

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Barbora Veselá**

Kardioprotektivní úloha epoxyeicosatrienových kyselin v ischemicko-reperfuzním poškození srdce

Cardioprotective role of epoxyeicosatrienoic acids in ischemia-reperfusion injury

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Neckář Jan, PhD.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 5. 2016

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Neckářovi, PhD. za odborné vedení, za ochotu, trpělivost a za cenné rady a užitečné připomínky. Další díky patří všem, kteří mě podporovali.

## **Abstrakt**

Epoxyeikosantrienové kyseliny (EETs), metabolity kyseliny arachidonové, se významným způsobem podílí na funkci kardiovaskulárního systému za fyziologických i patofyziologických stavů. Současný výzkum v oblasti EETs ukazuje, že tyto molekuly mohou významným způsobem snižovat míru akutního ischemicko-reperfuzního poškození srdce. Mohou se však také významně podílet na zotavení srdečního svalu po infarktu myokardu a omezit tak rozvoj postischemického srdečního selhání. Cílem této práce bylo souhrnně představit kardioprotektivní úlohu EETs v ischemicko-reperfuzním poškození srdce a jejich možné mechanismy.

**Klíčová slova:** srdce, ischemie-reperfuze, epoxyeikosantrienové kyseliny

## **Abstract**

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are arachidonic acids metabolites that importantly contribute to vascular and cardiac physiology and pathophysiology. Current research in the field of EETs shows that these molecules can significantly reduce the rate of acute ischemia-reperfusion injury of the heart. However, they can also contribute significantly to the recovery of the heart muscle following myocardial infarction and to reduce the development of post-ischemic heart failure. The project aims to outline the known cardioprotective effect(-s) of EETs on myocardial ischemia/reperfusion injury and their mechanisms.

**Key words:** heart, ischemia-reperfusion, epoxyeicosatrienoic acids

## Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
2. Arachidonová kyselina	9
3. Epoxyeikosantrienové kyseliny	11
3.1. Dělení epoxyeikosantrienových kyselin a jejich degradace	12
4. Ischemie a reperfuze	14
5. Kardioprotekce	15
6. Možnosti léčby pomocí EETs	16
6.1. Preventivní léčba	16
6.1.1. Exogenní podání EETs	16
6.1.2. Exogenní podání inhibitoru sEH	18
6.1.3. Zvýšení koncentrace EETs pomocí inaktivace genu sEH	19
6.1.4. Zvýšení koncentrace EETs pomocí zvýšení exprese CYP 450 epoxygenázy	19
6.1.5. Cytochrom P450 hydroxyláza	19
6.1.6. Mechanismus kardioprotektivního působení EETs	20
6.2. Preventivní léčba u nemocných srdcí	22
6.3. Terapeutická léčba	23
8. Závěr	25
Seznam citované literatury	26

## Seznam použitých zkratk

ATP	Adenosintrifosfát
AUDA	12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanová kyselina inhibitor sEH
AUDA-BE	Butyl-ester 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanové kyseliny inhibitor sEH
c-AUCB	cis-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyclohexyl-oxy]benzoová kyselina – inhibitor sEH
CYP 450	cytochrom P450
DHETs	dihydroxeikosantrienové kyseliny
EETs	epoxyeikosantrienové kyseliny
14,15-EEZE	14,15-epoxyeikosa-5(Z)-enová kyselina – antagonist 14,15-EET
HETEs	hydroxeikosantrienové kyseliny
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
p42/p44 MAPK	p42/p44 mitogen-aktivovaná protein kináza
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
sEH	solubilní epoxid hydroláza
STAT-3	„Signal transducer and activator of transcription 3“ Transkripční faktor
t-AUCB	trans-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyclohexyl-oxy]benzoová kyselina – inhibitor sEH
UA-7	13-(2-(butylamino)-2-oxoacetamido)tridec-8(Z)-enová kyselina analog EETs
UA-8	13-(3-propylureido)tridec-8-enová kyselina – analog EETs

## 1. Úvod

Kardiovaskulární choroby jsou hlavní příčinou úmrtí ve vyspělých státech světa. Toto onemocnění tvoří přibližně 50% všech, kterým lidé v současné době podléhají. Kardiovaskulární choroby patří k vysoce rozšířené hlavně díky špatnému životnímu stylu a zhoršujícímu se životnímu prostředí.

Z epidemiologických studií proto vyplývá, že současný biomedicínský výzkum se musí specializovat na kardiovaskulární choroby, především na ischemickou poruchu srdeční, která je nejčastějším onemocněním v rámci kardiovaskulárních chorob. Vědci hledají způsoby, jak tomuto onemocnění předejít nebo zmenšit jeho následky.

Aktuální výzkum se specializuje na hledání metod, které ochrání srdeční sval před vznikem infarktu myokardu nebo se zaměřuje na to, aby omezil dopad ischemické choroby na funkci srdce. Tyto metody jsou založené na studiu molekulárních mechanismů protekce srdce, neboť právě ty nejsou dosud zcela známy.

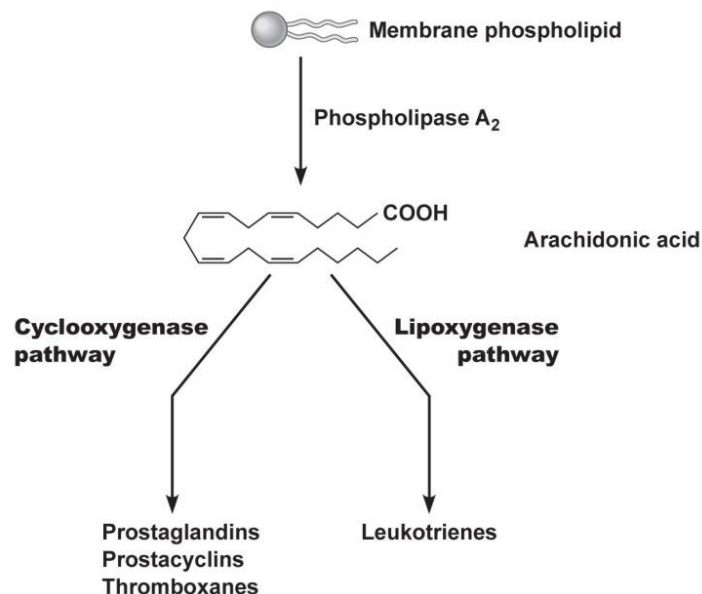
Kardioprotektivní signalizace se účastní velké množství molekul a enzymů. Mezi tyto molekuly také patří arachidonová kyselina, která může být dále metabolizována na epoxyeikosantrienové kyseliny, které mají pozitivní účinky při léčbě kardiovaskulárních chorob. Toto téma se proto stalo předmětem mé bakalářské práce.



## 2. Arachidonová kyselina

Arachidonová kyselina je nenasycená mastná kyselina, která obsahuje 20 uhlíků a čtyři dvojné vazby. Zdrojem pro získání arachidonové kyseliny do organismu je například konzumace podzemnice olejné, ve které se kyselina vyskytuje. Kyselina arachidonová je také v těle syntetizována z linolové kyseliny elongací a tvorbou dvojných vazeb. Není tedy esenciální, pokud je přítomna kyselina linolová, což neplatí u koček, kde je kyselina arachidonová esenciální mastnou kyselinou. Konverze z linoleátu na arachidonát je katalyzována enzymem desaturázou. Arachidonová kyselina je důležitou složkou fosfolipidů, u živočichů je kyselina vázána na alkohol esterově. Tvoří 5-15% mastných kyselin fosfolipidů membrán. Obsahuje 4 cis vazby a to umožňuje řadu různých prostorových uspořádání. Další vlastnosti jsou vysoká ohebnost a tvorba velkého množství prostorových konformací. Tyto vlastnosti mají význam pro polohu a uspořádání mastných kyselin v molekulách fosfolipidů a ovlivňují kvalitu membrán (Murray & Davis 2003).

