fenotipų – cholinerginių, adrenerginių, ir peptiderginių (CGRP) – pokyčius hipertenzinių ir kontrolinių žiurkių širdies vidusieninio nervinio rezginio mazguose, nervuose ir miokardo nerviniame rezginyje skirtingais gyvenimo etapais.
5. Ištirti ir palyginti turinčių hipertenziją ir kontrolinių žiurkių širdies sienos nervinio rezginio ultrastruktūrinės organizacijos ypatybes.

MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR REIKŠMĖ

Pirminė arterinė hipertenzija (AH) lemia struktūrinius ir funkcinius miokardo pokyčius, sukeliančius miokardo išemiją, fibrozę, hipertrofiją ir širdies nepakankamumą [5]. AH priskiriama prie aukščiausio lygio rizikos veiksnių, lemiančių ankstyvą mirtį nuo širdies ir kraujagyslių ligų [7].

Pasaulyje gyvūnų modelių (žiurkės, pelės) ir žmogaus širdies bei simpatinių neuronų kūnų ir nervinių skaidulų cholinerginė transdiferenciacija, nulemta kraujyje cirkuliuojančių citokinų veikimo, buvo tyrinėta. Nustatytas jos galimas molekulinis mechanizmas [8, 9]. Tačiau sutrikus autonominei pusiausvyrai, galimi morfologiniai intrakardinio nervinio rezginio pokyčiai nėra pakankamai išsamiai ir, svarbiausia, nuosekliai ištirti. Mūsų tyrimo naujumas – tai vienintelis tyrimas, aprėpiantis daug amžiaus grupių – nuo jaunų iki labai senų žiurkių. Šis tyrimas yra vienintelis, kuriame išsamiai išnagrinėjama intrakardinių nervų ultrastruktūrinė sandara sergant arterine hipertenzija skirtingais gyvenimo laikotarpiais. Tai svarbu, nes arterinė hipertenzija – tai viso gyvenimo liga. Taigi galime daryti prielaidą, kad jos poveikis intrakardinei nervų sistemai bus skirtingas ligai dar tik beprasidedant jaunystėje, pasiekus piką suaugusio amžiaus laukotarpiu, išryškėjus ilgalaikiam poveikiui vyresnio amžiaus metu. Svarbu nustatyti, kada pažeidžiamas intrakardinis rezginys, kad būtų galima geriau suplanuoti gydomąsias intervencijas, tokias kaip antihipertenzinių vaistų vartojimas.

Prie nuo amžiaus priklausiančių pakitimų priskirtini audinių uždegimas ir miokardo fibrozė yra labai svarbios grandys AH patogenezei, nes imuninės sistemos ląstelių išskiriami citokinai stimuliuoja renino ir angiotenzino sistemos veiklą bei turi didelę įtaką širdies nepakankamumo išsivystymui [10, 11]. Klajoklio nervo skaidulų išskiriamas acetilcholinas (ACh) yra širdies skilvelių miokardo hipertenzinės remodeliacijos reguliatorius, nes stimuliuojant AH sergančių pacientų cholinerginę širdies nervų sistemą, galima labai sumažinti sergamumą ir mirtingumą [12]. Atlikti eksperimentai su gyvūnais. Jų metu sukėlus barorefleksus mažėja simpatinės nervų sistemos aktyvumas bei didėja gyvūnų išgyvenamumas po hipertenzijos sukulto širdies nepakankamumo – rodo, jog padidėjęs simpatinės nervų sistemos tonusas yra svarbus širdies nepakankamumo patogenezei [12, 13].

Laboratorinių gyvūnų ir mirusių nuo lėtinio širdies nepakankamumo žmonių širdžių tyrimai atskleidė, kad išsivysčius širdies nepakankamumui didžioji dalis širdies skilvelių simpatinių nervinių skaidulų ir žvaigždinio mazgo neuronų kūnų įgauna cholinerginį fenotipą, veikiant pažeisto miokardo išskiriamiems citokinams [14]. Eksperimentai su druska jautriomis Dahl žiurkėmis rodo, kad nedidelės įtampos pulsinė transkutaninė klajoklio nervo

juntamųjų skaidulų stimuliacija elektros srove labai sumažina kraujospūdžio didėjimą, gerina diastolinę funkciją ir net silpnina kairiojo skilvelio uždegimą ir fibrozę [11]. Adrenerginųjų receptorių blokatoriai vartojami kartu su angiotenziną konvertuojančiojo fermento inhibitoriais ir angiotenzino receptorių blokatoriais yra laikomi aukso standartu gydant hipertenziją bei jos sukeltą lėtinį širdies nepakankamumą. Tačiau eksperimentai su gyvūnais atskleidė, jog cholinerginė stimuliacija (elektriškai dirginant klajoklį nervą ar panaudojant acetilcholinesterazės inhibitorius, donepezilį ir piridostigminą) kartu taikant beta adrenerginųjų receptorių blokavimą, reikšmingai padidina širdies susitraukimo jėgą, galbūt sumažindami širdies miokardo fibrozinę remodeliaciją, ir pailgina gyvenimo trukmę [11, 15–17]. Acetilcholinesterazės inhibitoriai ir klajoklio nervo elektrinė stimuliacija, didindami acetilcholino kiekį, slopina renino ir angiotenzino sistemos veiklą ir skatina limfocitų aktyvumą, taip mažindami kraujyje cirkuliuojančių citokinų koncentraciją bei slopindami uždegimą, kurie yra svarbūs pirminės arterinės hipertenzijos patogenezėi [1, 8, 9, 11]. Nustatyta, kad dėl klajoklio nervo elektrinės stimuliacijos ar acetilcholinesterazės medikamentinės inhibicijos padidėjęs ACh lygis taip pat slopina hipertenzijos sukeltą širdies miokardo remodeliaciją [11, 12].

Taip pat labai svarbus peptiderginės nervų sistemos, kuri daugiausia žinoma kaip juntamoji, tyrimas. Šiai sistemai priklausantys neuromediatoriai atlieka ir daug kitų funkcijų [18, 19]. Manoma, kad CGRP gali turėti įtakos hipertenzijos vystymuisi [20]. Pasaulyje nėra išsamaus tyrimo, kuriame būtų išnagrinėta vieno pagrindinių peptiderginųjų neuromediatorių, CGRP+, intrakardinių nervinių skaidulų morfologija nuo jaunystės iki gyvenimo pabaigos. CGRP pagrindu jau yra sukurti vaistai nuo migrenos, plečiantys galvos smegenų kraujagysles [21, 22]. Šio neuromediatoriaus vazodilatacinės bei apsauginės savybės [22–25] ateityje galėtų būti pritaikomos ir sisteminės arterinės hipertenzijos gydymui.

Įrodžius širdies adrenerginųjų struktūrų ankstyvą morfologinį kitimą, esant prehipertenzinei būklei, atsirastų prielaidos SHR modelį panaudoti hipertenzinės kardiomiopatijos naujo gydymo metodui sukurti – būtų užbėgama už akių arterinei hipertenzijai atsirasti labai jauno amžiaus žmonėms. Taip pat naujo kardiomiopatijos gydymo metodo pagrindas galėtų būti CGRP smulkiųjų kraujagyslių vazodilatacinio efekto panaudojimas kartu su beta adrenerginųjų receptorių blokatoriais ir klajoklio nervo transkutanine elektrine stimuliacija. Čia esmę sudarytų širdies parasimpatinės nervų sistemos veiklos stimuliavimas, vaistais kontroliuojant širdies adrenerginį tonusą bei plečiant smulkiąsias kraujagysles. Galbūt tai sumažintų širdies miokardo remodeliavimąsi – fibrozę ir hipertrofiją. Tikėtina, kad sustabdytas ir (arba) sumažėjęs miokardo remodeliavimasis reikšmingai padidintų širdies susitraukimo jėgą

(priešingai, nei vienu β adrenerginių receptorių blokatorių vartojimo atveju) ir pailgėtų pacientų gyvenimo trukmė.

Dėl miokardo ir arterinės hipertenzijos ligų pasaulyje miršta daugiausia žmonių, tačiau iki šiol nėra detaliai tyrinėti su hipertenzine liga, miokardo fibroze ir hipertrofija (remodeliavimusi) bei širdies nepakankamumu susiję cholinerginių, adrenerginių ir peptiderginių nervinių struktūrų morfologiniai kompleksiniai pokyčiai širdies nervinio rezginio mazguose, epikardiniuose nervuose, miokardo nervinėse skaidulose. Lietuvoje žmogaus ir eksperimentinių gyvūnų širdies nervinio rezginio struktūriniai tyrimai yra atliekami tik Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Anatomijos institute. Šio instituto mokslininkai tyrinėja tiek žmogaus, tiek ir daug tam tikrų eksperimentinių gyvūnų širdies nervų sistemos anatomiją apie 30 metų ir yra sukaukę didelę šių tyrimų patirtį, tačiau pirminės arterinės hipertenzijos modelis jų darbuose niekada nebuvo tyrinėtas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Arterinė hipertenzija ir širdies nepakankamumas

Pirminė arterinė hipertenzija (AH) yra įgimta lėtinė liga, kuri, metams bėgant nepastebimai keičia (remodeliuoja) miokardo sandarą, sukelia jo hipertrofiją, fibrozę, vainikinių arterijų ligas ir, ilgainiui, širdies nepakankamumą (ŠN) [1]. Tai labiausiai paplitęs širdies ir kraujagyslių sutrikimas, paveikiantis 20–50 proc. suaugusiųjų pasaulyje [1]. Ši hipertenzijos rūšis dar vadinama esencialine ir sudaro liūto dalį – 90 proc. susirgimų. Tai nėra miokardo infarktas, kurio katastrofiški padariniai yra greitai pasireiškiantys. Arterinę hipertenziją galėčiau pavadinti tyliąja žudike, kuri veikia nepastebimai [26–28]. Negydoma arterinė hipertenzija sukelia lėtinę perkrovą spaudimu ir neurohumoralinę aktyvaciją, stimuliuoja genų ekspresiją, baltymų sintezę, sarkomerų surinkimą ir ląstelių metabolizmą, dėlko vystosi širdies hipertrofija, ypač kairiojo skilvelio sąskaita [29,30]. Ne tik kairiojo skilvelio hipertrofija, bet ir mikro bei makroskopiniai miokardo audinio pakitimai, kaip fibrozė, prieširdžių remodeliacija svarbūs hipertenzinės širdies ligos vystymuisi [30].

Garsioji Framingham'o studija parodė, kad pagrindinė širdies nepakankamumo priežastis (67 proc.) yra vainikinių arterijų liga, tačiau dauguma šių pacientų sirgo ir arterine hipertenzija (57 proc.). Vožtuvų ligos lėmė nepakankamumą 10-čiai procentų, o pirminės miokardo ligos (ypatingai dilatacinė kardiomiopatija) – 20-čiai procentų [31]. Taigi, arterinė hipertenzija yra vienas svarbiausių širdien nepakankamumo veiksnių. Neatsižvelgiant į kilmę, pažengęs ŠN pasireiškia kaip kompleksinis sindromas: sutrikusia miokardo funkcija, skilvelių remodeliacija, pakitusia hemodinamika, neurohumoraline aktyvacija, citokinių padidėjusia produkcija, kraujagyslių bei endotelio disfunkcija [32].

Ilgėjanti gyvenimo trukmė, mažėjantis mirčių skaičius po miokardo infarkto ir kitos priežastys lemia, kad ŠN dažnis, paplitimas, gydymo išlaidos progresyviai auga. Bendras širdies nepakankamumo paplitimas yra 1–2 proc. tarp vidutinio amžiaus, 2–3 proc. tarp vyresnių nei 65 m. pacientų, 5–10 proc. – tarp vyresnių nei 75 m. pacientų. Jų išgyvenamumas priklauso nuo ŠN trukmės ir sunkumo, lyties, gydymo taktikos. Framingham'o studijoje metus išgyveno 25 proc. vyrų ir 38 proc. moterų [31]. Pagrindinės mirties priežastys yra staigi mirtis (40 proc.) ir ŠN pablogėjimas (40 proc.), kitos priežastys lemia 20 proc. mirčių.

1.2. Širdies nepakankamumo charakteristika

Nepriklausomai nuo širdies nepakankamumo etiologijos, neurohumoralinė ir citokinų sistema atlieka svarbų vaidmenį prognozuojant širdies nepakankamumo baigtį [33]. Neurohumoralinės sistemos aktyvacija įvyksta palaipsniui ir yra organui specifiška. Sergant ŠN, daugiau išsiskiria noradrenalino ir mažiau jo suskaidoma galimai dėl nusilpusios širdinių ir arterinių baroreceptorių simpatinio tonuso kontrolės. Panašiai, ir natriuretinis peptidas anksti, dar ŠN pradžioje, aktyvuojamas – jo padidėję kiekiai randami dar asimptominiams pacientams su kairiojo skilvelio disfunkcija. O plazmos renino aktyvumas ir vazopresino išsiskyrimas padidėjęs tik simptominiams ŠN pacientams [33].

Pacientams, sergantiems širdies nepakankamumu, būna padidėjęs širdies kamerų prisipildymo slėgis, sumažėjęs širdies minutinis tūris, padidėjęs plaučių ir sisteminių kraujagyslių pasipriešinimas. Yra manoma, kad dėl didėjančio arteriolių ir kapiliarų rezistentiškumo susintetinama daugiau endotelino, mažiau – azoto oksido. Šių kraujagyslių endotelis remodeliuojasi ir sutrinka jo funkcija. Sutrikusi endotelio funkcija turi įtakos hemodinamikos pakitimams ir ramybės, ir ypač krūvio metu [34].

Esant paskutinės stadijos ŠN, įvyksta jam būdingi funkciniai, biocheminiai ir molekuliniai miokardo pakitimai. Manoma, kad dėl miokardo pažeidimo sutrinka jo sužadavimo – susitraukimo procesas [35]. Tai gali būti susiję su sarkoplazminio tinklo kalcio siurblių aktyvumo sumažėjimu bei sarkolemos natrio – kalcio siurblių suaktyvėjimu [36]. Kalcio transportas į sarkoplazminį tinklą sumažėja dėl sutrikusio metabolizmo (adenozintrifosfato gamybos) miokarde.

Studijos rodo, kad negaluojančioje žmogaus širdyje pakinta β adrenerginių signalų perdavimo keliai. Taip nutinka todėl, kad sumažėja β_1 -adrenoreceptorių tankis. Tankis dalinai sumažėja dėl sumažėjusios genų ekspresijos. Tai pademonstravo ir mRNR, ir baltymų kiekio tyrimai. Taip pat miokarde padaugėja jungiamojo audinio [37].

1.3. Eksperimentinio gyvūninio modelio pasirinkimas širdies ir kraujagyslių ligų tyrimui

Gydant ir tyrinėjant širdies ir kraujagyslių ligas, itin pasitarnauja eksperimentiniai gyvūnų modeliai. Vis dėlto, kol kas nėra rasta vaisto, kuris visam laikui išgydytų nuo širdies ir kraujagyslių ligų. Pavyzdžiui, šiuo metu visiškas širdies nepakankamumo išgydymas yra įmanomas tik atlikus donoro širdies persodinimo operaciją [38]. Šis gydymo būdas labai riboto potencialo, nes donorų širdžių skaičius yra baigtinis ir labai mažas lyginant su poreikiu [39]. Net ir atlikus persodinimą, donoro širdies ilgalaikė veikla gali būti kompli-

kuota vaskulopatijų, nutrūkusios ekstrakardinės inervacijos, kitų komplikacijų [40]. Dirbtinių bioaudinių ir autologinių/alogeninių ląstelių persodinimas ateityje taip pat galėtų būti būdas atstatyti širdies funkciją ir alternatyva donorinės širdies persodinimui [41]. Pastaraisiais metais, tiek genų terapija, tiek ląstelių transplantacijos technologijos yra nuolat tobulinamos [42]. Jei bus įrodyta, kad šie gydymo būdai yra efektyvūs ir saugūs – ateityje gali pakeisti miokardo pažaidos sukeltų ligų gydymą [42].

Didžiulis iššūkis ikiklinikinėms studijoms yra sukurti kliniškai teisingus miokardo infarkto, arterinės hipertenzijos, širdies nepakankamumo modelius [43]. Donorų padovanotos žmonių širdys būna arba tos, kurios netiko persodinimui, arba galutinės stadijos širdies nepakankamumo širdys, kurios išimamos transplantacijos metu. Taigi, tyrėjai gauna labai nedaug šių širdžių, jos pasižymi dideliu variabiliškumu dėl genetikos, vartotų vaistų, dietos, socialinių sąlygų ir pačių persirgtų ligų. Todėl atsiranda būtinybė turėti širdies ligoms tinkamų laboratorinių gyvūnų modelių. Naudojant gyvūnus, širdies fiziologiją ir sandarą galima išstudijuoti daug efektyviau ir gautus rezultatus pritaikyti žmonių kardiologijoje [44].

Laboratorinio gyvūno pasirinkimas, priklausomai nuo tiriamos ligos, gali nulemti tyrimo išvadas ir tai, ar pavyks rezultatus pritaikyti žmonėms. Paprasta taisyklė – kuo širdies ar kūno svoris artimesnis žmogaus širdies ar kūno svoriui – tuo panašesnės širdys [45]. Tiesa, tiek maži, tiek dideli gyvūnai turi privalumų ir trūkumų. Didžiausia problema dirbant su mažais gyvūnais yra, kaip įvertinti gydymo privalumus ir kaip pritaikyti rezultatus žmonėms [46]. Naudojant didelius gyvūnus, etikos reikalavimai riboja gyvūnų skaičių [47]. Ypač kreipiamas dėmesys į primatų ar šunų naudojimą, dėl nedidelio didelių gyvūnų skaičiaus – sunkiau studijas standartizuoti [45].

Deja, kol kas morfologiniams tyrimams nėra geresnio būdo nei gyvūniniai ligų modeliai. Gyvūnai gyvena trumpai, todėl galima atlikti tyrimus skirtingoms amžiaus grupėms [45].

1.3.1. Populiarūs modeliai širdies nepakankamumui tirti

Aortos perrišimas

Perrišus aortą, aortos koarktacija – susiaurėjimas – virš inkstų sukelia labai trumpą renino kiekio padidėjimą plazmoje mažiau nei 4-ias dienas. Po to cirkuliuojančiame kraujyje renino – angiotenzino sistema nebesiaktyvuoja, bet suaktyvėja angiotenziną konvertuojantis fermentas skilveliuose. Po kelių savaičių ir šio fermento aktyvumas sumažėja iki normalaus. Tai susiję su širdies sienelės hipertrofija ir tempimo streso sumažėjimu. Yra atlikta daug studijų naudojant aortos perrišimą žiurkėms ir tyrinėjant skirtingus kairio skilvelio hipertrofijos aspektus. Vienoje studijoje jaunos žiurkėms buvo perrišta ky-

lančioji aorta ir sukelta lėtinė eksperimentinė aortos konstrikcija. Po kelių savaičių išsivystė kompensuota kairiojo skilvelio hipertrofija. Po 20 sav. identifikuotos dvi žiurkių grupės: žiurkės, kurioms sistolinis kairiojo skilvelio spaudimas nepakito, ir tos, kurioms šis spaudimas reikšmingai sumažėjo. Pastarajai grupei padidėjo kairiojo skilvelio sistolinis tūris, sumažėjo išmetimo frakcija, išryškėjo širdies nepakankamumo klinikiniai požymiai [48].

Panašu, kad šis modelis tinka tyrinėti miokardo hipertrofijos perėjimą į nepakankamumą, bet reikia nepamiršti, kad žiurkių miokardas subląsteliniame lygyje skirsis nuo žmogaus miokardo [49].

Vainikinių kraujagyslių perrišimas

Šis būdas gali būti naudojamas Sprague-Dawley veislės žiurkėms. Vainikinių arterijų ligavimas (perrišimas) sukelia miokardo infarktą. Jo pasekoje išsivysto širdies nepakankamumas. Jei kairioji vainikinė arterija yra nepilnai perrišta, ŠN atsiras dėl lėtinės miokardo išemijos. Pilna kairiosios vainikinės arterijos okliuzija sukelia įvairios apimties miokardo infarktą. Kairiojo skilvelio funkcija sutrinka dėl nebefunkcionuojančio miokardo. Kairysis skilvelis išsiplečia, suprastėja jo sistolinė funkcija, padidėja prisipildymo slėgiai [50]. Disfunkcija progresuoja ir dėl neurohumoralinės aktyvacijos, panašiai kaip ir žmonėms, ŠN pacientams. Angiotenziną konvertuojantis fermento aktyvumas kairiajame skilvelyje atvirkščiai koreliuoja su skilvelio funkcija, o inkstuose šio fermento aktyvumas padidėja gerokai vėliau po širdies nepakankamumo pradžios. Šio būdo trukumai yra didelis pradinis mirtingumas. Šis modelis tinkamas ilgos trukmės farmakologinėms neurohumoralinės sistemos studijoms [51].

Taip pat Lewis veislės žiurkėms ligavus kairę nusileidžiančią vainikinę arteriją sukeliamas didelis infarktas su mažu mirtingumu. Galbūt šis modelis net pranašesnis už Sprague-Dawley žiurkes [52].

1.3.2. Žiurkių, kaip eksperimentinių modelių širdies ir kraujagyslių ligoms tirti, privalumai ir trūkumai

Graužikai (pelės, žiurkės, jūrų kiaulytės) ir triušiai širdies ir kraujagyslių studijose dažnai naudojami, nes juos sąlyginai lengva prižiūrėti ir veisti. Laboratorinės žiurkės yra nebrangios. Dėl trumpo neštumo jas galima sąlyginai greitai dauginti ir manipuliuoti genetinė medžiaga. Tai lemia, kad žiurkių modeliai plačiai taikomi ilgos trukmės farmakologiniuose tyrimuose, išgyvenimo studijose [33]. Žiurkės dalinasi 90 proc. savo genomo su žmonėmis. Beveik visi su ligomis susiję žmonių genai buvo rasti ir žiurkių genome, todėl žiurkės yra tinkamas ligų tyrinėjimų objektas. Gerai žinomos žiurkių rūšys naudojamos daugelio ligų, pavyzdžiui, nutukimo ir diabeto, vėžio, širdies ir

kraujagyslių ligų (įskaitant ir aukšto kraujo spaudimo ir širdies nepakankamumo), tyrinėjimui [53, 54].

Žiurkių panaudojimą moksliniuose tyrimuose riboja kai kurie fiziologijos ypatumai: 1) žiurkių miokardo veiklos potencialas labai trumpas, nėra plato fazės; 2) kalcio pasišalinimas iš citozolio priklauso nuo sarkoplazminio tinklo kalcio siurblių aktyvumo, o natrio-kalcio siurblys mažiau svarbus; 3) normaliaame žiurkių miokarde dominuoja alfa-miozino sunkiosios grandinės izoforma, beta-miozino izoforma dominuoja esant hormoniniams ar hemodinaminiais pokyčiams; 4) ramybėje žiurkių širdies susitraukimų dažnis yra penkis kartus didesnis nei žmonių [55].

1.4. Žiurkės, kaip arterinės hipertenzijos modeliai

1.4.1. Druskai jautrios Dahl veislės žiurkės

Išvestos Kalifornijoje dr. Teodoro Kurtzo iš Harlan SS/Jr kolonijos. Veislės homozigotiškumui patvirtinti, jos genomas patikrintas 200-ais mikrosatelitinių markerių. Tai dar vienas gyvūnų modelis, tinkamas studijuoti širdies hipertrofijos dekompensavimą iki ŠN. Ši žiurkių veislė suserga sisteminė hipertenzija, kai būna šeriama daug druskos turinčiu maistu. Tuomet jau per aštuonias savaites išsivysto koncentrinė kairiojo skilvelio hipertrofija, po to įvyksta ženkli šio skilvelio dilatacija. Klinikinis ŠN išsivysto 15–20-ą savaitėmis. Žiurkės nugaišta neilgai trukus po to. Idealiai tinka hipertenzijos, diastolinio ŠN, nefropatijos tyrinėjimams [33, 56].

1.4.2. Spontaniškai hipertenzinės žiurkės

Pasirinktas arterinės hipertenzijos modelis – spontaniškai hipertenzinės žiurkės – pasižymi stabilumu (ši veislė išveista 1964 m. pagal visas taisykles: hipertenziniai gyvūnai kryžminti 10 kartų kol pasiektas stabilus arterinis kraujo spaudimas). Arterinė hipertenzija nesukeliama vaistais, o yra genetiškai įgimta. Spontaniškai hipertenzinę žiurkę (SHR) kaip gyvūnų modelį lėtiškai, nuolatinei hipertenzijai tirti sukūrė japonų mokslininkai Okamoto ir Aoki [57]. Dėl šios priežasties Wistar Kyoto (WKY) žiurkės plačiai naudojamos kaip kontrolinė grupė tiriant SHR žiurkes. Šiame modelyje širdies simpatinės neurotransmisijos reguliavimas atsiranda prieš prasidedant hipertenzijai, kaip rodo padidėjęs simpatinių nervų aktyvumas, kuris yra jau ankstyvame amžiuje [58].

Jaunoms, dar lytiškai nesubrendusioms SHR žiurkėms yra vadinama prehipertenzija. Tuo tarpu suaugusioms, lytiškai subrendusioms, priimta laikyti, kad sistolinis arterinis kraujo spaudimas yra padidėjęs, kai >150 mm Hg [54,

57, 59–62]. Numatoma spontaniškai hipertenzinių žiurkių gyvenimo trukmė yra apie 1,5–2 metus, o Wistar Kyoto žiurkių apie 2,5–3 m. [63].

Spontaniškai hipertenzinės žiurkės (angl. *the spontaneously hypertensive rat*) yra gerai žinomas genetinės hipertenzijos modelis. Širdies, kaip kraujo pompos funkcija, išlieka gera iki vienu metų amžiaus [57]. Nuo 18–24 mėnesių pradeda ryškėti širdies nepakankamumas dėl suprastėjusios miokardo funkcijos, išaugusios fibrozės. Tyrinėjant šį modelį taip pat nustatytas pakitęs kalcio apykaitos ciklas, bet sarkoplazminio tinklo kalcio siurblių mRNR kiekis nekito pereinamuoju laikotarpiu nuo kompensuotos hipertrofijos iki ŠN. Manoma, kad šiuo laikotarpiu įvyksta ryškūs genų, koduojančių ekstraląstelinę matriksą, pokyčiai [59], taip pat padaugėja apoptozę atliekančių kardiomiocitų. Tai galėtų paaiškinti, kodėl mažėja raumens masė, kai ŠN iš kompensuoto tampa dekompensuotu. Įdomu, kad vaistas kaptoprilis (AKF inhibitorius) susijęs su išreikštos apoptozės, lydinčios ŠN, sumažėjimu [64].

1.4.3. Spontaniškai hipertenzinės, širdies nepakankamumu sergančios žiurkės

Šios žiurkės nuo prieš tai aptartųjų skiriasi tuo, kad joms ŠN išsivysto anksčiau nei 18 mėn. amžiaus. Tai pavyko padaryti kryptingai veisiant spontaniškai hipertenziskas žiurkes (angl. trumpinys SH–HF). ŠN išsivysto anksčiau, nes šios žiurkės turi *facp* geną, kuris koduoja defektuotą leptino receptorių (SH-HF/Mcc-*facp*). Tai lemia, kad šiems gyvūnams su amžiumi daugėja plazmos renino, prieširdžių natriuretinio peptido, aldosterono. Plazmos renino kiekis, nepriklausomai nuo kitų veiksnių, koreliuoja su širdies hipertrofija [65].

1.5. Autonominės nervų sistemos įtaka arterinės hipertenzijos išsivystymui

Populiari hipotezė, kad arterinė hipertenzija kyla iš autonominės nervų sistemos išsibalansavimo tarp simpatinės ir parasimpatinės dalies [6]. Šis disbalansas pasireiškia vidinių autonominės nervų sistemos resursų, tokių kaip neuromediatorių kiekių pakitimu. Šiuolaikinės studijos demonstruoja, kad simpatinė nervų sistema dalyvauja arterinės hipertenzijos patogenezėje dėl padidėjusio simpatinio tonuso tiek pacientams, tiek žiurkėms, sergantiems arterine hipertenzija [66].

Širdies veikla valdoma dviejų, priešingai veikiančių autonominės nervų sistemos dalių. Tradiciškai, abiejų sistemų, simpatinės ir parasimpatinės, ikimazginiai neuronai, taip pat kaip ir parasimpatinės mazginės ląstelės, yra cholinerginės, tuo tarpu simpatinės nervų sistemos mazginiai neuronai yra adrenerginiai. Taip autonominė nervų sistema kontroliuoja daugumos vidaus

organų veiklą [67], nes ši sistema siejama su liaukų, širdies ir lygiųjų raumenų inervacija, jos pagrindinė funkcija gali būti apibūdinta kaip homeostazės palaikymas, taip pat funkciškai galima apibūdinti ir kaip atliekančią vidaus organų motorinę inervaciją [67].

Autonominio disbalanso įrodymai gaunami iš tyrimų, atliktų taikant skirtingus metodus (katecholaminų koncentraciją plazmoje, katecholaminų išsiskyrimą, raumenų simpatinių nervų mikroneurografinius įrašus) ankstyvose hipertenzijos stadijose ir esant prehipertenzinei būklei, bei normalų kraujospūdį turintiems asmenims, kurie turi šeiminingą hipertenzijos anamnezę [68].

Progresuojantis adrenerginis hiperaktyvumas yra akivaizdus progresuojant hipertenzinei būklei, ir jis ypač ženklus labiau pažengusiose ligos stadijose, tai yra esant sistolo-diastolinei hipertenzijai, izoliuotai sistolinei hipertenzijai ir atspariai hipertenzijai [69].

Keletas tyrimų parodė, kad hiperadrenerginis tonusas, būdingas pirminei hipertenzijai, nėra stabilus, bet seka ligos progresavimą nuo nekomplikuotų iki sunkių stadijų [70]. Palyginti su kontroliniais tiriamaisiais, adrenerginio tonuso padidėjimas yra ryškesnis hipertenzija sergantiems asmenims su sutrikusia inkstų funkcija [71, 72] ar pakitusia širdies struktūra [4]. Šie nuoseklūs duomenys rodo, kad simpatinės nervų sistemos aktyvacija yra lygiagretus procesas progresuojančiam kraujospūdžio padidėjimui ir organų pažeidimų vystymuisi. Sąsaja dar nereiškia priežasties ir pasekmės ryšio, todėl būtina žinoti, ar padidėjęs simpatinis tonusas, lydintis progresuojančią hipertenziją, turi patogenezinį vaidmenį. Turima duomenų, kad hiperadrenerginis tonusas, nepriklausomai nuo kraujospūdžio pokyčių, gali paskatinti širdies ir kraujagyslių struktūrinius pokyčius [73, 74].

Per daugelį metų surinkti įrodymai parodė, kad pirminei hipertenzijai būdingas sumažėjęs klajoklio nervo slopinantis poveikis širdžiai [75,76]. Tachikardinis atsakas, panašus, kad yra pirmasis jaunų hipertenzija sergančių asmenų [77, 78] bei ankstesnių hipertenzinių būklių autonominės disfunkcijos įrodymas. Parasimpatinė nervų sistema, kurios cholinerginiai neuronų kūnai dominuoja žinduolių ir žmonių širdies mazguose taip pat turi švelninantį efektą hipertenzijos išsivystymui ir pasireiškimo mastui [79]. Dargi, cholinerginiai neuronai ir jų sukeltas parasimpatinis tonusas gali turėti ne tik švelninantį, bet ir priešingą hipertenzijai efektą. Tai nustatė Masuda ir kt. ([80] spontaniškai hipertenzinėms žiurkėms ankstyvuojant hipertenzijos atsiradimo laikotarpiu. Įdomu, kad hipertenzijos genė ir pasireiškimas priklauso nuo autonominių neuronų cheminio disbalanso gyvūnams senstant [81] ir taip pat gali sukelti periferinę neuropatiją [82], kartu ir intrakardinės nervų sistemos pakitimus [83–85]. Dar daugiau, buvo parodyta, kad širdies nepakankamumas sukelia simpatinių (adrenerginių) skaidulų transdiferenciaciją į parasimpatines (cholinergines) žiurkių širdyse [8].

Nepaisant daugiamečių hipertenzijos tyrimų, mechanizmai, atsakingi už adrenerginio tonuso aktyvumą, vis dar nėra apibrėžti. Pirmoji hipotezė ta, kad simpatinis hipertonusas gali priklausyti nuo pernelyg didelio atsako į aplinkos dirgiklius (t.y. į stresą, oro taršą, rūkymą), sukeldamas kraujospūdžio kitimus ir vėliau stabilesnę ir ilgalaikę hipertenzinę būseną [78]. Ši hipotezė nėra galutinė, nes sunku apibrėžti, standartizuoti ir sukelti realų stresą siekiant iširti ilgalaikį jo poveikį. Buvo pasiūlyta, kad refleksogeninių sričių simpatinis slopinimas, kuris palaiko adrenerginį aktyvumą, gali būti atsakingas už simpatinio aktyvumo padidėjimą [75, 76, 86]. Buvo įrodyta, kad hipertenzijos metu sutrinka arterinis barorefleksas ir pablogėja jo gebėjimas kontroliuoti širdies ritmą, tačiau jis ir toliau moduliuoja kraujospūdį ir simpatinį aktyvumą [86, 87]. Šis pastebėjimas susilpnina barorefleksinę hipotezę, nors visiškai neatmeta jos vaidmens palaikant ir progresuojant simpatiniam aktyvumui pasunkėjus hipertenzijai. Barorefleksinę hipotezę patvirtina įrodymai, kad padidėjus kraujo spaudimui, padidėja ir simpatinė moduliacija, kurią vykdo barorefleksas (vadinamasis atsistatymo reiškinys), stabilizuojantis organizmo būseną esant aukštesnėms kraujospūdžio vertėms [87]. Taip pat, pacientams su kairiojo skilvelio hipertrofija ir/ar disfunkcija, hiperadrenerginės būklės atsiradime gali dalyvauti sumažėjęs širdies tempimo receptorių slopinamasis efektas širdies ir plaučių receptoriams refleksogeninėse srityse [75, 76, 86]. Taip pat hipertenzija siejama su renino, angiotenzino ir aldosterono sistemos aktyvumu. Įrodyta, kad angiotenzinas II gali veikti centrinę nervų sistemą ir padidinti adrenerginį tonusą [88]. Angiotenzino II infuzija gali padidinti simpatinių nervų aktyvumą, tuo tarpu angiotenziną konvertuojančio fermento inhibitorius leidžia to išvengti [89]. Kitas veiksnys, susijęs su adrenerginio tonuso reguliavimu – hipoksinis dirgiklis. Dėl hipoksijos gali pasireikšti du mechanizmai: periferinio chemorefleksinio jautrumo padidėjimas ir tiesioginis poveikis centrinei reguliacijai [90].

Daug ankstesnių straipsnių pateikia įrodymus, kad širdies simpatinės inervacijos reguliacija gali sutrikti dar prieš išsivystant klinikinei arterinei hipertenzijai. Spontaniškai hipertenzinės žiurkės, sulaukusios 4 savaičių amžiaus, dar yra normotenzinės, bet joms jau padidėjęs intraląstelinis kalcio kiekis kaip atsakas į neuronų depoliarizaciją [91], sumažėja priešsinapsinio norepinefrino transporterio aktyvumas [92, 93] žvaigždiniam ir viršutiniame kakliniam mazguose. Tiesioginė dešinio žvaigždinio mazgo stimuliacija sukėlė didesnę tachikardiją jaunoms spontaniškai hipertenzinėms žiurkėms nei Wistar Kyoto žiurkėms [92, 93]. Tuo tarpu, ir suaugusių žiurkių žvaigždinio mazgo stimuliacija elektra sukėlė didesnę atsaką nei kontrolei, taip pat ir norepinefrino išsiskyrė gausiau, β receptoriai labiau sureagavo nei kontrolinėje grupėje [94]. Yra įrodymų, kad suaugusių spontaniškai hipertenzinių žiurkių žvaigždinio mazgo neuronai ląstelių kultūroje turi didesnę kalcio tranzitą

[91], sumažėjusį priešsinapsinį noradrenalino įsisavinimą [92, 93], sutrikusią α_2 receptorių funkciją mažinti noradrenalino išsiskyrimą iš presinapsinės galūnės (varikozės) [95]. Tuo remiantis, visi aukščiau cituoti autoriai numanė, kad hipertenzinių žiurkių širdies noradrenerginių nervinių skaidulų hiperinervacija gali būti pats pirminis pakitimas, atsirandantis dar prieš arterinės hipertenzijos išsivystymą [96].

Nervinių ląstelių, kurioms kaip pagrindinis neuromediatorius nebūdingas nei acetilcholinai, nei adrenalinas, atradimas autonominėje nervų sistemoje atskleidė medžiagų, kurios atitinka neuromediatorių kriterijus, įvairovę autonominėje nervų sistemoje. Nuo to laiko nustatyta daugybė kitų baltymų, susijusių su signalo perdavimu. Kalcitonino geno baltymo produktas (angl. *calcitonine gene-related peptide*, CGRP) gausiai sintetinamas nugarinio mazgo juntamuosiuose neuronuose ir yra laikomas vienu specifiskiausių šių ląstelių žymeniu [97]. Taipogi, CGRP žinomas kaip vienas iš pajėgiausių vazodilatorių, veikiančių mikrocirkuliaciją smegenyse [98], odoje [99, 100], kituose organuose bei širdyje [101–103].

2. TYRIMŲ METODIKA

2.1. Tyrimo medžiaga

Tyrime naudotos kontrolinės Wistar – Kyoto (WKY) veislės ir eksperimentinės spontaniškai hipertenzinės (SHR) žiurkės. Gyvūnai buvo įsigyti iš Charles River Laboratories (Vokietija) ir laikyti Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologinių tyrimų centre. Biologinių tyrimų centre gyvūnų laikymo sąlygos ir procedūros su gyvūnais yra sertifikuotos, Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas dėl bandomųjų gyvūnų veisimo ir naudojimo – Nr. B6-(1.9.)-855. Pagal laboratorinių žiurkių laikymo taisyklės, žiurkės buvo apgyvendintos narvuose, patalpoje su kontroliuojamu šviesos/tamsos ciklu (12/12 val.), bei 22 ± 2 °C temperatūra, turėjo laisvą prieigą prie maisto ir vandens (*ad libitum*). Visi eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais atitiko ES direktyvą 86/609/EEB, gautas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas bandymo su gyvūnais projekto atlikimui Nr. G2-137.

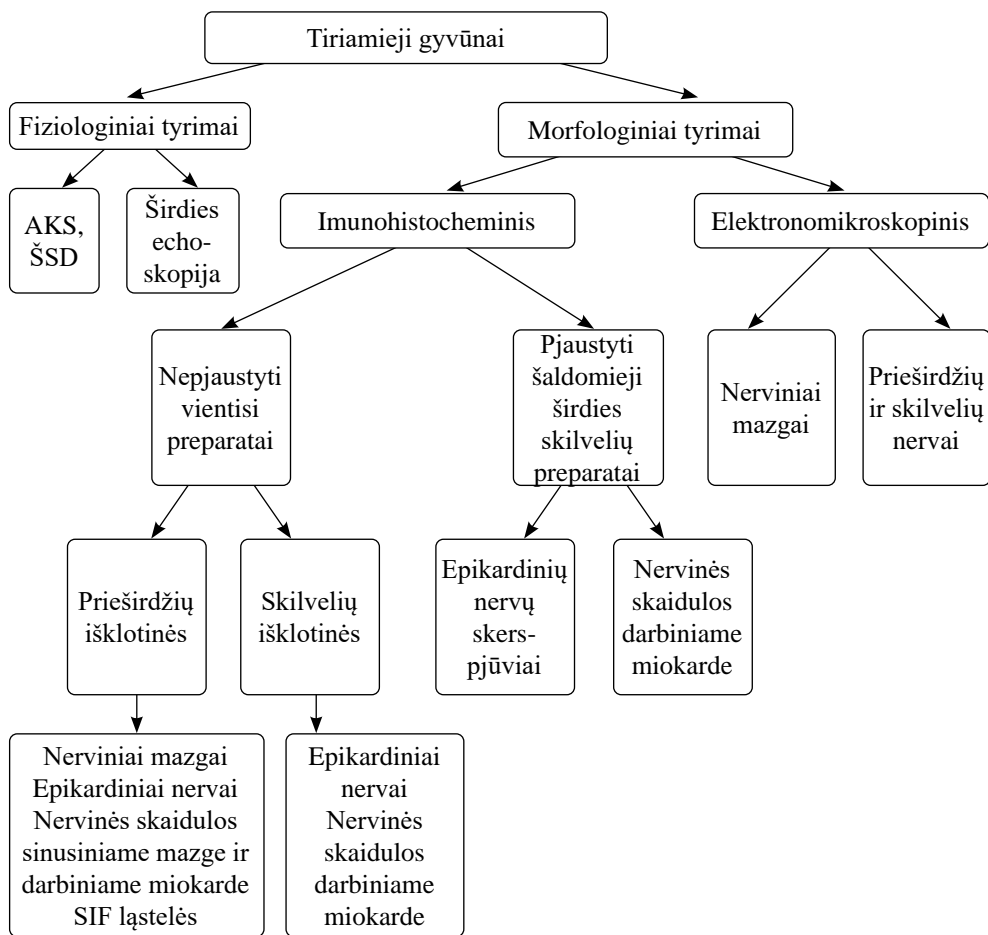
Tirta keturių amžiaus grupių, abiejų veislių (WKY ir SHR) medžiaga (2.1.1 lentelė). Imunohistocheminiam kievieno neuromediatoriaus tyrimui panaudojome po šešis gyvūnus (išskyrus labai senų žiurkių amžinę grupę). Ultrastruktūriniam tyrimui panaudojome po tris suaugusių ir senų amžiaus grupių gyvūnus.

2.1.1 lentelė. Tyrime naudoti gyvūnai

Tiriamoji grupė	Amžiaus grupė			
	Jaunos (8-9 sav.)	Suaugusios (12-18 sav.)	Senos (46-60 sav.)	Labai senos (78-82 sav.)
WKY	18	18	18	5
SHR	18	18	18	5

2.2. Tyrimo struktūra

Gyvūnų tyrimus galima suskirstyti į tris grupes (2.2.1 pav.). Pirmiausia, gyviems gyvūnams, atlikti hemodinamikos tyrimai siekiant patvirtinti, kad tai bus tinkama medžiaga AH modeliui. Toliau sekė morfologiniai tyrimai, panaudojant imunohistocheminį bei transmisinės elektroninės mikroskopijos metodus.



2.2.1 pav. Atliktų tyrimų schema

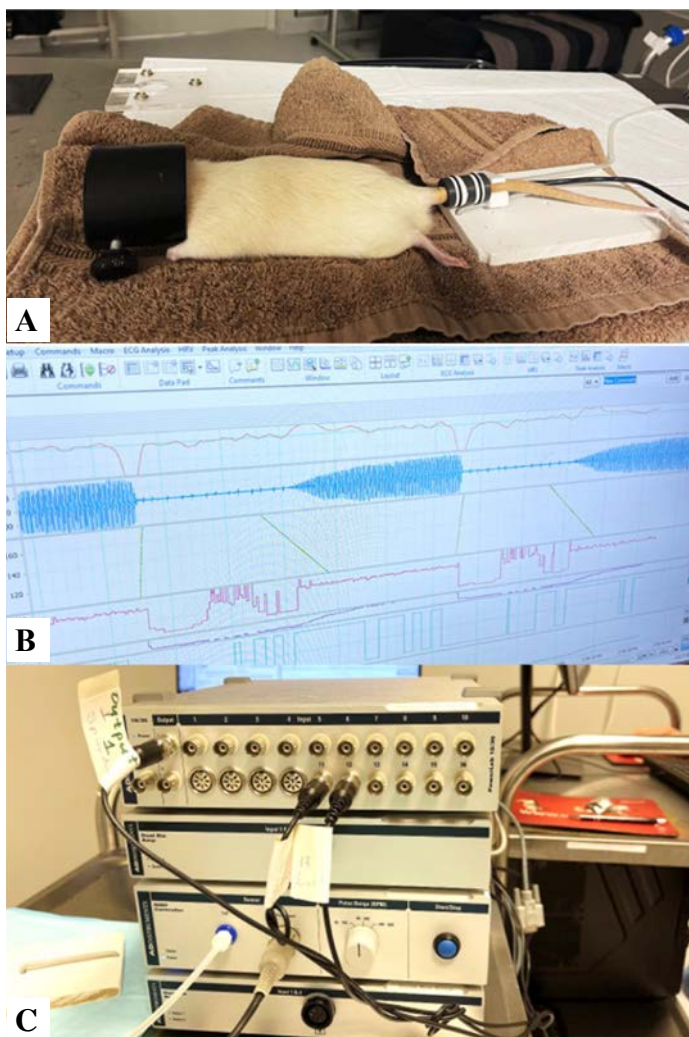
AKS – arterinis kraujo spaudimas; ŠSD – širdies susitraukimų dažnis.

2.3. Fiziologiniai tyrimai

2.3.1. Arterinio kraujo spaudimo matavimas

Trijų amžiaus grupių gyvūnams atliktas neinvazinis arterinio kraujo spaudimo matavimas uodegoje uždėjus manžetę, taikant intraperitoninę sedaciją ketaminu 90 mg/kg ir deksmedetomidinu 0,5 mg/kg. Naudotas šildantis iki 37 °C padelis. Po sedacijos, kiekvienai žiurkei buvo atlikta po dešimt matavimų kas 1 min automatinio būdu. Rezultatams naudota šių matavimų mediana. Išmatuotas širdies susitraukimų dažnis (ŠSD), sistolinis bei diastolinis kraujo spaudimai (SAKS ir DAKS). Vidurinis kraujo spaudimas (VAKS) apskaičiuotas pagal šią formulę: $DAKS + 1/3(SAKS - DAKS)$. Visus matavimus

atliko ta pati tyrėjų komanda, tylioje ir ramioje aplinkoje, naudota sertifikuota aparatūra (AD Instruments ML125/R NIBP system, Sidney, Australia ir LabChart programinė įranga) (2.3.1.1 pav.).



2.3.1.1 pav. Kraujo spaudimo matavimas žiurkės uodegoje

A – seduota žiurkė guli su gaubteliu ant galvos (saugo nuo triukšmo ir šviesos). Ant uodegos – išorinė kraujo spaudimo matavimo manžetė bei infraraudonųjų spindulių daviklis. B – matavimų metu sugeneruojama informacija. C – neinvazinio kraujo spaudimo matavimo aparatūra (AD Instruments ML125/R NIBP system, Sidney, Australia).

2.3.2. Gyvūnų širdies echoskopijos tyrimas

Kontrolinių bei hipertenzinių žiurkių širdies ultragarsinis tyrimas viengubu aklu būdu (angl. *single-blinded method*) buvo atliktas LSMU Biologinių tyrimų centre dalyvaujant gydytojui veterinarui, patyrusiam gyvūnų širdies echoskopijos specialistui. Tyrimo metu, gyvūnai seduoti diazepamą 3–5 mg/kg injekcija į pilvaplėvės ertmę, monitoruojant gyvybines funkcijas (kvėpavimo dažnis, širdies susitraukimų dažnis). Naudotas šildantis iki 37 °C padelis. Po sedacijos, žiurkei buvo nuskutamas kailiukas ir gyvūnas guldytas ant dešiniojo šono. 2D tyrimas atliktas su 120 kadru per sekundę režimu bei M režimu naudojant Mindray DC-70 aparatą su 3,0–12,0 MHz dažnio davikliu. Ultragarsinis širdies tyrimas atliktas su išoriniu davikliu per krūtinės laštos sieną. Fiksuoti parametrai: sistolės bei diastolės metu matuota pertvaros, kairiojo skilvelio sienų storiai, kairiojo skilvelio vidinės ertmės skersmuo; taip pat automatiškai apskaičiuota išstūmimo frakcija (angl. *ejection fraction*), frakcinis sutrumpėjimas (angl. *fractional shortening*). Kiekvienas matavimas pakartotas šešis kartus, rezultatuose naudota vidutinė reikšmė. Remtasi Amerikos echokardiografijos draugijos metodologinėmis rekomendacijomis [104] ir kitais tyrėjais [105]. Gyvūnai tirti tris kartus gyvenimo eigoje. Po tyrimo gyvūnai monitoruoti bei toliau laikyti Biologinių tyrimų centre.



2.3.2.1 pav. Širdies 2D echoskopijos tyrimo vaizdas monitoriuje

2.4. Morfolginiai tyrimai

2.4.1. Audinių paruošimas imunohistocheminiams tyrimams

Žiurkių eutanazija atlikta remiantis pasauline gerąja praktika. Žiurkė buvo patalpinama į eutanazijos kamerą su palaispniui didėjančia CO₂ koncentracija 6-ioms minutėms. Tada tikrintas ragenos refleksas. Konstatavus jo nebuvimą ir žiurkės numarinimo faktą, atvėrus krūtinės ląstą ir į širdies kairiojo skilvelio ertmę transmiokardialiai įvedus kateterį, širdis buvo perfuzuojama atšaldytu 0,1 M fosfatinio buferiu su druska (PBS, pH 7,4). PBS tirpalo sudėtis: 8,06 mM Na₂HPO₄, 1,94 mM NaH₂PO₄, 2,7 mM KCl ir 137 mM NaCl. Vidutiniškai širdies perfuzija trukdavo 8–12 min. Perfuzato perteklius pasišalindavo per įkirptą dešiniąją prieširdžio ausytę. Tuomet buvo atliekama audinių prefiksacija, perfuzuojant su 4 proc. paraformaldehido (PFA) tirpalu. Išplovus širdies kraujagysles bei kameras, širdis būdavo išimama iš krūtinės ląstos ir postfiksuojama 40 min. 4 proc. PFA tirpale. Duomenys fiksuojami protokole (2.4.1.1 pav.)

HIPERTENZIJOS PROTOKOLAS

KODAS

DATA

Rūšis		
Lytis	Amžius	Svoris
Kita informacija		
Perfuzija (iki fiksacijos)		
Fiksacija (iki dehidratacijos)		

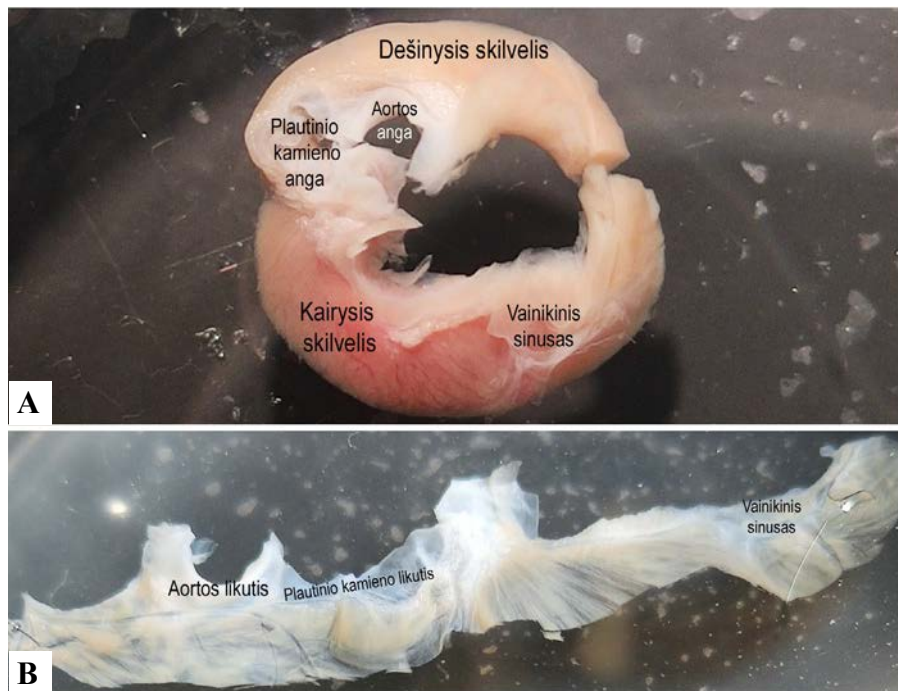
2.4.1.1 pav. Preparatų paruošimo protokolas imunocheminėms reakcijoms

Nepjaustyčių preparatų paruošimas

Vėliau širdis patalpinama specialioje kameroje su atšaldytu iki 4 °C PBS tirpalu. Šioje kameroje širdis iškarpoma dviems skirtingiems preparatams paruošti.

1. Plokščiam prieširdžių preparatui paruošti: skilveliai pašalinami perkerpant širdį per vainikinę vagą, tarpširdinė pertvara taip pat iškerpama. Pašalinus kairiosios ir dešinėsios širdies ausyčių viršūnes, jos buvo perkerpamos išilgai link širdies viršūnės ir atlenkiamos. Prieširdis atsargiai ištempiamas ir prisegamas plonomis adatėlėmis prie silikonu užpildytos kameros, taip, kad būtų matomos viršutinės ir apatinės tuščiųjų venų, kairiosios galvinės venos bei kairiosios, vidurinės ir dešinėsios plautinių venų angos.

2. Ruošiant širdies skilvelių išklotines, buvo paimama likusi skilvelių dalis po prieširdžių pašalinimo, atkerpamas 2-3 mm dešiniojo ir kairiojo skilvelio žiedas po vainikine vaga ir perkerpamas ties dešiniąja ausyte (2.4.1.2 pav.).



2.4.1.2 pav. Skilvelių išklotinės ruošimas

A – atkirptas dešiniojo ir kairiojo skilvelių žiedas po vainikine vaga. B – išskleistas ir išplonintas skilvelio preparatas, epikardiniu paviršiumi į viršų.

Nukirpta skilvelio dalis yra išploninama, pašalinanant endokardą, didžiąją dalį miokardo, ir prismeigiama vonelėje su silikoniniu paduku, epikardu į viršų. Prieširdžių bei skilvelių paruošti preparatai praplaunami 3×10 min. PBS buferyje ir dehidratuojami laikant juos po 10 min. 30° , 50° , 70° , 90° , 96° ir tris kartus 100° etanolio tirpale. Kad antikūnai geriau skverbtųsi į audinį, preparatas buvo laikomas 2 valandas Dento tirpale: viena tūrinė dalis dimetil-sulfoksido maišoma su keturiomis tūrinėmis dalimis 100° etanolio. Audinyje esančiam pigmentui pašalinti, preparatas buvo laikomas per naktį peroksido tirpale: viena tūrinė dalis 30 proc. vandenilio peroksido buvo maišoma su keturiomis tūrinėmis dalimis minėto Dent'o tirpalo. Po balinimo, preparatas rehidratuojamas, laikant jį po 10 min. 70° , 50° , 30° etanolyje ir tris kartus PBS buferyje su 1 proc. Triton X-100 (CarlRoth, Vokietija) tirpalu.

Pjaustytų mėginių paruošimas imunohistocheminiams tyrimams

Širdies skilvelių pjūvių imunohistocheminėms reakcijoms atlikti, po postfikasacijos širdis 3 kartus plaunama PBS buferyje ir perkeliama krioprotekcijai į 30 proc. sacharozės tirpalą (CarlRoth, Vokietija) fosfatiniame buferyje su natrio azidu ir laikoma 24–48 val. +4°C temperatūroje, kol nugrims į dugną. Po to užšaldoma –60 °C. Prieš pjaunant, skilveliai suorientuojami ir įliejami į šaldomiesiems mėginiams skirtą specialią terpę (TBS, *Triangle Biomedical Sciences*, JAV). Šaldomuoju mikrotomu HM560 (Micom, Vokietija), –23 °C temperatūroje pjaunami 18 µm storio pjūviai, surenkami ant SuperFrost stiklelių (Menzel-Glaser, Vokietija), išdžiovinami kambario temperatūroje, įvyniojami į aliuminio foliją, saugomi –45°C temperatūroje.

Imunohistocheminės reakcijos

Nespecifinėms antrinių antikūnų reakcijoms užblokuoti, preparatas inkubuojamas 2 val. kambario temperatūroje 5 proc. normaliam asilo serume (angl. *Normal Donkey Serum*, NDS), plaunamas 3×10 min. PBS buferyje ir inkubuojamas 48 val. +4 °C temperatūroje pirminių antikūnų mišinyje (2.4.1.1 lentelė). Po to, plaunamas 3×10 min. PBS buferyje ir inkubojamas 4 val. kambario temperatūroje antrinių antikūnų (2.2 lentelė) mišinyje. Blokuojančio serumo, pirminių bei antrinių antikūnų praskiedimui buvo naudojamas antikūnų skiedimo tirpalas (*ab64211*, *Abcam*, UK). Po reakcijos preparatas plaunamas 3×10 min. PBS buferyje, po to audinys atsargiai perkeliamas ant stiklelio, išskleidžiamas bei ištiesinamas specialios nefluorescuojančios terpės *Vectashield Mounting Medium* (*Vector Laboratories, Inc.*, *Burlingame*, JAV) laše. Audinys uždengiamas dengiamuoju stikleliu, prispaudžiamas svaireliu, o dengiamojo stiklelio kraštai užsandarinami skaidriu nagų laku. Antikūnų specifiskumui patikrinti buvo naudojama neigiama kontrolė: nedidelis prieširdžio audinio gabalėlis buvo prisegamas šalia išskleisto prieširdžio ir vietoj pirminių antikūnų mišinio, jis buvo inkubuojamas PBS tirpale. Kitos reakcijos atliekamos taip pat kaip ir visam prieširdžiui. Praleidus pirminių antikūnų etapą, mažame kontrolinio audinio gabalėlyje nebuvo matyti nervinių struktūrų.

2.4.1.1 lentelė. Tyrime naudotų antikūnų sąrašas

Antikūnai	Antigenas	Kilmė	Skiedimas	Katalogo Nr.	Gamintojas*
Pirminiai					
	ChAT	Ožka	1:100	AB144P	Chemicon
	TH	Triušis	1:500	AB152	Chemicon
	CGRP	Pelė	1:500	ab10987	Abcam
	PGP 9,5	Triušis	1:500	38-1000	Invitrogen
	PGP 9,5	Pelė	1:500	ab8189	Abcam
	nNOS	Pelė	1:500	sc-5302	SantaCruz
	HCN4	Triušis	1:300	AB5808	Millipore
	SP	Jūrų kiaulytė	1:500	ab10353	Abcam
Antriniai prieš:					
	Ožką, konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP180C	Chemicon
	Ožką, konjuguoti su Cy5	Asilas	1:500	AP180S	Chemicon
	Triušį, konjuguoti su FITC	Asilas	1:300	AP182F	Chemicon
	Triušį, konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP182C	Chemicon
	Triušį, konjuguoti su Cy5	Asilas	1:500	AP182S	Chemicon
	Pelę, konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP192C	Chemicon
	Pelę, konjuguoti su FITC	Asilas	1:500	AP192F	Chemicon
	Jūrų kiaulytę, konju- guoti su Cy3	Asilas	1:500	AP193C	Chemicon

*Tiekėjų adresai: Chemicon International, Temecula, California, USA; Abcam, Cambridge, UK; Invitrogen, Rockford, USA; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA.

2.4.2. Mėginių paruošimas transmisinei elektroninei mikroskopijai

Po eutanazijos, atvėrus krūtinę, į širdies kairiojo skilvelio ertmę transmio-kardialiai įvestu kateteriu širdis perfuzuota atšaldytu heparinizuotu 0,1 M fosfatiniu buferiu su druska (PBS, pH 7,4). Vidutiniškai širdies perfuzija už-trukdavo 5–10 min. Išplovus širdies kraujagysles bei kameras, širdis būdavo prefiksuo-jama perfuzijos būdu per metalinį kateterį 2,5 proc. glutaraldehido 0,1 M fosfatiniame buferyje tirpalu, pH 7,4. Po prefiksacijos širdis išprepa-ruojama iš krūtinės ląstos ir papildomai fiksuojama 10–60 min. panardinus tame pačiame fiksatoriuje. Širdies gabalėliai ultrastruktūriniais tyrimams buvo iškerpami specialioje kameroje, panardinus širdį į fiksatorių (2.4.2.1 pav.). Iškirpti mėginiai papildomai fiksuojami tame pačiame 2,5 proc. gliu-

taraldehido tirpale per naktį. Kitą dieną fiksuojami 1 proc. osmio tetrokside 2 val, dehidruojami didėjančios koncentracijos etanolio tirpalais ir acetonu, įliejami į epoksidinių dervų Epon 812 (Serva) ir Araldit 502 (Serva) mišinį. Pusiau plonus (1–3 μm) ir ultraplonus (50–70 nm) širdies pjūvius pjaustėme ultramikrotomu Leica Ultracut EM UC7. Atpjauti 1 μm storio pusiau ploni pjūviai buvo dažomi metileno mėliu pagal Ridgway [106] ir analizuojami šviesiniu mikroskopu Zeiss (M2, Carl Zeiss, Vokietija). Identifikavus pusiau plonuose pjūviuose nervines struktūras, pjūvio plotas sumažinamas iki reikiamo dydžio ir pjaunami ~60 nm ultraploni pjūviai, panaudojant specialius deimantinius peilius elektroninei mikroskopijai. Pjūviai surenkami ant specialaus tinklelio ir dažomi įprastine metodika uranilo acetatu ir švino citratu.

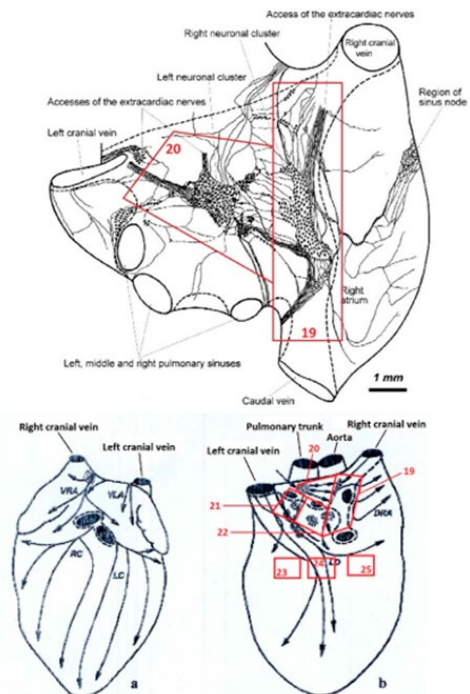
HIPERTENZIJOS TEM PROTOKOLAS

KODAS.....

DATA.....

Rūšis		
Lytis	Amžius	Svoris
Kita informacija		
Perfuzija (iki fiksacijos)		
Fiksacija (iki dehidratacijos)		

Prieširdžiai	19	Mazgas tarp dešn. kranialinės ir kaudalinės venų	
	20	Mazgas prie plautinių venų	
	21	Kair. prieširdžio užpak. pav. mazgai	
	22	Kair. prieširdžio užpak. pav. mazgai	
Skilveliai	23	Kair. skilvelio užpak. pavirš.	
	24	Užpakal. tarpkilvelinė vaga	
	25	Deš. skilvelio užpakalinis pavirš.	
	26	LD3 įeinantys nervai ties LCV	
	27	LD1 stambūs nervai nuo LCV	
	28	LD stambūs nervai	
	29	LC	
	30	RC	
	31	VRA	
	32	VRA1 įeinantis ties RCV1	
33	VLA		



2.4.2.1 pav. Preparatų paruošimo protokolas transmisinei elektronmikroskopijai

2.4.3. Mikroskopavimas ir duomenų rinkimas

Imunohistocheminių mėginių mikroskopinis tyrimas

Gauti imunohistocheminiai preparatai analizuoti mikroskopu AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Vokietija), turinčiu apotomą (Carl Zeiss, Vokietija), skaitmeninę monochrominę kamerą AxioCam MRm (Carl Zeiss, Vokietija). Taip pat konfokaliniu mikroskopu LSM 700 (Carl Zeiss, Vokietija). Gautos skaitmeninės nuotraukos koreguotos ir analizuotos kompiuterine programa AxioVision 4.7.1 (Carl Zeiss, Vokietija) bei ImageJ (*Fiji, National Institutes of Health, JAV*) [107].

Išplokštintuose preparatuose

Nervinių mazgų vertinimas: Prieširdžių išsklotinėse išmatuojami nervinių mazgų plotai, jų kiekis; suskaičiuojama, kiek neuronų yra kiekviename mazge, įvertinamas neuronų tankumas; vertinant atskiras nervines ląsteles, išmatuojamas neuronų kūnų plotas, suskaičiuojama kiek yra adrenerginių bei cholinerginių neuronų mazge; išmatuojamas SIF (*angl. small intensive fluorescent*) ląstelių, esančių šalia mazgo, telkinių plotas, taip pat įvertinamas adrenerginių, cholinerginių bei peptiderginių nervinių skaidulų tankumas mazge. Atskiru mazgu laikytas neuronų telkinys, nuo kito mazgo nutolęs daugiau nei per du neuronus. Tinkamu matavimui laikytas neuronas, turintis aiškias sienas bei branduolį. Jei neuronų skaičius mazge arba nerve buvo mažiau 30 – neuronų kūnų plotas pamatuotas jiems visiems. Jei neuronų skaičius mazge buvo didesnis nei 30 – plotas matuotas 10-čiai procentų nuo bendro neuronų skaičiaus mazge. Neuronų matavimai atlikti visuose nuotraukos sluoksniuose, tuo tarpu mazgai matuoti susumavus nuotraukų sluoksnius.

Nervų vertinimas: Prieširdžių kairės nugarinės pusės srities, bei skilvelių išsklotinėse buvo suskaičiuojamas nervų kiekis; išmatuojamas nervų, storesnių negu 5 mikrometrai, skersinis plotis; apskaičiuojama, kiek procentiškai nervo išilginio pjūvio plote yra adrenerginių, cholinerginių bei peptiderginių nervinių skaidulų. Nervo plotis (skersmuo) matuotas statmenai (90° kampu) nervo ilgiui. Prieširdžio išsklotinėje išmatuota kiekviena nervo atšaka (išsišakojimas). Skilvelio išsklotinėje matavimai atlikti dvejose menamose linijose, lygiagrečiose vainikinei vagai: (1) prie pat vainikinės vagos bei (2) 1 mm žemiau jos, siekiant įvertinti nervų pokyčius leidžiantis nuo prieširdžių link skilvelių viršūnės žemyn.

Įvertinamas širdies sinusinio mazgo ir prieširdžių darbinio miokardo smulkių nervinių skaidulų tankumas.

Skilvelių pjūvių preparatuose: 40× didinimu buvo fotografuojami visi ryškūs viename skilvelių pjūvyje matomi epikardiniai nervai. Nervai suskirs-

tyti į dešiniojo bei kairiojo skilvelio grupes. Įvertinti epikardinių nervų kiekis, jų dydis, imunocheminė skaidulų sudėtis. Imunohistocheminė sudėtis iširta taip: rankiniu būdu apibrėžtas bendras nervo skerspjūvio plotas, pažymėtas PGP 9,5 neuromarkeriu. Gautas dydis padalintas iš skirtingais neuromarkeriais pažymėtų skaidulų ploto bei išreikštas procentais. Miokardo nervinės skaidulos fotografuotos sistemškai vienodu atsitiktiniu imties būdu (angl. *Systemic uniform random sampling*), o skaičiavimo rėmas buvo viena nuotrauka (angl. counting frame). Nuotraukos plotas $150\ 135\ \mu\text{m}^2$. Rezultatai pateikti procentine išraiška.

