

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



Úloha epoxyeikosatrienových kyselin v regulaci krevního tlaku a renálních funkcí u experimentálních modelů hypertenze

MVDr. Zuzana Honetschlägerová

Praha 2018

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Pracoviště experimentální medicíny Institutu Klinické a Experimentální
Medicíny v Praze

Autor: MVDr. Zuzana Honetschlägerová

Školitel: doc. MUDr. Věra Čertíková-Chábová, Ph.D.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:vhod.
kde:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu
2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

OBSAH

Abstrakt	3
Abstract	4
Úvod	5
Studie č. 1: Vliv inhibice solubilní epoxid hydrolázy na hypertenzi a poškození ledvin u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů	5
Hypotéza a Cíl studie	5
Materiál a metodika	5
Výsledky	6
Studie č. 2: Inhibice solubilní epoxid hydrolázy zlepšuje zhoršenou tlakovou natriurézu a zmírňuje rozvoj hypertenze a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů	9
Hypotéza a Cíl studie	9
Materiál a metodika	10
Výsledky	10
Studie č. 3: Léčba pomocí L-NAME zrušila antihypertenzní a renoprotektivní účinek inhibice solubilní epoxid hydrolázy u ANG II dependentní hypertenze	15
Hypotéza a Cíl studie	15
Materiál a metodika	16
Výsledky	16
Diskuze	22
Závěr	23
Literatura	25
Publikace	27

Abstrakt

Úvod: Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) jsou přeměněny enzymem solubilní epoxid hydrolázy (sEH) na biologicky neaktivní dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs). EETs se významně podílí na kontrole krevního tlaku, ovlivňují vaskulární tonus a renální transportní mechanismy. Inhibitor sEH snižuje krevní tlak zvýšením biologické dostupnosti EETs u mnoha modelů hypertenze.

Cíl: Zjistit, zda inhibitor sEH snižuje krevní tlak a zlepšuje renální funkce během rozvoje maligní hypertenze u transgenních potkanů po indukci myšího reninového genu.

Metodika: Hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů byla navozena podáním diety s obsahem přírodního xenobiotika indol-3-karbinolu (I3C, 0.3%) po dobu 3 a 11 dní. I3C aktivuje reninový gen. U 3-denní indukce hypertenze byl současně podáván inhibitor NO syntázy (L-NAME, 600 mg/l) v pitné vodě. Inhibitor sEH c-AUCB byl podáván v pitné vodě v dávkách 13 nebo 26 mg/l 48 hod před podáním diety obsahující I3C a L-NAME. U bdělých zvířat bylo provedeno radiotelemetrické měření krevního tlaku a sledování exkrečních parametrů ledvin. U anestetizovaných zvířat byly zjištěny účinky na hemodynamiku a exkreční funkce ledvin akutními renálními studiemi.

Výsledky: Podávání I3C u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů vedlo k rozvoji maligní hypertenze se zvýšením systolického krevního tlaku, ztrátě hmotnosti, zvýšení proteinurie, značnému snížení průtoku krve ledvinou (PKL) a glomerulární filtrace (GFR) a výrazně zhoršené autoregulační schopnosti ledvin. c-AUCB léčba významně zmírnila rozvoj hypertenze, ztrátu hmotnosti a stupeň proteinurie. Navíc, c-AUCB léčba zabránila snížení PKL a GFR, významně zvýšila exkreci sodíku, zlepšila autoregulační schopnost PKL a GFR a významně zlepšila sklon křivky tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů. c-AUCB léčba zvýšila poměr EETs/DHETs v ledvině a zabránila rozvoji poškození ledvin u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Antihypertenzní a renoprotektivní účinky léčby inhibitorem sEH c-AUCB byly však kompletně zrušeny doprovodným podáváním inhibitoru NO syntázy, L-NAME.

Závěr: Léčba inhibitorem sEH c-AUCB významně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze a zlepšuje zhoršené renální funkce u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Prospěšné účinky této léčby byly kompletně zrušeny podáváním L-NAME. Zlepšení renálních mechanismů je pravděpodobně zodpovědné za antihypertenzní efekt c-AUCB léčby. Antihypertenzní působení inhibitoru sEH u této ANG II dependentní maligní formy hypertenze je závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a NO.

Abstract

Introduction: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are converted by the enzyme soluble epoxid hydrolase (sEH) to the biologically inactive dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs). EETs are significantly involved in the control of blood pressure, they influence vascular tone and renal transport mechanism. sEH inhibitor reduce blood pressure by increasing the bioavailability of EETs in many models of hypertension.

Aim of the study: To determine that sEH inhibitor decreases blood pressure and improves the renal function during the development of malignant hypertension in transgenic rats after the induction of the mouse renin gene.

Methods: Hypertension in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats was induced through a dietary administration of the natural xenobiotic indole-3-carbinol (I3C, 0.3 %) for 3 and 11 days. I3C activates the renin gene. At the same time, during a three-day induction of hypertension, the inhibitor of nitric oxide synthase L-NAME (600 mg/l) was administered in drinking water. The sEH inhibitor *c*-AUCB was given in drinking water at a dose of 13 or 26 mg/l, starting 48 hours before the initiation of I3C and L-NAME administration. Radiotelemetric measurement of blood pressure was performed and renal excretory parameters were monitored in the conscious animals. The effects on renal hemodynamics and excretory function were determined by acute renal studies in the anesthetized animals.

Results: I3C administration in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats resulted in malignant hypertension with the rise in systolic blood pressure, the loss of body weight (BW), the rise in proteinuria, markedly lowered renal blood flow (RBF) and glomerular filtration rate (GFR) and substantially impaired renal autoregulatory efficiency. *c*-AUCB treatment significantly attenuated the development of hypertension, the loss of BW and the degree of proteinuria. Moreover, *c*-AUCB treatment prevented the reduction in RBF and GFR, significantly increased sodium excretion, improved autoregulatory efficiency of RBF and GFR and significantly improved the suppressed slope of pressure–natriuresis relationship in I3C-induced rats. The treatment with *c*-AUCB increased the renal EETs/DHETs ratio and prevented the development of renal damage in I3C-induced Cyp1a1-Ren-2 rats. Antihypertensive and renoprotective actions of the treatment with the sEH inhibitor *c*-AUCB were completely abolished by concomitant administration of L-NAME.

Conclusion: Treatment with the sEH inhibitor *c*-AUCB substantially attenuates the development of malignant hypertension and improves the impaired renal function in I3C-induced Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. Beneficial effects of this treatment were completely abolished by administration of L-NAME. . The improvement of renal mechanisms is likely responsible for the antihypertensive effect of *c*-AUCB treatment. Antihypertensive actions of sEH inhibitor in this ANG II dependent form of malignant hypertension are dependent on the interactions of endogenous bioavailability of EETs and NO.

Úvod

Nepřiměřená aktivace renin-angiotenzinového systému je příčinou ANG II dependentní formy hypertenze (Červenka et al. 1998). Metabolity cytochromu P450 působí jako regulátory kardiovaskulárních a renálních funkcí (Roman, 2002) a podílejí se na patofyziologii tohoto typu hypertenze. Natriuretické účinky a přímé vazodilatační působení EETs hrají důležitou roli v jejich antihypertenzních vlastnostech. Zvýšení biologické dostupnosti EETs by se tak mohlo stát jednou z možností léčby vysokého krevního tlaku.

Nicméně u potkanů s maligní hypertenzí je role eikosanoidů jako kompenzačního systému s protektivními účinky proti zvýšené aktivitě RAS nedostatečně objasněna. Proto se v této práci zaměříme na to, jaký vliv bude mít zvýšení biologické dostupnosti EETs na krevní tlak, renální hemodynamiku a orgánové poškození u potkanů s ANG II dependentní formou hypertenze. Pro objasnění otázek s tím spojených jsme provedli následující experimenty.

Studie č. 1: Vliv inhibice solubilní epoxid hydrolázy na hypertenzi a poškození ledvin u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů

Hypotéza

Podání nového inhibitoru sEH, *cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoové kyseliny (*c*-AUCB) (Hwang et al. 2007) zmírní rozvoj hypertenze a zhoršené renální funkce u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí.

Cíl

Ověřit účinnost inhibitoru sEH pomocí monitorování krevního tlaku a renálních funkcí u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí.

Materiál a metodika

Pokusy byly provedeny na samcích Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou ANG II dependentní maligní hypertenzí. Hypertenze byla indukována pomocí diety s obsahem indol-3-karbinolu (I3C) po dobu 12 dní (indukovaní potkani). Kontrolním zvířatům byla podávána dieta bez I3C (neindukovaní potkani). Inhibitor sEH, *cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoová kyselina (*c*-AUCB) byl podáván v pitné vodě v dávce 13 nebo 26 mg/l, 48 hodin před přechodem na dietu bez obsahu I3C nebo s obsahem 0,3 % I3C. Exkrece sodíku (U_{NaV}) a proteinurie byly stanoveny ze sběru moče za 24 hod z metabolických klecí.

Statistická analýza

Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Statistická analýza dat byla provedena použitím GraphPadPrism software (Graph Pad Software, San Diego, California, USA) pomocí Student testu, Wilcoxonova testu pro nepárová data, popřípadě one-way ANOVA. Ke statistickému srovnání uvnitř skupin byla užita ANOVA pro opakovaná měření pomocí Student-Newman-Keulsova testu. Hodnoty překračující 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$) byly považovány za statisticky významné. Statistické postupy byly stejné i u dalších experimentů, proto je nadále neuvádíme.

Výsledky

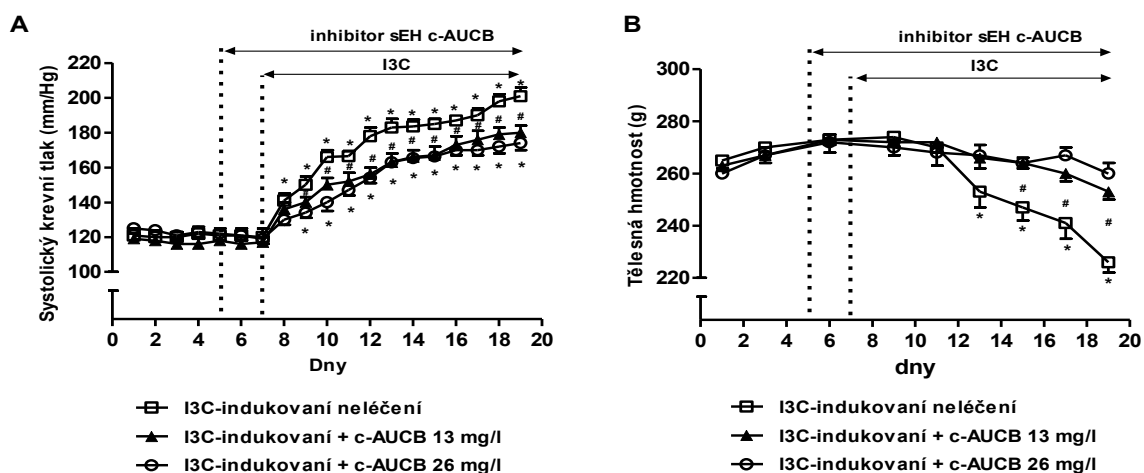
- **Krevní tlak a exkreční funkce ledvin:**

Krevní tlak u radiotelemetrického měření zůstal u neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů v normotenzním rozmezí (na začátku experimentu 124 ± 6 a na konci experimentu 126 ± 7 mm Hg). Léčba inhibitorem sEH v dávkách 13 a 26 mg/l u těchto zvířat neovlivnila systolický krevní tlak (SKT). Podání I3C vedlo k výrazné hypertenzi (graf 1A) a ztrátě tělesné hmotnosti (graf 1B). Tito potkani vykazovali také další známky maligní hypertenze jako polyurii, polydypsii, nahrbený postoj a piloerectii. U skupiny I3C-indukovaných potkanů při léčbě c-AUCB s dávkou 13 nebo 26 mg/l byl rozvoj hypertenze snížen (graf 1A), stejně tak byla menší ztráta hmotnosti (graf 1B) a ostatní příznaky maligní hypertenze.