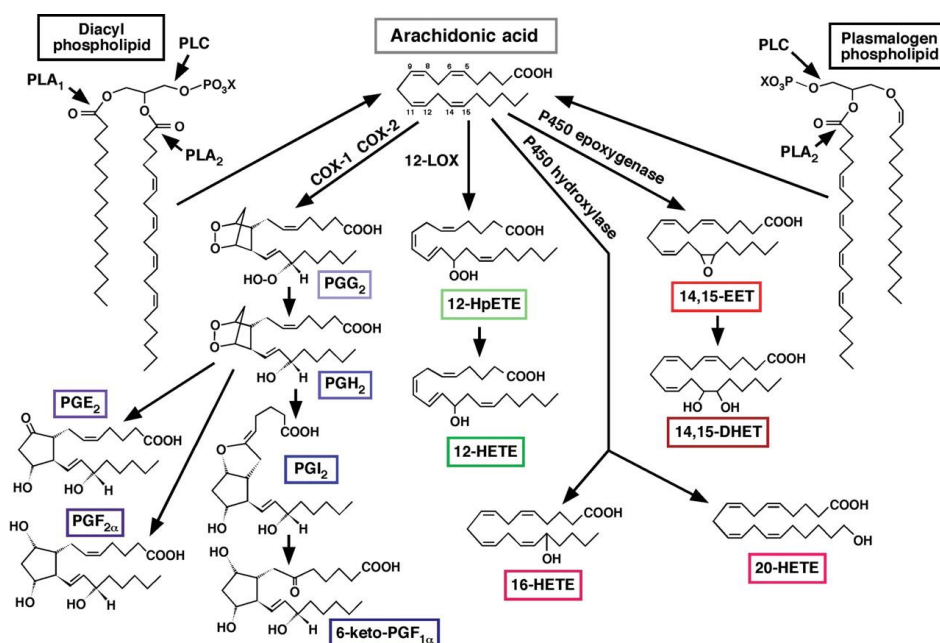
Uvolnění arachidonové kyseliny z fosfolipidů probíhá nejčastěji pomocí enzymu fosfolipázy A<sub>2</sub> (viz. Obr. 1). Jak arachidonová kyselina, tak další nenasycené mastné kyseliny s více dvojnými vazbami, mohou sloužit jako zdroj molekul pro syntézu eikosanoidů. Jak ukazuje Obr. 1 biologicky aktivní eikosanoidy - prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany a další jsou tvořené cyklizující dráhou pomocí enzymu cyklooxygenázy, leukotrieny vznikají linearizující dráhou za pomoci enzymu lipoxygenázy (Murray & Davis 2003). Téměř všechny savčí buňky tvoří



Obrázek 1 – Metabolická dráha vzniku eikosanoidů z arachidonové kyseliny, uvolnění z fosfolipidů až k syntéze prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů a leukotrienů (Stanfield 2013).

z arachidonové kyseliny eikosanoidy. Eikosanoidy fungují při velmi nízkých koncentracích a mají značné fyziologické a biologické účinky. Působí jako lokální mediátory, které jsou biologicky nestálé, rychle se degradují, nejsou tedy přenášeny krevním řečištěm (Voet & Voet 1995).

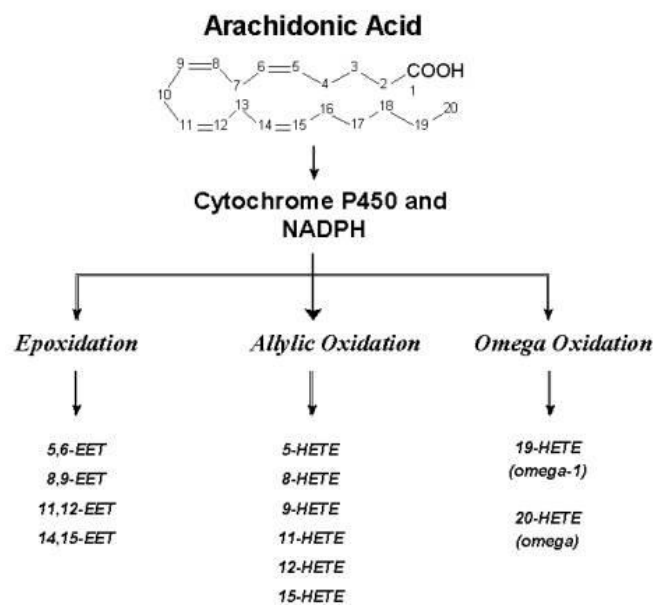
Metabolismus arachidonové kyseliny je závislý na několika faktorech – na typu podnětu, přítomnosti kofaktoru, na typu tkáně a inhibitech. Volná arachidonová kyselina může být metabolizována třemi drahami (viz Obr. 2) První enzym je cyklooxygenáza, druhý lipoxygenáza a třetí cytochrom P450 (CYP 450) monooxygenáza. Enzymy cyklooxygenáza a lipoxygenáza zprostředkovávají reakci kyseliny s kyslíkem, usnadňují odstranění vodíku, pomáhají přeskupení dvojné vazby, inkorporují kyslík do molekuly a tím vznikají nestabilní hydroperoxy mastné kyseliny. Podle místa v molekule arachidonové kyseliny, které je enzymem atakováno, je určen další osud molekuly – z kyseliny se stávají prostaglandiny nebo leukotrieny. Třetí dráha CYP 450 monooxygenáza je závislá na kofaktoru nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH). Tato cesta může probíhat třemi typy reakcí (1) allylová oxidace, která vede k tvorbě hydroxyeikosantrienových kyselin (HETEs), (2) olefin epoxidace tvoří EETs a (3)  $\omega$ -oxidace, která vytvoří 20-HETEs a 19-HETEs (viz Obr. 3). Enzym CYP 450 existuje v mnoha formách a regulace výše uvedených reakcí a přednostní tvorba cílových molekul je ovlivněna typem tkání, izoenzymu nebo buněk (Schwartzman et al. 1985).



Obrázek 2 - Signální dráha arachidonové kyseliny. Výsledkem dráhy jsou prostaglandiny, HETEs, DHETs a EETs. Enzymy účastníci se této dráhy jsou COX, LOX, P450 hydroxyláza a P450 epoxygenáza (Jenkins et al. 2009).

### 3. Epoxyeikosantrienové kyseliny

EETs jsou významné molekuly s biologickou aktivitou. Jsou syntetizovány pomocí CYP 450 epoxygenázy z arachidonové kyseliny. CYP 450 epoxygenáza tvoří několik podskupin. Může napadat dvojnou vazbu arachidonové kyseliny a vytvářet funkční epoxydovou skupinu (Capdevila et al. 1992). CYP 450 epoxygenáza potřebuje ke svému fungování přítomnost koenzymu NADPH (Capdevila et al. 1984). Každá z enzymových podskupin je většinou selektivní a vytváří pouze jeden stereoizomer EET. Předchozí studie ukázaly, že epoxygenáza je multienzymový komplex a její stereoselektivita je kontrolována (Capdevila et al. 1992).