Transmisinė elektroninė mikroskopija

Ultrastruktūriniam tyrimui transmisiniu elektroniniu mikroskopu (TEM) FEI® BioTwin G2 Spirit (FEI, Eindhoven, Olandija) visas pjūvis, ieškant nervinių struktūrų – nervų ir nervinių skaidulų, buvo peržiurimas nuosekliai su įmontuota šonine kamera Olympus® MegaViewG2, o suradus nervinę struktūrą morfometriniams matavimams buvo fotografuojama $\times 4800$ ir $\times 6800$ padidiniu apačioje įmontuota didelės skiriamosios gebos kamera 16 MP TEM CCD camera Eagle 4K naudojant programinę įrangą TIA (FEI, Eindhoven, Olandija). Elektronogramos analizuotos programa AxioVision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Elektronogramose buvo įvertinti morfologiniai neuronų kūnų, sinapsių, aksonų bei Švano ląstelių pokyčiai. Atliktas kiekybinis prieširdžių bei skilvelių nervų vertinimas:

1. Vertinant nemielinines nervines skaidulas:
 - a) išmatuojamas aksonų skersmuo ir plotas;
 - b) suskaičiuojamas aksonų skaičius skaiduloje;
 - c) apskaičiuotas bendras aksonų užimamas plotas nerve;
 - d) suskaičiuojami aksonai su artefaktais.
2. Vertinant mielinines nervines skaidulas:
 - a) suskaičiuotos visos tirtame nerve rastos ir intaktinės mielininės skaidulos;
 - b) išmatuoti elektronogramoje matomas nervo plotas, aksono ir nervinės skaidulos skersmenys ir plotai;
 - c) apskaičiuotas aksonų tankumas nerve ir G santykis (santykis tarp aksono skersmens ir mielininio dangalo išorinio skersmens);
 - d) suskaičiuojami aksonai ir Švano ląstelės su artefaktais.

2.5. Statistinė analizė

Naudoti aprašomosios ir analitinės statistikos metodai. Duomenų pasiskirstymo normalumas tikrintas panaudojant Kolmogorovo-Smirnovo kriteri-

jų ir laikytas normaliai pasiskirsčiusiu, kai $p > 0,05$. Statistinė analizė atlikta IBM SPSS 20.0 programa, pasirinktas 95 proc. pasikliautinumo intervalas. Duomenys lentelėse ir grafikuose išreikšti aritmetiniu vidurkiu ir jo standartinė paklaida arba mediana ir standartiniu nuokrypiu. Jeigu lyginamos duomenų imtys atitiko normalųjį skirstinį, buvo taikytas Stjudento t-testas, o kai neatitiko – Mann-Whitney U testas. Lyginant daugiau nei dvi duomenų grupes taikyta Kruskal-Wallis testas nepriklausomoms imtims, Friedmano testas – priklausomoms imtims. Duomenų bazė sukurta naudojantis Microsoft Office Excel.

3. REZULTATAI

3.1. Fiziologinių parametru charakteristika

3.1.1. Arterinis kraujo spaudimas ir širdies susitraukimų dažnis

Visų amžiaus grupių (15–17, 45–47 ir 52–60 savaičių) hipertenzinių žiurkių sistolinis, vidurinis ir diastolinis arterinis kraujo spaudimas buvo padidėjęs ir didėjo gyvūnui senstant. Tokia pati tendencija pastebėta ir kontrolinėje grupėje: senų (52–60 savaičių) WKY žiurkių sistolinis kraujo spaudimas kilo virš 140 mm Hg, t. y. buvo didesnis nei viršutinė normos riba. Širdies susitraukimų dažnis varijavo normos ribose su polinkiu didėti gyvūnams senstant (3.1.1.1 lentelė).

3.1.1.1 lentelė. Hemodinaminiai parametrai

Parametrai	Amžius					
	15–17 savaičių		45–47 savaičių		52–60 savaičių	
	WKY (N = 8)	SHR (N = 8)	WKY (N = 8)	SHR (N = 8)	WKY (N = 10)	SHR (N = 11)
ŠSD, k./min.	249 (8)	237 (14)	175 (9)	254 (26)*	305 (30)	344 (18)
SAKS, mm Hg	118 (4)	173 (9)*	133 (6)	195 (7)*	160 (12)	198 (9)*
DAKS, mm Hg	75 (7)	137 (8)*	109 (5)	149 (8)*	116 (13)	150 (7)*
VAKS, mm Hg	89 (6)	149 (8)*	117 (5)	164 (7)*	130 (12)	166 (8)*

*- statistiškai reikšmingas skirtumas tarp WKY ir SHR grupių, $p < 0,05$.

Duomenys pateikiami kaip vidurkis (standartinė paklaida). N – žiurkių kiekis; SAKS – sistolinis arterinis kraujo spaudimas; DAKS – diastolinis arterinis kraujo spaudimas; VAKS – vidurinis arterinis kraujo spaudimas; k./min. – kartai per minutę.

3.1.2. Širdies ultragarsinis tyrimas

Širdies ultragarsinis tyrimas parodė, kad kontrolinė ir hipertenzinė grupės iš esmės skyrėsi 20-ies savaičių grupėje (3.1.2.1 lentelė). Labiausiai skyrėsi kairiojo skilvelio parametrai: vidinis skersmuo, sienos storis, išstūmimo frakcija, frakcinis sutrumpėjimas. Hipertenzinių žiurkių kairiojo skilvelio hipertrofija statistiškai reikšmingai pasireiškė 20-os ir 30-os savaičių grupėse. Echoskopinis tyrimas atskleidė, kad 20-ies sav. SHR grupėje sustorėjo tarp-skilvelinė pertvara ir laisvoji kairiojo skilvelio sienelė, bei pasikeitė kairiojo skilvelio ertmės skersmuo – pokytis stebimas tiek sistolėje, tiek diastolėje. 60-ies sav. SHR grupėje lyginant su tokio pačio amžiaus WKY, reikšmingai padidėjo kairiojo skilvelio ertmė. Išmetimo frakcijos bei frakcinio sutrumpėjimo procentai reikšmingai didesni SHR 30-ies sav. grupėje nei to paties

amžiaus WKY žiurkių. 60-ies sav. grupėje WKY tie patys parametrai panašūs į SHR (3.1.2.1 lentelė).

3.1.2.1 lentelė. Žiurkių širdies echoskopijos duomenys

Parametrai	Amžius					
	19–20 savaičių		29–30 savaičių		46–60 savaitės	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
	(N = 6)	(N = 11)	(N = 6)	(N = 6)	(N = 19)	(N = 23)
Gyvūno svoris, g	241 (25)	224 (39)	362 (15)	380 (13)	368 (14)	324 (16)*
IVSd, mm	2,5 (0,1)	2,4 (0,2)	2,3 (0,1)	2,2 (0,1)	2,2 (0,1)	2,1 (0,1)
IVSs, mm	3,4 (0,2)	3,6 (0,2)	3,2 (0,1)	3,1 (0,2)	3,1 (0,1)	3,0 (0,1)
LVIDd, mm	4,8 (0,2)	4,4 (0,3)	5,1 (0,3)	5,2 (0,3)	5,2 (0,1)	5,5 (0,2)
LVIDs, mm	3,0 (0,1)	1,7 (0,2)*	2,8 (0,2)	2,9 (0,3)	2,8 (0,2)	2,9 (0,2)
LVWd, mm	1,8 (0,5)	2,5 (0,1)	2,2 (0,1)	2,8 (0,1)*	2,5 (0,1)	2,4 (0,1)
LVWs, mm	2,3 (0,5)	3,5 (0,2)*	2,8 (0,2)	3,6 (0,2)*	3,2 (0,1)	3,2 (0,1)
FS, proc.	38,2 (1)	60,7 (3,9)*	45,1 (1,6)	44,2 (2,9)	45,7 (2,6)	47,6 (3,5)
EF, proc.	74,3 (1,5)	91,1 (2,2)*	82,2 (1,6)	80,4 (3,1)	81,3 (2,1)	80,4 (2,8)

* – statistiškai reikšmingas skirtumas tarp WKY ir SHR grupių, $p < 0,05$.

Duomenys pateikiami kaip vidurkis (standartinė paklaida). *N* – žiurkių kiekis; IVS – tarpkilvelinė pertvara; LVID – kairio skilvelio vidinis skersmuo; LVW – kairio skilvelio laisvoji siena; FS – frakcijinis sutrumpėjimas; EF – išstūmio frakcija; d – diastolėje; s – sistolėje.

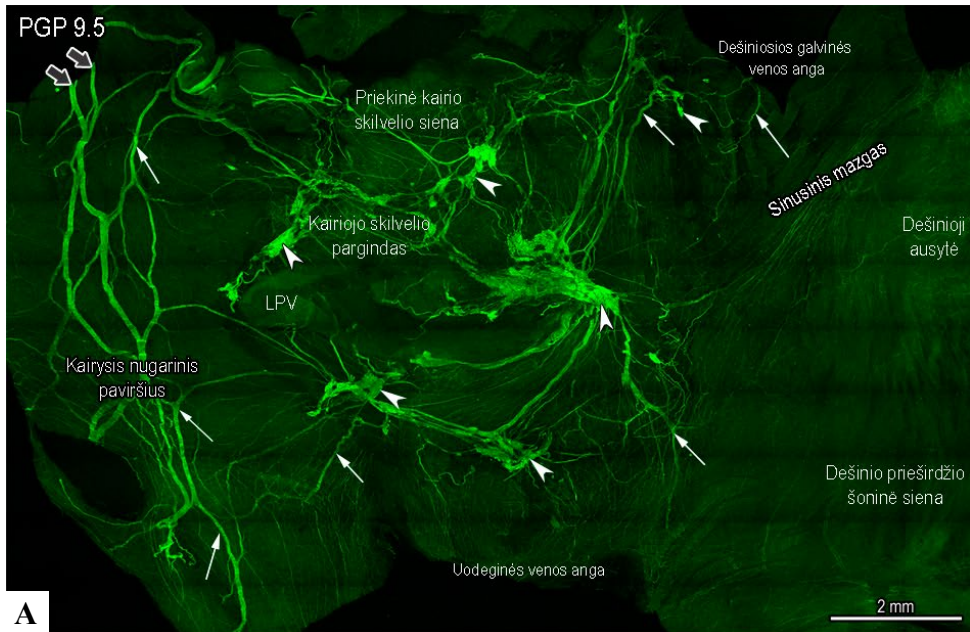
Atskiruose senuose individuose (tiek WKY, tiek SHR) buvo pastebėta tokių širdies nepakankamumui būdingų požymių: aortos vožtuvo nepakankamumas, plautinio vožtuvo nepakankamumas (WKY); aortos vožtuvo regurgitacija, padidėjęs sferiškumo indeksas (SHR); storas miokardas, didelė kairiojo skilvelio dilatacija (SHR).

3.2. Širdies nervinio rezginio charakteristika

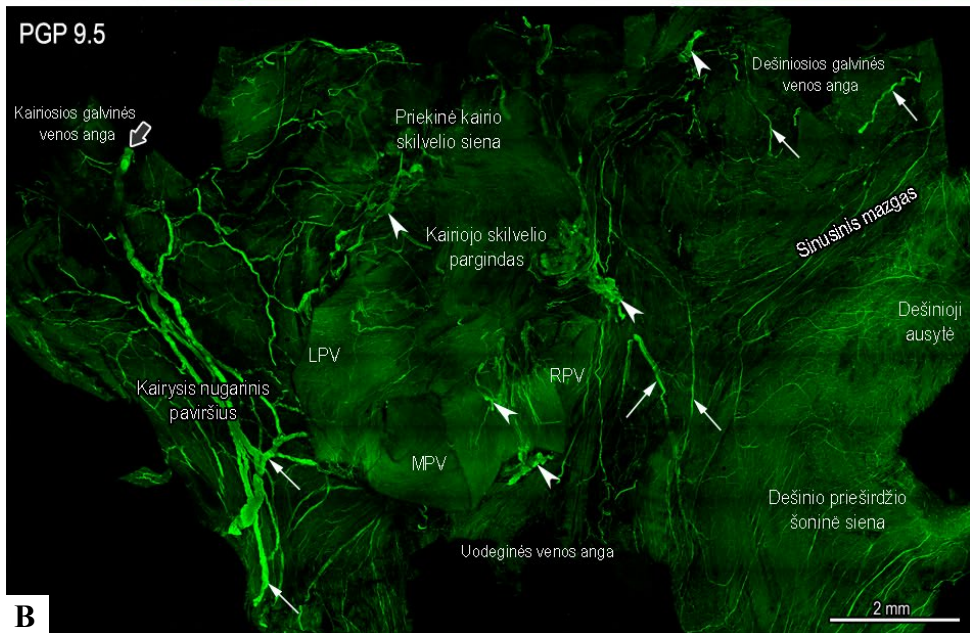
3.2.1. Mazgų ir neuronų morfologija

Visose tirtose širdyse ir amžiaus grupėse, širdies mazgai yra širdies vartuose, didžiausi nerviniai mazgai sudarė gerai apibrėžtus nervinių mazgų laukus, išsidėsčiusius priekinėje viršutinėje kairiojo prieširdžio pusėje. Šie mazgai buvo sujungti tarpusavyje stambiais nervais ir smulkiomis nervinėmis skaidulomis, kurie kartu sudaro žiedo formos nervinį rezginį, juosiantį plautinių venų žiotis (3.2.1.1 pav.). Mazgai, nutolę nuo pagrindinio širdies vartų nervinio rezginio, buvo mažesni. Jaunų ir suaugusių žiurkių pavieniai neuronų kūnai, sudarantys mažas grupeles (vidutiniškai – 22, min/max 2–305), buvo taip pat randami ir dažnai stebimi stambiuose epikardiniuose nervuose. Vidutiniškai, senos SHR turėjo 23 (min/max 16–29), senos WKY žiur-

kės – 27 (min/max 19–34) mazgus prieširdžiuose. Abiejų grupių mazgų forma priklausė nuo jų dydžio ir kito nuo ovalo (mažesnių mazgų) iki į voratinklį panašių grandinių, susijusių su dideliais mazgais (3.2.1.2 pav.). Priešingai, skilveliuose mazgų nebuvo.



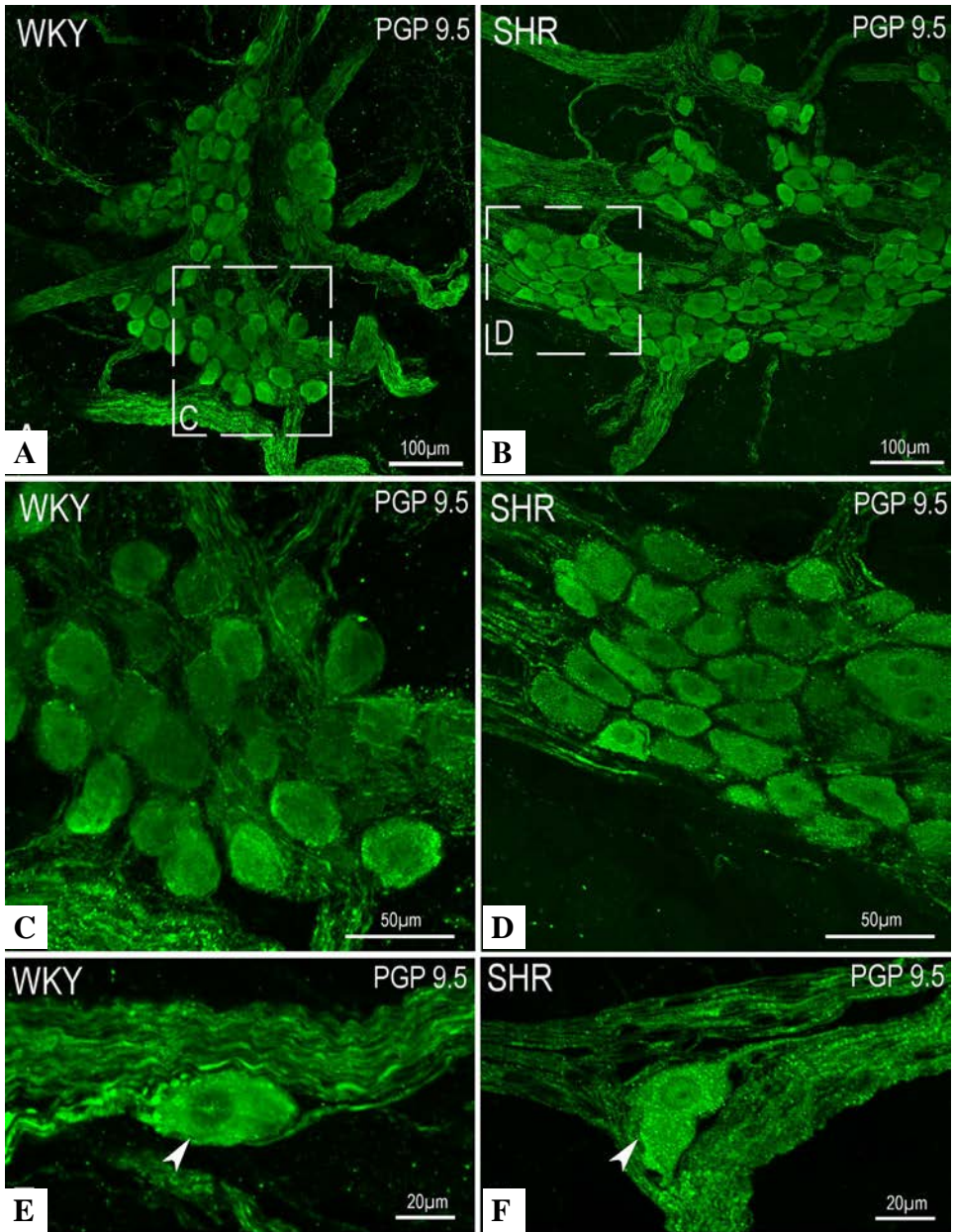
A



B

3.2.1.1 pav. Konfokalinės mikroskopijos fotografija, susumuota iš 108 panoraminio fotografavimo vaizdų per visą epikardo gyli, vaizduojanti jaunos (8 sav.) (A) ir suaugusios (14 sav.) (B) SHR žiurkės prieširdžio nervinį rezginį.

Nervinės struktūros išryškintos PGP 9,5 antikūnu. Matomas sumažėjęs nervinio rezginio tankumas vyresniame amžiuje (B). Pilka rodyklė rodo įeinančius nervus; baltos rodyklės – vidusieninio rezginio nervus; rodyklių smaigaliai – nervinius mazgus. Sutrumpinimai: LPV – kairioji plautinė vena; MPV – vidurinė plautinė vena; RPV – dešinioji plautinė vena.



3.2.1.2 pav. Tipinio mazgo sandara senų žiurkių WKY (A, C, E) ir SHR (B, D, F) grupėse. E ir F pavaizduoti pavieniai neuronai, įsiterpę tarp nervo aksonų. SHR grupėje neuronai yra mažesni (D) ir yra mazge išsidėstę glaudžiau, lyginant su WKY (C)

Jaunų SHR, nervinių mazgų skaičius ir plotas buvo ženkliai didesni lyginant su tokio pat amžiaus WKY kontrolinėmis žiurkėmis (3.2.1.1 lentelė), dėl ko nustatytas ženkliai didesnis neuronų kūnų kiekis mazge. Suaugusių bei senų žiurkių mazguose tokio skirtumo nebebuvo. Suaugusių SHR ir WKY žiurkių mazgų skaičius, mazgų plotas, neurono plotas, neuronų skaičius mazge buvo sumažėję lyginant su jaunomis tos pačios veislės žiurkėmis (3.2.1.1 lentelė). Šitie amžiniai skirtumai buvo mažiau išreikšti WKY grupėje. Suaugusių WKY žiurkių širdyse, mazgo plotas buvo mažesnis nei jauniklių WKY, tuo tarpu suaugusių SHR plotas buvo sumažėjęs 38 proc. lyginant su jaunomis.

3.2.1.1 lentelė. *Nervinių mazgų morfometriniai skirtumai tarp skirtingo amžiaus SHR ir WKY žiurkių širdžių. Labai senų žiurkių grupėje mazgų sk. pateiktas mažiausias ir didžiausias skaičius)*

Parametras	Žymuo	Jaunos		Suaugusios		Senos		Labai senos	
		WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Mazgų skaičius, vnt.	PGP 9,5	29,5	34,8	23,3	22,5	27	23	30–60	17–77
Mazgų plotas, μm^2		52349	70973,1	45097	43895,8	182749	266868	60400	56286
Neurono plotas, μm^2		643	581*	532	502*	734	596*	706	623*
Neuronų skaičius mazge, vnt.		52	94*	33	29	115	171	69	61
Nervinės skaidulos mazge, proc.	TH	2,06	1,46*	1,04	1,59*	1,43	1,58		
SIF suminis plotas, mm^2		72181	79206	21594	45852	90326	94632	40380	57470
SIF plotas / $0,1 \text{ mm}^2$		3080	4016	1439	3150	3257	4296	1486	1718
Nervinės skaidulos mazge	CGRP	3,15	3,47	1,99	2,12	2,21	3,66*	-	-

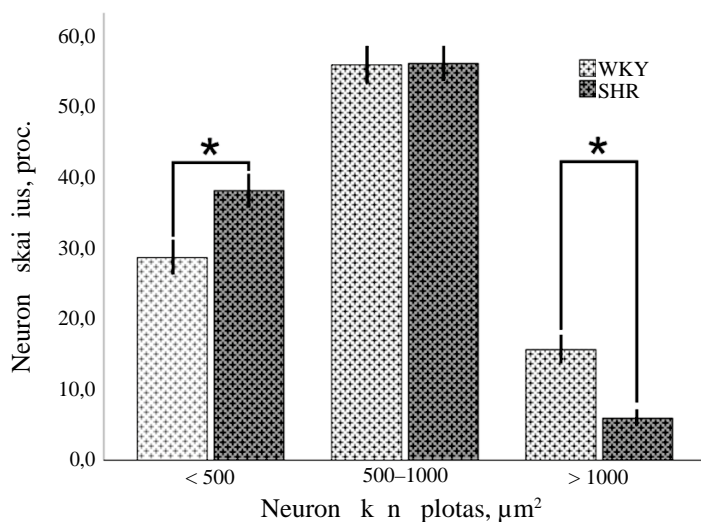
* – statistiškai reikšmingas skirtumas tarp to paties amžiaus WKY ir SHR grupių, $p < 0,05$. Duomenys pateikiami kaip vidurkis. PGP 9,5 – proteino geno produktas 9,5, TH – tirozino hidroksilazė; CGRP – kalcitonino geno peptidas; SIF – mažos, intensyviai fluorescuojančios ląstelės.

Panašiai, neuronų skaičius mazge buvo kiek sumažėjęs WKY suaugusiose, bet reikšmingai sumažėjęs (68 proc.) SHR suaugusiose lyginant su jaunomis (3.2.1.1 lentelė). Neuronų skaičius buvo 44 proc. didesnis jaunų SHR lygi-

nant su jaunomis WKY; tačiau nebuvo skirtumų suaugusiųjų grupėse (3.2.1.1 lentelė). Senų gyvūnų neuronų skaičius nesiskyrė. Stebėta tiek neuronų skaičiaus, tiek mazgų ploto didėjimo tendencija su amžiumi. Šie parametrai piką pasiekia senų žiurkių grupėje, o labai senų žiurkių grupėje – mažėja.

Tipiškas senų WKY ir SHR prieširdžių mazgas buvo gana sudėtingos sandaros, ir neuronai buvo jame pasiskirstę netolygiai, retai išsisklaidę vienoje vietoje ir tankiai susitelkę kitoje (3.2.1.2 pav., A ir B). Dėl širdies mazgų netaisyklingos sandaros ir kontūrų, abu (mazgo plotas ir neuronų skaičius mazge) kito labai ženkliai. Lyginant su normotenzinėmis WKY kontrolinėmis žiurkėmis, SHR buvo akivaizdi mazgo ploto augimo tendencija 46 proc. ir didesnis neuronų kūnų skaičiaus vidurkis, ~48.7 proc. mazge ir ~13.8 proc. visame prieširdžių paviršiuje (3.2.1.1 lentelė). Nervuose taip pat buvo rasti pavieniai neuronai (3.2.1.2 pav., E ir F).

Įdomu, kad visose amžiaus grupėse SHR mazginių neuronų kūno ploto vidurkis buvo mažesnis lyginant su WKY žiurkėmis. Neuronų dydžio vidurkis buvo 10 proc. didesnis jaunosiose WKY lyginant su jaunomis SHR. Suaugusiųjų, neuronų dydžio vidurkis buvo ženkliai mažesnis SHR grupėje (6 proc.). Neuronų dydžio vidurkio sumažėjimas buvo labiau išreikštas WKY lyginant su SHR (3.2.1.1 lentelė). Pažymėtina, kad senų SHR neuronų kūnai buvo mažesni 19 proc. ir susitelkę mazge labiau kompaktiškai nei WKY žiurkių (3.2.1.2 pav., 3.2.1.1 lentelė). Svarbu pabrėžti, kad maži neuronai vyravo SHR ganglijuose, tuo tarpu dideli neuronai buvo labiau būdingi WKY žiurkėms (3.2.1.3 pav.). Be to, tik keletas neuronų SHR viršijo 1500 μm^2 skerspjūvio plotą (max = 1573,9 μm^2), kai skerspjūvio plotas WKY žiurkių siekė net 3218 μm^2 . Mažas pavienių neuronų ar mažų neuronų telkinių skaičius buvo rastas epikardiniuose nervuose ar nutolęs nuo prieširdžių mazgų laukų.

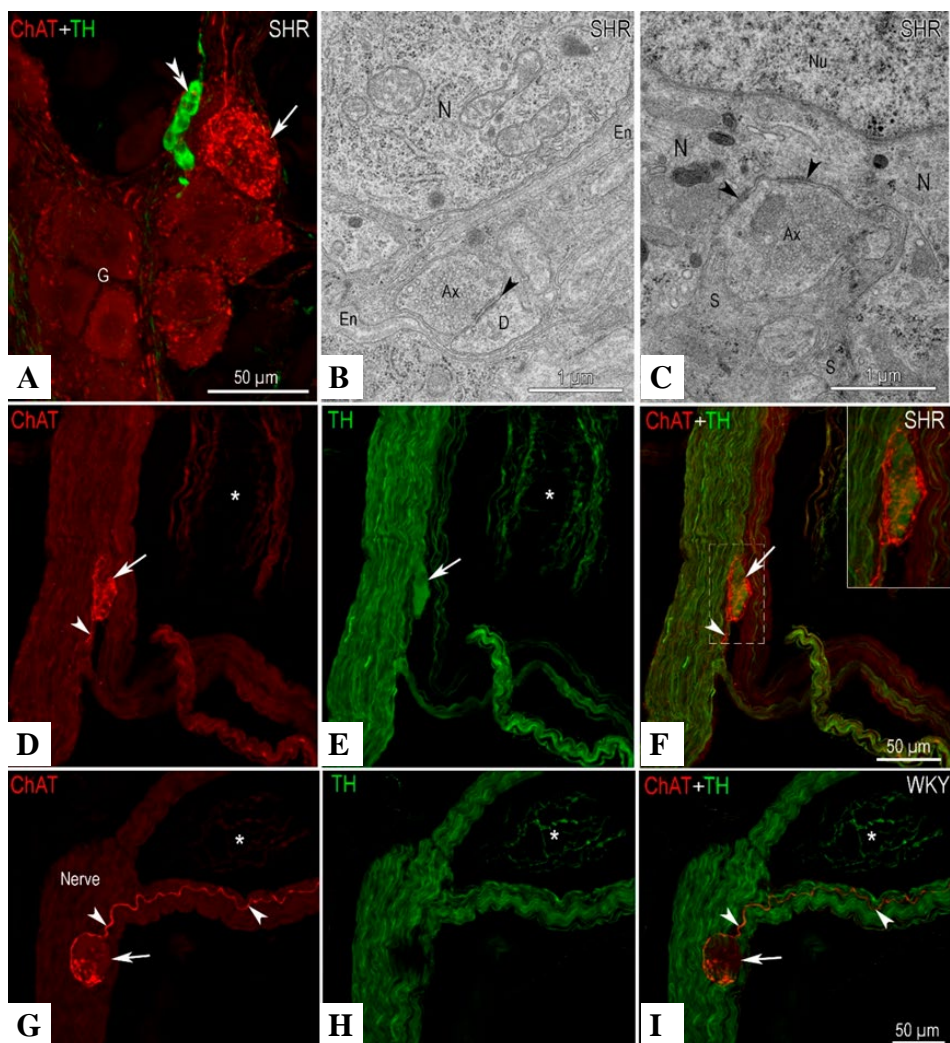


3.2.1.3 pav. Skirtingas neuronų dydžių pasiskirstymas senų WKY ir SHR grupėse

Stulpeliai vaizduoja vidurkį ir standartinę paklaidą.

* – rodo statistiškai patikimą skirtumą ($p < 0,05$) tarp grupių.

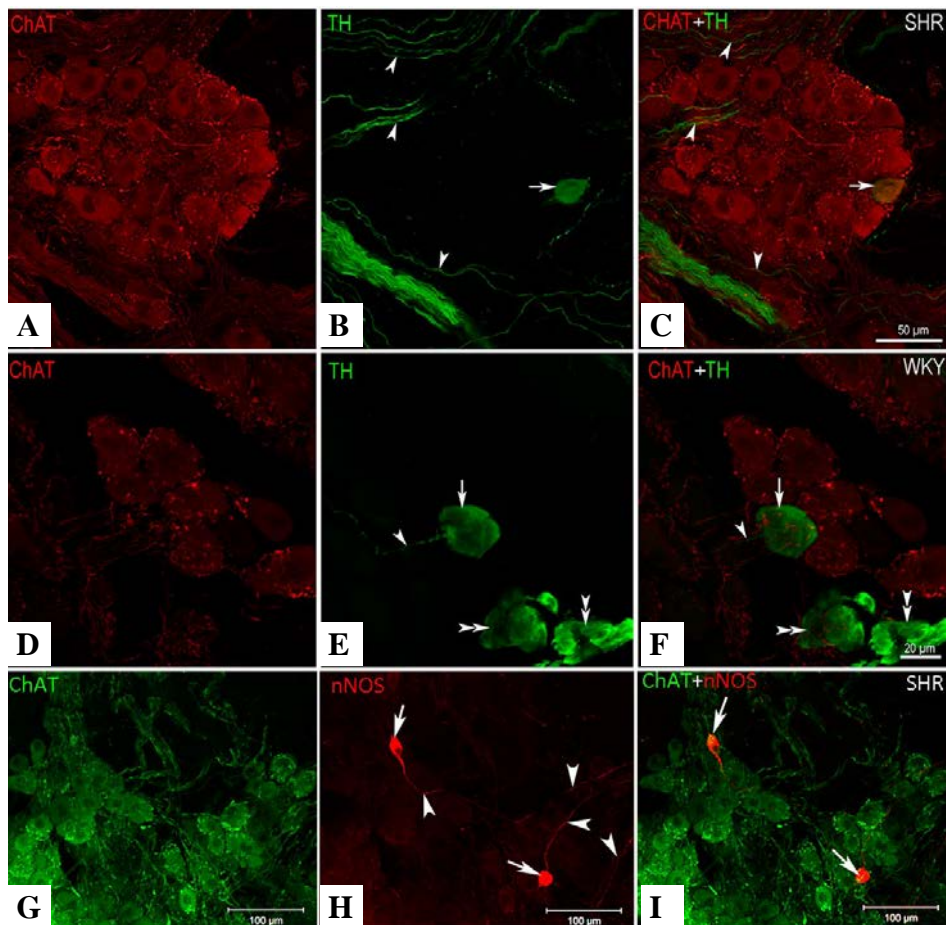
Galima teigti, kad tiek WKY, tiek SHR nervinius mazgus sudaro išskirtinai cholinerginiai (ChAT pozityvūs) neuronai. Mazguose gausios cholinerginės terminalės apsupa neuronų kūnus ir tolygiai pasiskirsto neuropilyje (3.2.1.4 pav. A). Elektronomikroskopiškai matyti daug akso-dendritinių sinapsių su priešsinapsinėse terminalėse esančiomis gausiomis skaidriomis vezikulomis, kurios, numanoma, irgi cholinerginės (3.2.1.4 pav. B). Mazguose rasta žymiai mažiau akso-somatinių sinapsių (3.2.1.4 pav. C). Taip pat, cholinerginės terminalės pastebėtos apraizgančios tiek adrenerginis, tiek cholinerginius pavienius neuronus, esančius intrakardinių/širdinių nervų sudėtyje (3.2.1.4 pav. D–I).



3.2.1.4 pav. *Paveikslas vaizduoja dominuojančius ChAT neuronus intrakardiniuose mazguose*

A – Mazgas (G) kuriame matosi SIF ląstelių telkinys (dvigubi rodyklių smaigaliai) bei vienas ypač sinapsių gausus neuronas (rodyklė). B – elektronogramoje matyti akso-dendritinė sinapsė (rodyklės smaigalys). C – elektronogramoje matyti akso-somatinė sinapsė (rodyklės smaigaliai). D–E – pavaizduotas TH pozityvus neuronas (rodyklė) nerve, apsuptas gausiomis ChAT terminalėmis. G–I – pavaizduotas cholinerginis neuronas (rodyklė) nerve, apsuptas gausiomis ChAT terminalėmis. Paveikluose D–I rodyklės smaigaliais pažymėta aiškiai matoma pavienis ChAT pozityvus aksonas, o žvaigždutė žymi nervinėmis skaidulomis apsuptą kraujagyslę. Sutrumpinimai: N – neurono kūnas; Nu – neurono branduolys; En – endoneuriumas; Ax – aksonas; D – dendritas; S – palydovinės ląstelės.

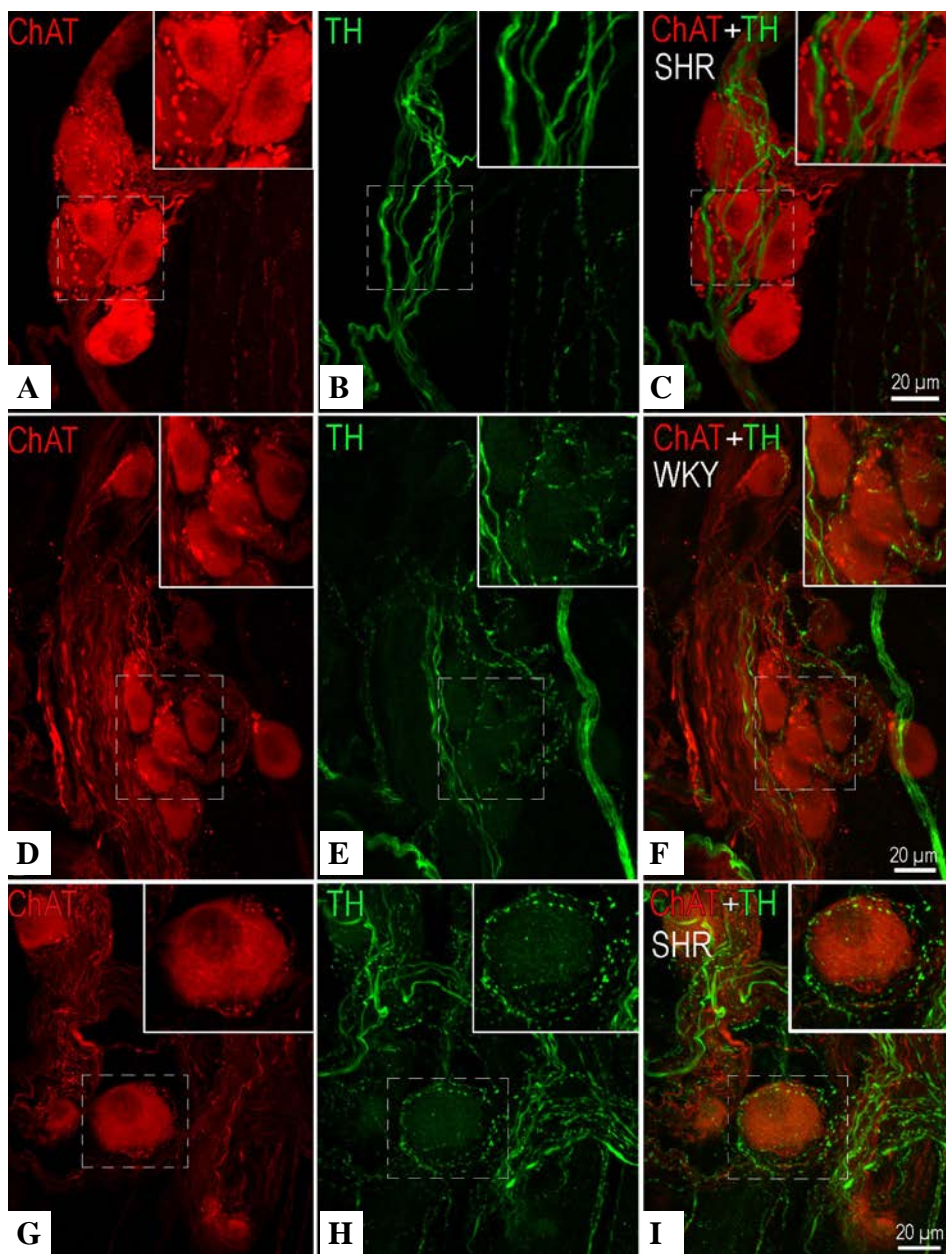
Pavienėse, tiek hipertenzinių, tiek kontrolinių žiurkių širdyse buvo rasti tik 1–3 tirozino hidroksilazei (TH) pozityvūs neuronų kūnai (3.2.1.4 pav. E–F), o tik nNOS+ neuronai iš viso nebuvo rasti. Bifenotipinių neuronų (ChAT+/TH+) ir (ChAT+/nNOS+) buvo rasta dvigubai daugiau visose tirtose grupėse (3.2.1.5 pav. A–C, G–I), bet dėl labai mažo neuronų skaičiaus statistinė analizė neatlikta.



3.2.1.5 pav. Intrakardiniai nerviniai mazgai SHR (A–C) ir WKY (D–F) žiurkių širdyse, kuriuose dominuoja ChAT pozityvios skaidulos, bet pasitaiko ir bifenotipinių neuronų (A–F pažymėta rodyklėmis), arba išskirtinai adrenerginių (E–F pažymėta rodyklėmis)

Rodyklių smaigaliai žymi TH pozityvias nervines skaidulas, o dvigubi rodyklių smaigaliai (E–F) SIF ląsteles. G–F – intrakardinis mazgas, kuriame rasti du nNOS pozityvūs neuronai (H ir I pažymėta rodyklėmis) ir keletas niterginių skaidulų (H, rodyklių smaigaliai)

Priešingai nei cholinerginės nervinės skaidulos, dauguma adrenerginių nervinių skaidulų širdiniuose vidusieniuose mazguose neturėjo varikozių ir kirto juos „tranzitu“ (3.2.1.6 pav. A–C). Nepaisant to, pavienės adrenerginės nervinės skaidulos turėjo skirtingo dydžio varikozes ir supo cholinerginius mazginius neuronus (3.2.1.6 pav., D–F, G–I). Remiantis ankstesniais tyrimais, galimas adrenerginių sinapsių kontaktų buvimas intrakardiniuose mazguose. Adrenerginių struktūrų kiekis buvo padidėjęs suaugusių ir senų SHR žiurkių mazguose (3.2.1.1 lentelė).

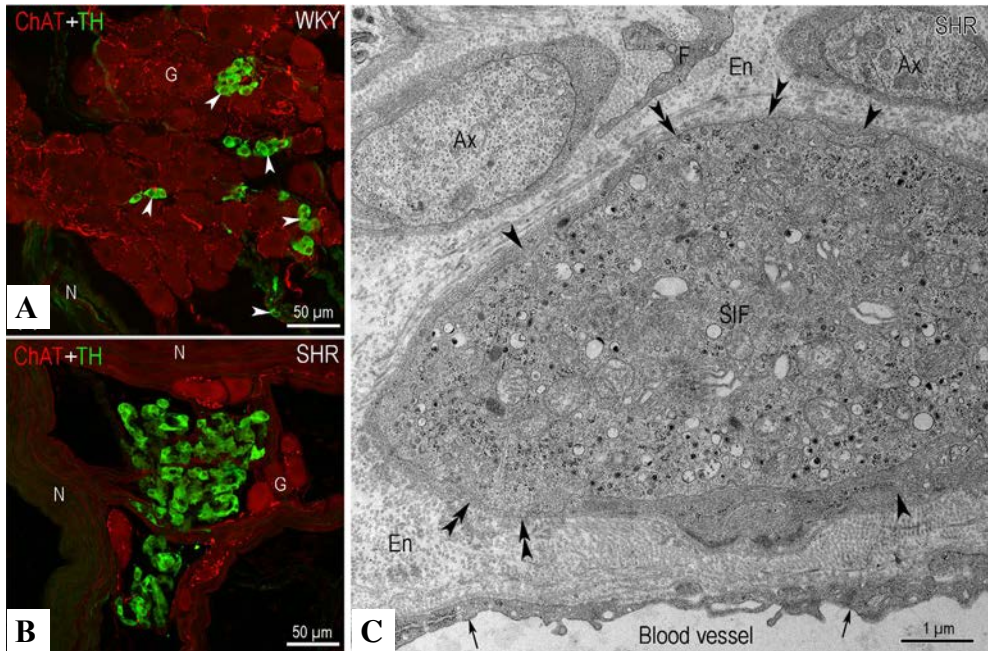


3.2.1.6 pav. *Paveikslas iliustruoja TH skaidulas mazguose*

Daugelyje mazgų TH skaidulos pračina mazguose nesudarydamos varikozių (A–C), bet pasi-
taiko, mazgų, kuriuose TH skaidulos apsupta vieną ar keletą neuronų mazge tiek WKY (D–F),
tiek SHR (G–I) grupėse.

Gausūs mažų intensyviai fluorescensuojančių ląstelių (SIF) telkiniai, kurie
buvo pozityvūs TH, buvo randami tiek mazguose, tiek nervuose (3.2.1.4 pav.

A, 3.2.1.5 pav.). Dauguma SIF telkinių buvo sudaryti iš 5–12 ląstelių. Mes nustatėme santykinai didesnę sudėtinę SIF telkinių plotą jaunų gyvūnų širdyse, bei šių ląstelių plotų mažėjimą gyvūnams bręstant bei vėlgi didėjimą gyvūnams senstant. Palyginus WKY ir SHR, daugiau SIF buvo hipertenzinėse žiurkėse. SHR žiurkėse kai kurie SIF telkiniai buvo netgi didesni už gretimus nervinius mazgus (3.2.1.7 pav. B). Elektronomikroskopiškai patvirtinta, kad SIF telkiasi prie kapiliarų (3.2.1.7 pav. C), esančių nerviniuose mazguose bei kad SIF telkinių viduje nepastebėta nervinių skaidulų, potencialių sinapsių.

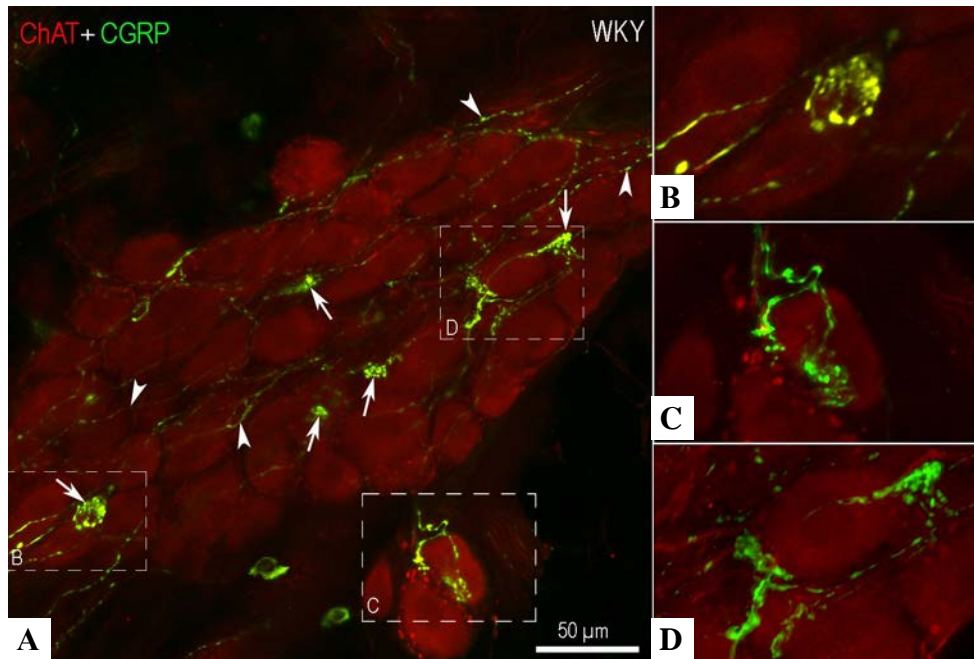


3.2.1.7 pav. SIF ląstelės WKY (A) bei SHR (B, C) nerviniuose mazguose

A – pavieniai SIF ląstelių telkiniai (rodyklių smaigaliai) matomi intrakardiniame mazge (G), šalia nedidelio Nervo (N). B – didelis SIF ląstelių telkinys įsiterpęs tarp nervų (N), šalia esantis mazgas (G) yra mažesnis už SIF telkinį. C – elektronograma, vaizduojanti SIF ląstelę (SIF), šalia kraujagyslės endotelio (rodyklės). Vietomis ląstelė apsupta palydovinėmis ląstelėmis (rodyklių smaigaliai), o kai kur atsidenus (dvigubi rodyklių smaigaliai). Sutrumpiniai: Ax – aksonas; En – endoneuriumas; F – fibroblastas.

CGRP pozityvių nervinių skaidulų buvo rasta visuose tirtuose širdiniuose mazguose (3.2.1.8 pav.). Svarbu, kad neaptikta CGRP pozityvių neuronų kūnų visuose tirtuose gyvūnuose. CGRP pozityvios nervinės skaidulos yra itin plonos, su gausiomis varikozėmis (3.2.1.8 pav.). Šio tipo skaidulos pasklinda po nervinį mazgą tolygiai, tinklo principu. Pažymėtina, kad buvo stebėtos didelės, specifinės CGRP varikozės, apsupančios neuronų kūnus

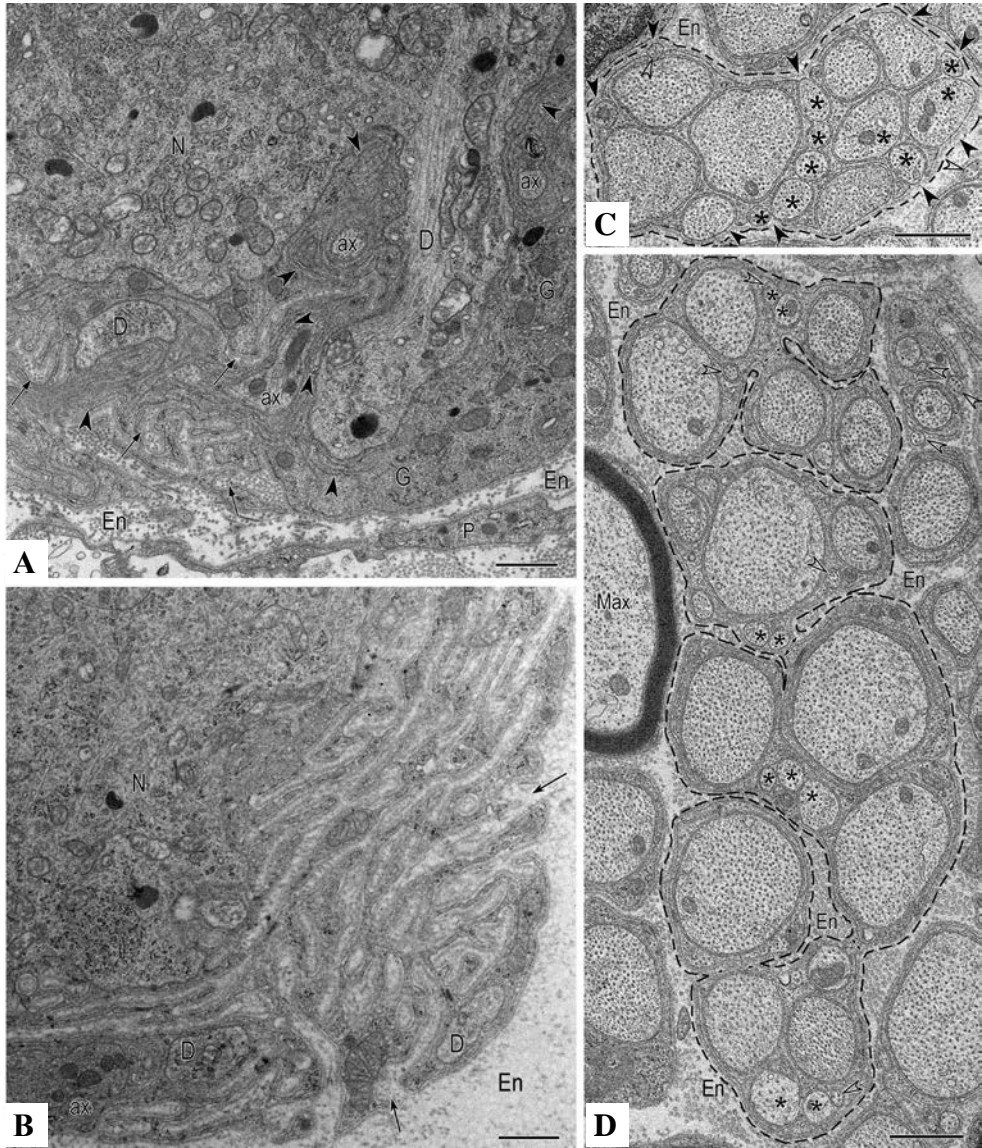
ir, tikėtina/galimai, sudarančios su jais sinapses. CGRP pozityvių nervinių struktūrų buvo daugiau rasta hipertenzinėse žiurkėse visose amžiaus grupėse.



3.2.1.8 pav. CGRP nervinės skaidulos intrakardiniam mazge

Dalis CGRP pozityvių skaidulų praeina mazgu (rodyklių smaigaliai), nesudarydamos artimiesnio kontakto su neuronais, o dalis jų apsupa neuronus (rodyklės) taip formuodamos galimas sinapses. Apibrėžti langeliai paveiksle A yra išdidinti paveiksluose B–D, siekiant parodyti skaidulų formuojamas struktūras apie neuronus.

Suaugusių ir senų, tiek SHR, tiek ir WKY žiurkių vidusieniniai mazgai buvo tirti transmisiniu elektroniniu mikroskopu. Visi suaugusių žiurkių neuronų kūnai turėjo jiems būdingą citoplazmos struktūriškumą. Skirtingai nei WKY, kai kurių SHR neuronų nukleolema buvo deformuota. Daugumą neuronų satelitinės ląstelės gaubė vienu sluoksniu, o vietomis ir keliais sluoksniais. Dažnai satelitinių ląstelių dangalas, apsupantis intrakardinius neuronus buvo lyg porėtas su giliomis kolageną turinčiomis endoneuriumo invaginacijomis (3.2.1.9 pav., A). Tokios glijos struktūros buvo labiau išreikštos SHR neuronuose, kur tokie porėti glijos dangalai dengė dideles neuronų kūnų dalis (3.2.1.9 pav., B). Pavienėse satelitinėse ląstelėse buvo gerai išreikštos centriolės. SHR intrakardiniuose mazguose aksonų terminalės ir/ar sinapsės buvo negausios, kiek dažniau jos buvo aptinkamos WKY mazguose. Senų SHR ir WKY žiurkių elektroninės mikroskopijos tyrimas neatskleidė žymesnių ultrastruktūrinių neuronų kūnų skirtumų.



3.2.1.9 pav. Elektronogramos vaizduoja WKY (A, C) ir SHR (B, D) intrakardinių nervinių mazgų ir nemielinines nervines skaidulas

A – pavaizduotas neurono kūno (N) fragmentas su dendritinėmis ataugomis (D) ir jį dengiančios satelitinės neuroglijos (G) ląstelės, išsidėsčiusiais keliais sluoksniais (rodyklių smaigaliai), o kai kur tarp jų įsiterpia endoneuriumo kolageno skaidulos (rodyklės). B – iliustruoja SHR neurono fragmentą, kurį dengiančios satelitinės ląstelės atrodo korėtros, su giliomis invaginacijomis (rodyklės), užpildytomis endoneuriumo kolageno skaidulomis. Šalia neurono matosi keletas dendritų (D) ir aksonas (ax) su pūslelėmis. C – nemielininė WKY nervo skaidula, kuriame aksonai išsidėstę kompaktiškai, ir jame nėra Švano ląstelės invaginacijų. Kai kurie aksonai pilnai apgaubti glijos, kiti – atsidengę (juodi rodyklių smaigaliai), kai kurie

aksonai susiglaudę ir apgaubti bendra Švano ląstelės membrana (*). D – nemielininė SHR nervo skaidula. Brūkšniuota linija žymi kiekvienos skaidulos bazinę membraną. Šių skaidulų Švano ląstelės fragmentuotos, su giliomis invaginacijomis, pripildytomis endoneuriumo. Kai kur Švano ląstelės susisiečia tik siaurais glijos tilteliais (dvipusė rodyklė). Baltomis rodyklėmis pažymėti labai mažo skersmens aksonai (mažiau nei 0,2 μm). Sutrumpinimai: D – dendritas; ax – aksonas; Max – mielininis aksonas; En – endoneuriumas; P – perineuriumas. Skalė: 1 μm .

3.2.2. Prieširdžių ir skilvelių nervų morfologiniai pokyčiai

5–6 dideli nervai (50–150 μm storio) pasiekia tirtų žiurkių širdį ties kairiąja galvine vena ir plinta prieširdžių epikardu kaip kairysis nugarinis subrezginys. Šie kairiojo nugarinio subrezginio nervai vidutiniškai šakojasi 1 – 3 kartus sklisdami kairiojo prieširdžio nugariniu paviršiumi. Nuo prieširdžių, žiurkių epikardiniai nervai pasiekia skilvelių sienas dviem keliais. Pirmasis kelias eina per arterinę širdies vartų dalį, tarp kylančiosios aortos ir plautinio kamieno (3.2.1.1 pav., 3.2.2.1 pav.), antrasis kelias, kuriuo epikardiniai nervai pasiekia dorsalinį skilvelių paviršių, driekiasi nuo širdies vartų veninės dalies, lygiagrečiai kairiajai galvinei venai ir plinta link širdies viršūnės (3.2.1.1 pav., 3.2.2.1 pav.).

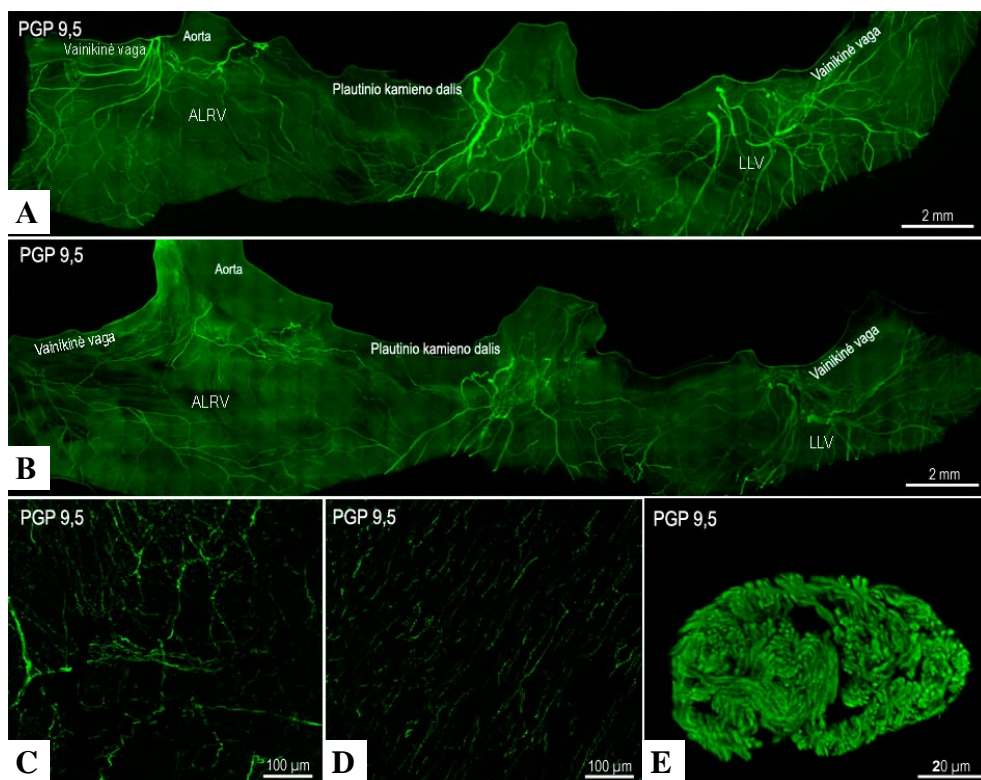
Epikardinių nervų skaičius ir morfologija labai kintanti (3.2.2.1 pav., A, B; 3.2.2.1 lentelė). Nebuvo skirtumų tarp prieširdžių nervų storių, lyginant jaunas SHR ir WKY žiurkes (3.2.2.1 lentelė). Priešingai, skilvelių nervų storis buvo ženkliai didesnis SHR jaunų žiurkių lyginant su tokio pat amžiaus WKY žiurkėmis. Suaugusių gyvūnų prieširdžių nervai lyginant su jaunomis, storėjo WKY, tuo tarpu SHR plonėjo. Tuo pačiu metu, bręstant skilvelių nervai liko nepakitę abejuose grupėse (3.2.2.1 lentelė). Senų SHR grupės gyvūnų kairiojo dorzalinio subrezginio nervai buvo plonesni 12 proc. lyginant su WKY žiurkėmis, o labai senų žiurkių preparatuose buvo matyti išskirtinai stori epikardiniai nervai, vos ne dvigubai storesni nei jaunesnių gyvūnų (3.2.2.1 lentelė). Skilveliuose taip pat stebėta amžinė nervų skersmens stambėjimo tendencija, be reikšmingo skirtumo tarp hipertenzinės ir kontrolinės grupių.

3.2.2.1 lentelė. Epikardinių nervų palyginimas tarp SHR ir WKY žiurkių skirtingose amžiaus grupėse

Nervas	Žymuo	Jaunos		Suaugusios		Senos		Labai senos	
		WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Nervų plotis, μm									
Prieširdžių	PGP 9,5	28,6	29	32,2	25,8*	31	27,4*	64,29	70
Skilvelių		22,2	26,9*	27,1	27,4	36	34	46	53
Nervinių skaidulų plotas nerve, proc.									
Prieširdžių	ChAT	23,8	22,2*	27	30,5*	26,92	21,2*	20,43	24,32*
Skilvelių		30,1	28,5	26,8	25,6	26,8	25,7	16,81	18,56
Prieširdžių	TH	19,9	25,18*	18,35	18,74	15,8	15,07	26,69	31,98*
Skilvelių		27,9	25,2*	23,17	22,13	24,73	22,1*	30,74	35,65*
Prieširdžių	CGRP	1,1	3,08*	3,54	2,94*	2,5	7,91*	2,97	7,02*
Skilvelių		1,63	3,48*	2,29	2,53	5,01	3,02*	3,06	5,41*
Skilvelių nervų skerspjuvyje ¹	PGP 9,5	72,5	73,3	81,6	71,7*	71,6	68,9*	54,95	54,59

* $p < 0,05$ vs. to paties amžiaus WKY žiurkės

Duomenys pateikiami kaip vidurkis. PGP 9,5 – proteino geno produktas 9,5; TH – tirozino hidroksilazė; CGRP – kalcitonino geno peptidas; SIF – mažos, intensyviai fluorescuojančios ląstelės. ¹ Šie matavimai atlikti skilvelių šaldomuosiuose pjūviuose, tuo tarpu kiti matavimai – išsklotinėse.

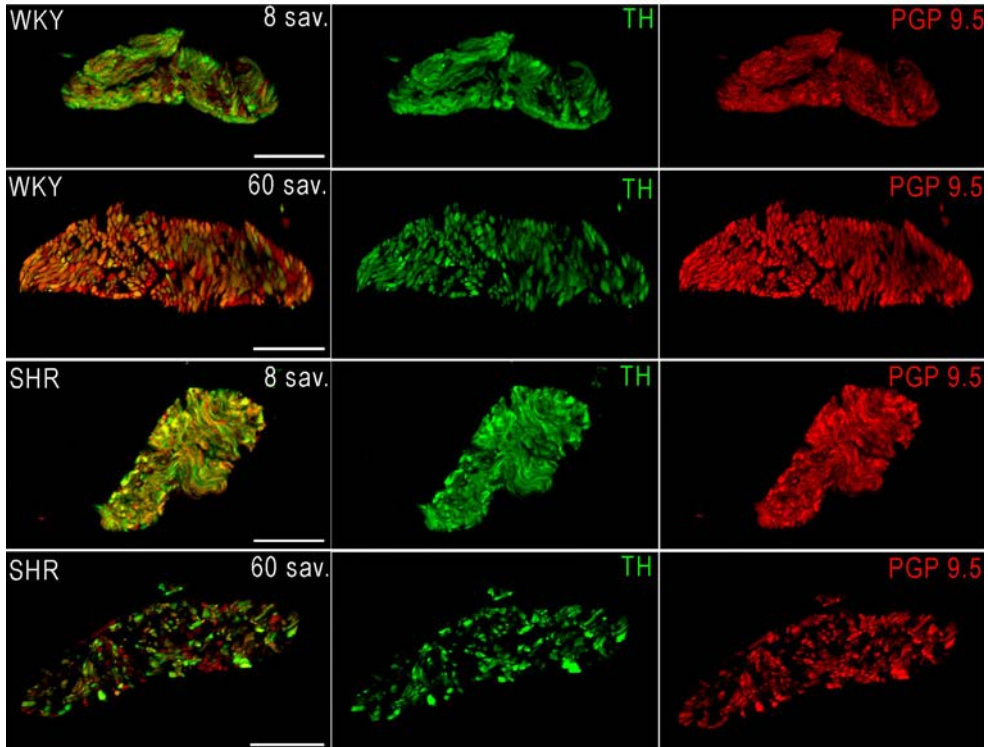


3.2.2.1 pav. *Viso skilvelio (nepjaustyti) preparatai, vaizduojantys WKY (A) ir SHR (B) skilvelinius nervus, nukirptus prie vainikinės vagos ir besidriekiančius link viršūnės*

Skilvelių pagrindo žiedas buvo įkirptas po dešiniąja ausyte, ištiestas ir išplonintas. Fluorescentiniu mikroskopu fotografuotas preparatas buvo automatiškai sujungtas iš daugybės fotografijų naudojant AxioVision 4.8.2 MozaikX modulį. Langelyje C pavaizduota 14 savaičių SHR prieširdžių miokardo skaidulos, o langelyje D – skilvelių miokardo skaidulos. Skilvelių pjūvio preparatas, kuriame matyti gausios PGP 9,5 pozityvios skaidulos buvo fotografuotos konfokalinio mikroskopu. Langelyje E pavaizduotas epikardinis skilvelių nervas, gausus įvairiomis kryptimis besidriekiančių PGP 9,5 pozityvių aksonų.

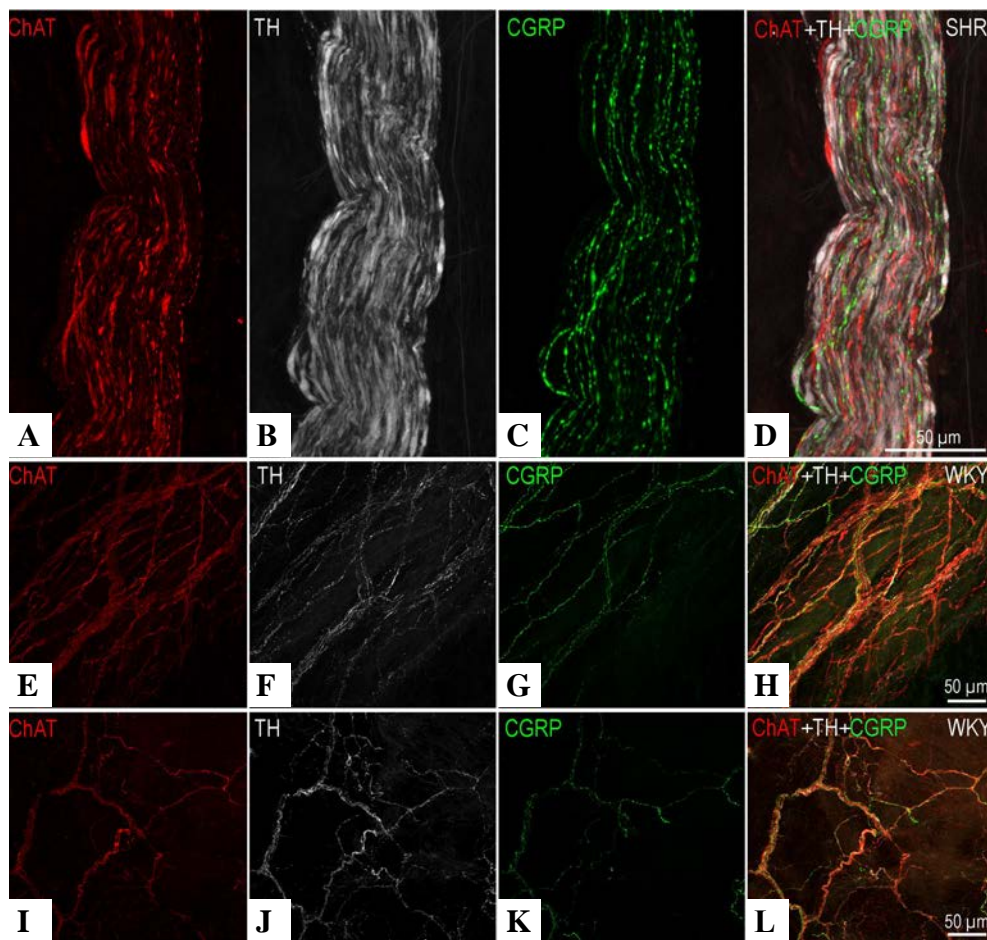
Remiantis imunohistocheminės analizės rezultatais, skersiniame epikardinio nervo pjūvyje aksonų pažymėtų PGP 9,5 plotas nesiskyrė tarp jaunų SHR ir WKY žiurkių. Tačiau, šis santykis pakito suaugusiųjų grupėse: normotenzinių WKY žiurkių, jis reikšmingai išaugo (+13 proc.), o SHR - liko nepakitęs (3.2.2.1 lentelė). Senų žiurkių nervuose PGP 9,5+ plotas buvo mažesnis SHR grupėje, o labai senų žiurkių grupėje dar sumažėjo tiek hipertenzinėje, tiek normotenzinėje grupėje. Apibendrintai, stebėtas ryškus amžinis PGP 9,5+ nervinių skaidulų mažėjimas – jaunų gyvūnų nervuose šis plotas nervo skerspjūvyje užėmė >70 procentų, o senų – tik kiek daugiau nei 50 proc. To-

čia tendencija būdinga ir sveikiems, ir hipertenziniams gyvūnams (3.2.2.1 lentelė, 3.2.2.1 pav.).



3.2.2.2 pav. *Adrenerginių (TH) ir PGP 9,5 pozityvių skaidulos epikardiniuose nervuose amžiaus eigoje*
8 sav. – jauna žiurkė, 60 sav. – labai sena žiurkė.

