

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University in Prague
Faculty of Science**



Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

**Nové přístupy k ochraně srdce
před postischemickým selháním**

**Novel approaches to protect the heart
against postischemic failure**

Mgr. Jaroslav Hrdlička

Praha

2021

„I am a fish.“

Arnold Judas Rimmer, BSc. SSc.

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program:	Fyziologie živočichů
Předseda oborové rady:	doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Školící pracoviště:	Fyziologický ústav AV ČR
Autor:	Mgr. Jaroslav Hrdlička
Školitel:	Ing. František Papoušek, CSc.
Školitel konzultant:	doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D

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

*Charles University in Prague
and Czech Academy of Sciences*

Study Program:	Animal Physiology
President of Subject Area Board:	doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.
Training center:	Institute of Physiology CAS v. v. i.
Author:	Mgr. Jaroslav Hrdlička
Supervisor:	Ing. František Papoušek, CSc.
Consultant Supervisor:	doc. RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D

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

Obsah / Content

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratek / List of Abbreviations	7
Česká část	
1. Úvod	8
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metodika	9
4. Výsledky	10
5. Diskuse	16
6. Závěr	19
English Part	
1. Introduction	20
2. Aims of the Thesis	20
3. Material and Methods	21
4. Results	22
5. Discussion	28
6. Conclusions	31
7. Použitá literatura / References	32
8. Publikace pro disertační práci / List of Publications for the Ph.D. Thesis	35

Abstrakt

Ischemická choroba srdeční a následné srdeční selhání patří k nejzávažnějším příčinám úmrtí v rozvinutých zemích. Zlepšení klinického obrazu pacientů s infarktem myokardu a úspěšná prevence postischemického srdečního selhání vyžaduje použití nových léčebných postupů, které by ochránily srdce před zhoubnými důsledky ischemického poškození. Přenos experimentálních kardioprotektivních postupů do klinické praxe zatím není úspěšný; přetrvává proto potřeba hledat nové efektivní strategie pro prevenci a léčbu srdeční ischemie.

V naší práci jsme se proto pokusili vyzkoušet nové protektivní postupy, s cílem ochránit myokard před postischemickým srdečním selháním, vyvolaným u laboratorních potkanů podvazem koronární arterie. Sledovali jsme preventivní a terapeutický vliv adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH, 12 % O₂), preventivní a terapeutický vliv fyzické zátěže (běhací pás) a vliv farmakologického ovlivnění hladiny epoxyeikosatrienových kyselin (EET) na průběh postischemického srdečního selhání. U prvních dvou přístupů byly již dříve prokázány kardioprotektivní účinky při akutním ischemicko/reperfučním poškození, projevující se zmenšením rozsahu infarktu myokardu. EETs jsou známé pro své antihypertenzní účinky, a zdají se proto vhodné pro výzkum klinicky relevantních modelů kardioprotekce u hypertenzních zvířat.

Naše výsledky ukázaly, že:

- Preventivní adaptace na CNH měla významný antiarytmický efekt, což vedlo ke zlepšenému přežívání; srdeční funkce v průběhu postischemického srdečního selhání však ovlivněna nebyla. Kardioprotektivní vliv preventivní adaptace na fyzickou zátěž se v našem experimentálním uspořádání prokázat nepodařilo.
- Terapeutická adaptace na CNH zpomalila průběh postischemického srdečního selhání a zlepšila srdeční funkci. Obdobně jako u preventivní adaptace jsme nepozorovali ani u terapeutické adaptace na fyzickou zátěž kardioprotektivní vliv na postischemické srdeční selhání.
- Preventivní podávání EET-B (analog EET) mělo významný antiarytmický efekt, což vedlo ke zlepšenému přežívání spontánně hypertenzních potkanů; zlepšilo rovněž postischemickou funkci srdce.
- Současné terapeutické podání EET-A (analog EET) a *c*-AUCB (inhibitor solubilní epoxid hydrolázy) zlepšilo funkci levé komory u normotenzních potkanů kmene Hannover Sprague-Dawley s postischemickým srdečním selháním. Samostatné podávání těchto látek kardioprotektivní efekt nemělo. Terapeutické podání EET-A a *c*-AUCB nemělo vliv na postischemické srdeční selhání u transgenního kmene potkanů s angiotenzin II dependentní hypertenzí.

Naše výsledky ukazují, že mechanismy, které zvyšují odolnost srdečního svalu k akutní ischemii, mohou protektivně ovlivnit rovněž jeho postischemickou funkci a remodelaci.

Abstract

Ischemic heart disease and resulting heart failure (HF) belong to the leading causes of death in developed countries. In order to prevent HF and improve clinical outcome in patients with myocardial infarction, novel therapies are required to protect the heart against the detrimental effect of ischemic injury. Due to the failure to translate numerous available experimental cardioprotective strategies into clinical practice, the need for novel protective treatments persists.

We have, therefore, tried to apply a novel approach to cardiac protection against the postischemic HF induced in rats by ligation of the coronary artery. For this purpose, we have studied (i) the preventive and therapeutic effects of adaptation to continuous normobaric hypoxia (CNH; 12% O₂) and exercise training (ExT; treadmill running), and (ii) the possible cardioprotective potential of epoxyeicosatrienoic acid (EET)-based therapy in order to attenuate the postischemic HF in rats. Adaptation to CNH and ExT is known for their cardioprotection in acute ischemia/reperfusion (I/R) injury manifested as reduction of infarct size. EETs exert antihypertensive effects and thus seem to be perspective for the research in clinically relevant models of cardioprotection in hypertensive animals.

Our results have revealed that:

- CNH prior to the I/R insult improved survival but did not affect cardiac function in postischemic HF in Wistar rats. ExT prior to the I/R insult had no significant effect on cardiac function in postischemic HF in our experimental setup.
- Therapeutic adaptation to CNH attenuated the progression of postischemic HF in Wistar rats. On the other hand, therapeutic ExT did not affect the postischemic HF.
- Preventive EET-B (EET analogue) treatment led to the increased survival in spontaneously hypertensive rats subjected to I/R insult and improved cardiac function in postischemic HF.
- Therapeutic administration of EET-A (EET analogue) combined with *c*-AUCB (inhibitor of soluble epoxide hydrolase) improved cardiac function in normotensive HanSD rats with postischemic HF. Single therapies did not provide a cardioprotective effect in normotensive HanSD rats. Postischemic HF was not affected by the therapeutic administration of either EET-A or *c*-AUCB treatment in hypertensive TGR.

Based on our results, we can conclude that protective mechanisms leading to increased cardiac tolerance to acute ischemia could play an important role also in postischemic cardiac remodelling and function.

Seznam zkratk / List of Abbreviations

c-AUCB	inhibitor solubilní epoxid hydrolázy / inhibitor of soluble epoxide hydrolase
CNH	kontinuální normobarická hypoxie / continuous normobaric hypoxia
EET	epoxyeikosatrienová kyselina / epoxyeicosatrenoic acid
EET-A	analog EET / EET analogue
EET-B	analog EET / EET analogue
ExT	zvýšená fyzická zátěž / exercise training
FS	frakční zkrácení / fractional shortening
HanSD	Hannover Sprague-Dawley
HF	srdeční selhání / heart failure
I/R	ischemie/reperfúze / ischemia/reperfusion
LV	levá komora / left ventricle
LVD _d	end-diastolický rozměr levé komory / end-diastolic diameter of left ventricle
MI	infarkt myokardu / myocardial infarction
sEH	solubilní epoxid hydroláza / soluble epoxide hydrolase
SEM	střední chyba průměru / standard error of the mean
SHR	spontánně hypertenzní potkan / spontaneously hypertensive rat
TGR	Ren 2 transgenický potkan / Ren 2 transgenic rat

1. Úvod

Přes neúspěšnou snahu o nalezení efektivní klinické kardioprotektivní terapie v posledních 50 letech nelze pochybovat o tom, že hlavním cíle zůstává ischemicko/reperfuzní poškození myokardu. Přetrvává tedy potřeba zmírňovat škodlivé účinky akutního ischemického poškození myokardu, předcházet následné remodelaci levé komory a tlumit rozvoj srdečního selhání.

Různé kardioprotektivní strategie mají antiapoptotický a protizánětlivý efekt. Tyto dva mechanismy hrají klíčovou roli v postischemické remodelaci srdce a vybrané kardioprotektivní přístupy tedy mají potenciál předcházet rozvoji postischemického srdečního selhání a zmírňovat jeho průběh. Vliv takových kardioprotektivních přístupů na rozvoj srdečního selhání přitom často není známý. Tato disertační práce se věnuje několika z nich, konkrétně adaptaci na kontinuální normobarickou hypoxii (CNH), zvýšenou fyzickou zátěž (ExT) a léčbě založené na zvyšování tkáňové hladiny epoxyeikosatrienových kyselin (EET). Terapie založené na EET jsou přitom často spojeny s antihypertenzním efektem u různých experimentálních modelů a mohly by proto být využity ke studiu klinicky relevantních kombinace kardiovaskulárních chorob u hypertenzních zvířat.

Tato práce se pokouší přispět k identifikaci nových strategií efektivní prevence a léčby postischemického srdečního selhání.

2. Cíle práce

Specifické cíle práce byly:

1. Zjistit vliv kontinuální normobarické hypoxie a zvýšené fyzické zátěže před ischemicko/reperfuzním poškozením na postischemické srdeční selhání u potkanů.
2. Zjistit terapeutický vliv adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii a zvýšenou fyzickou zátěž na postischemické srdeční selhání u potkanů.
3. Zjistit vliv analogu epoxyeikosatrienové kyseliny EET-B na postischemické srdeční selhání u spontánně hypertenzních potkanů.
4. Zjistit vliv analogu epoxyeikosatrienové kyseliny EET-A a inhibitoru solubilní epoxid hydrolázy *c*-AUCB na postischemické srdeční selhání u normotenzních a Ren 2 transgenních potkanů s angiotenzin II dependentní hypertenzí.

3. Materiál a metodika

Experimentální protokol kontinuální normobarické hypoxie

Potkani Wistar byli vystaveni kontinuální normobarické hypoxii (CNH; frakce O₂ 0,12) v normobarické komoře. Tato adaptace trvala po dobu 3 týdnů před ischemickým zásahem (CNH + MI), nebo 3 týdnů po 7 dnech od ischemie (MI + CNH).

Experimentální protokol zvýšené fyzické zátěže

Potkani Wistar byli vystaveni zvýšené fyzické zátěži (nuceným běháním na běhacím pásu) po dobu 2 týdnů před ischemií (ExT + MI). Během prvních 5 dnů byla intenzita zátěže postupně zvyšována a po dvoudenním odpočinku pokračoval pětidenní protokol fyzické zátěže (30 m/min, 60 min/den, sklon 0°) a další dva dny odpočinku pře ischemickým zásahem. Terapeutický protokol (MI + ExT) byl zahájen 7 dní po ischemii a po týdenní habituaci (5+2 dny) pokračoval další dva týdny v plné intenzitě (15 m/min, 60 min/den, 5 dní/týden).

Experimentální protokol ovlivnění hladiny epoxyeikosatrienových kyselin

Spontánně hypertenzním potkanům (SHR) byl podáván analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET) (EET-B; 10 mg/kg/den, p.o.) po dobu 2 týdnů před a 7 týdnů po ischemii. Kontrolní skupině bylo podáváno vehikulum (0,05% ethanol a 0,10% polyethylene glycol 400). Potkanům Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a Ren-2 transgenním potkanům (TGR) byl podáván analog EET (EET-A; 10 mg/kg/den, p.o.), inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEH) (*c*-AUCB; 1 mg/kg/den, p.o.) a jejich kombinace ve vodném roztoku. Podávání bylo zahájeno 24 hodin po ischemii a trvalo 5 týdnů.