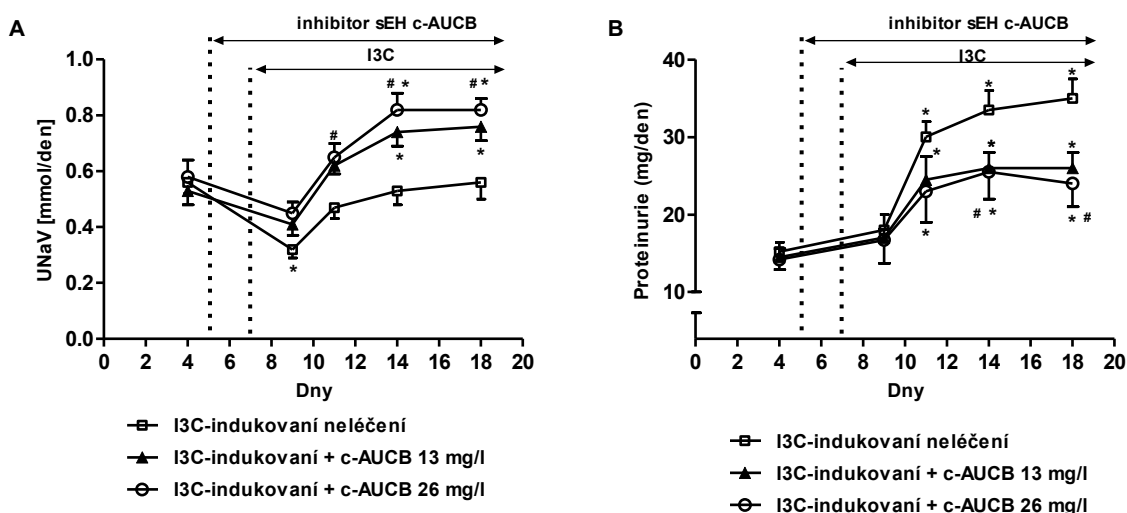
Exkrece sodíku u neindukovaných neléčených potkanů nebyla odlišná ve srovnání se skupinou neindukovaných léčených c-AUCB potkanů. Podání I3C vedlo ke snížení U_{NaV} ve 2. experimentálním (v grafu 9. dni) a následně byla exkrece sodíku normalizována (graf 2A). c-AUCB léčba zvýšila u I3C-indukovaných potkanů U_{NaV} již 2. den a dále 4., 7. a 11. den (v grafu 9. a dále 11., 14. a 18. den) ve srovnání s neléčenými zvířaty (graf 2A). Obě dávky c-AUCB změnilly U_{NaV} v podobném rozsahu. U neindukovaných neléčených potkanů se objevila nepatrná proteinurie ($15,45 \pm 1,05$ mg/den) a léčba s c-AUCB nezpůsobila žádné změny. c-AUCB však zmírnil proteinurii u potkanů krmených I3C 7 a 11 dní (graf 2B).

- **Koncentrace ANG II, EETs, DHETs a proteinová exprese epoxygenázy a sEH:**

Na konci experimentálního protokolu byly stanoveny hodnoty ANG II v plasmě a kůře ledvin (graf 3). Podání I3C vedlo k nárůstu hodnot ANG II v plasmě i kůře ledvin ve srovnání s neindukovanými skupinami. Léčba inhibitorem c-AUCB neměla žádný vliv na hodnoty ANG II v plasmě a tkáni ledvin u neindukovaných i I3C-indukovaných potkanů.

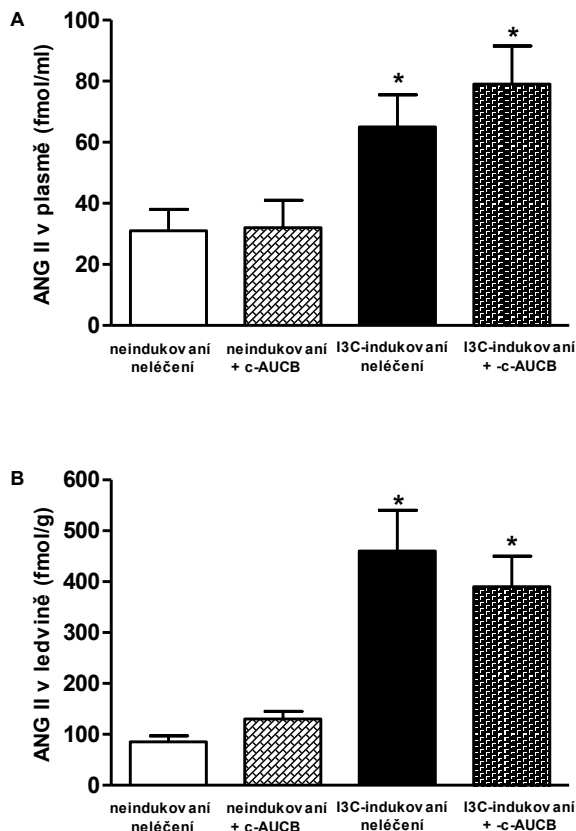


Graf č. 1: Průběh systolického krevního tlaku (A) a tělesné hmotnosti (B) u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů a efekt inhibitoru sEH c-AUCB (13 a 26 mg/l) (n = 8 v každé skupině). *p < 0,05 vs. bazální hodnoty, #p < 0,05 vs. I3C-indukování neléčení potkani.



Graf č. 2: Průběh denního vylučování sodíku (UNaV) (A) a proteinurie (B) u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů a efekt inhibitoru sEH c-AUCB (13 a 26 mg/l) (n = 8 v každé skupině). *p < 0,05 vs. bazální hodnoty, #p < 0,05 vs. I3C-indukování neléčení potkani.

Ačkoli podání I3C neovlivnilo hodnoty EETs, léčba inhibítorem sEH c-AUCB zvýšila koncentrace EETs v kůře ledvin u neindukovaných i I3C-indukovaných skupin (graf 4A). DHETs, produkty degradace EETs, byly vyšší u skupin I3C-indukovaných neléčených potkanů než neindukovaných skupin (graf 4B). Inhibice sEH nezměnila koncentrace DHETs u neindukovaných potkanů, ale snížila hodnoty DHETs u I3C-indukovaných potkanů. Výrazně zvýšený poměr EETs/DHETs u indukovaných i neindukovaných zvířat léčených c-AUCB ukazuje účinnost inhibitoru sEH (graf 4C).

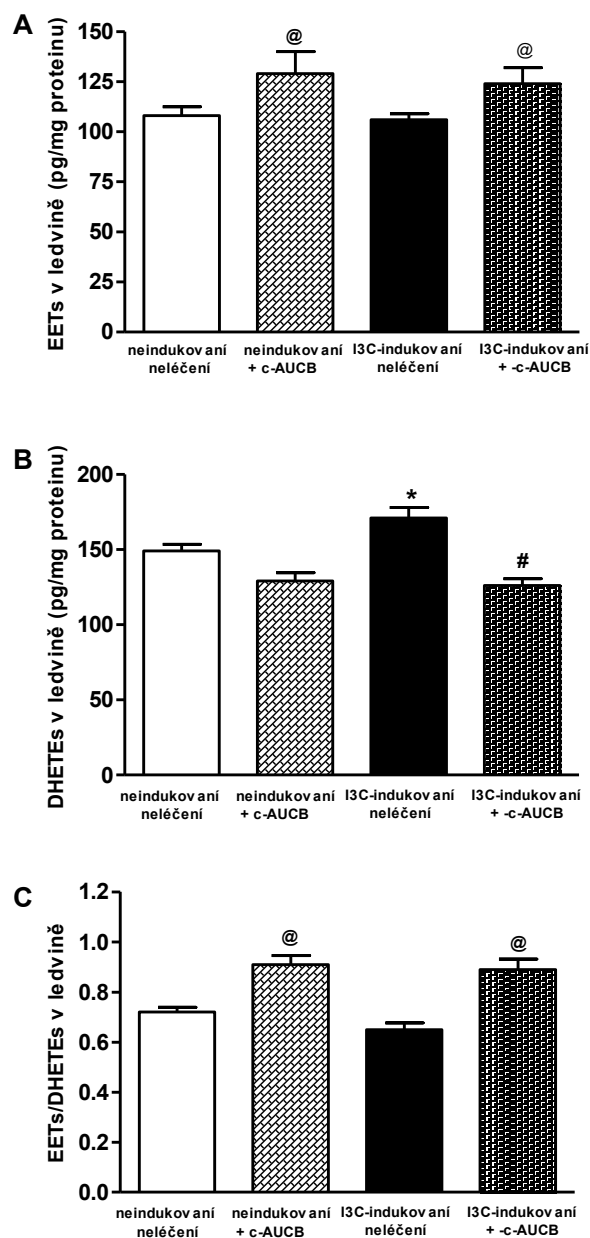


Graf č. 3: Hodnoty ANG II v plasmě (A) a kůře ledvin (B) na konci experimentu u Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 6-8). *p < 0,05 vs. neindukované skupiny.