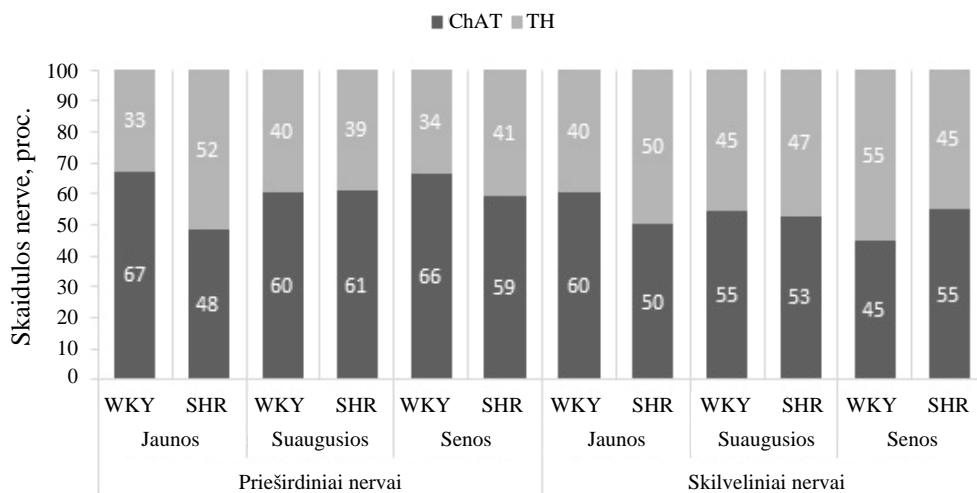
Cholinerginės ir adrenerginės nervinės skaidulos sudarė didžiąją dalį skaidulų visų gyvūnų grupių tiek prieširdžių, tiek skilvelių epikardiniuose nervuose (3.2.2.2 pav., 3.2.2.3 pav., 3.2.2.1 lentelė). Amžiaus bėgyje buvo stebėti tiek ChAT+, tiek ir TH+ skaidulų plotų svyravimai, neženkliai dominuojant cholinerginėms skaiduloms, tačiau aiškiau nepasireiškiant nei vienam pagrindinių autonominės nervų sistemos neuromediatorių (3.2.2.3 pav., 3.2.2.4 pav.).



3.2.2.3 pav. Paveikslas iliustruoja adrenerginių (TH), cholinerginių (ChAT) bei peptiderginių (CGRP) skaidulų pasiskirstymą nerve (A–D) bei miokarde (E–L)

A–D nerve dominuoja TH pozityvios skaidulos (B, D), tuo tarpu sinusiniame prieširdžio mazge matosi daug cholinerginio komponento (E). Tiek laidžiojoje sistemoje (G), tiek darbiniam miokarde (K), CGRP nervinių skaidulų yra mažiausiai.

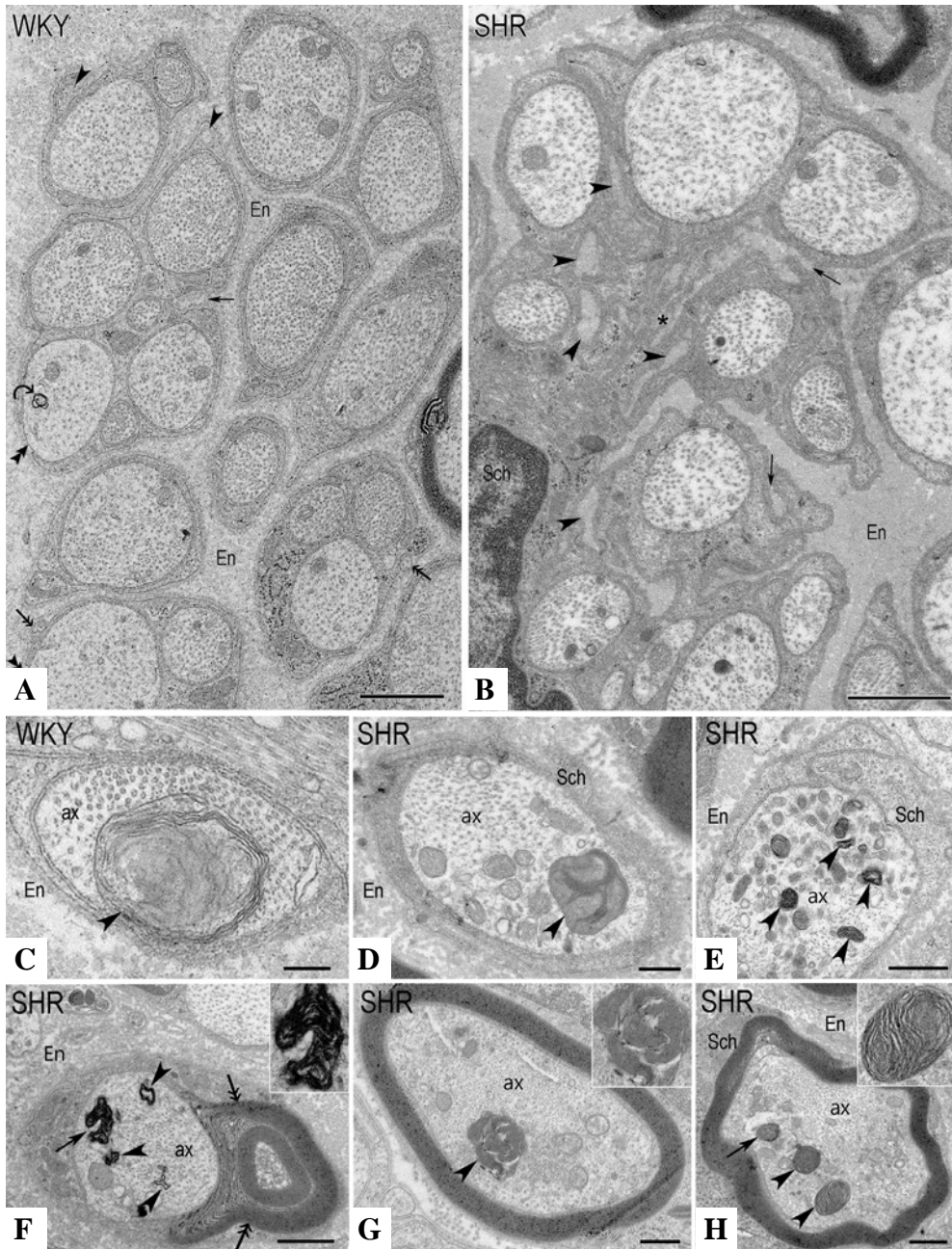
Nervai ties tam tikromis vietomis, kaip kairioji plautinė bei dešinioji galvinė venos buvo sudaryti kone vien tik iš adrenerginių skaidulų. Jaunų gyvūnų nervuose adrenerginės skaidulos buvo gausios, jų mažėjo suaugusių grupės nervuose, nesikeitė senųjų nervuose ir maksimalų kiekį pasiekė senų žiurkių grupėje. Pažymėtina, kad jaunų ir labai senų SHR nervuose adrenerginių skaidulų buvo ženkliai daugiau lyginant su atitinkamo amžiaus kontroline grupe (3.2.2.1 lentelė).



3.2.2.4 pav. Adrenerginųjų ir cholinerginių skaidulų pokytis amžiaus eigoje

Nitrierginės skaidulos tirtuose nervuose buvo itin retos, todėl atsisakyta jų morfometrinių vertinimų. Peptiderginųjų (CGRP+) skaidulų nervuose buvo ženkliai mažiau nei cholinerginių bei adrenerginųjų, tačiau stebėti šių negausių skaidulų kiekio ryškūs skirtumai hipertenzinių ir kontrolinių gyvūnų nervuose beveik visose amžiaus grupėse. Beveik visų amžiaus grupių SHR tiek prieširdžių, tiek skilvelių nervuose CGRP+ skaidulos buvo gausesnės, lyginant su to paties amžiaus kontroline grupe (3.2.2.1 lentelė). Kita vertus CGRP+ skaidulų nors netolygiai, bet didėja amžiaus bėgyje tiek WKY, tiek ir SHR. Tokiu būdu CGRP+ skaidulų maksimalus gausumas buvo stebėtas senų ir labai senų SHR žiurkių nervuose (3.2.2.1 lentelė).

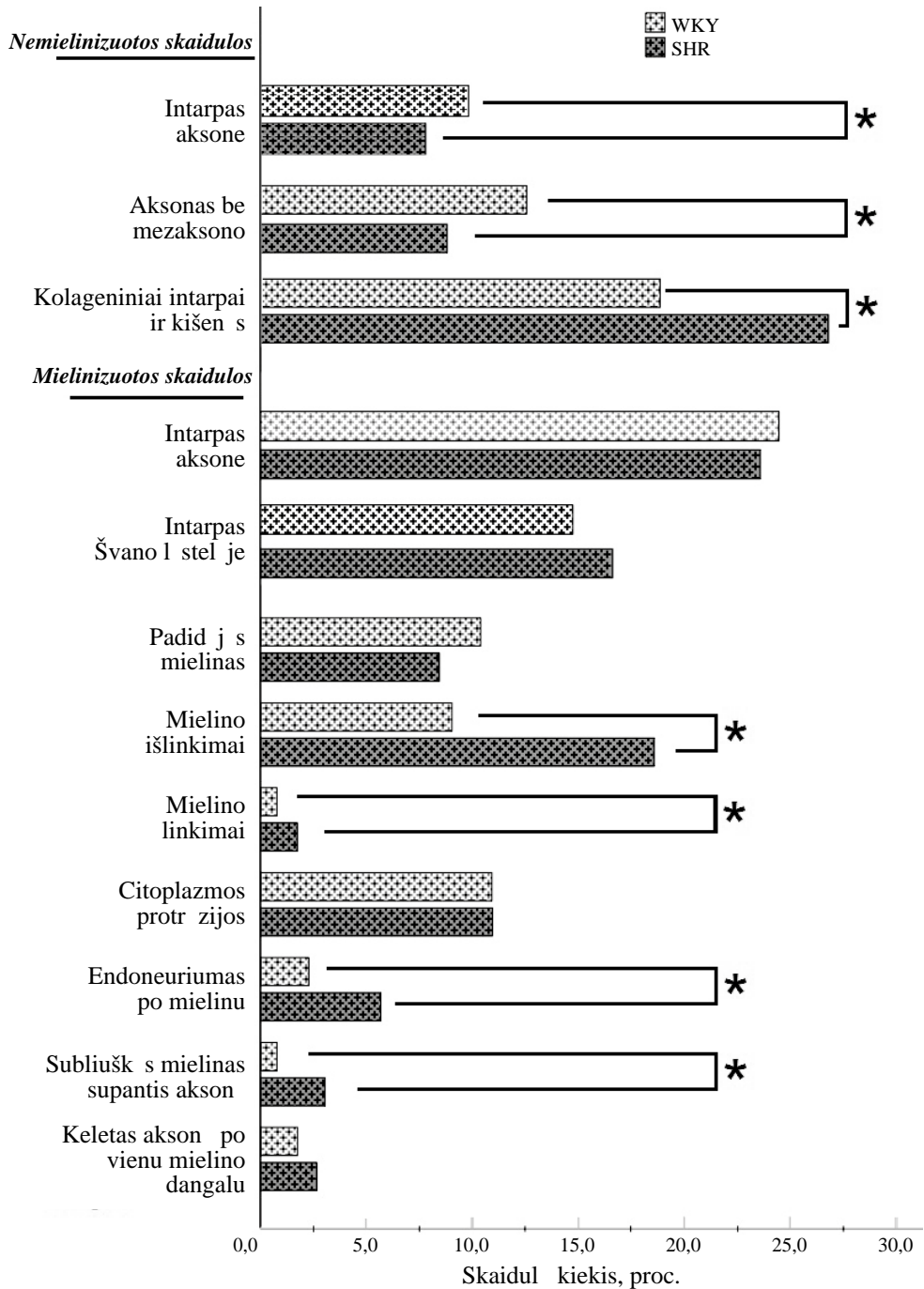
Senų gyvūnų nervų endoneuriume kolageno skaidulos buvo ypatingai tankios ir pilnai užpildė tarpus tarp nervinių skaidulų. Ištyrus suaugusiųjų žiurkių nemielininių nervinių skaidulų ultrastruktūrą buvo nustatyta, kad WKY epikardiniuose nervuose dominavo tipinės nemielininės nervinės skaidulos su kompaktiškomis Švano ląstelėmis, suteikiančiomis skaiduloms taisyklingą kontūrą (3.2.1.9 pav., C). SHR nemielininės skaidulos buvo mažiau kompaktiškos su sluoksniuotomis Švano ląstelėmis ir gausesnėmis endoneuriumo kišenėmis, lyginant su WKY nemielininėmis skaidulomis. Pamatinės membranos raukšlės be Švano ląstelių ataugų buvo būdingos SHR nervams (3.2.2.5, 3.2.2.6 pav.). SHR ir WKY širdies nervuose, daug aksonų buvo nepilnai padengti glijos ląstelėmis ar kontaktavo vienas su kitu tame pačiame Švano ląstelės griovelyje (3.2.1.9 pav., C–D).



3.2.2.5 pav. Iliustracijoje pavaizduota nemielininės (A–B) skaidulos, keletas tipų intarpų nemielininiuose (C–E), ir melininiuose (F–H) aksonuose

A – pavaizduota įprasta nemielininės skaidulos ultrastuktūra, keletas kolageno kišenių yra pažymėta rodyklių smaigaliais, o įlinkiai – rodyklėmis. Dvigubos rodyklės žymi aksonus, mažesnius už $0,2 \mu\text{m}$, o aksonai be mezaksonų pažymėti dvigubais rodyklių smaigaliais.

B – daugybė kolagenų kišenių (rodyklių smaigaliai) ir kolageno intarpų (rodyklės) įsiperpia giliai į Švano ląstelę ir taip sudaro porėtą ir netaisyklingą skaidulos formą. Plonas įlinkimas apsuptas bazine membrana pavaizduotas centre (*). C – didelis membraninis intarpas su homogenine membrana yra pažymėtas rodyklės smaigaliu. D – rodyklės smaigaliu pažymėtas didelis homogeniškas intarpas, šalia kurio yra daugybė mitochondrijų. E – daug mažų membraninių intarpų (rodyklių smaigaliai) yra išsidėstę aksoplazmoje tarp mitochondrijų ir pūslelių. F – aksonas su dideliu membraniniu (rodyklė) ir keletu mažesnių (rodyklių smaigaliai) inkluzų, padengtų netipišku mielininiu dangalu. G – mielininis aksonas su fragmentuotu inkluzu (rodyklės smaigalys). H – mielininėje skaiduloje rasti du laminuoti kūneliai (rodyklių smaigaliai) ir homogeniškas intarpas (rodyklė). Sutrumpinimai: Ax – aksonas; En – endoneuriumas; Sch – Švano ląstelė. Skalės: A–B, F, H – 1 μm; C–E, G – 0,5 μm.



3.2.2.6 pav. Skirtingas nemielininių ir mielininių skaidulų pokyčių pasiskirstymas senų WKY ir SHR širdies nervuose
Statistiškai patikimi skirtumai ($p < 0,05$) pažymėti žvaigždute.

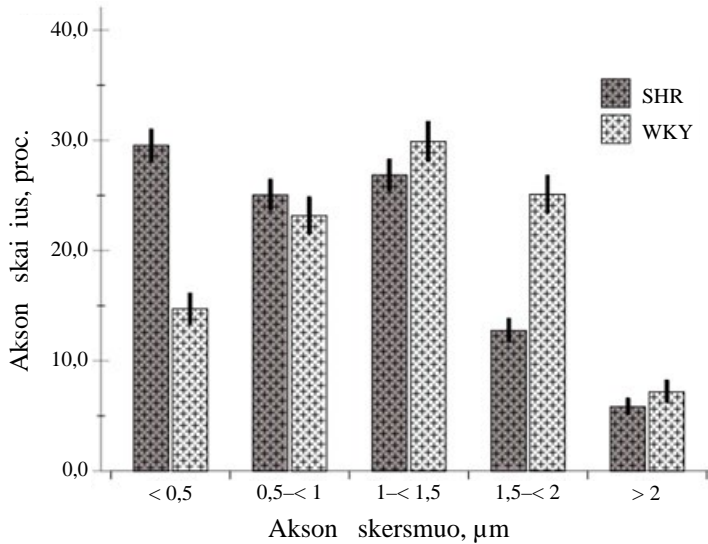
Nemieliniai aksonai buvo plonesni SHR nervuose, lyginant su WKY, vi-
sose amžiaus grupėse tiek skilveliuose, tiek ir prieširdžiuose. Pažymėtina, kad
skilvelių nervuose šis skirtumas buvo ženklesnis (3.2.2.2 lentelė). Bendrai,
ploni aksonai dominavo SHR epikardiniuose nervuose, ir priešingai, stores-
nių aksonų buvo daugiau WKY epikardiniuose nervuose (3.2.2.7 pav.).

3.2.2.2 lentelė SHR ir WKY žiurkių nervų ultrastruktūrinė charakteristika,
pateikta parametrų vidurkiai (standartinė paklaida)

Parametras	Suaugusios žiurkės				Senos žiurkės			
	Prieširdinės skaidulos		Skilvelinės skaidulos		Prieširdinės skaidulos		Skilvelinės skaidulos	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Nemielinės skaidulos								
Matuotų aksonų skaičius, n	1381	999	978	1953	4611	8063	3675	2057
Aksono plotas, μm^2	1,5 (0,03)	1,2 (0,03)*	1,2 (0,04)	0,9 (0,02)*	1,36 (0,02)	1,13 (0,01)*	1,33 (0,02)	1,11 (0,03)*
Aksono skersmuo, μm	1,3 (0,01)	1,11 (0,02)*	1,07 (0,02)	0,9 (0,01)*	1,18 (0,01)	1,04 (0,01)*	1,12 (0,01)	0,97 (0,02)*
Aksonų skaičiaus vidurkis nervinėje skaiduloje, n	2,5 (0,1)	2,8 (0,1)*	4,4 (0,6)	4,4 (0,2)	2,53 (0,06)	3,42 (0,80)*	3,22 (0,30)	3,43 (0,20)
Suminis/bendras aksonų plotas nervė, proc.	48,9 (1,2)	43,6 (1,1)*	54,4 (1,4)	50,1 (0,8)*	58,60 (0,70)	52,70 (0,70)*	58,90 (0,98)	50,90 (0,80)*
Mielinės skaidulos								
Mielininių skaidu- lų skaičius, n	-	-	-	-	829	526*	495	229*
Mielininių skai- dulų tankumas, n/1000 μm^2	-	-	-	-	16,96 (1,63)	7,95 (0,67)*	14,96 (1,35)	11,49 (1,04)*
Matuotų aksonų skaičius, n	92	200	28	146	576	294	295	120
Aksonų plotas, μm^2	4,1 (0,1)	4,2 (0,2)	5,5 (0,3)	5,1 (0,2)	4,02 (0,08)	4,25 (0,15)*	4,71 (0,15)	5,66 (0,30)*
Aksono skersmuo, μm	2,3 (0,04)	2,2 (0,1)	2,6 (0,1)**	2,5 (0,1)	2,20 (0,02)	2,23 (0,04)*	2,37 (0,04)	2,56 (0,75)*
Nervinės skaidu- los plotas, μm^2	7,2 (0,3)	7,3 (0,2)	8,8 (0,6)**	7,6 (0,3)	7,06 (0,1)	7,59 (0,20)*	7,90 (0,20)	9,06 (0,46)*
Nervinės skaidu- los skersmuo, μm	3,0 (0,1)	2,95 (0,1)	3,3 (0,1)**	3,0 (0,1)	2,90 (0,3)	3,01 (0,05)	3,09 (0,04)	3,27 (0,09)*
G-santykis	0,77 (0,01)	0,75 (0,01)	0,8 (0,01)**	0,8 (0,01)	0,752 (0,004)	0,736 (0,01)*	0,767 (0,004)	0,78 (0,001)

* – statistiškai patikimas skirtumas tarp SHR ir WKY vienodo amžiaus grupių, $p < 0,05$.

** – statistiškai patikimas skirtumas tarp prieširdinių ir skilvelinių nervinių skaidulų to paties
amžiaus WKY ar SHR grupėse, $p < 0,05$.



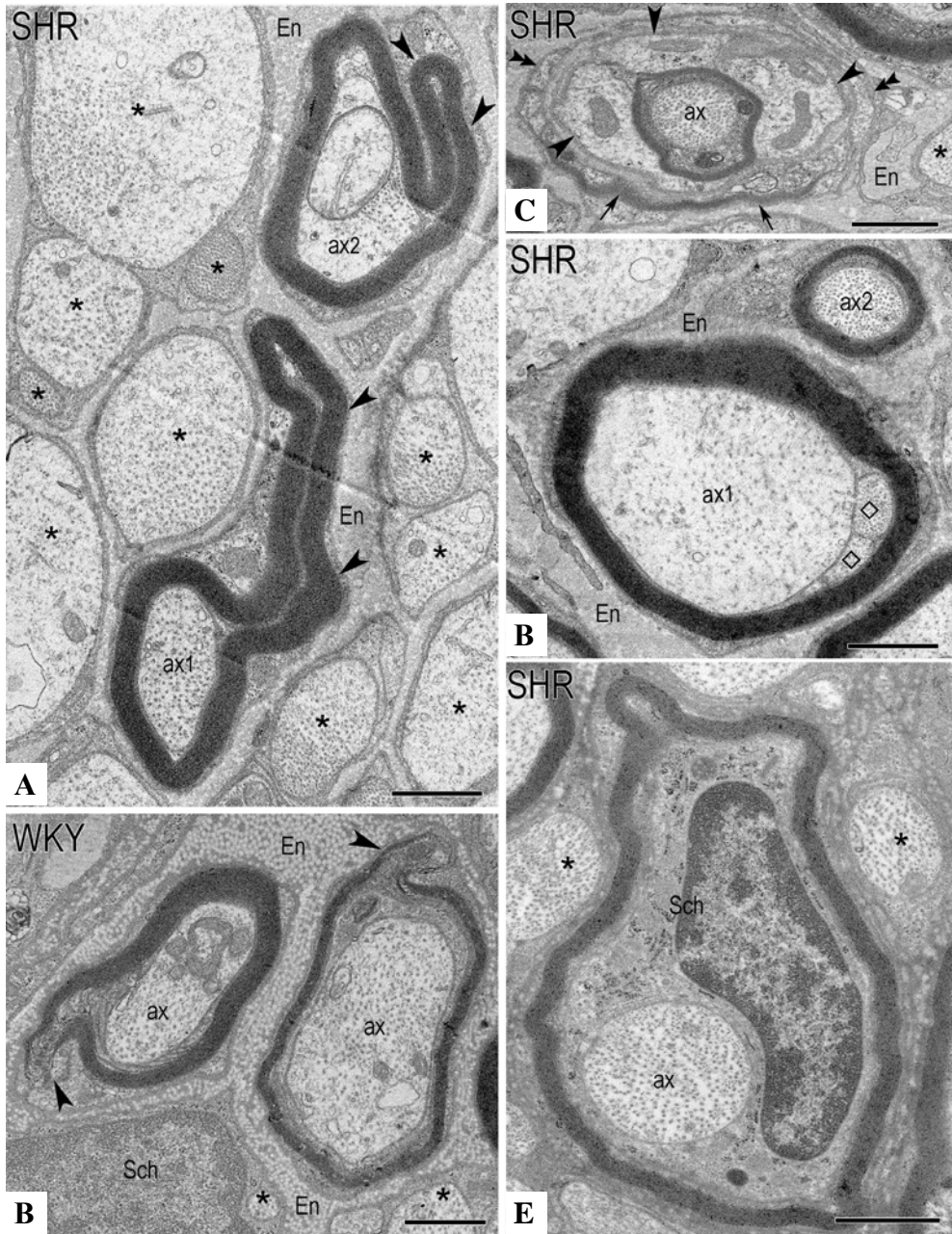
3.2.2.7 pav. Aksonų pasiskirstymas pagal skersmenį suaugusių WKY ir SHR nervuose

Suminis aksonų užimamas plotas nerve buvo nustatytas ženkliai mažesnis abejuose prieširdžių ir skilvelių SHR epikardiniuose nervuose (3.2.2.2 lentelė).

Mielinės nervinės skaidulos vizualiai buvo gausios tiek WKY, tiek ir SHR nervuose. Tačiau įvertinus bendrą mielininių skaidulų skaičių ir jų tankumą nervuose buvo nustatytas statistiškai reikšmingas šių skaidulų sumažėjimas senų SHR žiurkių nervuose (3.2.2.2 lentelė). Daugumos mielininių skaidulų aksonų ultrastruktūra buvo be pakeitimų, išskyrus įvairius intarpus, kurie buvo rasti 20 proc. senų žiurkių aksonų. Intarpų dydžiai kito nuo labai mažų iki didelių, elektrono-tankūs, homogeniški, ar pūsleliniai intarpai. Taip pat intarpų buvo mielininių skaidulų Švano ląstelių citoplazmoje, tačiau čia jie buvo mažiau paplitę (3.2.2.5 pav., F–H; 3.2.2.6 pav.).

Tuo tarpu didelėje dalyje mielininių nervinių skaidulų buvo nustatyti mielino dangalo neuropatiniai pokyčiai. Ypač gausios patologinės mielinės skaidulos buvo rastos senų žiurkių grupėje: jos sudarė vieną trečdalį visų WKY žiurkių nervų mielininių skaidulų ir beveik pusę SHR nervuose (3.2.2.2 lentelė). Abiejų tirtų amžiaus grupių nervuose daugumoje pakitusių mielininių nervinių skaidulų buvo mielino apvalkalo perteklius (hipermielinizacija), kuris neatitiko aksono skersmens ir dėl to susidarė mielino klostės, kurios buvo gerai matomos elektronogramose. Perteklinis mielinas sudarė charakteringas klostes, dažniau nukreiptas į išorę (3.2.2.8 pav.; 3.2.2.9 pav. C), kurios ženkliai gausesnės buvo hipertenzinių žiurkių nervuose. Į vidų nukreiptos

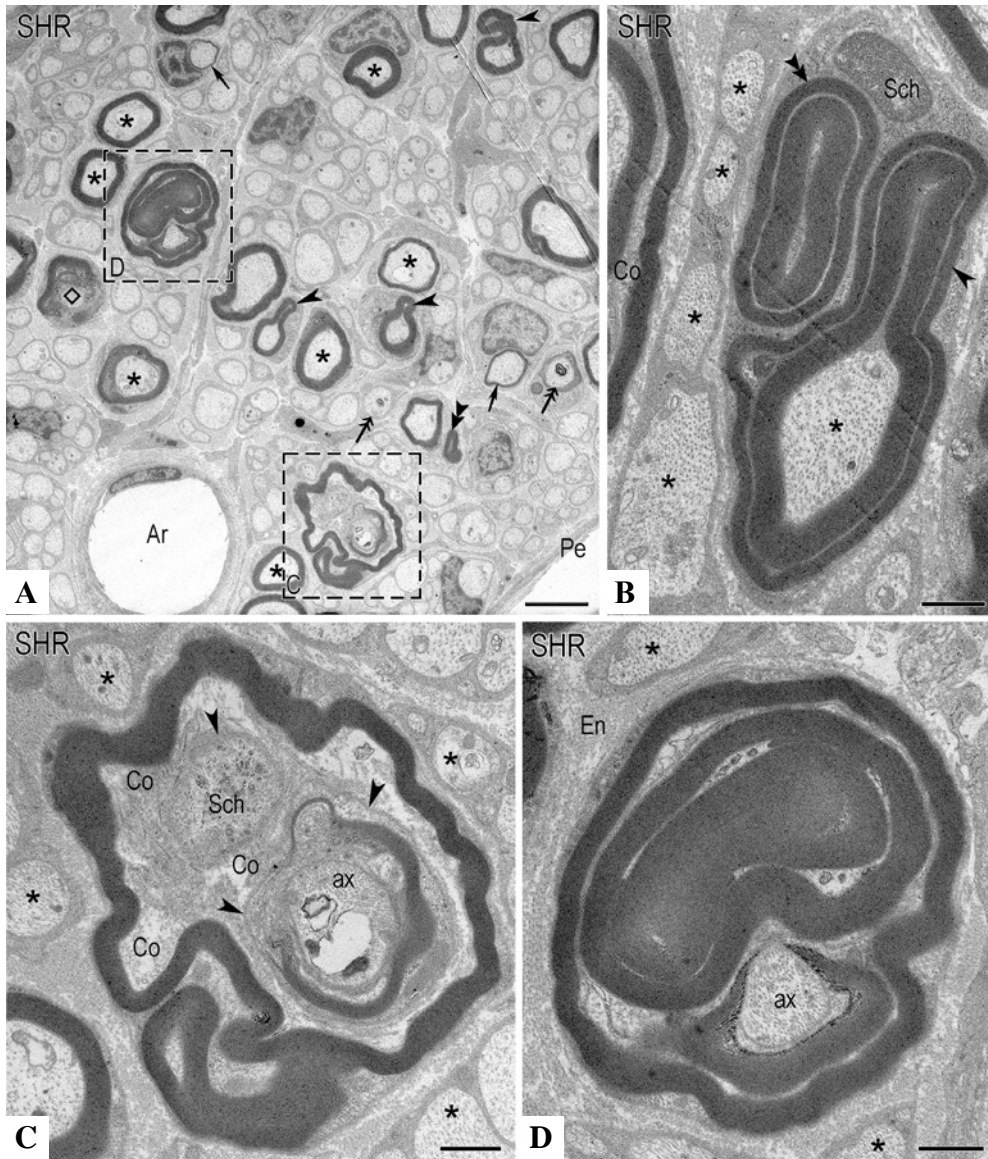
mielino klostės buvo gerokai retesnės, tačiau taip pat statistiškai patikimai gausesnės SHR nervuose (3.2.2.6 pav.). Kartais pjūviuose buvo matomos kelios klostės, arba mielinas būdavo itin išvešėjęs, sudarydamas taip vadinamus „tomakulus“ (3.2.2.9 pav., B).



3.2.2.8 pav. Įvairūs ultrastruktūriniai mielininių skaidulų pokyčiai SHR (A, C, D) ir WKY (B, E) nervuose

A – du hipermielinizuoti aksonai (ax1, ax2) su mielino pertekliaus linkiu (rodyklių smaigaliai). B – citoplazma pasklidusi po mielino dangalo sluoksnius (rodyklių smaigaliai) suformuoja išsikišimus. C – plonas mielininis aksonas apsuptas trimis Švano ląstelėmis (rodyklių smaigaliai), padengtas endoneuriumo kolageno skaidulomis ir papildomai dar viena Švano

ląstele (dvigubi rodyklių smaigaliai). Dalis šios skaidulos dar yra padengta mielino dangalu (rodyklės). D – trys aksonai po vienu mielino danglu. Didžiausias aksonas (ax1) yra normalaus dydžio, bet kiti du (pažymėti deimantais) yra labai ploni. Dar vienas plonas mielininis aksonas pažymėtas ax2 yra viršuje dešiniam kampe. E – daugybiniai mielino trūkiai (išgriuvęs mielinas) pažymėti rodyklių smaigaliais. Tankiame endoneuriume yra žvaigždutėmis pažymėti nemielininiai aksonai. Sutrumpinimai: Sch – Švano ląstelė; En – endoneuriumas. Skalės: A–E 1 μm .



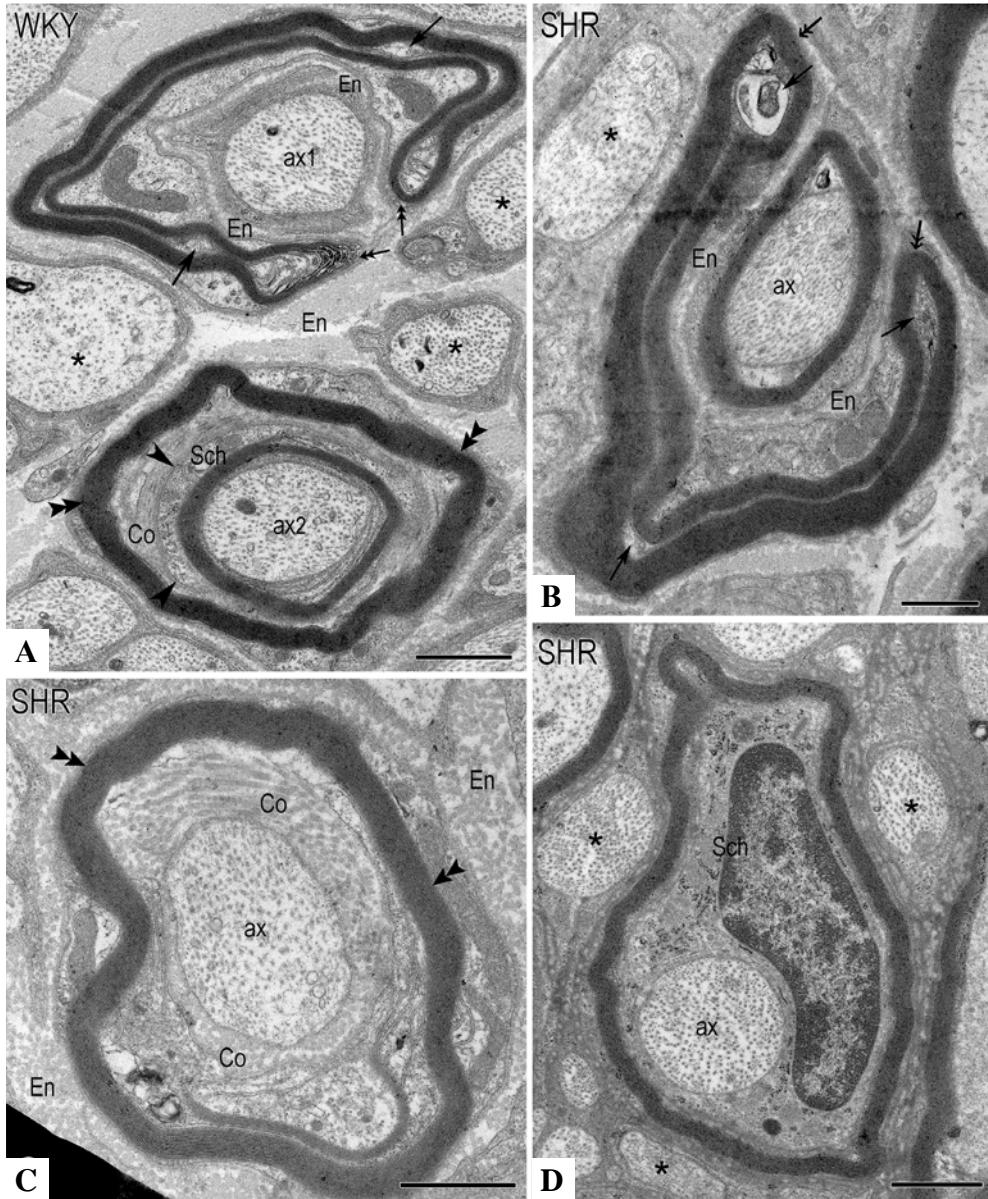
3.2.2.9 pav. Hipertenzinių žiurkių širdies nervų mielininių skaidulų ultrastruktūra

A – mažo didinimo elektromograma, vaizduojanti daug mielininių aksonų, išsidėsčiusių tarp pavienių nemielininių skaidulų. Žvaigždute pažymėti normalūs mielininiai aksonai; rodyklių smaigaliais pažymėti mielino išlinkimai; dvigubomis rodyklėmis pažymėti aksonai su intarpais; deimantas žymi aksoną, kuris apsuptas mielinu tik iš vienos pusės; rodyklės žymi labai plonas mielinines skaidulas, apibrėžti laukeliai yra išdidinti paveiksluose C ir D. B – dvigubo mielino dangalas (rodyklės smaigalys) ir greta esantis mielinas (dvigubas rodyklių smaigalys) rasti apgaubti toje pačioje Švano ląstelėje. C – mielininės skaidulos aksone

esantis intarpas (ax) dalinai padengtas mielino dangalu. D – hipermielinizuotas aksonas (ax). Sutrumpinimai: Pe – perineuriumas; Ar – arteriolė; Co – kolagenas; Sch – Švano ląstelė; En – endoneuriumas. Skalės: A – 5 μm , B–D – 1 μm .

Kitas charakteringas pakitimas tai citoplazmos tarpai mieline, kurie akivaizdžiai skyrėsi nuo Šmito Lantermano įpjovų, nes citoplazmos tarpai visada buvo tik iš vienos pusės ir tęsėsi gana toli nuo aksono, sudarydami būdingus kabliukus (3.2.2.8 pav., A, B). Gana dažnai pasitaikydavo išburkusio mielino, tačiau šis pakitimas nebuvo stipriai išreikštas ir netgi dažnesnis senų WKY žiurkių nervuose, nei tokio pat amžiaus SHR žiurkių. Ypač charakteringu galima vadinti mielininių skaidulų pokytį, kai endoneuriumas buvo stebimas po mielinu, t.y. kolageno skaidulos buvo įsiterpusios tarp mielino apvalkalo ir aksono. Ši endoneurinė tarpą nuo nervinių struktūrų skyrė pamatinė membrana (3.2.2.10 pav., A, C). Toks išorinis mielino sluoksnis apsupdavo ne tik endoneuriumo dalį, bet taip pat ir mielininę arba nemielininę nervinę skaidulą. Pažymėtina, kad nors šio tipo skaidulos nebuvo itin gausios, tačiau jų skaičius SHR nervuose net viršijo 2,5 karto WKY. Dar vienas labai charakteringas mielininių nervinių skaidulų pakitimų tipas, mūsų įvardijamas kaip „subliuškęs mielinas apsupantis aksoną“, taip pat buvo gana retas, tačiau SHR grupės nervuose jų buvo tris kartus daugiau nei WKY grupėje (3.2.2.6 pav.). Toks „subliuškęs mielinas“ apsupdavo arba nemielininę (3.2.2.10 pav., A), arba mielininę (3.2.2.10 pav., B) nervines skaidulas. Galiausiai tirtuose nervuose buvo rasta plonų mielininių nervinių skaidulų, tačiau jų nebuvo daug abiejose gyvūnų grupėse. Kartais šios plonos mielininės skaidulos buvo apsuptos kelių Švano ląstelių (3.2.2.8 pav., C). Keletas aksonų po tuo pačiu mielino apvalkalu (3.2.2.8 pav., D), taip pat buvo dažnesni SHR nervuose. Skaidula su Švano ląstelės branduoliu mielino apvalkalo viduje (3.2.2.10 pav., D) buvo rasta SHR nervuose (3.2.2.6 pav.).

Aprašytos pakitusios mielininės skaidulos su mielino dangalu neatitinkančiu aksono paviršiaus nebuvo vertinamos morfometriškai, tokiu būdu matuojant tik intaktines nervines skaidulas (kuriose mielinas buvo priglundęs prie aksono). Tokių skaidulų skaičius senų WKY nervuose buvo 65,7 proc. ir tik 51,4 proc. senų SHR nervuose. Visų grupių mielininės skaidulos ir jų aksonai skilvelių nervuose buvo storesni už prieširdžių nervų (3.2.2.2 lentelė). Suaugusių amžiaus grupės WKY ir SHR žiurkių nei skaidulų, nei aksonų plotai taip pat nesiskyrė. Tuo tarpu senų žiurkių tiek prieširdžių nervuose, tiek skilvelių nervuose SHR mielininės skaidulos ir jų aksonai buvo statistiškai reikšmingai storesni už WKY (3.2.2.2 lentelė).



3.2.2.10 pav. *Seni neįprasti ultrastuktūriniai mielininių skaidulų pokyčiai WKY (A) ir SHR (B-C) nervuose*

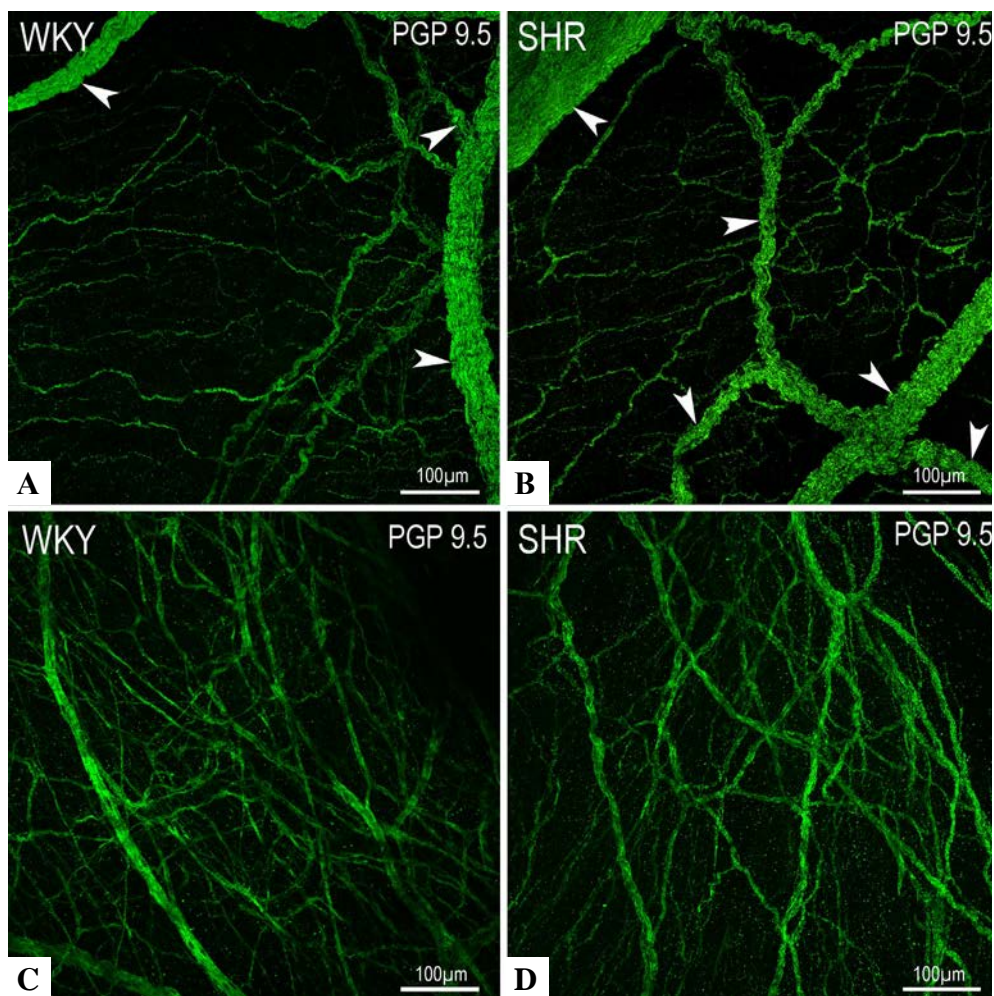
A – viršuje matomas nemielininis aksonas (ax1) yra apsuptas pusiniu mielininio dangalo lanku. Mielininio puslankio galuose matomas mielino sluoksnių atsiskyrimas (dvigubos rodyklės). Rodyklės žymi ploną Švano ląstelės citoplazmą. Žemiau esantis aksonas ax2 yra apsuptas pilnai dvigubu mielino dangalu. Rodyklių smaigaliais pažymėta Švano ląstelės bazinė membrana. B – mielininis aksonas (ax) apsuptas pairusiu mielino dangalu. Dvigubos rodyklės žymi puslankio galus, kur tarp mielino sluoksnių įsiterpusi citoplazma (rodyklės).

C – mielininis aksonas (ax) apsuptas kolageno skaidulomis (Co) ir mielino dangalu (dvigubi rodyklių smaigaliai). D – Švano ląstelė kartu su branduoliu įsiterpusi po mielino dangalu. Nemielinės skaidulos pažymėtos žvaigždutėmis. Sutrumpinimai: En – endoneuriumas; Co – kolageno skaidulos. Skalė – 1 μm .

3.2.3. Miokardo inervacijos pokyčiai

Miokardo nervinės skaidulos sudarė smulkų tinklelį, kuris buvo gerai pastebimas išskleistuose prieširdžių preparatuose (3.2.3.1 pav.) ir širdies skilvelių šaldomuosiuose pjūviuose.

Gausiausiai inervuota prieširdžių vieta buvo sinusinis mazgas, mažiausiai – ausytės. Jaunų, suaugusių ir senų tiek WKY, tiek ir SHR žiurkių sinusiniame mazge vyravo cholinerginės skaidulos. Abiejų veislių gyvūnų cholinerginė inervacija palaipsniui mažėjo senstant, kol labai senų amžiaus grupėje cholinerginių skaidulų liko mažiau nei adrenergiųjų. Hipertenzinių ir kontrolinių gyvūnų cholinerginės inervacijos mažėjimas amžiaus bėgyje vyko netolygiai: jaunų grupėje šių skaidulų buvo daugiau WKY sinusiniame mazge nei SHR. Gyvūnams bręstant abiejose grupėse cholinerginių skaidulų mažėjo, tačiau WKY žiurkių širdyse sumažėjimas buvo stipresnis ir lėmė, kad suaugusių grupėje jau SHR turėjo gausesnę cholinerginę inervaciją. Vėliau, labai senų amžiaus grupėje SHR sinusinio mazgo cholinerginė inervacija beveik tris kartus viršijo WHY (3.2.3.1 lentelė). Beveik visų amžiaus grupių, išskyrus labai senas žiurkes, sinusinio mazgo adrenerginę inervaciją buvo menkesnė už cholinerginę ir taip pat mažėjo amžiaus bėgyje. Tačiau mažėjimas vyko lėčiau ir tai lėmė, kad labai senų žiurkių adrenerginę inervaciją savo gausa viršijo sinusinio mazgo cholinerginę inervaciją (3.2.3.1 lentelė). Amžinis TH⁺ skaidulų mažėjimas vyko netolygiai hipertenzinių ir kontrolinių gyvūnų širdyse, todėl tik suaugusių ir labai senų amžiaus grupėje adrenerginę inervaciją buvo gausesnė SHR sinusiniame mazge lyginant su kontroliniais gyvūnais (3.2.2.3 pav., E–H). Peptiderginės, CGRP⁺ skaidulos sudarė mažiausią inervacijos dalį, taip pat mažėjo amžiaus bėgyje. Tačiau lyginant su aukščiau aptarta cholinergine bei adrenergine inervacija mažėjimas vyko tolygiai gyvūnams senstant. Pažymėtina, kad visų amžiaus grupių SHR gyvūnų sinusiniame mazge CGRP⁺ skaidulos buvo reikšmingai gausesnės lyginant su atitinkamo amžiaus WKY (3.2.3.1 lentelė, 3.2.3.1 pav.).



3.2.3.1 pav. Nuotraukos iliustruoja WKY (A ir C) bei SHR (B ir D) prieširdžio smulkius nervus (rodyklių smaigaliai) bei miokardo nervines skaidulas

A ir B vaizduoja retą skaidulų tinklą kairiajame nugariniame prieširdžio paviršiuje, o C ir D – tankų skaidulų tinklą sinusinio prieširdžio mazgo srityje.

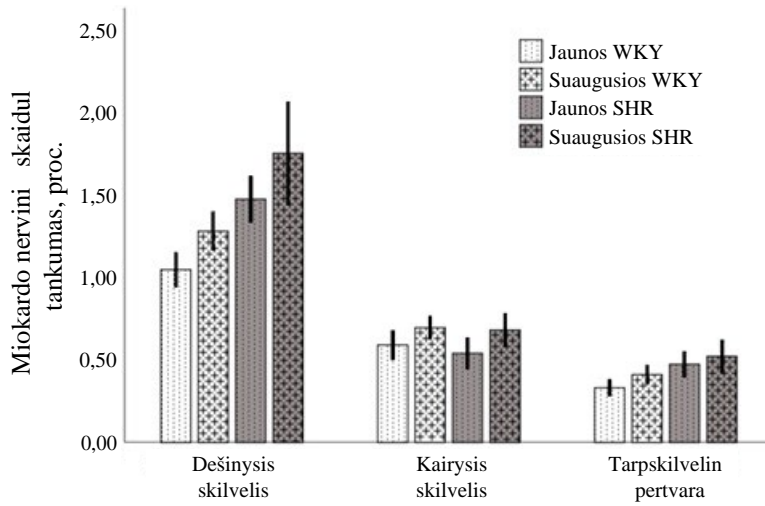
3.2.3.1 lentelė SHR ir WKY žiurkių miokardo nervinių skaidulų tankumas, pateikiamas vidurkiu

Nervinių skaidulų tankumas miokarde, proc.	Žymuo	Jaunos		Suaugusios		Senos		Labai senos	
		WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Prieširdžiuose	PGP 9,5	0,96	0,77	1	1,2*	1,69	1,07*	-	-
Kairiajame skilvelyje		0,6	0,5	0,7	0,65	1,04	0,72*	1,02	0,9
Dešiniajame skilvelyje		1,04	1,47*	1,1	1,7*	1,59	2,22*	1,94	3,29*
Sinusiniame mazge	ChAT	7,53	6,7	4,05	5,88*	3,82	3,48	0,46	1,29*
Prieširdžiuose		1,15	1,67*	1,41	2,11*	1,36	1,34	0,37	0,47
Sinusiniame mazge	TH	4,1	3,41*	1,85	2,86*	2,36	2,07	1,08	1,47*
Prieširdžiuose		1,12	1,42*	0,95	1,95*	1,26	1,16	0,46	0,42
Kairiajame skilvelyje		0,77	0,65	0,87	1,03	1,1	0,8*	0,16	0,73*
Dešiniajame skilvelyje		1,23	1,41	1,26	2,22*	1,93	2,47*	0,35	1,27*
Sinusiniame mazge	CGRP	1,34	1,45	0,72	1,12*	0,69	1,07*	0,04	0,22*
Prieširdžiuose		0,55	0,78*	0,48	0,59	0,48	0,62*	0,04	0,1*
Kairiajame skilvelyje		0,1	0,2*	0,14	0,08*	0,12	0,08*	0,16	0,73*
Dešiniajame skilvelyje		0,13	0,27*	0,19	0,09*	0,14	0,13	0,35	1,27*

* $p < 0,05$ vs. to paties amžiaus WKY žiurkės. Duomenys pateikiami kaip vidurkis. PGP 9,5 – proteino geno produktas 9,5; TH – tirozino hidroksilazė; CGRP – kalcitonino geno peptidas.

Prieširdžių darbiname miokarde tiek ChAT+, tiek TH+ skaidulų tankumas amžiaus bėgyje išliko gana stabilus ir tik labai senų grupėje stebėjome ženklų abiejų fenotipų inervacijos sumažėjimą. Jaunų ir suaugusių SHR grupių prieširdžių miokarde tiek cholinerginė, tiek adrenerginė inervacija buvo gausesnė nei to paties amžiaus kontrolinių. Žiurkėms senstant – šių skirtumų neliko. CGRP+ skaidulos buvo gausesnės visų amžiaus grupių SHR prieširdžių miokarde, tačiau ypač didelis skirtumas atsirado labai senų žiurkių grupėje, kur jų gausumas 2,5 karto viršijo kontrolinių (3.2.3.1 lentelė).

Skilvelių miokardo inervacija buvo nevienalytė. Dešiniojo skilvelio inervacija iki 30 proc. buvo tankesnė nei kairiojo (3.2.3.2 pav.; 3.2.3.1 lentelė). Tuo tarpu kairiojo skilvelio miokardo inervacija buvo ~10 proc. menkesnė SHR lyginant su tokio pat amžiaus normotenzinės kontrolinės grupės (3.2.3.1 lentelė).



3.2.3.2 pav. Nervinių skaidulų pasiskirstymo pokyčiai tarpkilvelinėje pertvaroje ir skilvelių miokarde

4. DISKUSIJA

4.1. Savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės – arterinės hipertenzijos modelis

Savaimine hipertenzija sergančios žiurkės yra daugiausia ištirtas pirminės arterinės hipertenzijos gyvūnų modelis, dažniausiai naudojamas širdies ir kraujagyslių ligoms tirti. Ši veislė buvo išvesta Kiote (Kyoto, Japonija) iš vietinės Wistar Kyoto veislės, atrenkant žiurkes, turinčias padidėjusį kraujospūdį [57]. Taip pasiekta, kad 5–6 savaičių amžiaus SHR veislės žiurkėms spontaniškai padidėja kraujospūdis, kuris išlieka padidėjęs visą gyvenimą [62]. Kontrolei naudojome normotenzines Wistar Kyoto žiurkes, kurios dėl jų genetinio artimumo tiriamai veislei yra rekomenduojamos kaip aukso standartas arterinės hipertenzijos tyrimuose [108, 109].

Žinoma, kad Wistar Kyoto ir savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės turi skirtingas hemodinamikos ir elgesio ypatybes, nors jos genetiškai labai panašios [10]. Palyginti su amžių atitinkančiomis normotenzinėmis WKY žiurkėmis, SHR rodo mažesnę širdies susitraukimų dažnumą ramybės metu, labai padidėjusį arterinį kraujospūdį, didesnę kairiojo skilvelio masės ir kūno svorio santykį, mažesnę išstūmio frakciją ir dalinį skilvelio sutrumpėjimą, ilgesnį lėtėjimo laiką ir mažesnę E/A santykį ir daugybę kitų pokyčių [11]. Prieš pamant mėginčius hipertenzijai patvirtinti, buvo naudojamas neinvazinis kraujospūdžio matavimo metodas. Invazinė intraarterinė kaniuliacija ir laikoma kraujospūdžio registravimo aukso standartu, tačiau tyrimai rodo stiprų ryšį tarp neinvazinio kraujospūdžio, pamatuoto uodegos manžetės metodu, ir intraarteriniu metodu pamatuoto kraujospūdžio [110]. Fiziologiniai tyrimais, atliktais prieš gyvūnų eutanaziją, nustatyti padidėję suaugusių ir senų SHR žiurkių kraujospūdžio parametrai. Mūsų nustatyti fiziologiniai SHR parametrai koreliavo su kitų tyrėjų duomenimis [105, 111]. Suaugusių WKY žiurkių kraujospūdis atitiko normos ribas. Senoms WKY žiurkėms nustatėme nuolatinių AKS didėjimą, kuris pasiekė viršutinės normos ribos kraujospūdį, o tam tikrų gyvūnų – net didesnę nei 150 mm Hg. Ši vertė įvardijama kaip hipertenzinė kalbant apie žiurkes, taigi WKY ilgainiui įgyja hipertenzijos požymių. Abiejų veislių gyvūnų arterinis kraujospūdis didėjo, tačiau SHR veislės stipriau. Todėl net ir padidėjus WKY žiurkių spaudimui, tiriamų SHR gyvūnų arterinis kraujospūdis buvo reikšmingai didesnis už kontrolinių gyvūnų. Tai padėjo naudoti SHR ir WKY žiurkes kaip gyvūnų modelius struktūriniais intrakardinių pokyčių tyrimams. Rezende ir kt. [61] taip pat tyrė SHR, WKY ir Wistar žiurkių kraujospūdį bei nustatė, kad WKY kraujospūdžio ribos yra tarpinės tarp SHR ir Wistar veislių žiurkių. Todėl galima manyti, kad Wistar

veislė būtų tinkama alternatyva Wistar Kyoto veislei kaip kontrolė, tačiau tam reikalingi papildomi tyrimai [61].

Makroskopiškai hipertenziją turinčių jaunų žiurkių širdžių dydis ir svoris nesiskyrė nuo kontrolinių, tai rodo dar neprasidėjusią miokardo hipertrofiją. Suaugusiųjų amžiaus grupės SHR žiurkėms buvo padidėję kairiojo skilvelio matmenys. Įdomu, kad bėgant laikui kairiojo skilvelio siena nebestorėjo ir netgi tapo šiek tiek plonesnė nei sulaukus suaugusiojo amžiaus. WKY žiurkių patinėlių kairiojo skilvelio parametrai didėjo palaipsniui ir nemažėjo, buvo šiek tiek didesni nei širdies echoskopijos normos ribos [112].

Mūsų tirtas gyvūno modelis – žiurkės yra genetiškai identiškos, skiriasi tik sirgimu arba nesirgimu hipertenzija – atskleidė dar vieną svarbų aspektą. Jaunos žiurkytės išoriškai nesiskyrė, tačiau hipertenziją turinčioms žiurkėms senstant išryškėjo svorio mažėjimas, taip pat jų kailis neblizgėjo, buvo nutriušęs, palyginti su to paties amžiaus WKY žiurkėmis. Vadinasi, negydoma pirminė arterinė hipertenzija pareikalauja didesnių organizmo išteklių, išsekina gyvūną, sutrumpina gyvenimo trukmę. SHR žiurkės paprastai gyvena 1,5 metų, o genetiškai tokios pačios, tačiau neturinčios padidėjusio kraujospūdžio WKY – 2,5–3 metus [63]. Taigi paskutinė mūsų tyrime naudota > 1,5 metų labai senų žiurkių amžiaus grupė buvo pasiekusi SHR gyvenimo trukmės ribą [63].

4.2. Savaiminę hipertenziją turinčios žiurkės širdies nervinio rezginio pokyčiai

Mokslininkai labai išsamiai tyrė suaktyvėjusį bendrą simpatinį tonusą esant pirminei hipertenzijai [8, 83, 113–115]. Nustatytas tiek parasimpatinių komponentų, tiek simpatinės veiklos suintensyvėjimas, taip pat – širdies stimuliacijos sukeltas širdies nepakankamumas šunų modelyje [116] rodo reikšmingus vidinio širdies nervinio rezginio struktūrinius pokyčius dėl sisteminės arterinės hipertenzijos.

Adrenerginės nervų sistemos dalies spurtas gali būti susijęs su ekstrakardine simpatinės nervų sistemos dalimi. Neseniai buvo įrodyta, kad sutrikusi tarpląstelinė kalcio homeostazė gali sukelti autonominę disfunkciją, kuriai būdingas jaunų prehipertenziją turinčių SHR individų slopinamas parasimpatinis ir padidėjęs simpatinis aktyvumas [117]. Manoma, kad šis presinapsinio neuronų Ca^{2+} valdymo sutrikimas, be kitų širdies ligų, prisideda prie hipertenzijos. Dėl per didelės Ca^{2+} reikšos (ekspresijos) prehipertenzinių SHR individų žvaigždinio mazgo simpatiniuose neuronuose atsiranda mitochondrijų ir endoplazminio tinklo anomalijos [118]. Fiziologiniais tyrimais nustatyta, kad norepinefrino išsiskyrimas padidėja jauniems tiriamiems subjektams, kuriems išsivysčiusi ribinė AH. Šis procesas ypač ryškus inkstuose bei širdyje,

pagrindiniuose pagal svarbą širdies ir kraujagyslių sistemos homeostazės palaikymo organuose [119].

Grįžtant prie intrakardinės nervų sistemos, duomenų apie ankstyvosios hipertenzijos sukeltus morfologinius širdies nervinio rezginio pokyčius itin nedaug, todėl mūsų rezultatai užpildo šią nišą [84]. Prehipertenzinės būklės žiurkės įdomios, kad galima pamėginti atsakyti į klausimą apie vištą ir kiaušinį: ar pirmiau aktyvinama simpatinė nervų sistema ir todėl didėja AKS, ar simpatinė aktyvacija yra padidėjusio kraujospūdžio padarinys bei organizmo reakcija į padidėjusį širdies darbo krūvį [120]. Mūsų tyrimas rodo, kad nervinė sistema jau yra suaktyvėjusi prieš hipertenzijos išsivystymą. Neely ir kt. taip pat aprašė periferinį simpatinį hiperaktyvumą ankstyvomis hipertenzijos stadijomis [115].

Gauti duomenys rodo, kad 8 savaičių amžiaus prehipertenzinės būklės SHR gyvūnai, kuriems dar nepadidėjęs arterinis kraujospūdis [121, 122], jau turi daug širdies inervacijos morfologinių pokyčių, palyginti su amžių atitinkančiais WKY kontroliniais gyvūnais. Tik morfologiniai nervų sistemos tyrimai atskleidė, kad intrakardinė nervų sistema jau buvo sureagavusi: hipertenzinės grupės prieširdžių nerviniuose mazguose yra daugiau neuronų, tačiau jie yra mažesni, aksonų skersmuo ir plotas sumažėję, skilveliuose pagausėjęs miokardo nervinis rezginys, kuris, žiurkei suaugant, retėja; glijos ląstelės nerviniuose mazguose ir nervuose turi ultrastruktūrinių pakitimų, būdingų neuropatijai. Taigi užfiksavome adrenerginės sistemos suvešėjimo, vadinamojo spurto, intrakardinės nervų sistemos čiuopiamus morfologinius pokyčius jau prehipertenziniu laikotarpiu.

4.2.1. Intrakardiniai mazgų pokyčiai

Visų tirtų žiurkių grupių intrakardiniai mazgai, tarpusavyje susijungę smulkiais nervais ir nerviniais pluoštais, sudarė žiedo formos rezginį aplink plautinių venų įėjimą ir buvo panašūs į anksčiau tirtų Sprague-Dawley [123] ir Wistar žiurkių [124]. Stebėta didelė mazgų plotų įvairovė – nuo labai mažų iki labai didelių. Senstant mazgai jungiasi į konglomeratus ir yra sunku juos atskirti. Tokia mazgų dydžių įvairovė lėmė, kad suaugusių ir senų gyvūnų neuronų kūnų skaičius viename mazge statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp SHR ir WKY. Mūsų duomenys rodo, kad suaugusių tiek WKY, tiek SHR žiurkių intrakardinių mazgų ir mazginių neuronų skaičius mažėja. Tačiau 46–60 sav. žiurkių tyrimų rezultatai rodo su amžiumi susijusius pokyčius, dėl kurių akivaizdžiai padidėja neuronų skaičius viename mazge ir senų gyvūnų mazgo plotas, palyginti su suaugusiais (12–18 sav.). Padidėjęs intrakardinių neuronų skaičius senstant buvo aprašytas ir sveikų Wistar žiurkių [124]. Hipertenzijos

sukeltas intrakardinių cholinerginių neuronų skaičiaus padidėjimas kartu su padidėjusiu jaudrumu taip pat buvo aprašytas senų žiurkių SHR [125].

SHR buvo daug mažesni neuronų kūnai, tai lėmė padidėjusį neuronų kūnų tankį senų SHR mazguose, palyginti su to paties amžiaus WKY. Bendra tendencija, pastebėta mūsų ir Ashton ir kt. [125], sutampa su ankstesniais Wistar žiurkių tyrimais – suaugusių žiurkių širdyse (8–12 savaičių) buvo mažiau intrakardinių neuronų, palyginti su jaunomis (3–4 savaičių) žiurkėmis, o senų gyvūnų (> 48 savaičių) širdyse buvo daugiausia intrakardinių neuronų, palyginti su kitomis amžiaus grupėmis [124]. Kartu tai gali atspindėti intrakardinės nervų sistemos plastiškumą ir dinamiškumą per visą ontogenezę.

Senstant kai kurios savybės kinta panašiai tiek SHR, tiek WKY, pvz., tirtų suaugusių gyvūnų intrakardinių neuronų dydis proporcingai mažėja, palyginti su jaunų individų širdimis, tai patvirtina ir kiti autoriai [81, 83, 114, 116, 124]. Svarbu, kad hipertenzinėje grupėje vykstantys nuo amžiaus priklausantys pokyčiai yra ryškesni, o tai rodo hipertenzijos poveikį intrakardiniam nerviniam rezginiui.

Šios išvados patvirtina ankstesnius rezultatus, kad hipertenzija gali turėti įtakos intrakardinių neuronų struktūriniais pokyčiams, kaip buvo numanoma analizuojant hipertrofavusius žmonių, šunų, kiaulių ir triušių širdžių po miokardo išemijos arba eksperimentiškai sukulto širdies nepakankamumo sindromo intrakardinius neuronus [126–128]. Dėl lėtinio ir sunkaus hipertenzinio fenotipo jau po 6 mėnesių nuo gimimo SHR išsivysto kompensacinė skilvelių hipertrofija, susijusi su padidėjusiu širdies krūviu [126]. Todėl tyrėme, ar dėl šios priežasties nepasikeis mazginių neuronų kūnų dydis. Nustatėme, kad neuronų kūnų plotas SHR buvo mažesnis, palyginti su WKY visose amžiaus grupėse – jaunų, suaugusiųjų, senų ir labai senų. Verta paminėti, kad senų gyvūnų neuronų kūnų dydžių skirtumas buvo didesnis, kai SHR neuronai buvo 19 proc. mažesni nei WKY, o suaugusiųjų grupėje jie buvo tik 6 proc. mažesni [85]. Manoma, kad neurono dydis turi reikšmingų pasekmių neurono jaudrumui ir veikimo potencialams susidaryti, todėl mažesni neuronai yra labiau sužadinami [129,130]. Naujausi fiziologiniai atradimai – sergant arterine hipertenzija padidėjęs intrakardinių neuronų jaudrumas [83] gali atsirasti dėl neuronų kūno sumažėjimo – buvo įrodyti šiame tyrime [126]. Tačiau didesni intrakardinių neuronų kūnų plotai buvo aptikti hipertrofuotose SHR širdyse, sergančiose širdies nepakankamumu, palyginti su normotenzinių WKY žiurkių neuronais [126]. Taip gali būti dėl skirtingo širdies nepakankamumo klinikinių požymių atsiradimo: remdamiesi širdies echoskopijos duomenimis fiksavome širdies skilvelių hipertrofijos ir dilatacijos požymius, tačiau išstūmio frakcija atitiko normos ribas. Tai sufleruoja, kad mūsų tirtos senos bei labai senos žiurkės galėjo sirgti išsaugotos kairiojo skilvelio išstūmio frakcijos širdies nepakankamumu (angl. *heart failure with preserved*

ejection fraction – HFpEF) [131]. Tačiau tyrimuose, pvz., Singh ir kt. [126], kuriame taip pat tirtos žiurkės, šunys ir žmonės – širdies nepakankamumas galėjo būti dekompensuotas ir turintis sumažėjusią kairiojo skilvelio išstūmio frakciją. Pažymėtina, kad pastarajame darbe tiriamųjų žiurkių, šunų ir žmonių širdies nepakankamumo priežastys buvo skirtingos [126]. Galima daryti prielaidą, kad intrakardinės nervų sistemos atsakui į ligos vystymąsi labai svarbu, kokia yra ligos stadija – ar jau išseikvotos autoreguliacijos galimybės. Taigi morfologiniai pokyčiai (pvz., neuronų kūnų dydis) gali būti kardinaliai priešingi, atsižvelgiant į tai, ar jau peržengta riba, kai autonominė nervų sistema geba palaikyti autoreguliaciją, ar jau vyksta dekompensacija.

Neuronų kūnų dydžio svarba – nustatyta, kad hipertrofavę neuronai buvo sunkiau sužadinami dėl padidėjusio membranų kanalų pralaidumo ir pačios membranos ploto [132, 133]. Tai lėmė, kad sužadinimo slenksčiui pasiekti jiems reikėjo didesnės įtampos signal [132, 133]. Todėl neuronų hipertrofija širdies mazguose juos padarytų sunkiau sujaudinamus ir paaiškintų parasimpatinės inervacijos abstinenciją, susijusią su širdies nepakankamumu.

Mūsų tyrimas patvirtino, kad visuose tirtų gyvūnų intrakardiniuose mazguose vyrauja cholinerginiai neuronų kūnai, tačiau triušių, kiaulių [134–136], žmonių, beždžionių [137, 138], pelės [139] širdyse šalia jų buvo rasta ir nitregerinių, adrenergerinių, bifenotipinių cholinerginių / nitrierginių bei cholinerginių / adrenergerinių neuronų kūnų. Tačiau būtent žiurkės intrakardinius mazgus sudarė beveik tik cholinerginiai neuronai, tiesa, dar buvo aptikta ir bifenotipinių cholinerginių / nitrierginių neuronų kūnų. Intrakardinių nervinių skaidulų, imunoreaktyvių adrenergeriniams ir CGRP žymenims, jau buvo nustatyta [127], tačiau žiurkės širdyje nepavyko aptikti bifenotipinių cholinerginių / adrenergerinių ir bifenotipinių cholinerginių / CGRP+ neuronų kūnų. Pažymėtina, kad mūsų tyrime, kaip ir Ashton ir kt. [83], SHR ir kontrolinių žiurkių širdyse buvo nustatytos pavienės adrenerginės ir bifenotipinės cholinerginės / adrenerginės neuronų kūno. Įdomu, ši neuroanatominė žiurkės širdies savybė iš esmės skiriasi nuo pelių intrakardinių mazgų, kuriuose adrenerginės ir bifenotipinės cholinerginės / adrenerginės neuronų kūno sudaro didelę intrakardinių neuronų dalį [139, 140]. Tiek šio tyrimo išvados, tiek Ashton ir kt. [83] pastebėjimai parodė šiek tiek daugiau adrenergerinių ląstelių SHR mazguose, tačiau sporadiniai adrenergerinių neuronų kūnai nėra svarus hipertenzinės remodeliavimosi širdies mazguose įrodymas.