Model postischemického srdečního selhání

Anestetizovaní potkani (pentobarbital sodný, 60 mg/kg, i.p.) byli intubováni a ventilováni (68 dechů/min, ventilační objem 1,2 ml/100 g). Rektální teplota byla udržována mezi 36,5°C a 37,5°C. Při levostranné thorakotomii byla provedena 60 minutová okluze levé sestupné větve koronární arterie (30 minutová u SHR). Následně byla operační rána zašita, zvířatům byla podána analgetika a jejich stav byl monitorován do celkového probuzení.

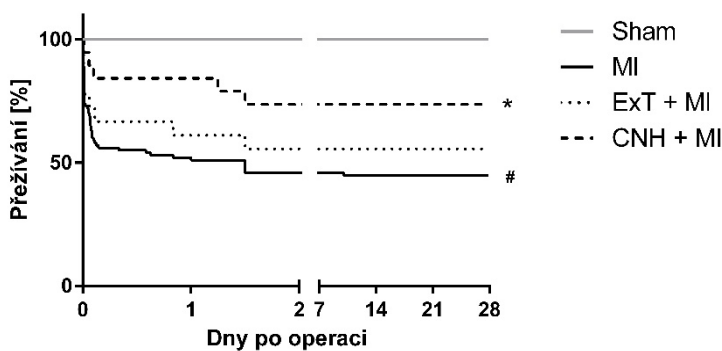
Hodnocení srdeční funkce a geometrie

Geometrie a funkce srdce byly hodnoceny u anestetizovaných zvířat (2% isofluran) pomocí echokardiografie. Rektální teplota byla udržována mezi 36,5°C a 37,5°C a byla sledována srdeční frekvence. Echokardiografické vyšetření bylo provedeno na začátku experimentu, před ischemií a na konci experimentu, není-li uvedeno jinak. Na konci experimentu bylo dále provedeno vyšetření tlakovým katetrem. Srdce byla následně odebrána a byla stanovena velikost jizvy (barvení Picrosirius Red).

4. Výsledky

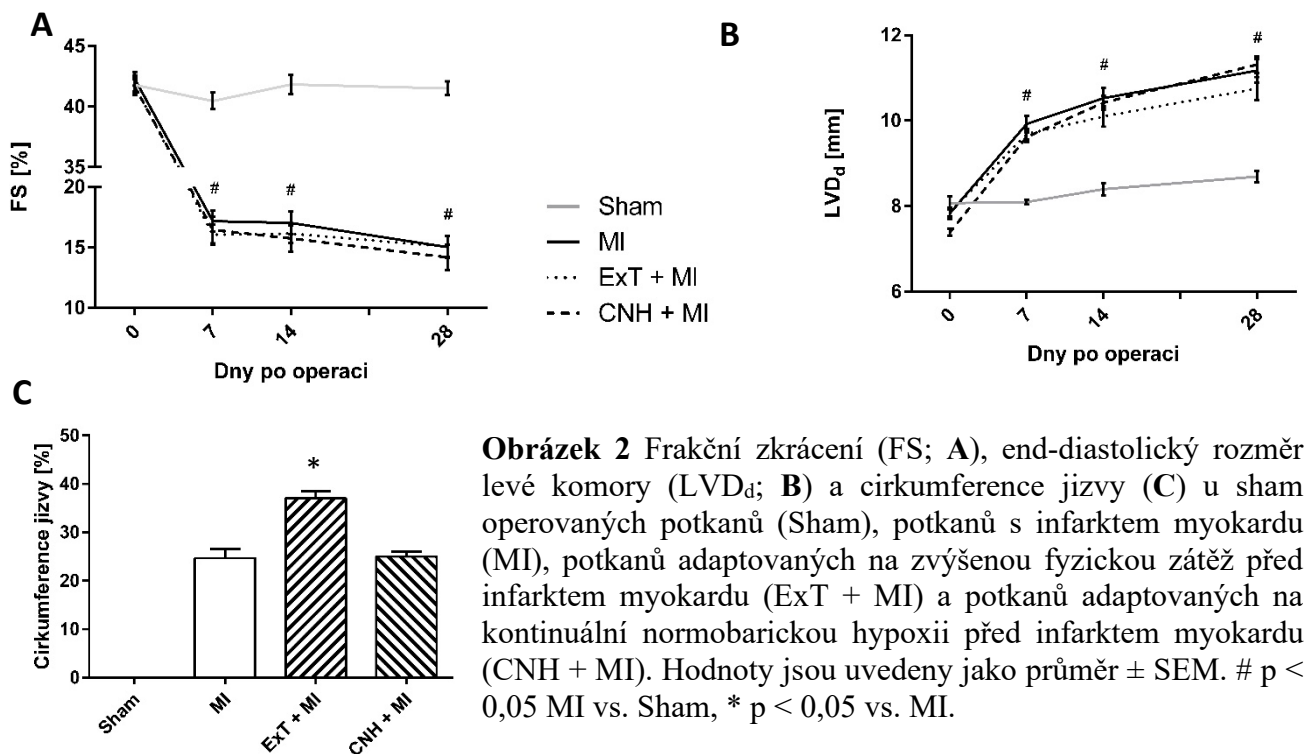
Vliv kontinuální normobarické hypoxie a zvýšené fyzické zátěže před ischemicko/reperfučním zásahem na postischemické srdeční selhání

U kontrolní skupiny (MI) byla mortalita 55%. Hlavní příčinou úmrtí byly ischemické arytmie. Mortalita byla mírně snižena u zvířat adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž (44%) a významně snižena u zvířat adaptovaných na hypoxii (26%).



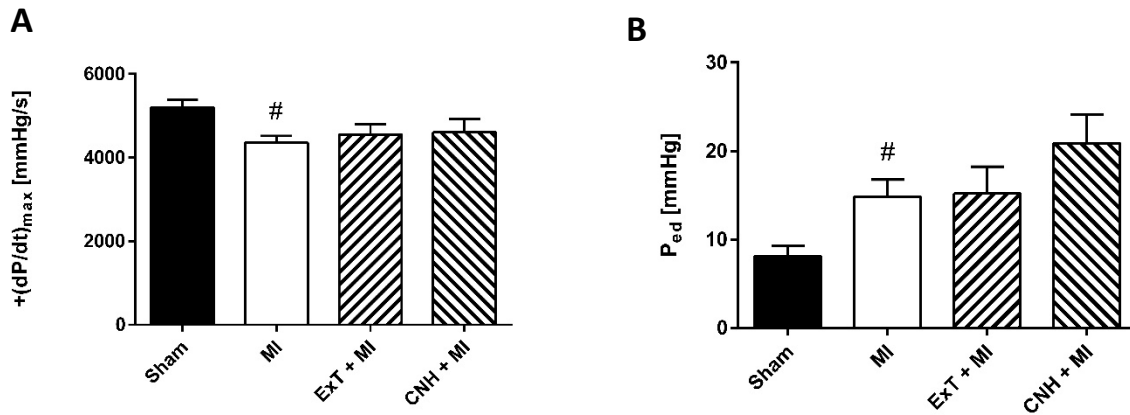
Obrázek 1 Přežívání u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž před infarktem myokardu (ExT + MI) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii před infarktem myokardu (CNH + MI) # $p < 0,05$ MI vs. Sham, * $p < 0,05$ vs. MI.

Ischemický zásah vedl k výraznému poklesu systolické funkce (frakční zkrácení, FS) a progresivní dilataci levé komory (end-diastolický rozměr levé komory, LVD_d). Tyto změny nebyly ovlivněny hypoxií ani zvýšenou fyzickou zátěží. Velikost jizvy (cirkumference) na konci experimentu nebyla ovlivněna hypoxií, ale byla zvýšená ve skupině ExT + MI.



Obrázek 2 Frakční zkrácení (FS; **A**), end-diastolický rozměr levé komory (LVD_d ; **B**) a cirkumferenci jizvy (**C**) u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž před infarktem myokardu (ExT + MI) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii před infarktem myokardu (CNH + MI). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. # $p < 0,05$ MI vs. Sham, * $p < 0,05$ vs. MI.

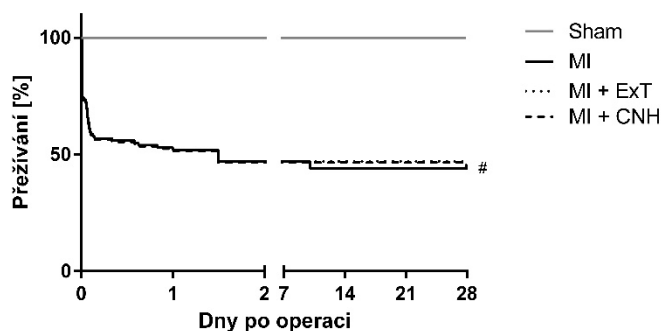
Ischemický zásah vedl k poklesu kontraktility levé komory ($+(dP/dt)_{max}$), který nebyl ovlivněn hypoxií ani fyzickou zátěží. U kontrolní skupiny (MI) byl zvýšený end-diastolický tlak a nebyl pozorován vliv hypoxie ani zvýšené fyzické zátěže na toto zvýšení.



Obrázek 3 Maximální rychlost růstu tlaku krve v levé komoře ($+(dP/dt)_{max}$; **A**) a end-diastolický tlak (P_{ed} ; **B**) na konci experimentu u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž před infarktem myokardu (ExT + MI) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii před infarktem myokardu (CNH + MI). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. # $p < 0,05$ MI vs. Sham.

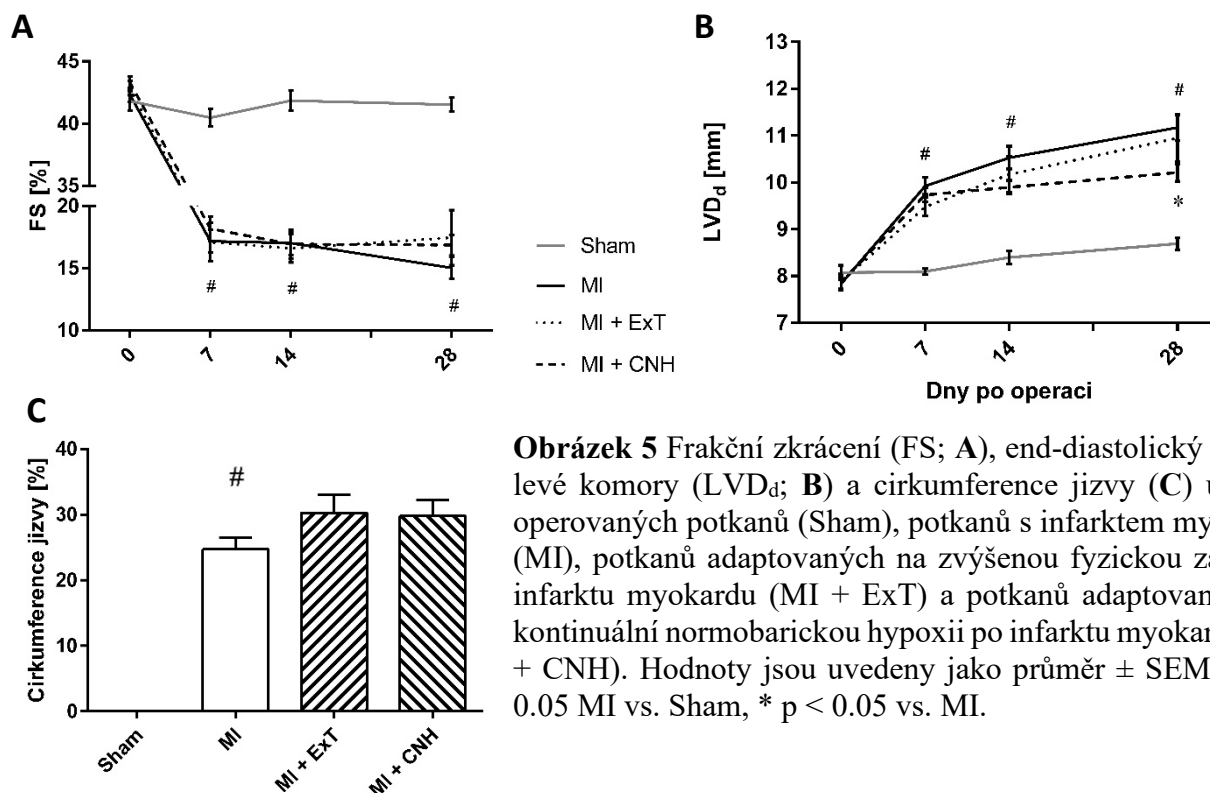
Terapeutický vliv kontinuální normobarické hypoxie a zvýšené fyzické zátěže na postischemické srdeční selhání

Experimentální skupiny Sham a MI v této studii jsou shodné s předchozími studii. Mortalita nebyla ovlivněna terapeutickou adaptací na hypoxii nebo zvýšenou fyzickou zátěž.