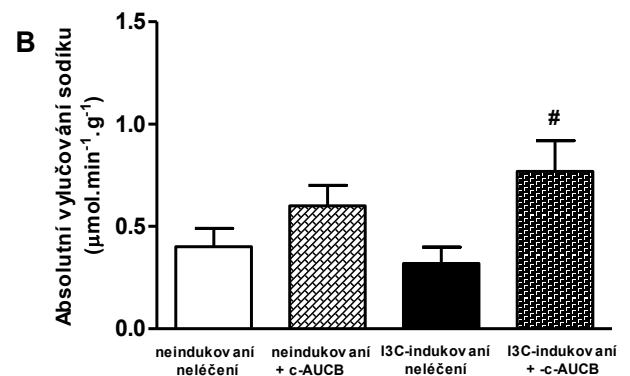
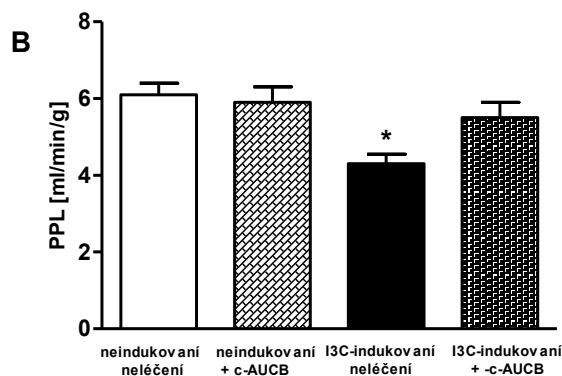
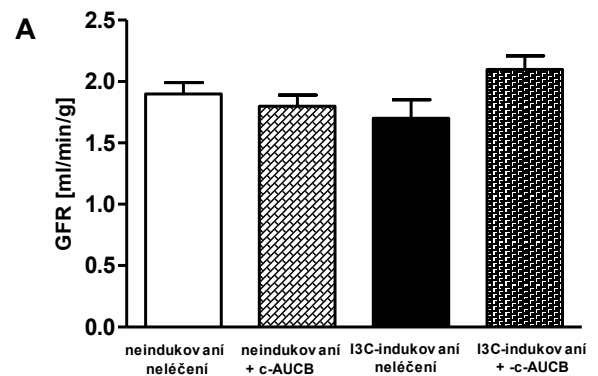
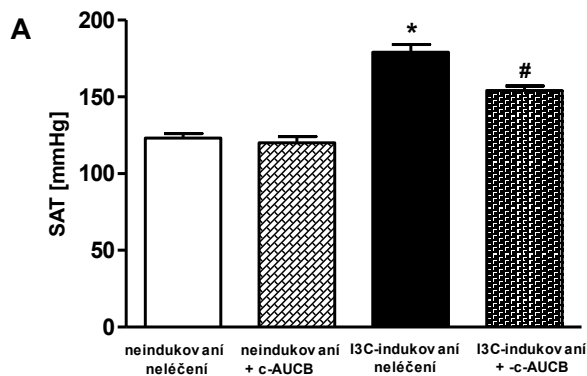
• Hemodynamika ledvin

V jiné sérii pokusů, byly na konci stejného experimentálního protokolu provedeny renální

clearancové pokusy v anestézii. Jelikož obě dávky c-AUCB vykazovaly podobné odpovědi v chronické studii, byla použita pouze vyšší dávka inhibitoru (26 mg/l) pro určení středního arteriálního tlaku (SAT) a renálních funkčních parametrů u neindukovaných a I3C-indukovaných potkanů. Léčba inhibitorem c-AUCB neovlivnila žádný parametr ledvin u neindukovaných zvířat (graf 5 a 6). U I3C-indukovaných zvířat však léčba c-AUCB významně zmírnila rozvoj hypertenze (graf 5A) a normalizovala průtok plasmy ledvinou (PPL) (graf 5B). Glomerulární filtrace (GFR) zůstala nezměněna u všech skupin (graf 6A). U I3C-indukovaných potkanů způsobila c-AUCB léčba vyšší vylučování sodíku než u neléčených potkanů (graf 6B).



Graf č. 4: Hodnoty epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) (A) a dihydroxyeikosatrienových kyselin (DHETs) (B) v kůře ledvin u Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 6-8) a EETs/DHETs poměr (C), jako indikátor účinnosti léčby c-AUCB. @p < 0,05 vs. neléčené skupiny; *p < 0,05 vs. neindukované skupiny; #p < 0,05 vs I3C-indukováni neléčení potkani.



Graf č. 5: Střední arteriální tlak (SAT) a průtok plasmy ledvinou (PPL) u anestezovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 8-9).

*p < 0,05 vs. neindukované skupiny, #p < 0,05 vs. I3C-indukovaní neléčení potkani.

Graf č. 6: Glomerulární filtrace (GFR) a absolutní vylučování sodíku u anestezovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 8-9).

#p < 0,05 vs. I3C-indukovaní neléčení potkani.

Studie č. 2: Inhibice solubilní epoxid hydrolázy zlepšit zhoršenou tlakovou natriurézou a zmírní rozvoj hypertenze a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

Hypotéza

Inhibice sEH obnoví tlakovou natriurézou v ledvinách a tím přispívá ke snížení hypertenze.

Cíl

1. Charakterizovat účinek chronické léčby nového inhibitoru sEH (c-AUCB) na autoregulaci renální hemodynamiky, tlakovou natriurézou a hypertenzí vyvolanou srdeční hypertrofií u Cyp1a1-Ren-2 potkanů s indukovanou hypertenzí.

2. Srovnání účinku chronické blokády AT₁ receptorů a inhibice sEH na krevní tlak, renální funkce a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u tohoto modelu hypertenze.

Materiál a metodika

Pokusy byly provedeny na samcích Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Hypertenze byla indukována pomocí diety s obsahem I3C (indukovaní potkani) po dobu 11 dní. Kontrolním zvířatům byla podávána dieta bez I3C (neindukovaní potkani).

Inhibitor sEH c-AUCB byl podáván v pitné vodě (26 mg/l) 48 hodin před zahájením diety s nebo bez obsahu I3C. U dalších skupin byl použit AT₁ antagonista losartan (Lozap, v dávce 100 mg/l v pitné vodě), také 48 hodin před zahájením diety s nebo bez obsahu I3C. Tato dávka zabrání rozvoji hypertenze u tohoto modelu potkanů (Erbanová et al. 2009). Podrobný postup akutních clearancových pokusů je uveden v Honetschlägerová et al. 2011a.

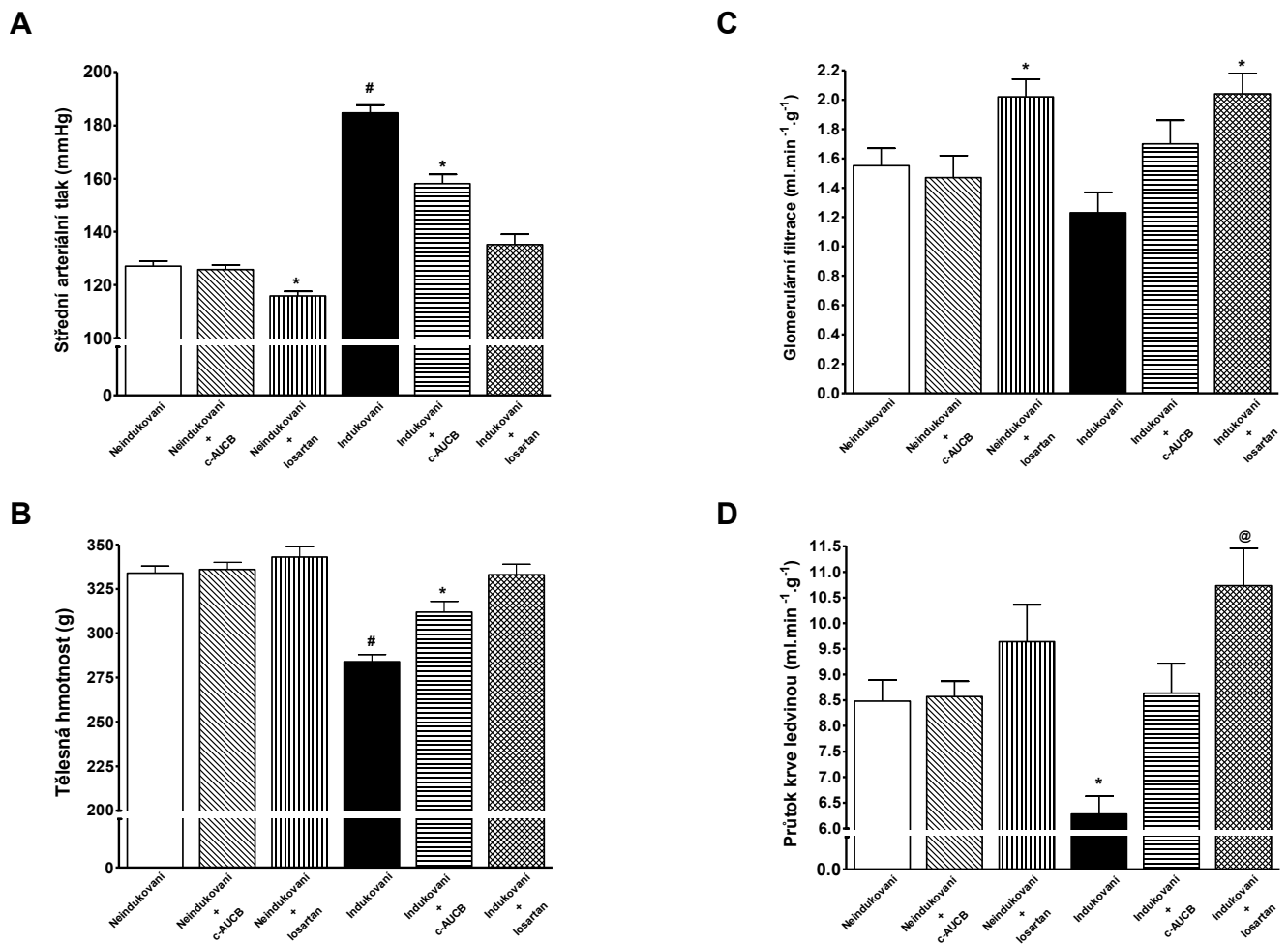
Výsledky

- **Protokol č. 1: Odpověď glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou a na vylučování sodíku ledvinou při snižování renálního arteriálního tlaku:**

Bazální hodnoty (průměrné hodnoty od skupin kontrolního i experimentálního protokolu získané během první clearancové periody při fyziologickém renálním arteriálním tlaku) středního arteriálního tlaku (SAT), tělesné hmotnosti, PKL, a GFR jsou zobrazeny v grafu 7. c-AUCB léčba neovlivnila SAT, tělesnou hmotnost, PKL ani GFR u neindukovaných zvířat ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany. Léčba losartanem signifikantně snížila SAT a GFR, ale neovlivnila tělesnou hmotnost a PKL u normotenzních neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Podání diety s 0,3 % I3C vedlo k výrazné hypertenzi (graf 7A) spojené s váhovým úbytkem (graf 7B) ve srovnání s neindukovanými zvířaty. c-AUCB léčba zmírnila rozvoj hypertenze, ztrátu tělesné hmotnosti a zabránila snížení PKL u I3C-indukovaných potkanů. Léčba losartanem zamezila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti, navíc také zabránila snížení PKL a dokonce způsobila jeho zvýšení u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými normotenzními potkany (graf 7D).