Obrázek 3 – Tři typy reakcí CYP 450 monooxygenázy (Schleihaufer et al. 1998).

EETs jsou metabolicky aktivní molekuly a působí v řadě tkání organismu. Mají celou řadu přínosných účinků (Tacconelli & Patrignani 2014). Jsou to vasoaktivní molekuly, které způsobují dilataci cév (Proctor et al. 1987). Jednou z dalších pozitivních funkcí EETs pro organismus je jejich protizánětlivý účinek. EETs proto mohou sloužit jako vhodná terapie pro léčbu řady zánětlivých onemocnění (Node et al. 1999). Další z unikátních vlastností EETs, která byla dosud objevena je, že slouží v těle jako proangiogenní molekuly a podílejí se na tvorbě nových cév (Pozzi et al. 2005). Z komplexního pohledu EETs působí kladně na celé orgány, nejvíce se účinky zkoumají za patofyziologických situací, jakými jsou mozková mrtvice, při poškození ledvin a v neposlední řadě především při ischemii

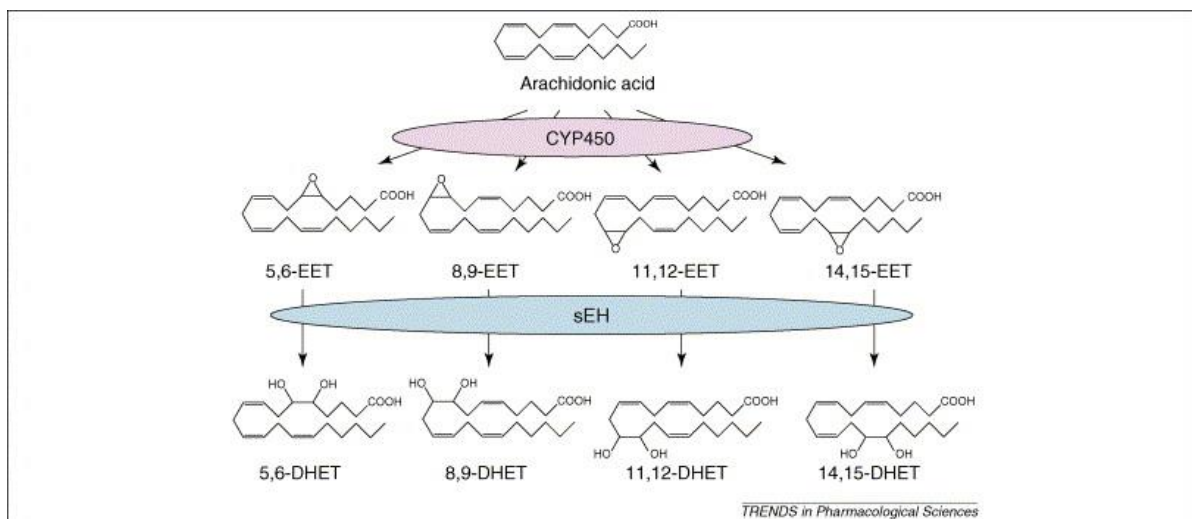
srdečního svalu (Imig 2006). Je však důležité zmínit, že EETs nemají pouze příznivý efekt. Jak bylo také ukázáno, EETs působí na některé signální dráhy, které mohou vést k proliferaci nádorových buněk (Jiang et al. 2005) a podporují invazivitu nádorového bujení a vznik metastáz (Jiang et al. 2007). Tato skutečnost může úzce souviset s jejich proangiogenním působením.

### **3.1. Dělení epoxyeikosantrienových kyselin a jejich degradace**

CYP 450 epoxygenáza syntetizuje 4 regioizomery EETs. Tyto regioizomery jsou 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET a 14,15-EET (Obr. 4). Různé izomery jsou syntetizovány v různých tkáních a působí zde jako aktivní lipidické molekuly. Každý z EETs se pravděpodobně váže na specifický receptor (Fang et al. 1995), nicméně dosud se nepodařilo příslušné receptory identifikovat. Předpokládá se však, že se bude jednat o receptory spřažené s G-proteiny (Imig 2006).

Dnes již víme, že jednotlivé izomery mohou být insertovány do intracelulárních lipidů. Ve většině případů bývají izomery inkorporovány do fosfatidylcholinu více než do ostatních fosfolipidů. Další typy fosfolipidů, kde byly EETs identifikovány jsou například fosfatidylinositol nebo fosfatidylethanolamin (VanRollins et al. 1993).

EETs jsou dále metabolizovány na dihydroxyeikosantrienovou kyselinu (DHETs) pomocí enzymu solubilní epoxid hydrolázy (sEH). Tato reakce slouží k rychlému odstranění EETs na DHETs. Vzniklé DHETs mohou být vyloučeny do extracelulárního prostoru. Přeměna EETs na DHETs je závislá na typu tkáně a její bioaktivitě. Jak již bylo zmíněno, EETs jsou bioaktivní molekuly, přeměnou na DHETs ztrácejí svoji biologickou aktivitu. Přeměna je tedy závislá na tom, jestli EETs jsou v určité tkáni potřebné. Není však zatím vyloučené, že by DHETs nemohly mít nějakou další funkci pro organismus (VanRollins et al. 1993), proto jsou také v zájmu výzkumných týmů.



Obrázek 4 – Metabolická dráha arachidonové kyseliny, přeměna arachidonové kyseliny přes EETs na DHETs pomocí sEH (Larsen et al. 2016).

Další dráhou, kterou jsou EETs metabolizovány je  $\beta$ -oxidace.  $\beta$ -oxidace je proces, kde dochází k postupné oxidaci mastných kyselin, v tomto případě EETs. Tímto procesem buňka získává energii. Oxidace EETs převažuje v peroxisomech. EETs podléhají metabolismu  $\beta$ -oxidace nebo jsou konvertovány na DHETs díky sEH. Rychlý metabolický převrat EETs je způsoben právě těmito dvěma dráhami (Fang et al. 2000).

## 4. Ischemie a reperfuze

Ischemie myokardu je srdeční choroba, která vzniká při uzavření některé z větví koronárních tepen. Častou příčinou vzniku tohoto onemocnění je trombus. Při uzavření některé z větví koronárních tepen se přeruší dodávka kyslíku do srdečního svalu, výrazně se sníží dodávka substrátů a významně se sníží odplavování metabolitů. Díky přerušení dodávky kyslíku se změní metabolismus srdečního svalu z převažujícího aerobního na anaerobní. To vede k velkému snížení tvorby ATP.

Metabolismus ischemického myokardu doprovázejí i další změny. Myocyty nemají dostatek energie, hromadí se v nich ionty a mění se jejich membránový potenciál. Hlavním iontem hromadícím se uvnitř buňky je vápník. Příčinou hromadění je zvýšené vyplavování vápníku ze sarkoplasmatického retikula, selhání sarkolemální vápníkové pumpy závislé na ATP a další příčiny. Díky zvýšení intracelulární koncentrace vápníku se aktivují lysozomální proteázy, zvyšuje se tvorba kyslíkových radikálů a jiné, pro buňku negativní procesy s fatálními důsledky. Draslík se hromadí v extracelulárním prostoru buňky a významně mění velikost membránového potenciálu na plazmatické membráně.