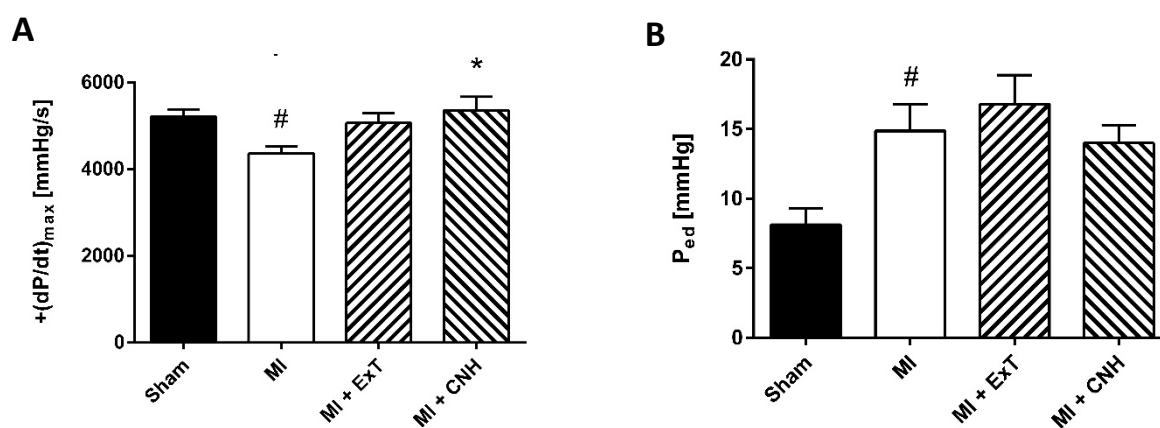
Obrázek 4 Přežívání u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž po infarktu myokardu (MI + ExT) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii po infarktu myokardu (MI + CNH). # $p < 0,05$ MI vs. Sham, * $p < 0,05$ vs. MI.

Hypoxie a zvýšená fyzická zátěž měly tendenci zmírnit systolickou dysfunkci na konci experimentu. Dilatace levé komory byla na konci experimentu významně zpomalena u skupiny MI + CNH ale ne u skupiny MI + ExT. Velikost jizvy nebyla v důsledku adaptace změněna ani u jedné skupiny.



Obrázek 5 Frakční zkrácení (FS; **A**), end-diastolický rozměr levé komory (LVD_d; **B**) a cirkumference jizvy (**C**) u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž po infarktu myokardu (MI + ExT) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii po infarktu myokardu (MI + CNH). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. # $p < 0.05$ MI vs. Sham, * $p < 0.05$ vs. MI.

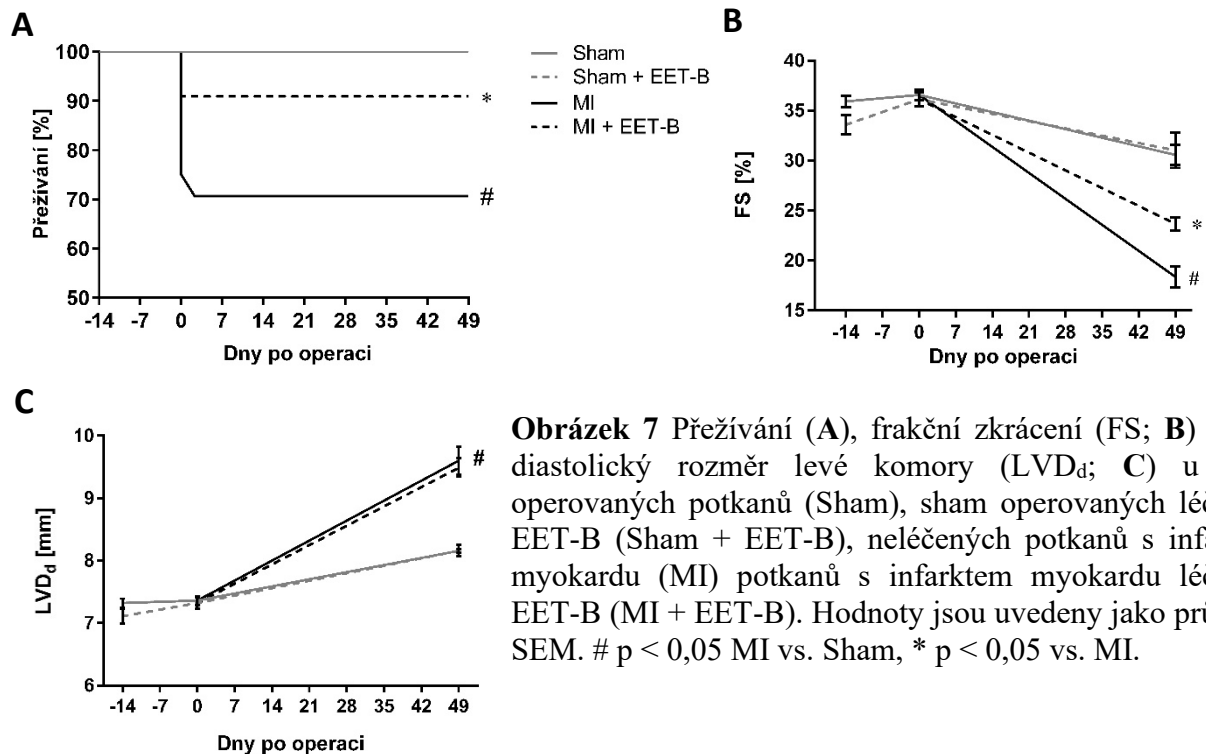
Adaptace na zvýšenou fyzickou zátěž měla tendenci zvýšit postischemickou kontraktilitu levé komory ($+(dP/dt)_{max}$). U potkanů adaptovaných na hypoxii bylo zjištěno signifikantní zlepšení postischemické kontraktility levé komory. End-diastolický tlak nebyl ovlivněn adaptacemi na hypoxii a zvýšenou fyzickou zátěž.



Obrázek 6 Maximální rychlost růstu tlaku krve v levé komoře ($+(dP/dt)_{max}$; **A**) a end-diastolický tlak (P_{ed} ; **B**) na konci experimentu u sham operovaných potkanů (Sham), potkanů s infarktem myokardu (MI), potkanů adaptovaných na zvýšenou fyzickou zátěž před infarktem myokardu (ExT + MI) a potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii před infarktem myokardu (CNH + MI). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. # $p < 0,05$ MI vs. Sham, * $p < 0,05$ vs. MI.

Vliv analogu epoxyeikosatrienových kyselin EET-B na postischemické srdeční selhání u spontánně hypertenzních potkanů

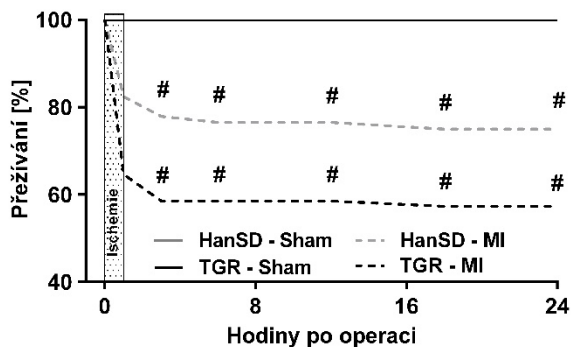
U kontrolní skupiny (MI) byla mortalita 30% a podávání EET-B vedlo k jejímu poklesu (10%). Postischemická systolická dysfunkce levé komory (FS) byla zmírněna podáváním EET-B. Nebyl zjištěn vliv EET-B na postischemickou dilataci levé komory (LVD_d).



Obrázek 7 Přežívání (A), frakční zkrácení (FS; B) a end-diastolický rozměr levé komory (LVD_d; C) u sham operovaných potkanů (Sham), sham operovaných léčených EET-B (Sham + EET-B), neléčených potkanů s infarktem myokardu (MI) potkanů s infarktem myokardu léčených EET-B (MI + EET-B). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. # $p < 0,05$ MI vs. Sham, * $p < 0,05$ vs. MI.

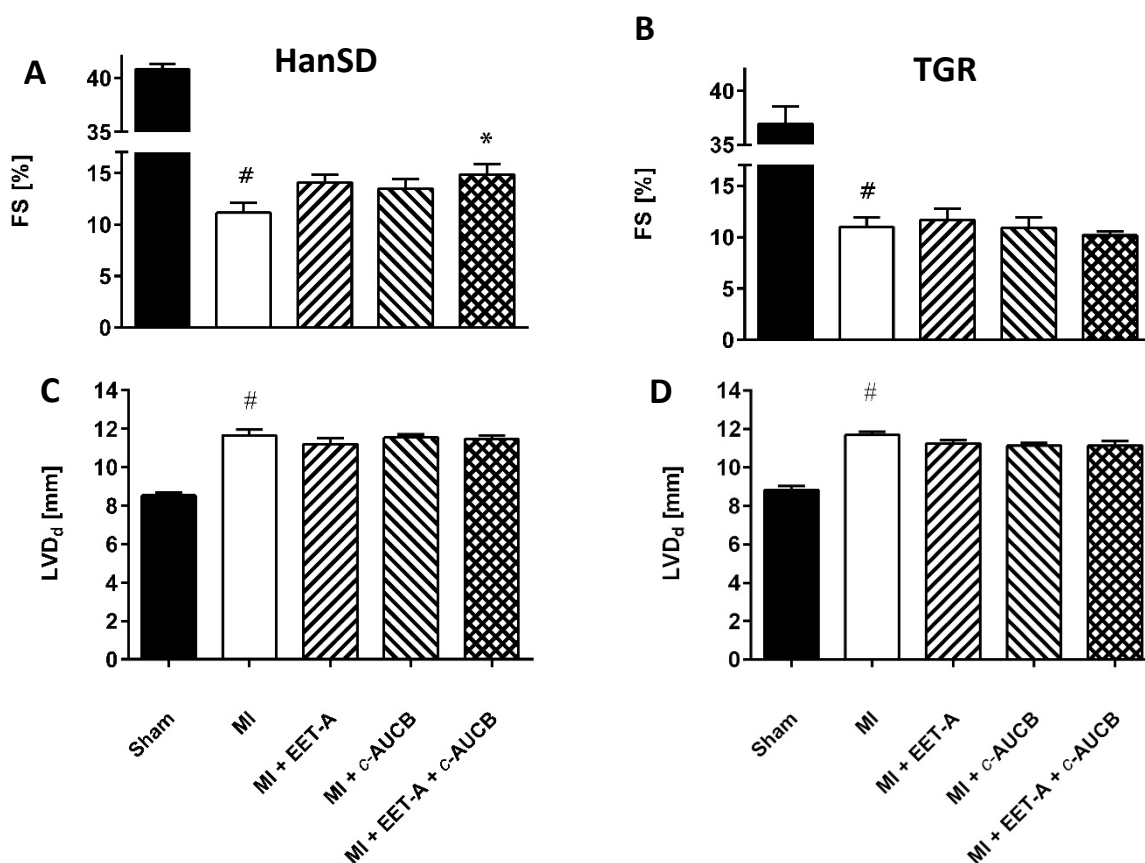
Terapeutický vliv EET-A a c-AUCB na postischemické srdeční selhání u normotenzních potkanů HanSD a hypertenzních Ren-2 transgenních potkanů

Časná mortalita byla vyšší u TGR ve srovnání s HanSD a byla způsobena především ischemickými arytmiemi. Celková mortalita na konci studie byla 28% u HanSD a 61% u TGR a nebyla ovlivněna podáváním EET-A, c-AUCB ani jejich kombinací.