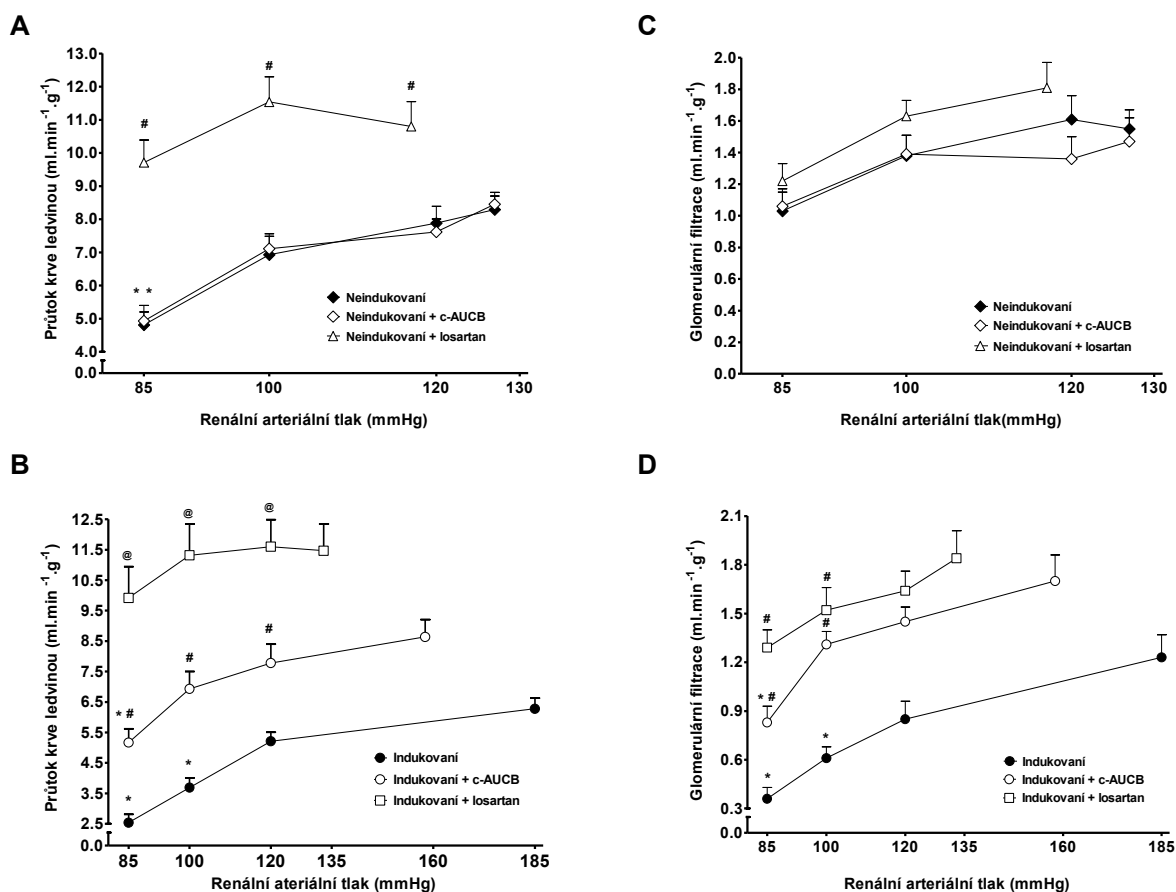
U neindukovaných potkanů neměla c-AUCB léčba vliv na autoregulační schopnost PKL a GFR při redukcích RAT (graf 8A a 8C). Léčba losartanem neovlivnila autoregulační schopnost GFR u neindukovaných potkanů. Zvýšila však bazální hodnoty PKL a zlepšila jejich autoregulaci i při nejnižší hodnotě RAT ($p < 0,05$) (graf 8A). PKL při bazálních hodnotách byl nižší u neléčených I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými

potkany ($6,28 \pm 0,35$ vs. $8,29 \pm 0,41$ ml/min/g, $p < 0,05$) a redukce RAT vedla k poklesu PKL již při redukcí na 100 mm/Hg (graf 8B). c-AUCB léčba u I3C-indukovaných potkanů nejenom zabránila snížení PKL při bazálních hodnotách RAT, ale také výrazně zlepšila autoregulační schopnost PKL až na hodnoty pozorované u neindukovaných zvířat. Léčba losartanem u indukovaných potkanů navíc zvýšila PKL při bazálních hodnotách RAT ($11,47 \pm 0,88$ ml/min/g) a udržela autoregulační schopnost i při nejnižších hodnotách RAT (graf 8B). I3C-indukovaní neléčení potkani reagovali na redukcí RAT snížením GFR a léčba jak c-AUCB, tak losartanem zlepšila autoregulační schopnost GFR (grafu 8D).



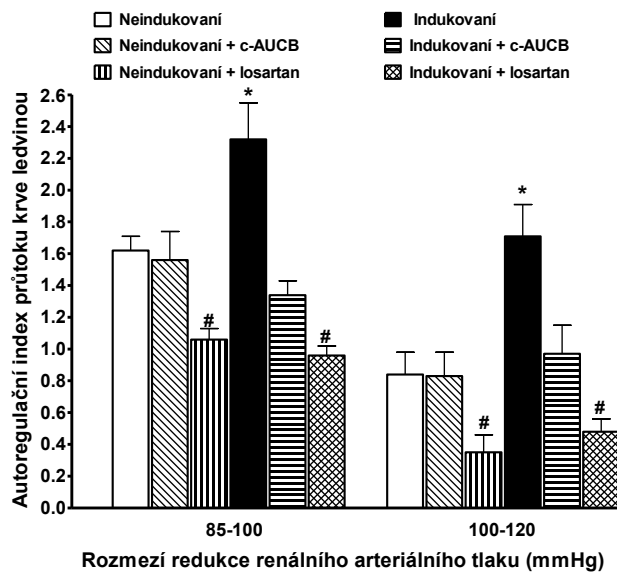
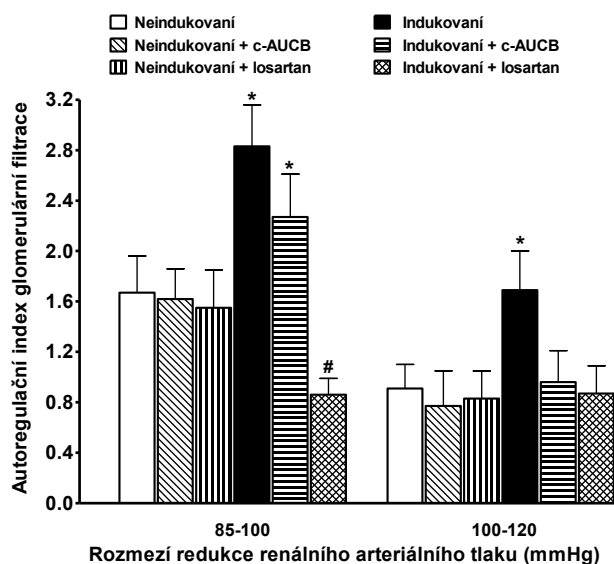
Graf č. 7: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku (SAT), tělesné hmotnosti, glomerulární filtrace (GFR) a průtoku krve ledvinou (PKL), u Cyp1a1-Ren-2 transgenických potkanů krměných normální krmnou dávkou (neindukovaní), nebo dietou s obsahem 0,3 % I3C (I3C-indukovaní). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru.

* $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty, # $p < 0,05$ vs. všechny hodnoty, @ $p < 0,05$ vs. neindukovaní neléčení potkani.



Graf č. 8: Vztah mezi renálním arteriálním tlakem (RAT) a průtokem krve ledvinou (A a B) a mezi RAT a glomerulární filtrací (C a D) u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krměných buď normální dietou (neindukováni), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukováni). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. bazální hodnoty, #p < 0,05 vs. neléčení potkani, @p < 0,05 vs. c-AUCB léčení potkani.

Graf 9 ukazuje autoregulační schopnost PKL a GFR použitím autoregulačního indexu podle metody Semple a Wardenera (Semple et al. 1959). I3C-indukováni neléčení potkani vykazují zhoršenou autoregulační schopnost PKL a GFR již při redukcí RAT ze 120 na 100 mmHg a ještě více při redukcí na konečných 85 mmHg. Léčba s c-AUCB neovlivnila autoregulační index u neindukovaných potkanů, ale normalizovala autoregulační index PKL a GRF u I3C-indukovaných potkanů při redukcí tlaku ze 120 na 100 mmHg, ale nezlepšila zhoršený autoregulační index GFR při redukcí RAT ze 100 na 85 mmHg. Léčba losartanem obnovila autoregulační index PKL i GFR u I3C-indukovaných potkanů a dokonce zlepšila autoregulační index PKL u neindukovaných potkanů ve srovnání s neindukovými neléčenými potkany. Kompletní data absolutního a frakčního vylučování sodíku a diurézy při redukcí renálního arteriálního tlaku viz. Honetschlägerová et al. 2011b.

A**B**

Graf č. 9: Autoregulační index PKL

(A) a GFR (B) při redukcích

renálního arteriálního tlaku z hodnot

120 na 100 mmHg a ze 100 na 85

mmHg. *p < 0,05 vs. neoznačené

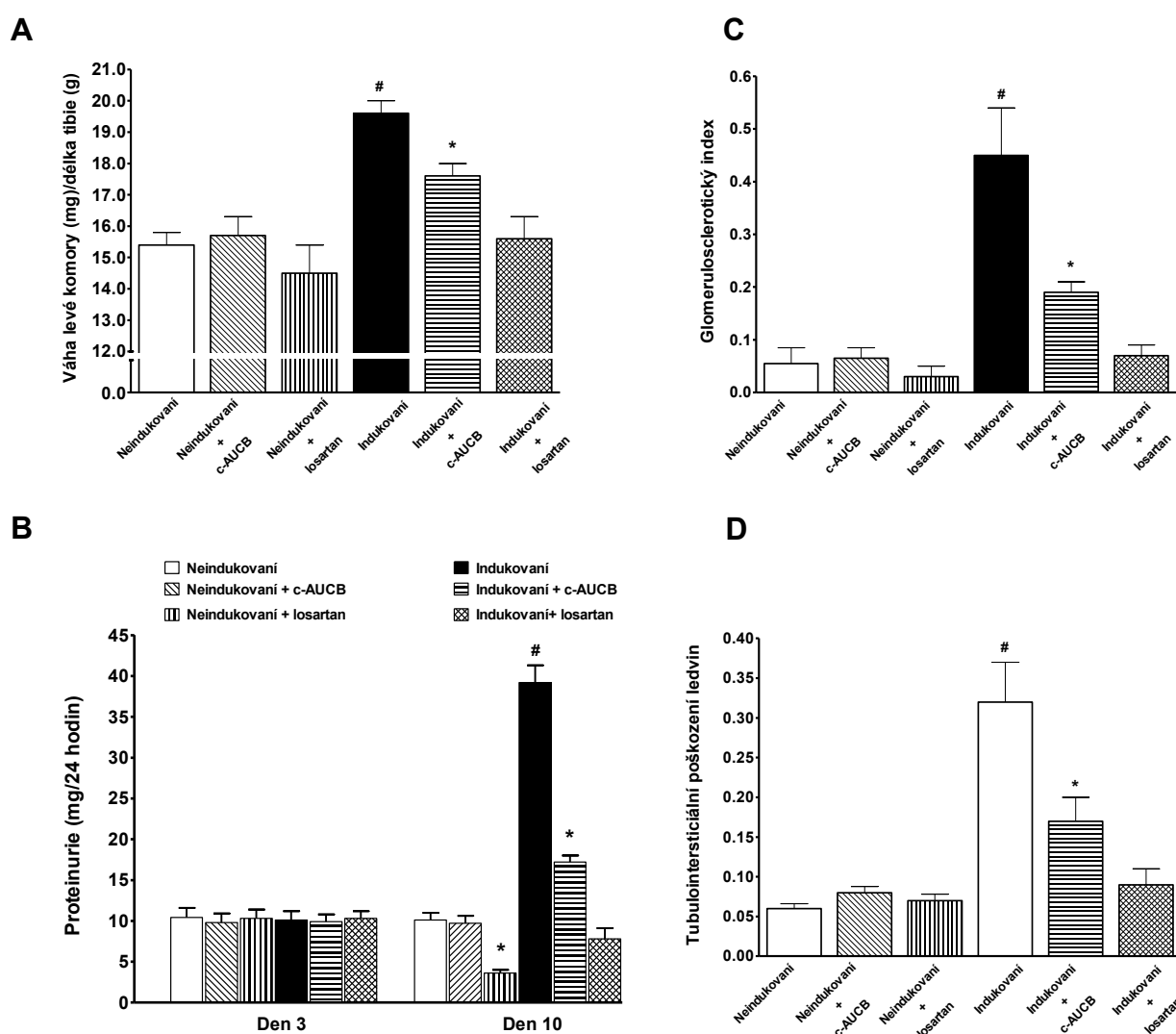
hodnoty, #p < 0,05 vs. veškeré hodnoty.