Porucha vápníkové homeostázy, vyčerpání všech energetických zdrojů, hromadění kyslíkových radikálů a poškození buněčných membrán vedou k degradaci srdečních buněk a jejich následné smrti. K zániku dochází dvěma způsoby, energeticky nezávislým procesem nekontrolovatelného autolytického rozkladu nebo řízeným rozkladem organel a makromolekul pomocí proteolytických enzymů (kaspáz a jiných) tzv. apoptózou.

Funkčním důsledkem ischemie je ztráta kontraktility srdečního svalu, poruchy srdečního rytmu a vznik bolesti. V konečném důsledku pak odumření části tkáně myokardu. Ischemie vyvolává řadu patofyziologických změn srdečního svalu, které jsou při včasné zprůchodnění koronární tepny reverzibilní. K ireverzibilnímu poškození dochází po delším trvání ischemie, které je příčinou buněčné smrti. Tato situace vede ke vzniku infarktové jizvy v myokardu.

Obnovení průtoku po ischemii se říká reperfúze. Při reperfúzi po relativně krátké době působení ischemie se myokard vrátí k normální činnosti, pokud však dojde k reperfúzi po delší době ischemie (po vyčerpání energie, akumulace vápníku a kyslíkových radikálů), může dojít k poškození i těch buněk, které by bylo možné zachránit. Za reperfúzní poškození je odpovědné zvýšení produkce kyslíkových radikálů a nekontrolovatelné uvolnění vápníku po obnovení koronárního průtoku postiženou oblastí (Ošťádal & Vízek 2003).

## 5. Kardioprotekce

Choroby srdečního svalu jsou nejzávažnějším a nejčastějším onemocněním současné doby. První místo patří ischemické chorobě srdeční a její následně závažnější formě - infarktu myokardu. Ischemie myokardu je důsledkem nedostatku kyslíku. Poškození srdce je závislé nejen na přítomnosti kyslíku, ale také na kondici srdečního svalu při kyslíkové deprivaci. Odolnost srdce se mění se zvyšujícím se věkem a je také závislá na pohlaví (Ošťádal & Vízek 2003).

Pod pojmem kardioprotekce rozumíme procesy, která vedou k ochraně myokardu a zmenšení nebo prevenci poškození myokardu. Kardioprotekcí je tedy snaha zachránit poškozené kardiomyocyty před buněčnou smrtí, respektive zvýšit jejich odolnost vůči akutnímu ischemicko-reperfuznímu poškození srdce. Existuje celá řada přirozeně se vyskytujících kardioprotektivních proteinů a sekrečních látek, které jsou uvolňovány jako odpověď na stres nebo na srdeční ischemii. Tyto proteiny a molekuly působí na srdeční buňky. Aktivují buněčné signální dráhy nutné pro přežití myokardu, aby zvýšili toleranci na stav bez kyslíku a zmírnily tak důsledky akutního infarktu. Je proto logické, že farmakologická léčiva vyvinutá na základě experimentů analyzujících kardioprotektivní signální dráhy by mohla v budoucnosti významným způsobem omezit kardiovaskulární mortalitu u lidí (Liu et al. 2011).

Jedním z faktorů hrajících roli v kardioprotektivních účincích na srdce mohou být právě EETs. Pochopení molekulárních mechanismů, které mohou za kardioprotektivní účinek, jsou zásadní pro vývoj za účelem zmenšení infarktu myokardu nebo důsledků pramenících z poškození srdce při akutní ischemii/reperfuzi (Liu et al. 2011).

## 6. Možnosti léčby pomocí EETs

Možnosti léčby, které mají za následek zvýšení koncentrace EETs v těle lze rozdělit na dvě – preventivní nebo terapeutické. Léčba preventivní se snaží předejít onemocnění či průběh onemocnění zmírnit. Terapeutickou léčbou rozumíme, že provádíme opatření, která ovlivňují průběh po odeznění akutního onemocnění. Terapeutická léčba se snaží důsledky onemocnění zmírnit a zlepšit funkčnost postiženého orgánu. V případě terapeutické léčby po akutním infarktu myokardu, rozumíme léčbu rozvoje postischemického srdečního selhání.

### 6.1. Preventivní léčba

Při preventivní léčbě byla jako možnost zvýšení koncentrace EETs dosud studováno: 1) exogenní podání EETs, 2) exogenní podání inhibitorů sEH, 3) inaktivace genu sEH, 4) zvýšení exprese genu pro EETs nebo 5) exogenní podání inhibitorů CYP 450 hydroxylázy.

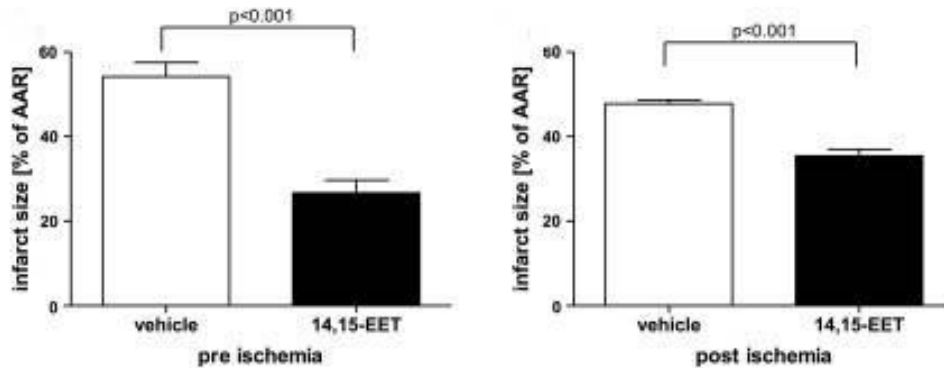
#### 6.1.1. Exogenní podání EETs

Při podání exogenních EETs byly testovány všechny regioizomery EETs na různých zvířecích modelech. Po experimentálním navození ischemie a následné reperfuzi bylo zjištěno, že regioizomer 8,9-EET neměl žádný protektivní vliv na velikost infarktu u laboratorních potkanů na rozdíl od izomerů 11,12-EET a 14,15-EET kde, se výrazně projevilo zmenšení velikosti infarktu po podání před okluzí koronární arterie (Gross et al. 2007). Při akutním ischemicko-reperfuzním poškození srdce dochází k odumírání buněk srdečního svalu. Díky léčbě pomocí 14,15-EET se počet umírajících buněk myší snížil ve studii Merkel et al. (2010). Potvrzením hypotézy, že EETs hrají hlavní úlohu v účinnosti léčby před akutním infarktem myokardu je i ta skutečnost, že pokud použijeme kompetitivní antagonisty EETs 14,15-EEZE zabráníme vazbě EETs na jejich receptor, což má za následek inhibici kardioprotektivního působení EETs. Takto bylo potvrzeno, že EETs jsou metabolicky aktivní molekuly a mohou hrát významnou úlohu v ischemické toleranci srdce (Gross et al. 2007).

Jak již bylo uvedeno výše, exogenní podání EETs před ischemií snižuje velikost infarktu. Pro lepší využití v klinické praxi je samozřejmě přijatelnější léčba, která se provede v průběhu ischemie nebo na začátku reperfuze, jelikož se jen těžko identifikuje, kdy přesně k infarktu dojde. Řada experimentálních studií ukázala, že



podáním EETs před reperfuzí má kardioprotektivní účinek jak u laboratorních myší (viz Obrázek 5) (Motoki et al. 2008), tak u psů (Nithipatikom et al. 2006a).