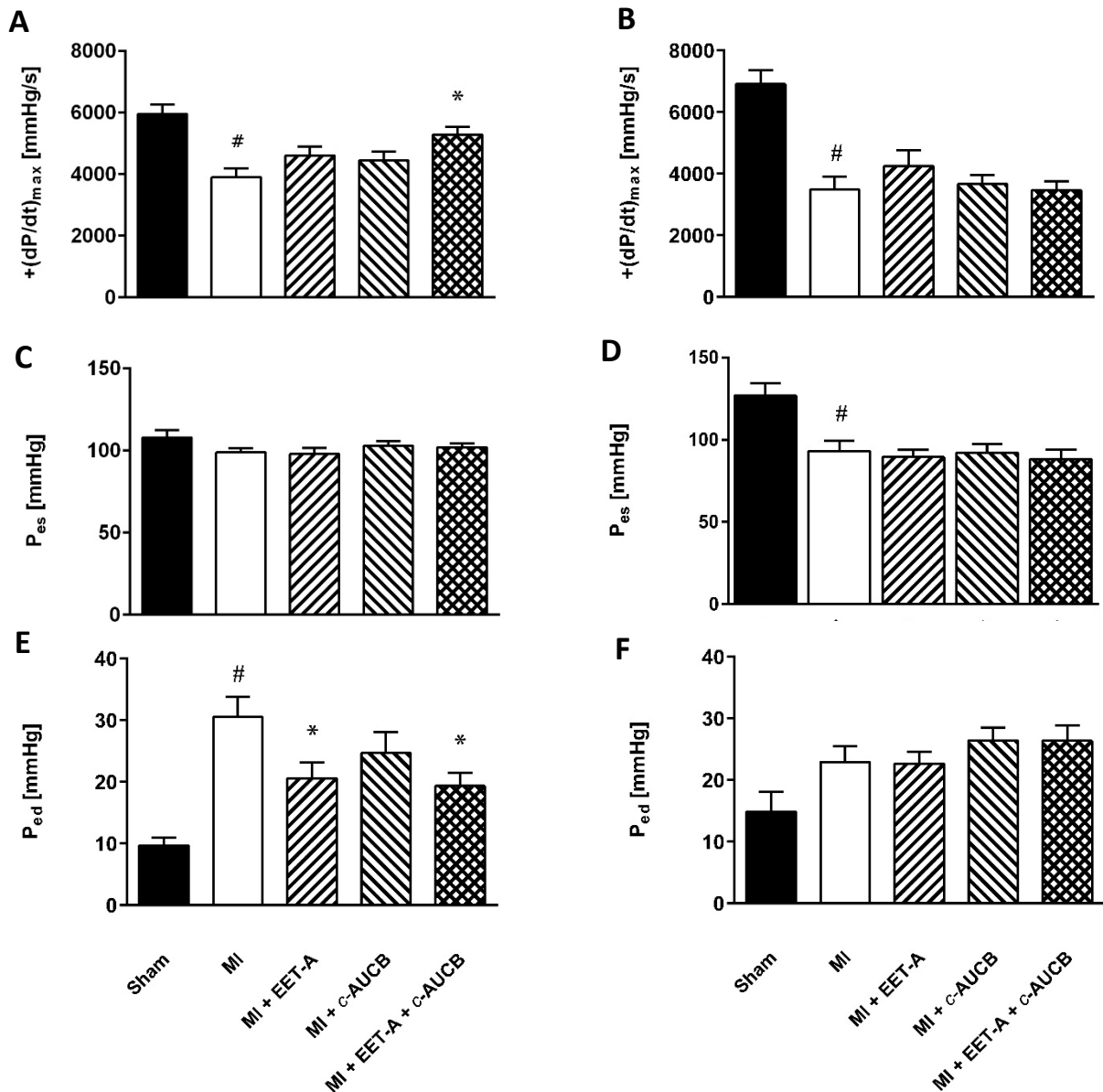
Obrázek 8 Časné postischemické přežívání u potkanů Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a *Ren-2* transgenních potkanů (TGR). Experimentální skupiny: sham operování neléčení (Sham), neléčení s infarktem myokardu (MI) Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. # $p < 0,05$ MI vs. příslušná Sham skupina,

Systolická funkce (FS) byla u sham operovaných TGR nižší než u HanSD. EET-A a *c*-AUCB měly tendenci mírnit postischemickou systolickou dysfunkci u HanSD, ale signifikantní zlepšení bylo dosaženo pouze jejich kombinací. Léčba neměla vliv na postischemickou systolickou dysfunkci u TGR. Léčba neměla vliv na postischemickou dilataci levé komory u HanSD ani u TGR.



Obrázek 9 Frakční zkrácení (FS; **A, B**) a end-diastolický rozměr levé komory (LVD_d; **C, D**) u potkanů Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a *Ren-2* transgenních potkanů (TGR) s sham operací (Sham) infarktem myokardu (MI) a léčených analogem epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A) a inhibítorem solubilní epoxid hydrolázy (*c*-AUCB). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. # $p < 0,05$ MI vs. příslušná Sham skupina, * $P < 0,05$ vs. příslušná MI skupina.

Ischemie vedla k významnému poklesu kontraktility levé komory ($+(dP/dt)_{max}$) u HanSD i TGR. Kombinované léčba zmírnila tento pokles u HanSD. U TGR nebyl zjištěn vliv léčby na postischemickou kontraktilní dysfunkci. End-systolický tlak byl snížený u TGR s infarktem myokardu (ve srovnání se Sham skupinou) a léčba neměla vliv na tento pokles. End-diastolický tlak byl výrazně zvýšený u HanSD s infarktem myokardu a podávání EET-A samostatně nebo v kombinaci s *c*-AUCB tento nárůst tlumilo. U TGR byla zjištěna tendence ke zvýšení end-diastolického tlaku a nebyl pozorován vliv léčby.



Obrázek 10 Maximální rychlost růstu tlaku krve v levé komoře ($+(dP/dt)_{max}$; **A, B**), end-systolický tlak (P_{es} ; **C, D**) a end-diastolický tlak (P_{ed} ; **E, F**) u potkanů Hannover Sprague-Dawley (HanSD) a *Ren-2* transgenních potkanů (TGR) s sham operací (Sham) infarktem myokardu (MI) a léčených analogem epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A) a inhibítorem solubilní epoxid hydrolázy (*c*-AUCB). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. # $p < 0.05$ MI vs. příslušná Sham skupina, * $P < 0.05$ vs. příslušná MI skupina.

5. Diskuse

V této práci jsme se u normotenzních a hypertenzních potkanů pokusili určit kardioprotektivní potenciál různých experimentálních přístupů ve smyslu prevence postischemického srdečního selhání a jeho zmírnění u normotenzních a hypertenzních potkanů.

Vliv kontinuální normobarické hypoxie a zvýšené fyzické zátěže před ischemicko/reperfuzním zásahem na postischemické srdeční selhání

Z výsledků této kapitoly vyplývá, že adaptace na kontinuální normobarickou hypoxie, ale ne na zvýšenou fyzickou zátěž, zlepšuje přežívání při akutním I/R zásahu. Tyto adaptace přitom nemají vliv na rozvoj postischemického srdečního selhání a potkanů kmene Wistar.

Je známo, že adaptace na CNH a ExT zvyšují odolnost myokardu vůči akutnímu I/R poškození. Vliv těchto adaptací na postischemické srdeční selhání přitom zůstává nejasný.

Naše výsledky potvrdily, že potkani adaptovaní na CNH jsou odolnější vůči výskytu přetrvávajících komorových fibrilací v průběhu I/R, jak bylo popsáno dříve (Asemu *et al.*, 1999; Alánová *et al.*, 2017). To vedlo ke snížení mortality, která byla u kontrolní skupiny srovnatelná s podobnými modely rozsáhlého infarktu myokardu (Pfeffer *et al.*, 1985). V našem experimentu neměla preventivní adaptace na CNH vliv na velikost infarktu myokardu, zatímco některé práce uvádějí jeho zmenšení v důsledku adaptace na CNH (Maslov *et al.*, 2013; Chytilová *et al.*, 2015). Tento rozdíl lze vysvětlit prodloužením ischemie v našem experimentu, ve snaze docílit dostatečně velkého infarktu myokardu, který by vedl k rozvoji srdečního selhání. Vzhledem k tomu, že známky rozvoje postischemického srdečního selhání silně korelují s velikostí infarktu myokardu (Pfeffer *et al.*, 1979), můžeme dojít k závěru, že adaptace na CNH před I/R zásahem neměla pozitivní vliv na rozvoj postischemického srdečního selhání u potkanů Wistar.

Adaptace na zvýšenou fyzickou zátěž neměla významný vliv na zlepšení přežívání. Pozorovali jsme přitom tendenci k antiarytmickému efektu popsaného Hamiltonem *et al.* (2004). Zvětšení cirkumference poinfarktové jizvy v naší studii je v rozporu s předchozími výsledky (Yamashita *et al.*, 1999; Demirel *et al.*, 2001 a Freimann *et al.*, 2005). Tento rozpor mohou alespoň částečně vysvětlit rozdíly v konkrétním protokolu ischemie myokardu, zejména pak v délce ischemického zásahu. Lze tedy shrnout, že adaptace na zvýšenou fyzickou zátěž před I/R zásahem významně neovlivnila progresi srdečního selhání u potkanů Wistar.

Terapeutický vliv kontinuální normobarické hypoxie a zvýšené fyzické zátěže na postischemické srdeční selhání

V této části práce bylo zjištěno, že terapeutická adaptace na CNH, ale ne na ExT zpomaluje rozvoj postischemického srdečního selhání u potkanů Wistar (Hrdlička *et al.*, 2016).

Zlepšené přežívání u potkanů s infarktem myokardu bylo zjištěno u potkanů adaptovaných na terapeutickou intermitentní hypoxii (Xu *et al.*, 2011) a zvýšenou fyzickou zátěž (Lundeberg *et al.*, 1998). Vzhledem k minimální mortalitě v našem experimentu nebyl pozorován vliv terapeutické adaptace na CNH a ExT na přežívání. Několik publikací se věnuje vlivu intermitentní hypobarické hypoxie na srdeční selhání (del Pilar *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011; Naghshin *et al.*, 2012), vliv CNH přitom dosud nebyl znám. V naší práci jsme pozorovali příznivý vliv CNH na kontraktilitu levé komory a systolický tlak a naše studie jako první jsme popsala zpomalení rozvoje srdečního selhání v důsledku adaptace na CNH, které je srovnatelné s vlivem intermitentní hypobarické hypoxie (Xu *et al.*, 2011).

V naší práci nebyl zjištěn vliv adaptace na zvýšenou fyzickou zátěž na velikost poinfarktové jizvy, ani na změny end-diastolické velikosti levé komory. Lze tedy konstatovat, že na rozdíl od dříve popsaného prospěšného vlivu zvýšené fyzické zátěže (Musch *et al.*, 1989; Ait Mou *et al.*, 2009; Bito *et al.*, 2010) jsme v naší práci nepozorovali protektivní vliv ExT ve smyslu zmírnění postischemické dilatace levé komory. U vybraných parametrů srdeční funkce přitom byly zjištěny tendence k jejich zlepšení. Zle tedy argumentovat, že rozsah poškození myokardu v naše experimentu mohl limitovat případný pozitivní vliv adaptace na ExT. Vzhledem k tomu, že podle řady studií je k dosažení kardioprotekce spojené s ExT je nutná určitá intenzita fyzické zátěže (Noble *et al.*, 1999; Lennon *et al.*, 2004), mohla být absence významného protektivního efektu v naší studii zapříčiněna sníženou schopností potkanů s infarktem myokardu tolerovat fyzickou zátěž potřebné intenzity.