- **Protokol č. 2: Účinek chronické inhibice solubilní epoxid hydrolázy a blokátoru AT₁ receptoru na srdeční hypertrofii, proteinurii, poškození glomerulů ledvin, tubulointerstiální poškození ledvin a koncentrace EETs a DHETs v ledvinné tkáni:**
I3C-indukování neléčení potkani vyvinuli zřetelnou srdeční hypertrofii vyjádřenou jako poměr váhy levé komory k délce tibie, dále výraznou proteinurii a značný stupeň renálního glomerulárního a tubulointerstiálního poškození ve srovnání s neindukovanými

normotenzními potkany. c-AUCB léčba signifikantně zmírnila rozvoj srdeční hypertrofie, proteinurie a zvýšení glomerulosklerotického indexu (GSI) a tubulointerstiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů. Léčba losartanem kompletně zabránila rozvoji srdeční hypertrofie, proteinurie a zrušila zvýšení GSI a tubulointerstiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů. Neindukováni normotenzní Cyp1a1-Ren-2 potkani vykazovali malou proteinurii a minimální stupeň renálního glomerulárního a tubulointerstiálního poškození, přičemž léčba c-AUCB významně neovlivnila žádný z těchto parametrů (graf 10). Navíc léčba losartanem signifikantně snížila proteinurii 10. den experimentu u neindukovaných normotenzních potkanů.

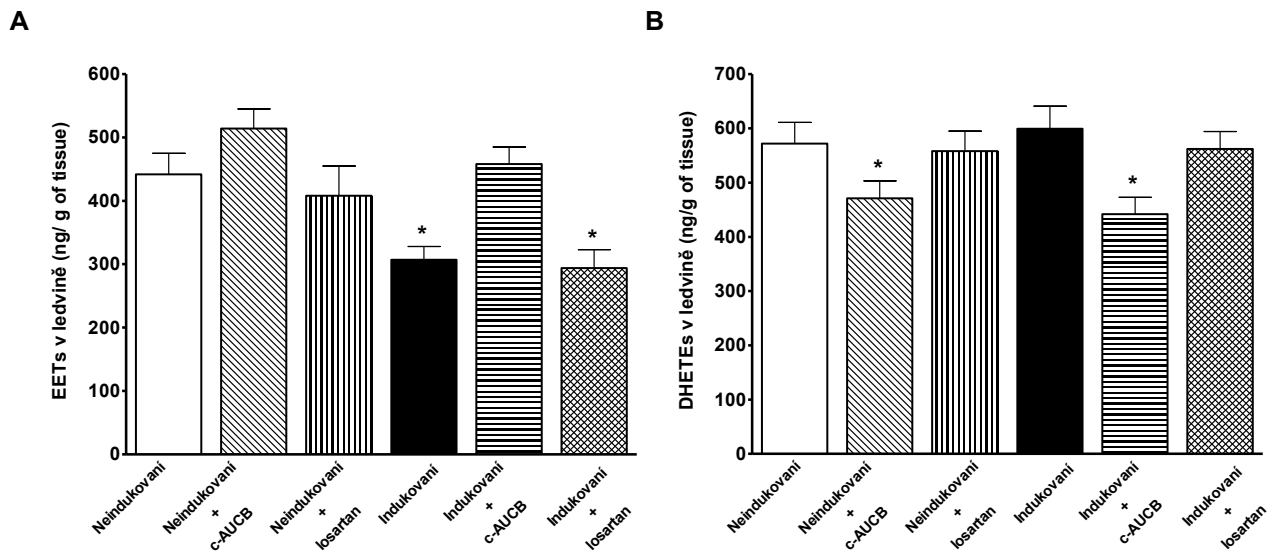
Neléčení a losartanem léčení I3C-indukovaní potkani vykazují signifikantní snížení koncentrace EETs v kůře ledvin. Léčba c-AUCB zabránila snížení hodnot EETs v ledvině u

I3C-indukovaných potkanů. Navíc c-AUCB léčba u neindukovaných stejně jako u I3C-indukovaných vedla k signifikantnímu snížení koncentrací DHETs v ledvinné tkáni. Při použití poměru EETs/DHETs, což nejlépe představuje intrarenální účinnost biologicky aktivních metabolitů epoxygenázy, je vidět, že je tento poměr významně nižší u I3C-indukovaných neléčených potkanů ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany. Tento poměr nebyl ovlivněn léčbou s losartanem, ale c-AUCB léčba signifikantně zvýšila tento poměr u I3C-indukovaných stejně jako u neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenických potkanů (graf 11).

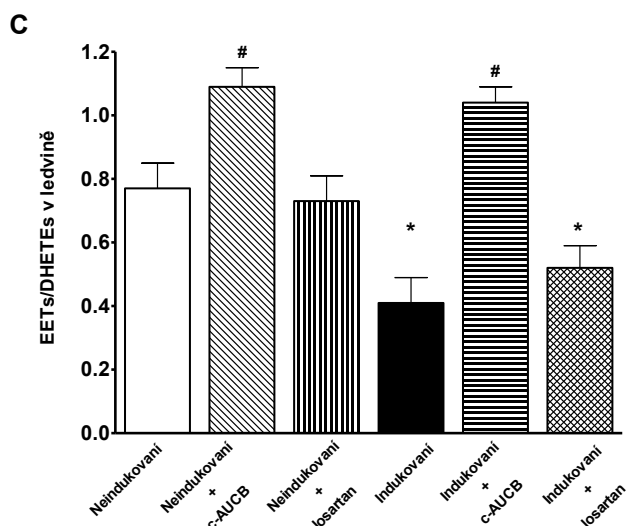


Graf č. 10: Poměr srdeční levé komory k délce tibiae (A), proteinurie za bazálních podmínek (den 3) a na konci experimentu (den 10) (B), glomerulosklerotický index (C) a tubulointersticiální poškození ledvin (D) u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krmených buď normální dietou (neindukováni), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukováni). c-AUCB značí léčbu inhibitorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru.

*p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty.



Graf č. 11: Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) (A) a dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) (B) a poměr EET/DHETs v kůře ledvin (C) na konci experimentálního protokolu u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krmených buď normální dietou (neindukovani), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukovani), c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty.



Studie č. 3: Léčba pomocí L-NAME zrušila antihypertenzní a renoprotektivní účinek inhibice solubilní epoxid hydrolázy u ANG II dependentní hypertenze.

Hypotéza

Vazodilatační účinky eikosanoidů jsou převážně způsobeny jejich schopností aktivovat endoteliální NO syntázu (eNOs) s následným uvolněním NO do vaskulatury.

Cíl

1. Zjistit, zda snížení krevního tlaku pomocí inhibítora sEH je způsobeno EETs zprostředkovanou zvýšenou biologickou dostupností NO.

2. Pro detailnější porozumění, jakou roli hraje intrarenální interakce Cyp metabolitů s RAS a NO, stanovit intrarenální koncentrace ANG II, EETs, DHETs, a koncentraci NOx, 8-isoprostanu, peroxidu vodíku a reaktivní látky s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v moči u normotenzních a hypertenzních zvířat.

Materiál a metodika

Pokusy byly provedeny na samcích Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Hypertenze byla indukována pomocí diety s obsahem I3C (indukovaní potkani). Kontrolním zvířatům byla podávána dieta bez I3C (neindukovaní potkani).

Inhibitor sEH c-AUCB byl podáván v pitné vodě v dávce 26 mg/l. L-NAME byl podáván v pitné vodě v dávce 600 mg/l. Tato dávka plně blokuje aktivitu NOS (Zicha et al. 2009). K zablokování aktivity RAS byla použita kombinace ACE inhibitoru trandolaprilu (Gopten, v dávce 6 mg/l v pitné vodě) a AT₁ antagonisty losartanu (Lozap, v dávce 100 mg/l v pitné vodě). Takto vysoké dávky inhibitoru ACE a AT₁ kompletně zabránily rozvoji hypertenze a poskytly větší ochranu srdce a ledvin než použití dávek běžně užívaných (Kujal et al. 2010). Experimentální protokol začal léčbou s inhibítorem sEH (c-AUCB) nebo s kombinací inhibitoru ACE a antagonisty AT₁ receptoru (Gopten + Lozap). Po 48 hodinách léčby se začala potkanům podávat dieta s nebo bez obsahu 0,3 % I3C a příslušným skupinám potkanů také L-NAME v pitné vodě po dobu 3 dní. Zvolili jsme tento typ protokolu, neboť bylo zjištěno, že po 3 dnech indukce 0,3 % I3C dojde k maximální aktivaci reninového genu a hypertenze dosáhne nejvyšší hodnoty (Honetschlägerová et al. 2011a, Honetschlägerová et al. 2011b, Kantachuvesiri et al. 2001, Vaňourková et al. 2006, Husková et al. 2010).