Obrázek 5 – Redukce infarktu myokardu pomocí exogenních EETs. Graf ukazuje procento velikosti infarktu po léčbě před a po ischemii srdečního svalu (Motoki et al. 2008).

Akutní podání exogenních EETs nese s sebou jednu hlavní nevýhodu pro klinické uplatnění léčby v praxi a to, že EETs jsou velmi rychle metabolizovány (v řádu minut), jsou chemicky i metabolicky labilní a jejich fyziologický účinek je tedy časově omezený (Voet & Voet 1995). Proto byla v současné době chemicky vytvořena řada nových analogů EETs, které mají podobnou strukturu a funkci, nicméně jejich životnost v krevním řečišti je výrazně delší. V některých případech tyto analogy mohou zároveň působit jako inhibitory sEH a tak potencovat protektivní účinek zvýšením endogenních EETs (Falck et al. 2009).

Jak ukázal Batchu et al. (2011) přidání nízké dávky analogu UA-8 (0,1 $\mu$ M) do oběhu srdce laboratorní myši vykazovalo podstatné zlepšení postischemické obnovy srdeční kontraktility. Zlepšení srdečních funkcí po ischemii podáním UA-8 bylo výraznější než u léčby 11,12-EET nebo u transgenních myší, které měly deletovaný gen pro sEH. Podobný kardioprotektivní efekt byl také pozorován u analogu UA-7 o vyšší dávce (1 $\mu$ M). Analogy EETs byly také testovány, jak ovlivní ischemickou odolnost na modelu tkáňové kultury kardiomyocytů, které byly podrobeny 6 hodinové simulované ischemii a 16 hodinové reoxygenaci. Jak ukázaly výsledky této práce, při léčbě analogem byla mnohem menší mortalita buněk, než při léčbě exogenními EETs. Buňky léčené analogem měly sníženou aktivaci kaspázy-3, která je odpovědná za zvýšenou indukci apoptózy na začátku reoxygenace. Analog EETs také omezil pokles mitochondriálního membránového potenciálu po ischemii. Výsledky ukazují, že léčba pomocí EETs respektive EETs analogů by mohla alespoň

částečně zachovat funkci mitochondrií a tím snížit mortalitu srdečních buněk. Tyto výsledky jasně ukázaly, že použití analogu EETs může sloužit jako terapie pro omezení poškození myokardu a mitochondrií v důsledku akutní ischemie/reperfuze.

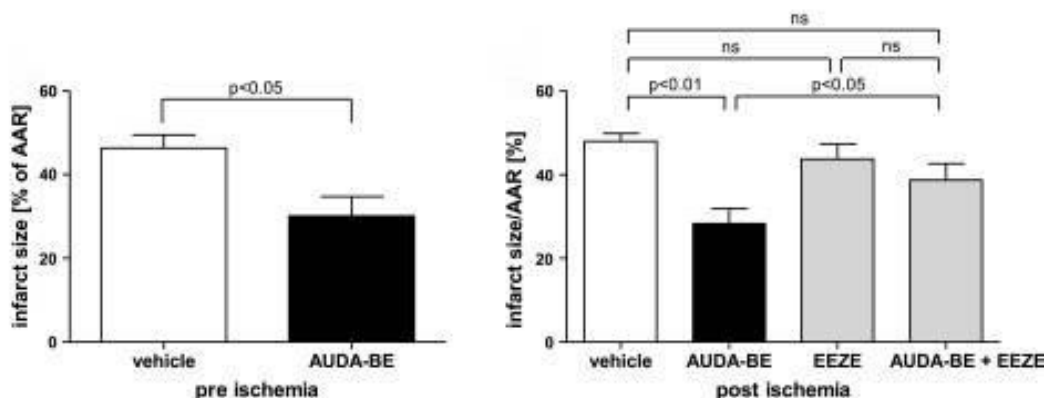
### **6.1.2. Exogenní podání inhibitoru sEH**

Inhibitorů sEH existuje velké množství, v této práci se budu věnovat studiím, které používali látky AUDA, AUDA-BE, c-AUCB a t-AUCB.

Inhibitor sEH blokuje funkci tohoto enzymu a eliminuje tedy degradaci EETs na biologicky málo účinné DHETs. Inhibice sEH má za následek zvýšení koncentrace endogenních EETs. Jak ukázala studie Gross et al. (2008), akutní podání inhibitoru AUDA před okluzí koronární arterie zmenšilo velikost infarktu u psů. Zvýšená ischemická tolerance byla zprostředkována zvýšením koncentrace endogenních EETs. Tato skutečnost byla potvrzena v experimentech, kdy byl přidán do oběhu antagonist 14,15-EETs 14,15-EEZE. V důsledku podání 14,15-EEZE byl kardioprotektivní účinek inhibitoru sEH zablokován. Tento výsledek lze vysvětlit tak, že antagonist selektivně působil na specifický receptor pro EETs a zabránil tak aktivaci protekce. Dále bylo zjištěno, že ve vyšší dávce působí AUDA lépe než v menší a dosahuje přibližně stejně velkého efektu jako při podání vyšší dávky EETs.

Další látka podána před ischemií, která byla použita pro zvýšení obnovy postischemické kontraktility srdečního svalu byl inhibitor t-AUCB. Tento pokus byl prováděn na laboratorních myších. I v tomto případě kardioprotektivní strategie, inhibice sEH, byla potvrzena (Chaudhary et al. 2010). Jak se dále ukázalo, nezáleží, zda je inhibitor sEH (AUDA-BE) podán před nebo na konci ischemie, vždy došlo k navození a zlepšení ischemické tolerance (Obr. 6) (Motoki et al. 2008).

Exogenní podání inhibitoru c-AUCB nemělo velký účinek na snížení velikosti infarktu u laboratorních potkanů (Neckář et al. 2012). Tento negativní výsledek může mít několik důvodů, například nedostačující zvýšení koncentrace EETs natolik, aby byl účinek EETs znatelný. Kardioprotektivní potenciál tohoto inhibitoru byl však prokázán na hypertenzí ovlivněném srdci potkanů (viz kapitola 7).



Obrázek 6 – Snížení relativní velikosti infarktu pomocí inhibitoru sEH AUDA-BE. Graf ukazuje procento velikosti infarktu po podání před (vlevo) a po ischemii (vpravo) (Motoki et al. 2008).

### 6.1.3. Zvýšení koncentrace EETs pomocí inaktivace genu sEH

Jednou z možností, jak dosáhnout zvýšené hladiny EETs, je inaktivace genu pro sEH. Jak bylo prokázáno u myší, jedinci s inaktivním genem pro sEH nedokáží konvertovat EETs na DHETs. Poměr EETs k DHETs je tedy u sEH null transgenních myší vyšší oproti wild type myším. Pokud byly tyto myši podrobeny ischemii/reperfuzi, ukázalo se, že u sEH null je velikost infarktu výrazně menší než u wild type myší v důsledku zvýšené koncentrace endogenních EETs. Tento fakt byl potvrzen v experimentech, při kterých byl myším podán antagonist EETs a kardioprotektivní účinky transgenního fenotypu byly tak anulovány (Seubert et al. 2006, Motoki et al. 2008, Chaudhary et al. 2013).