Vliv analogu epoxyeikosatrienových kyselin EET-B na postischemické srdeční selhání u spontánně hypertenzních potkanů

V této části práce bylo zjištěno, že nový analog epoxyeikosatrienových kyselin EET-B snižuje úmrtnost v důsledku I/R poškození myokardu a mírní postischemickou systolickou dysfunkci levé komory u spontánně hypertenzních potkanů (Neckář *et al.*, 2019).

Akutní podávání analogů EET nebo inhibitorů sEH (což jsou dvě nejčastější strategie zvýšení tkáňové dostupnosti EET) před ischemií nebo na začátku reperfuze vede ke zvýšené odolnosti myokardu vůči I/R poškození (Batchu *et al.*, 2012; Motoki *et al.*, 2008; Neckář *et al.*, 2012). Několik studií zároveň demonstrovalo potenciál EET-A (EET analog podobný EET-B; Campbel *et al.*, 2017) a

inhibitoru sEH *c*-AUCB snižovat výskyt ischemických arytmií včetně závažných komorových fibrilací (Červenka *et al.*, 2018). V naší studii byl pozorován obdobný efekt i při podání EET-B. Při léčbě analogem EET NUDSA bylo prokázáno zlepšení srdeční funkce u myši s infarktem myokardu (Ca *et al.*, 2015). Při podávání inhibitorů sEH GSK2188931B a AUDA byl popsán jejich vliv na zmírnění postischemické remodelace srdce (Kompa *et al.*, 2013; Merabet *et al.*, 2012). Naše výsledky jsou ve shodě s těmito pozorováními.

Při podávání EET-A před ischemií a EET-B na začátku reperfuze byla u normotenzních HanSD potkanů zjištěna zvýšená odolnost myokardu vůči I/R poškození (Alánová *et al.*, 2015; Neckář *et al.*, 2018). Velikost infarktu naopak nebyla ovlivněna podáním EET-A a inhibitoru sEH u normotenzních EET-A a hypertenzních TGR v práci Červenky *et al.* (2018). Můžete tedy pouze spekulovat, do jaké míry byl námi zjištěný kardioprotektivní účinek podávání EET-B závislý na zvýšené odolnosti myokardu vůči akutnímu I/R poškození na jedné straně a změnami v postischemické remodelaci myokardu na straně druhé. Studie navazující na náš experiment přitom v souvislosti s podáváním EET-B ukazují snížené množství kolagenu a redukci infiltrace monocytů a makrofágů v srdci, což by poukazovalo na významnou roli změn remodelace myokardu (Neckář *et al.*, 2019).

Terapeutický vliv EET-A a *c*-AUCB na postischemické srdeční selhání u normotenzních HanSD a hypertenzních Ren-2 transgenních potkanů

V této části práce bylo zjištěno, že terapeutické podávání EET-A a *c*-AUCB zpomaluje rozvoj postischemického srdečního selhání u normotenzních HanSD, ale ne u TGR potkanů s angiotenzin dependentní hypertenzí (Hrdlička *et al.*, 2019).

U TGR byl ve srovnání s HanSD zjištěn zvýšený výskyt přetrvávajících komorových fibrilací v průběhu ischemie. To vedlo k vyšší mortalitě u TGR, což je ve shodě s dříve publikovanými výsledky (Červenka *et al.*, 2018; Ferdinandy *et al.*, 2007). U TGR byla potvrzena koncentrická hypertrofie a mírné zhoršení systolické funkce, dříve popsané v pracích Bachman *et al.* (1992) a Whaley-Connel *et al.*, 2007). I/R zásah vedl k rozvoji srdečního selhání s podobnou mírou systolické dysfunkce u HanSD a TGR. Zároveň byla pozorována poměrně vysoká individuální variability v rozvoji srdečního selhání v rámci experimentálních skupin.

Ve shodě s předchozími výsledky Li *et al.* (2009) a Merabet *et al.* (2012) jsme pozorovali zlepšení systolické funkce srdce u HanSD léčených EET-A a *c*-AUCB. Jak ukázaly předchozí studie, tento efekt je spojen se zvýšením tkáňové hladiny EET (Li *et al.*, 2009; Sirish *et al.*, 2013). To potvrzuje i jeho vymizení při podávání inhibitoru cytochrom P450 epoxygenázy (Merabet *et al.*, 2012), enzymu klíčového pro produkci EET.

Srdečního selhání u experimentálních modelů hypertenze je často spojeno s poškozením dalších orgánů. S přihlédnutím k jejich roli v regulaci krevního tlaku je pak často hodnocena funkce ledvin. Ve studii paralelní s touto prací byl zjištěn na hypertenzi nezávislý renoprotektivní efekt EET-A (Hrdlička *et al.*, 2019). Lze tedy předpokládat, že renoprotektivní a kardioprotektivní efekt při léčbě založené na zvyšování tkáňové hladiny EET se mohou navzájem ovlivňovat.

6. Závěr

Přes intenzivní výzkum v oblasti ischemické kardioprotekce je v důsledku neúspěšného přenosu slibných experimentálních přístupů do klinické praxe obtížné zlepšovat dlouhodobé klinické výsledky. To vede ke skeptickému pohledu na potenciální využitelnost experimentálních kardioprotektivních přístupů v klinické praxi. Přesto věříme, že kardioprotektivní protokoly, kterými se zabývá tato práce (adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii, zvýšenou fyzickou zátěž a léčba zaměřená na zvýšení tkáňové hladiny epoxyeikosatrienových kyselin), mají potenciál zvyšovat odolnost myokardu vůči ischemickému poškození a tlumit rozvoj postischemického srdečního selhání. Naše výsledky ukazují, že všechny tyto přístupy mají do jisté míry příznivé účinky a v případě kontinuální normobarické hypoxie a epoxyeikosatrienových kyselin vedou k významným pozitivním efektům.

Výsledky naší práce ukazují, že mechanismy vedoucí ke zvýšené odolnosti srdce k akutní ischemii mohou hrát významnou roli také při prevenci a léčbě postischemického srdečního selhání.

1. Introduction

The failure to find a cardioprotective therapy despite 50 years of research should not put into doubt the ischemia/reperfusion injury as a viable target for protection. The novel protective strategies are still required to attenuate the detrimental effects of acute myocardial ischemic injury, prevent adverse left ventricle remodelling, and reduce the heart failure.

Various cardioprotective strategies provide antiapoptotic and anti-inflammatory actions. Since apoptosis and inflammation are the key mediators of postischemic cardiac remodeling, these strategies have certain potential to prevent and attenuate the development of postischemic heart failure. However, their role in postischemic heart failure is often unclear. This thesis addresses several of those approaches, i.e. adaptation to continuous normobaric hypoxia (CNH), exercise training (ExT) and epoxyeicosatrienoic acid (EET)-based treatment. Moreover, EET-based treatments showed antihypertensive effect in various experimental setups and could be therefore used in clinically relevant models of cardiovascular diseases in hypertensive animals.

This thesis tried to contribute to identification of novel strategies that could effectively prevent or attenuate postischemic heart failure

2. Aims of the Thesis

The specific aims of this thesis were:

1. To evaluate the effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training applied prior to the ischemia/reperfusion insult on postischemic heart failure in rats.
2. To evaluate the therapeutic effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training on postischemic heart failure in rats.
3. To evaluate the effect of epoxyeicosatrienoic acid analogue EET-B on postischemic heart failure in spontaneously hypertensive rats.
4. To evaluate the effect of epoxyeicosatrienoic acid analogue EET-A and soluble epoxide hydrolase inhibitor *c*-AUCB on postischemic heart failure in normotensive rats and Ren-2 transgenic rats with angiotensin II-dependent hypertension.

3. Material and Methods

Experimental protocols of continuous normobaric hypoxia

Wistar rats were exposed to continuous normobaric hypoxia (CNH; inspired O₂ fraction 0.12) in the normobaric chamber. This exposure lasted for 3 weeks prior to myocardial infarction (MI) (CNH + MI experimental group) or for 3 weeks starting 7 days after MI (MI + CNH).

Experimental protocols of exercise training

Wistar rats assigned to preventive exercise training (treadmill running; ExT + MI) were habituated to forced treadmill running during the first 5 days of the exercise protocol. After 2 days of rest, the protocol continued with 5 more exercise sessions (30 m/min, 60 min/day, treadmill inclination 0°) and 2 days of rest before MI. Therapeutic protocol of ExT (MI + ExT) started 7 days after MI with one week of habituation and 2 weeks of full intensity training (15 m/min, 60 min/day, 5 days/week).

Experimental protocols of EET-based treatment

Spontaneously hypertensive rats (SHR) were treated with EET-B (EET analogue; 10 mg/kg/day, p.o.) for 2 weeks prior to MI and 7 weeks thereafter. Control groups received vehicle (0.05 % ethanol and 0.10 % polyethylene glycol 400). Hannover Sprague-Dawley (HanSD) and Ren 2 transgenic rats (TGR) were treated for with EET-A (EET analogue; 10 mg/kg/day, p.o.) and/or *c*-AUCB (inhibitor of soluble epoxide hydrolase; 1 mg/kg/day, p.o.) since 24 hours after ischemia/reperfusion (I/R) in drinking water.

Model of postischemic heart failure

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.), intubated and ventilated with room air (68 strokes/min, tidal volume 1.2 ml per 100 g of body weight). Rectal temperature was monitored and maintained between 36.5 °C and 37.5 °C. The left thoracotomy was performed, and the left anterior descending coronary artery was occluded for 60 min (30 min in SHR). After that chest was closed by stitches, animals were provided with analgesia and monitored until recovery.

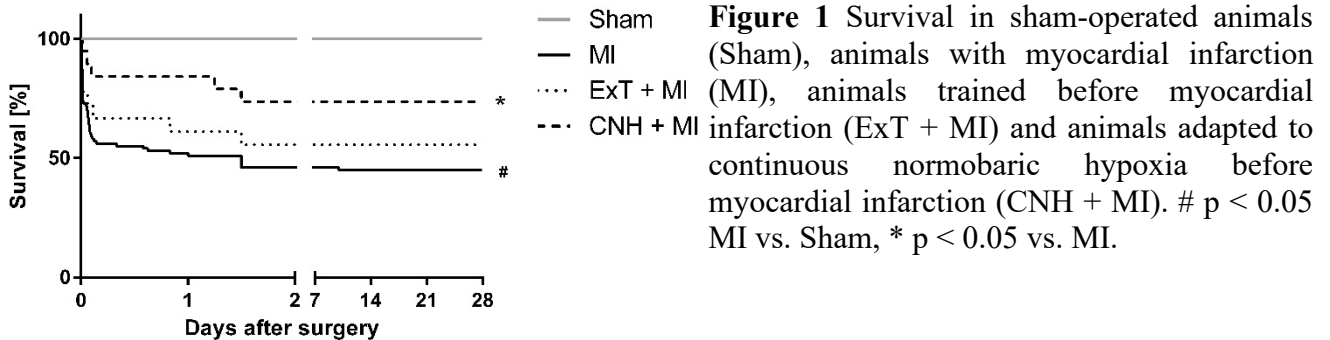
Assessment of left ventricle geometry and function

Echocardiographic examination of left ventricle (LV) geometry and function was performed in anaesthetised animals (2% isoflurane). Rectal temperature was maintained between 36.5 °C and 37.5 °C and heart rate was monitored. Echocardiographic examination was performed at the beginning and end of the experiments and before MI if not stated otherwise. Heart catheterisation with pressure catheter was performed at the end of the experiments in anaesthetised animals (2% isoflurane). After that the hearts were harvested and scar circumference was assessed using Picrosirius Red staining.