Daugelis autorių pastebėjo, kad intrakardiniuose mazguose vyrauja cholinerginės sinapsės. Padidėjęs cholinerginių sinapsių skaičius SHR žiurkių intrakardiniuose mazguose, aprašytas Ashton ir kt. [83], buvo stebėtas ir mūsų preparatuose, nors cholinerginių nervinių galūnių su varikozėmis kiekybiškai nevertinome. Nėra iki galo sutarta dėl adrenergerinių nervinių galūnių su varikozėmis, kurios gali būti laikomos galimomis sinapsėmis, turinčiomis

intrakardinių neuronų. Pelių ir kiaulių širdžių adrenerginiai aksonai širdies mazguose pereina pernašos būdu, priešingai nei cholinerginiai aksonai, kurie dažniausiai turi varikozes, apsieja neuronų kūnus mazguose [139, 141]. Tačiau adrenerginiai aksonai su varikozėmis buvo anksčiau aprašyti žiurkių [127] ir jūrų kiaulyčių [142]. Dabartiniame tyrime daroma išvada, kad dalis adrenerginių aksonų kerta intrakardinius mazgus – nėra jokios užuominos į sinapsinius kontaktus su neuronais, tačiau kita dalis adrenerginių aksonų turėjo varikozių ir jų morfologija panaši į adrenerginio aksono sinapsę su cholinerginiu neuronu. Pažymėtina, kad adrenerginių nervinių skaidulų kiekis intrakardiniuose mazguose tiek suaugusios, tiek senos SHR žiurkės buvo didesnis, palyginti su atitinkamo amžiaus WKY žiurke.

Papildomas katecholaminų šaltinis širdyje yra SIF ląstelės. Dažnai naudojamas sinonimas „chromafininės ląstelės“, nes tiek širdyje nustatomų, tiek simpatinių mazgų SIF ląstelių ultrastruktūra identiška antinksčių chromafininėms ląstelėms [143]. Manoma, kad SIF ląstelės galėtų atlikti interneuronų arba paraneuronų funkciją [144, 145]. Taip pat aprašoma ir endokrininė funkcija [146]. Morfologinis SIF ląstelių panašumas į I tipo mieginio kūnelio (lot. *glomus caroticum*) ląsteles [147] ir intensyvus nuo kalcio / kalmodulino priklausomas baltymų kinazės imunoreaktyvumas, nustatytas žiurkės viršutinio kaklinio mazgo SIF ląstelėse, sudaro prielaidą, kad kai kurios SIF ląstelės atlieka chemorecepcijos funkciją, panašiai kaip mieginio kūnelio ląstelės [148]. Neseniai buvo įrodyta, kad spontaniinę hipertenziją turinčių žiurkių mieginis kūnelis yra toniškai aktyvinamas ir jautrinamas [149]. Mūsų tyrime nustatytas visų SHR amžiaus grupių padidėjęs bendras SIF telkinių plotas intrakardiniuose mazguose, tai pat kaip ir Ashton ir kt. tirtų suaugusių SHR žiurkių mazguose [83], galbūt prisideda prie prieširdinės aritmijos atsiradimo sergant hipertenzija.

Daugiausia kalcitonino geno peptido (CGRP) nustatoma juntamųjų neuronų kūnuose ir po organizmą išplintančiose juntamosiose nervinėse skaidulose, ir ypač – intensyviai palei kraujagyslinį tinklą. CGRP atlieka dvigubą funkciją – jutiminę (aferentinę) bei efektorinę (eferentinę) [150]. Širdyje CGRP+ nervinės skaidulos plačiai pasklidusios aplink vainikines arterijas; miokarde, laidžiojoje sistemoje – veikia chronotropiškai ir inotropiškai [151], taip pat ir – kardioprotektiškai [137, 152–155]. CGRP vazodilatacinis poveikis visuotinai pripažįstamas, tačiau nėra pasiektas sutarimas dėl jo vaidmens AH patogenezėje. Žmonėms, sergantiems AH, CGRP kiekis kraujyje, skirtingų autorių duomenimis, buvo rastas padidėjęs, nepakitęs bei sumažėjęs [153]. Neatsižvelgiant į duomenų įvairovę, sutariama, kad CGRP atlieka apsauginę miokardo funkciją, kai AH prasideda ir progresuoja [137, 155]. CGRP+ neuronų kūnų nebuvo rasta mūsų ir kitų autorių tirtuose intrakardiniuose mazguose [137]. Tačiau CGRP+ skaidulos mazguose buvo dvejopos. Vienų buvo

mažai, jos plonos – tarsi pernašos būdu kertančios mazgą. Kitos, daug stambesnės, formuojančios varikozes ir tarsi apsupančios neuronų kūnus, kurios ir lėmė bendrą CGRP kiekį mazge. Šių varikozių artimumas mazginiams neuronams leidžia daryti prielaidą, kad jos su pastaraisiais sudaro sinapses. Tačiau šiai prielaidai patvirtinti reikalingi detalesni tyrimai. Pažymėtina, kad visų amžiaus grupių SHR nerviniuose širdies mazguose buvo nustatytas didesnis CGRP kiekis, palyginti su WKY. Ypač didelis CGRP kiekio skirtumas buvo nustatytas senų hipertenzinių gyvūnų intrakardiniuose mazguose, palyginti su normotenziniais. Gali būti, kad sumažėjęs CGRP kiekis prisideda prie AH kaip vienas iš sukeliamųjų veiksnių, panašūs duomenys gauti ir kituose SHR tyrimuose [154, 156]. Amžėjančiose SHR stebimas didėjantis CGRP kiekis, tai galėtų būti paaiškinama kaip kompensacinis atsakas į nuolatinę užsitęsusią negydomą AH.

4.2.2. Prieširdžių ir skilvelių nervų morfologiniai ir fenotipiniai pokyčiai

Atlikta daug tyrimų apie arterinės hipertenzijos poveikį įvairioms organizmo struktūroms, tačiau širdies vidusieniniai nervai šiuo požiūriu mažai tyrinėti. Įvairūs mūsų tyrime nustatyti intrakardinių nervų subtilūs pokyčiai gali reikšti neigiamą arterinės hipertenzijos poveikį. Pavyzdžiui, skilvelinių epikardinių nervų skersiniuose pjūviuose fiksuotas PGP 9,5+ žymeniu dažytų nervinių skaidulų nykimas metams bėgant, bet jis buvo statistškai reikšmingai didesnis SHR grupėje, palyginti su to paties amžiaus WKY. Duomenys apie jaunų SHR skilvelių išsklotinėse matuotų epikardinių nervų skersmens padidėjimą tarsi prieštarauja aptartam nervinių skaidulų nykimui. Tačiau, turint omenyje anksčiau aprašytą hipertenzijos sukeltą miokardo [2–4] ir kai kurių nervų [157, 158] fibrozę, galima daryti prielaidą, kad SHR širdies epikardinių nervų storėjimas taip pat yra fibrozės padarinys [60]. Labai senų žiurkių beveik dvigubai didesni epikardinių nervų skersmenys gali būti paaiškinti tuo, kad šių vyriausių žiurkių prieširdiniai nervai buvo neįprastai padengti jungiamuoju, todėl plonesni nervai tapo nematomi tyrėjo akimis ir pamatuoti buvo tik patys stambiausi egzemplioriai. Priešingai, skilveliniai epikardiniai nervai, žiurkėms senstant, storėjo tolygiai.

Cholinerginės skaidulos vidutiniškai sudarė panašią matuoto nervo ploto dalį, jų kiekis (kelių procentų skirtumu) bangavo per visą gyvenimą. Suaugusių žiurkių prieširdžiuose pastebėtas sąlyginis cholinerginių skaidulų kiekio pagausėjimas, o skilveliuose – palaiptnis mažėjimas, tendencingai greitesnis SHR grupėje.

Svarbu pabrėžti, kad prieširdžiuose buvo nustatyta ir tik adrenerginių, ir tik cholinerginių nervų, kurie galbūt gali būti dar nespėję persijungti ekstra-

kardiniai nervai. Tačiau skilvelius pasiekdavo jau vien tik mišrūs nervai, kurių sudėtis buvo gana tolygi. Toks nervų fenotipų pasiskirstymas galėjo lemti, kad TH⁺ nervinių skaidulų plotas epikardiniuose nervuose buvo didesnis skilveliuose nei prieširdžiuose visose grupėse. Galima vertinti, kad prieširdžiuose dalis cholinerginių nervų baigiasi mazguose, na o adrenerginių nervų pagrindinis taikynys yra skilvelių miokardas, todėl čia ir gausiau adrenerginių skaidulų. Jaunų SHR žiurkių tiek prieširdžių, tiek skilvelių nervai turi reikšmingai daugiau adrenerginių skaidulų nei kontrolė, vėliau šis skirtumas išnyksta ir vėl atsikartoja labai senuose gyvūnuose. Įdomus aspektas – nenustatoma senų gyvūnų šių skaidulų procentinio mažėjimo, tai buvo būdinga cholinerginėms. Svarbu, kad šis pagausėjimas ne tik kad neapsaugo, bet galbūt ir lemia SHR trumpesnį gyvenimą, nes reikia daug širdies ir kraujagyslių išteklių palaikyti sunkesniai širdies darbui.

CGRP⁺ nervinių skaidulų kiekis nervuose itin nedidelis, kolegų [18, 127] ir mūsų duomenimis. CGRP⁺ skaidulų yra reikšmingai daugiau SHR nervuose, taip pat, kaip ir mazguose bei miokarde, už to paties amžiaus kontrolinių gyvūnų. Tai rodo CGRP vaidmenį arterinės hipertenzijos patogenezei. Tačiau, kaip vyksta intrakardinių mazgų moduliacija [18], ar paveikiama miokardo mikrocirkuliacija [159] – reikia tolesnių tyrimų.

Apskritai degeneracinius pokyčius, vykstančius SHR nervuose, rodo prieširdžių ir skilvelių epikardinių nervų atrofija dėl nemielininių aksonų plonėjimo ir beveik dvigubai sumažėjusio mielininių nervinių skaidulų tankumo. Nustatyta, kad SHR aortos nusileidžiančiajame nerve mažėja aksonų dydis ir jų skaičius nemielininėse nervinėse skaidulose [160]. Be to, mielininių nervinių skaidulų skaičius ir tankis buvo mažesni diafragmos [161] ir blauzdiniame nervuose [162]. Tačiau Gregory su bendraautorais nustatė nekintamą mielininių nervinių skaidulų tankumą SHR blauzdiniame ir sėdmeniniame nervuose [163] ir SHR aortos nusileidžiančiajame nerve [164].

Ankstesni duomenys apie hipertenzijos sukeltus mielininių aksonų ir skaidulų ploto pokyčius bei mielino apvalkalo storį yra gana prieštaringi [160–164]. SHR mielininių aksonų plotas sumažėjo blauzdiniame ir sėdmeniniame nervuose [163], aortos nusileidžiančiajame nerve [164], blauzdiniuose nervuose [162], tačiau kitų autorių teigimu, jie buvo padidėję blauzdiniame ir diafragmos nervuose [161, 165]. Mūsų atlikti epikardinių nervų matavimai rodo padidėjusį SHR mielininių aksonų plotą, kuris buvo ryškesnis skilvelių nervuose.

Šiame tyrime nustatytos neįprastos mielininių nervų skaidulų ultrastruktūrinės aberacijos WKY ir SHR intrakardiniuose nervuose. Pažymėtina, kad suaugusių gyvūnų, palyginti su senais, buvo pakitusi mažesnė skaidulų dalis, iš kitos pusės, abiejose amžiaus grupėse – suaugusių ir senų žiurkių daugiau skaidulų pakito SHR nervuose. Šiame tyrime nustatytos intrakardinių ner-

vų mielininio dangalo aberacijos taip pat buvo aprašytos dėl paveldimų demielinizuojančių neuropatijų. Pavyzdžiui, „tomakulai“ ir perteklinio mielino klostės yra ryškūs neuropatologiniai įvairių paveldimų demielinizuojančių neuropatijų bruožai. Manoma, kad nereguliuojamas fosfoinozotido kiekis turi lemiamą įtaką tomakulinių neuropatijų patologijai [166]. Demielinizacija, sergant paveldima neuropatija ir Charcot-Marie-Tooth ligomis, daugiausia susijusi su periferinio mielino baltymo 22 genų anomalijomis [167, 168]. Distrofinių *Bar Harbor* pelių bendrajame šeiviniame nerve nustatyta patologinės mielinizacijos ypatumų, pvz., perteklinės mielino kilpos, plonai mielinizuoti aksonai, keletas mielinizuotų aksonų, kuriuos apsupa Švano ląstelės tik su mielinu, bet be aksono [169]. Autoriai šias išvadas interpretuoja kaip Švano ląstelių metabolinio sutrikimo požymį. Be to, buvo pranešta apie vienos Švano ląstelės mielino susidarymą aplink du skirtingo skersmens aksonus 45 metų vyro, sergančio dauginiu (multipleksiniu) mononeuritu, nerve [170]. Naujausiame tyrime buvo įrodyta, kad *Fbxw7*, E3 ubikvitino ligazės komponento praradimas padidina Švano ląstelių mielinizacijos potencialą, nes Švano ląstelės gamina storesnius mielino apvalkalus ir kartais atrodo, kad mielinizuoja kelis aksonus [171]. Be to, nustatyta, kad mielino anomalijos prie įvairių neuropatijų, įskaitant perteklinio mielino klostes ir „tomakulus“, buvo susijusios su Akt aktyvacija, kuri, atrodo, pagreitina aksonų mielinizaciją, bet nepaveikia nemielininių skaidulų Švano ląstelių [172]. Įvairios demielinizuojančios neuropatijos taip pat yra susijusios su tomakulų susidarymu žmogaus nervo biopsijose [173]. Daugelis anksčiau minėtų anomalijų taip pat nustatytos tirtuose intrakardiniuose nervuose rodo, kad neuropatiniai procesai širdyje gali būti nulemti lėtinio padidėjusio arterinio kraujospūdžio [166]. Anksčiau buvo pranešta apie hipertenzijos sukeltą neuropatiją, susijusią su blauzdiniu ir sėdmeniniu nervais [163, 165]. Tačiau išsami ultrastruktūrinė analizė, atskleidžianti mielininių nervinių skaidulų neuropatinius pokyčius, buvo atlikta tik mūsų tyrime. Nepavyko literatūroje rasti atitikmenų, kai po mielino sluoksniu įsiterpia endoneuriumas ir atskiria mielina nuo jo viduje esančios mielininės ar nemielininės skaidulos; ar dvigubas mielino sluoksniu, lyg subliuškęs mieliną apgaubia greta esančią mielininę ar nemielininę nervines skaidulas. Pastrosios mielino aberacijos kol kas aprašytos tik mūsų tirtų intrakardinių nervų, todėl galima daryti prielaidą, kad širdies nervai jautriau ar specifiškiau reaguoja į hipertenzijos sukeltą poveikį. Kita vertus, žinoma, kad remielinizacija yra beveik visų demielinizuojančių patologijų (klinikinių ir eksperimentinių) požymis, neatsižvelgiant į etiologiją [174]. Šio tyrimo metu taip pat buvo pastebėti kai kurie tirtų nervų remielinizacijos požymiai, pavyzdžiui, plonai mielinizuotos nervinės skaidulos, turinčios plonus aksonus, kartais apsuptos kelių Švano ląstelių, tačiau jų nebuvo daug. Pažymėtina, kad mielininės skaidulos, turinčios Švano ląstelių branduolį mielino dangalo

viduje, nustatytos intrakardiniuose nervuose, anksčiau buvo įvardytos kaip klaidingos remielinizacijos padarinys [167]. Reikia pažymėti, kad neuropatiniai mielino dangalo pokyčiai, aprašyti SHR epikardiniuose nervuose, buvo pastebėti ir WKY žiurkių nervuose, tačiau mažesniais kiekiais.

Glijos ląstelės labai svarbios nervų sistemos funkcionavimui, nes jos aktyviai formuoja sinapsių savybes, reguliuoja neuronų uždegimą ir yra būtinos medžiagų apykaitai palaikyti, jonų homeostazei ir neurovaskuliniam moduliavimui [175–177]. Nustatyta, kad glija atlieka aktyvią funkciją moduliuojant sužadavimo grandines enterinėje nervų sistemoje [7], o naujausi įrodymai išryškino esminę enterinių glijos ląstelių vaidmenį reguliuojant žarnyno homeostazei ir jų reikšmę virškinimo ir nevirškinimo ligoms [178]. Priešingai, mažai žinoma apie glijos (Švano ir palydovinių) ląstelių vaidmenį intrakardinėje nervų sistemoje [179]. Todėl mūsų intrakardinių glijos ląstelių rezultatai gali būti aptariami tik atsižvelgiant į kitų organų autonominius rezginius.

Gerai žinoma, kad Švano ląstelės retai dalijasi sveiko suaugusiojo gyvenimo metu. Švano ląstelių proliferacijos greitis suaugusiesiems pastebimai padidėja įvairiomis eksperimentinėmis sąlygomis (pvz., po aksonų pjūvio ir po tam tikrų cheminių medžiagų skyrimo) arba kai kuriomis pataloginėmis sąlygomis [180]. Įdomu, kad centriolės Švano ląstelėse buvo pastebėtos daugeliu atvejų mūsų tyrime, o tai rodo padidėjusį šios ląstelių populiacijos mitozinį aktyvumą, susijusį su arterine hipertenzija. Buvo pasiūlyta, kad palydovinės ir Švano ląsteles gali suaktyvinti uždegiminiai atsakai, palaikydami aktyvesnį šių ląstelių vaidmenį, o ne tik kaip neuronų paramos tinklą [181]. Taigi mūsų rastos daugiasluoksnės ir poringos palydovinės ląstelės širdies mazguose gali rodyti aktyvintą būseną, kurią gali sukelti uždegiminis ir pataloginis procesai. Be to, mielino pokyčiai, kaip ir pastebėti šiame tyrime, anksčiau buvo aprašyti įvairių neuropatijų kontekste [169, 170, 172, 173, 182].

G santykis, t. y. vidinio aksono skersmens ir bendro skaidulos skersmens santykis, yra plačiai vartojamas kaip funkcinis ir struktūrinis optimalios aksono mielinizacijos indeksas. Centrinės nervų sistemos skaidulų G santykis yra 0,72–0,81, o periferinių aksonų atveju jis gali siekti 0,6, tai rodo storesnį mielino sluoksnį [183]. Yra žinoma, kad kai kurios periferinių aksonų G santykio vertės yra mažesnės nei centrinio aksono G santykio vertės [170], nors pagrindinis mechanizmas tebėra mažai suprantamas. Kaip buvo minėta, didelė dalis mielininių skaidulų buvo neintaktiškos, todėl morfometriniai matavimai buvo atlikti tik intaktiškų, t. y. kai mielinas buvo priglundęs prie aksono, skaidulų. Sveikų mielininių skaidulų procentas buvo didesnis suaugusių gyvūnų grupėse, mažiau – senų gyvūnų nervuose. Senų SHR nervuose sveikų, tinkamų morfometriniais matavimams mielininių skaidulų buvo mažiausiai – tik 55 proc. Todėl šio tyrimo mielininių skaidulų G santykis neatspindi viso masto pokyčių, o apibūdina tik likusias sveikas mielinines skaidulas.

Mūsų duomenys rodo, kad WKY žiurkių G santykis buvo gana didelis ($> 0,7$), o SHR širdyse, nors nedaug, bet statistiškai reikšmingai mažesnis. Šie duomenys rodo sustorėjusį mielino apvaskalą. Žmonių periferinių nervų G santykio vertės, mažesnės nei 0,4, rodo nervines skaidulas, turinčias patologiškinį mielino apvaskalo sustorėjimą, o didesnės nei 0,7 rodo arba regeneruotas skaidulas, turinčias plonesnį mielino apvaskalą, arba demielinizuotas nervų skaidulas [184]. Mūsų duomenimis, joks kitas tyrimas nebuvo atliktas apie žiurkių širdies nervų skaidulų G santykį, todėl neįmanoma padaryti jokių lyginamųjų išvadų.

WKY žiurkės buvo klasifikuojamos kaip normotenziniai gyvūnai, tačiau WKY žiurkių kraujospūdis yra artimas hipertenzijos ribai, o sistolinio kraujospūdžio vertės yra didesnės nei Wistar žiurkių. Lėtinis kraujospūdžio padidėjimas gali sukelti tokias pasekmes kaip kairiojo skilvelio koncentrinė hipertrofija, arterijų sukietėjimas, insultas, miokardo infarktas ir širdies nepakankamumas [61], todėl yra reali galimybė mielininėse WKY nervinėse skaidulose, panašiai kaip SHR intrakardiniuose nervuose, vystytis struktūriniais pakitimams [61]. Tad dabartiniai duomenys apie daugybę neuropatinių ultrastruktūrinių intrakardinių nervų pakitimų kelia naujų abejonių dėl WKY žiurkių tinkamumo kaip kontrolės aukso standarto SHR tyrimams, o tolesni tyrimai yra labai svarbūs, norint suprasti arterinės hipertenzijos sukeltus širdies nervinio rezginio struktūrinius pokyčius. Taigi daroma prielaida, kad Wistar žiurkės turėtų būti laikomos tinkamesnėmis būti normotenzine kontrole SHR žiurkėms nei WKY žiurkės atliekant eksperimentus, kuriais siekiama ištirti kraujospūdžio poveikį intrakardinių nervų struktūrai.

4.2.3. Miokardo inervacijos pokyčiai

Miokardo nervinių skaidulų rezginio pokyčiai itin priklausė nuo tiriamos vietos. Pavyzdžiui, prieširdžiuose nepavyko išvelgti aiškių nuo amžiaus priklausančių ar arterinės hipertenzijos poveikio tendencijų, tačiau skilveliuose išsiskyrė labai aiški tendencija – tiek SHR, tiek WKY dešinysis skilvelis turi tankesnę inervaciją nei kairysis. Šis fenomenas ryškesnis SHR grupėje, galima priežastis – miocitai hipertrofuoja ir hiperplazuoja labiau kairiajame skilvelyje [29, 185, 186] ir nervinių skaidulų tinklas nepaveja šio proceso.

Bendras miokardo nervinių skaidulų tankio sumažėjimas kairiajame skilvelyje rodo ir tiriamos SHR žiurkės degeneracinius pokyčius. Vidutinis miokardo nervinių skaidulų tankio skirtumas tarp WKY ir SHR buvo ryškesnis prieširdžiuose nei skilveliuose. Labiausiai sumažėjo senų individų tankiausia sinusinio mazgo srities inervacija, daugiau – nei per pusę, trečdaliu – prieširdžių miokardo ir mažiausiai – skilvelių miokardo. Tačiau kai kuriose įvertintose prieširdžių ir skilvelių sienelių srityse miokardo nervų tinklo tankis

padidėjo. Nervinių skaidulų tankio kintamumas tam tikrose pavienėse širdies srityse patvirtina idėjas apie autonominės pusiausvyros sutrikimą arba regioninę denervaciją ir hiperinervaciją, atsirandančią hipertenzija sergančių žiurkių širdyse senstant [187, 188]. Kartu tai rodo, kad autonominis aktyvinimas pasireiškia: (a) jauno amžiaus tarpsniu; (b) labiau jaunesnio nei vyresnio amžiaus tarpsniu ir (c) iki arterinės hipertenzijos pasireiškimo. Kitas skirtumas, kurį reikia apsvarstyti tarp mūsų ir Adamso ir kt. [60] radinių – mes įvertinome skaidulų tankį tiek dešiniajame, tiek kairiajame skilvelyje ir nustatėme, kad dešinysis skilvelis turi didesnę inervacijos laipsnį. Panašiai Kondo su bendrautoriais [189] ištyrė miokardo noradrenerginių nervų tankį ir nustatė padidėjusią dešiniojo skilvelio inervaciją 30 ir 90 dienų amžiaus spontaniinę hipertenziją turinčių žiurkių, kurioms nustatytas polinkis į insultą [189]. Šis rezultatas gali būti paaiškintas suaugusių gyvūnų miokardo hipertrofija, kuri labiau pažeidžia kairįjį skilvelį ir nebūna inervacijos padidėjimo. Tačiau skirtinga jaunų gyvūnų kairiojo ir dešiniojo skilvelių inervacija lieka atviras klausimas.

Remiantis mūsų duomenimis, adrenerginės nervinės struktūros stambėjo bei tankėjo suaugusių SHR žiurkių darbiniam bei laidžiajam miokarde – tai patvirtina adrenerginių nervinių komponentą kaip AH vystymosi veiksnį [119]. Taip pat nustatytas senų SHR žiurkių adrenerginių struktūrų nykimas šiek tiek nesutampa su teiginiu, kad adrenerginė sistema lemia ne tik AH pradžią, bet ir tolesnį progresą [119]. Suaugusių SHR padidėjęs tiek adrenerginių, tiek cholinerginių nervinių komponentų kiekis neparemia Kanazawa ir kt. [14] hipotezės apie kompensacinį mechanizmą, kai adrenerginės nervinės skaidulos pakeičiamos cholinerginėmis. Šie skirtumai galėtų būti, nes Kanazawa mokslinė grupė tyrė Dahl druskai jaurias žiurkes, kurių AH kilmė kitokio pobūdžio.

4.3. Tyrimo trūkumai

Dėl techninių galimybių arterinio kraujospūdžio matavimo ir širdies echoskopijos tirtų gyvūnų amžius ne visai tiksliai atitinka morfologinių tyrimų amžiaus grupes. Šie tyrimai daugiau orientaciniai, skirti suprasti kraujospūdžio kitimo tendencijas bei širdies makroskopinius pokyčius gyvūnams senstant.

Neinvazinis arterinio kraujospūdžio matavimas uodegoje uždėjus manžetę, siekiant patvirtinti arba paneigti arterinės hipertenzijos buvimą, dėl techninių kliūčių (dėl smulkumo išorine manžete nepavyko pagauti pulso bangos) neatliktas jauniausiomis žiurkėms. Numatyta remtis žiurkių tiekėjų pateikiamais arterinio kraujospūdžio duomenimis (*Charles River Laboratories, tarpininkas Animalab Baltic SIA*), būtent, jaunoms < 8 sav., žiurkėms, kad joms arterinė hipertenzija dar neišsivysčiusi.

IŠVADOS

1. Spontanine hipertenziją turinčių žiurkių arterinis kraujospūdis buvo padidėjęs viso gyvenimo laikotarpiu bei linkęs didėti gyvūnui senstant. Jaunų ir suaugusių kontrolinės grupės žiurkių kraujospūdis atitiko normos ribas, tačiau senų žiurkių grupėje siekė viršutinę normos ribą, o kai kurių gyvūnų net viršijo.
2. Nustatyta spontanine hipertenziją turinčios žiurkės kairiojo skilvelio hipertrofija ir dilatacija viso gyvenimo laikotarpiu, o kairiojo skilvelio išstūmio frakcija išliko normali. Širdies susitraukimų dažnis kito ir atitiko normos ribas ir turėjo polinkį didėti gyvūnams senstant. Ilgalaikė arterinė hipertenzija pagreitina gyvybinių išteklių eikvojimą, pasireiškiantį svorio mažėjimu ir bendra gyvūno išvaizda.
3. Arterinė hipertenzija lemia ir sustiprina visą amžių vykstančius struktūrinius širdies nervinio rezginio pokyčius: neuronų kūnų mažėjimą, intrakardinių nervų fibrozę, nervinių skaidulų nykimą nervuose ir kairiojo skilvelio miokarde, dešiniojo skilvelio miokardo nervinio rezginio tankėjimą.
4. Nustatyti pagrindinių autonominės nervų sistemos fenotipų pokyčiai:
 - a) cholinerginės inervacijos bėgant metams nykimas, kurį pagreitino arterinė hipertenzija;
 - b) adrenerginė inervacija yra ryškesnė hipertenzinės grupės nerviniame rezginyje, palyginti su kontroline. Šis skirtumas ypač reikšmingas prehipertenzinių ir labai senų žiurkių širdyse;
 - c) visų amžiaus grupių hipertenzinių žiurkių CGRP skaidulų kiekis buvo reikšmingai didesnis visose nervinio rezginio dalyse ir didėjo metams bėgant. CGRP – rečiausio fenotipo – kiekio didėjimas vyko greičiausiai.
5. Nustatyti ultrastruktūriniai intrakardinio nervinio rezginio pokyčiai:
 - a) palydovinių ląstelių suvešėjimas nerviniuose mazguose;
 - b) nemielininių skaidulų nykimas;
 - c) mielinių skaidulų skaičiaus ir tankumo mažėjimas hipertenzinių žiurkių nervuose;
 - d) gausios ir įvairios mielino deformacijos, būdingos demielinizuojančioms neuropatinėms ligoms tiek kontrolinių (Wistar Kyoto veislės), tiek hipertenzinių žiurkių nervuose;
 - e) nustatytos mielinių skaidulų deformacijos buvo reikšmingai gausesnės hipertenzinių gyvūnų nervuose.

PRAKTINĖ REKOMENDACIJA

Remiantis Wistar Kyoto veislės žiurkių padidėjusiu arteriniu spaudimu, iš dalies patologiniais širdies parametrais ir ultrastuktūriniais neuropatiniais pakitimais, keliamas klausimas dėl šios veislės tinkamumo būti hipertenzijos modelio aukso standartu (spontanine hipertenziją turinčios žiurkės, SHR) kontrolei. Rekomenduojame Wistar Kyoto veislės žiurkių nesirinkti senėjimo tyrimams kaip spontanine hipertenzijos žiurkės normotenzinės kontrolės.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

ACh	– acetylcholine
AH	– arterial hypertension
ChAT	– choline acetyltransferase
CGRP	– calcitonin gene-related peptide
HF	– heart failure
PGP9.5	– protein gene product 9.5
SIF cells	– small intensely fluorescent cells
SHR	– spontaneously hypertensive rat
TEM	– transmission electron microscopy
TH	– tirozine hydroxilase
WKY	– Wistar Kyoto rat

1. INTRODUCTION

Persistent arterial hypertension (AH) leads to structural and functional myocardial abnormalities resulting in myocardial ischemia, fibrosis and hypertrophy [5]. AH is considered as the highest risk factor leading to early death from cardiovascular diseases [7]. Tissue inflammation and myocardial fibrosis are the key factors in pathogenesis of AH since cytokines released by the immune system cells activate the renin-angiotensin system (RAS) and play a pivotal role in the development of heart failure (HF) [10, 11]. Acetylcholine (ACh) released from vagal fibers is considered as the major regulating factor in the remodeling of cardiac myocardium following AH since the augmented level of the released ACh due to electrical vagal stimulation and acetylcholinesterase inhibition reduces significantly both the morbidity and the mortality of patients suffering from AH and HF [17]. The decrease in sympathetic tone throughout activation of baroreflexes demonstrates a better survival of animal models suffering from HF and suggests that the enhanced sympathetic signaling plays a critical role in the progression of HF [13, 17]. It is considered that adrenergic neurons in the stellate ganglia and possibly cardiac adrenergic nerve fibers originated from other sympathetic cervical ganglia undergo a cholinergic trans-differentiation during HF because of cytokines released by the failing myocardial cells [8, 190]. Intermittent low-level transcutaneous stimulation of the sensory vagal fibers attenuates

significantly the blood pressure elevation, ameliorates the diastolic function and mitigates the leftventricular inflammation and fibrosis [11]. In spite of fact that the usage of beta-adrenergic receptor blockers in combination with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensinreceptor blockers is considered as a gold standard in treatment of AH and HF, findings from some HF animal models demonstrate that additional electrical stimulation of vagal nerve or application of acetylcholinesterase inhibitors donepezil or piridostigmin together with beta-blocade therapy, may reduce myocardial remodeling and fibrosis, improves cardiac contractility, and prolongs animal survival [11, 16, 17, 117, 191]. It was shown that both the acetylcholinesterase inhibition and the electric vagal nerve stimulation increases the level of ACh which reduces the activity of RAS, acts on lymphocytes lessening the concentration of circulating cytokines and attenuating inflammation, i.e. diminishes key factors of AH and HF pathogenesis [11, 152, 192–194].

Aim of the study: to evaluate the effect of long-term untreated arterial hypertension on the nerve plexus of the heart, using spontaneously hypertensive rats as a model of experimental hypertension of different ages.

Objectives:

1. To evaluate and compare the arterial blood pressure of hypertensive and control rats and its dynamics during life.
2. To evaluate and compare the physiological parameters of the heart of hypertensive and control rats at different age stages.
3. To determine and compare the structural changes in the nerve plexus of the heart of hypertensive and control rats – nerve ganglia, nerve and myocardial innervation – at different age stages.
4. To determine and compare the changes of the main phenotypes of the autonomic nervous system – cholinergic, adrenergic, and peptidergic (CGRP) – in the ganglia, nerves and myocardial nerve plexus of the heart of hypertensive and control rats at different stages of life.
5. To investigate and compare the ultrastructural features of the neural plexus of the heart wall of hypertensive and control rats.

2. MATERIALS AND METHODS

Males of spontaneously hypertensive rats and Wistar–Kyoto rats for control were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Germany). All animals, spontaneously hypertensive and control rats, were divided into four age groups: (1) juvenile (8–9 weeks); (2) adult (12–18 weeks); (3) aged (46–60 weeks); and very old (78–82 weeks). All experiments with laboratory

animals conformed to EU directive 86/609/EEC and were performed under ethical permission No. G2-137.

Methods of the study can be divided into three groups (Figure 2.1). First, hemodynamic studies were performed on living animals to confirm that this would be a suitable material for the AH model. Morphological studies followed, using immunohistochemical and transmission electron microscopy methods.

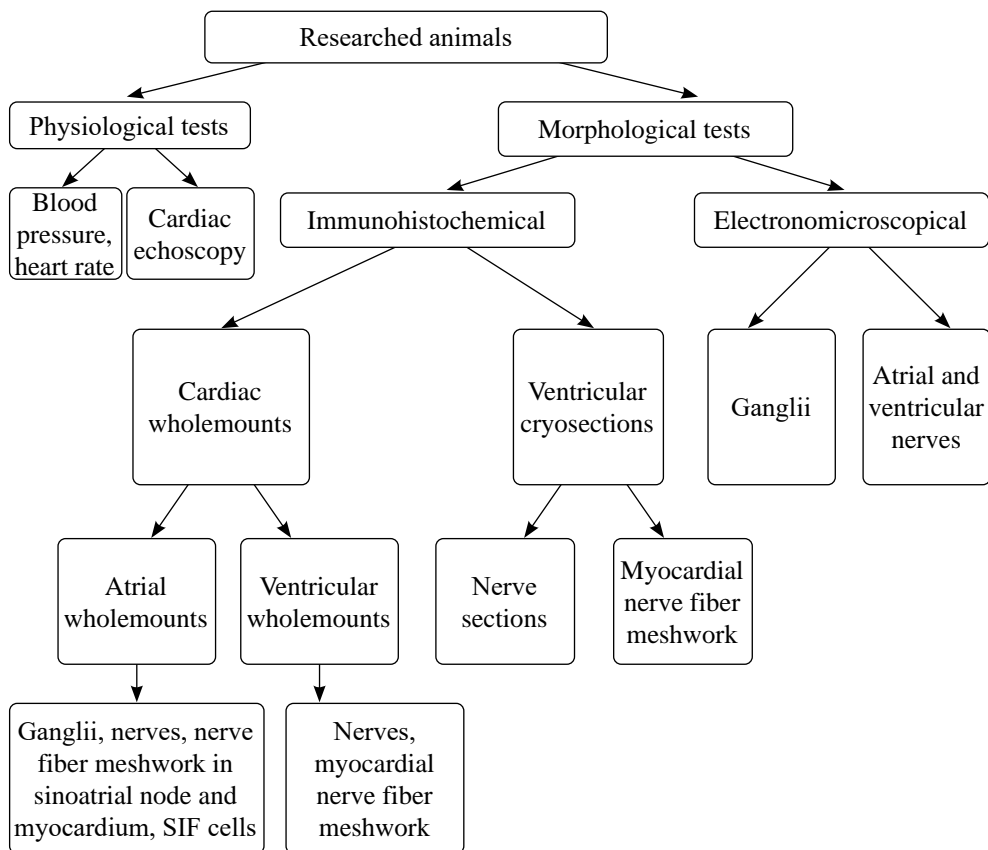


Fig. 2.1. The flowchart of study design.

Physiologic measurements

Before euthanasia, the single-blinded investigators performed the blood pressure measurement, animal weighing and echocardiographic analysis. Arterial blood pressure was measured by the non-invasive tail-cuff method. Heart rate, systolic blood pressure and diastolic blood pressure were measured. Mean arterial blood pressure was calculated by the equation.

Echocardiographic measurements were performed at 19–20th, 29–30th and 46–49th weeks of life. Two-dimensional transthoracic echocardiography and

M-mode were obtained at a scanning speed of 200 mm and adjusted according to heart rate. Cardiac echoscopy was performed following methodology recommended by the American Society of Echocardiography [104] and other researchers [105].

Preparations

Immunohistochemistry

Three types of preparations were made from each of the hearts: (i) whole mounts of atria, (ii) whole mounts of the basal part of ventricles and (iii) transverse serial sections of the middle part of cardiac ventricles. After euthanasia, animals were perfused in situ with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) and prefixed with 4 % paraformaldehyde solution (PFA). Hearts were removed from the chest, fixed in 4 % PFA for 40 min and the atria were separated, flattened.

The whole mount of the basal part of ventricles was prepared. In order to decrease background light for a laser scanning microscope examination, tissues were dehydrated and cleared using a dimethyl sulfoxide and hydrogen peroxide solution, as reported previously [195].

The remaining part of the cardiac ventricles was used for transverse cryosections. Subsequently, whole-mount preparations and cryosections were incubated within a mixture of two or three primary antisera that were diluted and consisted of antibodies (ChAT, TH, CGRP, PGP9.5) for 48–72 h at 4 °C. Afterwards, whole mounts were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS and incubated with a mix of corresponding secondary antisera for 4 h at room temperature with gentle shaking. Lastly, specimens were washed in 0.1 M PBS, mounted, cover-slipped and sealed using clear nail polish.

Preparations for transmission electron microscopy

Next to euthanasia, the rat chest was opened, perfused with PBS in situ and prefixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer via the left cardiac ventricle. Tissue samples of 1 mm³ from the definite sites of atria and ventricles of each heart were prepared according to a protocol of routine transmission electron microscopy, and the samples were orientated in flat embedding molds for transverse sectioning of cardiac ganglionated nerves. Ultrathin sections were analysed at 120 kV with a Tecnai BioTwin Spirit G2 transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Images were taken with a bottom-mounted 16 M-pixel Eagle 4 K TEM CCD camera, employing specific TIA software (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

Microscopy and quantitative analysis

Whole-mount preparations and cryosections were observed using a confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Objectives of 10× (for tile-scan panoramas of all preparation types) and 20× (for measurements of neural structures of atrial and ventricular preparations) were used. For analysis of non-sectioned, longitudinal nerves, images of 20 random nerves from the left dorsal atrium and 20 random nerves from ventricular whole-mount preparation were taken. For analysis of TH and CGRP terminals in the ganglia, 10 random ganglia from each atrial whole-mount preparation were taken. Two random areas were selected for imaging of axon terminals in the left dorsal atrium, sinoatrial area, on the right auricle, and base of the heart near pulmonary veins. All neural structures from the above-mentioned locations were measured in multiple optical sections of the z-stack. The area occupied by neural structures was defined manually to avoid artefacts. The quantity of labelled fluorescent neural structures was calculated using the binary thresholding method available by the software AxioImage (Rel. 4.8., Carl Zeiss AG) and expressed in percentages. The area of all visible atrial ganglia was manually measured using a flattened z-projection.

To evaluate the density of meshwork of myocardial nerve fibres positive for TH and CGRP in the ventricular transverse sections, images of 20–30 randomly selected myocardial areas from each transverse section were taken. The tissue areas with transversely sectioned meshwork of nerve fibres were evaluated on the projection of z-stack images using the above-mentioned method of binary thresholding.

For ultrastructural examination with a transmission electron microscope FEI® BioTwin G2 Spirit (FEI, Eindhoven, The Netherlands), the entire section was viewed sequentially for neural structures—nerves and nerve fibers—with the built-in lateral camera Olympus® MegaViewG2, and after finding the neural structure for morphometric measurements photographed at x4800 and x6800 magnification with the built-in high-resolution camera 16 MP TEM CCD camera Eagle 4K at the bottom using software TIA (FEI, Eindhoven, The Netherlands). The electrograms were analyzed by the program AxioVision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Morphological changes in neuron bodies, synapses, axons and Schwann cells were evaluated in electrograms as well. Quantitative assessment of atrial and ventricular nerves was performed. In non-myelinated nerve fibers: (i) axonal diameter and area are measured; (ii) the number of axons in the fiber is counted; (iii) calculated total area occupied by axons in the nerve; (iv) axons with artifacts are counted. In myelinated nerve fibers: (i) all intact myelinated fibers found in the tested nerve were counted; (ii) measure the area of the

nerve visible in the electrogram, the diameters and areas of the axon and nerve fiber; (iii) the density of axons in the nerve and the G ratio (the ratio between the diameter of the axon and the outer diameter of the myelin sheath) were calculated; (iv) axons and Schwann cells with artifacts are counted.

Image analysis was performed using the free available Fiji software ImageJ [107].

Statistical analysis

Descriptive and analytical statistical methods were used. The normality of data distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov criterion and was considered normally distributed when $p > 0.05$. with 95 % confidence interval. Data in tables and graphs are expressed as arithmetic mean and its standard error. If the compared data samples conformed to the normal distribution, the Student's t-test was applied, and when they did not conform, the Mann-Whitney U test was applied. When comparing more than two data groups, the Kruskal-Wallis test was used for independent samples, and the Friedman test was used for dependent samples. The database was created using Microsoft Office Excel.

3. RESULTS

Characterization of physiological parameters

In hypertensive rats of all age groups (15–17, 45–47, and 52–60 weeks), systolic, mean, and diastolic arterial blood pressures were elevated and increased as the animal aged. Aged (52–60 weeks) WKY rats had systolic blood pressure above 140 mm Hg, which was higher than the upper limit of normal. Heart rate varied within normal limits with a tendency to increase as the animals aged. Cardiac ultrasound examination showed that the control and hypertensive groups were significantly different in the 20-week adult group. The parameters of the left ventricle differed the most. Left ventricular hypertrophy of hypertensive rats was statistically significant. At 60 weeks in the SHR group, compared to age-matched WKY, the left ventricular cavity was significantly increased.

Morphology of ganglia and neurons

In all studied hearts and age groups, the cardiac ganglia are located in the hilum of the heart, the largest ganglia formed well-defined fields of nerve ganglia located in the anterior superior left atrium (Figure 3.1). In contrast, there were no ganglia in the ventricles.

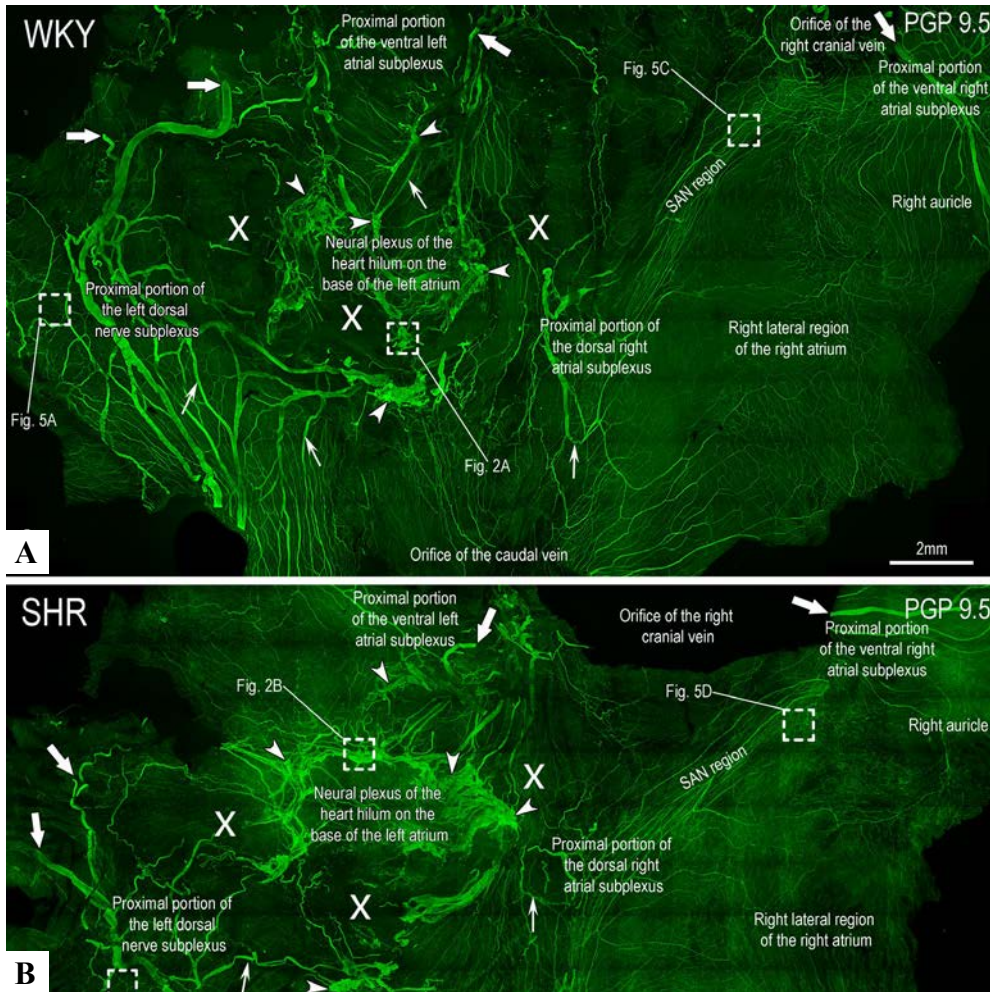


Fig. 3.1. Laser-scanning (confocal) microphotographs to illustrate a general view of morphological patterns of intracardiac ganglionated nerve plexus of the SHR atria of 8 (A) and 14 week (B) old animals.

The general views of whole mounts of the rat atria were assembled with the aid of software ZEN 2010B SP1 from 108 images displaying neural structures immunochemically labeled for the antigen PGP9.5. Note, there are decreased ganglionic clusters in the aged (panel B) compared to the young rats (panel A). White arrows indicate some epicardiac nerves, arrowheads point to some ganglia, and thick arrows point to preganglionated nerves, which enter the heart through the heart hilum at the left cranial vein. Abbreviations: LPV – left pulmonary vein, MPV – middle pulmonary vein, RPV – right pulmonary vein.

In young SHR, the amount and area of ganglia were significantly higher compared to age-matched WKY control rats (Table 3.1), which resulted in a significantly higher number of neuronal bodies per ganglia. This difference

was no longer present in the ganglia of adult and old rats. The number of neurons per ganglia was slightly reduced in WKY adults but significantly reduced (68 %) in SHR adults compared to young (Table 3.1). The number of neurons in old animals did not differ. These parameters reach a peak in the group of old rats and decrease in the group of very old rats.

Table 3.1. Morphometry of ganglia comparison between age-matched WKY and SHR groups. The ganglion number in the very old group presented as min-max values; otherwise – mean (standard error)

Parameter	Marker	Juvenile		Adult		Old		Very old	
		WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Ganglion number	PGP9.5	29.5	34.8	23.3	22.5	27	23	30–60	17–77
Ganglion area, μm^2		52349	70973.1	45097	43895.8	182749	266868	60400	56286
Neuron area, μm^2		643	581*	532	502*	734	596*	706	623*
Neuronal number in ganglion		52	94*	33	29	115	171	69	61
NF in ganglia, %	TH	2.063	1.46*	1.042	1.59*	1.43	1.58	-	-
SIF total area, mm^2		72181	79206	21594	45852	90326	94632	40380	57470
SIF area /0.1 mm^2		3080	4016	1439	3150	3257	4296	1486	1718
NF in ganglia	CGRP	3.15	3.47	1.99	2.12	2.21	3.66*		

Abbreviations: CGRP, immunoreactive for calcitonin gene-related peptide; NF, nerve fiber; PGP9.5, immunoreactive for protein gene product 9.5; SHR, spontaneously hypertensive rats; SIF, small intensely fluorescent cells; TH, immunoreactive for tyrosine hydroxylase; WKY, Wistar–Kyoto rats. * Significant difference between the age-matched group of WKY and SHR at $p < 0.05$.

A typical atrial ganglia of old WKY and SHR was quite complex in structure, and neurons were unevenly distributed, sparsely scattered in one place and densely clustered in another. Due to the irregular structure and contours of the cardiac ganglia, both (the area of the ganglia and the number of neurons in it) varied significantly. Single neurons were also found in the nerves.

Interestingly, the mean body area of neurons in SHR was smaller compared to WKY rats in all age groups. (Table 3.1). A small number of single neurons or small clusters of neurons were found in epicardial nerves or distant from

atrial nodal fields. Both WKY and SHR neural ganglia consist exclusively of cholinergic (ChAT+) neurons. Cholinergic terminals, which are abundant in the nodes, surround the neuronal bodies and are evenly distributed in the neuropil.

Electron microscopy shows many axo-dendritic synapses with abundant clear vesicles present in the presynaptic terminals, which are also presumably cholinergic. Also, cholinergic terminals were observed innervating both adrenergic and cholinergic single neurons. In contrast to cholinergic nerve fibers, most adrenergic nerve fibers did not have varicosities in cardiac intimal nodes and crossed them “in transit”. Nevertheless, single adrenergic nerve fibers had varicosities of variable size and surrounded cholinergic ganglion neurons.

Abundant clusters of small intensely fluorescent cells (SIFs) that were TH positive were found in both nodes and nerves. We found a relatively larger composite area of SIF clusters in the hearts of young animals, as well as a decrease in these cell areas as the animals matured and again an increase as the animals aged. Compared with WKY and SHR, more SIF was present in hypertensive rats. It was confirmed by electron microscopy that SIF accumulates at the capillaries.

CGRP-positive nerve fibers were found in all cardiac ganglia examined. Importantly, no CGRP-positive neuron bodies were detected in all animals studied. CGRP-positive nerve fibers are extremely thin, with abundant varicosities.

All adult rat neuron bodies had their characteristic cytoplasmic structure. Unlike WKY, the nucleolema of some SHR neurons was deformed. Electron microscopy examination of aged SHR and WKY rats did not reveal significant ultrastructural differences in neuronal bodies.

Morphology of atrial and ventricular nerves

From the atria, rat epicardial nerves reach the walls of the ventricles by two pathways. The first path passes through the arterial part of the hilum of the heart, between the ascending aorta and the pulmonary trunk, the second path, by which the epicardial nerves reach the dorsal surface of the ventricles, extends from the venous part of the hilum of the heart, parallel to the left cephalic vein and spreads towards the apex of the heart.

The morphology of epicardial nerves is variable. Ventricular nerve thickness was significantly higher in young SHR rats compared to age-matched WKY rats. The nerves of the left dorsal subplexus of the old SHR group animals were 12 % thinner, compared to WKY rats, and preparations from very old rats showed exceptionally thick epicardial nerves (Table 3.2). In the ventricles, an age-old trend of nerve diameter enlargement was also observed.

Table 3.2. Epicardiac nerve comparison between age-matched WKY and SHR groups

Nerve	Marker	Juvenile		Adult		Old		Very old	
		WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Nerve width, μm									
Atrial	PGP9.5	28.6	29	32.2	25.8*	31	27.4*	64.29	70
Ventricular		22.2	26.9*	27.1	27.4	36	34	46	53
Nerve fiber area in nerve longitudinal section, %									
Atrial	ChAT	23.8	22.2*	27	30.5*	26.92	21.2*	20.43	24.32*
Ventricular		30.1	28.5	26.8	25.6	26.8	25.7	16.81	18.56
Atrial	TH	19.9	25.18*	18.35	18.74	15.8	15.07	26.69	31.98*
Ventricular		27.9	25.2*	23.17	22.13	24.73	22.1*	30.74	35.65*
Atrial	CGRP	1.1	3.08*	3.54	2.94*	2.5	7.91*	2.97	7.02*
Ventricular		1.63	3.48*	2.29	2.53	5.01	3.02*	3.06	5.41*
Ventricular nerve cross-section ¹	PGP9.5	72.5	73.3	81.6	71.7*	71.6	68.9*	54.95	54.59

Abbreviations: ChAT, immunoreactive for choline acetyltransferase; CGRP, immunoreactive for calcitonin gene-related peptide; PGP9.5, immunoreactive for protein gene product 9.5; SHR, spontaneously hypertensive rats; TH, immunoreactive for tyrosine hydroxylase; WKY, Wistar–Kyoto rats. *Significant difference between the age-matched group of WKY and SHR at $p < 0.05$.

¹ Measurements are from ventricular cryosections, otherwise – from atrial or ventricular whole-mounts.

A marked permanent reduction of PGP9.5+ nerve fibers was observed – in the nerves of young animals, this area in the cross-section of the nerve occupied > 70 percent, and in old animals – only slightly more than 50 percent (Table 3.2).

Cholinergic and adrenergic nerve fibers constituted the majority of fibers in both atrial and ventricular epicardial nerves of all animal groups (Table 3.2). Peptidergic (CGRP+) fibers were significantly less in nerves than cholinergic and adrenergic ones, but CGRP+ fibers were more abundant in both atrial and ventricular nerves of SHR of almost all age groups compared to the same age control group (Table 3.2). Thus, maximal abundance of CGRP+ fibers was observed in the nerves of old and very old SHR rats (Table 3.2).

Examination of the ultrastructure of unmyelinated nerve fibers in adult rats revealed that WKY epicardial nerves were dominated by typical unmyelinated nerve fibers with compact Schwann cells giving the fibers a regular outline. Base membrane folds without Schwann cell outgrowths were characteristic of SHR nerves. In SHR and WKY cardiac nerves, many axons were incompletely covered by glial cells or contacted each other in the same Schwann cell groove.

Unmyelinated axons were thinner in SHR nerves compared to WKY in all age groups, both in the ventricles and in the atria. It should be noted that this difference was more significant in ventricular nerves (Table 3.3). The total area occupied by axons in the nerve was found to be significantly smaller in both atrial and ventricular SHR epicardial nerves (Table 3.3).

Table 3.3 SHR and WKY rat nerve ultrastructural characteristics presented as mean (standard error)

Parameter	Adult rats				Old rats			
	Atrial		Ventricular		Atrial		Ventricular	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
Unmyelinated fibers								
Number of axons measured, n	1381	999	978	1953	4611	8063	3675	2057
Axon area, μm^2	1.5 (0.03)	1.2 (0.03)*	1.2 (0.04)	0.9 (0.02)*	1.36 (0.02)	1.13 (0.01)*	1.33 (0.02)	1.11 (0.03)*
Axon diameter, μm	1.3 (0.01)	1.11 (0.02)*	1.07 (0.02)	0.9 (0.01)*	1.18 (0.01)	1.04 (0.01)*	1.12 (0.01)	0.97 (0.02)*
Mean axonal number in nerve fiber, n	2.5 (0.1)	2.8 (0.1)*	4.4 (0.6)	4.4 (0.2)	2.53 (0.06)	3.42 (0.80)*	3.22 (0.30)	3.43 (0.20)
Axon area in nerve, %	48.9 (1.2)	43.6 (1.1)*	54.4 (1.4)	50.1 (0.8)*	58.60 (0.70)	52.70 (0.70)*	58.90 (0.98)	50.90 (0.80)*
Myelinated fibers								
Number of axons, n	-	-	-	-	829	526*	495	229*
Fiber density, n/1000 μm^2	-	-	-	-	16.96	7.95*	14.96	11.49*
Number of axons measured, n	92	200	28	146	576	294	295	120
Axon area, μm^2	4.1 (0.1)	4.2 (0.2)	5.5 (0.3)	5.1 (0.2)	4.02 (0.08)	4.25 (0.15)*	4.71 (0.15)	5.66 (0.30)*
Axon diameter, μm	2.3 (0.04)	2.2 (0.1)	2.6 (0.1)**	2.5 (0.1)	2.20 (0.02)	2.23 (0.04)*	2.37 (0.04)	2.56 (0.75)*
Nerve fiber area, μm^2	7.2 (0.3)	7.3 (0.2)	8.8 (0.6)**	7.6 (0.3)	7.06 (0.1)	7.59 (0.20)*	7.90 (0.20)	9.06 (0.46)*
Nerve fiber diameter, μm	3.0 (0.1)	2.95 (0.1)	3.3 (0.1)**	3.0 (0.1)	2.90 (0.3)	3.01 (0.05)	3.09 (0.04)	3.27 (0.09)*
G-ratio	0.77 (0.01)	0.75 (0.01)	0.8 (0.01)**	0.8 (0.01)	0.752 (0.004)	0.736 (0.01)*	0.767 (0.004)	0.78 (0.001)

* – statistically significant difference between WKY and SHR groups, $p < 0.05$.

** – statistically significant difference between atrial and ventricular fibers in WKY or SHR groups, $p < 0.05$.

Evaluating the total number of myelinated fibers and their density in nerves revealed a statistically significant decrease in these fibers in the nerves of old SHR rats (Table 3.3). The axon ultrastructure of most myelinated fibers was unchanged, except for various inclusions, which were found in 20 % of old rat axons. Inclusions were also present in the cytoplasm of myelinated fibers in Schwann cells, but here they were less common.

Meanwhile, neuropathic changes in the myelin sheath were detected in a large proportion of myelinated nerve fibers. In the nerves of both age groups studied, the majority of myelinated nerve fibers showed an excess of myelin sheath (hypermyelination) that did not correspond to the diameter of the axon, resulting in the formation of myelin folds, which were clearly visible on electrograms. Sometimes several folds were visible in the sections, or the myelin was extremely worn out, forming the so-called “tomacula”.

Another characteristic change is cytoplasmic inclusions in myelin, which clearly differed from Schmidt Lanterman’s incisions, because cytoplasmic inclusions were always only on one side and extended quite far from the axon, forming characteristic hooks. Spoiled myelin was quite common, but this change was not strongly expressed and was even more frequent in the nerves of old WKY rats than in t

Another characteristic change is cytoplasmic inclusions in myelin, which clearly differed from Schmidt Lanterman’s incisions, as cytoplasmic inclusions were always only on one side and extended quite far from the axon, forming characteristic hooks. Very characteristic type of myelinated nerve fiber changes, which we termed “degraded myelin surrounding the axon”, was three times more common in the nerves of the SHR group than in the WKY group. Thinly myelinated nerve fibers were found in the nerves examined, but they were not abundant in both groups of animals.

The described altered myelinated fibers with a myelin sheath not matching the axon surface were not evaluated morphometrically, thus measuring only intact nerve fibers (in which the myelin was attached to the axon). The number of such fibers in the nerves of old WKY was 65.7 percent. and only 51.4 percent. in the nerves of old SHR. In all groups, myelinated fibers and their axons in the ventricular nerves were thicker than in the atrial nerves (Table 3.3). Neither fiber nor axon areas differed between adult-aged WKY and SHR rats. Meanwhile, in both atrial nerves and ventricular nerves of old rats, SHR myelinated fibers and their axons were statistically significantly thicker than WKY (Table 3.3).

Changes in myocardial innervation

Myocardial nerve fibers formed a fine mesh that was well visible in wholemound preparations of the atria and cryosections of the heart ventricles.

The most abundantly innervated atrial site was the sinus node, the least - the auricles. Cholinergic fibers predominated in the sinus node of both young, adult, and old WKY and SHR rats. In the sinus node, cholinergic innervation in both breeds of animals gradually decreased with aging. Adrenergic innervation of the sinus node was less than cholinergic in almost all age groups except very old rats and also decreased with age. Peptidergic, CGRP+ fibers accounted for the smallest proportion of innervation and also decreased with age. It should be noted that CGRP+ fibers were significantly more abundant in the sinus node of SHR animals of all age groups compared to WKY of the corresponding age.

In the contractile atrial myocardium, the density of both ChAT+ and TH+ fibers remained relatively stable with age, and only in the very old group did we observe a significant decrease in innervation of both phenotypes. In the atrial myocardium of young and adult SHR groups, both cholinergic and adrenergic innervation were more abundant than in age-matched controls. As the rats aged, these differences did not remain. CGRP+ fibers were more abundant in SHR atrial myocardium of all age groups, but a particularly large difference appeared in the group of very old rats, where their abundance was 2.5 times that of controls.

The innervation of the ventricular myocardium was heterogeneous. Innervation of the right ventricle up to 30 % was denser than the left one. Meanwhile, the innervation of the left ventricular myocardium was ~10 % lower SHR compared to the normotensive control group of the same age.

CONCLUSIONS

1. The arterial blood pressure of spontaneously hypertensive rats was elevated throughout life and tended to increase as the animal aged. Blood pressure in young and adult control rats was within the normal range, but in the aged rats it reached the upper limit of normal, and some animals even exceeded it.
2. Hypertrophy and dilatation of the left ventricle of spontaneously hypertensive rats was determined during life, while the left ventricular ejection fraction remained normal. Heart rate varied within normal limits with a tendency to increase as the animals aged. Long-term arterial hypertension accelerates the depletion of vital resources, manifested by weight loss and the general appearance of the animal.
3. Arterial hypertension affects and enhances the structural changes in the cardiac nerve plexus that occur with age: reduction of neuronal bodies, fibrosis of intracardiac nerves, loss of nerve fibers in the nerves and left

ventricular myocardium, but thickening of the right ventricular myocardium nerve plexus.

4. Changes in the main phenotypes of the autonomic nervous system were determined:
 - a) age-related loss of cholinergic innervation accelerated by arterial hypertension;
 - b) adrenergic innervation is better expressed in the nerve plexus of the hypertensive group compared to the control. This difference is particularly significant in the hearts of prehypertensive and very old rats;
 - c) the content of CGRP fibers in hypertensive rats of all age groups was significantly higher in all parts of the neural plexus and increased with age. CGRP, the rarest phenotype, showed the fastest increase.
5. Ultrastructural changes of the intracardiac nerve plexus were identified:
 - a) the release of satellite cells in nerve nodes;
 - b) loss of non-myelinated fibers;
 - c) decrease in the number and density of mycelial fibers in the nerves of hypertensive rats;
 - d) abundant and diverse myelin deformations characteristic of demyelinating neuropathic diseases in nerves of both control (Wistar Kyoto breed) and hypertensive rats;
 - e) the identified deformations of myelinated fibers were significantly more abundant in the nerves of hypertensive animals.

PRACTICAL RECOMMENDATION

Based on the increased arterial pressure, partially pathological cardiac parameters, and ultrastructural neuropathic changes in Wistar Kyoto rats, the suitability of this breed as a gold standard for the control of a hypertension model (spontaneously hypertensive rat, SHR) is questioned. We recommend that Wistar Kyoto rats not be selected for aging studies as normotensive controls for spontaneously hypertensive rats.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396:1223. Available from: [/pmc/articles/PMC7566194/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37566194/)
2. Burns J, Sivananthan MU, Ball SG, Mackintosh AF, Mary DASG, Greenwood JP. Relationship between central sympathetic drive and magnetic resonance imaging-determined left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 2007;115:1999–2005. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17389264/>
3. Greenwood JP, Scott EM, Stoker JB, Dasg M. Hypertensive left ventricular hypertrophy: Relation to peripheral sympathetic drive. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1711–7.
4. Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108:560–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12847071/>
5. Kuroda K. Hypertensive cardiomyopathy: A clinical approach and literature review. *World J Hypertens*. 2015;5:41.
6. Mancia G, Grassi G. The autonomic nervous system and hypertension. *Circ Res*. 2014;114:1804–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24855203/>
7. McClain JL, Fried DE, Gulbransen BD. Agonist-evoked Ca²⁺ signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1:631–45.
8. Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsuhashi T, et al. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120:408–21.
9. Olivás A, Gardner RT, Wang L, Ripplinger CM, Woodward WR, Habecker BA. Myocardial infarction causes transient cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130. *Journal of Neuroscience*. 2016;36:479–88.
10. Satou R, Penrose H, Navar LG. Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20:100.
11. Zhou H, Li N, Yuan Y, Jin Y-G, Guo H, Deng W, et al. Activating transcription factor 3 in cardiovascular diseases: a potential therapeutic target. *Basic Res Cardiol*. 2018;113:37.
12. Roy A, Guatimosim S, Prado VF, Gros R, Prado MAM. Cholinergic activity as a new target in diseases of the heart. *Mol Med*. 2015;20:527–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25222914>
13. Zucker IH, Hackley JF, Cornish KG, Hiser BA, Anderson NR, Kieval R, et al. Chronic baroreceptor activation enhances survival in dogs with pacing-induced heart failure. *Hypertension*. 2007;50:904–10.
14. Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsuhashi T, et al. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *J Clin Invest*. 2010;120:408–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20051627/>
15. Delfiner MS, Siano J, Li Y, Dedkov EI, Zhang Y. Reduced epicardial vagal nerve density and impaired vagal control in a rat myocardial infarction–heart failure model. *Cardiovascular Pathology*. 2017;26:21–9.
16. Lатарo RM, Silva CAA, Fazan R, Rossi MA, Prado CM, Godinho RO, et al. Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305:R908-16.

17. Roy A, Fields WC, Rocha-Resende C, Resende RR, Guatimosim S, Prado VF, et al. Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. *FASEB J*. 2013;27:5072–82.
18. Benarroch EE. CGRP. *Neurology*. 2011;77:281–7.
19. Scharrer B. Peptidergic neurons: Facts and trends. *Gen Comp Endocrinol*. 1978;34:50–62.
20. Aline Boer P, Ueno M, Sant’Ana JSM, Saad MJA, Rocha Gontijo JA. Expression and localization of NK1R, substance P and CGRP are altered in dorsal root ganglia neurons of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Molecular Brain Research*. 2005;138:35–44.
21. Russo AF, Hay DL. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond. *Physiol Rev*. 2023;103:1565–644.
22. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, Krause DN. CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018;14:338–50.
23. Bentsen S, Sams A, Hasbak P, Edvinsson L, Kjaer A, Ripa RS. Myocardial perfusion recovery induced by an α -calcitonin gene-related peptide analogue. *Journal of Nuclear Cardiology*. 2022;29:2090–9.
24. Argunhan F, Thapa D, Aubdool AA, Carlini E, Arkless K, Hendrikse ER, et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Protects Against Cardiovascular Dysfunction Independently of Nitric Oxide In Vivo. *Hypertension*. 2021;77:1178–90.
25. Kee Z, Kodji X, Brain SD. The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. *Front Physiol*. 2018;9.
26. Kyriakoulis KG, Kollias A, Stergiou GS. Masked hypertension: how not to miss an even more silent killer. *Hypertension Research*. 2023;46:778–80.
27. Kalehoff JP, Oparil S. The Story of the Silent Killer. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22:72.
28. Pokharel Y, Karmacharya BM, Neupane D. Hypertension—A Silent Killer Without Global Bounds. *J Am Coll Cardiol*. 2022;80:818–20.
29. González A, Ravassa S, López B, Moreno MU, Beaumont J, San José G, et al. Myocardial Remodeling in Hypertension. *Hypertension*. 2018;72:549–58.
30. Nwabuo CC, Vasan RS. Pathophysiology of Hypertensive Heart Disease: Beyond Left Ventricular Hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. 2020;22:11.
31. Ho KKL, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival After the Onset of Congestive Heart Failure in Framingham Heart Study Subjects. Available from: <http://ahajournals.org>
32. Vasan RS, Levy D. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. A clinical mechanistic overview. *Arch Intern Med*. 1996;156:1789–96.
33. Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation*. 1993;87:VI40-8.
34. Katz SD. Mechanisms and implications of endothelial dysfunction in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 1997;12:259–64.
35. Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Allen PD, Haerberle JR, Alpert NR. Alteration of contractile function and excitation-contraction coupling in dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 1992;70:1225–32.
36. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;96:2190–6.

37. Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 1995;30:570–84.
38. Guidetti F, Arrigo M, Frank M, Mikulicic F, Sokolski M, Aser R, et al. Treatment of Advanced Heart Failure—Focus on Transplantation and Durable Mechanical Circulatory Support. *Heart Fail Clin.* 2021;17:697–708.
39. Bhagra SK, Pettit S, Parameshwar J. Cardiac transplantation: indications, eligibility and current outcomes. *Heart.* 2019;105:252–60.
40. Awad MA, Shah A, Griffith BP. Current status and outcomes in heart transplantation: a narrative review. *Rev Cardiovasc Med.* 2022;23:1.
41. Nakamura K, Stempien-Otero A. Stem Cells and the Future of Heart Transplantation. 2020. p. 483–500.
42. Tenreiro MF, Louro AF, Alves PM, Serra M. Next generation of heart regenerative therapies: progress and promise of cardiac tissue engineering. *NPJ Regen Med.* 2021;6:30.
43. van Doorn ECH, Amesz JH, Sadeghi AH, de Groot NMS, Manintveld OC, Taverne YJHJ. Preclinical Models of Cardiac Disease: A Comprehensive Overview for Clinical Scientists. *Cardiovasc Eng Technol.* 2024;15:232–49.
44. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:497841.
45. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998;39:60–76.
46. Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology.* 2006;15:318–30.
47. Li K, Cardoso C, Moctezuma-Ramirez A, Elgalad A, Perin E. Evaluation of large animal models for preclinical studies of heart failure with preserved ejection fraction using clinical score systems. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1099453.
48. Weinberg EF, Schoen J, George D, Kagaya Y, Douglas PS, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Prolongs Survival and Modifies the Transition to Heart Failure in Rats With Pressure Overload Hypertrophy Due to Ascending Aortic Stenosis. 1994. Available from: <http://ahajournals.org>
49. Patel A, Patel D. Congestive heart failure model representing aortic banding induced hypertrophy: A study to analyse extent of pressure overload and alteration in myocardial structure and function. *IJC Heart & Vasculature.* 2021;34:100755.
50. Kajstura J, Zhang X, Reiss K, Szoke E, Li P, Lagrasta C, et al. Myocyte Cellular Hyperplasia and Myocyte Cellular Hypertrophy Contribute to Chronic Ventricular Remodeling in Coronary Artery Narrowing-Induced Cardiomyopathy in Rats. Available from: <http://ahajournals.org>
51. Li H, Huang J, Liu C, Zhang Z, Song K, Ma K, et al. A New Model of Heart Failure Post-Myocardial Infarction in the Rat. *J Vis Exp.* 2021;
52. Liu Y-H, Yang X-P, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA, et al. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. 2018. Available from: www.physiology.org/journal/ajpheart
53. Dillmann WH. The rat as a model for cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Models.* 2008;5:173–8.
54. Doggrel S. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39:89–105.
55. Bers DM. Control of Cardiac Contraction by SR Ca Release and Sarcolemmal Ca Fluxes. 1993. p. 149–70.

56. Rapp JP, Garrett MR. Will the real Dahl S rat please stand up? *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;317:F1231–40.
57. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282–93.
58. Simms AE, Paton JFR, Pickering AE, Allen AM. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: Does it contribute to hypertension? *Journal of Physiology*. 2009;587:597–610.
59. Boluyt MO, Bing OHL, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* [Internet]. 1995;16:19–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8682057/>
60. Adams MA, Bobik A, Korner PI. Differential Development of Vascular and Cardiac Hypertrophy in Genetic Hypertension Relation to Sympathetic Function [Internet]. Available from: <http://ahajournals.org>
61. Rezende LMT de, Soares LL, Drummond FR, Suarez PZ, Leite L, Rodrigues JA, et al. Is the Wistar Rat a more Suitable Normotensive Control for SHR to Test Blood Pressure and Cardiac Structure and Function? *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2021;
62. Panzenhagen AC, Bau CHD, Grevet EH, Rovaris DL. An animal model of what? The case of spontaneously hypertensive rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;94:109617.
63. Reckelhoff JF, Yanes Cardozo LL, Fortepiani MLA. Models of hypertension in aging. *Conn's Handbook of Models for Human Aging*. 2018;703–20. Available from: <https://scholars.uthsesa.edu/en/publications/models-of-hypertension-in-aging>
64. L Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EdwG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. 1997. Available from: www.physiology.org/journal/ajpheart
65. Holycross BJ, Summers BM, Dunn RB, McCune SA. Plasma renin activity in heart failure-prone SHHF/Mcc-facp rats. *Am J Physiol*. 1997;273:H228-33.
66. Larsen HE, Lefkimmatis K, Paterson DJ. Sympathetic neurons are a powerful driver of myocyte function in cardiovascular disease. *Sci Rep*. 2016;6.
67. Thomas GD. Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ*. 2011;35:28–32.
68. Ferrier C, Cox H, Esler M. Elevated total body noradrenaline spillover in normotensive members of hypertensive families. *Clin Sci*. 1993;84:225–30.
69. Grassi G, Seravalle G, Bertinieri G, Turri C, Dell'Oro R, Stella ML, et al. Sympathetic and reflex alterations in systo-diastolic and systolic hypertension of the elderly. *J Hypertens*. 2000;18:587–93.
70. Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. Baroreflex Control of Sympathetic Nerve Activity in Essential and Secondary Hypertension. *Hypertension*. 1998;31:68–72.
71. Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, et al. Early Sympathetic Activation in the Initial Clinical Stages of Chronic Renal Failure. *Hypertension*. 2011;57:846–51.
72. Converse RL, Jacobsen TN, Toto RD, Jost CMT, Cosentino F, Fouad-Tarazi F, et al. Sympathetic Overactivity in Patients with Chronic Renal Failure. *New England Journal of Medicine*. 1992;327:1912–8.
73. Mangoni AA, Mircoli L, Giannattasio C, Mancia G, Ferrari AU. Effect of Sympathectomy on Mechanical Properties of Common Carotid and Femoral Arteries. *Hypertension*. 1997;30:1085–8.
74. Hansson GK. How to Chew Up Cells. *Circ Res*. 2012;111:669–71.

75. Grassi G. Sympathetic Neural Activity in Hypertension and Related Diseases. *Am J Hypertens.* 2010;23:1052–60.
76. Grassi G. Assessment of Sympathetic Cardiovascular Drive in Human Hypertension. *Hypertension.* 2009;54:690–7.
77. Palatini P. Role of Elevated Heart Rate in the Development of Cardiovascular Disease in Hypertension. *Hypertension.* 2011;58:745–50.
78. Julius S, Sanchez R, Malayan S, Hamlin M, Elkins M, Brant D, et al. Sustained blood pressure elevation to lower body compression in pigs and dogs. *Hypertension.* 1982;4:782–8.
79. Van Zwieten PA, Hendriks MGC, Pfaffendorf M, Bruning TA, Chang PC. The parasympathetic system and its muscarinic receptors in hypertensive disease. *J Hypertens.* 1995;13:1079–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8586799/>
80. Masuda Y, Motomura S, Toyo-Oka T, Hirata Y. Role of the parasympathetic nervous system and interaction with the sympathetic nervous system in the early phase of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36 Suppl 2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11206723/>
81. Fisher JP, Paton JFR. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens.* 2012;26:463–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21734720/>
82. Smith DI, Tran HT, Poku J. Hemodynamic Considerations in the Pathophysiology of Peripheral Neuropathy. *Blood Pressure - From Bench to Bed.* 2018; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/63580>
83. Ashton JL, Argent L, Smith JEG, Jin S, Sands GB, Smaill BH, et al. Evidence of structural and functional plasticity occurring within the intracardiac nervous system of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020;318:H1387–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32357112/>
84. Ranceviene D, Rysevaite-Kyguoliene K, Inokaitis H, Saburkina I, Plekhanova K, Sabeckiene D, et al. Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats. *Histol Histopathol.* 2022;18453. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35356999/>
85. Pauziene N, Ranceviene D, Rysevaite-Kyguoliene K, Inokaitis H, Saburkina I, Plekhanova K, et al. Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension. *Anat Rec.* 2022; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36342958/>
86. Grassi G, Mark A, Esler M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circ Res.* 2015;116:976–90.
87. Grassi G, Seravalle G, Brambilla G, Pini C, Alimento M, Facchetti R, et al. Marked sympathetic activation and baroreflex dysfunction in true resistant hypertension. *Int J Cardiol.* 2014;177:1020–5.
88. Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 1992;262:E763–78.
89. Miyajima E, Shigemasa T, Yamada Y, Tochikubo O, Ishii M. Angiotensin II blunts, while an angiotensin-converting enzyme inhibitor augments, reflex sympathetic inhibition in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:797–802.
90. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1309–17.

91. Li D, Lee CW, Buckler K, Parekh A, Herring N, Paterson DJ. Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension*. 2012;59:642–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252398/>
92. Shanks J, Mane S, Ryan R, Paterson DJ. Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the hypertensive rat. *Hypertension*. 2013;61:187–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23172922/>
93. Shanks J, Manou-Stathopoulou S, Lu CJ, Li D, Paterson DJ, Herring N. Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23913706/>
94. Herring N, Lee CW, Sunderland N, Wright K, Paterson DJ. Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:99–106.
95. Zugck C, Lossnitzer D, Backs J, Kristen A, Kinscherf R, Haass M. Increased cardiac norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats: role of presynaptic alpha-2A adrenoceptors. *J Hypertens*. 2003;21:1363–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12817185/>
96. Kondo M, Terada M, Fujiwara T, Arita N, Yano A, Tabei R. Noradrenergic hyperinnervation in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995;22:S75–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9072451/>
97. Navickaite I, Pauziene N, Pauza DH. Anatomical evidence of non-parasympathetic cardiac nitergic nerve fibres in rat. *J Anat*. 2021;238:20–35.
98. Toyoda K, Faraci FM, Russo AF, Davidson BL, Heistad DD. Gene transfer of calcitonin gene-related peptide to cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10666091/>
99. Escott KJ, Brain SD. Effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP8-37) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve. *Br J Pharmacol*. 1993;110:772–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8242250/>
100. N'Diaye A, Gannesen A, Borrel V, Maillot O, Enault J, Racine PJ, et al. Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide: Key Regulators of Cutaneous Microbiota Homeostasis. *Front Endocrinol*. 2017;8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28194136/>
101. Bergdahl A, Valdemarsson S, Nilsson T, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L. Dilatory responses to acetylcholine, calcitonin gene-related peptide and substance P in the congestive heart failure rat. *Acta Physiol Scand*. 1999;165:15–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10072092/>
102. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;313:54–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3917554/>
103. Li L, Hatcher JT, Hoover DB, Gu H, Wurster RD, Cheng ZJ. Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive axons in the whole-mount atria of mice. *Auton Neurosci*. 2014;181:37–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2013.12.010>
104. Sahn DJ, Demaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations Regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiographic Measurements. *Circulation* 1978;58(6):1072–1083.
105. Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich ED. Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and

- age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:181–5. Available from: <http://www.ajpheart.org>
106. Ridgway RL. Flat, adherent, well-contrasted semithin plastic sections for light microscopy. *Stain Technol*. 1986;61:253–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3750356/>
 107. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22743772/>
 108. Kurtz TW, Curtis Morris R. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987;10:127–31. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.hyp.10.1.127>
 109. Zhang-James Y, Middleton FA, Faraone S V. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiol Genomics*. 2013;45:528–38.
 110. Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Lab Anim*. 1991;25:26–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2010973/>
 111. LeGrice IJ, Pope AJ, Sands GB, Whalley G, Doughty RN, Smaill BH. Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23001837/>
 112. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline Echocardiographic Values for Adult Male Rats. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2004;17:161–7.
 113. Fisher JP, Paton JFR. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *Journal of Human Hypertension* 2012 26:8. 2011;26:463–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/jhh201166>
 114. Paton JFR, Waki H. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33:89–94.
 115. Neely OC, Domingos AI, Paterson DJ. Macrophages Can Drive Sympathetic Excitability in the Early Stages of Hypertension. *Front Cardiovasc Med*. 2022;8.
 116. Ng J, Villuendas R, Cokic I, Schliamser JE, Gordon D, Koduri H, et al. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:388–96.
 117. Li D, Paterson DJ. Pre-synaptic sympathetic calcium channels, cyclic nucleotide-coupled phosphodiesterases and cardiac excitability. *Semin Cell Dev Biol*. Elsevier Ltd; 2019. p. 20–7.
 118. Shanks J, Herring N, Johnson E, Liu K, Li D, Paterson DJ. Overexpression of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a Promotes Cardiac Sympathetic Neurotransmission via Abnormal Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Ca²⁺ Regulation. *Hypertension*. 2017;69:625–32.
 119. Grassi G, Ram VS. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2016;10:457–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27052349/>
 120. Harrison DG, Coffman TM, Wilcox CS. Pathophysiology of Hypertension. *Circ Res*. 2021;128:847–63.
 121. Radosinska J, Kollarova M, Jasenovc T, Radosinska D, Vrbjar N, Balis P, et al. Aging in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats: Focus on Erythrocyte Properties. *Biology (Basel)*. 2023;12:1030.

122. Dickhout JG, Lee RMKW. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998;274:794–800.
123. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res*. 2003;314:337–50.
124. Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. *Ann Anat*. 2003;185:449–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14575272/>
125. Ashton JL, Argent L, Smith JEG, Jin S, Sands GB, Smaill BH, et al. Evidence of structural and functional plasticity occurring within the intracardiac nervous system of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;318:1387–400.
126. Singh S, Sayers S, Walter JS, Thomas D, Dieter RS, Nee LM, et al. Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. *J Am Heart Assoc*. 2013;2.
127. Richardson RJ, Grkovic I, Anderson CR. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res*. 2003;314:337–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523644>
128. Meerson FZ, Krokhina EM. Neurons of intramural ganglia of the heart in its hyperfunction and hypertrophy. *Cells Tissues Organs*. 1965;62:161–75.
129. Steinback CD, Salmanpour A, Breskovic T, Dujic Z, Shoemaker JK. Sympathetic neural activation: an ordered affair. *J Physiol*. 2010;588:4825–36.
130. Koester J, Siegelbaum SA. Propagated signaling: the action potential. *Principles of neural science*. 7th ed. 2000. p. 157.
131. Bozkurt B, Coats AJ, Tsutsui H, Abdelhamid M, Adamopoulos S, Albert N, et al. Universal Definition and Classification of Heart Failure. *J Card Fail*. 2021;27:387–413.
132. Steinback CD, Salmanpour A, Breskovic T, Dujic Z, Shoemaker JK. Sympathetic neural activation: an ordered affair. *J Physiol*. 2010;588:4825–36.
133. Arora RC, Cardinal R, Smith FM, Ardell JL, Dell'Italia LJ, Armour JA. Intrinsic cardiac nervous system in tachycardia induced heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2003;285:1212–23.
134. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, et al. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat*. 2016;228.
135. Pauziene N, Rysevaite-Kyguoliene K, Alaburda P, Pauza AG, Skukauskaite M, Masaityte A, et al. Neuroanatomy of the Pig Cardiac Ventricles. A Stereomicroscopic, Confocal and Electron Microscope Study. *Anat Rec*. 2017;300:1756–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28598580/>
136. Tomas R, Kristina RK, Neringa P, Hermanas I, Dainius PH. Intrinsic cardiac neurons of the adult pigs: chemical types, abundance, parameters and distribution within ganglionated plexus. *Ann Anat*. 2022;243. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35331888/>
137. Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Pagé P, Armour JA. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. *Neuroscience*. 2009;164:1170–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19747529/>
138. Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 2005;492:370–9.
139. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, et al. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-

- mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*. 2011;8:731–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232628>
140. Hoard JL, Hoover DB, Mabe AM, Blakely RD, Feng N, Paolocci N. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75. *Neuroscience*. 2008;156:129–42.
 141. Hanna P, Dacey MJ, Brennan J, Moss A, Robbins S, Achanta S, et al. Innervation and Neuronal Control of the Mammalian Sinoatrial Node a Comprehensive Atlas. *Circ Res*. 2021;128:1279–96. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.120.318458>
 142. Parsons RL. Mammalian Cardiac Ganglia as Local Integration Centers: Histochemical and Electrophysiological Evidence. *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. 2004;335–56. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9054-9_15
 143. Weight FF, Weitsen HA. Identification of small intensely fluorescent (SIF) cells as chromaffin cells in bullfrog sympathetic ganglia. *Brain Res*. 1977;128:213–26.
 144. Chiba T, Black AC, Williams TH. Evidence for dopamine-storing interneurons and paraneurons in rhesus monkey sympathetic ganglia. *J Neurocytol*. 1977;6:441–53.
 145. Yokoyama T, Saito H, Nakamuta N, Yamamoto Y. Immunohistochemical localization of vesicular nucleotide transporter in small intensely fluorescent (SIF) cells of the rat superior cervical ganglion. *Tissue Cell*. 2022;79:101924.
 146. Singhal P, Senecal JMM, Nagy JI. Expression of the gap junction protein connexin36 in small intensely fluorescent (SIF) cells in cardiac parasympathetic ganglia of rodents. *Neurosci Lett*. 2023;793:136989.
 147. Atanasova DY, Iliev ME, Lazarov NE. Morphology of the rat carotid body. *Biomedical Reviews*. 2011;22:41.
 148. Hoshi H, sakagami H, Owada Y, kondo H. Localization of Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I in the Carotid Body Chief Cells and the Ganglionic Small Intensely Fluorescent (SIF) Cells of Adult Rats. The arterial chemoreceptors. 87–92.
 149. Felipe ISA, Zera T, da Silva MP, Moraes DJA, McBryde F, Paton JFR. The sympathetic nervous system exacerbates carotid body sensitivity in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2023;119:316–31.
 150. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2014;94:1099–142. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00034.2013>
 151. Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*. 1985;86:855–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2416378/>
 152. Zhou ZH, Peng J, Ye F, Li NS, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection induced by nitroglycerin is mediated by alpha-calcitonin gene-related peptide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002;365:253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11919648/>
 153. Kee Z, Kodji X, Brain SD. The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. *Front Physiol*. 2018;9:1249.
 154. Kumar A, Potts JD, DiPette DJ. Protective Role of α -Calcitonin Gene-Related Peptide in Cardiovascular Diseases. *Front Physiol*. 2019;10:821.
 155. Smillie SJ, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. *Neuropeptides*. 2011;45:93–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21269690/>

156. Supowit SC, Zhao H, DiPette DJ. Nerve growth factor enhances calcitonin gene-related peptide expression in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 2001;37:728–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11230364/>
157. Bechara AJ, Cao G, Casabé AR, Romano S v., Toblli JE. Morphological modifications in clitoris and vagina in spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res*. 2003;15:166–72.
158. Sanada LS, da Rocha Kalil AL, Tavares MR, Neubern MCM, Salgado HC, Fazan VPS. Sural nerve involvement in experimental hypertension: Morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *BMC Neurosci*. 2012;13.
159. Hong KW, Yu SS, Shin YW, Kim CD, Rhim BY, Lee WS. Decreased CGRP level with increased sensitivity to CGRP in the pial arteries of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1997;60:697–705.
160. Fazan VPS, Salgado HC, Barreira AA. Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11247766/>
161. Rodrigues AR, Ferreira RS, Salgado HC, Fazan VPS. Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011;44:583–91.
162. Ozaki K, Matsuura T. Superimposition of hypertension on diabetic peripheral neuropathy affects small unmyelinated sensory nerves in the skin and myelinated tibial and sural nerves in rats with alloxan-induced type 1 diabetes. *J Toxicol Pathol*. 2020;33:161–9.
163. Gregory JA, Jolivalt CG, Goor J, Mizisin AP, Calcutt NA. Hypertension-induced peripheral neuropathy and the combined effects of hypertension and diabetes on nerve structure and function in rats. *Acta Neuropathol*. 2012;124:561–73. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-012-1012-6>
164. Paula V, Fazan S, Fazan Junior R, Salgado HC, Antunes Barreira A, Brazil B et al. Morphology of aortic depressor nerve myelinated fibers in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst*. 1999. Available from: www.elsevier.com/locate/jans
165. Sanada LS, da Rocha Kalil AL, Tavares MR, Neubern MCM, Salgado HC, Fazan VPS. Sural nerve involvement in experimental hypertension: Morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *BMC Neurosci*. 2012;13.
166. Goebbels S, Oltrogge JH, Wolfer S, Wieser GL, Nientiedt T, Pieper A, et al. Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tomaculous neuropathy. *EMBO Mol Med*. 2012;4:486–99.
167. Bilbao JM, Schmidt RE. Schwann Cells and Myelin in the Peripheral Nervous System. *Biopsy Diagnosis of Peripheral Neuropathy*. Springer International Publishing; 2015. p. 85–109.
168. Jouaud M, Mathis S, Richard L, Lia AS, Magy L, Vallat JM. Rodent models with expression of PMP22: Relevance to dysmyelinating CMT and HNPP. *J Neurol Sci*. Elsevier B.V.; 2019. p. 79–90.
169. Jaros E, Bradley WG. Atypical axon-Schwann cell relationships in the common peroneal nerve of the dystrophic mouse: an ultrastructural study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1979;5:133–47.
170. Chau WK, So K-F, Tay D, Dockery P. A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2000;16:105–16.
171. Harty BL, Coelho F, Pease-Raissi SE, Mogha A, Ackerman SD, Herbert AL, et al. Myelinating Schwann cells ensheath multiple axons in the absence of E3 ligase component Fbxw7. *Nat Commun*. 2019;10:2976.

172. Domènech-Estévez E, Baloui H, Meng X, Zhang Y, Deinhardt K, Dupree JL, et al. Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS. *J Neurosci*. 2016;36:4506–21.
173. Sander S. Clinical syndromes associated with tomacula or myelin swellings in sural nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:483–8.
174. Hall SM. The response of the (myelinating) Schwann cell population to multiple episodes of demyelination. *J Neurocytol*. 1983.
175. Attwell D, Buchan AM, Chrapak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010;468:232–43.
176. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 2014;81:728–39.
177. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129:877–96.
178. Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, et al. Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology*. 2014;147:1230–7.
179. Tedoldi A, Argent L, Montgomery JM. The role of the tripartite synapse in the heart: how glial cells may contribute to the physiology and pathophysiology of the intracardiac nervous system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320:C1–14.
180. Pannese E. *Neurocytology*. Cham: Springer International Publishing; 2015.
181. Tay SSW, Wong WC, Ling EA. An ultrastructural study of the non-neuronal cells in the cardiac ganglia of the monkey (*Macaca fascicularis*) following unilateral vagotomy. *J. Anat*. 1984.
182. Harty BL, Coelho F, Pease-Raissi SE, Mogha A, Ackerman SD, Herbert AL, et al. Myelinating Schwann cells ensheath multiple axons in the absence of E3 ligase component Fbxw7. *Nat Commun*. 2019;10.
183. Chomiak T, Hu B. What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS? A Theoretical Approach. *PLoS One*. 2009;4:7754.
184. Ugrenović S, Jovanović I, Vasović L, Kundalić B, Čukuranović R, Stefanović V. Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. *Anat Sci Int*. 2016;91:238–45.
185. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. 1999;79:215–62. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9922372&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/88897D50-2732-4187-A68A-034B3DEEDAD5>
186. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol*. 1991;260. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1992792/>
187. Scridon A, Gallet C, Arisha MM, Oréa V, Chapuis B, Li N, et al. Unprovoked atrial tachyarrhythmias in aging spontaneously hypertensive rats: the role of the autonomic nervous system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:386–92. Available from: www.ajpheart.org
188. Herring N, Kalla M, Paterson DJ. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31197232/>
189. Kondo M, Fujiwara T, Tabei R, Kondo M. Noradrenergic Hyperinnervation in the of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP) Heart. *Hypertension Research*. 1996;19(2), 69-73.
190. Kanazawa H, Fukuda K. The plasticity of cardiac sympathetic nerves and its clinical implication in cardiovascular disease. *Front Synaptic Neurosci*. 2022;14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36160916/>

191. Zhang-James Y, Middleton FA, Faraone S V. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiol Genomics*. 2013;45:528. Available from: [/pmc/articles/PMC3727021/](#)
192. Mann DL, Deswal A, Bozkurt B, Torre-Amione G. New therapeutics for chronic heart failure. *Annu Rev Med*. 2002;53:59–74.
193. Schulte A, Lichtenstern C, Henrich M, Weigand MA, Uhle F. Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *Journal of Surgical Research*. 2014;188:480–8.
194. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30:379–87.
195. Dickie R, Bachoo RM, Rupnick MA, Dallabrida SM, DeLoid GM, Lai J, et al. Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvasc Res*. 2006;72:20–6.

STRAIPSNIAI, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI

1. **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Azukaite, J., Pauza, D. H., & Pauziene, N. (2022). Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats. *Histology and histopathology*, 37(10), 955–970.
2. Pauziene, N., **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Martinaityte, R., Pilnikovaite, E., & Pauza, D. H. (2023). Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 306(9), 2313–2332.
3. Pauziene, N., **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Ragauskas, T., Inokaitis, H., Sabeckis, I., Plekhanova, K., Khmel, O., & Pauza, D. H. (2023). Neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Journal of anatomy*, 243(4), 630–647.

MOKSLINĖS KONFERENCIJOS, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI

1. **Rancevienė, D.**, Rysevaitė-Kyguolienė, K., & Paužienė, N. (2021). Aging and arterial hypertension are associated with alterations of cardiac autonomic nervous system. In *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger: 27th International Symposium on Morphological Sciences-ISMS 2021 Abstracts part II, 27th International Symposium on Morphological Sciences-ISMS 2021 "Cell, tissue, organs-experience, innovation and progress": Aktobe, Kazakhstan, May 27-31, 2021 Amsterdam, Boston, London [et al.]: Elsevier GmbH, 2021, vol. 237, suppl. 1.*
2. **Rancevienė, D.**, Rysevaitė-Kyguolienė, K., Inokaitis, H., Plekhanova, K., & Paužienė, N. (2021). Hypertension rearranges neuroanatomy of the heart. In *Annals of anatomy-Anatomischer Anzeiger: Abstracts part I, 27th International Symposium on Morphological Sciences-ISMS 2021 "Cell, tissue, organs-experience, innovation and progress": Aktobe, Kazakhstan, 27-31 May, 2021/Zapadno-Kazakhstanskiy Gosudarstvennyy Meditsinskiy Universitet Im. M. Ospanova, Aktobe, Kazakh. Amsterdam, Boston, London: Elsevier GmbH, 2021, vol. 230, suppl., June.*
3. **Rancevienė, D.**, Ažukaitė, J., Rysevaitė-Kyguolienė, K., & Paužienė, N. (2021). Arterial hypertension change phenotype of nerve fibers in epicardiac nerves. In *115th Annual Meeting = 115th Anatomische Gesellschaft Meeting: September 21-23, 2021, Innsbruck, Austria. Innsbruck: Institute for Clinical and Functional Anatomy Medical University, 2021.**
4. **Rancevienė, D.**, Rysevaitė-Kyguolienė, K., Sabeckienė D., Sabeckis I., & Paužienė, N.(2021). Arterial hypertension influences heart innervation in aged experimental animals. *XIII International Conference of the Lithuanian Neuroscience Association „CONSCIOUSNESS“ (LNA conference) : 26 November 2021, Kaunas, Lithuania : Virtual Conference : Abstract book / Vilnius University. Lithuanian University of Health Sciences. Vytautas Magnus University. Vilnius : Vilnius University Press, 2021*
5. **Rancevienė, D.**, Rysevaitė-Kyguolienė, K., & Paužienė, N. (2021). Calcitonin Gene-related Peptide Relations To The Arterial Hypertension In Spontaneously Hypertensive Rats. In *International online-conference*

* pateko tarp 20 geriausių konferencijos tezių.

- “From experience to project” dedicated to the Independence Day of the Republic of Kazakhstan. December 12, 2021, Aktobe, Kazakhstan.*
6. **Rancevienė, D.**, Azukaite J., Rysevaitė-Kyguolienė, K., & Paužienė, N. (2022). *Early Structural Alterations of Intrinsic Cardiac Ganglionated Plexus in Spontaneously Hypertensive Rats. In Health for All: 2022 - International Conference Health for All “Our planet, our health”: abstract book Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2022., p. 26-27.*
 7. Ranceviene, D., Zigmantaite, V., Jurevicius, J., & Pauziene, N. (2022). The designing experiment of essential hypertension: the choice of a control group for spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension. Supplement : 31st Annual Scientific Meeting of the European Society of Hypertension (ESH) on Hypertension and Cardiovascular Protection : June 17-20, 2022, Athens, Greece : abstract book / European Society of Hypertension. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2022, vol. 40, suppl. 1., p. e94-e94.*
 8. **Ranceviene, D.**, Azukaite, J., Rysevaite-Kyguoliene, K., & Pauziene, N. (2022). Impact of arterial hypertension versus aging to the structures of epicardiac nerves in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension. Supplement : 31st Annual Scientific Meeting of the European Society of Hypertension (ESH) on Hypertension and Cardiovascular Protection : June 17-20, 2022, Athens, Greece : abstract book / European Society of Hypertension. London : Lippincott Williams & Wilkins, 2022, vol. 40, suppl. 1., p. e1.*
 9. **Rancevienė, D.**, Rysevaitė-Kyguolienė, K., & Saburkina, I. (2022). *Calcitonin Gene-Related Peptide Relations to the Arterial Hypertension in Spontaneously Hypertensive. Compendium II International online-conference for students and young scientists dedicated to the 30th Anniversary of the Independence of the Republic of Kazakhstan «From Experience to Project» p. 139-140.*

STRAIPSNIŲ KOPIJOS

1. **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Azukaite, J., Pauza, D. H., & Pauziene, N. (2022). Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats. *Histology and histopathology*, 37(10), 955–970
2. Pauziene, N., **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Martinaityte, R., Pilnikovaite, E., & Pauza, D. H. (2023). Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 306(9), 2313–2332.
3. Pauziene, N., **Ranceviene, D.**, Rysevaite-Kyguoliene, K., Ragauskas, T., Inokaitis, H., Sabeckis, I., Plekhanova, K., Khmel, O., & Pauza, D. H. (2023). Neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Journal of anatomy*, 243(4), 630–647.

Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats

Dalia Ranceviene, Kristina Rysevaite-Kyguoliene, Hermanas Inokaitis, Inga Saburkina, Khrystyna Plekhanova, Deimante Sabeckiene, Ignas Sabeckis, Joana Azukaite, Dainius H. Pauza and Neringa Pauziene
Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Summary. Persistent arterial hypertension leads to structural and functional remodeling of the heart resulting in myocardial ischemia, fibrosis, hypertrophy, and eventually heart failure. Previous studies have shown that individual neurons composing the intracardiac ganglia are hypertrophied in the failing human, dog, and rat hearts, indicating that this process involves changes in cardiac innervation. However, despite a wealth of data on changes in intrinsic cardiac ganglionated plexus (GP) in late-stage disease models, little is known about the effects of hypertension on cardiac innervation during the early onset of heart failure development. Thus, we examined the impact of early hypertension on the structural organization of the intrinsic cardiac ganglionated plexus in juvenile (8-9 weeks) and adult (12-18 weeks) spontaneously hypertensive (SH) and age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats. GP was studied using a combination of immunofluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy in whole-mount preparations and tissue sections. Here, we report intrinsic cardiac GP of SH rats to display multiple structural alterations: (i) a decrease in the intracardiac neuronal number, (ii) a marked reduction in axonal diameters and their proportion within intracardiac nerves, (iii) an increased density of myocardial nerve fibers, and (iv) neuropathic abnormalities in cardiac glial cells. These findings represent early neurological changes of the intrinsic ganglionated plexus of the heart introduced by early-onset arterial hypertension in young adult SH rats.

Key words: Hypertension, Intrinsic cardiac neurons, Ganglionated plexus, Immunohistochemistry, Electron microscopy, Heart, Spontaneously hypertensive rats

Corresponding Author: Prof. Neringa Pauziene, Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickeviciaus Street 9, Kaunas LT-44307, Lithuania. e-mail: neringa.pauziene@lsmuni.lt
DOI: 10.14670/HH-18-453

Introduction

Persistent arterial hypertension leads to structural and functional alterations of the heart resulting in myocardial ischemia, fibrosis, and hypertrophy (Kuroda, 2015). Previous studies have shown that individual neurons composing the intracardiac ganglia are hypertrophied in the failing hearts of human, dog, and rat (Singh et al., 2013). It was associated with increased nerve growth factor levels found in the advanced stage failure hearts (Ueyama et al., 1992; Zettler and Rush, 1993; Singh et al., 2013). However, little is known about hypertension-induced effects on cardiac innervation during the early onset of HF development.

The intrinsic cardiac nervous system integrates neural signals from the central vagal neurons, sensory afferents, sympathetic preganglionic neurons and is proposed to involve local intracardiac interneurons (Armour, 2004, 2008). The spontaneously hypertensive (SH) rat was initially developed by Okamoto and Aoki (1963) as an animal model for studying chronic, persistent hypertension. It is an inbred strain established by selecting for high arterial blood pressure in the Wistar Kyoto (WKY) rat strain. Due to that, WKY rats are widely used as a control group for studying SH rats. In this model, dysregulation of cardiac sympathetic neurotransmission arises before the onset of hypertension, as shown by augmented sympathetic nerve activity already present early in postnatal life (Simms et al., 2009).

Similarly, intracellular calcium transient in the stellate and the superior cervical ganglionic neurons was shown to be increased in response to neuronal depolarization in prehypertensive (4 week old) SH rats (Li et al., 2012). In addition, the reduced activity of presynaptic norepinephrine uptake transporter has also been reported in the cultured stellate ganglionic cells of

Abbreviations. ad, adult; DOPA, dihydroxyphenylalanine; GP, ganglionated plexus; juv, juvenile; LD, left dorsal; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde solution; SH, spontaneously hypertensive; WKY, Wistar-Kyoto



the juvenile prehypertensive SH rats (Shanks et al., 2013a). This is accompanied by the fact that the resting heart rate is significantly higher in the SH rats than the age- and weight-matched WKY, despite the unchanged intrinsic contraction rate of the isolated atria and vagal influence (Shanks et al., 2013b). It is further shown that direct stimulation of the right stellate ganglion produces an increased tachycardic response in the young SH rats compared to age-matched WKY controls (Shanks et al., 2013b).

In SH rats, there is a parallel increase in the number of cholinergic neurons and adrenergic glomus cells in cardiac ganglia, a higher proportion of synaptic $\alpha 7$ -subunit but not $\beta 2$ -containing nicotinic receptors, and an elevation in the number of synaptic terminals onto neuronal somata of intrinsic ganglionated plexus GP (Ashton et al., 2020). The significant structural and functional plasticity occurs in the intracardiac nervous system, and the enhanced excitability through synaptic plasticity together with the remodeling of cardiac neuron electrophysiology contribute to the substrate for atrial arrhythmia in hypertensive heart disease (Ashton et al., 2020). The densities of noradrenaline nerve fibers in the epicardium of the right and left ventricles are higher in SH than in WKY rats from 30 to 90 days of age, and those in the myocardium of left ventricle and interventricular septum in SH rats are similar to those in WKY rats (Adams et al., 1989). Thus, the hyperinnervation of the heart by noradrenaline nerve fibers in SH rats may be a primary change of the heart prior to hypertension and may be caused by hyperfunction, increased activity of lysine and DOPA uptake, and increased relative weight of the stellate ganglia that innervate the heart (Kondo et al., 1996).

Therefore, the present study aimed to identify the impact of both the early and the bloom hypertension on the structural organization of the intrinsic cardiac ganglionated plexus in SH rat model compared with WKY rats.

Materials and methods

Animals

Juvenile (8-9 weeks) and adult (12-18 weeks) spontaneously hypertensive (SH) rats and control Wistar Kyoto (WKY) rats were used for the study. Juvenile SH rats before sexual maturity are prehypertensive in which the blood pressure only starts to climb; meanwhile, the adult SHRs, sexually matured animals of this breed, are generally considered as stably hypertensive with systolic blood pressure exceeding over 150 mm Hg (Okamoto and Aoki, 1963; Adams et al., 1989; Boluyt et al., 1995; Doggrell and Brown, 1998; Rezende et al., 2022). For immunohistochemistry, we used 8 hearts per group - juv. SH and WKY, ad. SH and WKY - 32 hearts in total. Three types of specimens were prepared from each

heart: (i) whole-mount of atria, (ii) whole-mount of the basal part of the ventricles, (iii) cryosections of the ventricular middle part. In addition, a transmission electron microscope investigation was performed on adults (SH n=3, WKY n=3). All rats were male and purchased from a breeding company Charles River Laboratories (Germany). They were grown until preferred age and euthanized in the Animal Research Center of the Lithuanian University of Health Sciences under permission No. G2-137.

Wholemout preparations and immunohistochemical protocol

After euthanasia in the Animal Research Center, the rat chest was opened, and the heart was perfused *in situ* with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM phosphate, pH-value 7.4, via a cannula inserted into the left ventricular cavity, then prefixed with 4% paraformaldehyde solution (PFA) in 0.1 M PBS (pH=7.4). Hearts were dissected from the chest and postfixed with 4% PFA for 40 min. After washing the heart two times in PBS, the atria were dissected from ventricles and the interatrial septum. Then the atria were flattened and pinned in a Petri dish with a silicone bottom filled with cold PBS. 2-3 mm below the coronary groove, the base of ventricles was cut off along the coronary groove, separated from the interventricular septum, and pinned flat to extirpate most of the myocardium from the endocardial side. When preparation of the upper portion of ventricles became thin due to separation of myocardial tissues, it was turned epicardium up and pinned flat to a silicone dish. In order to decrease background light for a laser scanning microscope examination, tissues were dehydrated and cleared using a dimethyl sulfoxide and hydrogen peroxide solution, as reported previously (Dickie et al., 2006). Subsequently, whole-mount preparations were rehydrated through a graded ethanol series (in each for 10 min), washed 3×10 min in 0.1 M PBS containing 1% Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany). Next, the non-specific binding was blocked for 2 hours in PBS containing 5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). The blocked for non-specific binding specimens were incubated with a Protein gene product 9.5 (38-1000, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) primary antisera for 48-72 hours at 4°C. Afterward, whole mounts were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS and incubated with donkey anti-rabbit antisera conjugated with a fluorochrome Alexa Fluor plus 488 (A32790, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) for 4 hours at room temperature. In the last stage, specimens were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS, mounted with a Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cover slipped, and sealed with clear nail polish.

Sectioned tissue preparations

Cardiac ventricles separated from the atria were washed in PBS and then immersed in 30% sucrose in 0.1M PBS containing 0.1% sodium azide in 4°C for 24 hours. Following cryoprotection, ventricles were frozen using a tissue-freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, USA) for sectioning. Next, tissues were sectioned into 18 µm slices using a cryomicrotome HM 560 (Micom, Germany) at -22°C, mounted onto Superfrost Plus microscope slides (Menzel Glaser, Germany), and dried at room temperature for 30 min. For immunohistochemical permeabilization, sections were incubated for 40 min. in a solution containing 9% DMSO and 1% Triton X-100 in 0.1M PBS. After 3x10 min washing in PBS, immunohistochemical procedures were performed as earlier described applying Protein gene product 9.5 (38-1000, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) and secondary antisera donkey anti-rabbit, conjugated with a fluorochrome Alexa Fluor plus 488 (A32790, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500). Finally, specimens were washed three times for 5-8 min in 0.1 M PBS mounted with a Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cover slipped, and sealed with clear nail polish. Both positive and negative controls were used.

Preparations for transmission electron microscopy

After euthanasia, the rat chest was opened, perfusion with PBS (300 ml, 140 mmHg) and prefixation with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB pH 7.4, (300 ml, 140 mm/Hg) were performed *in situ* through the left ventricle. Afterward, the hearts were excised from the chest and placed for 40 minutes in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4). Tissue samples of 1 mm³ from the definite sites of atria and ventricles were dissected using fine scissors and tweezers. The samples were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4), washed twice in PB, postfixed for two hours with 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB (pH 7.4) and dehydrated through a graded ethanol and acetone series then infiltrated into a mixture of Epon 812 and Araldite 502 resins. Tissue samples were carefully orientated for transverse sectioning in flat embedding molds under a stereoscopic microscope Stemi 2000CS (Zeiss, Göttingen, Germany) and polymerized for 48 hours at 60°C temperature. Semi-thin sections (1 µm) were cut with a Leica EM UC7 ultra-microtome (Leica Mikrosysteme Handelsges.m.b.H., Vienna, Austria) using a glass knife, and stained with methylene blue according to Ridgway (1986). Ultrathin sections (50-70 nm) were cut using the same Leica EM UC7 ultra-microtome with DiATOME ultra 45° diamond knife (Biel, Switzerland). Following Reynolds, samples were mounted on 600-mesh thin bar support nickel grids (Agar Scientific, Essex, UK) and stained with 2% uranyl acetate and lead citrate. Finally, ultrathin sections were

analyzed at 120 kV with a Tecnai BioTwin Spirit G2 transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, the Netherlands). Images were taken with a bottom-mounted 16 mega-pixel Eagle 4K TEM CCD camera, employing specific TIA software (FEI, Eindhoven, the Netherlands). They were photographed at grid bar intersections using 2900 magnification and analyzed with AxioVision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Microscopy and quantitative analysis

Whole-mount preparations of atria were snapped using confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). The ventricular whole-mounts were photographed using fluorescence microscope AxioImager Z1 equipped with digital camera AxioCamMRm applying a software package AxioVision (rel. 4.8.2; Carl Zeiss, Jena, Germany). The magnifications of images were at x10 (for panoramas of both preparations types) and x20 (for neural structures of atrial whole-mounts). The ganglia number per atrium, ganglion area, and neuronal somata number were counted and measured in atrial whole-mounts. Measurements were performed on 547 ganglia - juv. SH n=137, ad. SH n=143, juv. WKY n=120, ad. WKY n=147. All measurements were done manually under the same conditions. The criterion for the separation of ganglia was to have a distance of at least two neuronal bodies from the next ganglia. Neurons were identified and found in ganglia and epicardiac nerves. Neuronal bodies with prominent nuclei were counted as neurons and their somata areas were measured, whereas nerve cells without clearly noticeable nuclei were ignored during neuronal counting in serial ganglion sections. Neuronal bodies were counted and measured in separate stacks; meanwhile, the ganglia area was measured in summed stacks.

The epicardiac nerves, ≥ 5 µm in width, were measured manually from the right atrium left dorsal region (n=2246) and the *whole-mount preparations of ventricles* directly below the coronary sulcus (n=4369) in ventricular whole-mount preparations. In addition, digital images of atrial whole-mount myocardium were analyzed using a standard counting frame (150135 µm²), selecting threshold grey values and expressing the area of segmented nerve fibers in relation to the counting frame area as a percentage. Counting frames were selected manually to avoid big epicardiac or vascular nerves as artifacts.

Sectioned tissue preparations were snapped at x10 (for panoramas) and 20x (for neural structures) magnification using confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Epicardiac nerves, ≥ 5 µm in diameter, were investigated. The whole epicardiac nerve cross-section area and area labeled for PGP 9.5 pan-neuronal marker were measured with threshold values adequate for the best visibility and expressed as

the area occupied by PGP 9.5-positive neural structures in percentage. In addition, ventricles' myocardial innervation was measured in digital images using the same method as in atrial preparations.

In electron micrograms, the number of axons inside unmyelinated nerve fiber were counted. Unmyelinated and myelinated axon areas, myelinated nerve fiber area, and the overall nerve area occupied by unmyelinated fibers was measured. Axon diameter and G ratio (the ratio of the axon diameter to the outer diameter of the myelin sheath) was calculated. Furthermore, the area occupied by unmyelinated axons in the nerve was determined and expressed as a percentage.

Statistical analysis. Data are presented as absolute numbers (n), percentages (%), mean (M), and standard error (SE). Statistical analysis was done with IBM SPSS 20.0. Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the data. The parametric data samples from two groups were compared with the Student's t-test; means of non-parametric data were compared with the Mann-Whitney U test. The Kruskal-Wallis test was employed for comparing non-parametric data of multiple groups. Differences were considered significant when the p-value was equal to or less than 0.05.

Results

The intracardiac nervous system includes three distinct neural components: 1) autonomic neurons forming intracardiac ganglia on atrial and ventricular surfaces; 2) large epicardial nerves through which nerve fibers proceed to reach their effector targets; 3) and a fine meshwork of nerve fibers encompassing the myocardium. Each of these components is considered below in detail.

Intracardiac ganglia and neurons

In all animals studied, intracardiac ganglia were mainly localized within the hilum of the heart. Ganglia largest in size (containing up to 1410 neurons), were composed of the defined ganglionic fields scattered predominantly on the anterior upper side of the left atrium. These ganglia were interconnected by large nerves and fine nerve fibers that together formed a ring-like plexus as they extended along the perimeter of the pulmonary vein roots (Fig. 1). Ganglia found further away from the main neuronal network of the heart hilum were smaller in size and did not form ganglionic fields. Solitary neuronal somata and neuron bodies forming small groups (average count - 22, range 2-305) were also found and often were observed within large epicardial nerves. In contrast, no intracardiac ganglia were found residing in the cardiac ventricles.

In juvenile SHR, both the number of intracardiac ganglia and the ganglion area were slightly larger in regard to age-matched WKY controls (Table 1). This was accompanied by the significantly augmented quantity of neuronal somata per ganglion compared to juvenile WKY rats. Interestingly, in juvenile SHR rats, the average area of individual neuron bodies composing the ganglia was found to be smaller than that in normotensive WKY counterparts.

In adult animals of both strains, all measured morphometric parameters were reduced compared to juveniles (Table 1). These age-related differences were less pronounced in the normotensive WKY group. In adult WKY rat hearts, the area of intracardiac ganglia was slightly smaller than that found in juveniles, whereas in adult SHR this was reduced by 38% compared to strain-matched juveniles. Similarly, the

Table 1. The mean parameters (\pm standard error) of the analyzed neural structures in the SHR and WKY rats. Neural structures were immunohistochemically labeled for PGP9.5.

Parameter	WKY				SHR			
	Juvenile		Adult		Juvenile		Adult	
	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)
Ganglia								
Ganglion number	121	29.5 (13.2)	148	23.3 (4.8)	139	34.8 (10.6)	145	22.5 (7.0)
Ganglion area (μm^2)	121	52348.9 (6565.5)	148	45097.0 (4402.7)	139	70973.1 (16186.3)	145	43895.8 (4924.5)**
Neuron area (μm^2)	697	643.6 (10.8)	996	532.2 (7.1)**	1145	581.6 (6.6)*	1107	502.7 (6.4)*, **
Neuronal number in ganglion	5876	52.4 (10.1)	6811	33.0 (2.8)	9336	94.7 (22.0)*	5954	29.8 (3.2)**
Epicardial nerves								
Atrial nerve width (μm)	544	28.6 (29.8)	368	32.2 (28.3)**	571	29.0 (29.7)	763	25.8 (24.6)*, **
Ventricular nerve width (μm)	295	22.2 (1.1)	673	27.1 (0.7)	308	26.9 (1.1)*	1119	27.4 (0.6)
PGP 9.5 in epicardial nerve cross-sections (%)	151	72.5 (0.9)	149	81.6 (1.6)**	162	73.3 (0.8)	111	71.7 (0.9) *
Density of myocardial nerve fibers (%)								
Atrial	144	0.96 (0.02)	70	1.0 (0.03)	210	0.77 (0.01)	42	1.2 (0.5)*, **
Ventricular	195	0.65 (0.4)	235	1.1 (0.6)**	198	1.35 (0.9) *	147	1.5 (1.0)*
Right ventricular	78	1.04 (0.1)	69	1.1 (0.1)	69	1.47 (0.1)*	46	1.7 (0.1)*
Left ventricular	60	0.6 (0.1)	103	0.7 (0.04)**	71	0.5 (0.1)	53	0.65 (0.04)**
Interventricular septal	57	0.3 (0.03)	63	0.4 (0.03)**	58	0.47 (0.04)*	48	0.5 (0.04)

*: statistically significant difference between SHR and WKY groups of the same age, $p < 0.05$; **: statistically significant difference between juvenile and adult groups in WKY or SHR groups, $p < 0.05$.

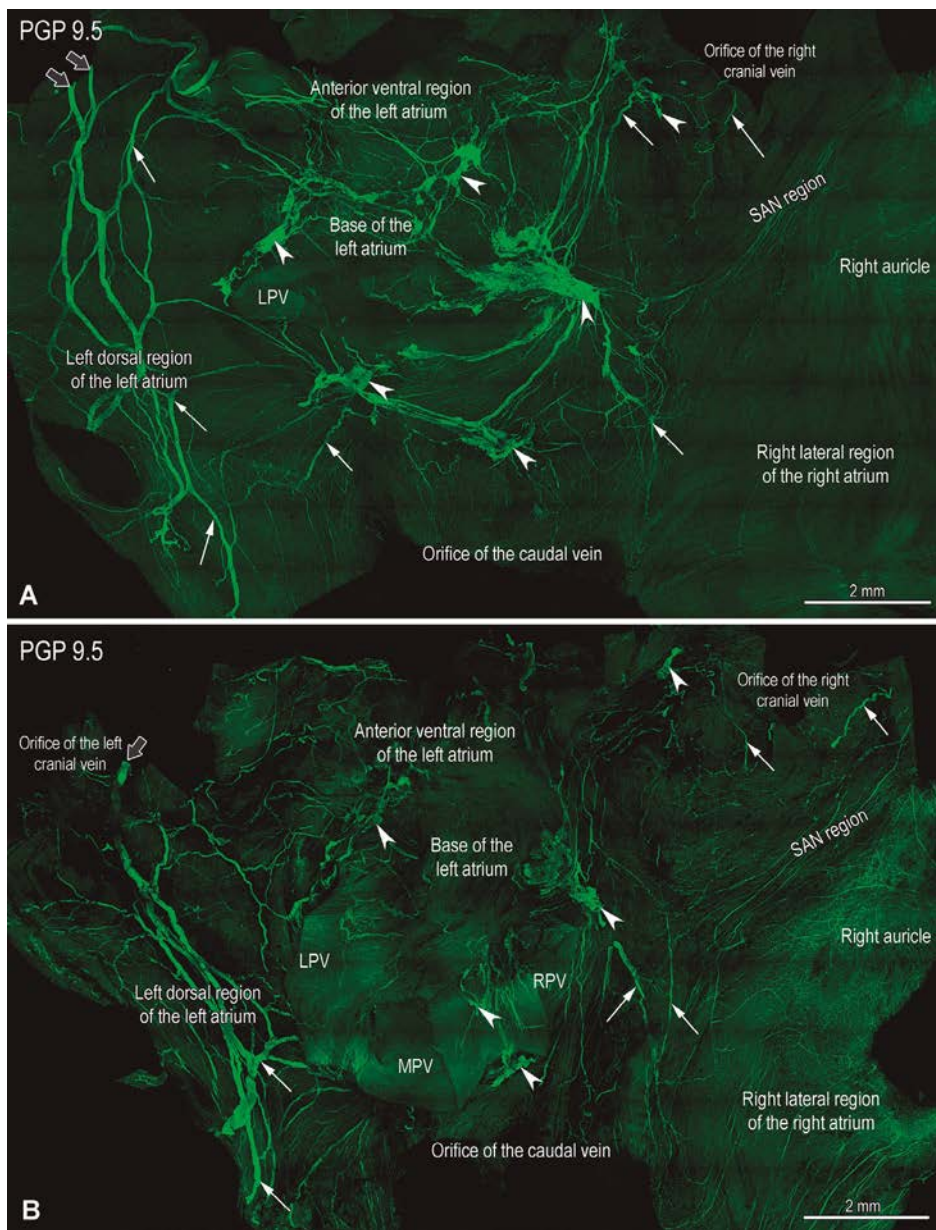


Fig. 1. Laser-scanning (confocal) microphotographs to illustrate a general view of morphological patterns of intracardiac ganglionated nerve plexus of the SHR atria of 8 **(A)** and 14 week **(B)** old animals. The general views of whole mounts of the rat atria were assembled with the aid of software ZEN 2010B SP1 from 108 images displaying neural structures immunochemically labeled for the antigen PGP 9.5. Note, there are decreased ganglionic clusters in the aged (panel **B**) compared to the young rats (panel **A**). White arrows indicate some epicardiac nerves, arrowheads point to some ganglia, and thick arrows point to preganglionated nerves, which enter the heart through the heart hilum at the left cranial vein. Abbreviations: LPV - left pulmonary vein, MPV - middle pulmonary vein, RPV - right pulmonary vein.

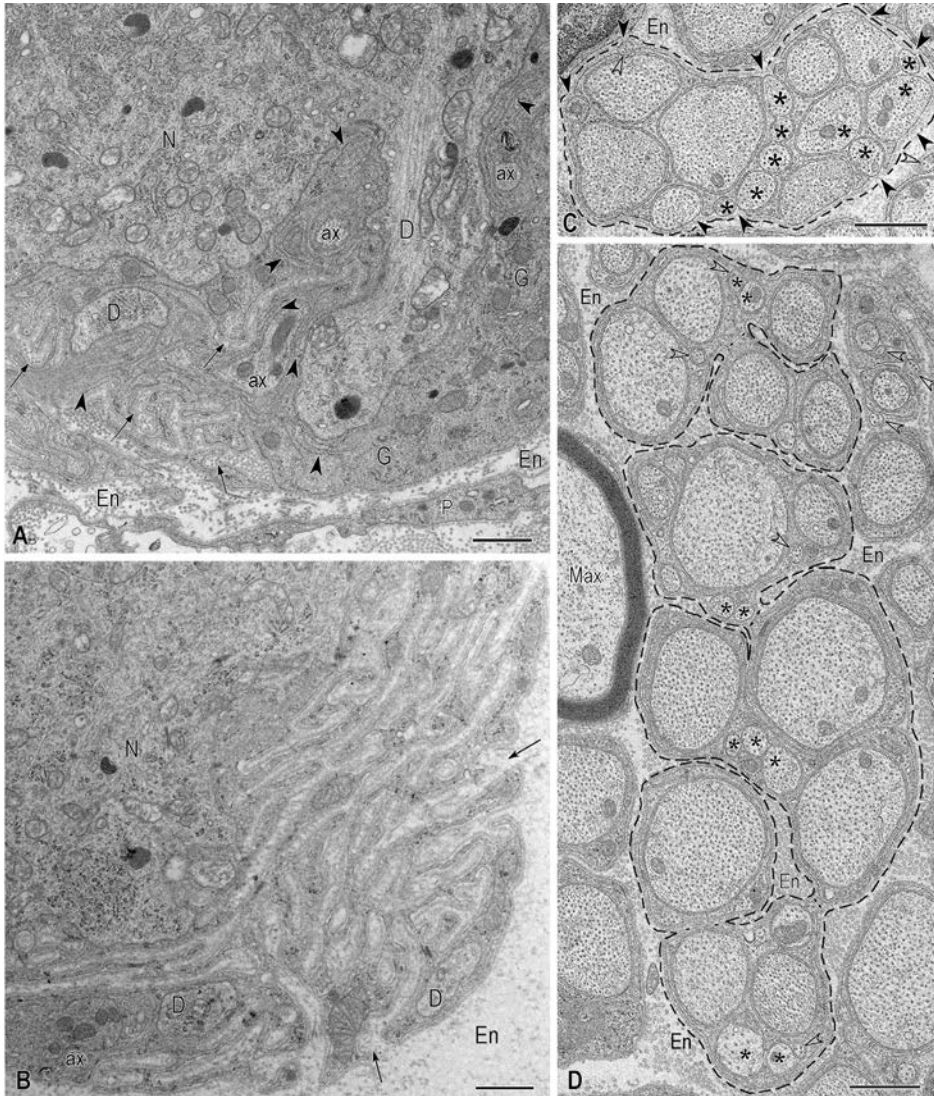


Fig. 2. Electron micrographs to demonstrate an ultrastructure of intrinsic cardiac ganglia and unmyelinated nerve fibers in WKY (**A, C**) and SH (**B, D**) rats. **A.** A fragment of a WKY neuronal soma with a satellite cell covering it. The top of the electronogram is occupied by a neuronal body (N) from which the dendrite (D) extends downwardly. At this location, the neuron body is surrounded by a thick layer of neuroglia (G) which is multi-layered (arrowheads). In some sites, deep invaginations intervene in the neuroglia, and endoneurial collagen fibers (arrows) interpose between the satellite cell processes. Fragments of several axons and dendrites are seen around the neuronal body. **B.** Fragment of an SHR neuronal body. The satellite cell that covers the neuron looks porous with deep invaginations containing endoneurial collagen fibers (arrows). A few dendrites (D) and one axon (ax) with vesicles are visible at a distance from the neuronal body. **C.** Unmyelinated nerve fiber from the WKY rat nerve, in which the axons are arranged compactly, and there are no Schwann cell invaginations. Some axons are completely covered by the glia cell; others are opened and covered only with the basal membrane (arrowheads). Some axons are placed in one throat of a Schwann cell and adjoin each other (*). **D.** Unmyelinated nerve fibers of the SH rat. A dotted line marks the basal membrane of each fiber, indicating the boundaries of the fiber. Schwann cells in these fibers are fractioned with specific invaginations of the endoneurium that separate a single nerve fiber into discernible parts interconnected by narrow glial bridges. Numerous very thin axons with a diameter of less than $0.2 \mu\text{m}$ (white arrowheads) are common in these fibers. Some axons adjoin each other (*). Abbreviations: D - dendrite, ax - axon, Max - myelinated axon, En - endoneurium, P - perineurium. Scale bars: $1 \mu\text{m}$.

Intracardiac nerve plexus in spontaneously hypertensive rats

number of neurons per ganglion was slightly reduced in WKY adults but significantly decreased by 68% in SHR adults compared to strain-matched juveniles.

In cross-species comparison, ganglion neuron count was 44% greater in juvenile SHR compared to age-matched normotensive WKY rats; however, no differences between strains were found in ganglion neuron count in adult animals (Table 1).

Average neuron size was 10% greater in juvenile normotensive WKY compared to SHR juveniles. In adult animals, the average neuron size was still significantly smaller in SHR, yet this difference was less pronounced (6%). This might be attributed to the fact that with aging, the reduction of average neuron size was more

pronounced in WKY compared with SH rats (Table 1).

Next, autonomic ganglia of adult SHR and WKY rats were examined at the cellular level by means of transmission electron microscopy (TEM). All intracardiac neuron bodies had a characteristic cytoplasmic structure at the ultrastructural level. In contrast to WKY animals, the nucleolemma of some SHR neurons was distorted with oscillating nucleic boundaries. In most cases, satellite glial cells ensheathed the intracardiac neuron body in a single cell layer, yet the neuroglial layer in some instances was much thicker and was composed of multiple layers of satellite cells. Interestingly, the glial sheath surrounding the intracardiac neurons in SHR and WKY rat hearts was

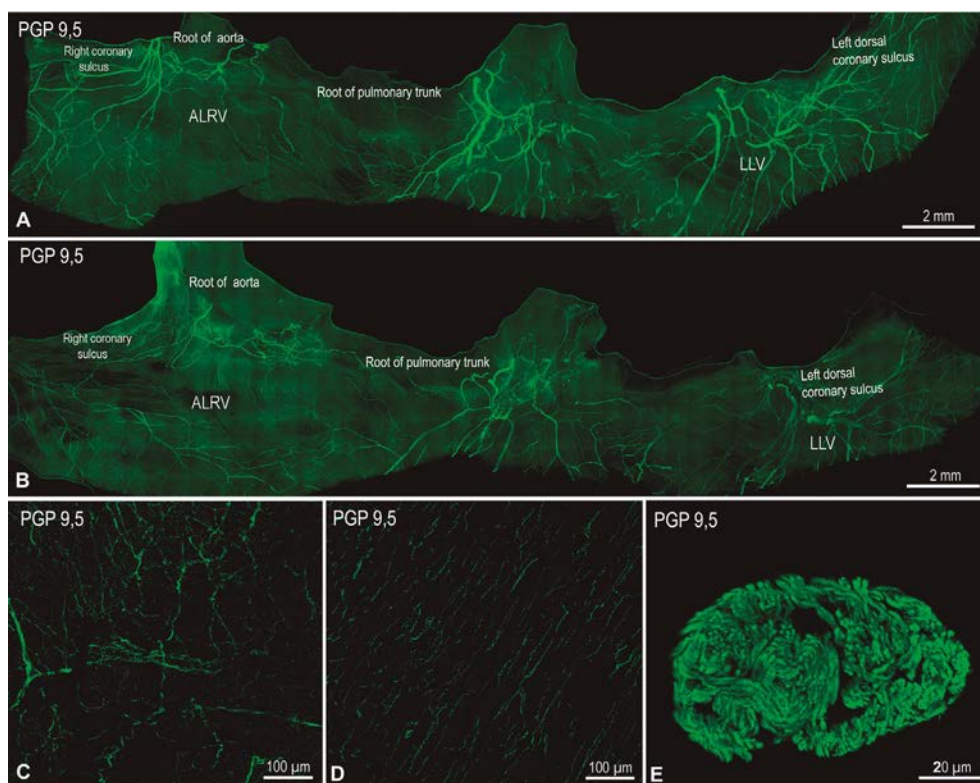


Fig. 3. Immunofluorescent images from whole-mount preparations labeled for PGP 9.5 of 14 week old WKY (panel **A**) and SHR (panel **B**) cardiac ventricles. Whole-mount preparations were made, cutting off the bases of cardiac ventricles and flattening them under a stereoscopic microscope. The displayed general views were assembled from 500 images with the aid of the software AxioVision (Rel. 4.8.2). Panel **C** demonstrates the nerve meshwork in the atrial myocardium of 14 week old SHR, while panel **D** is a transverse section of cardiac ventricles demonstrating profiles of myocardial nerve fibers immunohistochemically stained for PGP 9.5. Panel **E** shows one of the thick epicardial nerves in 16 week old SHR ventricles that is full of PGP 9.5 positive nerve fibers. LLV, lateral left ventricle; ALRV, anterolateral right ventricle.

oftentimes porous with deep collagen-containing invaginations of the endoneurium (Fig. 2A). Such glial formations were much more pronounced in the SHR neurons, where such porous glial sheaths were found covering large portions of the neuronal cell body (Fig. 2B). Occasionally, cell bodies of satellite cells had well-defined centrioles. Within the intracardiac ganglia, axonal terminals and/or synapses were not abundant, but they were more commonly observed in WKY rat ganglia compared to that of SHR.

Atrial and ventricular epicardiac nerves

In rats, epicardiac nerves access walls of cardiac ventricles mainly by two pathways. The first neural route proceeds throughout the arterial part of the heart hilum at the roots of ascending aorta and pulmonary trunk (Fig. 1). Epicardiac nerves from this site extend widely on the ventral side of cardiac ventricles, as described in detail by us previously (Batulevicius et al., 2003). The second neural route by which epicardiac nerves pass on the dorsal side of cardiac ventricles comes from the venous portion of the heart hilum along the left cranial vein and towards the heart apex (Fig. 1). This neural pathway contains epicardiac ganglia on the left atrium at the root of the left and middle pulmonary veins and has been named the left dorsal ganglionated subplexus (Batulevicius et al., 2003). The left dorsal subplexus supplies the dorsal walls of both cardiac ventricles and is linked by thin interconnecting nerves with the numerous nerve cells concentrated into two large clusters on the heart base in the limits of the venous part of the heart hilum. Both the number and morphologic pattern of epicardiac nerves on walls of cardiac ventricles is highly variable (Fig. 3A,B).

Next, epicardiac nerves were examined in whole-mount cardiac ventricles and atria preparations. For atrial preparation, epicardiac nerves were measured only in the left-dorsal subplexal (LD) area due to abundant and highly replicable innervation patterns within this region between different hearts. Only nerves with a width greater than 5 μm were selected for evaluation. Overall, the width of both ventricular and atrial nerves varied greatly, and some reached up to 200 μm . No differences in atrial nerve thickness were found between the juvenile SHR and WKY rats (Table 1). In contrast, the thickness of ventricular epicardiac nerves was significantly larger in SHR juveniles compared to age-matched WKY rats. The atrial nerves in adult animals compare to juveniles thickened in WKY, whereas in SHR it is thinned. At the same time, ventricular nerves stayed unchanged during aging in both groups (Table 1).

Based on the results of immunohistochemical analysis, the percentage area immunoreactive for pan-neuronal marker PGP 9.5, also known as UCHL1, within the epicardiac nerves did not differ between the juvenile SHR and WKY rats. However, this ratio changed in adult animals. In normotensive WKY rats, it increased 13% ($p < 0.001$) during aging, while in SHR, it remained

unchanged, resulting in significant 12% ($p < 0.001$) difference between the two strains (Table 1).

Axons within the unmyelinated and myelinated nerve fibers had a characteristic ultrastructural appearance in both adult strains examined. In WKY rats, unmyelinated nerve fibers with compact Schwann cells resulting in the smooth outline of the fiber (Fig. 2C) predominated in the epicardiac nerves. In stark contrast, most Schwann cells in SHR nerves were fractionated, with specific invaginations of the endoneurium that separated a single nerve fiber into distinguishable parts interconnected by a narrow glial fissure (Fig. 2D). Occasionally, fractionated fibers were found in the intracardiac nerves of WKY rats, especially close to intracardiac ganglia. In both strains, within the intracardiac nerves, multiple axons were incompletely covered by the glial cells and oftentimes contacted each other within a single Schwann cell groove (Fig. 2C,D).

The area of unmyelinated axons was lesser in SHR nerves compare to WKY, but tendency was different for the ventricles and atria. The area of axons was 23% lesser in the ventricular nerves and only 17% lesser in atrial (Table 2). Furthermore, classifying non-myelinated axons into 5 categories based on their diameters (<0.5; 0.5-1; 1-1.5; 1.5-2; >2 μm) revealed that small-diameter axons predominate within the SHR epicardiac nerves. Contrarily, the percentage of large-diameter axons was markedly higher in the WKY rat epicardiac nerves (Fig. 4).

The area occupied by axons in the nerve (%) was found to be significantly smaller in both the atrial and ventricular SHR epicardiac nerves (Table 2).

The area of myelinated nerve fibers differed significantly between atrial and ventricular nerves. In the atrial nerves, axon diameter was smaller, whereas myelin sheath was thicker, as indicated by a lower G ratio (axon diameter/ nerve fiber diameter) within both strains. However, they were found to be similar in corresponding

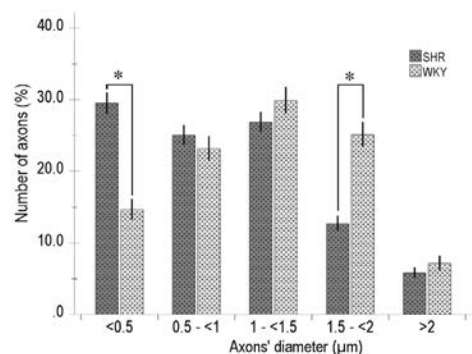


Fig. 4. Abundance in percentages of the different axonal diameters in adult SH and WKY rats. Vertical lines on the bars indicate limits of standard errors (Mann-Whitney U test, asterisks marks $p < 0.05$).