### 6.1.4. Zvýšení koncentrace EETs pomocí zvýšení exprese CYP 450 epoxygenázy

Zvýšení koncentrace EETs lze také docílit transgenním zvýšením exprese enzymu, který metabolizuje arachidonovou kyselinu na EETs, tj. CYP 450 epoxygenáza. Myši i potkani, které měly zvýšenou expresi CYP 450 epoxygenázy vykazovaly po ischemii a reperfuzi zlepšení zotavení funkce levé komory srdeční (Seubert et al. 2004, Chaudhary et al. 2013).

### 6.1.5. Cytochrom P450 hydroxyláza

Cytochrom P450 hydroxyláza hraje také významnou roli v ischemické toleranci srdce a kardioprotektivním působení EETs. CYP 450 hydroxyláza metabolizuje EETs a přeměňuje je na HETEs. Jak bylo prokázáno, HETEs, na rozdíl

od EETs, významným způsobem zvyšují míru ischemického poškození srdce. Blokací CYP 450 hydroxylázy lze snížit koncentraci HETEs i velikost infarktu myokardu. HETEs mají tedy negativní vliv na zotavení srdce po ischemii/reperfuzi. Exogenním podáním 20-HETE do koronárního oběhu se zřetelně zvýšila velikost infarktu u psů. Zdá se tedy, že preference epoxygenázové dráhy před hydroxylázovou je klíčová pro výsledný protektivní účinek enzymů CYP 450 (Nithipatikom et al. 2006b).

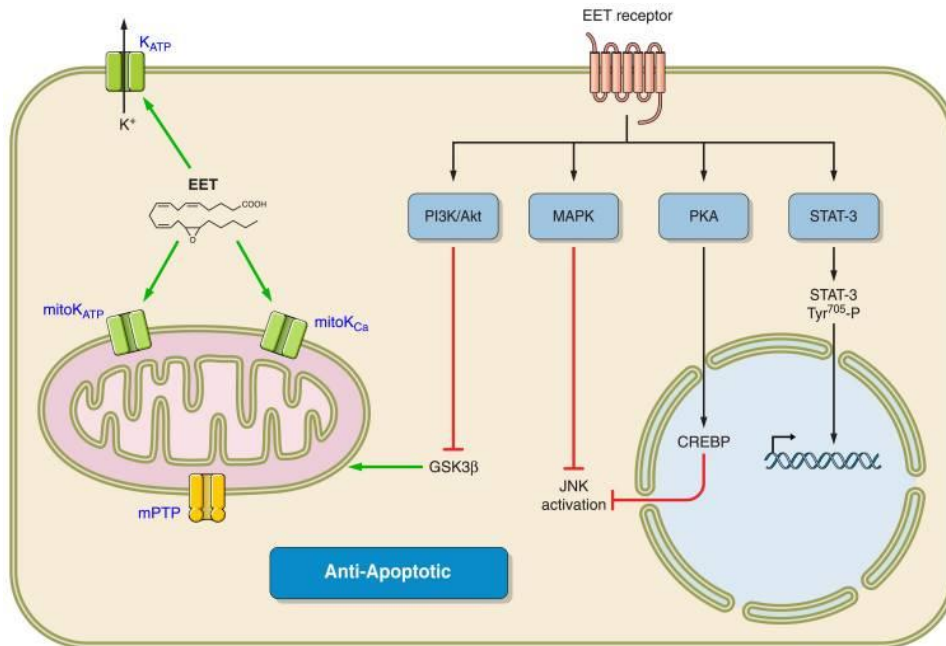
### **6.1.6. Mechanismus kardioprotektivního působení EETs**

Kardioprotektivní účinky EETs jsou zprostředkovány několika signálními dráhami. EETs aktivují tyto signální dráhy a tím regulují velké spektrum buněčných procesů, které podporují adaptivní změny v srdečním svalu za patofyziologických stavů (Imig 2012).

Jednou z důležitých signálních drah při vzniku ischemie je dráha vedoucí k otevření na ATP závislý draslíkový kanál ( $K_{ATP}$ ). Jak mitochondriální, tak sarkolemální  $K_{ATP}$  kanály hrají roli při poškození srdce, jak bylo prokázáno v průběhu posledních několika let. Vědecké výzkumy potvrdili, že EETs mají pozitivní účinek na aktivaci obou forem  $K_{ATP}$  kanálů. Akutní podání inhibitorů  $K_{ATP}$  kanálu inhibovalo kardioprotektivní působení EETs (Gross et al. 2007, Seubert et al. 2004).

Kardioprotektivní signalizace EETs je také spojená s fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3K). Jak bylo zjištěno v přítomnosti EETs se zvýšilo množství fosforylovaných metabolitů kinázy. Pokud byl přidán do oběhu myši neselektivní inhibitor PI3K wortmannin, inhiboval zlepšenou postischemickou obnovu kontraktilních funkcí srdce navozenou EETs (Batchu et al. 2011, Seubert et al. 2006).

Zlepšení regenerace funkce srdce zahrnuje další signální dráha - p42/p44 MAPK. Potvrzeno to bylo tím, že po přidání inhibitorů MAPK dráhy byla léčba EETs inhibována (Seubert et al. 2004). Další pokusy také potvrdily, že kardioprotekce EETs je z části zprostředkována STAT-3 signální drahou (Merkel et al. 2010).



Obrázek 7 – Signální dráhy EETs kardioprotekce a protekce před ischemickým poškozením (Imig 2012).

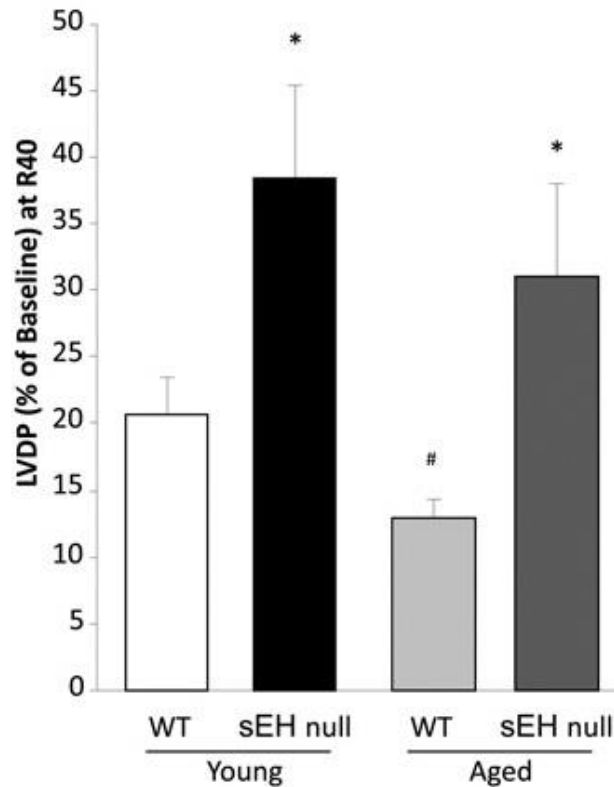
Všechny tyto dráhy mají jako jednu z funkcí zabránit umírání srdečních buněk. Kardioprotekce EETs by mohla být zprostředkována pomocí těchto signálních drah. EETs a tyto signální dráhy také vedou ke změnám v mitochondriích, které redukuje apoptózu srdečních buněk, která je spojená s ischemicko-reperfuzním poškozením (Obr. 7) (Imig 2012).