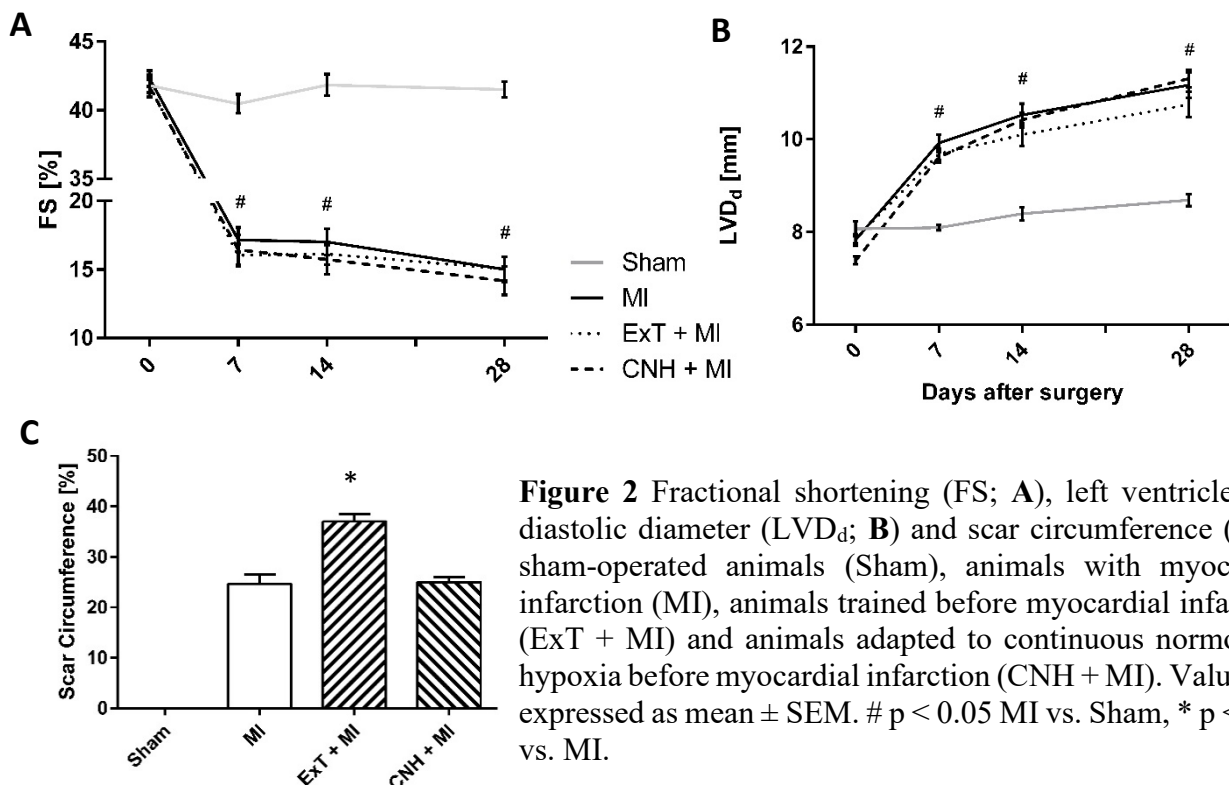
4. Results

Effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training prior to ischemia/reperfusion insult on postischemic heart failure

Ischemic insult resulted in 55% mortality in control group (MI) caused mostly by ischemic arrhythmias. Mortality tended to decrease in ExT animals (44%) and was significantly lower in CNH animals (26%).



Ischemic insult led to marked decrease of systolic function (fractional shortening: FS) and progressive dilatation of left ventricle (end-diastolic LV diameter, LVD_d) that were not affected by either CNH or ExT. Scar circumference at the end of the study was not affected by CNH, but was increased in ExT + MI group.



Ischemic insult led to decrease in LV contractility ($+(dP/dt)_{max}$) that was not affected by either CNH or ExT. End-diastolic pressure was increased in MI animals and neither CNH nor ExT affected this change.

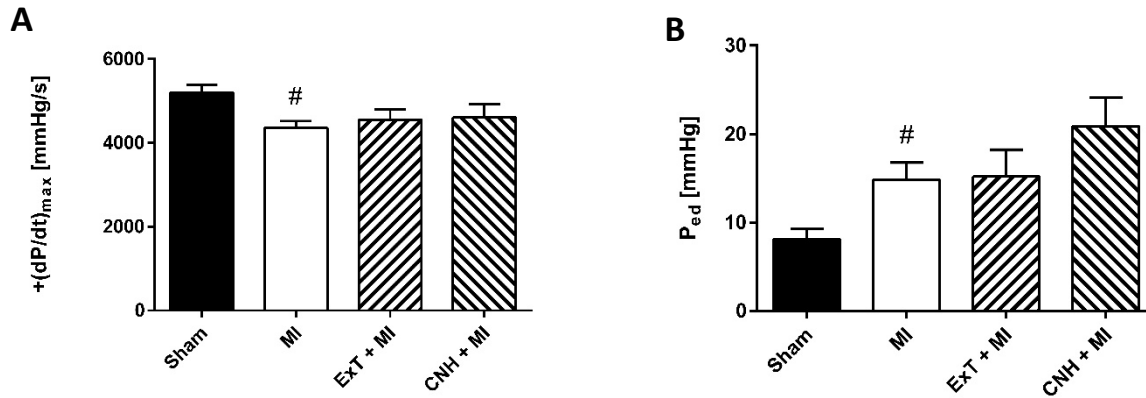


Figure 3 Peak rate of left ventricle blood pressure development ($+(dP/dt)_{max}$; **A**) and end-diastolic pressure (P_{ed} ; **B**) at the end of the study in sham-operated animals (Sham), animals with myocardial infarction (MI), animals trained before myocardial infarction (ExT + MI) and animals adapted to continuous normobaric hypoxia before myocardial infarction (CNH + MI). Values are expressed as mean \pm SEM. # $p < 0.05$ MI vs. Sham.

Therapeutic effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training on postischemic heart failure

Sham group and MI group in this study were identical to those in the previous study. The mortality was not affected by therapeutic adaptation to CNH or ExT.

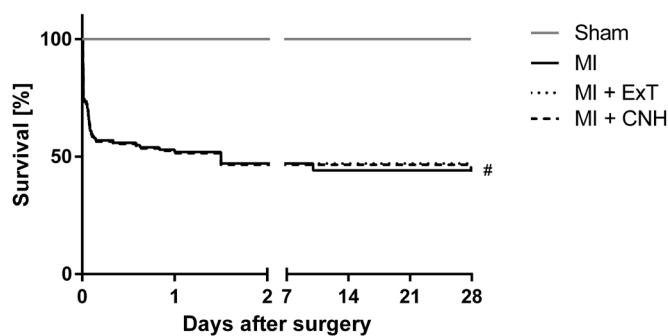


Figure 4 Survival in sham-operated animals (Sham), animals with myocardial infarction (MI), animals trained after myocardial infarction (MI + ExT) and animals adapted to continuous normobaric hypoxia after myocardial infarction (MI + CNH). # $p < 0.05$ MI vs. Sham.

Systolic function (FS) tended to be improved by CNH and ExT at the end of the study. Left ventricle dilatation (LVD_d) was attenuated by CNH but not by ExT at the end of the study. Scar circumference was not altered by either CNH or ExT.

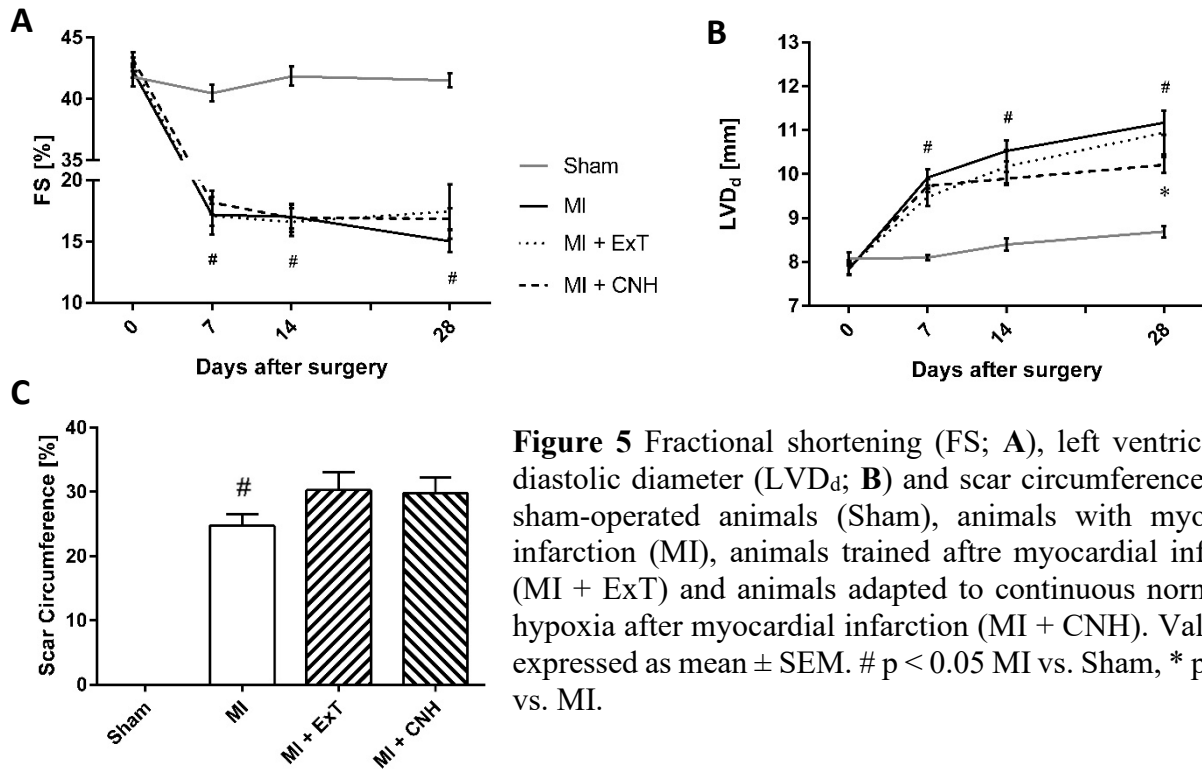


Figure 5 Fractional shortening (FS; **A**), left ventricle end-diastolic diameter (LVD_d; **B**) and scar circumference (**C**) in sham-operated animals (Sham), animals with myocardial infarction (MI), animals trained after myocardial infarction (MI + ExT) and animals adapted to continuous normobaric hypoxia after myocardial infarction (MI + CNH). Values are expressed as mean ± SEM. # $p < 0.05$ MI vs. Sham, * $p < 0.05$ vs. MI.

Contractility of LV tended to be increased in MI + ExT animals and was significantly higher in MI + CNH group. End-diastolic pressure was not affected by either CNH or ExT.