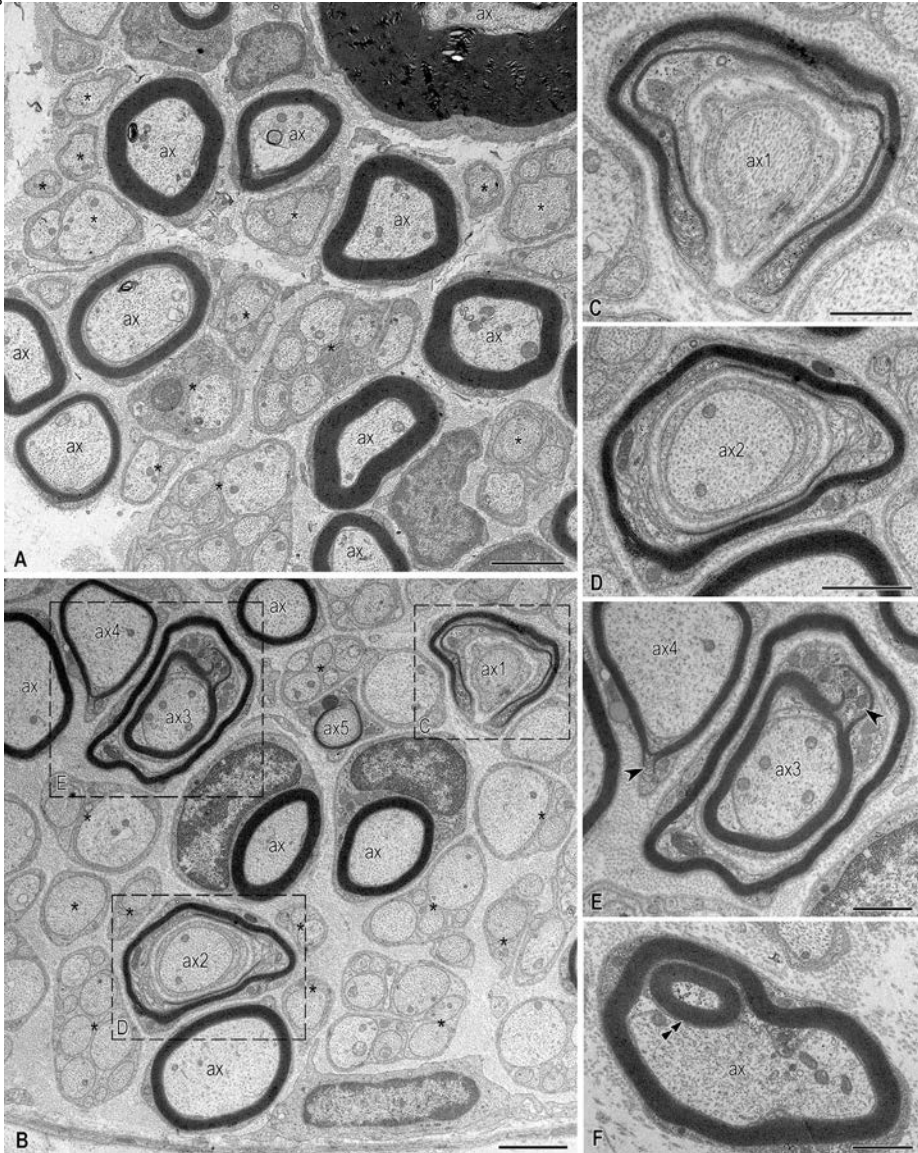
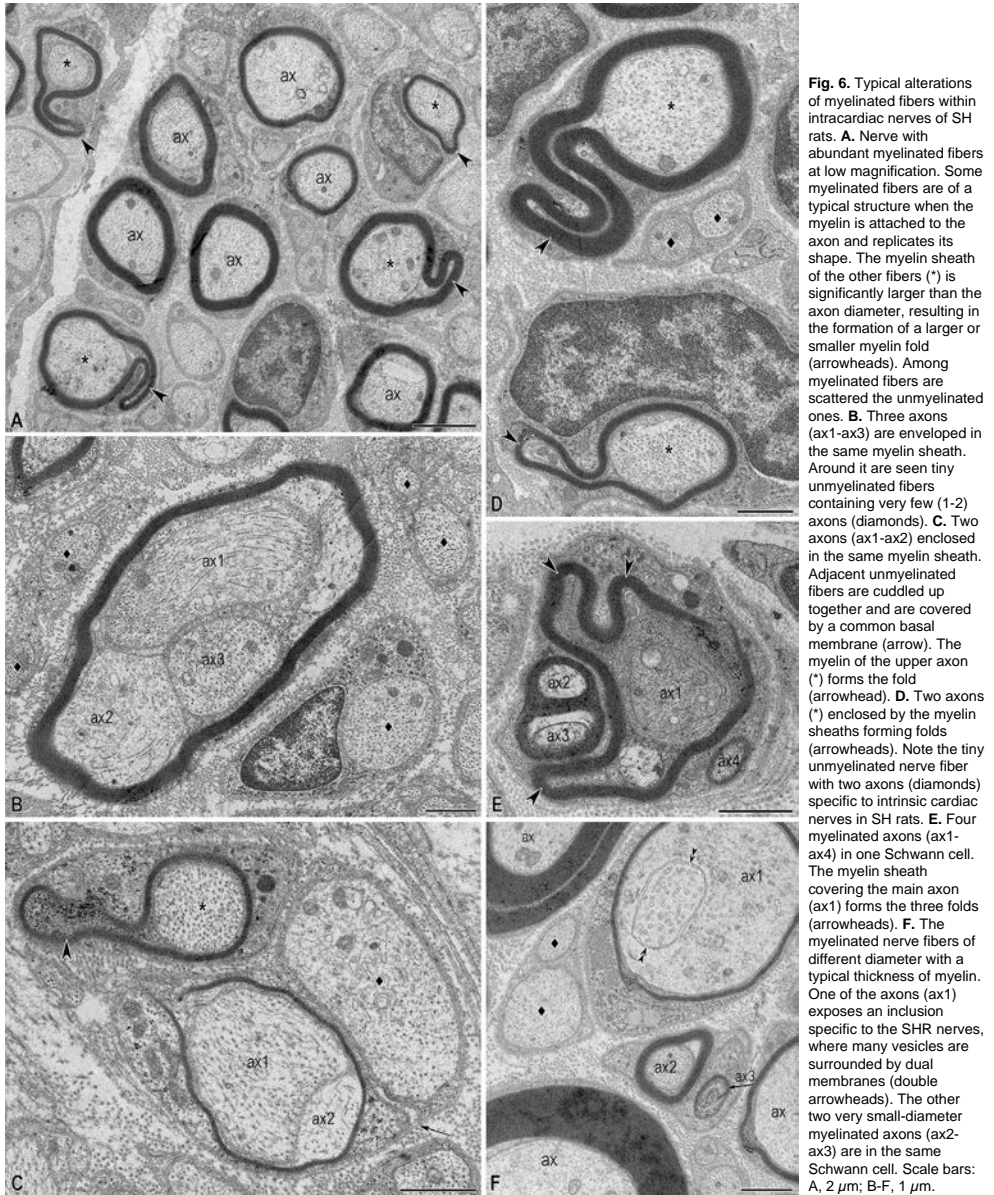


Fig. 5. Electron micrographs of intracardiac nerves in WKY (A) and SH (B-F) rats. **A.** Normal myelinated (ax) and unmyelinated (*) nerve fibers from the WKY rat nerve. Myelin sheath is attached to the axon and corresponds to its diameter and shape. Compact and thin unmyelinated nerve fibers are scattered between the myelinated ones. In the right upper part of the image, a fragment of thick myelinated fiber (axon diameter is 4.9 μm , that is unusual for intracardiac nerves) is seen. **B.** Typical electron microscopic image of intracardiac nerve in SH rats. Some myelinated nerve fibers (ax) are of normal ultrastructure. In other ones, there are typical visible alterations: ax1 - depicts the collapsed/empty myelin sheath encasing an axon with its outer surface (enlarged in panel C), ax2 - endoneurium intervenes between the myelin and the axon covered by a layer of glial cells (enlarged in panel D), ax3 - endoneurium is between the myelin and a myelinated axon (enlarged in panel E), ax4 and ax5 - cytoplasm is interposed between the myelin layers which formed specific protrusions that varied in size, yet remain inside the Schwann cell always (white arrowheads). Note the same protrusion which penetrates the myelin of ax3. ax5 (1.18 μm in diameter) is noticeably thinner than the adjacent ones and encloses a very thin myelin sheath. The unmyelinated nerve fibers are marked by asterisks (*). **F.** Intra-axon myelin ring (double arrowhead) of the myelinated nerve fiber in the SH rat. Scale bars: A, B, 2 μm ; C-F, 1 μm .

Intracardiac nerve plexus in spontaneously hypertensive rats



parts of the heart between WKY and SH rats (Table 2).

Myelinated fibers in nerves of WKY rats mainly had myelin sheath attached to the axon corresponding to its diameter and shape (Fig. 5A). However, a number of unusual ultrastructural features localized to myelinated nerve fibers were found (Figs. 5, 6). These features can be categorized based on (1) differences attributable to Schwann cells and/or (2) differences observed in axons.

In the former case, unusual axon-myelin relations are exemplified in Fig. 5B-E. A collapsed/empty myelin sheath often enclosed an axon with its outer surface (Fig. 5B,C). Also, endoneurial collagen was observed in between the myelin sheath and the axon (Fig. 5B,D,E). In such fibers, some axons were without myelin (Fig. 5B,D), whereas others were covered by an additional layer of myelin (Fig. 5B,E). In some fibers, the cytoplasm was observed between the myelin layers, which formed characteristic protrusions that varied in size; however, they always remained inside the Schwann cell (Fig. 5B,E). Myelin swellings (tomacula) were also found to be present (Fig. 5F).

Furthermore, some myelinated axon changes were observed. Markedly smaller axon cross-section areas compared to the perimeter of the myelin sheath enclosing them led excess myelin to form protruding folds that varied in size and structure (Fig. 6A,C,D). In addition, multiple axons were observed insulated by a single myelin sheath in some instances. This is exemplified by a myelin-covered fiber containing three distinct axons (Fig. 6B). Interestingly, individual Schwann cells were found to incorporate two (Fig. 6F) and occasionally multiple myelinated axons at once (Fig. 6E). Regularly, axons possessed a number of unusual artifacts such as an accumulation of vesicles ensheathed by a single membrane (Fig. 6F), laminated bodies, spiral membrane formations, fractionated myelin, or intra-axon myelin rings.

Innervation of myocardium

In juvenile animals, the density of nerve fibers innervating the atrial myocardium was comparable between the SHR and WKY strains (Table 1). Overall, innervation of both the atrial and ventricular myocardium increased with aging, although to different extents in hypertensive and normotensive animals. In WKY rats, myocardial innervation of the atria did not differ, whereas that of the ventricles was markedly higher in adult animals. In SHR, the density of nerve fibers innervating the atrial myocardium increased significantly, while the increase of ventricular innervation was only marginal in adult animals compared to juveniles (Table 1).

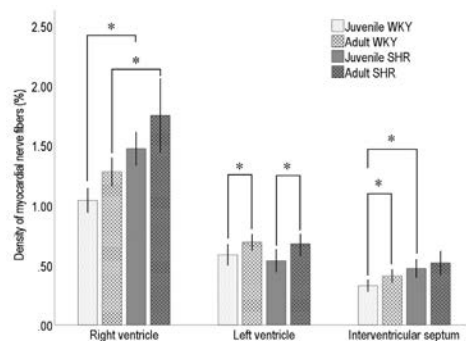


Fig. 7. Density in percentages of myocardial nerve fibers in adult SH and WKY rats. Vertical lines on the bars indicate limits of standard errors (Mann-Whitney U test, asterisks marks $p < 0.05$).

Table 2. The mean parameters (\pm standard error) of neural structures in WKY rats versus SHR were analyzed with the aid of a transmission electron microscope.

Parameter	WKY		SHR	
	Atrial	Ventricular	Atrial	Ventricular
Unmyelinated fibers				
Number of axons measured (n)	1381	978	999	1953
Axon area (μm^2)	1.5 (0.03)	1.2 (0.04)**	1.2 (0.03)*	0.9 (0.02)*, **
Axon diameter (μm)	1.3 (0.01)	1.07 (0.02)	1.11 (0.02)*	0.9 (0.01)*
Mean axonal number in nerve fiber	2.5 (0.1)	4.4 (0.6)**	2.8 (0.1)*	4.4 (0.2)*
Axon area in nerve (%)	48.9 (1.2)	54.4 (1.4)**	43.6 (1.1)*	50.1 (0.8)*, **
Myelinated fibers				
Number of axons measured (n)	92	28	200	146
Axon area (μm^2)	4.1 (0.1)	5.5 (0.3)	4.2 (0.2)	5.1 (0.2)**
Axon diameter (μm)	2.3 (0.04)	2.6 (0.1)**	2.2 (0.1)	2.5 (0.1)**
Nerve fiber area (μm^2)	7.2 (0.3)	8.8 (0.6)**	7.3 (0.2)	7.6 (0.3)
Nerve fiber diameter (μm)	3.0 (0.1)	3.3 (0.1)**	2.95 (0.1)	3.0 (0.1)
G-ratio	0.77 (0.01)	0.8 (0.01)**	0.75 (0.01)	0.8 (0.01)**

*: statistically significant difference between WKY and SHR groups, $p < 0.05$; **: statistically significant difference between atrial and ventricular fibers in WKY or SHR groups, $p < 0.05$.

The innervation of the ventricular myocardium was not uniform. Comparison of the nerve fiber density between the right and the left ventricles and the interventricular septum revealed innervation of the right ventricle to be higher than that of the left, while interventricular septum innervation was rather sparse. These results were found in all studied groups (Fig. 7, Table 1).

The density of fine neural meshwork innervating the right ventricle was higher by about 30% in both juvenile and adult SHR compared to age-matched WKY rats (Fig. 7). An opposite result was found for the left ventricle in which the myocardial innervation was ~10% less dense in SHR compared to aged-matched normotensive controls. Although the density of innervation in the left ventricle was markedly lower than the right one in all groups, comparatively most remarkable innervation changes during aging appeared in the left ventricle of SH rats (Table 1).

Discussion

Here, we investigate the influence of early-onset arterial hypertension on the structural organization of the intrinsic cardiac ganglionated plexus in the SHR. Primary findings of the present study are that: (i) innervation of the heart exhibits a number of morphological alterations in association with the development of arterial hypertension in adult SHR; (ii) age-related differences in cardiac innervation are present in both SHR and normotensive WKY rats and should be taken into consideration when assessing hypertension-related effects on cardiac function. These conclusions are based on our data showing that in young adult SHR hearts: (i) the neuronal number per intracardiac ganglion is significantly decreased; (ii) axonal diameters and the axonal area within epicardial nerves is reduced; (iii) the density of myocardial nerve fibers is higher, but significantly decreases with aging, and (iv) glial cells in intracardiac ganglia and nerves display a number of ultrastructural alterations indicative of cardiac neuropathy.

Whereas a wealth of data is available on the remodeling of the intrinsic cardiac nervous system related to chronic hypertension in the development of ventricular hypertrophy and heart failure, data on the effects of early-onset of hypertension on the cardiac autonomic innervation, related specifically to cardiac neuromorphology, is lacking, thus providing the rationale behind the present study. Wistar Kyoto (WKY) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) are known to have divergent hemodynamic and behavioral features despite being highly similar genetically (Huang et al., 2016). Compared to age-matched normotensive WKY rats, SHR display lower resting heart rate, significantly elevated arterial blood pressure, higher left ventricular mass to body weight ratio, reduced ejection fraction and fractional shortening, prolonged deceleration time, and lowered E/A ratio, among a host of other alterations

(Kokubo et al., 2005). It was shown that an increased number of inflammatory cells might play a role in peripheral sympathetic hyperactivity observed in the early stages of hypertension (Neely et al., 2022). Our data indicate that 8 week old prehypertensive SHR animals, i.e., SHR that do not exhibit arterial blood pressure elevation yet, already possess a range of distinct morphological alterations related to cardiac innervation compared to age-matched WKY controls. With aging, some of these features change to a similar extent in both SHR and WKY strains, e.g., intracardiac neuron size proportionally decreases in adult animals compared to juvenile hearts. For example, many strain-related changes only occur in association with the development of arterial hypertension in adult SHR animals.

The intracardiac ganglia in both studied rat strains formed a ring-like plexus around the entry of the pulmonary veins and were interconnected by a series of fine nerve fibers and were similar to that previously studied in Sprague-Dawley (Richardson et al., 2003) and outbred Wistar rats (Batulevicius et al., 2003). Our data indicate that the number of intracardiac ganglia and ganglionic neuron counts decreases in adult animals in both WKY and SHR strains. This contrasts with previous studies reporting an overall increase in neuron number in the intracardiac ganglionated plexus in the SHR (Ashton et al., 2020). Although this warrants further investigation, this discrepancy might be attributed to differently aged animals used in the study - 60-72 weeks compared to 12-18 weeks used in this study. Alternatively, this could be attributed to a different method of neuron quantification, as here, we employed manual nuclei counting within the intrinsic ganglia compared to neuron count estimation based on a fixed area. However, it is worth mentioning that the general trend observed in our and Ashton et al. (2020) study in the SHR matches our previous observations in outbred Wistar rats where young adult hearts (8-12 weeks) had fewer intracardiac neurons compared to juvenile (3-4 weeks) rats, whereas hearts of aged animals (>48 weeks) contained the greatest number of intracardiac neurons compared to the other two age groups (Batulevicius et al., 2003). Together, this might represent the plasticity and the dynamic nature of the intracardiac nervous system throughout the ontogenesis that needs to be considered when assessing changes related to (or induced by) specific pathological states.

Recently, it was demonstrated that abnormal intracellular calcium homeostasis may cause autonomic dysfunction characterized by suppressed parasympathetic and increased sympathetic activity in young prehypertensive SHR (Li and Paterson, 2019). This dysregulation of presynaptic neuronal Ca^{2+} handling contributes presumably to hypertension, among other cardiac diseases. As a consequence of Ca^{2+} overexpression, abnormalities of mitochondria and endoplasmic reticulum take place in stellate ganglia sympathetic neurons of prehypertensive SHR (Shanks et al., 2017). These recent findings confirm the earlier

implications that prehypertension may impact the structural changes within intracardiac neurons as has been implied analyzing hypertrophied intracardiac neurons in hearts of the human, canine, porcine, and rabbit following myocardium ischemia or experimentally induced heart failure syndrome (Meerson and Krokhnina, 1965; Richardson et al., 2003; Singh et al., 2013). Since SHR develops compensatory ventricular hypertrophy attributable to increased cardiac load due to chronic and severe hypertensive phenotype as early as 6 months postnatally (Singh et al., 2013), we attempted to explore whether this would lead to size alterations of ganglionic neuronal somata reported in other species. Our data suggest that short-term hypertension in the SHR, i.e., occurring between 12-18 weeks of life, is not yet associated with neuronal hypertrophy as indicated by the significantly smaller neuronal size found in both SHR and WKY adult rats compared to strain matched-juveniles. It is possible that smaller neurons could reflect parasympathetic inhibition or yet unmanifested compensatory parasympathetic sensitization in the progression of compensatory hypertrophy in the SHR (Singh et al., 2013; Ashton et al., 2020). This assumption is based on the fact that the intracardiac neurons located within the rat's heart are almost exclusively immunoreactive for choline acetyltransferase (ChAT) - a well-established marker of parasympathetic neurons (Richardson et al., 2003). However, this hypothesis requires further investigation into the neurotransmitter phenotypes of the intracardiac neurons between SHR and WKY hearts.

Regarding the epicardial nerves, both our ultrastructural data and immunofluorescence labeling with PGP 9.5 indicated a possible axonal loss associated with the onset of arterial hypertension in the SHR, as no age-related changes were detected in the WKY rats. This is an interesting finding that relates to a previous (Adams et al., 1989) study, which reports tissue noradrenaline (NE) concentration in the left ventricle and interventricular septum of the SHR to be nearly twice as that found in age-matched WKY controls aged 4 to 14 weeks. While in aged, 20 weeks and older, NE tissue levels were similar in both strains (Adams et al., 1989). It might be due to the loss of myocardial nerve fibers observed in this study. In the juvenile group (8-9 weeks), the percentage density of myocardial nerve fibers was 52% greater in the SHR (WKY 0.65% vs. SHR 1.35%), while this difference decreases to 23% in adult animals (12-18 weeks, WKY 1.17% vs. SHR 1.51%). Together, this suggests that autonomic activation happens: (i) already at a young age, with (ii) a greater extent at younger than older age and (iii) prior to the manifestation of arterial hypertension. Another difference to consider between our and Adams et al. findings is that we assessed fiber densities in both right and left ventricles and found the right ventricle to exhibit a greater degree of innervation. Similarly, Kondo et al. studied the densities of myocardial noradrenergic nerves and found increased right ventricle innervation in stroke-

prone SHR at the age of 30 and 90 days (Kondo et al., 1996). This result might be explained by myocardial hypertrophy in adult animals that affects the left ventricle to a greater extent and is not accompanied by an increase in innervation. However, differential innervation of left and right ventricles in young animals remains an open question.

The importance of glial cells in the functioning of the central nervous system is commonplace as glial cells actively shape synaptic properties, regulate neuronal firing, and are essential for metabolic support, ionic homeostasis, and neurovascular modulation (Simard and Nedergaard, 2004; Attwell et al., 2010; Araque et al., 2014). In addition, glial signaling plays an active role in modulating the excitatory circuits in the peripheral (enteric) nervous system (McClain et al., 2015), whereas recent evidence has highlighted the central role of enteric glia cells in the regulation of gut homeostasis as well as their implication in digestive and extra-digestive diseases (Neunlist et al., 2014). In contrast, little is known about the role of glial (Schwann and satellite) cells in the intracardiac nervous system (Tedoldi et al., 2021). For this, our results on intracardiac glial cells can only be discussed in the context of autonomic plexi in other organs.

It is well established that Schwann cells rarely divide during adult life in health. The rate of Schwann cell proliferation in adult life increases noticeably under various experimental conditions (e.g., after axonal section and following the administration of certain chemical substances) or some pathological conditions (Pannese, 2015). Interestingly, centrioles within Schwann cells were observed at many instances in our study, indicating increased mitotic activity of this cell population associated with arterial hypertension. It has been suggested that satellite glial and Schwann cells can be activated by inflammatory responses, supporting a more active role of these cells other than just being a support network for neuronal cells (Tay et al., 1984). Thus, our finding of multilayer and porous satellite cells within intracardiac ganglia could indicate an activated state which might be evoked by an ongoing inflammatory/pathological process.

Furthermore, myelin alterations, like those observed in the present study, have been previously described in the context of various neuropathies. In the common peroneal nerve of dystrophic Bar Harbor mice, abnormal features of myelination - such as redundant myelin loops, thinly myelinated axons, few myelinated axons enclosed by the cytoplasm of one Schwann cell, Schwann cells that lacked an axon but contained myelin debris in the cytoplasm can be found (Jaros and Bradley, 1979). Authors interpret these findings as an indication of a metabolic disorder of Schwann cells. Furthermore, a formation by a single Schwann cell of myelin around two axons of different diameters has been reported in the sural nerve of a 45-year-old man with mononeuritis multiplex (Kusaka et al., 1992). In a more recent mechanistic study, it has been shown that loss of *Fbxw7*,

an E3 ubiquitin ligase component, enhances the myelinating potential of Schwann cells in that in these mice Schwann cells produce thicker myelin sheaths and sometimes appear to myelinate multiple axons (Harty et al., 2019). Moreover, myelin abnormalities in various neuropathies, including infoldings/outfoldings and tomacula, have been previously associated with Akt activation that seems to enhance wrapping and sorting but not myelination of axons in Remak Schwann cells (Domènech-Estévez et al., 2016). Various demyelinating neuropathies are also associated with the formation of tomacula in the sural nerve biopsies of humans (Sander et al., 2000). As many of the aforementioned abnormalities related to Schwann cells have been detected in adult SHR hearts, this suggests that the cardiac nerves' neuropathic processes may relate to chronically elevated arterial blood pressure in this model.

Lastly, in the present study, we analyzed G-ratios, which we found to be unusually high for peripheral myelinated nerves, indicating thin myelin sheath. Our data show that the G-ratio in WKY rats was relatively high (>0.7), while it was even higher in the SHR hearts. G-ratios found in the central nervous system fibers fall within a range of 0.72-0.81, whereas for peripheral axons, it can reach 0.6, indicating a thicker myelin layer (Chomiak and Hu, 2009). It is known that some peripheral axon g-ratio values tend to be lower than central axon g-ratio values (Chau et al., 2000), although the underlying mechanism remains poorly understood. In humans, peripheral nerve g-ratio values lower than 0.4 indicate degenerated nerve fibers with abnormal thickening of the myelin sheath, whereas values higher than 0.7 indicate either regenerated fibers with thinner myelin sheath or demyelinated nerve fibers (Ugrenović et al., 2016). To the best of our knowledge, no other available study reports g-ratios of cardiac nerve fibers in rats, making it impossible to draw any comparative conclusions. Thus, further investigation of cardiac nerve fibers g-ratios is needed.

Finally, it is worth mentioning that deranged quality of the cardiac ganglia and nerves due to hypertension demonstrated in this and recent other studies along with ischemic neuronal degeneration of the vagal nodose ganglia may substantially contribute to the substrate for atrial and ventricular arrhythmia, heart failure, and shortened survival (Aydin et al., 2011, 2019; Ashton et al., 2020). Therefore, the demonstrated extent to which the intrinsic cardiac plexus undergoes structural changes due to hypertension has to be considered as clinically crucial for all kinds of cardiac interventions - cardiac surgery including heart transplantation, coronary artery bypass grafting, valvuloplasty, valve replacement, and arrhythmia treatment via catheter ablations.

Nevertheless, it is important to consider several limitations of the current investigation. For one, it is important to acknowledge that inbred WKY rats, used as controls in the present study, themselves display elevated blood pressure compared to outbred Wistar rats. For this

reason, a further analysis comparing SH, WKY, and outbred Wistar rats might provide a more accurate picture of the undergoing processes. Another limitation is that here we only describe morphological differences between SH and WKY rat hearts, and whether these would translate to any detectable functional differences remains to be established.

Conclusions

Our study provides evidence on (i) the structural differences in cardiac innervation between SH and WKY rats; (ii) the effects of early-onset hypertension on intracardiac neuron and nerve loss in the SHR; (iii) the increased innervation of the right ventricle and atria in SH rats and an opposite effect on the left ventricle; (iv) ultrastructural alterations of intracardiac ganglia and nerve glial cells indicative of an early onset on neuropathic processes in the SH rat hearts.

Acknowledgements, including funding sources. The authors thank Tomas Ragauskas and Dmitrij Kvitka for technical assistance. We are extremely grateful to Audrys G. Pauza from the Laboratories for Integrative Neuroscience and Endocrinology, University of Bristol (United Kingdom), for his careful reading of the manuscript, constructive criticisms, and generous editorial assistance. This study was supported by the Grant SMIP-19-23/PRM19-113 from the Research Council of Lithuania and Grants No. V-786, V-789 from the Lithuanian University of Health Sciences Research Foundation.

A conflict of interest statement. Authors declare no conflicts of interest.

References

- Adams M.A., Bobik A. and Komer P.I. (1989). Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension* 14, 191-202.
- Araque A., Carmignoto G., Haydon P.G., Oliet S.H.R., Robitaille R. and Volterra A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728-739.
- Armour J.A. (2008). Potential clinical relevance of the "little brain" on the mammalian heart. *Exp. Physiol.* 93, 165-176.
- Armour J.A. (2004). Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R262-R271.
- Ashton J.L., Argent L., Smith J.E.G., Jin S., Sands G.B., Smail B.H. and Montgomery J.M. (2020). Evidence of structural and functional plasticity occurring within the intracardiac nervous system of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 318, 1387-1400.
- Attwell D., Buchan A.M., Charpak S., Lauritzen M., MacVicar B.A. and Newman E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232-243.
- Aydin M.D., Kanat A., Yilmaz A., Cakir M., Emet M., Cakir Z., Aslan S., Altas S. and Gundogdu C. (2010). The role of ischemic neurodegeneration of the nodose ganglia on cardiac arrest after subarachnoid hemorrhage: an experimental study. *Exp Neurol.* 230, 90-95.
- Aydin M.D., Acikel M., Aydin N., Aydin M.E., Ahiskalioglu A., Atalay C., Ahiskalioglu E.O., Erdogan F. and Sipal S. (2020). Predestinating

Intracardiac nerve plexus in spontaneously hypertensive rats




- role of cardiac ganglia on heart life expectancy in rabbits after brain death following subarachnoid hemorrhage: an experimental study. *Transplant Proc.* 52, 61-66.
- Batulevicius D., Pauziene N. and Pauza D.H. (2003). Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. *Ann. Anat.* 85, 449-459.
- Boluyt M.O., Bing O.H. and Lakatta E.G. (1995). The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur. Heart J. Suppl.* N, 19-30.
- Chau W.K., So K.F., Tay D. and Dockery P. (2000). A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16, 105-116.
- Chomiak T. and Hu B. (2009). What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 4, e7754.
- Dickie R., Bachoo R.M., Rupnick M.A., Dallabrida S.M., DeLoid G.M., Lai J., DePinho R.A. and Rogers R.A. (2006). Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvasc. Res.* 72, 20-26.
- Doggrell S.A. and Brown L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 39, 89-105.
- Domènech-Estévez E., Baloui H., Meng X., Zhang Y., Deinhardt K., Dupree J.L., Einheber S., Christ R. and Salzer J.L. (2016). Akt regulates axon wrapping and myelin sheath thickness in the PNS. *J. Neurosci.* 36, 4506-4521.
- Harty B.L., Coelho F., Pease-Raissi S.E., Mogha A., Ackerman S.D., Herbert A.L., Gereau R.W., Golden J.P., Lyons D.A., Chan J.R. and Monk K.R. (2019). Myelinating Schwann cells ensheath multiple axons in the absence of E3 ligase component Fbxw7. *Nat. Commun.* 10, 2976.
- Huang S.M., Wu Y.L., Peng S.L., Peng H.H., Huang T.Y., Ho K.C. and Wang F.N. (2016). Inter-strain differences in default mode network: A resting state fMRI study on spontaneously hypertensive rat and Wistar Kyoto rat. *Sci. Rep.* 6, 1-9.
- Jaros E. and Bradley W.G. (1979). Atypical axon-Schwann cell relationships in the common peroneal nerve of the dystrophic mouse: an ultrastructural study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 5, 133-147.
- Kokubo M., Uemura A., Matsubara T. and Murohara T. (2005). Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens. Res.* 28, 601-609.
- Kondo M., Fujiwara T. and Tabei R. (1996). Noradrenergic hyperinnervation in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Hypertens. Res. Clin. Exp.* 19, 69-73.
- Kuroda K., (2015). Hypertensive cardiomyopathy: A clinical approach and literature review. *World J. Hypertens.* 5.
- Kusaka H., Imai T., Matsumoto S., Ito H. and Yamasaki M. (1992). Myelination of two axons by a single Schwann cell. *Acta Neuropathol.* 84, 574-576.
- Li D. and Paterson D.J. (2019). Presynaptic sympathetic calcium channels, cyclic nucleotide-coupled phosphodiesterases and cardiac excitability. *Semin. Cell Dev. Biol.* 94, 20-27.
- Li D., Lee C.W., Buckler K., Parekh A., Herring N. and Paterson D.J. (2012). Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension* 59, 642-649.
- McClain J.L., Fried D.E. and Gulbransen B.D. (2015). Agonist-evoked Ca²⁺ signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 631-645.
- Meerson F.Z. and Krokhnina E.M. (1965). Neurons of intramural ganglia of the heart in its hyperfunction and hypertrophy. *Cells Tissues Organs* 62, 161-175.
- Neely O.C., Domingos A.I. and Paterson D.J. (2022). Macrophages can drive sympathetic excitability in the early stages of hypertension. *Front. Cardiovasc. Med.* 8, 807904.
- Neunlist M., Rolli-Derkinderen M., Latorre R., Van Landeghem L., Coron E., Derkinderen P. and De Giorgio R. (2014). Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147, 1230-1237.
- Okamoto K. and Aoki K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27, 282-293.
- Pannese E. (2015). Neurocytology: Fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells. 2nd Edition. Springer.
- Rezende L.M.T., Soares L.L., Drummond F.R., Suarez P.Z., Leite L., Rodrigues J.A., Leal T., Favarato L., Reis E., Favarato E., Carneiro M., Natali A., Coimbra C. and Gomes T. (2022). Is the Wistar rat a more suitable normotensive control for SHR to test blood pressure and cardiac structure and function?. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 35, 161-171.
- Richardson R.J., Grkovic I. and Anderson C.R. (2003). Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res.* 314, 337-350.
- Ridgway R.L. (1986). Flat, adherent, well-contrasted semithin plastic sections for light microscopy. *Stain Technol.* 61, 253-255.
- Sander S., Ouvrier R.A., McLeod J.G., Nicholson G.A. and Pollard J.D. (2000). Clinical syndromes associated with tomacula or myelin swellings in sural nerve biopsies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 483-488.
- Shanks J., Herring N., Johnson E., Liu K., Li D. and Paterson D.J. (2017). Overexpression of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase 2a promotes cardiac sympathetic neurotransmission via abnormal endoplasmic reticulum and mitochondria Ca²⁺ regulation. *Hypertension* 69, 625-632.
- Shanks J., Mane S., Ryan R. and Paterson D.J. (2013a). Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the hypertensive rat. *Hypertension* 61, 187-193.
- Shanks J., Manou-Stathopoulou S., Lu C.J., Li D., Paterson D.J. and Herring N. (2013b). Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 305, 980-986.
- Simard M. and Nedergaard M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877-896.
- Simms A.E., Paton J.F.R., Pickering A.E. and Allen A.M. (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: Does it contribute to hypertension? *J. Physiol.* 587, 597-610.
- Singh S., Sayers S., Walter J.S., Thomas D., Dieter R.S., Nee L.M. and Wurster R.D. (2013). Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. *J. Am. Heart Assoc.* 2, 1-11.
- Tay S.S., Wong W.C. and Ling E.A. (1984). An ultrastructural study of the neuronal changes in the cardiac ganglia of the monkey (*Macaca fascicularis*) following unilateral vagotomy. *J. Anat.* 138, 67-80.
- Tedoldi A., Argent L. and Montgomery J.M. (2021). The role of the tripartite synapse in the heart: how glial cells may contribute to the

Intracardiac nerve plexus in spontaneously hypertensive rats

- physiology and pathophysiology of the intracardiac nervous system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 320, 1-14.
- Ueyama T., Hamada M., Hano T., Nishio I., Masuyama Y. and Furukawa S. (1992). Increased nerve growth factor levels in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 10, 215-219.
- Ugrenović S., Jovanović I., Vasović L., Kundalić B., Čukuranović R. and Stefanović V. (2016). Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. *Anat. Sci. Int.* 91, 238-245.
- Zettler C. and Rush R.A. (1993). Elevated concentrations of nerve growth factor in heart and mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 614, 15-20.

Accepted March 31, 2022

Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension

Neringa Pauziene  | Dalia Ranceviene | Kristina Rysevaite-Kyguoliene |
Hermanas Inokaitis  | Inga Saburkina | Khrystyna Plekhanova |
Deimante Sabeckiene | Ignas Sabeckis | Rugile Martinaityte |
Ernesta Pilnikovaite | Dainius H. Pauza 

Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

Correspondence

Neringa Pauziene, Lithuanian University
of Health Sciences, Mickeviciaus str.
9, Kaunas LT44307, Lithuania.
Email: neringa.pauziene@lsmuni.lt

Funding information

Lietuvos Mokslo Taryba, Grant/Award
Number: S-MIP-19-23/PRM19-113;
Lithuanian University of Health Sciences
Research Foundation, Grant/Award
Numbers: V-786, V-789

Abstract

Persistent arterial hypertension initiates cardiac autonomic imbalance and alters cardiac tissues. Previous studies have shown that neural component contributes to arterial hypertension etiology, maintenance, and progression and leads to brain damage, peripheral neuropathy, and remodeling of intrinsic cardiac neural plexus. Recently, significant structural changes of the intracardiac neural plexus were demonstrated in young prehypertensive and adult hypertensive spontaneously hypertensive rats (SHR), yet structural alterations of intracardiac neural plexus that occur in the aged SHR remain undetermined. Thus, we analyzed the impact of uncontrolled arterial hypertension in old (48–52 weeks) SHR and the age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY). Intrinsic cardiac neural plexus was examined using a combination of immunofluorescence confocal microscopy and transmission electron microscopy in cardiac sections and whole-mount preparations. Our findings demonstrate that structural changes of intrinsic cardiac neural plexus caused by arterial hypertension are heterogeneous and may support recent physiological implications about cardiac denervation occurring together with the hyperinnervation of the SHR heart. We conclude that arterial hypertension leads to (i) the decrease of the neuronal body area, the thickness of atrial nerves, the number of myelinated nerve fibers, unmyelinated axon area and cumulative axon area in the nerve, and the density of myocardial nerve fibers, and (ii) the increase in myelinated nerve fiber area and density of neuronal bodies within epicardiac ganglia. Despite neuropathic alterations of myelinated fibers were exposed within intracardiac nerves of both groups, SHR and WKY, we consider that the determined significant changes in structure of intrinsic cardiac neural plexus were predisposed by arterial hypertension.

KEYWORDS

electron microscopy, hypertension, immunohistochemistry, intrinsic cardiac ganglionated plexus, spontaneously hypertensive rats

Abbreviations: SHR, spontaneously hypertensive rat; WKY, Wistar-Kyoto rat.

1 | INTRODUCTION

Persistent arterial hypertension leads to hypertensive heart disease that involves left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction and eventually develops into clinical heart failure with either reduced or preserved ejection fraction (Whelton et al., 2018). Arterial hypertension is one of the primary risk factors for mortality globally in the aging population (Abbafati et al., 2020).

It is known that arterial hypertension alters cardiac tissues. This includes myocardial remodeling (Burns et al., 2007; Greenwood et al., 2001; Schlaich et al., 2003) associated with increased prevalence of ischemic heart disease (Kuroda et al., 2015), cardiac arrhythmias (Bélichard et al., 1988; Lip et al., 2017), and even myocardial infarction (Williams et al., 2018). Previous studies focusing on heart failure have implied that arterial hypertension leads to cardiac autonomic imbalance including sympathetic overactivity and parasympathetic withdrawal (Binkley et al., 1991; Itter et al., 2004).

It is established that pathogenesis of arterial hypertension has a neural component which contributes to arterial hypertension etiology, maintenance, and progression (Fisher & Paton, 2011; Mancía & Grassi, 2014). According to Esler et al. (2010) and Johnson et al. (2015) up to 50% cases are of neurological etiology. Hypothesis of neurogenic hypertension supports works of Merino-Jiménez et al. (2018), Martínez et al. (2019) and the very recent one by Haburčák et al. (2022) in which overactivity and changes in neuroplasticity of sympathetic nervous system in young and neonate SHR before the hypertension were detected. However, arterial hypertension damages the brain itself (Sabbatini et al., 2001) leading to peripheral neuropathy (Gregory et al., 2012; Smith et al., 2018) and remodeling of the autonomic nervous system including the intrinsic cardiac neural plexus (Ashton et al., 2020). Alterations of the intrinsic cardiac neural plexus involve changes in neuronal excitability, the altered neurotransmission and neuropeptide secretion, as well as some neuroanatomical alterations of intrinsic cardiac neural plexus (Clyburn et al., 2022). The latter includes cholinergic transdifferentiation (Kanazawa et al., 2010; Kanazawa & Fukuda, 2022) and hyperinnervation of the myocardium (Cao et al., 2000). Moreover, it has been supposed that cardiac hyperinnervation may co-occur with regional cardiac denervation whereas the denervated patches of cardiac muscles were linked to the increased incidences of cardiac arrhythmias (Herring et al., 2019; Kanazawa & Fukuda, 2022; Ng et al., 2009).

Recently, we have demonstrated that the experimental arterial hypertension is associated with significant structural changes of the intrinsic cardiac neural plexus in young prehypertensive and adult hypertensive spontaneously

hypertensive (SHR) rats (Ranceviene et al., 2022). Nevertheless, morphological changes in intrinsic cardiac neural plexus of the aged SHR with the untreated sustained arterial hypertension, which is actually equivalent to arterial hypertension of the aging humans with the uncontrolled arterial hypertension, remain undetermined. Therefore, this study was aimed to identify in detail structural alterations of ICNS that occur in the aged SHR.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Male Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Germany) at 9–15 weeks of age. The animals were housed in collective cages and allocated in a controlled environment with a light/dark cycle (12/12 h), a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and had free access to food and water (ad libitum) until the designated age of 48–52 weeks was reached. Afterward, rats were euthanized in the Animal Research Center of the Lithuanian University of Health Sciences. All experiments involving laboratory animals conformed to EU directive 86/609/EEC and were performed under the ethical permission No. G2-137.

Before euthanasia, the blood pressure was measured as a control for hypertension. Following animal sedation, heart rate, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure were measured using the noninvasive tail-cuff method (AD Instruments IN125/R NIBP system, UK and LabChart software). Each measurement was performed 10 times and the median value was used. All measurements were performed by the same investigator in a quiet, controlled environment. Mean arterial pressure was calculated by the following equation: $\text{DBP} + 1/3 (\text{SBP} - \text{DBP})$ in which DBP means the diastolic blood pressure, and SBP – the systolic blood pressure. The comparison revealed that all parameters were significantly higher in the SHR compared to that in the WKY ($p < 0.05$) (Table 1).

For immunohistochemistry eight hearts per group (SHR $n = 8$, WKY $n = 8$) and for transmission electron microscopy three hearts per group (SHR $n = 3$, WKY $n = 3$) were used. Sample sizes were based on a priori power calculation according to the research of Charan and Kantharia (2013).

2.2 | Immunohistochemical studies

Three types of specimens were prepared from each of the hearts: (i) whole-mount of atria, (ii) whole-mount of the

TABLE 1 Physiological data of 48 weeks rats in spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rat groups

PARAMETER	WKY (n = 8)	SHR (n = 8)	p-value
HR (bpm)	175 ± 9	254 ± 26	<0.05
SBP (mmHg)	133 ± 6	195 ± 7	<0.05
DBP (mmHg)	109 ± 5	149 ± 5	<0.05
MAP (mmHg)	117 ± 5	164 ± 7	<0.05

Note: n – number of rats.

Abbreviations: bpm, beats per minute; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure.

basal part of the ventricles, and (iii) serially sectioned ventricular middle part.

2.2.1 | Whole-mount preparations of atria and ventricles

After euthanasia, animals were intracardially perfused *in situ* with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM phosphate, pH-value 7.4, via a cannula inserted into the left ventricular cavity, then prefixed with 4% (w/v) paraformaldehyde solution (PFA) in 0.1 M PBS (pH = 7.4). Hearts were dissected from the chest and incubated in 4% PFA for 40 min. After washing the heart two times in PBS, the atria were dissected from the ventricles and the interatrial septum. Then, the atria were flattened and pinned on a silicone pad filled with pre-chilled PBS. The ring of 2–4 mm thickness of the ventricular base was dissected along the coronary groove, separated from the interventricular septum, cut through the right ventricle, and pinned flat to extirpate most of the myocardium from the endocardial side. When preparation of the upper portion of ventricles was sufficiently thin due to the removal of the myocardial tissues, the preparation was turned so that the epicardium was facing upwards and pinned again to the silicone pad. To decrease a background fluorescence in laser scanning microscope examination, tissues were dehydrated and cleared using a dimethyl sulfoxide and hydrogen peroxide solution, as reported previously (Dickie et al., 2006). Subsequently, whole-mount preparations were rehydrated through a graded ethanol series (in each for 10 min), washed 3 × 10 min in 0.1 M PBS containing 1% (v/v) Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany). Next, the non-specific binding was blocked for 2 hours in PBS containing 5% (v/v) normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Following, samples were incubated with a Protein gene product 9.5 (38–1,000, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) primary antisera for

48–72 hours at 4°C. Afterward, whole mounts were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS and incubated with donkey anti-rabbit antisera conjugated with a fluorochrome Alexa Fluor plus 488 (A32790, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) for 4 hours at room temperature. Lastly, specimens were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS, mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cover slipped, and sealed using clear nail polish.

2.2.2 | Sectioned tissue preparations

The remaining part of the ventricles was washed in PBS and immersed in 30% (w/v) sucrose in 0.1 M PBS containing 0.1% (w/v) sodium azide at 4°C for 24 h. Following cryoprotection, ventricles were frozen using a tissue-freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, USA). Next, tissues were sectioned into 18 µm slices using a cryomicrotome HM 560 (Microm, Germany) at –22°C, mounted onto Superfrost Plus microscope slides (Menzel Glaser, Germany), and dried at room temperature for 30 min. For immunohistochemical permeabilization, sections were incubated for 40 min in a solution containing 9% (v/v) DMSO and 1% (v/v) Triton X-100 in 0.1 M PBS. After 3 × 10 min washing in PBS, immunohistochemical procedures were performed as described earlier applying Protein gene product 9.5 (38–1,000, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500) and secondary antisera donkey anti-rabbit, conjugated with a fluorochrome Alexa Fluor plus 488 (A32790, Invitrogen, Rockford, USA; dilution 1:500). Finally, specimens were washed three times for 5–8 min in 0.1 M PBS mounted with a Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA), cover slipped, and sealed with clear nail polish. Primary antibody (negative) controls were always processed in parallel and inspected to confirm signal specificity.

2.3 | Preparations for transmission electron microscopy

After euthanasia, the rat chest was opened, perfused with PBS (300 ml, 140 mmHg), and prefixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M PB pH 7.4, (300 ml, 140 mm/Hg) *in situ* via the left ventricle. Next, the hearts were excised from the chest and placed for 40 minutes in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4). Tissue samples of 1 mm³ from the definite sites of atria (WKY n = 35, SHR n = 40) and ventricles (WKY n = 40, SHR n = 58) of each heart were dissected using fine scissors and tweezers. The samples were fixed overnight at 4°C in 2.5%

glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4), washed twice in PB, postfixed for 2 hours with 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB (pH 7.4), and dehydrated through a graded ethanol and acetone series. Next, samples were infiltrated into a mixture of Epon 812 and Araldite 502 resins. Tissue samples were carefully orientated for transverse sectioning in flat embedding molds under a stereoscopic microscope Stemi 2000CS (Zeiss, Gottingen, Germany) and polymerized for 48 hours at 60°C temperature. Semithin sections (1 µm) were cut with Leica EM UC7 ultramicrotome (Leica Mikrosysteme Handelsges.m.b.H., Vienna, Austria) using a glass knife and stained with methylene blue according to Ridgway (1986). Ultrathin sections (50–70 nm) were cut using the same Leica EM UC7 ultra-microtome with DiATOME ultra 45° diamond knife (Biel, Switzerland), mounted on a 600-mesh thin bar support nickel grids (Agar Scientific, Essex, UK) and stained with uranyl acetate and lead citrate. Finally, ultrathin sections were analyzed at 120 kV with a Tecnai BioTwin Spirit G2 transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, the Netherlands). Images were taken with a bottom-mounted 16 M-pixel Eagle 4 K TEM CCD camera, employing specific TIA software (FEI, Eindhoven, the Netherlands).

2.4 | Microscopy and quantitative analysis

Whole-mount preparations of atria and ventricles were imaged using confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). The ventricular whole-mounts were imaged using fluorescence microscope AxioImager Z1 equipped with digital camera AxioCam MRm running AxioVision (rel. 4.8.2; Carl Zeiss, Jena, Germany) software. Magnifications of $\times 10$ (for tile-scan panoramas of both preparation types) and $\times 20$ (for neural structures of atrial whole-mounts) were used. The number of ganglia per an atrium, ganglion area, and the number of neuronal somata were counted and measured in atrial whole-mounts. Measurements were performed on 279 ganglia SHR $n = 130$, WKY $n = 149$. All measurements were performed manually under the same conditions. The criterion for the separation of ganglia was based on the distance of at least two neuronal bodies between adjacent ganglia along all borders. The ganglion was evaluated as single structure, if there was a contact of neuronal somata at least at one point. Neurons were identified and found in ganglia and epicardiac nerves. Only neuronal cell bodies with well-defined nuclei were counted as neurons and measured their somata areas, whereas nerve cells without clearly noticeable nuclei were excluded

from neuronal counting in serial ganglion sections. Neuronal bodies were counted and measured in multiple focal planes of a z-stack; while, the ganglia area was measured using a flattened z-projection.

The epicardiac nerves, ≥ 5 µm in width, were measured manually at the left atrium left dorsal region ($n = 2,670$) and at the coronary sulcus ($n = 609$) and 1 mm below the coronary sulcus ($n = 978$) in ventricular whole-mount preparations.

In addition, the innervation of the atrial myocardium was measured in digital images of atrial whole-mount myocardium using a standard counting frame (150, 135 µm²), selecting threshold gray values, and expressing the area of segmented nerve fibers concerning the counting frame area as a percentage. The analyzed areas in the cardiac atria were in the sinoatrial node area ($n = 554$), left dorsal atrial region ($n = 248$), at the roots of pulmonary veins ($n = 227$), and on the right auricle ($n = 191$). Z-stacks were measured individually (8–15 stacks per photo) due to the thickness of the wholemount preparation compared to cryosectioned ventricle preparations. Counting frames were selected manually to avoid big epicardiac or vascular nerves as artifacts.

Sectioned tissue preparations were imaged using $\times 10$ (for tile-scan panoramas) and $\times 20$ (for neural structures) magnification using confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Epicardiac nerves, ≥ 5 µm in diameter, were investigated. The whole epicardiac nerve cross-section area and the area labeled for PGP 9.5 pan-neuronal marker were set using a binary threshold and the area occupied by PGP 9.5-positive neural structures expressed in percentage. The measurements were taken considering separate z-stacks. In addition, the innervation of the ventricular myocardium was measured in digital images ($n = 403$) using the same method as detailed for the atrial preparations.

Electron micrograms for morphometry were photographed at grid bar intersections using 2,900 magnification and analyzed with AxioVision Rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) software suite. In *electron micrograms*, the number of axons inside unmyelinated nerve fiber and the number of myelinated nerve fibers in the nerve were counted; the overall nerve area and area occupied by unmyelinated fibers, unmyelinated and myelinated axons areas, and myelinated nerve fiber areas was measured; the area occupied by unmyelinated axons in the nerve was determined and expressed as a percentage; a number of myelinated axons in 1000 µm² of the nerve, axon, and fiber diameter using circle area formula were calculated. G ratio was determined as the ratio of the axon diameter to the outer diameter of the myelin sheath. For myelinated fiber, measurements were selected only for intact

fibers whose axon perimeter corresponded to the inner perimeter of myelin.

2.5 | Statistical analysis

Data are presented as absolute numbers (n), percentages (%), mean (M), and standard error (\pm SE). Statistical analysis was done using IBM SPSS 20.0 software. Kolmogorov–Smirnov test was used to determine the normality of the data. The parametric data samples from two groups were compared with the Student's t -test; means of non-parametric data were compared with the Mann–Whitney U test. The Kruskal–Wallis test was employed for comparing non-parametric data of multiple groups. Differences were considered significant when the p -value was equal to or < 0.05 .

3 | RESULTS

We found that structural alterations within intrinsic cardiac neural plexus of the SHR in comparison with the WKY rats embrace three nerve components: (1) neuronal somata of the intracardiac ganglia distributed on atrial wall surfaces; (2) epicardiac nerves through which nerve fibers proceed to reach their target cells; (3) and a fine meshwork of nerve fibers surrounding the myocardial cells.

3.1 | Intracardiac ganglia and neuronal somata

The majority of the examined ganglia were located around the pulmonary vein roots and aggregated into groups (ganglionic fields). On average, SHR had 23 (range 16–29), and WKY rats 27 (range 19–34) ganglia per atria. In both groups, the shape of the ganglion depended on its size and varied from oval for smaller ganglia to cobweb-like chains associated with large ganglia (Figure 1). Typical ganglion on WKY and SHR atria was rather complex in distribution of ganglionic cells that were loose in one site and dense within another one (Figure 2a,b). Due to irregular shape and contours of intracardiac ganglia, both the ganglion area and the neuronal number per ganglion varied considerably. Compared to normotensive WKY controls, SHR ganglia show the tendencies of increasing of the cross-sectional area by 46% and the higher mean number of neuronal somata, by $\sim 48.7\%$ per ganglion and by $\sim 13.8\%$ on the whole atrial surface (Table 2). Singular neurons were found in nerves as well (Figure 2c,f).

Noteworthy, SHR neuronal somata were smaller in size by 19% and situated in ganglia with neuronal somata distributed more compactly than in WKY rats (Figure 2, Table 2). When neuronal somata were divided into groups of small ($< 500 \mu\text{m}^2$), medium ($500\text{--}1,000 \mu\text{m}^2$), and large ($> 1,000 \mu\text{m}^2$) ones based on their cross-sectional area, the medium-sized neurons were the most numerous in both groups. Importantly, small neurons prevailed in the SHR ganglia whereas large ones were more common in the WKY rats (Figure 3). Moreover, only a few neurons in the SHR exceeded $1,500 \mu\text{m}^2$ cross-sectional area (max = $1,573.9 \mu\text{m}^2$) while that reached up to $3,218.0 \mu\text{m}^2$ cross-sectional area in the WKY rats. A low number of solitary or small-grouped neurons were found inside the epicardial nerves or scattered remotely from the specific atrial ganglionic fields.

An electron microscopic study of epicardiac ganglia from SHR and WKY rats did not reveal any prominent differences in the ultrastructure of intracardiac neuronal somata. Irregular contours of numerous neuronal processes and invaginations of neuronal somata were common in the examined ganglia. Thick multilayered satellite cell sheaths predominated around the intracardiac ganglionic cells. Plentiful axonal terminals were filled by synaptic vesicles and a lot of axodendritic or axosomatic synapses were evident inside the ganglia. However, neuronal somata with the ensheathed in part by a single layer of satellite cells were frequent in the examined ganglia as well.

3.2 | Atrial nerves

The whole-mount preparations immunolabeled for PGP 9.5 of both the SHR and WKY rats demonstrated that 5–6 large nerves ($50\text{--}150 \mu\text{m}$ in thickness), access the heart at the left cranial vein and proceed within the atrial epicardium as the left dorsal ganglionated subplexus. These left dorsal subplexal nerves branched averagely 1–3 times spreading throughout the left dorsal atrium where the highest number of epicardiac nerves is located on the atria. Left dorsal subplexal nerves expand into the clusters of ganglia around the roots of pulmonary veins or toward the ventricles spreading widely on the wall of the left ventricle. Nerves accessing the heart at the right cranial and pulmonary veins were usually slender and spread throughout walls of the right atrium and had clusters of ganglia. Sinoatrial node area was supplied by nerves descending from the right cranial vein and intrinsic epicardiac nerves from the right-sided ganglia (Figure 1).

In the left dorsal subplexus in which nerves were topographically persistent, every nerve branch with a

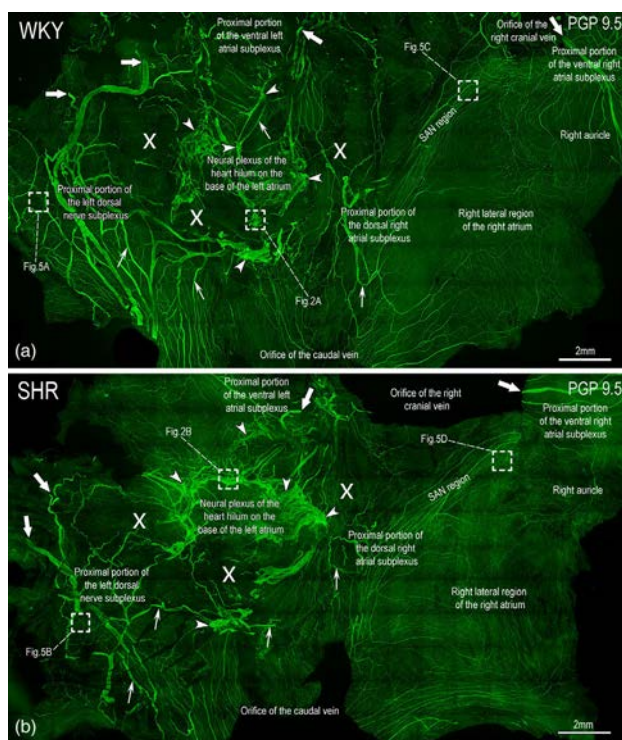


FIGURE 1 Laser-scanning (confocal) microphotographs to illustrate a general morphological pattern of atrial ganglionated nerve plexus of the WKY (a) and SHR (b). The atria were flattened following their dissection from interatrial septum and cardiac ventricles along and above coronary sulcus. Both cranial veins and the caudal ones were ripped longitudinally and flattened as well. The general views of whole mounts of the atria were assembled with the aid of software ZEN 2010B SP1 from Z-stack tile scan images displaying neural structures immunochemically labeled for the antigen PGP 9.5. Note the higher density of ganglia in SHR compared to the control WKY rats. Arrowheads indicate ganglia, thick arrows point to preganglionated nerves, which enter the heart through the heart hilum at the left and right cranial veins. Thin arrows point to some postganglionated epicardiac nerves. Boxed areas of some ganglia, sinoatrial node, and neural elements of the left dorsal neural subplexus are enlarged in Figures 2 and 5. Roots of three pulmonary veins (left, middle, and right one) are pointed by X symbol

thickness $>5 \mu\text{m}$ was selected for evaluation (Figures 1 and 5a,b). Although the morphologic pattern of epicardiac plexus was in general similar for both studied groups, SHR nerves from the left dorsal subplexus were thinner by 12% compared with the nerves of WKY (Table 2).

3.3 | Ventricular nerves

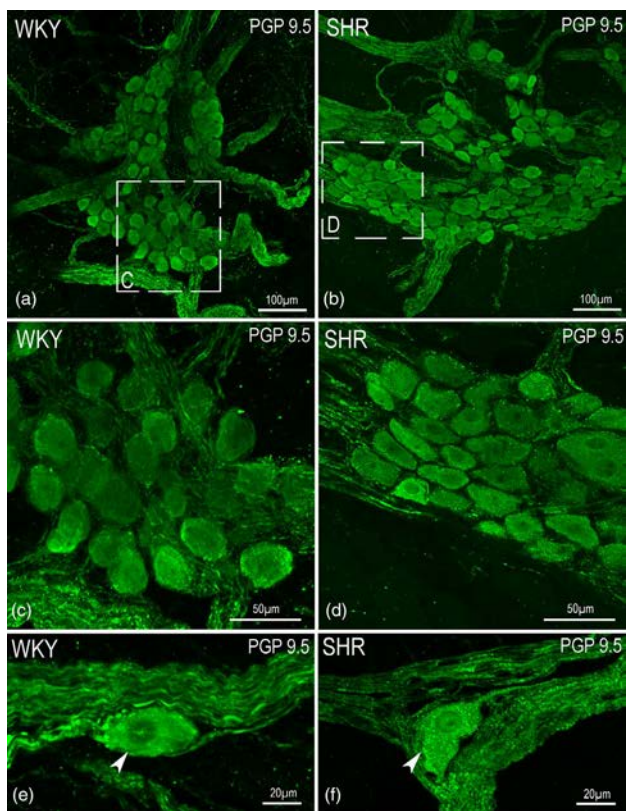
The examined whole-mount preparations confirm that the neural supply of the rat cardiac ventricles proceeds by three main routes, that is, as postganglionated nerves of the left dorsal, ventral right atrial, and two coronary ganglionated subplexi that was earlier described in detail by Batulevicius et al. (2003). The epicardiac nerves descending from the left dorsal ganglionated subplexus through the coronary sulcus toward the apex of the heart on the posterior side of the left ventricle are the largest and most abundant on the ventricles (Figure 1). The nerves of the

ventral right atrial ganglionated subplexus expanding on the anterior side of the ventricles intersect with the epicardiac nerves of the right and left coronary ganglionated subplexi (Figure 1).

In the ventricular whole-mounts, nerve thickness was measured at two locations: at the coronary sulcus, and 1 mm below the coronary sulcus (Figure 6). The nerves nearby the coronary sulcus were thickest and got much thinner at 1 mm below. It should be noted that the nerves measured at different heights in the SHR group were altered differently. The SHR nerves nearby the coronary sulcus, as well as the atrial nerves, were thinner than WKY nerves, and the SHR nerves 1 mm below the coronary groove were thicker than WKY in contrast (Table 2).

Ventricular epicardiac nerves descending further to the apex and measured in the transverse cryosections had the significantly larger (by 37%) areas in the SHR than in WKY rats (Table 2). However, the area of intraneural structures positive for PGP 9.5 in the transverse sections

FIGURE 2 Morphological patterns of WKY (a and c) and SHR (b and d) ganglia from epicardiac ganglionated nerve plexi boxed in Figure 1. a and b illustrate two typical atrial ganglia in which continuous population of ganglionic cells has quite uneven distribution of neuronal somata. And, therefore, were considered as belonging to one ganglion. Boxed parts of ganglia in a and b are enlarged and displayed in panels c and d. Neuronal somata of SHR (b and d) are noticeably smaller and distributed more tightly compared with the WKY ganglionic cell bodies (a and c). Solitary neuronal somata (arrowheads) located in WKY (e) and SHR (f) nerves



of these nerves was significantly smaller in the SHR compared with the WKY rats (Table 2).

3.4 | Ultrastructure of nerves

In the epicardiac nerves of SHR and WKY, endoneurial collagen fibers were particularly dense and occupied the whole space between nerve fibers.

In SHR, unmyelinated nerve fibers were less compact, with layered Schwann cells, and the higher number of insertions and pockets of collagen fibers compared with the WKY unmyelinated nerve fibers. Folds of basal lamina without Schwann cell processes were common in SHR nerves (Figures 4 and 7). The number of axons without mesaxons, exposed to the endoneurium and covered just by the basal lamina was larger in WKY nerves (Figure 7).

The number of axons per unmyelinated nerve fiber was significantly greater in the SHR atrial nerves (Table 3).

In SHR, the mean axonal area within unmyelinated nerve fibers and the cumulative axon area in the sections of the epicardiac nerves were significantly decreased in comparison with WKY. Different inclusions (small and large membranous, and homogenous substances) were found more frequently inside of unmyelinated axons in nerves of WKY and less often in axons of SHR (Figures 4c–e and 7).

The number of myelinated nerve fibers and their density in the profiles of epicardiac nerves were evidently lessened in the SHR nerves (Table 3). The measurements of myelinated nerve fibers were performed on intact nerve fibers only (in which myelin sheath was attached to the axons) and the number of intact myelinated nerve fibers was 65.7% in WKY nerves and only 51.4% in SHR. Despite of fact that areas of axons and myelinated nerve fibers

TABLE 2 Morphometric differences in PGP 9.5-immunoreactive neural structures between hearts of spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats

Parameter	WKY	SHR
Ganglia		
Ganglion number per atria	27 ± 3	23 ± 3
Ganglion area (μm ²)	182,749 ± 27,146	266,868 ± 51,183
Neuronal body area (μm ²)	734 ± 11	596 ± 6*
Neuronal number in ganglion	115 ± 15	171 ± 27
Neuronal number in atria	3,288 ± 332	3,742 ± 297
Density of ganglia (neurons/mm ²)	931 ± 39	1,047 ± 48*
Epicardiac nerves		
Atrial nerves thickness (μm)	31.0 ± 1.0	27.4 ± 0.8*
Ventricular nerves thickness		
At coronary sulcus (μm)	47.0 ± 2.8	38.9 ± 1.7*
1 mm below the coronary sulcus (μm)	25.9 ± 1.1	30.2 ± 1.1*
Ventricular nerves cross-section area (μm ²)	621.0 ± 30.0	849.0 ± 69.0*
Area of PGP 9.5+ NF in cross-sections (%)	71.6 ± 0.6	68.9 ± 0.5*
Density of myocardial nerve fibers (%) in		
Sinoatrial nodal area	4.6 ± 0.2	2.1 ± 0.1*
Atria in general	1.69 ± 0.1	1.07 ± 0.03*
Left dorsal atrial region	2.23 ± 0.23	1.05 ± 0.06*
Roots of pulmonary veins	0.98 ± 0.04	1.41 ± 0.07*
Right auricle	1.96 ± 0.16	1.19 ± 0.06*
Ventricles in general	1.09 ± 0.04	1.05 ± 0.05*
Right ventricular wall	1.59 ± 0.09	2.22 ± 0.09*
Left ventricular wall	1.04 ± 0.05	0.72 ± 0.05*
Interventricular septum	0.57 ± 0.04	0.4 ± 0.03*

*Significant difference between WKY and SHR groups at $p < 0.05$; NF, nerve fibers.

were smaller in the atrial nerves than in ventricular ones independently from animal groups (Table 3), these parameters were increased in atrial and ventricular nerves of the SHR group. Hypertrophy of myelinated nerve fibers in the

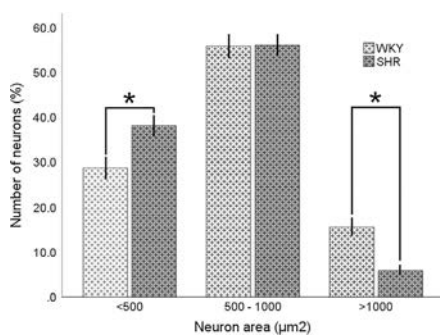


FIGURE 3 Distribution of differently sized neuronal somata within the epicardiac ganglia of SHR and WKY rats. Vertical lines on the bars indicate the limits of standard errors. * means the significant difference between SHR and WKY rat groups at $p < 0.05$

atrial nerves was less expressed and was probably caused by thickening of myelin sheath which is related to a decreased G-ratio. Meanwhile, the axonal area of the ventricular myelinated nerve fibers increased more than the thickness of myelin sheath which indicates the increased G-ratio (Table 3).

Ultrastructure of the majority of axons within myelinated nerve fibers of both groups was rather intact, apart from various inclusions which were revealed in over 20% of axon profiles. Myelin-like inclusions varying in size from very small to large predominated but homogenous electron-dense or vesiculated inclusions sometimes were observed as well. Besides, inclusions were also observed in the Schwann cell cytoplasm of myelinated nerve fibers, yet they were less common (Figures 4f-h and 7).