## 6.2. Preventivní léčba u nemocných srdcí

Jednou ze studií, zabývajících se touto otázkou, analyzovala ischemickou toleranci srdce u hypertenzních potkanů, kterým byl do jejich genomu vložen myší gen pro renin. Jednalo se tedy o angiotensin II. dependentní formu hypertenze. Pro léčbu pomocí EETs byl použit inhibitor sEH c-AUCB. Pětidenní podávání c-AUCB radikálně snížil systolický krevní tlak u hypertenzních jedinců. U léčených transgenních potkanů byl rozdíl v poměru srdečních EETs a DHETs mnohem větší. Potvrzuje to tedy teorii, že inhibitor sEH zabránil degradaci EETs. U srdcí hypertenzního potkana léčba dále snížila levostranný systolický tlak a maximální rychlost srdeční kontrakce. Tato léčba dále ukázala tendenci ke snížení parametrů hypertrofie levé komory (Neckář et al. 2012).

Dalším z příkladu nemocného srdce může být myokard diabetika. V pokusech Yousif et al. (2009) bylo prokázáno, že inhibitory CYP hydroxylázy a inhibitory sEH mohou pomoci při léčbě akutního infarktu myokardu u diabetických srdcí potkanů. Po inhibici CYP hydroxylázy se zlepšila funkce srdečního svalu. Tato skutečnost naznačuje, že zvýšená produkce HETEs u diabetických jedinců podporuje a přispívá ke zvýšenému poškození srdce v důsledku ischemie.

Třetím příkladem může být stárnoucí srdce. Ve studii Chaudhary et al. (2013) bylo srdce starších myší ovlivněno zvýšenou expresí CYP 450 epoxygenázy nebo delecí genu pro sEH. Jak ukázaly výsledky této studie, v reperfuzi se zlepšila funkčnost levé komory u sEH null jak u mladých tak starých myší (viz. Obr. 8). Zlepšená obnova kontraktility levé komory se u jedinců se zvýšenou expresí CYP 450 epoxygenázy neprokázala nicméně po přidání inhibitoru sEH do oběhu k transgenním starým myším funkci levé komory zlepšila. Další pokusy ukázaly, že tyto rozdíly, kdy u starých transgenních myší léčba se zvýšenou expresí CYP 450 epoxygenázy nefunguje, nejsou způsobeny zvýšenou expresí sEH u starších myší, ale tento rozdíl je způsobený tím, že čím starší myš tím větší oxidační stres, tím více dihydro-metabolitů vytvořených enzymem sEH a snížená funkce protein fosfatázy. Tyto rozdíly se u inaktivace sEH genu eliminují.



Obrázek 8 – Obnova postischemické kontraktlní funkce v levé komoře po 40 minutách reperfúze u mladých transgenních a netransgenních myší a starých transgenních a netransgenních myší, LVDP slouží jako marker pro zlepšení kontraktlní funkce srdečního myokardu (Chaudhary et al. 2013).

Diabetes a vysoký krevní tlak jsou jednou z nejčastějších onemocnění současné doby a rizikovými faktory ischemické choroby srdeční. Jak uvedené studie potvrzují, léčba pomocí EETs u nemocných srdcí se zdá velmi perspektivní. Stářím náš organismus slábne a ztrácí svoji funkčnost, avšak EETs se i v tomto směru ověřily jako nadějně léčivo.

### 6.3. Terapeutická léčba

Pro terapeutickou léčbu postischemického rozvoje srdečního selhání založenou na EETs byly dosud využívány pouze inhibitory sEH. Jako látky inhibující sEH byly testovány AUDA, GSK, TPPU a t-AUCB.

Inhibitor sEH AUDA byl podáván ve studii Merabet et al. (2012) a analyzoval rozvoj srdečního selhání, pokud byla léčba zahájena 42 dní po akutní ischemii srdečního svalu, měření proběhlo až 50. den po infarktu. Zvýšení dostupnosti EETs prokázalo jejich léčebný účinek. Zlepšila se celková funkce srdce, vylepšila kontraktilita srdečního svalu a perfuze srdce.

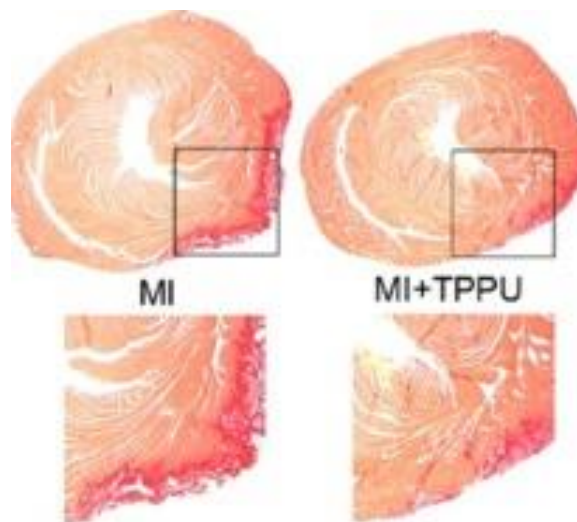
Další ze studií využívala inhibitor GSK, který byl podáván potkanům hned po akutní ischemické chorobě srdeční po dobu pěti týdnů. Inhibice sEH a následné

snížení degradace EETs prokázala anti-remodelační účinek. Po léčbě inhibitorem se zlepšila funkce levé komory, v srdečních fibroblastech se snížila produkce kolagenu, nedošlo tedy ke vzniku tak rozsáhlé srdeční fibrózy. Dalším efektem zvýšené hladiny EETs v post-ischemickém srdci byla snížená tvorba zánětlivých faktorů a exprese genů stimulující hypertrofii srdečního svalu (Kompa et al. 2013).

Sirish et al. (2013) svým výzkumem potvrdil předešlou studii. Pro tuto studii byly zvoleny jiné podmínky než pro předešlé. Pokusnými zvířaty byly myši a doba podávání inhibitoru TPPU byla tři týdny. Po podání léčebné látky se zlepšila funkčnost srdce, kontraktilita srdečního svalu a došlo k zamezení nepříznivé remodelace srdce po infarktu myokardu. Zmenšení velikosti jizvy po srdeční ischemii bylo jedním z efektů EETs, která předchozí studie neuváděly (Obr. 9).

Konečně v práci Li et al. (2009) byl použit inhibitor t-AUCB, který byl podáván laboratorním myším po infarktu myokardu po dobu tří týdnů. Díky inhibici sEH se u léčené skupiny zvýšil poměr EETs k DHETs v porovnání s neléčenou. V této studii se také potvrdilo, že inhibice sEH má za následek zlepšení kontraktility srdečního svalu, došlo ke zmenšení velikosti infarktu, snížila se produkce zánětlivých faktorů a předešlo se rozvoji srdeční hypertrofie.

Z uvedených studií můžeme předpokládat, že léčba infarktu myokardu pomocí EETs je vhodná a účinná. Díky inhibici enzymu sEH a následnému zvýšení koncentrace EETs se dá předcházet rozvoji srdečního selhání po infarktu myokardu.



Obrázek 9 – Znázornění velikosti infarktové jizvy před a po léčbě inhibitorem sEH TPPU (Sirish et al. 2013).



## 8. Závěr

Ve studiích proběhlých v nedávných letech byly jasně potvrzeny kardioprotektivní působení EETs, a to jak u zdravých tak nemocných jedinců. Protektivní účinky byly prokázány po podání exogenních EETs, po preventivním i terapeutickým zvýšením koncentrace EETs pomocí inhibitorů sEH nebo zvýšením endogenních EETs na řadě transgenních modelů.