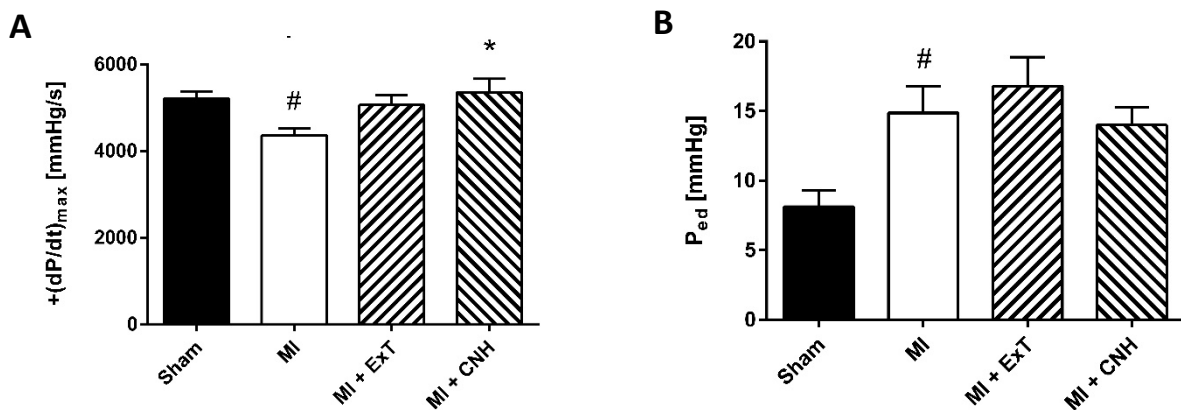
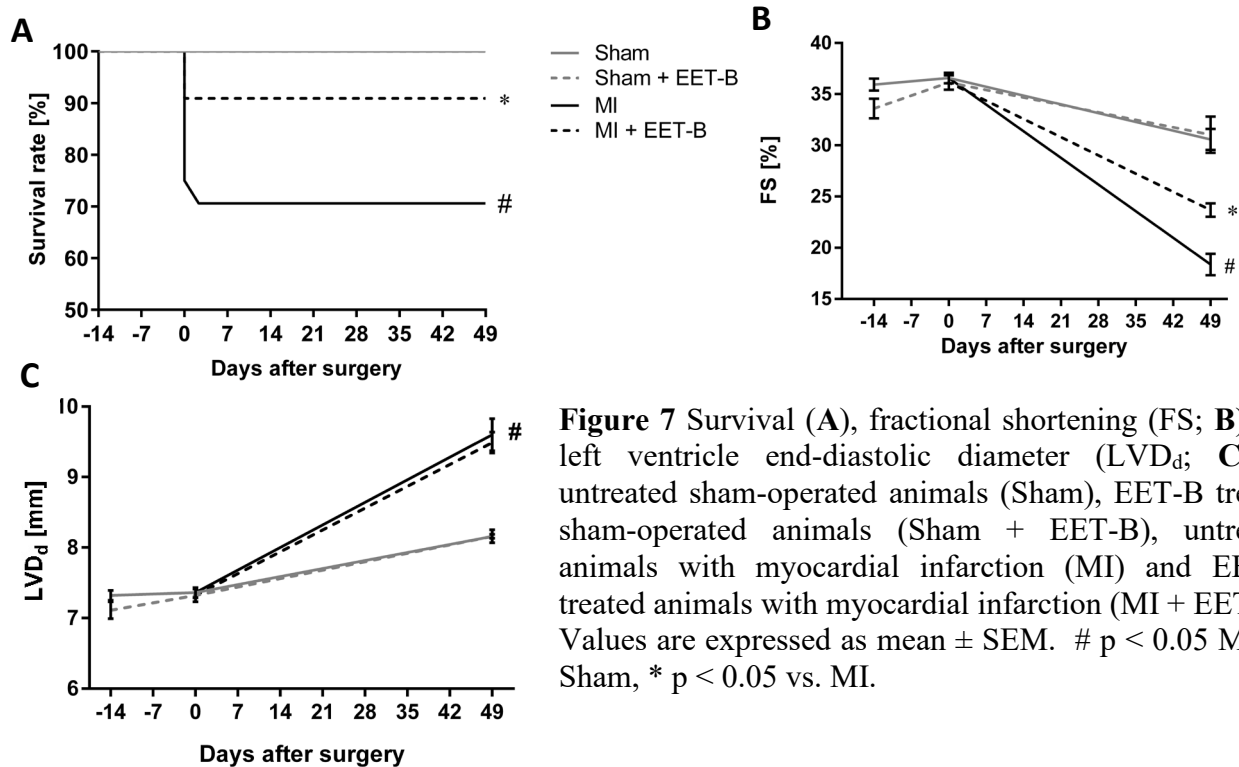


Figure 6 Peak rate of left ventricle blood pressure development ($+(dP/dt)_{max}$; **A**) and end-diastolic pressure (P_{ed}; **B**) at the end of the study in sham-operated animals (Sham), animals with myocardial infarction (MI), animals trained after myocardial infarction (MI + ExT) and animals adapted to continuous normobaric hypoxia after myocardial infarction (MI + CNH). Values are expressed as mean ± SEM. # $p < 0.05$ MI vs. Sham, * $p < 0.05$ vs. MI.

Effect of epoxyeicosatrienoic acid analogue EET-B on postischemic heart failure in spontaneously hypertensive rats

Ischemic insult led to 30% mortality in control group (MI) and was decreased by EET-B treatment (MI + EET-B). Postischemic systolic dysfunction (FS) was improved by EET-B treatment, but protective effect of EET-B was not observed in LV dilatation (LVD_d).



Therapeutic effect of EET-A and c-AUCB on postischemic heart failure in normotensive HanSD rats and hypertensive *Ren-2* transgenic rats

Early mortality in TGR was higher compared to HanSD and was caused mostly by ischemic arrhythmias. Total mortality at the end of the study was 28% in HanSD and 61% in TGR and was not affected by EET-based treatments.

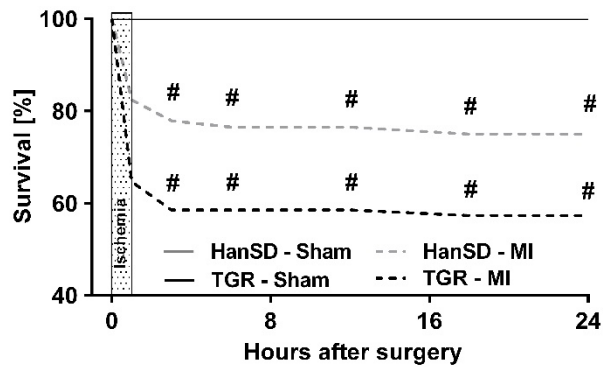


Figure 8 Early postischemic survival in Hannover Sprague-Dawley (HanSD) and *Ren-2* transgenic rats (TGR). Experimental group: sham untreated (Sham), MI untreated (MI) Values are expressed as mean \pm SEM. # $P < 0.05$ MI vs. corresponding Sham group.

Systolic function (FS) in Sham groups was lower in TGR when compared to HanSD. EET-A and *c*-AUCB tended to attenuate postischemic systolic dysfunction in HanSD, but only combined treatment had significant effect. Postischemic systolic dysfunction was not affected by EET-based treatments in TGR. Postischemic dilatation of left ventricle was not affected by EET-based treatments in either HanSD or TGR.

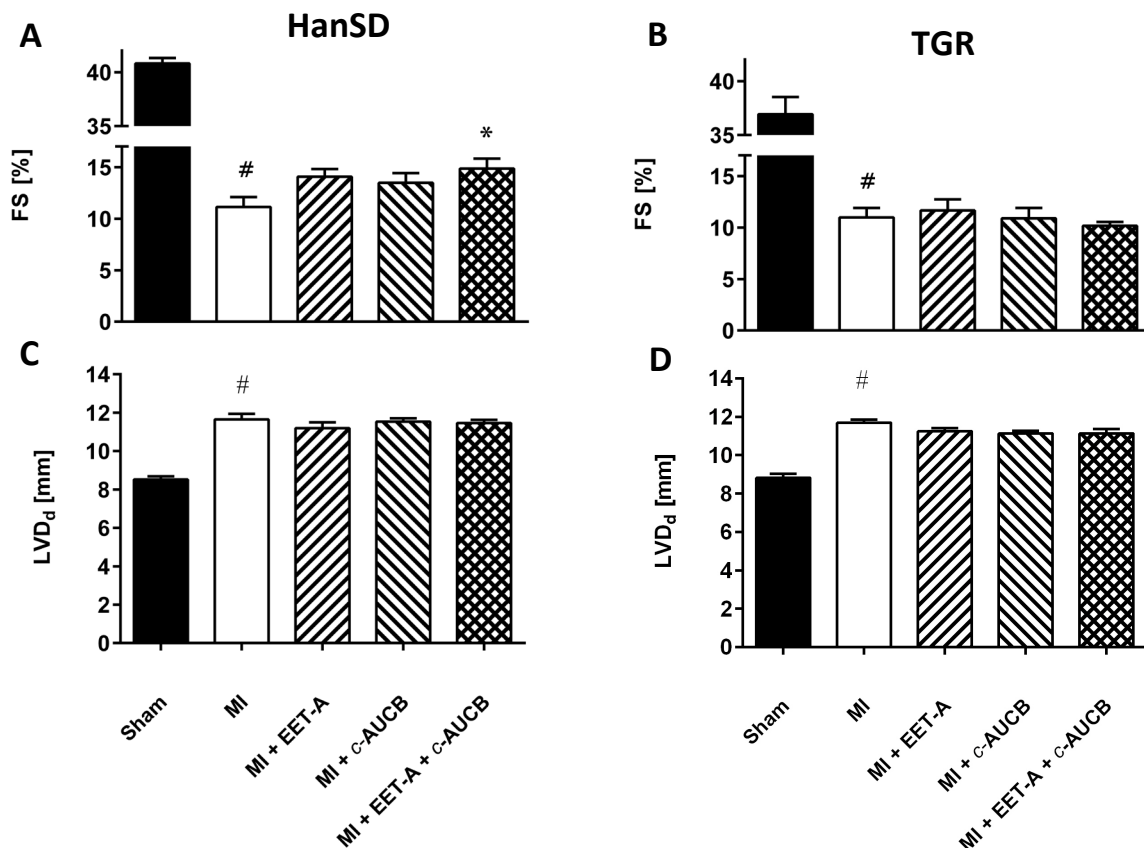


Figure 9 Fractional shortening (FS; **A**, **B**) and left ventricle end-diastolic diameter (LVD_d; **C**, **D**) in Hannover Sprague-Dawley (HanSD) and *Ren-2* transgenic rats (TGR) subjected to sham operation (Sham) or myocardial infarction (MI) and treated with epoxyeicosatrienoic acid analogue (EET-A) and soluble epoxide hydrolase inhibitor (*c*-AUCB). Values are expressed as mean \pm SEM. # $P < 0.05$ MI vs. corresponding Sham group, * $P < 0.05$ vs. corresponding MI group.

Postischemic contractility of LV $(+dP/dt)_{max}$ was markedly decreased in both strains. Combined treatment increased LV contractility in HanSD, but was not affected by EET-based treatments in TGR. End-systolic pressure was decreased in TGR with MI and was not affected by treatments in either HanSD or TGR. End-diastolic pressure was markedly increased in HanSD. This increase was attenuated by EET-A in single therapy and in combination with *c*-AUCB. End-diastolic pressure tended to be increased in TGR with MI and was not affected by EET-based treatments.