Výsledky

- **Protokol č. 1: Vliv na krevní tlak, albuminurii, vylučování nitrátů/nitritů močí, 8-isoprostanů, peroxidu vodíku, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, koncentrace EETs, DHETs a ANG II v ledvinách a glomerulární a tubulointersticiální poškození ledvin:**

Indukce indol-3-karbinolem zvýšila střední arteriální tlak (SAT) ze 108 ± 3 na konečných 163 ± 4 mmHg (graf 12A). Hypertenze byla spojena se značným váhovým úbytkem ze 334 ± 5 na 293 ± 5 g (graf 12B). Podání L-NAME u I3C-indukovaných zvířat přechodně zvýšilo krevní tlak ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany (163 ± 4 vs. 128 ± 3 mmHg, $p < 0,05$, 1. den po nasazení I3C). Při pozdějších měřeních byl však střední arteriální tlak

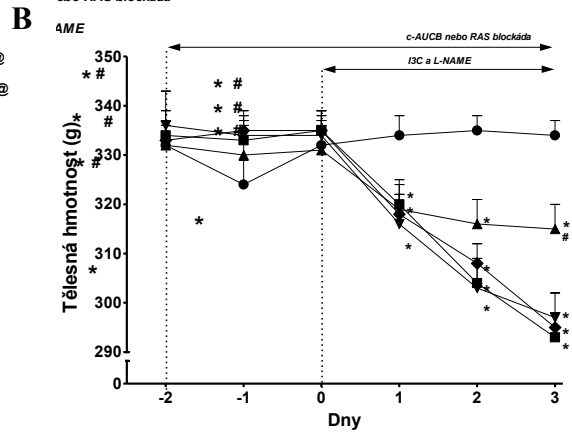
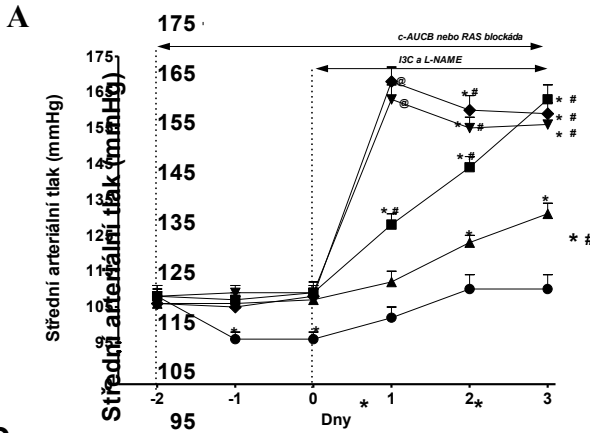
podobný jako u I3C-indukovaných neléčených potkanů. c-AUCB léčba zmírnila rozvoj hypertenze a váhový úbytek u I3C indukovaných potkanů ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. Kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME u I3C-indukovaných potkanů nesnížila krevní tlak, ani nezabránila poklesu váhy. Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba zabránila zvýšení SAT a váhovému úbytku u I3C-indukovaných potkanů.

SAT i tělesná hmotnost u neindukovaných potkanů zůstaly v normotenzních mezích v průběhu celé experimentální periody a ani c-AUCB na něj neměla vliv (graf 12C). Podání L-NAME vedlo u neindukovaných potkanů k rychlému zvýšení SAT ze 108 ± 2 na 132 ± 3 mmHg ($p < 0,05$), což bylo spojeno se snížením tělesné hmotnosti z 336 ± 3 na 319 ± 3 g ($p < 0,05$). Kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME u neindukovaných potkanů nezabránila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s L-NAME léčenými neindukovanými potkany. Kombinovaná RAS a NOS blokáda zabránila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti u neindukovaných potkanů (graf 12C a D).

Z grafu 13A je patrná zvýšená albuminurie u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými potkany ($16,2 \pm 2,1$ vs. $0,4 \pm 0,2$ mg/24hod, $p < 0,05$). c-AUCB léčba signifikantně zmírnila albuminurii u I3C-indukovaných potkanů. Podání L-NAME ještě zhoršilo albuminurii u I3C-indukovaných potkanů a kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME nezabránila zvýšení albuminu v moči u I3C-indukovaných zvířat. Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba zabránila zvýšení albuminu v moči u I3C-indukovaných zvířat (graf 13A). c-AUCB léčba žádný vliv na albuminurii u neindukovaných potkanů. Avšak podání L-NAME způsobilo značné zvýšení albuminurie ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($9,8 \pm 1,5$ vs. $0,4 \pm 0,2$ mg/24 hod, $p < 0,05$), ale nebylo ovlivněno kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME (graf 13C). Podobně jako u I3C-indukovaných potkanů kombinovaná RAS a NOS blokáda úplně zabránila zvýšení albuminurie u neindukovaných potkanů. I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují silnější ledvinné tubulointersticiální poškození ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,04 \pm 0,02$, $p < 0,05$). c-AUCB léčba zabránila zvýšení ledvinného tubulointersticiálního poškození u I3C-indukovaných zvířat (graf 13B). Podání L-NAME signifikantně zhoršilo stupeň ledvinného tubulointersticiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů a kombinace s c-AUCB tomu nezabránila. Kombinovaná blokáda RAS a NOS normalizovala stupeň ledvinného tubulointersticiálního poškození na hodnoty u neindukovaných neléčených potkanů. c-AUCB léčba u neindukovaných potkanů neovlivnila stupeň tubulointersticiálního poškození, avšak podání L-NAME způsobilo jeho značné zvýšení ve srovnání s neindukovanými neléčenými

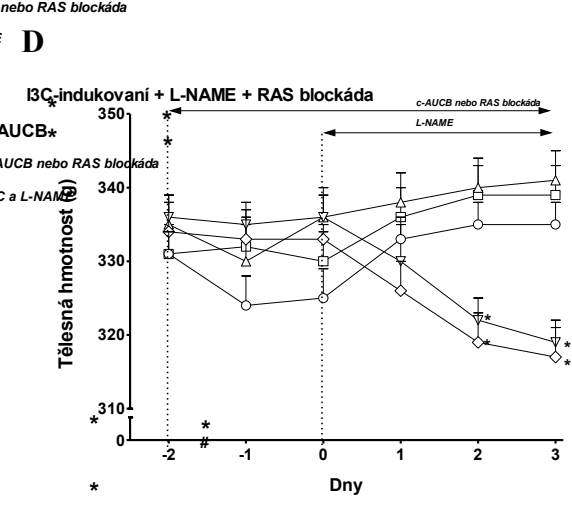
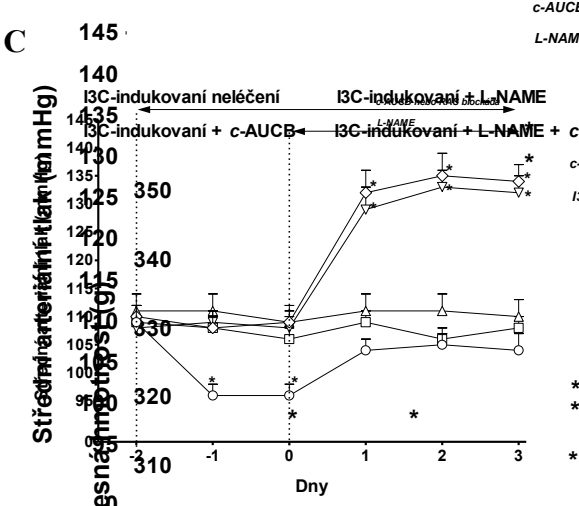
A

■ I3C-indukování neléčení ▼ I3C-indukování + L-NAME ● I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda
▲ I3C-indukování + c-AUCB ◆ I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB



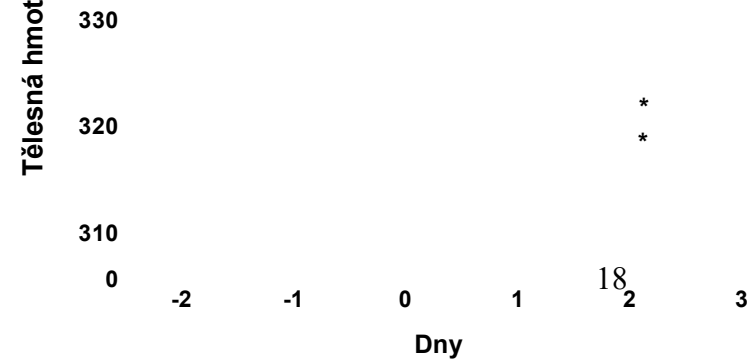
C

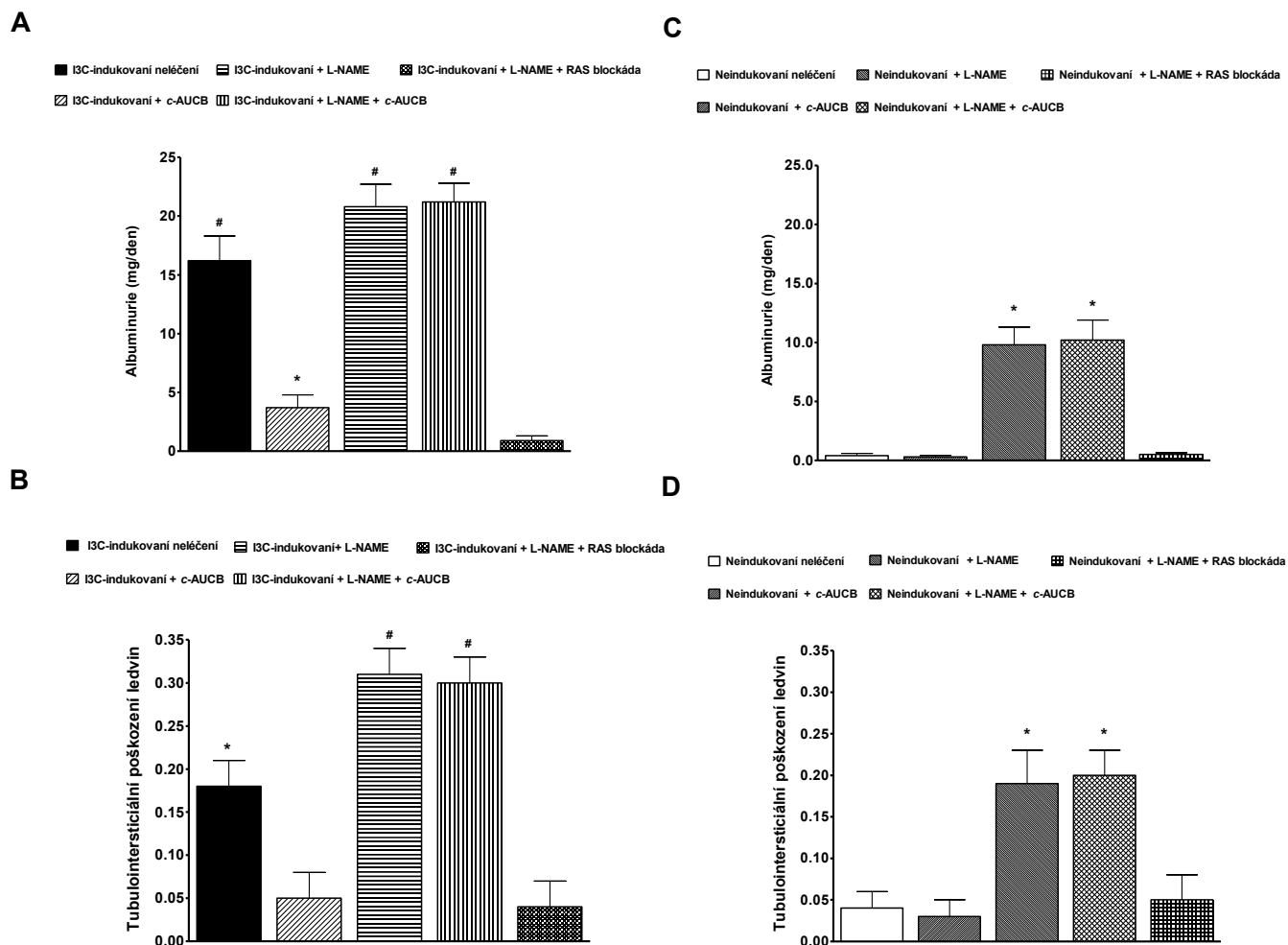
□ Neindukování neléčení ▼ Neindukování + L-NAME ○ Neindukování + L-NAME + RAS blokáda
△ Neindukování + c-AUCB ◇ Neindukování + L-NAME + c-AUCB