Kardioprotektivní účinky EETs byly testovány před i po zahájení ischemie. Jelikož v běžném životě nemůžeme předvídat, kdy dojde k přerušení dodávky kyslíku do srdce, jsou výsledky při podání na začátku reperfuze důležité a velmi nadějně pro biomedicínský výzkum zabývající se akutní léčbou ischemické choroby srdeční.

Účinky EETs byly také zkoumány až po proběhlé ischemii srdečního svalů (terapeutické podání). Inhibitory sEH byly podávány jako léčebné látky po různé dlouhou dobu od infarktu myokardu a ukázaly svůj protektivní potenciál. Protektivní efekt EETs by se tedy dal využít jak pro léčbu akutního infarktu myokardu, tak pro léčbu rozvoje srdečního selhání po infarktu myokardu.

Výsledky provedených výzkumů naznačují, že EETs jsou nadějnou možností pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Bohužel zvýšení koncentrace EETs může mít i vedlejší účinky, například proliferaci nádorových buněk a tvorbu metastází. Aby se předešlo těmto nežádoucím vedlejším účinkům, je třeba znát velmi podrobně molekulární mechanismy působení EETs nejen na srdce, ale i na další orgány a tkáně. Po podrobnějším prozkoumání těchto mechanismů by se mohly stát EETs a inhibitory jejich degradačních drah budoucností pro léčbu různých onemocnění srdce a cév.

## Seznam citované literatury

- Batchu, S.N. et al., 2011.** Cardioprotective effect of a dual acting epoxyeicosatrienoic acid analogue towards ischaemia reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 162(4), s.897–907.
- Capdevila, J., Snijder, G.D. & Falck, J.R., 1984.** Epoxygenation of arachidonic acid by rat anterior pituitary microsomal fractions. *FEBS Letters*, 178(2), s.319–322.
- Capdevila, J.H., Falck, J.R. & Estabrook, R.W., 1992.** Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(2), s.731–736.
- Falck, J.R. et al., 2009.** 14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic acid (14,15-EET) surrogates containing epoxide bioisosteres: Influence upon vascular relaxation and soluble epoxide hydrolase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(16), s.5069–5075.
- Fang, X. et al., 2000.** Conversion of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to chain-shortened epoxy fatty acids by human skin fibroblasts. *Journal of Lipid Research*, 41(1), s.66–74.
- Fang, X. et al., 1995.** Epoxyeicosatrienoic acid metabolism in arterial smooth muscle cells. *J Lipid Res*, 36(6), s.1236–1246.
- Gross, G.J. et al., 2008.** Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294, s.H2838–H2844.
- Gross, G.J. et al., 2007.** Mechanisms by which epoxyeicosatrienoic acids (EETs) elicit cardioprotection in rat hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(3), s.687–691.
- Chaudhary, K.R. et al., 2013.** Epoxyeicosatrienoic Acids Improve Postischemic Functional Recovery of Heart in Aged Mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, s.8–17.
- Chaudhary, K.R. et al., 2010.** Inhibition of soluble epoxide hydrolase by trans-4- [4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid is protective against ischemia-reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 55(1), s.67–73.

- Imig, J.D., 2006.** Cardiovascular therapeutic aspects of soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Cardiovascular Drug Reviews*, 24(2), s.169–188.
- Imig, J.D., 2012.** Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiological reviews*, 92(1), s.101–30.
- Jenkins, C.M., Cedars, A. & Gross, R.W., 2009.** Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovascular Research*, 82(2), s.240–249.
- Jiang, J.G. et al., 2005.** Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Research*, 65(11), s.4707–4715.
- Jiang, J.G. et al., 2007.** Cytochrome P450 epoxygenase promotes human cancer metastasis. *Cancer Research*, 67(14), s.6665–6674.
- Kompa, A.R. et al., 2013.** Soluble epoxide hydrolase inhibition exerts beneficial anti-remodeling actions post-myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 167(1), s.210–219.
- Larsen, B.T., Campbell, W.B. & Gutterman, D.D., 2016.** Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(1), s.32–38.
- Li, N. et al., 2009.** Beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in myocardial infarction model: Insight gained using metabolomic approaches. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(6), s.835–845.
- Liu, S.Q. et al., 2011.** Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia. *Molecular & cellular biomechanics : MCB*, 8(4), s.319–38.
- Merabet, N. et al., 2012.** Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(3), s.660–666.
- Merkel, M.J. et al., 2010.** Inhibition of soluble epoxide hydrolase preserves cardiomyocytes: role of STAT3 signaling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 298(2), s.H679–H687.
- Motoki, A. et al., 2008.** Soluble epoxide hydrolase inhibition and gene deletion are protective against myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:, 5(295), s.2128–2134.
- Murray, R.K. & Davis, J.C., 2003.** *Harper 's Illustrated Biochemistry*,
- Neckář, J. et al., 2012.** Inhibition of soluble epoxide hydrolase by cis-4-[4-(3-

- adamantan-1-ylureido)cyclohexyl-oxy]benzoic acid exhibits antihypertensive and cardioprotective actions in transgenic rats with angiotensin II-dependent hypertension. *Clin Sci (Lond)*, 122(11), s.513–525.
- Nithipatikom, K., Endsley, M.P., et al., 2006.** Effects of selective inhibition of cytochrome P -450 -hydroxylases and ischemic preconditioning in myocardial protection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 53226, s.500–505.
- Nithipatikom, K., Moore, J.M., et al., 2006.** Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: ischemic versus reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(2), s.H537–42.
- Node, K. et al., 1999.** Anti-inflammatory Properties of Derived Eicosanoids. *Science*, 285(August), s.1276–1280.
- Ošťádal, B. & Vízek, M., 2003.** *Patologická fyziologie srdce a cév*,
- Pozzi, A. et al., 2005.** Characterization of 5,6- and 8,9-epoxyeicosatrienoic acids (5,6- and 8,9-EET) as potent in vivo angiogenic lipids. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), s.27138–27146.
- Proctor, K.G., Falck, J.R. & Capdevila, J., 1987.** Intestinal vasodilation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P450 monooxygenase. *Circulation research*, 60(1), s.50–9.
- Seubert, J. et al., 2004.** Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circulation Research*, 95(5), s.506–514.
- Seubert, J.M. et al., 2006.** Role of soluble epoxide hydrolase in postischemic recovery of heart contractile function. *Circulation Research*, 99(4), s.442–450.
- Schleihauf, E., Prior, T. & Rangachari, P.K., 1998.** Cytochrome P450 metabolites of Arachidonic acid: potential roles in intestinal ion transport.
- Schwartzman, M. et al., 1985.** Renal arachidonic acid metabolism. The third pathway. *Hypertension*, 7(3 Pt 2), s.I136–I144.
- Sirish, P. et al., 2013.** Unique mechanistic insights into the beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in the prevention of cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14), s.5618–23.
- Stanfield, C.L., 2013.** *Principles of Human Physiology*,
- Tacconelli, S. & Patrignani, P., 2014.** Inside epoxyeicosatrienoic acids and

cardiovascular disease. *Frontiers in Pharmacology*, 5(NOV), s.1–6.

**VanRollins, M. et al., 1993.** 14,15-Epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. , 91(341), s.1931–1942.

**Voet, D. & Voet, J.G., 1995.** *Biochemie*,

**Yousif, M.H.M., Benter, I.F. & Roman, R.J., 2009.** Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid play a role in the enhanced cardiac dysfunction in diabetic rats following ischaemic reperfusion injury. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, 29(1-2), s.33–41.