Although ultrastructure of axons was rather intact, myelin sheath of one third of myelinated nerve fibers in nerves of WKY rats and almost half in SHR nerves showed neuropathic changes (Table 3). The majority of abnormal myelinated nerve fibers had an excess of myelin sheath, which did not correspond to the diameter of the axon and, thereby, formed folds that were well seen in the nerve profiles. Myelinated nerve fibers with abnormal myelin sheaths were grouped according to variations of morphology and frequency of their distribution in the intracardiac nerves expressed as a percentage from total number of myelinated nerve fibers. Focal hypermyelination, myelin outfoldings, and tomacula were the most obvious and numerous changes of myelinated nerve fibers in both groups. The most common abnormality was "outfoldings" that had one or more folds of myelin sheath extended outwards (Figures 7, 8a-c and 9a). Myelinated nerve fibers with outfoldings were the most numerous (23.8%) in the atrial nerves of SHR. Variations of

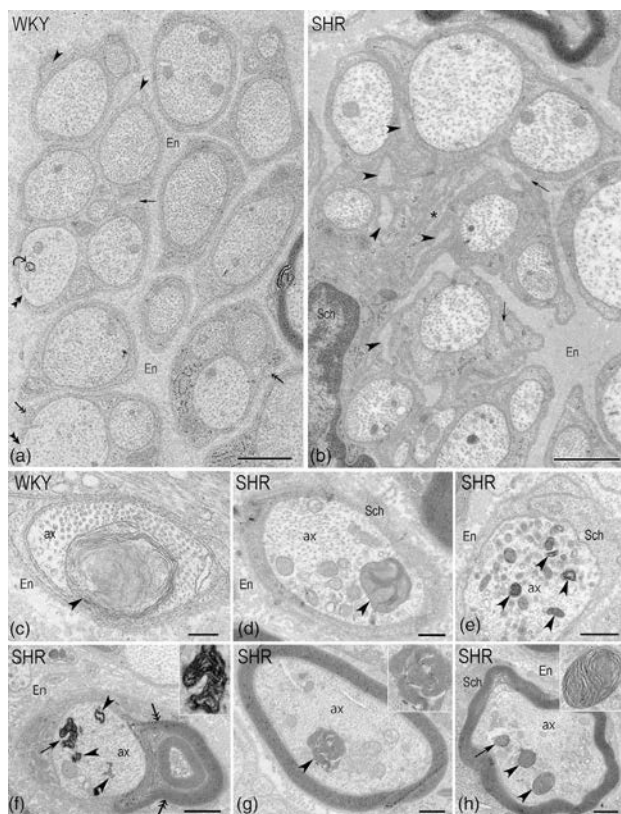


FIGURE 4 Ultrastructure of unmyelinated nerve fibers from hearts of WKY and SHR (a-b) and diversity of axonal inclusions found in the unmyelinated (c-e) and myelinated (f-h) nerve fibers. (a) Unmyelinated fibers of WKY nerves demonstrate the regular ultrastructure. A few small collagen pockets are indicated by arrowheads, insertions of collagen – by arrow. Two-headed arrows indicate axons with diameter thinner than $0.2\ \mu\text{m}$. Axon without mesaxon is pointed by double arrowhead. Small membranous inclusion is indicated by curved arrow. (b) Numerous collagen pockets (arrowheads) and collagen insertions (arrows) intervene deeply in the Schwann cell and form its porous appearance with irregular outline. Folds of loose basal lamina are seen in the fiber center (*). (c) Large membranous inclusion with homogenous substance in the center (arrowhead) fills the haft of axonal profile. (d) Large dense homogenous inclusion (arrowhead) with aside located numerous mitochondria. (e) Small membranous inclusions (arrowheads) scattered among mitochondria and vesicles in the axoplasm. (f) Axon with large membranous (arrow) and few small membranous (arrowheads) bodies covered by abnormal myelin just from one side. (g) Myelinated axon with few-pieces electron-dense inclusion (arrowhead). (h) Two laminar (arrowheads) and small homogenous (arrow) inclusions within myelinated axon. The enlarged inclusions are showed in the figure insets. Other abbreviations: Ax – Axon, En – endoneurium, Sch – Schwann cell. Scale bars in a-b, f, h – $1\ \mu\text{m}$, c-e, g – $0.5\ \mu\text{m}$

this type were the comma-shaped outfoldings (Figure 9a), tomacula, and the recurrent loops when the loops looked like a separate structure (Figure 8b). The second abnormality of myelinated nerve fibers was “infoldings” that involved the focally redundant loops inside the myelin sheath (Figure 8d).

These abnormal myelinated nerve fibers were not abundant in either group, yet they were more common in SHR nerves (Figure 7). The third type of alterations in myelinated nerve fibers was “cytoplasmic protrusions” with disruptions of the myelin sheath that resembled Schmidt-Lanterman incisures.

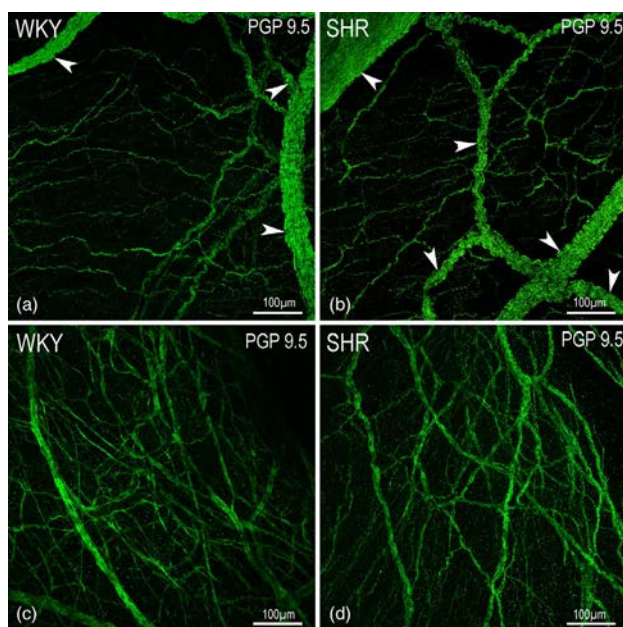


FIGURE 5 The enlarged views of the areas boxed in Figure 1 to illustrate the morphologic patterns of innervation in WKY (a and c) and SHR (b and d) atria. a and b demonstrate fragments of the epicardiac nerve plexus with the measured nerves indicated by arrowheads and the comparatively loose meshwork of myocardial nerve fibers in walls of the dorsal left atrium. c and d exhibit the relatively denser meshwork of myocardial nerve fibers in the region of typical sinoatrial node in which no thicker nerves are located. Note the denser innervation pattern in WKY (c) to compare with the SHR sinoatrial nodal area (d)

However, cytoplasmic protrusions differed evidently from the Schmidt-Lanterman incisures since protrusions always were from one side only and extended quite far from the axon making characteristic hooks (Figure 9b). In some myelinated nerve fibers named as “endoneurium beneath myelin”, the collagen fibers were interspersed between the myelin sheath and the axon which was segregated in this way from the myelin sheath. In the latter case, the endoneurial space inside the myelinated nerve fibers was separated by a basal membrane of glial cells (Figure 10a,c). The number of the latter myelinated nerve fibers in SHR outnumbered 2.5-folds the same in WKY. The fifth type of alterations in myelinated nerve fibers named by us as “collapsed myelin ensheathing axon” was rather rare but nerves of SHR group had threefold larger number of them than WKY group (Figure 7). These nerve fibers were either including unmyelinated axon (Figure 10a) or the myelinated axon (Figure 10b). Myelinated nerve fibers with swollen myelin sheaths were also rather common in both groups (Figures 7 and 9e).

Finally, the thinly myelinated nerve fibers were found in the examined nerves yet were not numerous in both animal groups. Occasionally, these thinly myelinated fibers were surrounded by the processes of

supernumerary Schwann cells (Figure 9c). Besides, we found the myelinated nerve fibers that had few axons under the same myelin sheath (Figure 9d), and that having Schwann cell nuclei inside of myelin sheath (Figure 10d). Myelinated nerve fibers with Schwann cell nuclei inside of myelin sheath were determined in nerves of the SHR only while myelinated nerve fibers with few axons were observed in both groups (Figure 7).

3.5 | Myocardial nerve fibers

Myocardial nerve fibers performed the fine meshwork which was well-observable in the atrial whole-mount preparations and cryosections of the cardiac ventricles (Figure 5).

The measurements of myocardial nerve fibers meshwork of in the zone of sinoatrial node (Figure 5a,c), in several areas of the left dorsal atrial wall (Figure 5b,d), near the roots of pulmonary vein and the right auricle as well as in walls of the right and left ventricles including interventricular septum demonstrate that the density of nerve fibers is significantly decreased in the sinoatrial node, atrial and ventricular myocardium of SHR compared with WKY rats (Table 2).

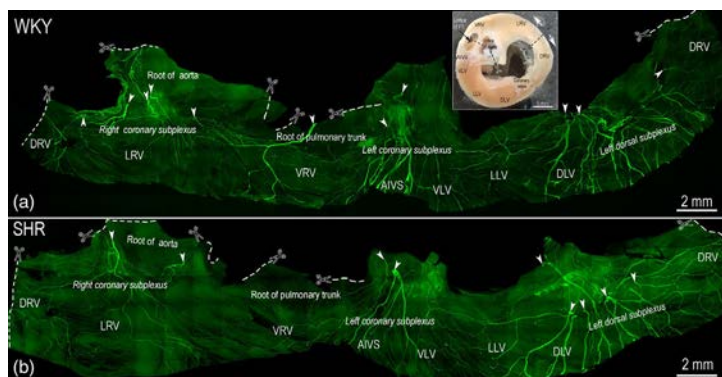


FIGURE 6 Immunofluorescent images from whole-mount preparations of WKY (a) and SHR (b) cardiac ventricles labeled for PGP 9.5. The whole-mount preparations were prepared in a way of flattening cardiac ventricular walls when the cutaway below and along the coronary sulcus rings of the basal portion of ventricles (2–4 mm in height) with the dissected interventricular septa were ripped longitudinally to the axis of the heart at the dorsal side of the right ventricular wall and at the posterior walls of ascending aorta and pulmonary trunk. The inset in a demonstrates the upper view of the base of cardiac ventricles with the cutting lines (dashed lines) of the right ventricular wall, ascending aorta, and pulmonary trunk, while two arrows show directions of the digestive edges of the right ventricular wall. Arrowheads in a and b point to the epicardial nerves accessing cardiac ventricles via the left and right coronary, and the left dorsal subplexi. The mosaic images a and b were assembled with the aid of software ZEN 2010B SP1 from Z-stack tile scan images. The dashed lines mark the cutting lines of the right ventricular wall, ascending aorta, and pulmonary trunk, while the lines of dissection of atria along the coronary sulcus and distal part of ventricles are seen correspondingly as the upper and lower edges of the flattened preparations. Other DRV – the dorsal region of the right ventricular wall; LRV – the lateral region of the right ventricular wall; VRV – the ventral region of the right ventricular wall; AIVS – anterior interventricular sulcus; VLV – the ventral region of the left ventricular wall; LLV – the lateral side of the left ventricular wall; DLV – the dorsal region of the left ventricular wall

Nonetheless, alterations of the density of myocardial nerve fibers were location dependent. At most, the decrease of nerve fibers density was found in the sinoatrial node area where it was reduced up to 54%. Nevertheless, the density of nerve fibers in the atrial myocardium near the roots of pulmonary veins and in the myocardium of the right ventricle was significantly increased in SHR versus WKY (Table 2).

4 | DISCUSSION

Our study defines the structural alterations of the intrinsic cardiac ganglionic nerve plexus caused by the uncontrolled arterial hypertension in the old (48–52 weeks) spontaneously hypertensive rats (SHR) in comparison with the age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats. Using the methods of immunohistochemistry and transmission electron microscopy, we determined that arterial hypertension leads to (i) the decrease of the neuronal body area, the thickness of atrial nerves, the number of myelinated nerve fibers, unmyelinated axon area, and the cumulative axon area within intrinsic cardiac nerves, and the density of myocardial nerve fibers; and (ii) the

increase in the myelinated nerve fiber area and the density of ganglionic cells. Although neuropathic alterations of the myelinated fibers were found in both groups, SHR and WKY, nerves, the number of neuropathic nerve fibers was significantly greater in the SHR group.

4.1 | Choice of animal model

Spontaneously hypertensive rat is the most studied animal model of essential arterial hypertension, commonly used to study cardiovascular diseases. The model was derived from the cross of outbred Wistar rats with noted hypertension (Okamoto & Aoki, 1963). The SHR model spontaneously develops elevated blood pressure at 5–6 weeks of age which lasts throughout a lifetime (Panzenhagen et al., 2019). As controls for the SHR, we decided to use normotensive descendants of Wistar rats of the colony from which the SHR strain was derived (Wistar-Kyoto rats, WKY). The outbred WKY tends to be normotensive and has been used as the closest genetic control for the SHR worldwide (Kurtz & Curtis Morris, 1987; Zhang-James et al., 2013).

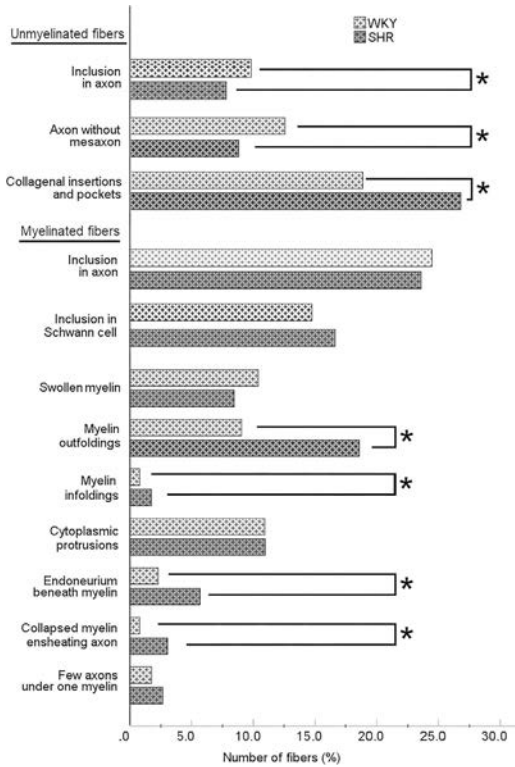


FIGURE 7 Differences of various ultrastructural alterations of unmyelinated and myelinated nerve fibers within intracardiac nerves of WKY and SHR rats. Horizontal lines on the bars indicate the limits of standard errors. *means the significant difference between SHR and WKY rat groups at $p < 0.05$

The noninvasive tail-cuff method for blood pressure measuring was used before making specimens to confirm hypertension. Although invasive intraarterial cannulation has been viewed as the gold standard for blood pressure recording, recent studies show a strong correlation between noninvasive blood pressure measured by the tail-cuff method and the intraarterial method (Ikeda et al., 1991).

The blood pressure, heart rate, weight, and cardiac echoscopy measurements performed before sacrificing animals showed the increased hypertension parameters in SHR and the normal blood pressure in WKY rats. The determined by us physiological parameters of SHR correlated with data of other studies (LeGrice et al., 2012; Slama et al., 2004) and, enabled us to use SHR and WKY rats as the animal models for examinations of structural changes within intracardiac nerve plexus due to arterial hypertension.

4.2 | Atrial ganglia

The identified remodeling of atrial ganglia could be twofold: both the age-related and the hypertension-induced.

Our findings from both the present and the previous studies demonstrate the age-related changes that involve the evident increases in the neuronal number per ganglion and area of intrinsic cardiac ganglion in old (48–52 weeks) animals compared with adult (12–18 weeks) ones (Ranceviene et al., 2022). The increased number of intracardiac neurons during aging was described in the healthy Wistar rats as well (Batulevicius et al., 2003).

Nevertheless, it was earlier shown that general sympathetic tone is activated due to arterial hypertension (Ashton et al., 2020; Fisher & Paton, 2011; Paton & Waki, 2009). Hypertension-induced increase in the number of intracardiac cholinergic neurons together with the

TABLE 3 Comparative ultrastructure of nerve fibers from atrial and ventricular nerves of Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats

Parameter	WKY			SHR		
	Atrial	Ventricular	Total	Atrial	Ventricular	Total
Unmyelinated fibers						
Number of axons measured (<i>n</i>)	4,611	3,675	8,286	8,063	2,057	10,120
Axon area (μm^2)	1.36 ± 0.02	1.33 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.13 ± 0.01*	1.11 ± 0.03*	1.13 ± 0.01*
Axon diameter (μm)	1.18 ± 0.01	1.12 ± 0.01	1.15 ± 0.01	1.04 ± 0.01*	0.97 ± 0.02*	1.03 ± 0.01*
Mean axonal number in NFs	2.53 ± 0.06	3.22 ± 0.30	2.80 ± 0.10	3.42 ± 0.80*	3.43 ± 0.20	3.42 ± 0.08*
Cumulative axon area in nerve (%)	58.60 ± 0.70	58.90 ± 0.98	58.70 ± 0.60	52.70 ± 0.70*	50.90 ± 0.80*	52.29 ± 0.55*
Myelinated fibers						
Number of myelinated NFs	829	495	1,324	526*	229*	756*
Number of myelinated NFs measured	576	295	871	294*	120*	414*
Axon area (μm^2)	4.02 ± 0.08	4.71 ± 0.15	4.26 ± 0.07	4.25 ± 0.15*	5.66 ± 0.30*	4.66 ± 0.15*
Axon diameter (μm)	2.20 ± 0.02	2.37 ± 0.04	2.26 ± 0.02	2.23 ± 0.04*	2.56 ± 0.75*	2.33 ± 0.04
Nerve fiber area (μm^2)	07.06 ± 0.1	7.90 ± 0.20	7.34 ± 0.12	7.59 ± 0.20*	9.06 ± 0.46*	8.02 ± 0.21*
Nerve fiber diameter (μm)	02.90 ± 0.3	3.09 ± 0.04	2.98 ± 0.02	3.01 ± 0.05	3.27 ± 0.09*	3.09 ± 0.04*
G-ratio	0.752 ± 0.004	0.767 ± 0.004	0.757 ± 0.003	0.736 ± 0.01*	0.78 ± 0.01	0.749 ± 0.004*
Fiber density (<i>n</i> /1000 μm^2)	16.96 ± 1.630	14.96 ± 1.35	16.03 ± 1.07	7.95 ± 0.67*	11.49 ± 1.04*	9.08 ± 0.59*

*Significant difference between corresponding parameters in WKY and SHR groups, $p < 0.05$; NFs, nerve fibers.

enhanced excitability was described in the old SHR (Ashton et al., 2020). Although due to evident high dispersion of measurements the increases in ganglion area, the neuronal body number per ganglion and the total neuronal body number per SHR atria did not reach statistically significant difference between SHR and WKY in this study, the significantly smaller neuronal somata in SHR resulted the increased density of neuronal somata within the ganglia of old SHR comparing with the same age control WKY. Therefore, the ascertained increases in both the parasympathetic components and the sympathetic activity as well as the previously discovered pacing-induced heart failure in the canine model (Ng et al., 2011) demonstrate the significant structural alterations in the intrinsic cardiac neural plexus due to arterial hypertension.

We found that the neuronal body area was smaller in SHR to compare with WKY in both age groups, in adult and old one as well. It is worth noting that the difference in the neuronal body sizes was larger in old animals, where SHR neurons were 19% smaller than in WKY, while in the adult group they were only on 6% smaller (Ranceviene et al., 2022). It is considered that neuron size has significant consequences for the excitability of a neuron and the generation of action potentials, resulting that smaller neurons are more excitable (Koester & Siegelbaum, 2000; Steinback et al., 2010). Recent physiological findings indicating that

the excitability of intracardiac neurons is enhanced in arterial hypertension (Ashton et al., 2020) can be resulted by decrease of neuronal somata, what was demonstrated in this study. However, the larger areas of intracardiac neuronal somata were found in the hypertrophied hearts of SHR with heart failure compared with the neurons from normotensive WKY rats (Singh et al., 2013).

4.3 | Intracardiac nerves

Despite numerous studies on the impact of arterial hypertension on the body, the arterial hypertension effect on peripheral nerves is limited and almost absent in regard to intramural nerves. Miscellaneous alterations of the intracardiac nerves ascertained in this study imply the disbalancing effect of arterial hypertension on the intracardiac nerve plexus. In general, degenerative changes undergo within SHR nerves which suggest the partial atrophy of atrial and ventricular epicardiac nerves due to the shrinkage of axonal size within unmyelinated nerve fibers and nearly twice decreased density of myelinated nerve fibers. The size of axons and their number within unmyelinated nerve fibers were found to decrease in the aortic depressor nerve in SHR (Fazan et al., 2001). In addition, the number and density of myelinated nerve fibers were found smaller in the phrenic nerve

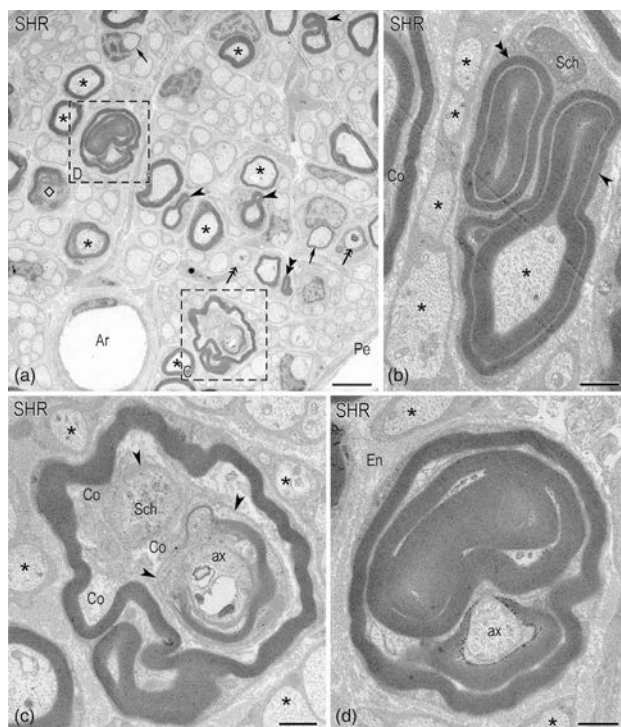


FIGURE 8 Ultrastructure of myelinated nerve fibers in the nerves of SHR. (a) a low magnification electron micrograph demonstrating general view of the nerve with the numerous myelinated nerve fibers scattered among unmyelinated ones. Perineurium (Pe) is seen on the lower-right corner and a small arteriole (Ar) on the left side. Intact myelinated nerve fibers with myelin sheath corresponding to the axon diameter are marked by asterisk (*). Three fibers with the comma-shaped myelin outfoldings are indicated by arrowheads, and fiber with recurrent loop outfolding is indicated with a double arrowhead. A diamond indicates that the axon was covered by the swollen myelin sheath just from one side. Arrows indicate the thinly myelinated nerve fibers. Two extraordinary hypermyelinated fibers are boxed and enlarged in c and d. Two-headed arrows indicate axons with inclusions. (b) Two myelin outfoldings – the comma-shaped (arrowhead) and the recurrent loop (double arrowhead), are seen in the same Schwann cell. On the left image side, the myelinated fiber with the collagen fibers (Co) beneath the outer layer of myelin is seen. (c) Inset from a demonstrating the aberrant nerve fiber with axon (ax) containing inclusions and partly surrounded by myelin. Additionally, the second irregular ring of myelin envelops both the another fragment of Schwann cell (Sch) and the thin rim of endoneurial collagen fibrils (Co). Arrowheads indicate the basal lamina surrounding Schwann cell fragments. (d) Inset from image a to illustrate the hypermyelination of axon (ax) with focally redundant loops and tomacula inside of outer layer of myelin sheath. Intact axons – are pointed by asterisks. Other abbreviations: Schwann cell – Sch, endoneurium – En. Scale bars: 5 μ m in A, 1 μ m in b-d

(Rodrigues et al., 2011), tibial and sural nerves of SHR (Ozaki & Matsuura, 2020). However, the unchanging density of myelinated nerve fibers was found in the SHR sural and sciatic nerves by Gregory et al. (2012) or even bigger this parameter was reported in the aortic depressor nerve of SHR by Fazan et al. (1999). The data on the increase in diameters of the SHR nerves from the lower

ventricular sites appear to contradict the first our conclusion about the presumable partial atrophy of epicardiac nerves at the coronary sulcus. However, keeping in mind the hypertension-induced fibrosis described earlier for the heart muscle cells (Burns et al., 2007; Greenwood et al., 2001; Schlaich et al., 2003) and some intramural nerves (Bechara et al., 2003; Sanada et al., 2012), it is

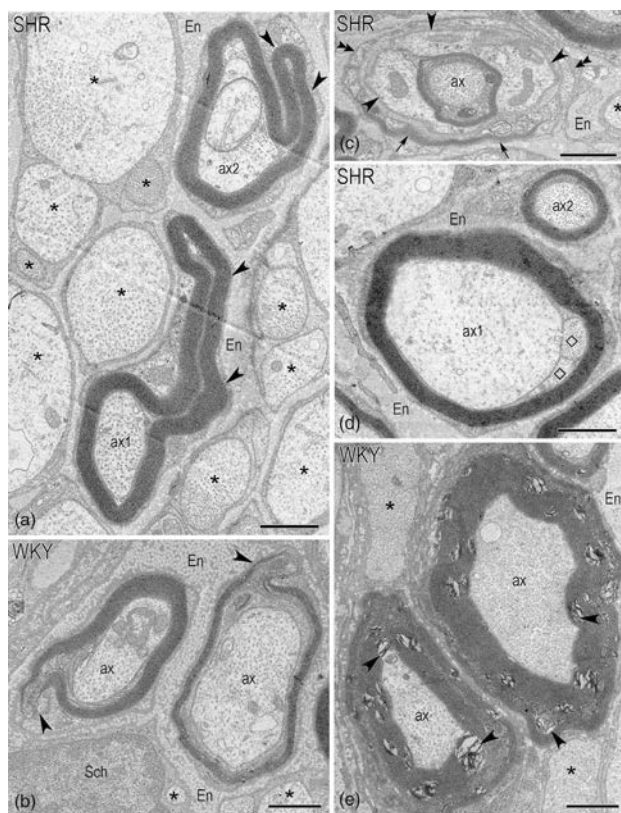


FIGURE 9 Diversity of ultrastructural aberrations of myelinated nerve fibers in WKY and SHR nerves. (a) Two hypermyelinated axons (ax1 and ax2) with comma-shaped myelin outfoldings (arrowheads). The myelin sheath covering of the ax1 exceeds threefold its perimeter. Neighboring unmyelinated axons vary in size – some of them look as being swollen while others – as the shrunken one. (b) “Cytoplasmic protrusions” in the myelin sheath (arrowheads) forming the particular hooks. (c) Thinly myelinated axon which is surrounded by three Schwann cells (arrowheads) and covered by the layer of endoneurial collagen fibers and the second layer of Schwann cells (double arrowheads) in addition. Moreover, the remains of myelin are evident in the lower part of the circle (arrows). (d) Three axons under the same myelin sheath. The main axon (ax1) is regular in size but the other two (marked by diamonds) are much thinner and look as being supplementary. Note the tiny and thinly myelinated axon (ax2) in the upper-right corner. (e) Swollen myelin sheaths of two axons (ax). Numerous fractures (some indicated by arrowheads) are seen in myelin. Note the particularly dense collagen fibrils in the endoneurium. The unmyelinated axons pointed by asterisks, while, myelinated axons indicated by ax, Schwann cells by Sch, and endoneurium by En. Scale bars – 1 μ m

possible that certain fibrosis may occur within intracardiac SHR nerves which results in a proportional decrease of nerve structures demonstrated by both, the immunohistochemical staining for PGP 9.5 and the ultrastructural analysis of this study, particularly in the samples of cardiac ventricles.

The general decrease of myocardial nerve fiber density shows degenerative changes in examined SHR as well. The mean difference in densities of myocardial nerve fibers between WKY and SHR was more evident in the atria than in the ventricles. The densest innervation of the SA nodal area decreased most of all, by more than

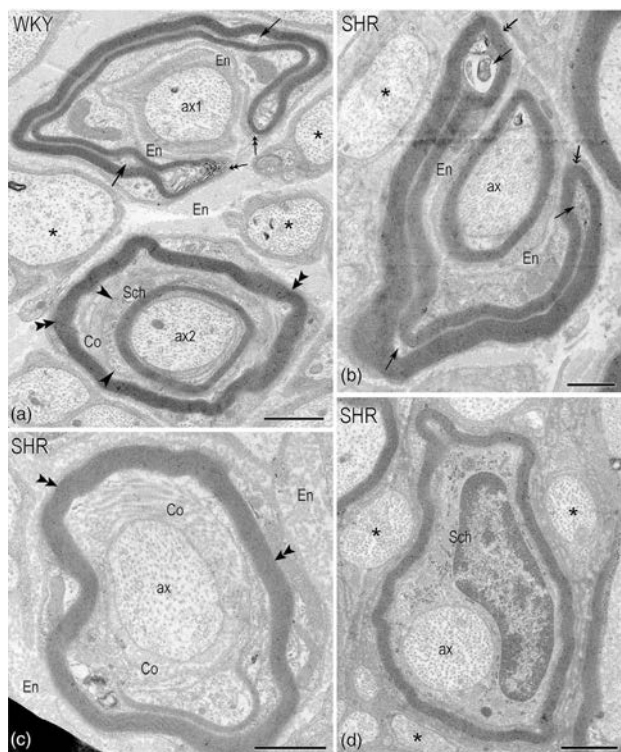


FIGURE 10 Unusual ultrastructural variations of the myelinated nerve fibers in WKY and SHR nerves. (a) Two types of the abnormal myelinated fibers from WKY rat nerve. Note the upper unmyelinated axon (ax1) which is surrounded by the collapsed myelin semicircle. The endings of this semicircle (two-headed arrows) imply that two layers of myelin are continuous, and the inner content of Schwann cell is lessened till thin layer of cytoplasm (arrows). The lower myelinated axon (ax2) is surrounded by the second layer of myelin (double arrowheads). Inside the second layer, there are located both the cytoplasm of Schwann cell (Sch) enclosed by basal lamina (arrowheads) and the layer of collagen fibrils. (b) The myelinated axon (ax) encircled by the collapsed myelin sheath. The endings of myelin semicircle (two-headed arrows) demonstrate the continuation of myelin layers and the remnants of cytoplasm between myelin layers (arrows). (c) The unmyelinated axon (ax) rined by both the prominent collagen fibrils and the above situated myelin sheath (double arrowheads). (d) Schwann cell with the nucleus located inside of the myelin sheath. The unmyelinated axons are pointed by asterisks. Other abbreviations: En - endoneurium; Co - collagen fibrils. Scale bars - 1 μ m

a half, by one-third of atrial myocardium and at least ventricular myocardium. In some assessed areas of the atrial and ventricular walls, nonetheless, density of the myocardial nerve meshwork was found to increase. Variability in density of nerve fibers within distinct heart areas support ideas about autonomic imbalance or regional denervation and hyperinnervation developing in hearts of hypertensive rats during aging (Herring et al., 2019; Scridon et al., 2012).

Earlier data about structural changes of myelinated axon and fiber area induced by hypertension as well as thickness of myelin sheath are rather contradictive. Axon area of myelinated nerve fibers in SHR was decreased in the sural and sciatic nerves (Gregory et al., 2012), aortic depressor nerve (Fazan et al., 1999), tibial and sural nerves (Ozaki & Matsuura, 2020), but they were increased in the sural and phrenic nerves according to other authors (Rodrigues et al., 2011; Sanada et al., 2012).

Our measurements of myelinated nerve fibers within epicardiac nerves demonstrate increase of the SHR axon area which was more prominent in ventricular nerves.

Unusual ultrastructural aberrations of myelinated nerve fibers demonstrated in this study were described in the adult WKY and SHR intracardiac nerves as well (Ranceviene et al., 2022). It has to be noted that in adult animals comparing with the old ones a smaller proportion of fibers were altered, and in both age groups, the adult and old rats, from other side, more fibers were altered in SHR nerves. In this study, therefore, only a half of myelinated nerve fibers in old SHR nerves could be measured due to mismatching perimeters of axon and inner myelin sheath. Morphologically identical aberrations of myelin sheaths within intracardiac nerves demonstrated in this study were described for inherited demyelinating neuropathies. Demyelination in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and Charcot-Marie-Tooth diseases are mainly linked due to abnormalities of genes of Peripheral Myelin Protein 22 (Bilbao & Schmidt, 2015; Jouaud et al., 2019). "Tomacula" and myelin outfoldings are striking neuropathological features of diverse groups of inherited demyelinating neuropathies. It was suggested that dysregulated phosphoinositide levels play a critical role in the pathology of tomaculous neuropathies (Goebbels et al., 2012). Although neuropathy induced by hypertension was reported earlier for the sural and sciatic nerves (Gregory et al., 2012; Sanada et al., 2012) the detail ultrastructural analysis revealing neuropathic changes of myelinated nerve fibers was done in our study only. On the other hand, it is well-known that remyelination is a feature of almost all peripheral neuropathies (clinical and experimental), irrespective of etiology (Hall, 1983). Some signs of remyelination like the thinly myelinated nerve fibers occasionally encircled by supernumerary Schwann cell processes were seen in nerves examined in the present study but they were not numerous. Presumably, myelinated nerve fibers with endoneurium beneath myelin and the axons ensheathed with the collapsed myelin identified by us in the present study may be considered as the aberrantly occurring remyelination. Noteworthy, myelinated nerve fibers with Schwann cell nuclei inside of myelin sheaths found within intracardiac nerves previously were addressed to the aberrant remyelination by Bilbao and Schmidt (2015).

It has to be noted that neuropathic changes of myelin sheaths described within epicardiac nerves of SHR were observed also within nerves of WKY rats yet in less quantities. Despite Wistar and WKY rats have been classified as normotensive animals, it is important to emphasize that systolic blood pressure values in the WKY rats are higher than in Wistar rats and blood pressure of WKY rats is close

to a hypertension borderline. Since the chronic increase in blood pressure can lead to such consequences as the left ventricular concentric hypertrophy, arterial stiffness, stroke, myocardial infarction, and heart failure (Rezende et al., 2021), there is a real possibility for developing of structural alterations within myelinated nerve fibers of WKY similar to the determined in SHR intracardiac nerves. Thus, it was assumed that Wistar rats should be considered as more suitable normotensive control animals for SHR than WKY rats for experiments aimed to examine impact of blood pressure to cardiac structure and function at different age of animals as WKY rats exhibit early declines in cardiac function and blood pressure values in the upper limit of normal blood pressure (Rezende et al., 2021). Therefore, the present data about numerous neuropathic ultrastructural changes of intracardiac nerves raise the new doubts for the suitability of WKY rats as the golden control standard for SHR studies and further examinations are crucial for a real understanding of structural changes of intrinsic cardiac neural plexus caused by essential arterial hypertension.

In conclusion, the determined structural changes of intrinsic cardiac neural plexus caused by arterial hypertension are heterogeneous and may be supporting the physiological implication about partial cardiac denervation occurring together with the hyperinnervation of the SHR heart.

AUTHOR CONTRIBUTIONS


Neringa Pauziene: Conceptualization; data curation; formal analysis; funding acquisition; investigation; methodology; project administration; resources; supervision; validation; visualization; writing – original draft; writing – review and editing. **Dalia Ranceviene:** Data curation; formal analysis; funding acquisition; investigation; visualization; writing – original draft. **Kristina Rysevaite:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; methodology; software; supervision; validation; visualization. **Hermanas Inokaitis:** Investigation; methodology; software; visualization. **Inga Saburkina:** Conceptualization; investigation; methodology. **Khrystyna Plekhanova:** Formal analysis; investigation. **Deimante Sabeckiene:** Formal analysis; investigation; software. **Ignas Sabeckis:** Formal analysis; investigation; software; visualization. **Rugile Martinaityte:** Software. **Ernesta Pilnikovaite:** Software. **Dainius H. Pauza:** Conceptualization; methodology; writing – review and editing.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Tomas Ragauskas for technical assistance. Dmitrij Kvitka, Vilma Zigmantaite, and Jonas Jurcevicius are acknowledged for their help collecting physiological data, while Audrys G. Pauza from the

Centre for Heart Research, Department of Physiology, Faculty of Medical and Health Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand - for his careful reading of the manuscript and editorial assistance. This study was supported by the Grant S-MIP-19-23/PRM19-113 from the Research Council of Lithuania and the small grants V-786 and V-789 from the Research Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

ORCID

Neringa Pauziene  <https://orcid.org/0000-0001-5005-3352>

Hermanas Inokaitis  <https://orcid.org/0000-0001-9672-7420>

Dainius H. Pauza  <https://orcid.org/0000-0001-8597-4370>

REFERENCES


- Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abegaz, K. H., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., et al. (2020). Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet*, *396*, 1223–1249.
- Ashton, J. L., Argent, L., Smith, J. E. G., Jin, S., Sands, G. B., Smail, B. H., & Montgomery, J. M. (2020). Evidence of structural and functional plasticity occurring within the intracardiac nervous system of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *318*, 1387–1400.
- Batulevičius, D., Pauziene, N., & Pauza, D. H. (2003). Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. *Annals of Anatomy*, *185*, 449–459.
- Bechara, A. J., Cao, G., Casabé, A. R., Romano, S. V., & Toblli, J. E. (2003). Morphological modifications in clitoris and vagina in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Impotence Research*, *15*, 166–172.
- Bélichard, P., Pruneau, D., & Rochette, L. (1988). Influence of spontaneous hypertension and cardiac hypertrophy on the severity of ischemic arrhythmias in the rat. *Basic Research in Cardiology*, *83*, 560–566.
- Bilbao, J. M., & Schmidt, R. E. (2015). *Schwann cells and myelin in the peripheral nervous system. Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy* (pp. 85–109). Springer International Publishing.
- Binkley, P. F., Nunziata, E., Haas, G. J., Nelson, S. D., & Cody, R. J. (1991). Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: Demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *Journal of the American College of Cardiology*, *18*, 464–472.
- Burns, J., Sivananthan, M. U., Ball, S. G., Mackintosh, A. F., Mary, D. A., & Greenwood, J. P. (2007). Relationship between central sympathetic drive and magnetic resonance imaging-determined left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*, *115*, 1999–2005.
- Cao, J. M., Fishbein, M. C., Han, J. B., Lai, W. W., Lai, A. C., Wu, T. J., Czer, L., Wolf, P. L., Denton, T. A., Shintaku, I. P., Chen, P. S., & Chen, L. S. (2000). Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation*, *101*, 1960–1969.
- Charan, J., & Kantharia, N. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, *4*, 303–306.
- Clyburn, C., Sepe, J. J., & Habecker, B. A. (2022). What gets on the nerves of cardiac patients? Pathophysiological changes in cardiac innervation. *The Journal of Physiology*, *600*, 451–461.
- Dickie, R., Bachoo, R. M., Rupnick, M. A., Dallabrida, S. M., DeLoid, G. M., Lai, J., DePinho, R. A., & Rogers, R. A. (2006). Three-dimensional visualization of microvessel architecture of whole-mount tissue by confocal microscopy. *Microvascular Research*, *72*, 20–26.
- Esler, M., Lambert, E., & Schlaich, M. (2010). Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *Journal of Applied Physiology*, *109*, 1996–1998.
- Fazan, V. P., Júnior, R. F., Salgado, H. C., & Barreira, A. A. (1999). Morphology of aortic depressor nerve myelinated fibers in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *77*, 133–139.
- Fazan, V. P., Salgado, H. C., & Barreira, A. A. (2001). Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *280*, 1560–1564.
- Fisher, J. P., & Paton, J. F. R. (2011). The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: Implications for hypertension. *Journal of Human Hypertension*, *26*, 463–475.
- Goebbels, S., Oltrogge, J. H., Wolfer, S., Wieser, G. L., Nientiedt, T., Pieper, A., Ruhwedel, T., Groszer, M., Sereda, M. W., & Nave, K. A. (2012). Genetic disruption of Pten in a novel mouse model of tacomulous neuropathy. *EMBO Molecular Medicine*, *4*, 486–499.
- Greenwood, J. P., Scott, E. M., Stoker, J. B., & Mary, D. A. (2001). Hypertensive left ventricular hypertrophy: Relation to peripheral sympathetic drive. *Journal of the American College of Cardiology*, *38*, 1711–1717.
- Gregory, J. A., Jolival, C. G., Goor, J., Mizisin, A. P., & Calcutt, N. A. (2012). Hypertension-induced peripheral neuropathy and the combined effects of hypertension and diabetes on nerve structure and function in rats. *Acta Neuropathologica*, *124*, 561–573.
- Haburčák, M., Harrison, J., Buyukozturk, M. M., Sona, S., Bates, S., & Birren, S. J. (2022). Heightened sympathetic neuron activity and altered cardiomyocyte properties in spontaneously hypertensive rats during the postnatal period. *Frontier in Synaptic Neuroscience*, *14*, 995474.
- Hall, S. M. (1983). The response of the (myelinating) Schwann cell population to multiple episodes of demyelination. *Journal of Neurocytology*, *12*, 1–12.
- Herring, N., Kalla, M., & Paterson, D. J. (2019). The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: Current concepts and emerging therapies. *Nature Reviews Cardiology*, *16*, 707–726.
- Ikedo, K., Nara, Y., & Yamori, Y. (1991). Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Laboratory Animals*, *25*, 26–29.
- Itter, G., Jung, W., Juretschke, P., Schoelkens, B. A., & Linz, W. (2004). A model of chronic heart failure in spontaneous hypertensive rats (SHR). *Laboratory Animals*, *38*, 138–148.
- Johnson, A. K., Zhang, Z., Clayton, S. C., Beltz, T. G., Hurley, S. W., Thunhorst, R. L., & Xue, B. (2015). The roles of sensitization

- and neuroplasticity in the long-term regulation of blood pressure and hypertension. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309, 1309–1325.
- Jouaud, M., Mathis, S., Richard, L., Lia, A. S., Magy, L., & Vallat, J. M. (2019). Rodent models with expression of PMP22: Relevance to dysmyelinating CMT and HNPP. *Journal of the Neurological Sciences*, 398, 79–90.
- Kanazawa, H., & Fukuda, K. (2022). The plasticity of cardiac sympathetic nerves and its clinical implication in cardiovascular disease. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 14, 960606. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.960606>
- Kanazawa, H., Ieda, M., Kimura, K., Arai, T., Kawaguchi-Manabe, H., Matsushashi, T., Endo, J., Sano, M., Kawakami, T., Kimura, T., Monkawa, T., Hayashi, M., Iwanami, A., Okano, H., Okada, Y., Ishibashi-Ueda, H., Ogasawa, S., & Fukuda, K. (2010). Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 408–421.
- Koester, J., & Siegelbaum, S. A. (2000). Local signaling: Passive electrical properties of the neuron. In E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.), *Principles of neural science* (pp. 136–143). McGraw-Hill.
- Kuroda, K., Kato, T. S., & Amano, A. (2015). Hypertensive cardiomyopathy: A clinical approach and literature review. *World Journal of Hypertension*, 5, 41–52.
- Kurtz, T. W., & Curtis Morris, R. (1987). Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 10, 127–131.
- LeGrice, I. J., Pope, A. J., Sands, G. B., Whalley, G., Doughty, R. N., & Small, B. H. (2012). Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 303, 1353–1365.
- Lip, G. Y. H., Coca, A., Kahan, T., Boriani, G., Manolis, A. S., Olsen, M. H., Oto, A., Potpara, T. S., Steffel, J., Marin, F., de Oliveira Figueiredo, M. J., de Simone, G., Tzou, W. S., En Chiang, C., & Williams, B. (2017). Hypertension and cardiac arrhythmias: Executive summary of a consensus document from the European heart rhythm association (EHRA) and ESC Council on hypertension, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLEACE). *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy*, 3, 235–250.
- Mancia, G., & Grassi, G. (2014). The autonomic nervous system and hypertension. *Circulation Research*, 114, 1804–1814.
- Martínez, L. A., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2019). Ganglionic long-term potentiation in prehypertensive and hypertensive stages of spontaneously hypertensive rats depends on GABA modulation. *Neural Plasticity*, 2019, 7437894.
- Merino-Jiménez, C., Miguel, F., Ferial Pliego, J. A., Zetina Rosales, M. E., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2018). Sympathetic hyperactivity and age affect segregation and expression of neurotransmitters. *Frontiers Cellular Neuroscience*, 12, 411.
- Ng, G. A., Mantravadi, R. K., Walker, W. H., Ortin, W. G., Choi, B. R., de Groat, W., & Salama, G. (2009). Sympathetic nerve stimulation produces spatial heterogeneities of action potential restitution. *Heart Rhythm*, 6, 696–706.
- Ng, J., Villuendas, R., Cokic, I., Schlammer, J. E., Gordon, D., Koduri, H., Benefield, B., Simon, J., Murthy, S. N., Lomasney, J. W., Wasserstrom, J. A., Goldberger, J. J., Aistrup, G. L., & Arora, R. (2011). Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure: Creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 4, 388–396.
- Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Circulation Journal*, 27, 282–293.
- Ozaki, K., & Matsuura, T. (2020). Superimposition of hypertension on diabetic peripheral neuropathy affects small unmyelinated sensory nerves in the skin and myelinated tibial and sural nerves in rats with alloxan-induced type 1 diabetes. *Toxicologic Pathology*, 33, 161–169.
- Panzenhagen, A. C., Bau, C. H. D., Grevet, E. H., & Rovaris, D. L. (2019). An animal model of what? The case of spontaneously hypertensive rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 90, 169–176.
- Paton, J. F. R., & Waki, H. (2009). Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 89–94.
- Ranceviene, D., Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Azukaite, J., Pauza, D. H., & Pauziene, N. (2022). Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats. *Histology & Histopathology*, 37, 18453.
- Rezende, L. M. T., Soares, L. L., Drummond, F. R., Suarez, P. Z., Leite, L., Rodrigues, J. A., Leal, T., Favarato, L., Reis, E. C. C., Favarato, E., Carneiro Júnior, M., Natali, A. J., Coimbra, C., & Gomes, T. P. (2021). Is the Wistar rat a more suitable normotensive control for SHR to test blood pressure and cardiac structure and function? *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 35, 161–171.
- Ridgway, R. L. (1986). Flat, adherent, well-contrasted semithin plastic sections for light microscopy. *Stain Technology*, 61, 253–255.
- Rodrigues, A. R., Ferreira, R. S., Salgado, H. C., & Fazan, V. P. S. (2011). Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, 583–591.
- Sabbatini, M., Tomassoni, D., & Amenta, F. (2001). Hypertensive brain damage: Comparative evaluation of protective effect of treatment with dihydropyridine derivatives in spontaneously hypertensive rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 2085–2105.
- Sanada, L. S., Rocha Kalil, A. L., Tavares, M. R., Neubern, M. C. M., Salgado, H. C., & Fazan, V. P. (2012). Sural nerve involvement in experimental hypertension: Morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *BMC Neuroscience*, 13, 1–11.
- Schlaich, M. P., Kaye, D. M., Lambert, E., Sommerville, M., Socratous, F., & Esler, M. D. (2003). Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 108, 560–565.
- Scrifon, A., Gallet, C., Arisha, M. M., Oréa, V., Chapuis, B., Li, N., Tabib, A., Christé, G., Barrès, C., Julien, C., & Chevalier, P. (2012). Unprovoked atrial tachyarrhythmias in aging spontaneously hypertensive rats: The role of the autonomic nervous system. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 303, 386–392.
- Singh, S., Sayers, S., Walter, J. S., Thomas, D., Dieter, R. S., Nee, L. M., & Wurster, R. D. (2013). Hypertrophy of neurons

- within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: The potential role of nerve growth factor. *Journal of the American Heart Association*, 2, 1–11.
- Slama, M., Ahn, J., Varagic, J., Susic, D., & Frohlich, E. D. (2004). Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: Effects of hypertension and age. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 286, 181–185.
- Smith, D. I., Tran, H. T., & Poku, J. (2018). *Hemodynamic considerations in the pathophysiology of peripheral neuropathy. Blood Pressure - From Bench to Bed*.
- Steinback, C. D., Salmanpour, A., Breskovic, T., Dujic, Z., & Shoemaker, J. K. (2010). Sympathetic neural activation: An ordered affair. *The Journal of Physiology*, 588, 4825–4836.
- Whelton, P. K., Carey, R. M., Aronow, W. S., Casey, D. E., Jr., Collins, K. J., Dennison Himmelfarb, C., DePalma, S. M., Gidding, S., Jamerson, K. A., Jones, D. W., MacLaughlin, E. J., Muntner, P., Oviagele, B., Smith, S. C., Jr., Spencer, C. C., Stafford, R. S., Taler, S. J., Thomas, R. J., Williams, K. A., Sr., ... Wright, J. T., Jr. (2018). 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *Hypertension*, 71, 13–115.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., ... Desormais, I. (2018). ESC scientific document group. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 39, 3021–3104.
- Zhang-James, Y., Middleton, F. A., & Faraone, S. V. (2013). Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiological Genomics*, 45, 528–538.

How to cite this article: Pauziene, N., Ranceviene, D., Rysevaite-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D., Sabeckis, I., Martinaityte, R., Pilnikovaite, E., & Pauza, D. H. (2023). Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension. *The Anatomical Record*, 306(9), 2313–2332. <https://doi.org/10.1002/ar.25109>

Neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats

Neringa Pauziene | Dalia Ranceviene | Kristina Rysevaite-Kyguoliene |
Tomas Ragauskas | Hermanas Inokaitis | Ignas Sabeckis | Khrystyna Plekhanova |
Olena Khmel | Dainius H. Pauza 

Institute of Anatomy, Faculty of Medicine,
Lithuanian University of Health Sciences,
Kaunas, Lithuania

Correspondence

Dainius H. Pauza, Institute of Anatomy,
Faculty of Medicine, Lithuanian University
of Health Sciences, A. Mickeviciaus Street
9, Kaunas LT-44307, Lithuania.
Email: dainius.pauza@lsmu.lt

Funding information

The Research Council of Lithuania, Grant/
Award Number: S-MIP-19-23/PRM19-113

Abstract

The acknowledged hypothesis of the cause of arterial hypertension is the emerging disbalance in sympathetic and parasympathetic regulations of the cardiovascular system. This disbalance manifests in a disorder of sustainability of endogenous autonomic and sensory neural substances including calcitonin gene-related peptide (CGRP). This study aimed to examine neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus (GP) triggered by arterial hypertension during ageing in spontaneously hypertensive rats of juvenile (prehypertensive, 8–9 weeks), adult (early hypertensive, 12–18 weeks) and elderly (persistent hypertensive, 46–60 weeks) age in comparison with the age-matched Wistar–Kyoto rats as controls. Parasympathetic, sympathetic and sensory neural structures of GP were analysed and evaluated morphometrically in tissue sections and whole-mount cardiac preparations. Both the elevated blood pressure and the evident ultrasonic signs of heart failure were identified for spontaneously hypertensive rats and in part for the aged control rats. The amount of adrenergic and immunoreactive to CGRP neural structures was increased in the adult group of spontaneously hypertensive rats along with the significant alterations that occurred during ageing. In conclusion, the revealed chemical alterations of GP support the hypothesis about the possible disbalance of efferent and afferent heart innervation and may be considered as the basis for the emergence and progression of arterial hypertension and perhaps even as a consequence of hypertension in the aged spontaneously hypertensive rats. The determined anatomical changes in the ageing Wistar–Kyoto rats suggest this breed being as inappropriate for its use as control animals for hypertension studies in older animal age.

KEYWORDS

CGRP, ChAT, heart ganglia, nerves and plexus, hypertension, immunohistochemistry, SIF cells, TH

1 | INTRODUCTION

At any given time, the influence of the autonomic nervous system on the heart activity balances between the opposing actions of sympathetic and parasympathetic systems (Patterson, 1978). The sympathetic innervation of the heart arises from the preganglionic neurons in the intermediolateral nuclei of the spinal cord distributed from the first through the fifth thoracic segments. The primary visceral motor neurons are in the adjacent thoracic paravertebral ganglia of the cardiac plexus. Norepinephrine released from sympathetic postganglionic terminals increases the rate of cardiac pacemaker activity and enhances cardiac contractility. Most of the parasympathetic preganglionic neurons are in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve projecting to intrinsic cardiac ganglia with parasympathetic postganglionic neurons. Activation of the parasympathetic cholinergic innervation of the heart decreases the discharge rate of the cardiac pacemaker in the sinoatrial node and slows the ventricular conduction system (Purves et al., 2001). Long being recognized as the relay station for parasympathetic preganglionic neurons, now intrinsic cardiac ganglia are known to contain a complex neural network involving different neuronal anatomical subtypes that include putative afferent neurons along with cholinergic and adrenergic neuronal somata that presumably represent two major motor phenotypes (Hoover et al., 2009; Pauza et al., 2014). These somata frequently interconnect with somata within or among adjacent intrinsic cardiac ganglia that are the second-order neuronal interactions. Based on this anatomy, intrinsic cardiac neurons may be considered not only as an efferent neuronal relay station under medullary and spinal cord (adrenergic) motor control, but also as an important element in cardiocentric local reflex control. That is why the autonomic control of the heart acts via several loops of feedback maintaining a balance of sympathetic and parasympathetic signals to the heart triggered due to spinal and vagal sensory neurons (Aksu, Gopinathannair, et al., 2021; Aksu, Gupta, & Pauza, 2021; Shivkumar et al., 2016).

The main endogenous autonomic neural substances (noradrenaline, adrenaline and acetylcholine) engage the transmission of necessary neuronal activity on target cells within the mammalian heart (Aksu, Gopinathannair, et al., 2021). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is abundantly synthesized inside the somata of spinal sensory neurons and is considered the most specific neuronal marker of these nerve cells (Navickaite et al., 2021). Moreover, CGRP is also known as one of the most potent microvascular vasodilator substances influencing blood flow within the brain (Toyoda et al., 2000), skin (Escott & Brain, 1993; N'Diaye et al., 2017) and other organs including the heart (Bergdahl et al., 1999; Brain et al., 1985; Li et al., 2014).

Recent studies demonstrate that the sympathetic nervous system plays a role in the pathogenesis of arterial hypertension since the increased sympathetic tone was discovered in both hypertensive patients and spontaneously hypertensive rats (Larsen et al., 2016). The parasympathetic nervous system, in which cholinergic cell bodies predominate within intrinsic cardiac ganglia in all mammalian

species and humans (Pauza et al., 2000, 2002, etc.), has a mitigating impact on development and even manifestation of arterial hypertension (van Zwieten et al., 1995). On the contrary, cholinergic neurons on arterial hypertension may have the opposite impact as the augmented parasympathetic tone was recorded during the early development of hypertension in spontaneously hypertensive rats (Masuda, 2000).

Interestingly, the genesis and manifestation of arterial hypertension depend (may emerge as a consequence of the chemical remodelling of autonomic neurons during animal ageing) (Fisher & Paton, 2011) and arterial hypertension induces peripheral neuropathy (Smith et al., 2018) including alteration of intrinsic cardiac ganglionated plexus (Ashton et al., 2020; Pauziene et al., 2022; Ranceviene et al., 2022). Moreover, heart failure also causes transdifferentiation of sympathetic (adrenergic) nerve fibres into parasympathetic (cholinergic) ones in rat hearts (Kanzawa et al., 2010).

Many previous reports provide evidence that dysregulation of cardiac sympathetic neurotransmission may develop even before the onset of hypertension within the spontaneously hypertensive rats. At 4 weeks of age when the spontaneously hypertensive rats are still normotensive, an increased intracellular calcium transient in response to neuronal depolarization (Li et al., 2012) and a reduction in the activity of the presynaptic norepinephrine uptake transporter (Shanks, Mane, et al., 2013; Shanks, Manou-Stathopoulou, et al., 2013) in stellate and superior cervical ganglionic neurons was demonstrated. Direct stimulation of the right stellate ganglion produced a larger tachycardia in the young spontaneously hypertensive rats than in the wild-type Wistar-Kyoto rats (Shanks, Mane, et al., 2013; Shanks, Manou-Stathopoulou, et al., 2013). However, electrical stimulation of neurons in the stellate ganglion of adult spontaneously hypertensive rats produced a significantly larger response, and norepinephrine release and β -adrenergic receptor responsiveness were also greatly increased compared with control (Herring et al., 2011). The adult spontaneously hypertensive rats had evidence of larger calcium transients on depolarization of cultured stellate neurons (Li et al., 2012), reduced presynaptic norepinephrine uptake activity (Shanks, Mane, et al., 2013; Shanks, Manou-Stathopoulou, et al., 2013) and impaired α_2 -adrenoceptor autoinhibition of norepinephrine release (Zugck et al., 2003). Based on this, the above-cited authors implied that hyperinnervation of the heart by noradrenergic nerve fibres in spontaneously hypertensive rats could be a primary alteration of the heart before hypertension and this hyperinnervation could cause the increased activity of lysine and DOPA uptake, the increased relative weight of the stellate ganglia that supply postganglionic adrenergic nerve fibres to the heart (Kondo et al., 1995).

Spontaneously hypertensive rats were initially developed and used as an animal model to study arterial hypertension by Okamoto and Aoki (1963). Spontaneously hypertensive rats are an inbred strain that was established by selecting hypertension in the Wistar-Kyoto rat strain. Thereby, Wistar-Kyoto rats are regarded as the most suitable control group for studying spontaneously hypertensive rats. Although these two inbred strains have extremely similar

genes, the expressions on cardiovascular and neuropsychological functions are quite different (Huang et al., 2016). Therefore, this study is aimed to examine neurochemical alterations (adaptations) of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive rats and control.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

To eliminate possible gender-dependent differences in anatomy and histochemistry of intrinsic cardiac ganglionated plexus, entirely males of spontaneously hypertensive rats and Wistar–Kyoto rats for control were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Germany) at 8–15 weeks of age. The animals were housed in collective cages and allocated in a controlled environment with a light/dark cycle (12/12h), a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, and had free access to food and water (*ad libitum*) until the designated age of 8–54 weeks was reached. All animals, spontaneously hypertensive and control rats, were divided into three age groups: (1) juvenile (8–9 weeks); (2) adult (12–18 weeks); and (3) aged (46–60 weeks). Juvenile spontaneously hypertensive rats before sexual maturity are prehypertensive in which the blood pressure only starts to climb; meanwhile, the adult spontaneously hypertensive rats, sexually matured animals of this breed, are generally considered as stably hypertensive with systolic blood pressure exceeding over 150 mm Hg (Adams et al., 1989; Boluyt et al., 1995; de Rezende et al., 2021; Doggrel & Brown, 1998; Okamoto & Aoki, 1963; Panzenhagen et al., 2019). The age for persistent hypertension group was based on life span of used breeds which is 1.5–2.5 years for spontaneously hypertensive rats and 2.5–3 years for Wistar–Kyoto rats (Reckelhoff et al., 2018).

Six animals per group were used for immunohistochemistry and three animals per group for electron microscopy. Rats were euthanized in the Animal Research Center of the Lithuanian University of Health Sciences. All experiments with laboratory animals conformed to EU directive 86/609/EEC and were performed under ethical permission No. G2-137.

2.2 | Physiologic measurements

Before euthanasia, the single-blinded investigators performed the blood pressure measurement and echocardiographic analysis. Animals underwent intraperitoneal anaesthesia (ketamine 90 mg/kg and dexmedetomidine 0.5 mg/kg for blood pressure measurement; ketamine 20–40 mg/kg and diazepam 3–5 mg/kg for echocardiography). Measurements were obtained 10 min after anaesthesia administration in a quiet, controlled environment. A warming pad with an ambient temperature of 37°C was used for laying animals.

Arterial blood pressure was measured by the non-invasive tail-cuff method. Automatic data collection was performed using

LabChart software and synchronized to trigger an electronic sphygmomanometer (AD Instruments IN125/R NIBP system, UK) to inflate and deflate the tail-cuff to a calibrated pressure at 1-min intervals. Tail pressure pulsations were detected with a pneumatic pulse transducer. Heart rate, systolic blood pressure and diastolic blood pressure were measured. Mean arterial blood pressure was calculated by the following equation: $\text{DBP} + 1/3(\text{SBP} - \text{DBP})$, in which DBP means the diastolic blood pressure, and SBP is the systolic blood pressure. Each measurement was repeated 10 times, and the median value was used for further analysis.

Echocardiographic measurements were performed at 19–20th, 29–30th and 46–49th weeks of life. After sedation, the animals were placed in a lateral decubitus position after shaving the chest area. Two-dimensional tests were performed with a rapid sampling rate (frame rate) of 120 fps and M-mode, using the ultrasound system (Mindray DC-70) and 3.0–12.0 MHz nominal frequency transducers (phased array) used to examine pets in the veterinary clinic. Two-dimensional transthoracic echocardiography and M-mode were obtained at a scanning speed of 200 mm and adjusted according to heart rate. The images were collected and stored for further analysis. Interventricular septum in diastole (IVSd in mm), interventricular septum in systole (IVSs in mm), the left ventricle internal diameter in diastole (LVIDd in mm), left ventricle internal diameter in systole (LVIDs in mm), left ventricular free wall in diastole (LVWd in mm) and left ventricular free wall in systole (LVWs in mm) were measured following methodology recommended by the American Society of Echocardiography (Sahn et al., 1978) and other researchers (Slama et al., 2004). Each measurement was performed six times, and the average value was used. According to formulas, the shortening fraction (FS in %) and ejection fraction (EF in %) were calculated automatically. A trained researcher performed these examinations through a single-blinded method.

2.3 | Preparations

2.3.1 | Immunohistochemistry

Three types of preparations were made from each of the hearts: (i) whole mounts of atria, (ii) whole mounts of the basal part of ventricles and (iii) transverse serial sections of the middle part of cardiac ventricles.

After euthanasia, animals were perfused *in situ* with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) and prefixed with 4% paraformaldehyde solution (PFA) via a catheter inserted into the chamber of the left cardiac ventricle. Hearts were removed from the chest, fixed in 4% PFA for 40 min and the atria were separated from cardiac ventricles as well as the interatrial septum from the atria. Then, the atria were flattened and pinned on a silicone pad filled with pre-chilled PBS. The whole mount of the basal part of ventricles was prepared in the following way: (1) the ring of the upper portion of cardiac ventricles parallel to the coronary groove and 2–4 mm in thickness was cut off, (2) interventricular septum was extirpated from this ring,

(3) the right ventricle wall of this ring was snapped along the cardiac longitudinal axis, and (4) using a fine microscissors, the myocardial and endocardial layers were removed from this unbend upper portion of cardiac ventricles slenderizing the preparation as thin as possible and avoiding any injury of epicardial and subepicardial layers. The remaining part of the cardiac ventricles was used for transverse cryosections. Subsequently, whole-mount preparations and cryosections were incubated within a mixture of two or three primary antisera that were diluted 1:100 and consisted of antibodies against choline acetyltransferase (ChAT, AB144P; Millipore), tyrosine hydroxylase (TH, AB152; Millipore) and calcitonin gene-related peptide (CGRP, ab10987; Abcam, Cambridge, UK) for 48–72 h at 4°C. Afterwards, whole mounts were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS and incubated with a mix of corresponding secondary antisera diluted 1:500: Anti-goat antibodies were conjugated with a fluorochrome Alexa Fluor Plus 488 (A32814, Invitrogen; Rockford, USA), anti-rabbit—with a fluorochrome Alexa Fluor 647 (A-31573, Invitrogen), and anti-mouse—with a fluorochrome Cy3 (AP192C, Millipore) for 4 h at room temperature with gentle shaking. Lastly, specimens were washed three times for 10 min in 0.1 M PBS, mounted with Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc.), cover-slipped and sealed using clear nail polish.

2.3.2 | Preparations for transmission electron microscopy

Next to euthanasia, the rat chest was opened, perfused with PBS *in situ* and prefixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer via the left cardiac ventricle. Tissue samples of 1 mm³ from the definite sites of atria and ventricles of each heart were prepared according to a protocol of routine transmission electron microscopy, and the samples were orientated in flat embedding moulds for transverse sectioning of cardiac ganglionated nerves. Ultrathin sections were analysed at 120 kV with a Tecnai BioTwin Spirit G2 transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Images were taken with a bottom-mounted 16 M-pixel Eagle 4 K TEM CCD camera, employing specific TIA software (FEI, Eindhoven, The Netherlands).

2.4 | Microscopy and quantitative analysis

Whole-mount preparations and cryosections were observed using a confocal laser scanning microscope LSM 700 with the software package ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Objectives of 10× (for tile-scan panoramas of all preparation types) and 20× (for measurements of neural structures of atrial and ventricular preparations) were used. For analysis of non-sectioned, longitudinal nerves, images of 20 random nerves from the left dorsal atrium and 20 random nerves from ventricular whole-mount preparation were taken. For analysis of TH and CGRP terminals in the ganglia, 10 random ganglia from each atrial whole-mount preparation were

taken. Two random areas were selected for imaging of axon terminals in the left dorsal atrium, sinoatrial area, on the right auricle, and base of the heart near pulmonary veins. All neural structures from the above-mentioned locations were measured in multiple optical sections of the z-stack. The area occupied by neural structures was defined manually to avoid artefacts. The quantity of labelled fluorescent neural structures was calculated using the binary thresholding method available by the software Axiolmage (Rel. 4.8., Carl Zeiss AG) and expressed in percentages. The area of all visible atrial ganglia was manually measured using a flattened z-projection. The quantity of small intensely fluorescent (SIF) cells as non-neural adrenergic structures were excluded from the general quantitative assessment of neural adrenergic structures in hearts of spontaneously hypertensive and control rats and the cumulative area of SIF cells per heart as well as the ratio of SIF cells' area per fixed atrial area were measured and analysed separately. To evaluate the density of meshwork of myocardial nerve fibres positive for TH and CGRP in the ventricular transverse sections, images of 20–30 randomly selected myocardial areas from each transverse section were taken. The tissue areas with transversely sectioned meshwork of nerve fibres positive for TH and CGRP were evaluated on the projection of z-stack images using the above-mentioned method of binary thresholding. The myocardial blood vessels and thick nerves penetrating the myocardium were manually deselected and avoided measuring. Image analysis was performed using the free available Fiji software ImageJ (Schindelin et al., 2012).

2.5 | Statistical analysis

Data are presented as absolute numbers (N), percentages (%), mean (M) and standard error (SE). Statistical analysis was done using IBM SPSS 20.0 software. Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the data. The parametric data samples from two groups were compared with the Student's *t*-test; means of non-parametric data were compared with the Mann-Whitney *U*-test. Differences were considered significant when the *p*-value was ≤ 0.05 .

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of physiologic parameters of investigated animals

The control and hypertensive age-matched groups differed mainly at a young age and became like each other while ageing. The left ventricle parameters (left ventricular internal diameter in systole, left ventricle free wall in systole and diastole) changed the most. The hypertrophy/enlargement of the left ventricle was found in the hypertensive groups of 19–20 weeks. Cardiac function derivative indicators (fractional shortening and ejection fraction) were significantly increased in spontaneously hypertensive rats at a relatively young

age (19–20 weeks) compared with the age-matched control animals. There were no differences in the oldest, 46–49 weeks old age-matched group, except rat body weight—it dropped in the spontaneously hypertensive rats' group (Table 1). In mature-aged animals, the following signs were observed: aortic valve insufficiency and regurgitation (spontaneously hypertensive and control rats); pulmonary valve insufficiency (control rats); left ventricular chamber dilatation and enlargement of the left ventricle with dilatation (spontaneously hypertensive rats).

Measurements of blood pressure determined that spontaneously hypertensive rats have increased (>150 mmHg) systolic, diastolic and mean arterial blood pressure during their life. The blood pressure was prone to increase with age. The same tendency was noticed in the control group: aged control rats even gained SBP >150 mmHg, meaning they also have hypertension. Heart rate varied in the normal rat heart rate range with the inclination to increase with age (Table 2).

3.2 | Cholinergic nerve structures

Intracardiac ganglia of spontaneously hypertensive and control rats involved almost entirely cholinergic neuronal somata (Figure 1). Abundant cholinergic terminals with numerous varicosities within ganglia either surrounded closely the cholinergic and adrenergic neuronal somata or scattered evenly within ganglion (Figure 2). Electron microscopy confirmed numerous axodendritic synapses with plentiful small clear vesicles in presynaptic terminals, which presumably are cholinergic ones (Figure 2b). Far fewer synapses were axosomatic in these ganglia as was observed by electron microscopy (Figure 2c). Similarly, cholinergic terminal axons surrounded either adrenergic or cholinergic neuronal somata distributed within intracardiac nerves, synapsing presumably with them (Figure 2d–i).

Cholinergic, positive for ChAT, nerve fibres were the most abundant type of nerve fibres within the intracardiac nerve plexus almost in all animal groups (Figure 3a,e,i, Table 3). The amount of cholinergic nerve fibres varied greatly in the epicardiac nerves and myocardium of spontaneously hypertensive and control rats. Only ventricular nerves of spontaneously hypertensive rats in all age groups had fewer cholinergic nerve fibres compared with nerves of the age-matched control rats (Table 3).