Graf č. 12: Průběh středního arteriálního tlaku (měřeno radiotelemetricky) (A a C) a tělesné hmotnosti (B a D) u I3C-indukovaných (A a B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotným inhibítorem sEH c-AUCB nebo L-NAME a buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME, nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. *p < 0,05 vs. bazální hodnoty, #p < 0,05 vs. c-AUCB neoznačené hodnoty ve stejném časovém okamžiku, @p < 0,03 vs. všechny hodnoty ve stejném časovém okamžiku

potkanů (0,19 ± 0,03 vs. 0,03 ± 0,02, p < 0,05) a opět současná c-AUCB a L-NAME léčba neměla na toto zvýšení žádný vliv. Stejně jako u L-NAME léčených I3C-indukovaných potkanů, RAS blokáda kompletně zabránila zvýšení tubulointersticiálního poškození u neindukovaných potkanů (graf 13D).



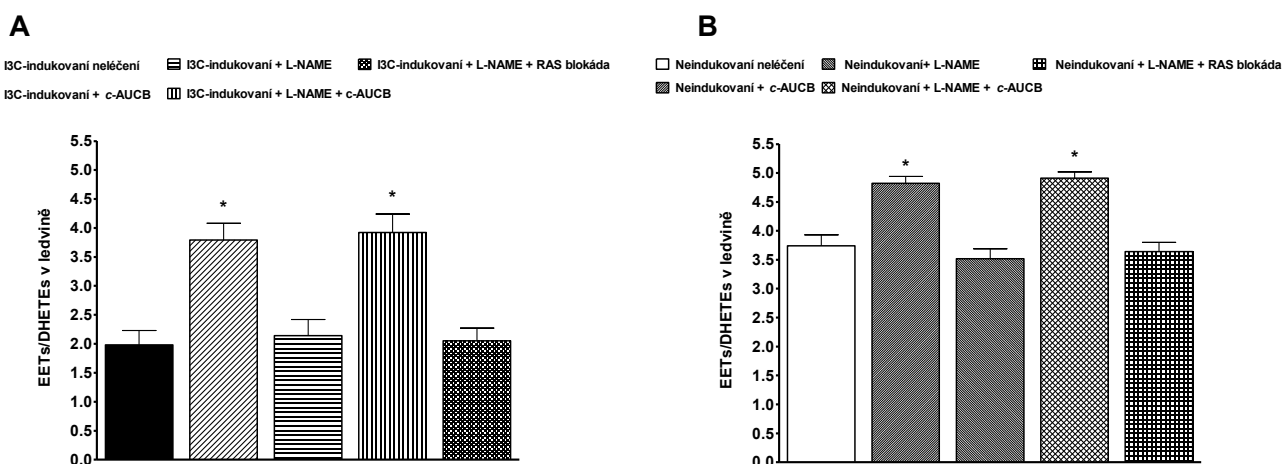


Graf č. 13: Albuminurie (A a C) a tubulointerstiální poškození ledvin (B a D) u I3C-indukovaných (A a B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotným inhibitorem sEH c-AUCB nebo NO inhibitorem L-NAME a buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME, nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty, # $p < 0,05$ vs. všechny hodnoty.

I3C-indukování neléčení potkanů měli signifikantně vyšší vylučování nitrátů/nitritů (NOx) močí než neindukování neléčení potkanů ($19,68 \pm 1,44$ vs. $11,98 \pm 0,91$ $\mu\text{mol/den}$). c-AUCB léčba signifikantně snížila vylučování NOx u I3C-indukovaných potkanů, ale neměla žádný vliv u neindukovaných potkanů. Podání L-NAME vedlo ke značné redukci ve vylučování NOx jak u I3C-indukovaných, tak i u neindukovaných potkanů. Kombinovaná léčba c-AUCB s L-NAME nebo RAS blokáda s L-NAME nijak neovlivnila vylučování NOx u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů. Nebyly žádné signifikantní rozdíly ve vylučování 8-isoprostanů, peroxidu vodíku ani látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou v průběhu

jakéhokoliv léčebného protokolu u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů. Kompletní data viz. Honetschlägerová et al. 2013.

Graf 14 sumarizuje dostupnost biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů vyjádřenou jako poměr EETs/DHETs. Tento poměr je u I3C-indukovaných potkanů nižší než u neindukovaných neléčených potkanů. Samotná c-AUCB léčba nebo kombinovaná léčba c-AUCB s L-NAME zvýšila poměr EETs/DHETs jak u I3C-indukovaných tak u neindukovaných potkanů (graf 14A a B), avšak tento vzrůst byl mnohem vyšší u I3C-indukovaných než u neindukovaných potkanů. Zvýšení poměru EETs/DHETs bylo u I3C-indukovaných potkanů výsledkem kombinace signifikantního zvýšení koncentrace EETs a signifikantního snížení koncentrace DHETs. U neindukovaných potkanů lze v poměru EETs/DHETs sledovat podobný trend. Samotné podání L-NAME nebo kombinace RAS blokády a L-NAME léčby nezměnilo poměr EETs/DHETs jak u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů (graf 14).



Graf č. 14: Poměr EETs/DHETs v ledvině u I3C-indukovaných a neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenických potkanů a efekt léčby samotného inhibitoru sEH c-AUCB nebo L-NAME a buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME, nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou.
*p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty.

Koncentrace ANG II v plasmě a ledvině byla signifikantně vyšší u I3C-indukovaných neléčených potkanů než u neindukovaných neléčených potkanů. c-AUCB léčba nezměnila koncentrace ANG II v plasmě a ledvině. Samotné podání L-NAME nebo kombinované léčby L-NAME s c-AUCB nebo RAS blokádou vedlo očekávaně ke snížení hodnot ANG II v plasmě a ledvině jak u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů. Kompletní výsledky viz Honetschlägerová et al. 2013.

- **Protokol č. 2: Vliv na hemodynamiku a exkretční funkce ledvin**

Tabulka 1a a 1b sumarizuje data (průměr ze 2 clearancových period) středního arteriálního tlaku, renální hemodynamiky a vylučování elektrolytů. I3C-indukovaní neléčení potkani vykazovali nižší PKL ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($p < 0,05$). c-AUCB léčba zabránila snížení PKL u I3C-indukovaných potkanů, ale signifikantně nezměnila PKL u neindukovaných potkanů. Podání L-NAME vedlo k nápadné redukci PKL, ale současné podávání L-NAME a c-AUCB léčby nezabránilo jeho snížení u I3C-indukovaných ani u neindukovaných potkanů. Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba nepatrně zmírnila snížení PKL u I3C-indukovaných a neindukovaných potkanů ve srovnání se zvířaty léčených

Tabulka č. 1a, 1b: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku, renálních funkcí a vylučovaných elektrolytů

Tabulka 1a:

Skupina	SAT (mm/Hg)	GFR (ml/min/g)	PKL (ml/min/g)
I3C-indukovaní neléčení	162 ± 3 [@]	1,45 ± 0,27*	6,03 ± 0,34#
I3C-indukovaní + c-AUCB	134 ± 3*	1,99 ± 0,19*	9,24 ± 0,62 [@]
I3C-indukovaní + L-NAME	163 ± 4 [@]	0,69 ± 0,11	2,61 ± 0,17
I3C-indukovaní + L-NAME + c-AUCB	161 ± 3 [@]	0,61 ± 0,14	2,09 ± 0,24
I3C-indukovaní + L-NAME + RAS bl.	109 ± 4	0,74 ± 0,14	3,69 ± 0,23*
Neindukovaní neléčení	111 ± 3	1,89 ± 0,17*	8,02 ± 0,41#
Neindukovaní + c-AUCB	112 ± 3	2,21 ± 0,21*	7,22 ± 0,53#
Neindukovaní + L-NAME	136 ± 4*	0,71 ± 0,19	2,37 ± 0,16
Neindukovaní + L-NAME + c-AUCB	135 ± 5*	0,65 ± 0,11	1,99 ± 0,21
Neindukovaní + L-NAME + RAS bl.	110 ± 4	0,73 ± 0,14	3,71 ± 0,28*

Tabulka 1b :

Skupina	U _{NaV} (μmol/min/g)	FE _{Na} (%)	UV (μl/min/g)
I3C-indukovaní neléčení	1,48 ± 0,25 [@]	1,32 ± 0,22	13,51 ± 1,48 [@]
I3C-indukovaní + c-AUCB	1,91 ± 0,27 [@]	2,04 ± 0,29 [@]	12,18 ± 1,81 [@]
I3C-indukovaní + L-NAME	0,29 ± 0,09*	0,25 ± 0,07*	3,82 ± 0,34*
I3C-indukovaní + L-NAME + c-AUCB	0,35 ± 0,06*	0,33 ± 0,04*	4,11 ± 0,29*
I3C-indukovaní + L-NAME + RAS bl.	0,66 ± 0,05#	0,71 ± 0,06#	6,52 ± 0,27
Neindukovaní neléčení	0,43 ± 0,06*	0,39 ± 0,08*	4,98 ± 0,36*
Neindukovaní + c-AUCB	0,47 ± 0,05*	0,44 ± 0,09*	4,66 ± 0,42*
Neindukovaní + L-NAME	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,03	2,54 ± 0,22
Neindukovaní + L-NAME + c-AUCB	0,14 ± 0,04	0,16 ± 0,05	2,63 ± 0,21
Neindukovaní + L-NAME + RAS bl.	0,29 ± 0,04*	0,33 ± 0,06*	3,61 ± 0,18*

c-AUCB - léčba inhibitory sEH, FE_{Na} - frakční vylučování sodíku, GFR – glomerulární filtrace, I3C – idol-3-karbinol, L-NAME – léčba inhibitory NO syntázy, SAT – střední arteriální tlak, RAS – renin-angiotenzin systém, PKL – průtok krve ledvinou, U_{NaV} – absolutní vylučování sodíku, UV – objem moče. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty, # $p < 0,05$ vs. c-AUCB označené hodnoty, @ $p < 0,05$ vs. všechny hodnoty.

samotným L-NAME (v obou případech $p < 0,05$). I3C-indukovaní neléčení potkani měli tendenci ke snížení glomerulární filtrace ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany, ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Při c-AUCB léčbě tato tendence ve snížení GFR zmizela, u neindukovaných zvířat nebyla GFR ovlivněna. Podání L-NAME způsobilo značné snížení GFR u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů. Ani kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME, ani kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba nezmírnily snížení GFR u I3C-indukovaných nebo neindukovaných potkanů ve srovnání se zvířaty léčenými samotným L-NAME.

I3C-indukovaní neléčení potkani mají signifikantně vyšší absolutní a frakční vylučování sodíku a diurézu než neindukovaní neléčení potkani (ve všech případech $p < 0,05$). U I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů vyvolalo podání L-NAME silné snížení diurézy a absolutního i frakčního vylučování sodíku, avšak kombinovaná léčba s c-AUCB a L-NAME tomuto snížení nezabránila (ve všech případech $p < 0,05$). Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba zmírnila snížení diurézy i absolutní a frakční vylučování sodíku u I3C-indukovaných a neindukovaných potkanů.

Diskuze

Podávání I3C u Cyp1a1-Ren-2 potkanů vedlo k rozvoji maligní hypertenze se značným zvýšením RAS aktivity (renin a ANG II). Léčba inhibitorem sEH c-AUCB nezměnila aktivitu RAS v plasmě ani ledvině, ale významně zmírnila rozvoj maligní hypertenze a zlepšila zhoršené renální funkce u I3C-indukovaných potkanů.

Renální clearancové studie pro stanovení renálních hemodynamických parametrů nám potvrdily výskyt renální vazokonstrikce a zhoršenou autoregulační schopnost PKL a GFR u Cyp1a1-Ren-2 potkanů (Mitchell et al. 2006). c-AUCB léčba snížila arteriální tlak, normalizovala průtok plasmy ledvinou a také zřetelně lépe udržela autoregulaci PKL a GFR při daných RAT a normalizovala utlumenou tlakovou natriurézu u I3C-indukovaných potkanů. Ačkoli při akutní renální studii nebyl žádný signifikantní efekt na glomerulární filtraci, exkrece sodíku byla vyšší u c-AUCB léčených potkanů vystavených působení I3C ve srovnání s neléčenými zvířaty. To dále podporuje názor, že inhibice sEH působí na přímý tubulární transport bez velkého vlivu na filtrované množství sodíku. Pokud tedy předpokládáme inhibici přímého tubulárního transportu sodíku pomocí EETs (Wei et al. 2004), je potom myslitelné tvrdit, že natriuretické účinky v této studii jsou modulovány zvýšenou biologickou dostupností EETs v ledvině během inhibice sEH. Celkově tedy naše

data demonstrují, že sledované renální mechanismy mohou signifikantně přispívat k antihypertenzním účinkům inhibitoru sEH u Cyp1a1-Ren-2 potkanů s indukovanou maligní hypertenzí. Kombinace vazodilatačních a natriuretických mechanismů je pravděpodobně zodpovědná za zlepšení autoregulační schopnosti PKL a GFR a zlepšení tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů.

Zjistili jsme však, že tyto antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické léčby inhibitoru sEH c-AUCB u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů byly kompletně zrušeny doprovodným podáváním I3C a NOS inhibitoru L-NAME i přes signifikantní zvýšení biologické dostupnosti epoxygenázových metabolitů vyjádřené poměrem EETs/DHETs. Naše studie ukazují, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují sníženou intrarenální dostupnost biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů. Při c- AUCB léčbě je intrarenální zvýšení poměru EETs/DHETs, a tím i biologické dostupnosti EETs výrazně vyšší u I3C-indukovaných než neindukovaných potkanů a nebylo vůbec ovlivněno současným podáním L-NAME. Absence antihypertenzních a renoprotektivních účinků u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů léčených současně c-AUCB a L-NAME tedy nemůže být způsobena nedostatkem biologické dostupnosti EETs.

I3C-indukovaní neléčení Cyp1a1-Ren-2 transgenní potkani mají výrazně vyšší hodnoty ve vylučování NOx než neindukovaní neléčení potkani. Tato data tak značí, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují, podobně jako u jiných modelů ANG II dependentní hypertenze, zvýšenou intrarenální aktivitu NOS pro udržení renální hemodynamiky, která působí proti vazokonstrikčnímu účinku zvýšených plasmatických a intrarenálních hodnot ANG II (Kopkan et al. 2007). Podání L-NAME buď samostatně nebo v kombinaci s c-AUCB vedlo k významné redukci ve vylučování NOx u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů. Nedostatek antihypertenzních účinků kombinované c-AUCB a L-NAME léčby u I3C-indukovaných potkanů může být způsoben značnou redukcí endogenní biologické dostupnosti NO. Antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické inhibice sEH pomocí c-AUCB u modelu ANG II dependentní formy maligní hypertenze jsou tedy spíše kriticky závislé na endogenní biologické dostupnosti NO než na přímých účincích zvýšené dostupnosti EETs.

Závěr

Léčba inhibitorem sEH c-AUCB významně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze a zlepšuje zhoršené renální funkce u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Právě renální mechanismy jsou pravděpodobně zodpovědné za antihypertenzní efekt c-AUCB léčby. Snížení krevního tlaku vede ke zmírnění srdeční hypertrofie a intersticiálního poškození tkáně ledvin.

Antihypertenzní účinky inhibitoru sEH jsou u ANG II dependentní formy maligní hypertenze závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a NO, při bloádě tvorby NO pomocí L-NAME nedochází ke snížení tlaku a zlepšení renálních parametrů.

Blokáda sEH je účinná v krátké době i u maligní hypertenze a mohla by tedy představovat jednu z cest vývoje nových antihypertenziv.

Literatura

1. Červenka L, Wang CT & Navar LG. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 274, 1998; F940–945. IF = 3,611
2. Erbanová M, Thumová M, Husková Z, Vaněčková I, Vaňourková Z, Mullins JJ, et al. Impairment of the autoregulation of renal hemodynamics and of the pressure-natriuresis relationship precedes the development of hypertension in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 2009; 27:575–586. IF = 4,085
3. Husková Z, Vaňourková Z, Erbanová M, Thumová M, Opočenský M, Mullins JJ, Kramer HJ, Bürgelová M, Červenka L. Inappropriately high circulating and intrarenal angiotensin II levels during dietary salt loading exacerbate hypertension in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2010 Mar;28(3):495-509. IF = 4,085
4. Hwang SH, Tsai HJ, Liu JY, Morisseau C & Hammock BD. Orally bioavailable potent soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J Med Chem*. 2007 Aug 9;50(16):3825-40. IF = 5,99
5. Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, et al. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 2001; 276:36727–36733. IF = 4,125
6. Kopkan L, Husková Z, Vaňourková Z, Thumová M, Škaroupková P, Červenka L, Majid DS. Superoxide and its interaction with nitric oxide modulates renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2007 Nov;25(11):2257-65. IF = 4,085
7. Kujal P, Čertíková Chábová V, Vernerová Z, Walkovska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Vaňourková Z, Husková Z, Opočenský M, Škaroupková P, Schejbalová S, Kramer HJ, Rakušan D, Malý J, Netuka I, Vaněčková I, Kopkan L, Červenka L. Similar renoprotection after renin-angiotensin-dependent and –independent antihypertensive therapy in 5/6-nephrectomized Ren-2 transgenic rats: are there blood pressure-independent effects? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37: 1159-1169. IF = 2,01
8. Mitchell KD, Bagatell SJ, Miller CS, Mouton CR, Seth DM, Mullins JJ. Genetic clamping of renin gene expression induces hypertension and elevation of intrarenal angiotensin II levels of graded severity in Cyp11a1-Ren2 transgenic rats. *JRAAS* 2006; 7:74–86. IF = 1,396

9. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002 Jan; 82(1):131-85. IF = 27,312
10. Semple SJ, de Wardener HE. Effect of increased renal venous pressure on circulatory autoregulation of isolated dog kidneys. *Circ Res.* 1959; 7: 643-648.
11. Vaňourková Z, Kramer HJ, Husková Z, Vaňečková I, Opočenský M, Chábová VC, Tesař V, Škaroupková P, Thůmová M, Dohnalová M, Mullins JJ & Červenka L. AT1 receptor blockade is superior to conventional triple therapy in protecting against end-organ damage in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *2006 J Hypertens* 2006; 24, 2465–2472. IF = 4,085
12. Wei Y, Lin DH, Kemp R, Yaddanapudi GS, Nasjletti A, Falck JR & Wang WH. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *J Gen Physiol* 124, 2004; 719–727. IF = 4,2
13. Zicha J, Kuneš J, Vranková S, Jendeková L, Dobešová Z, Pintérová M, Pecháňová O. Influence of pertussis toxin pretreatment on the development of L-NAME-induced hypertension. *Physiol Res* 2009; 58:751–755. IF = 1,461

Publikace

1. **Honetschlägerová Z**, Husková Z, Vaňourková Z, Sporková A, Kramer HJ, Hwang SH, Tsai HJ, Hammock BD, Imig JD, Červenka L, Kopkan L. Renal mechanisms contributing to the antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Physiol.* 2011a Jan 1; 589(Pt 1):207-19. IF = 5,037
2. **Honetschlägerová Z**, Sporková A, Kopkan L, Husková Z, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Kujal P, Vernerová Z, Chábová VC, Tesař V, Červenka L. Inhibition of soluble epoxide hydrolase improves the impaired pressure-natriuresis relationship and attenuates the development of hypertension and hypertension-associated end-organ damage in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2011b Aug;29(8):1590-1601. IF = 4,085
3. Kopkan L, Husková Z, Sporková A, Varcabová Š, **Honetschlägerová Z**, Hwang SH, Tsai HJ, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Bürgelová M, Vojtíšková A, Kujal P, Vernerová Z, Červenka L. Soluble epoxide hydrolase inhibition exhibits antihypertensive actions independently of nitric oxide in mice with renovascular hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 2012; 35(6):595-607. IF = 3,104
4. **Honetschlägerová Z**, Kitada K, Husková Z, Sporková A, Kopkan L, Bürgelová M, Varcabová Š, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Kujal P, Vernerová Z, Červenka L. Antihypertensive and renoprotective actions of soluble epoxide hydrolase inhibition in ANG II-dependent malignant hypertension are abolished by pretreatment with L-NAME. *J Hypertens.* 2013 Feb;31(2):321-32. IF = 4,085