3.3 | Adrenergic nerve structures and SIF cells

One to three per heart adrenergic, positive for TH, neuronal somata were regularly observed in both spontaneously hypertensive and control rats (Figure 1). Adrenergic neuronal somata were of two types: non-cholinergic adrenergic (Figure 1d–f) and cholinergic biphenotypic adrenergic that were simultaneously positive for both TH and ChAT (Figure 1a–c). The slightly higher number of the second phenotype neuronal somata to compare with the first phenotype was determined in the ganglia of both groups at any age. Likewise, a slightly higher number of cholinergic biphenotypic adrenergic neuronal somata was in the spontaneously hypertensive rats' ganglia. Due to the extremely small number of adrenergic neuronal somata of both types, it was impossible to evaluate their statistical significance.

Contrarily to cholinergic nerve fibres, the majority of adrenergic nerve fibres within the examined ganglia were no varicosities containing and passed the ganglia in transit (Figure 4a–c). However, sporadic adrenergic nerve fibres had differently sized varicosities and surrounded cholinergic ganglionic cells. Based on the latter observations, it may be implied that adrenergic synaptic contacts are possible inside intracardiac ganglia as well (Figure 4d–i). The amount of adrenergic neural structures was elevated in the ganglia of adult

TABLE 1 Mean parameters (standard error) of cardiac echosonic data of the analysed spontaneously hypertensive and control rats of three age groups.

Parameters	19–20 weeks		29–30 weeks		46–49 weeks	
	WKY (N = 6)	SHR (N = 11)	WKY (N = 6)	SHR (N = 6)	WKY (N = 19)	SHR (N = 23)
Weight, g	241 (25)	224 (39)	362 (15)	380 (13)	368 (14)	324 (16)*
IVS d, mm	2.5 (0.1)	2.4 (0.2)	2.3 (0.1)	2.2 (0.1)	2.2 (0.1)	2.1 (0.1)
IVS s, mm	3.4 (0.2)	3.6 (0.2)	3.2 (0.1)	3.1 (0.2)	3.1 (0.1)	3.0 (0.1)
LVID d, mm	4.8 (0.2)	4.4 (0.3)	5.1 (0.3)	5.2 (0.3)	5.2 (0.1)	5.5 (0.2)
LVID s, mm	3.0 (0.1)	1.7 (0.2)*	2.8 (0.2)	2.9 (0.3)	2.8 (0.2)	2.9 (0.2)
LVW d, mm	1.8 (0.5)	2.5 (0.1)	2.2 (0.1)	2.8 (0.1)*	2.5 (0.1)	2.4 (0.1)
LVW s, mm	2.3 (0.5)	3.5 (0.2)*	2.8 (0.2)	3.6 (0.2)*	3.2 (0.1)	3.2 (0.1)
FS, %	38.2 (1)	60.7 (3.9)*	45.1 (1.6)	44.2 (2.9)	45.7 (2.6)	47.6 (3.5)
EF, %	74.3 (1.5)	91.1 (2.2)*	82.2 (1.6)	80.4 (3.1)	81.3 (2.1)	80.4 (2.8)

Abbreviations: d, diastole; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; IVS, interventricular septum; LVID, left internal ventricle diameter; LVW, left ventricular free wall; SHR, spontaneously hypertensive rats; s, systole; WKY, Wistar–Kyoto rats.

*Statistically significant difference between WKY and SHR groups, $p < 0.05$.

TABLE 2 Mean parameters (standard error) of heart rate (beats per minute) and blood pressure (mmHg) of the analysed spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats of three age groups.

Parameters	15–17 weeks		45–47 weeks		52–60 weeks	
	WKY (N = 8)	SHR (N = 8)	WKY (N = 8)	SHR (N = 8)	WKY (N = 10)	SHR (N = 11)
Heart rate	249 (8)	237 (14)	175 (9)	254 (26)*	305 (30)	344 (18)
SBP	118 (4)	173 (9)*	133 (6)	195 (7)*	160 (12)	198 (9)*
DBP	75 (7)	137 (8)*	109 (5)	149 (8)*	116 (13)	150 (7)*
MAP	89 (6)	149 (8)*	117 (5)	164 (7)*	130 (12)	166 (8)*

Abbreviations: bpm, beats per minute; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure; SBP, systolic blood pressure; SHR, spontaneously hypertensive rats; WKY, Wistar-Kyoto rats.

*Significant difference between WKY and SHR groups, $p < 0.05$.

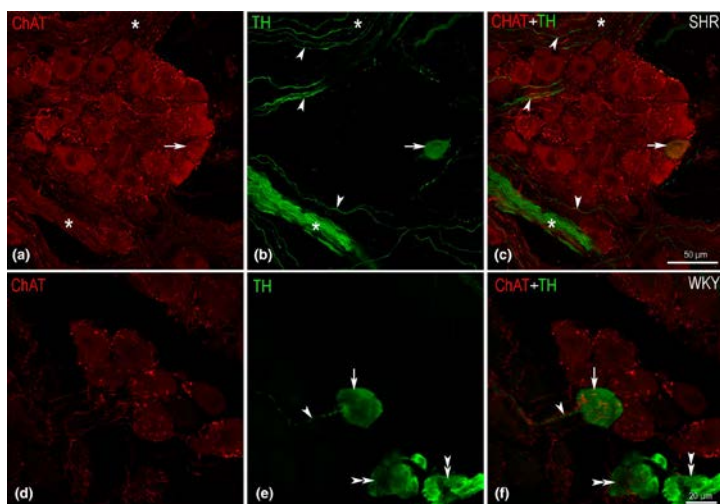


FIGURE 1 Immunofluorescent images of intracardiac ganglia in spontaneously hypertensive and control rats. (a–c): Single cholinergic biphenotypic adrenergic neuronal body (arrow) located between purely cholinergic neuronal somata. Numerous axonal terminals strongly positive for choline acetyltransferase (ChAT) seen as bright red buttons are interspersed between neuronal bodies in the ganglion. The ganglion is located at the intersection of two nerves (*), the lower of which is composed mainly of adrenergic nerve fibres, while in the upper one, just a few adrenergic nerve fibres proceed. Few adrenergic nerve fibres (arrowheads) extend close to ganglionic cells, yet they have no varicosities and other specific signs of synaptic contacts. (d–f) Lesser ganglion in which a single non-cholinergic adrenergic neuronal body (arrow) is located between purely cholinergic ganglionic cells. The axon of this adrenergic neuron is indicated by the arrowhead. Double arrows point to two clusters of SIF cells that differ from principal neurons by evidently smaller size and intensive fluorescent labelling.

and aged spontaneously hypertensive rats in comparison with the same-age control rats (Table 3).

Most intracardiac nerves were mixed in spontaneously hypertensive and control rats, yet the amount of adrenergic nerve fibres compared with cholinergic one was slightly lower (Figure 3b, Table 3). However, some intrinsic cardiac nerves distributed in specific sites at left pulmonary and right cranial veins were encompassing nearly exclusively the adrenergic ones (Figure 2d–i).

Atrial nerves of both spontaneously hypertensive and control rats at all age stages had fewer adrenergic nerve fibres than ventricular ones. In young animals of both groups, the amount of adrenergic nerve fibres was the highest, decreased in adults and did not change in the aged group. Only ventricular nerves in spontaneously hypertensive rats of all age groups had fewer adrenergic nerve fibres compared with age-matched control rats' nerves (Table 3).

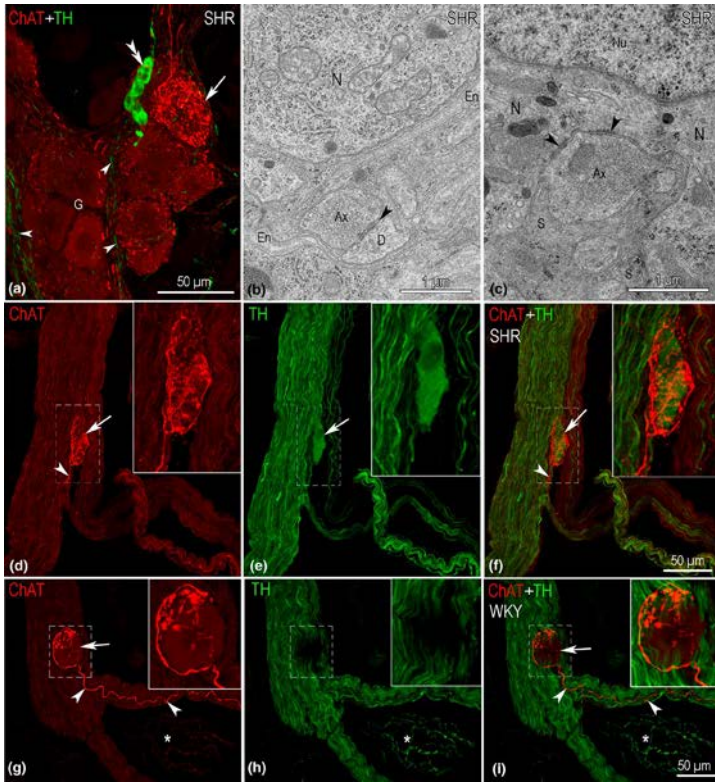


FIGURE 2 Cholinergic terminals in contact with intracardiac neuronal somata. (a) Flattened from a z-stack of optical sections immunofluorescent image of the intracardiac ganglion (G) composed of cholinergic neurons. Note, the variable densities of cholinergic terminals surrounding neuronal somata. The arrow indicates neuronal soma that is unusually densely bounded by axonal varicosities. Several adrenergic nerve fibres (arrowheads) pass through the ganglion. The cluster of SIF cells is indicated by double arrowheads. (b, c) Electron micrographs of axodendritic (B) and axosomatic (C) synapses within intracardiac ganglia. Ax, terminal of axon; En, endoneurium; N, neuronal cytoplasm; Nu, nucleus of neuron; S, satellite cells; (d-f) Solitary non-cholinergic adrenergic neuronal body (arrow) inside intracardiac nerve that involves almost entirely adrenergic nerve fibres. Note the cholinergic nerve fibre (arrowhead) trailing to this neuronal body, bounteously ramifying, containing numerous varicosities that wrap the neuronal body from all sides. (g-i) Adrenergic nerve fibres involving intracardiac nerve with the single cholinergic neuronal body (arrow). Arrowheads indicate cholinergic nerve fibre trailing through the nerve branch, surrounding the neuronal body and containing plentiful varicosities that encompass the neuron body. Asterisks in (g-i) indicate a blood vessel with a network of adrenergic nerve fibres.

Interestingly, the ratio of adrenergic and cholinergic nerve fibres in ventricular nerves alters differently with age in spontaneously hypertensive and control rats. In the control rats, the amount of cholinergic nerve fibres was maximal in the nerves of young animals and decreased gradually with age, while spontaneously hypertensive rats' nerves had the lowest amount of cholinergic nerve fibres at the beginning and increased with age. In contrast to the cholinergic phenotype, the amount of adrenergic nerve fibres increased with age in

the nerves of control rats, yet it decreased in the nerves of the adult and aged spontaneously hypertensive rats (Figure 5).

Adrenergic fibres innervating SAN underwent the same changes as in nerves. That is, the SAN of young animals in both groups was most abundantly innervated and the amount of TH-IR fibres decreased with age. However, contractile myocardium of atria and ventricles most densely innervated by adrenergic fibres was in the adult group of spontaneously hypertensive rats (Table 3).

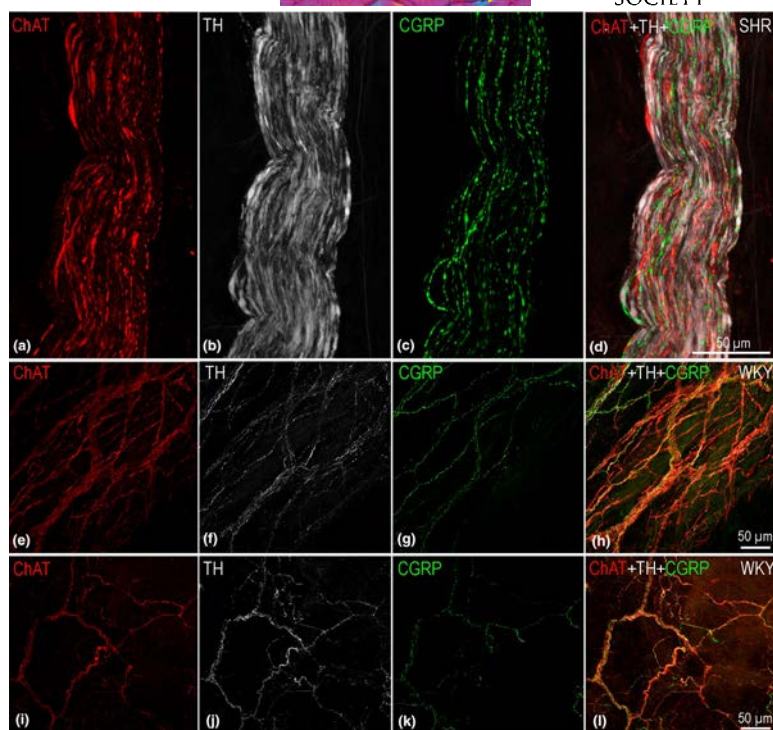


FIGURE 3 (a–d) immunofluorescent images demonstrating the mixed intracardiac nerve in which the majority of nerve fibres are either cholinergic (ChAT), adrenergic (TH) or immunoreactive for CGRP. Note, an almost equal number of ChAT and CGRP-positive nerve fibres. (e–h) Cholinergic (ChAT), adrenergic (TH) and CGRP immuno-positive nerve fibres within dense tiny meshwork spread between invisible (non-labelled) cells of the sinoatrial node (SAN) area. (i–l) a sparse meshwork of adrenergic (TH), cholinergic (ChAT) and peptidergic (CGRP) nerve fibres in contractile myocardium.

Plentiful clusters of SIF cells highly immunoreactive for tyrosine hydroxylase were distributed nearby the nerves and ganglia, yet no nerve fibres of any chemical phenotype were determined between these adrenergic cells. Most SIF cells were detected within clusters of 5–12 cells distributed either close to the nerves or ganglia or scattered between neuronal somata inside the ganglia (Figure 6a). We identified that the comparatively high cumulative area of SIF cells in hearts of young spontaneously hypertensive and control rats decreased with the animal age until animals reached maturity (adult animals), and it became the highest in groups of the old animals (Table 3). It should be noted that SIF cells were more numerous in all age groups of spontaneously hypertensive rats (Table 3). As well, the largest clusters of SIF cells were identified in the hearts of spontaneously hypertensive rats, in which the area of some SIF cells' clusters was larger than the area of some ganglia, close to which these cells distributed (Figure 6b). Large clusters of SIF cells were

not observed in hearts of control rats. Electron microscope examinations confirmed: (1) the presence of SIF cells beside the capillaries in ganglia and nerves (Figure 6c) and (2) no nerve fibres and no potential synaptic contacts within the clusters of SIF cells.

3.4 | Nerve fibres immunoreactive for CGRP

Although the positive to CGRP nerve fibres were distributed in all the examined ganglia, atrial and ventricular nerves as well as neural meshworks between cardiomyocytes, they constituted the smallest component of cardiac innervations both in spontaneously hypertensive and control rats (Figures 3c,g,k; Figure 7). Importantly, the absence of CGRP-positive neuronal somata was found in the hearts of the examined animals. In the ganglia, the majority of CGRP immunoreactive nerve fibres (CGRP-IR) appeared as particularly

TABLE 3 Mean percentages and areas (mm^2) of cholinergic (ChAT), adrenergic (TH) and peptidergic (CGRP) neural structures in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats of three age groups.

	Juvenile		Adult		Aged	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
ChAT						
NF in atrial epicardiac nerves	23.8	22.2*	27	30.5*	26.92	21.2*
NF in ventricular epicardiac nerves	30.1	28.5	26.8	25.6	26.8	25.7
Density of myocardial NF						
Sinoatrial node	7.53	6.7	4.05	5.88*	3.82	3.48
Atria	1.15	1.67*	1.41	2.11*	1.36	1.34
TH						
NF in ganglia	2.063	1.46*	1.042	1.59*	1.43	1.58
NF in atrial epicardiac nerves	19.9	25.18*	18.35	18.74	15.8	15.07
NF in ventricular epicardiac nerves	27.9	25.2*	23.17	22.13	24.73	22.1*
Density of myocardial NF						
Sinoatrial node	4.1	3.41*	1.85	2.86*	2.36	2.07
Atria	1.12	1.42*	0.95	1.95*	1.26	1.16
Left ventricle	0.77	0.65	0.87	1.03	1.1	0.8*
Right ventricle	1.23	1.41	1.26	2.22*	1.93	2.47*
SIF area per atria	72,181	79,206	21,594	45,852	90,326	94,632
SIF area in atrial area of 0.1mm^2	3080	4016	1439	3150	3257	4296
CGRP						
NF in ganglia, %	3.15	3.47	1.99	2.12	2.21	3.66*
NF in atrial epicardiac nerves, %	1.1	3.08*	3.54	2.94*	2.5	7.91*
NF in ventricular epicardiac nerves, %	1.63	3.48*	2.29	2.53	5.01	3.02*
Density of myocardial NF, %						
Sinoatrial node	1.34	1.45	0.72	1.12*	0.69	1.07*
Atria	0.55	0.78*	0.48	0.59	0.48	0.62*
Left ventricle	0.1	0.2*	0.14	0.08*	0.12	0.08*
Right ventricle	0.13	0.27*	0.19	0.09*	0.14	0.13

Abbreviations: CGRP, immunoreactive for calcitonin gene-related peptide; ChAT, immunoreactive for choline acetyltransferase; NF, nerve fibres; SHR, spontaneously hypertensive rats; SIF, small intensely fluorescent cells; TH, immunoreactive for tyrosine hydroxylase; WKY, Wistar-Kyoto rats. *Significant difference between the age-matched group of WKY and SHR at $p < 0.05$.

thin nerve fibres with numerous small varicosities. This phenotype of nerve fibres evenly distributed over the entire area of the ganglion and morphologically looked like the meandering network between the neuronal somata. In addition to these tinny fibres, the significantly larger and strongly CGRP-IR boutons were distributed along the ganglia (Figure 7a). The number of CGRP-IR structures within ganglia of spontaneously hypertensive rats was higher in all age groups compared with ganglia of the age-matched control rats (Table 3). In general, CGRP-IR fibres were more abundant in the atrial nerves as well as innervating atrial myocardium. In ventricular

nerves and ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats, nonetheless, any increase in CGRP-IR nerve fibres was not identified in any age group (Table 3).

4 | DISCUSSION

Untreated chronic arterial hypertension is a potent risk factor for cardiovascular mortality and morbidity, especially in older age (Abbatati et al., 2020). Hypertension triggers a series of initial

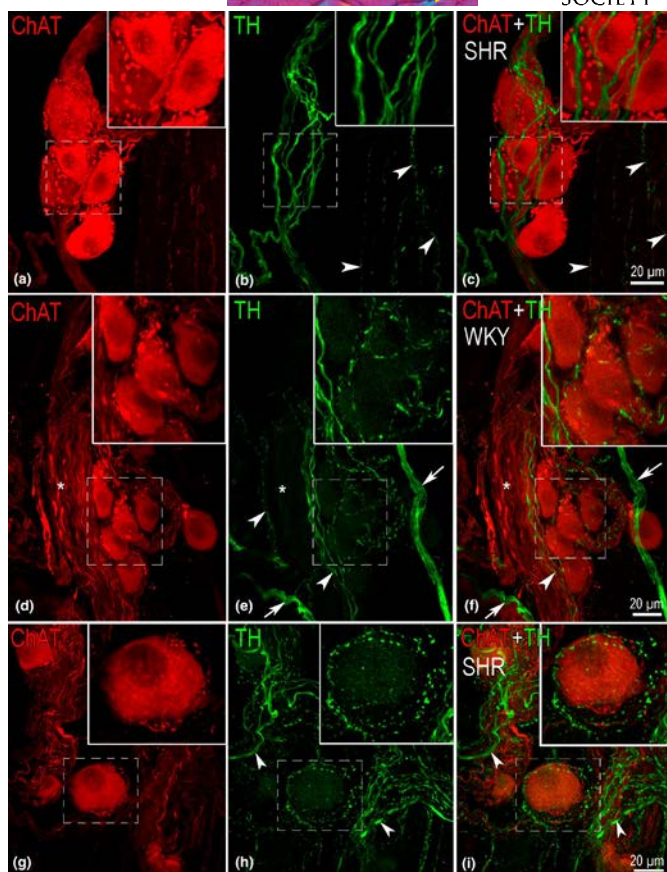


FIGURE 4 Immunofluorescent images demonstrating adrenergic nerve fibres inside intracardiac ganglia of spontaneously hypertensive and control rats. (a–c) Minor ganglion with cholinergic neuronal somata and no varicosities containing adrenergic nerve fibres passing through the ganglion in transit. Note the numerous cholinergic varicosities that are well visible around and between the neuronal somata in (a) and (c), while adrenergic nerve fibres (immunoreactive to TH) just pass the ganglion and have no varicosities (b and c). Note the varicosities containing adrenergic nerve fibres visible within the myocardial nerve meshwork in the left lower corner of the image (arrowheads). (d–f) Minor ganglion nearby the nerve (*) composed of cholinergic neuronal somata. Note (i) the nerve involving mainly cholinergic nerve fibres and just a few adrenergic ones (arrowheads), (ii) two thin bundles of adrenergic nerve fibres (arrows) pass nearby the ganglion, (iii) the varicosities containing adrenergic nerve fibres within the ganglion intervening between neuronal somata and surrounding them (e and f). (g–i) Fragment of intracardiac ganglion from spontaneously hypertensive rat with abundant adrenergic (immunoreactive to TH) nerve fibres. Note that location of some adrenergic fibres is not linked to the location of the neuronal body, and this indicates that these axons presumably pass in transit through the ganglion avoiding synaptic contacts (arrowheads). However, other adrenergic nerve fibres with varicosities are interspersed between neuronal somata and even encircle those somata. The latter type of adrenergic axons suggests that synaptic contact between adrenergic nerve fibres and cholinergic neurons exists within intracardiac ganglia in the rat heart.

compensatory changes that contribute towards heart failure while ageing (Drazner, 2011; Santos & Shah, 2014). Key studies of ageing in hypertension are performed mainly on rodents since these animals

have relatively short life spans, are inexpensive to purchase and maintain, and can be easily manipulated (Reckelhoff et al., 2018). Noteworthy, the normal blood pressure in healthy rats is the

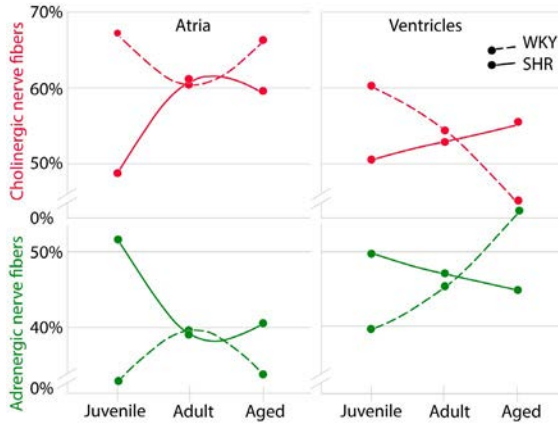


FIGURE 5 Histogram to demonstrate the proportion of cholinergic (ChAT) and adrenergic (TH) nerve fibres in the atrial and ventricular nerves of spontaneously hypertensive and control rats during ageing.

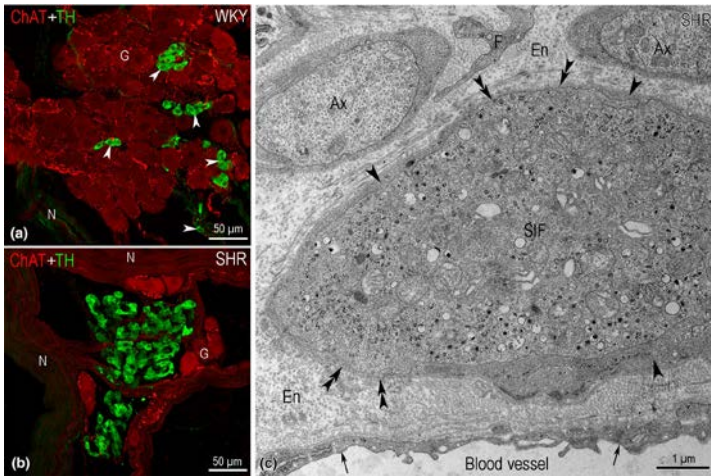


FIGURE 6 Immunofluorescent and electron microscope images illustrating the morphologic pattern of SIF cells within intracardiac ganglia and nerves. (a) Clusters of SIF cells (arrowheads) scattered between cholinergic neuronal somata within intracardiac ganglion (G). (b) A cluster of SIF cells that occupies a larger area than the ganglion (G) to which it is nestled. Note the intensive immunopositivity to TH of SIF cells in comparison with the TH-positive nerve fibres in the nerve (N). (c) Electronogram of SIF cell inside the intracardiac nerve. SIF cell is in part ensheathed with the glial cell (arrowheads), yet in sites where the glial sheath is broken its cytoplasm is exposed to endoneurial space (double arrowheads). Like other SIF cells, this SIF cell is located nearby a blood vessel (endothelial cells are indicated by arrows). Ax, axons; En, endoneurium; F, the process of fibroblast.

same as in humans. The spontaneously hypertensive rats' model, similarly to humans, experiences a blood pressure rise starting with a prehypertensive, developing and sustained hypertensive phase.

Because the lifespan of spontaneously hypertensive rats is twice as short as that of the 'normal' laboratory rats, our rat age groups would correspondingly represent human adolescence, young adulthood and

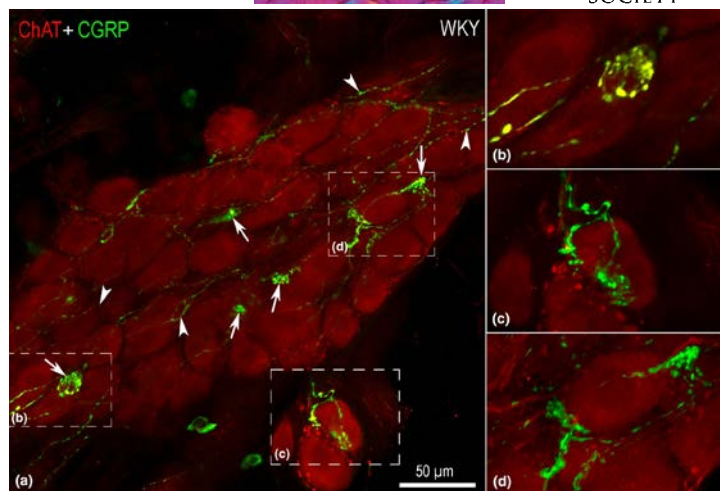


FIGURE 7 Immunofluorescent images demonstrating peptidergic (CGRP-positive) nerve fibres and boutons within the intracardiac ganglion. The majority of CGRP immunoreactive nerve fibres are particularly thin nerve fibres with numerous small varicosities (arrowheads) and distribute evenly over the entire area of the ganglion. These nerve fibres morphologically look like a meandering network in the ganglion between the cholinergic neuronal somata. Moreover, some peptidergic nerve fibres are significantly thicker and exhibit terminal boutons that are strongly positive to calcitonin gene-related peptide (CGRP, arrows) and distribute widely within intracardiac ganglia.

senescence, as described by Sengupta (2013). The only difference is heart rate which is higher in rats. Therefore, we considered the comparison of the human, and the rat blood pressures as tolerable and the classification of human hypertension may be reliably applied to rats without modifications (White & Seymour, 2013).

A spontaneously hypertensive rats represents the most popular animal model for hypertension (Lerman et al., 2019) because it gradually develops stable chronic hypertension due to genetics and shares similarities with human essential hypertension (Institute of Laboratory Animal Resources [US], 1976; Okamoto & Aoki, 1963). Rats of Wistar-Kyoto outbred have been used almost exclusively as control animals in studies of spontaneously hypertensive rats worldwide because both were established from the same parental, normotensive Wistar stock (Kurtz & Curtis Morris, 1987; Zhang-James et al., 2013). Therefore, to evaluate hypertension-related effects during ageing on intracardiac nerve plexus, juvenile, adult and aged spontaneously hypertensive rats were studied, and the matching age Wistar-Kyoto rats were selected as controls.

Although worldwide spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats are of the same origin, their hemodynamic characteristics vary from laboratory to laboratory. Factors, such as different sedation protocols (LeGrice et al., 2012), and differences in phenotypes of rats obtained from different commercial suppliers (Kurtz et al., 1989), can affect physiological parameters. According to our data, spontaneously hypertensive rats had stable, persistent hypertension with the trend to increase while ageing. We did reveal

on ultrasound scans that adult spontaneously hypertensive rats had the enlarged internal diameter of the left ventricle (LV) and LV free wall (19–20 and 29–30 weeks old), the increased ejection fraction and fractional shortening (19–20 weeks old) compared with age-matched control rats. Noteworthy, the ventricular parts of spontaneously hypertensive rats' hearts do not maintain the tendency to enlarge during ageing, that is interventricular septum and LV free wall in the 46–49 weeks group are even thinner than in the scans of 19–20 weeks.

Our physiologic assessment of control (Wistar-Kyoto) rats demonstrated: (i) the continuous growth of blood pressure during ageing while systolic pressure in aged rats reached >150 mmHg and diastolic blood pressure was high as well (according to Okamoto and Aoki (1963), these are reference values to classify rats as hypertensive); (ii) occasional ultrasound characteristics of heart failure such as mitral regurgitation, right ventricle dilation, left ventricle enlargement and dilation at a relatively young age; and (iii) gradual enlargement of ventricles while ageing causing the thickened interventricular septum and left ventricle wall compared with baseline echocardiographic values in male rats (Watson et al., 2004). Hereby, physiological parameters of the aged control rats resembled spontaneously hypertensive rats in the aged animals' group. Physiologic parameters fluctuating at the prehypertension–hypertension border were also observed in Wistar-Kyoto rats by other authors. Kurtz and Curtis Morris (1987) demonstrated that the Wistar-Kyoto rats had profound differences in growth rate and blood pressure

when obtained from different commercial suppliers since rats from Taconic Farms gained more weight, while those from Charles River Laboratories—had higher mean arterial blood pressure. At the same time, spontaneously hypertensive rats had no significant differences between suppliers. de Rezende et al. (2021) demonstrated that in long-term Wistar-Kyoto rats, blood pressure values were intermediate between spontaneously hypertensive and Wistar rats and close to hypertension borderline. In addition, Wistar-Kyoto presented earlier reductions in cardiac function compared with Wistar.

The most acknowledged hypothesis in modern cardio-angiology is that hypertension emerges due to an imbalance of sympathetic and parasympathetic regulation. In animal models of hypertension, both the increased sympathetic nerve activity and the reduction in vagal cardiac tone are associated with and responsible for the origin and progression of high blood pressure (Mancia & Grassi, 2014). Similar sympathetic-parasympathetic imbalance with increased sympathetic activity and decreased parasympathetic activity was determined in human patients (Valensi, 2021).

Physiologic studies have shown that the rate of norepinephrine spillover from the neuroeffector junctions is increased in young subjects with borderline blood pressure elevation and that this enhanced release takes place particularly in the kidney and in the heart, that is two organs of key importance in blood pressure homeostatic control (Grassi & Ram, 2016). Our neuroanatomical findings demonstrating some increase in adrenergic nerve fibres in conductive and contractile myocardium in the adult spontaneously hypertensive rats may support the hypothesis about adrenergic neural factors in the development of hypertension (Grassi & Ram, 2016). Nevertheless, the decreased amount of adrenergic nerve fibres in the myocardium in the aged group of the spontaneously hypertensive rats compared with the adult ones contradicts to statement of these authors that adrenergic neural factors are involved not only in the development but also in the progression of hypertension (Grassi & Ram, 2016). The increased amount of both the cholinergic and adrenergic nerve fibres in the myocardium of the adult spontaneously hypertensive rats compared with the age-matched control rats does not support the hypothesis by Kanazawa et al. (2010) about the replacement of adrenergic nerve fibres by cholinergic ones as a compensatory mechanism of hypertension. On the contrary, the differences between our data and with findings of Kanazawa et al. (2010) could be predisposed by the different subjects of studies (Dahl salt-sensitive rats versus spontaneously hypertensive rats) and by the different causes of hypertension.

Supplementary non-neuronal source of catecholamines in the heart is small intensely fluorescent (SIF) cells. The term of the chromaffin cells often is used as synonym, because the SIF-chromaffin cells in the sympathetic ganglia appeared ultrastructurally identical to the chromaffin cells in the adrenal gland (Weight & Weitsen, 1977). Hypotheses of SIF cells as interneurons and paraneurons were suggested long ago (Chiba et al., 1977) and are still supported (Yokoyama et al., 2022). Furthermore, endocrine function of SIF cells was described as well (Singhal et al., 2023). Morphological similarity of the SIF cells to the carotid body type I cells (Atanasova et al., 2011) and

intense immunoreactivity for Ca/calmodulin-dependent protein kinase identified in the SIF cells of the rat superior cervical ganglion suggest that some SIF cells play chemoreceptive roles in the same way as the carotid body chief cells (Hoshi et al., 2006). Recently, it was shown that the carotid body of spontaneously hypertensive rats is tonically activated and sensitized (Felippe et al., 2022). The increased total area of SIF clusters per heart in all age groups of spontaneously hypertensive rats determined in this study and hearts of the adult spontaneously hypertensive rats reported in the study by Ashton et al. (2020) presumably contributes to the substrate for atrial arrhythmia in hypertensive disease.

Calcitonin gene-related peptide (CGRP), the most primarily and abundantly, is localized in sensory neuronal somata and nerve fibres and is widespread throughout the body, particularly extensively in perivascular networks of nerve fibres. However, CGRP has a dual role in participating in sensory (nociceptive) and efferent (effector) functions (Russell et al., 2014). In the heart, CGRP-containing nerves are widely distributed around the coronary arteries, myocardium and conduction system, where it produces positive chronotropic and inotropic effects (Brain et al., 1985), and have the potential to act in cardioprotection (Kee et al., 2018; Kumar et al., 2019; Zhou et al., 2002), as well in the atrial ganglia (Hoover et al., 2009). Although the CGRP role as a vasodilator is generally acknowledged, there is no consensus on the impact of CGRP on hypertension. In human patients with hypertension, plasma CGRP is higher, unchanged and decreased as reviewed by several groups (Kee et al., 2018). Despite variable data, it is accepted that CGRP plays a protective role in the onset and progression of hypertension in rodents (Smillie & Brain, 2011) and this may explain the higher amount of CGRP within intracardiac ganglionated neural plexus of spontaneously hypertensive rats compared with control which was particularly prominent in the aged animal groups. Although CGRP amount within intracardiac nerves and meshwork of myocardial nerve fibres differently changes while ageing in hypertensive and control groups, the amount of nerve fibres positive for CGRP, in general, was increased in the control group during ageing, being the lowest in the young group and the highest in the aged group. Meanwhile, the quantity of CGRP immunoreactive nerve fibres in spontaneously hypertensive rats was the lowest in the adult group and, therefore, the decreased CGRP amount could contribute to hypertension, similarly as was shown with the markedly reduced CGRP expression in spontaneously hypertensive rats (Kumar et al., 2019; Supowit et al., 2001). In the aged spontaneously hypertensive rats' group, the amount of CGRP in blood plasma markedly increased, and this may be considered as a compensatory response to persistent hypertension.

Our study confirmed that cholinergic neuronal somata predominate within intracardiac ganglia of all species, although nitrenergic, adrenergic, as well as cholinergic biphenotypic nitrenergic and cholinergic biphenotypic adrenergic neuronal somata were also observed in hearts of the rabbits, pigs (Pauziene et al., 2016, 2017; Tomas et al., 2022) humans, rhesus monkeys (Hoover et al., 2009; Weihe et al., 2005) and mouse (Rysevaite et al., 2011). In the rat intracardiac ganglia, however, only cholinergic neuronal somata and in part

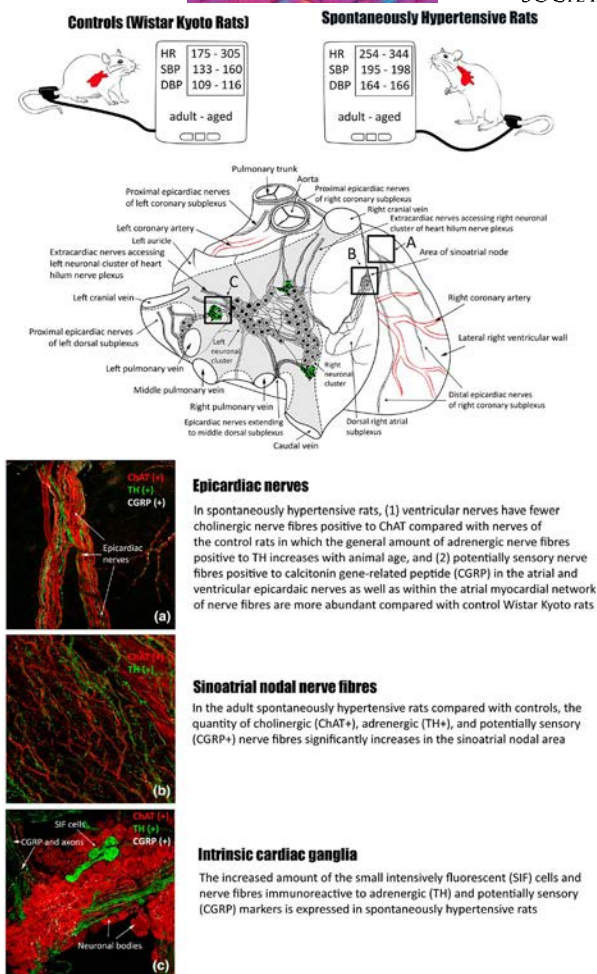


FIGURE 8 Schematic summing-up of the main findings of the present study. In the upper part, the significantly elevated heart rate (HR), systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure of the adult and aged spontaneously hypertensive rats in comparison with controls Wistar–Kyoto rats was confirmed employing the non-invasive tail-cuff blood pressure measurements. The drawing in the middle of the schema depicts the principal morphologic pattern of the rat intrinsic cardiac ganglionated plexus from a right posterolateral view of the rat heart. The boxed areas (a–c) in the drawing point to locations of diverse intrinsic cardiac structures (a), ventricular epicardial nerves; (b), dense network of nerve fibres within the sinoatrial nodal area; (c) intrinsic cardiac ganglia) in that the most significant differences between the spontaneously hypertensive and control rats were determined. The boxed areas (a–c) of the schematic drawing are correspondingly illustrated below by three typical immunofluorescent images specifying the principal structural alterations in spontaneously hypertensive rats compared with control Wistar–Kyoto rats. The dashed lines around the aorta-pulmonary trunk and orifices of pulmonary-caval veins outline the limits of the arterial and venous parts of heart hilum. The venous part of heart hilum encompasses two largest clusters of intracardiac neuronal bodies between which numerous small intensely fluorescent (SIF) cells are distributed.

cholinergic biphenotypic nitrergic ones have been identified so far. There were not revealed previously the cholinergic biphenotypic adrenergic and cholinergic biphenotypic CGRP neuronal somata in the rat heart, although nerve fibres immunoreactive for these markers were found earlier in the heart of rats (Richardson et al., 2003). Noteworthy, the occasional non-cholinergic adrenergic and cholinergic biphenotypic adrenergic neuronal somata were identified in the spontaneously hypertensive and control rats' hearts of the present study, as in the study by Ashton et al. (2020). Interestingly, this neuroanatomical feature of the rat heart substantially differs from the mouse intracardiac ganglia in which non-cholinergic adrenergic and cholinergic biphenotypic adrenergic neuronal somata constitute a significant portion of intracardiac neuronal somata (Hoard et al., 2008; Rysevaite et al., 2011). Both the findings of the present study and the observations by Ashton et al. (2020) showed slightly more adrenergic ganglionic cells in spontaneously hypertensive rats' hearts, yet the presence of sporadic adrenergic neuronal somata does not allow to imply that there is any remodelling of neuronal phenotypes within intracardiac ganglia due to arterial hypertension.

Since the absolute majority of intracardiac neuronal somata examined in this study were cholinergic ones in both spontaneously hypertensive and control rats, their alterations involved mainly quantitative parameters that were reported in our previous paper (Pauziene et al., 2022), in which we identified (i) the reduced sizes and (ii) the increased density of neuronal somata as well as (iii) the increased total number of neuronal somata within the old spontaneously hypertensive rats heart compared with age-matched control rats. Worth mentioning that Ashton et al. (2020) also showed an increased number of cholinergic neuronal somata within the intracardiac ganglia of spontaneously hypertensive rats compared with control rats.

The present study confirmed the observations of most previous authors that concluded the predomination of cholinergic synapses within intracardiac ganglia. Although the number of cholinergic terminals with varicosities was not quantitatively evaluated in this examination, the increased number of cholinergic synapses within spontaneously hypertensive rats intracardiac ganglia is reported by Ashton et al. (2020). There is no consensus on adrenergic terminals with varicosities that may be considered as possible synapses with intracardiac neurons. There are several observations from the hearts of mice and pigs that adrenergic axons extend throughout intracardiac ganglia in a passage without any morphologic similarity to cholinergic axons that usually have varicosities, meander at neuronal somata and within ganglion (Hanna et al., 2021; Rysevaite et al., 2011). Nonetheless, adrenergic axons with varicosities within intracardiac ganglia have been previously described in rats (Richardson et al., 2003) and guinea pigs (Parsons, 2004). The present study concludes that the part of adrenergic axons passes the intracardiac ganglia without any visible allusion to synaptic contacts with ganglionic cells, yet other adrenergic axons had varicosities and morphologic pattern that may be considered as synapsing adrenergic axons with cholinergic ganglionic cells. Interestingly, the amount of adrenergic nerve fibres within the intracardiac ganglia of both the adult and the aged spontaneously hypertensive rats was

higher compared with the ganglia of the age-matched control rats. It must be mentioned that other players modulating probably the activity of intracardiac neurons are nerve fibres immunoreactive for CGRP, which intervene between neuronal somata and form numerous boutons inside intracardiac ganglia analysed in this study. CGRP within varicosities of nerve fibres surrounding neuronal somata was formerly determined in the sympathetic ganglia implying its controlling and mediating roles in efferent signalling to the heart (Hoover et al., 2009; Horn & Stofer, 1989). It was demonstrated that CGRP alters the activity of airway parasympathetic neurons, ultimately affecting parasympathetic tone in the lower airways (Kajekar & Myers, 2008). The increased amount of CGRP within intracardiac ganglia of spontaneously hypertensive rats, particularly prominent in the aged spontaneously hypertensive rats' group, comparing with the age-matched control group, was found in this study. Therefore, it is suggestible that not only the increased number of cholinergic synapses as was shown in the study of Ashton et al. (2020), but also the increased amount of adrenergic and peptidergic (CGRP immunoreactive) varicosities (potential sites of synapses) differentially altered intracardiac neuronal activity and general parasympathetic tone causing the imbalance of sympathetic-parasympathetic regulation in hearts of spontaneously hypertensive rats.

The main findings of the present study are schematically summarized in Figure 8, from which we conclude that the revealed chemical remodelling of intracardiac ganglionic cells and nerve fibres most probably occurs due to both natural animal ageing and nascent arterial hypertension. This remodelling supports the hypothesis about the disbalance of efferent and afferent heart innervation which may be considered as the basis for the emergence and progression of arterial hypertension and perhaps even as an outcome of hypertension in the aged animals. In addition, it must be noted that due to the pronounced anatomical alterations in the ageing Wistar-Kyoto rats, this rat breed may be inappropriate for use as control animals for hypertension studies in older animal age.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Neringa Pauziene contributed to the conceptualization, investigation, data analysis, visualization, preparation and writing original draft, review and editing and supervision. Dalia Ranceviene contributed to the investigation, methodology, writing original draft and technical supervision. Kristina Rysevaite-Kyguoliene contributed to the investigation, methodology and technical supervision. Tomas Ragauskas, Hermanas Inokaitis and Ignas Sabeckis (equally) contributed to the investigation, data analysis and visualization. Khrystyna Plekhanova contributed to the data analysis. Olena Khmel contributed to the data analysis, visualization and graphics. Dainius H. Pauza contributed to the conceptualization, visualization, preparation, review and editing of manuscript, visualization, graphics, and supervision.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dmitrij Kvitka, Vilma Zigmantaite, Jonas Jurevicius and Aidias Grigonis for their help collecting physiological data, while

Jurgita Sventoraitiene and Deimante Sabeckiene for technical assistance. This study was supported by the Grant S-MIP-19-23/PRM19-113 from the Research Council of Lithuania and grants V-786 and V-789 from the Research Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors.

ORCID

Dainius H. Pauza  <https://orcid.org/0000-0001-8597-4370>

REFERENCES

- Adams, M.A., Bobik, A. & Korner, P.I. (1989) Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 14(2), 191–202.
- Aksu, T., Gopinathannair, R., Gupta, D. & Pauza, D.H. (2021) Intrinsic cardiac autonomic nervous system: what do clinical electrophysiologists need to know about the "heart brain"? *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 32(6), 1737–1747.
- Aksu, T., Gupta, D. & Pauza, D.H. (2021) Anatomy and physiology of intrinsic cardiac autonomic nervous system: da Vinci anatomy card #2. *Case Reports*, 3(4), 625–629.
- Ashton, J.L., Argent, L., Smith, J.E.G., Jin, S., Sands, G.B., Smail, B.H. et al. (2020) Evidence of structural and functional plasticity occurring within the intracardiac nervous system of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 318(6), H1387–H1400.
- Atanasyova, D.Y., Iliev, M.E. & Lazarov, N.E. (2011) Morphology of the rat carotid body. *Biomedical Reviews*, 22, 41–55.
- Bergdahl, A., Valdemarsson, S., Nilsson, T., Sun, X.Y., Hedner, T. & Edvinsson, L. (1999) Dilatory responses to acetylcholine, calcitonin gene-related peptide and substance P in the congestive heart failure rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, 165(1), 15–23.
- Boluyt, M.O., Bing, O.H. & Lakatta, E.G. (1995) The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *European Heart Journal*, 16(Suppl N), 19–30.
- Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R. & MacIntyre, I. (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313(5997), 54–56.
- Chiba, T., Black, A.C. & Williams, T.H. (1977) Evidence for dopamine-storing interneurons and paraneurons in rhesus monkey sympathetic ganglia. *Journal of Neurocytology*, 6, 441–453.
- de Rezende, L.M.T., Soares, L.L., Drummond, F.R., Suarez, P.Z., Leite, L., Rodrigues, J.A. et al. (2021) Is the Wistar rat a more suitable normotensive control for SHR to test blood pressure and cardiac structure and function? *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 35(2), 161–167.
- Doggrell, S.A. & Brown, L. (1998) Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, 39(1), 89–105.
- Drazner, M.H. (2011) The progression of hypertensive heart disease. *Circulation*, 123(3), 327–334.
- Escott, K.J. & Brain, S.D. (1993) Effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP8-37) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve. *British Journal of Pharmacology*, 110(2), 772–776.
- Felippe, I.S.A., Zera, T., da Silva, M.P., Moraes, D.J.A., McBryde, F. & Paton, J.F.R. (2022) The sympathetic nervous system exacerbates carotid body sensitivity in hypertension. *Cardiovascular Research*, 119(1), 316–331.
- Fisher, J.P. & Paton, J.F.R. (2011) The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 26(8), 463–475.
- GBD 2019 Risk Factors Collaborators. (2020) Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1223–1249.
- Grassi, G. & Ram, V.S. (2016) Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, 10(5), 457–466.
- Hanna, P., Dacey, M.J., Brennan, J., Moss, A., Robbins, S., Achanta, S. et al. (2021) Innervation and neuronal control of the mammalian sinoatrial node a comprehensive atlas. *Circulation Research*, 128(9), 1279–1296.
- Herring, N., Lee, C.W., Sunderland, N., Wright, K. & Paterson, D.J. (2011) Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(1), 99–106.
- Hoard, J.L., Hoover, D.B., Mabe, A.M., Blakely, R.D., Feng, N. & Paolucci, N. (2008) Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase a and p75. *Neuroscience*, 156(1), 129–142.
- Hoover, D.B., Isaacs, E.R., Jacques, F., Hoard, J.L., Pagé, P. & Armour, J.A. (2009) Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. *Neuroscience*, 164(3), 1170–1179.
- Horn, J.P. & Stofer, W.D. (1989) Preganglionic and sensory origins of calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivities in bullfrog sympathetic ganglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(7), 2543–2561.
- Hoshi, H., Sakagami, H., Owada, Y. & Kondo, H. (2006) Localization of Ca/calmodulin-dependent protein kinase I in the carotid body chief cells and the ganglionic small intensely fluorescent (SIF) cells of adult rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 580, 87–92.
- Huang, S.M., Wu, Y.L., Peng, S.L., Peng, H.H., Huang, T.Y., Ho, K.C. et al. (2016) Inter-strain differences in default mode network: a resting state fMRI study on spontaneously hypertensive rat and Wistar Kyoto rat. *Scientific Reports*, 6, 21697.
- Kajekar, R. & Myers, A.C. (2008) Calcitonin gene-related peptide affects synaptic and membrane properties of bronchial parasympathetic neurons. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 160(1), 28–36.
- Kanazawa, H., Ieda, M., Kimura, K., Arai, T., Kawaguchi-Manabe, H., Matsushashi, T. et al. (2010) Heart failure causes cholinergic trans-differentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 408–421.
- Kee, Z., Kodji, X. & Brain, S.D. (2018) The role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in neurogenic vasodilation and its cardioprotective effects. *Frontiers in Physiology*, 9, 1249.
- Kondo, M., Terada, M., Fujiwara, T., Arita, N., Yano, A. & Tabei, R. (1995) Noradrenergic hyperinnervation in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 22(1), S75–S76.
- Kumar, A., Potts, J.D. & DiPette, D.J. (2019) Protective role of α -calcitonin gene-related peptide in cardiovascular diseases. *Frontiers in Physiology*, 10, 821.
- Kurtz, T.W. & Curtis Morris, R. (1987) Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 10(1), 127–131.
- Kurtz, T.W., Montano, M., Chan, L. & Kabra, P. (1989) Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for

- research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 13(2), 188–192.
- Larsen, H.E., Lefkimiatis, K. & Paterson, D.J. (2016) Sympathetic neurons are a powerful driver of myocyte function in cardiovascular disease. *Scientific Reports*, 6, 38898.
- LeGrice, J.J., Pope, A.J., Sands, G.B., Whalley, G., Doughty, R.N. & Smail, B.H. (2012) Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303(11), H1353–H1365.
- Lerman, L.O., Kurtz, T.W., Touyz, R.M., Ellison, D.H., Chade, A.R., Crowley, S.D. et al. (2019) Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*, 73(6), 87–120.
- Li, D., Lee, C.W., Buckler, K., Parekh, A., Herring, N. & Paterson, D.J. (2012) Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension*, 59(3), 642–649.
- Li, L., Hatcher, J.T., Hoover, D.B., Gu, H., Wurster, R.D. & Cheng, Z.J. (2014) Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive axons in the whole-mount atria of mice. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 181(1), 37–48.
- Mancia, G. & Grassi, G. (2014) The autonomic nervous system and hypertension. *Circulation Research*, 114(11), 1804–1814.
- Masuda, Y. (2000) Role of the parasympathetic nervous system and interaction with the sympathetic nervous system in the early phase of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36(Suppl 2), S61–S64.
- Navickaitė, I., Pauziene, N. & Pauza, D.H. (2021) Anatomical evidence of non-parasympathetic cardiac nitrergic nerve fibres in rat. *Journal of Anatomy*, 238(1), 20–35.
- N'Diaye, A., Gannesen, A., Borrel, V., Maillot, O., Enault, J., Racine, P.J. et al. (2017) Substance P and calcitonin gene-related peptide: key regulators of cutaneous microbiota homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 15.
- Okamoto, K. & Aoki, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27(3), 282–293.
- Panzenhagen, A.C., Bau, C.H.D., Grevet, E.H. & Rovaris, D.L. (2019) An animal model of what? The case of spontaneously hypertensive rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 94, 109617.
- Parsons, R.L. (2004) Mammalian cardiac ganglia as local integration centers: histochemical and electrophysiological evidence. In: Dun, N.J., Machado, B.H. & Pilowsky, P.M. (Eds.) *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. Boston: Springer, pp. 335–356.
- Patterson, P.H. (1978) Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. *Annual Review of Neuroscience*, 1, 1–17.
- Pauza, D.H., Pauziene, N., Pakeltyte, G. & Stropus, R. (2002) Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, Guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase. *Annals of Anatomy*, 184(2), 125–136.
- Pauza, D. H., Rysevaitė-Kyguoliene, K., Vismantaitė, J., Brack, K. E., Inokaitis, H., Pauza, A. G. et al. (2014) A combined acetylcholinesterase and immunohistochemical method for precise anatomical analysis of intrinsic cardiac neural structures. *Annals of Anatomy*, 196(6), 430–440.
- Pauza, D.H., Skripka, V., Pauziene, N. & Stropus, R. (2000) Morphology, distribution, and variability of the epicardial neural ganglionated subplexuses in the human heart. *The Anatomical Record*, 259(4), 353–382.
- Pauziene, N., Alaburda, P., Rysevaitė-Kyguoliene, K., Pauza, A.G., Inokaitis, H., Masaityte, A. et al. (2016) Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *Journal of Anatomy*, 228(1), 26–46.
- Pauziene, N., Ranceviene, D., Rysevaitė-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K. et al. (2022) Comparative analysis of intracardiac neural structures in the aged rats with essential hypertension. *Anatomical Record*. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.25109> Online ahead of print.
- Pauziene, N., Rysevaitė-Kyguoliene, K., Alaburda, P., Pauza, A.G., Skukauskaite, M., Masaityte, A. et al. (2017) Neuroanatomy of the pig cardiac ventricles. A stereomicroscopic, confocal and electron microscope study. *Anatomical Record*, 300(10), 1756–1780.
- Purves, D. (Ed.). (2001) *The Visceral Motor System*. In: *Neuroscience*, 2nd edition, Sunderland: Sinauer Associates.
- Ranceviene, D., Rysevaitė-Kyguoliene, K., Inokaitis, H., Saburkina, I., Plekhanova, K., Sabeckiene, D. et al. (2022) Early structural alterations of intrinsic cardiac ganglionated plexus in spontaneously hypertensive rats. *Histology and Histopathology*, 37(10), 955–970.
- Reckelhoff, J.F., Yanes Cardozo, L.L. & Fortepiani, M.L.A. (2018) Models of hypertension in aging. In: *Conn's Handbook of Models for Human Aging*. Oxford: Elsevier, 703–720.
- Richardson, R.J., Grkovic, I. & Anderson, C.R. (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell and Tissue Research*, 314(3), 337–350.
- Russell, F.A., King, R., Smillie, S.J., Kodji, X. & Brain, S.D. (2014) Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4), 1099–1142.
- Rysevaitė, K., Saburkina, I., Pauziene, N., Vaitkevicius, R., Noujaim, S.F., Jalife, J. et al. (2011) Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*, 8(5), 731–738.
- Sahn, D.J., Demaria, A., Kisslo, J. & Weyman, A. (1978) Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, 58(6), 1072–1083.
- Santos, M. & Shah, A.M. (2014) Alterations in cardiac structure and function in hypertension. *Current Hypertension Reports*, 16(5), 428.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Sengupta, P. (2013) The laboratory rat: relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
- Shanks, J., Mane, S., Ryan, R. & Paterson, D.J. (2013) Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the hypertensive rat. *Hypertension*, 61(1), 187–193.
- Shanks, J., Manou-Stathopoulou, S., Lu, C.J., Li, D., Paterson, D.J. & Herring, N. (2013) Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305(7), H980–H986.
- Shivkumar, K., Ajjola, O.A., Anand, I., Armour, J.A., Chen, P.S., Esler, M. et al. (2016) Clinical neurocardiology defining the value of neuroscience-based cardiovascular therapeutics. *The Journal of Physiology*, 594(14), 3911–3954.
- Singhal, P., Senecal, J.M.M. & Nagy, J.I. (2023) Expression of the gap junction protein connexin36 in small intensely fluorescent (SIF) cells in cardiac parasympathetic ganglia of rodents. *Neuroscience Letters*, 793, 136989.
- Slama, M., Ahn, J., Varagic, J., Susic, D. & Frohlich, E.D. (2004) Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286, 181–185.
- Smillie, S.J. & Brain, S.D. (2011) Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. *Neuropeptides*, 45(2), 93–104.
- Smith, D.I., Tran, H.T. & Poku, J. (2018) Hemodynamic considerations in the pathophysiology of peripheral neuropathy. *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*, 5(5), 92–97.
- Supowit, S.C., Zhao, H. & DiPette, D.J. (2001) Nerve growth factor enhances calcitonin gene-related peptide expression in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 37(2 Pt 2), 728–732.
- Tomas, R., Kristina, R.K., Neringa, P., Hermanas, I. & Dainius, P.H. (2022) Intrinsic cardiac neurons of the adult pigs: chemical types,

- abundance, parameters and distribution within ganglionated plexus. *Annals of Anatomy*, 243, 1519-35.
- Toyoda, K., Faraci, F.M., Russo, A.F., Davidson, B.L. & Heistad, D.D. (2000) Gene transfer of calcitonin gene-related peptide to cerebral arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 278(2), H586-H594.
- Valensi, P. (2021) Autonomic nervous system activity changes in patients with hypertension and overweight: role and therapeutic implications. *Cardiovascular Diabetology*, 20(1), 170.
- van Zwieten, P.A., Hendriks, M.G.C., Pfaffendorf, M., Bruning, T.A. & Chang, P.C. (1995) The parasympathetic system and its muscarinic receptors in hypertensive disease. *Journal of Hypertension*, 13(10), 1079-1090.
- Watson, L.E., Sheth, M., Denyer, R.F. & Dostal, D.E. (2004) Baseline echocardiographic values for adult male rats. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 17(2), 161-167.
- Weight, F.F. & Weitsen, H.A. (1977) Identification of small intensely fluorescent (SIF) cells as chromaffin cells in bullfrog sympathetic ganglia. *Brain Research*, 128(2), 213-226.
- Weihe, E., Schütz, B., Hartschuh, W., Anlauf, M., Schäfer, M.K. & Eiden, L.E. (2005) Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 492(3), 370-379.
- White, C.R. & Seymour, R.S. (2013) The role of gravity in the evolution of mammalian blood pressure. *Evolution*, 68, 901-908.
- Yokoyama, T., Saito, H., Nakamura, N. & Yamamoto, Y. (2022) Immunohistochemical localization of vesicular nucleotide transporter in small intensely fluorescent (SIF) cells of the rat superior cervical ganglion. *Tissue & Cell*, 79, 101924.
- Zhang-James, Y., Middleton, F.A. & Faraone, S.V. (2013) Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiological Genomics*, 45(13), 528-538.
- Zhou, Z.H., Peng, J., Ye, F., Li, N.S., Deng, H.W. & Li, Y.J. (2002) Delayed cardioprotection induced by nitroglycerin is mediated by alpha-calcitonin gene-related peptide. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(4), 253-259.
- Zugck, C., Lossnitzer, D., Backs, J., Kristen, A., Kinscherf, R. & Haass, M. (2003) Increased cardiac norepinephrine release in spontaneously hypertensive rats: role of presynaptic alpha-2A adrenoceptors. *Journal of Hypertension*, 21(7), 1363-1369.

How to cite this article: Pauziene, N., Ranceviene, D., Rysevaite-Kyguoliene, K., Ragauskas, T., Inokaitis, H., Sabeckis, I. et al. (2023) Neurochemical alterations of intrinsic cardiac ganglionated nerve plexus caused by arterial hypertension developed during ageing in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Journal of Anatomy*, 243, 630-647. Available from: <https://doi.org/10.1111/joa.13877>

PRIEDAI

1 priedas



VALSTYBINĖS MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBOS KAUNO VALSTYBINĖS MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBOS VIRŠININKAS-VALSTYBINIS VETERINARIJOS INSPEKTORIUS

ĮSAKYMAS DĖL VETERINARINIO PATVIRTINIMO

2015 m. gruodžio 2 d. Nr. 33IV- 638
Kaunas

Vadovaudamasis Lietuvos Respublikos veterinarijos įstatymu, Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. liepos 3 d. įsakymo Nr. B1-517 „Dėl Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2005 m. kovo 1 d. įsakymo Nr. B1-146 „Dėl Valstybinės veterinarinės kontrolės subjektų, išskyrus maisto tvarkymo subjektus, veterinarinio patvirtinimo reikalavimų patvirtinimo“ pakeitimo“, atsižvelgdamas į Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Kauno valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2015-12-01 ūkio subjekto, norinčio gauti veterinarinį patvirtinimą, patikrinimo aktą Nr. 33GGP-1931/362:

1. T v i r t i n u LSMU VA Gyvūnų tyrimų centrą, įmonės kodas 302536989, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas., ir suteikiu veterinarinio patvirtinimo numerį LT-61-19-004, kaip bandomųjų gyvūnų naudojimo įmonę.

2. P a v e d u:

2.1. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Kauno valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos vyriausiajam veterinarijos gydytojui-inspektoriui, atsakingam už gyvūnų sveikatingumą ir gerovę, pagal patvirtintą valstybinės veterinarinės kontrolės tikrinimo programą, atlikti valstybinę veterinarinę kontrolę;

2.2. įsakymo vykdymo kontrolę Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Kauno valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos viršininko pavaduotojui-valstybiniam veterinarijos inspektoriui Linijui Valiuškai.

Viršininkas -
valstybinis veterinarijos inspektorius

Ričardas Kliučinskas

Parengė
Kauno valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos
viršininko pavaduotojas - valstybinis veterinarijos inspektorius

Linijus Valiuška
2015-12-02

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS
ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ2020-01-31 Nr. G2-137
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentinių ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2020-01-17 išvada Nr. 3 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,

l e i d i m a toliau nurodytam ūkio subjektui atlikti bandymo su gyvūnais projektą.

Duomenys apie ūkio subjektą:

pavadinimas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologinių tyrimų centras;

adresas Tilžės g. 18, Kaunas;

kodas Juridinių asmenų registre 302536989.

Duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Arterinės hipertenzijos sąlygota širdies nervų sistemos remodeliacija“;

vadovas prof. Neringa Paužienė;

naudojami gyvūnai 68 žiurkės.

Duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologinių tyrimų centras;

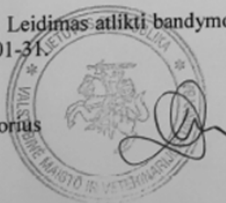
adresas Tilžės g. 18, Kaunas.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*:

Eil. Nr.	Vaisto pavadinimas	Gamintojas	Vaistinė forma	Kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą
1.	SEVOFLURANAS 100% V/V	Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing Ltd. (Airija)	Įkvepiamieji garai (skystis)	250 ml buteliukas, 1 vnt.

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja nuo 2020-02-01 iki 2023-01-31.

Direktorius



Darius Remeika

* – Nurodomi naudojami (-amų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“.

CURRICULUM VITAE

Name, surname **Dalia Rancevienė**
Date of birth: 1988.04.09
Contacts: dalia.ranceviene@lsmu.lt, +37062520769

Research interests

Cardiac nervous system, aging, arterial hypertension.

Education

2017–2024 PhD studies of Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy
2013–2017 Residency of Anaesthesiology and Intensive Care, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy
2011–2012 Paramedic professional qualification, King Mindaugas teaching center, Kaunas
2007–2013 Masters degree in Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy
1995–2007 Middle school education cum laude, Šilainiai secondary school, Kaunas

Internships

2013 Hamm Santa Barbara Hospital (Germany)
2014 Gent University Hospital (Belgium)

Courses

2018 11 26–2018 12 07 „Urgentinė terapija kardiologijoje“ (72 val.) Kardiologijos klinika (LSMU MA)
2019 01 24–2019 03 28 „Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimai“ (80 val.). Anatomijos ir fiziologijos katedra (LSMU VA)
2020 01 20–2020 01 24 Širdies ritmo ir laidumo sutrikimų diagnostika ir gydymas (36 val.) Kardiologijos klinika (LSMU MA)
2020 09 14–2020 09 18 Širdies nepakankamumas bendrojoje praktikoje (36 val.) Kardiologijos klinika (LSMU MA)

Work experience

2024 04– present Junior assistant, Lithuanian University of Health Sciences, Anatomy Institute
2019–2022 Junior researcher in project “Arterinės hipertenzijos sąlygota širdies nervų sistemos remodeliacija” (Nr. S-MIP-19-23/PRM19-113), Lithuanian University of Health Sciences, Anatomy Institute
2013– present Anaesthesiologist – Intensive Care doctor Kaunas Clinics Anaesthesiology clinic, Neurosurgery department

2020– present	Anaesthesiologist – Intensive Care doctor, Ukmergė District Hospital
2015 10–2016 12	Middle Grade Trust Doctor in Anaesthetics, Queens hospital, Anaesthesia Intensive Care Department, London, United Kingdom
2008–2010	Nurse Assistant, Operating theatre in Kaunas Clinics General surgery department

Languages

Lithuanian (native)

English (professional working)

German (limited working)

Memberships

Kaunas Region Anatomy Society

Lithuanian Society of Anaesthesiologists

European Society of Anaesthesiologists

Awards

2024 06 18 – 2024 06 21	Best PhD student presentation in 6 th International Conference “Evolutionary Medicine: How Evolutionary Thinking Can Contribute to Medical and Health Sciences” Vilnius University, Vilnius
2021 09 21 – 2021 09 23	Poster prize nominee in conference “115 th Annual Meeting of Anatomischen Gesellschaft”, Innsbruck, Austria
2007	Laureate of Lithuanian Republic Biology Olympiad

PADĖKA

Dėkoju visiems, kas prisidėjo prie šio darbo.

Labiausiai norėčiau padėkoti:

Savo darbo vadovei prof. dr. Neringai Paužienei už pagalbą vykdant tyrimus, patarimus, suteiktas žinias ir palaikymą visu studijų laikotarpiu.

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Anatomijos instituto vadovui prof. dr. Dainiui H. Paužai už pagalbą rengiant publikacijas, daktaro disertaciją, patarimus ir palaikymą. Jūs man atskleidėte raktą kaip atliekami fundamentiniai tyrimai, parodėte jų grožį ir sudėtingumą.

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Anatomijos instituto lektorei ir laboratorijos vedėjai Kristinai Rysevaitei-Kyguolienei už pagalbą rengiant preparatus, patarimus ir palaikymą.

Visiems Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Anatomijos instituto kolegoms už paramą tyrimų metu ir palaikančią atmosferą.

LSMU statistikei Eglei Grėbliauskienei už šiltas konsultacijas dėl statistinių metodų taikymo.

LSMU Veterinarijos akademijos specialistams prof. Aidiui Grigoniui ir dr. Dimitrijui Kvitkai, atlikusiems žiurkių širdžių echoskopinius tyrimus. dr. Ramunei Grigalevičiūtei už žiurkių priežiūrą. Prof. Jonui Jurevičiui, dr. Vilmai Zigmantaitėi – tik su jūsų pagalba pavyko išmatuoti žiurkių kraujo spaudimą.

Esu dėkinga ir LSMU Mokslo centro komandai už kantrybę ir skirtą laiką.

Dėkoju šeimai – už tai, kad manimi tikėjo, besąlygiškai palaikė, rūpinosi, kartu džiaugėsi darbo rezultatais.

Atsiprašau savo vaikų už kūdikystę laboratorijoje – tikiuosi senieji LSMU rūmai jums paliks tik pačius gražiausius prisiminimus.