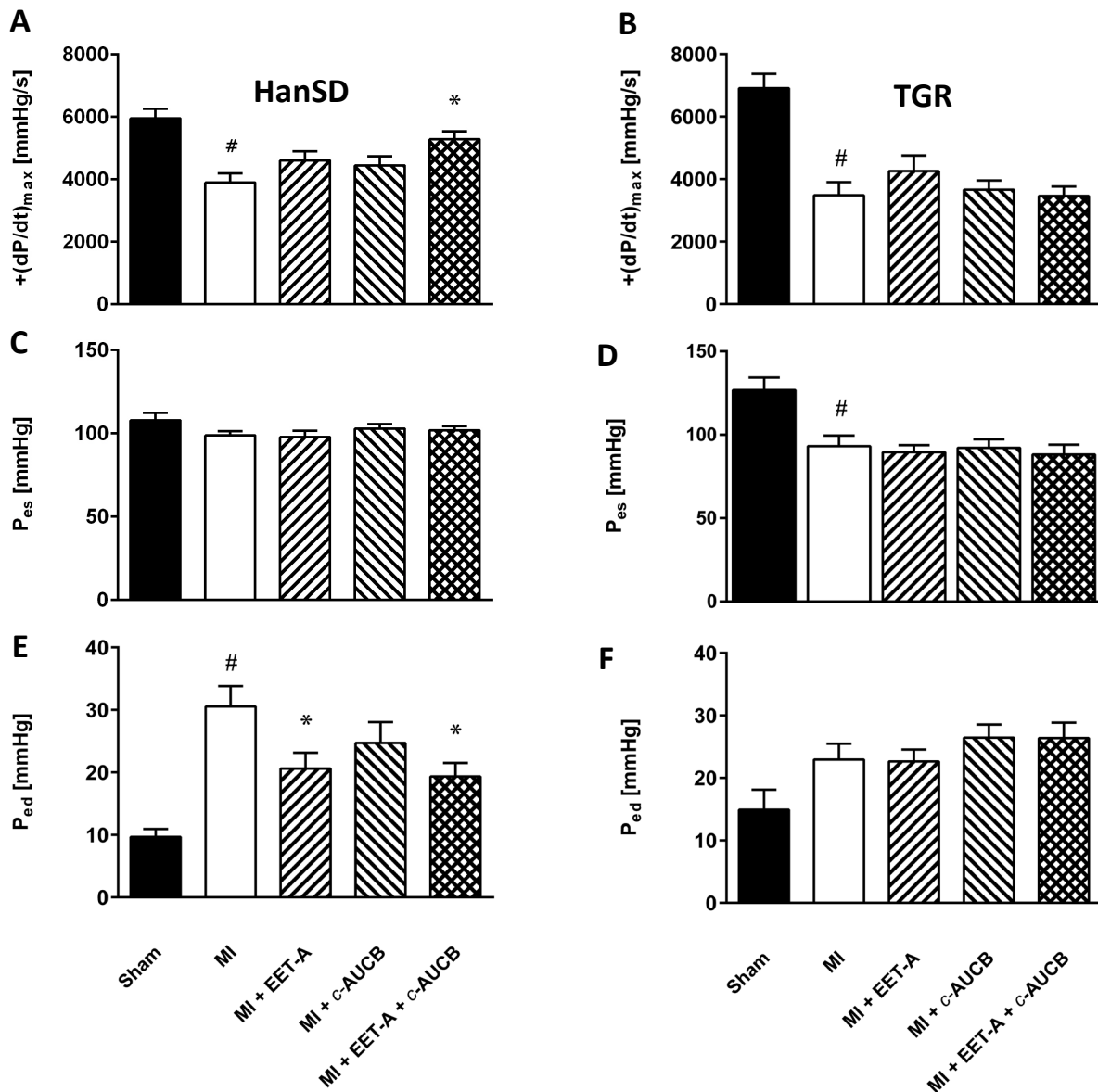


Figure 10 Peak rates of left ventricle pressure development $(+dP/dt)_{max}$; **A, B**), end-systolic pressure (P_{es} ; **C, D**) and end-diastolic pressure (P_{ed} ; **E, F**) in Hannover Sprague-Dawley (HanSD) and *Ren-2* transgenic rats (TGR) subjected to Sham operation (Sham) or Myocardial infarction (MI) and treated with epoxyeicosatrienoic acid analogue (EET-A) and soluble epoxide hydrolase inhibitor (*c*-AUCB) Values are expressed as mean \pm SEM. # $P < 0.05$ MI vs. corresponding Sham group, * $P < 0.05$ vs. corresponding MI group.

5. Discussion

We tried to characterize the cardioprotective potential of different approaches in order to prevent and attenuate postischemic HF progression in normotensive and hypertensive animals.

Effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training prior to ischemia/reperfusion insult on postischemic heart failure

The main finding of this part of our study is that the adaptation to CNH but not ExT improves survival during acute I/R insult, and these adaptations do not affect the progression of postischemic HF in Wistar rats.

It is well established that animals adapted to both CNH and ExT exhibit cardioprotective phenotypes if subjected to acute I/R insult. Yet, the effect of CNH and ExT on postischemic HF remains unclear. Our results confirmed that CNH-adapted animals are less susceptible to sustained ventricle fibrillation during the I/R period as previously reported by Asemu *et al.* (1999) or Alánová *et al.* (2017). This was further translated into improved survival, while mortality in the MI group was comparable to similar models of large MI (Pfeffer *et al.*, 1985). CNH adaptation did not alter LV scar size, whereas some studies reported a decrease in early postischemic MI size (Maslov *et al.*, 2013; Chytilová *et al.*, 2015). This could be explained by prolonged ischemic insult in our experimental setup that was necessary for inducing the HF. As the signs of postischemic HF progression strongly correlate with scar size (Pfeffer *et al.*, 1979), we can conclude that in our experimental setup, CNH prior to the I/R insult had no beneficial effect on postischemic HF development in Wistar rats.

In exercise-trained animals, we did not observe significant improvement in survival. Despite that, we observed a tendency to ExT-induced anti-arrhythmic effect as previously reported by Hamilton *et al.* (2004). The ExT-induced increase of scar size is contradictory to previous results of Yamashita *et al.* (1999), Demirel *et al.* (2001) and Freimann *et al.* (2005). The differences in protocol of MI induction (prolonged ischemia in our experiment) might partially explain this inconsistency. To conclude, our ExT regimen prior to the I/R insult did not alter postischemic HF progression in HanSD rats.

Therapeutic effect of continuous normobaric hypoxia and exercise training on postischemic heart failure

The main finding of this part of our study is that adaptation to CNH but not to ExT after ischemia/reperfusion insult attenuates the development of postischemic HF in Wistar rats (Hrdlička *et al.*, 2016).

Several studies reported improved survival after MI associated with therapeutic intermittent hypoxia (Xu *et al.*, 2011) or ExT (Lundeberg *et al.*, 1998). We observed minimal mortality during therapeutic adaptation, and our study thus did not show any differences in survival among experimental groups. Therapeutic effects of intermittent hypobaric hypoxia in HF were addressed by several studies (del Pilar *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011; Naghshin *et al.*, 2012), but the effect of CNH in HF was unclear. We observed a positive effect of CNH on postischemic LV contractility and systolic pressure and our study was the first one to demonstrate that postischemic adaptation to CNH attenuates progressive LV dilatation in a way comparable to IHH (Xu *et al.*, 2011).

In ExT animals, neither scar size nor LVD_d differed compared to the MI group. Therefore, we could conclude that contrary to previous reports (Musch *et al.*, 1989; Ait Mou *et al.*, 2009; Bito *et al.*, 2010), ExT in our experimental setup did not affect progressive LV dilatation. On the other hand, ExT exhibited some tendencies to improve functional parameters like $+(dP/dt)_{max}$, $-(dP/dt)_{max}$. Two limitations of our study should be mentioned. First, the infarct size needed for HF development may limit the potential protective effect. Second, several studies showed that certain intensity of physical load is needed to trigger the ExT-associated cardioprotection (Noble *et al.*, 1999; Lennon *et al.*, 2004), and this intensity probably wasn't reached in our experiment due to the limited exercise capacity of animals with MI.

Effect of epoxyeicosatrienoic acid analogue EET-B on postischemic heart failure in spontaneously hypertensive rats

The main finding of this chapter is that novel orally active EET analogue EET-B reduces I/R associated mortality and attenuates postischemic LV systolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats without affecting blood pressure (Neckář *et al.*, 2019).

Acute administration of EET analogues or sEH inhibitors (two most common strategies to increase EETs bioavailability) prior to ischemia or at the beginning of reperfusion are associated with increased cardiac resistance to I/R insult in multiple experimental models (Batchu *et al.*, 2012; Motoki *et al.*, 2008; Neckář *et al.*, 2012). Several results also showed that EET-A (EET analogue similar to EET-B; Campbel *et al.*, 2017) and sEH inhibitor *c*-AUCB have the potential to significantly decrease the incidence of ischemic arrhythmias including life-threatening sustained ventricle fibrillation (Červenka *et al.*, 2018). A similar effect of EET-B was observed in our experiment. Moreover, it has been shown that EET analogue NUDSA improved cardiac function in mice after MI (Cao *et al.*, 2015), and sEH inhibitors GSK2188931B or AUDA attenuated post-MI remodelling (Kompa *et al.*, 2013 and Merabet *et al.*, 2012). Our results are thus in line with previous reports. On the other hand, EET-A or

sEH inhibitor treatment did not affect infarct size in either normotensive HanSD or hypertensive TGR animals (Červenka *et al.*; 2018). Therefore, we can speculate whether the cardioprotective effect of EET-B showed in our study was associated rather with increased resistance to acute I/R injury or with alteration of postischemic myocardial remodelling. Despite that the role of altered cardiac remodelling is further supported by our follow-up study results showing EET-B-induced reduction in myocardial collagen deposition and reduced monocyte/macrophage infiltration (Neckář *et al.*, 2019).

Therapeutic effect of EET-A and *c*-AUCB on postischemic heart failure in normotensive HanSD rats and hypertensive *Ren-2* transgenic rats

The main finding of the final part of our study is that EET-based therapy using EET-A and *c*-AUCB can attenuate the progression of postischemic HF in normotensive HanSD rats but not in transgenic rats with Ang II-dependent hypertension (TGR) (Hrdlička *et al.*, 2019).

TGR were more susceptible to I/R-induced sustained ventricle fibrillation than HanSD, which resulted in increased mortality in TGR. This is in agreement with previous reports of Červenka *et al.* (2018) and Ferdinandy *et al.* (2007). Our data also confirmed concentric LV hypertrophy in TGR as reported earlier (Bachman *et al.* 1992) and mild systolic dysfunction (Whaley-Connell *et al.*, 2007). I/R insult resulted development of HF with a similar degree of systolic dysfunction in HanSD and TGR. However, we observed individual variability in HF progression in experimental groups.

Our results showed improved systolic function in HanSD rats with EET-based treatment, which is in agreement with previous reports (Li *et al.*, 2009; Merabet *et al.*, 2012). These beneficial effects are usually accompanied by increased tissue levels of EETs (Li *et al.*, 2009; Sirish *et al.*, 2013) that can be abolished by co-administration of cytochrome P450 epoxygenase inhibitors (Merabet *et al.*, 2012), a key enzyme in EETs production.

Experimental models of HF and hypertension are usually associated with a further end-organ injury. Kidneys are therefore often examined with regards to their role in regulating blood pressure and circulation. The renoprotective effect of EET-A without antihypertensive actions was observed in the study parallel to our experiment (Hrdlička *et al.*, 2019). Therefore, we can conclude that the renoprotective actions of EET-based treatments might contribute to their cardioprotective effects and vice versa.

6. Conclusions

Despite intensive research on the field of cardioprotection against ischemia, the struggle to translate the promising experimental results into clinical practice fails to provide significant improvement in long-term clinical outcomes. This has resulted in overall scepticism regarding the applicability of such experimental protocols of cardioprotection. However, we believe that several cardioprotective protocols used in this thesis, e.g. adaptation to CNH, ExT and EET-based treatment, have certain potential not only to improve the tolerance to acute ischemic insults but also to attenuate the progression of the postischemic HF. Our results have revealed that all these approaches are associated with some beneficial effect; in the case of adaptation to CNH and EET-based therapies, the differences were highly significant.

Based on our results, we can conclude that mechanisms leading to increased cardiac tolerance to acute ischemia could play an important role also in prevention and treatment of postischemic heart failure.

7. Použitá literatura / References

- Ait Mou, Y., Reboul, C., Andre, L., Lacampagne, A., Cazorla, O. (2009) Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 81: 555–564.
- Alánová, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlička, J., Míčová, P., Holzerová, K., Hlaváčková, M., Macháčková, K., Papoušek, F., Vašinová, J., Benák, D., Nováková, O., Kolář, F. (2017) Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 122(6): 1452-1461.
- Alánová, P., Husková, Z., Kopkan, L., Sporková, A., Jíhová, Š., Neckář, J., Imig, J. D., Klevstig, M., Kolář, F., Rami Reddy, N., Falck, J. R., Sadowski, J., Nishiyama, A., Kramer, H. J., Melenovský, V., Červenková, L., Kujal, P., Vernerová, Z., Červenka, L. (2015) Orally active epoxyeicosatrienoic acid analog does not exhibit antihypertensive and reno- or cardioprotective actions in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *Vascul. Pharmacol.* 73: 45-56.
- Asemu, G., Papoušek, F., Ošťádal, B., Kolář, F. (1999) Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31(10): 1821-31.
- Bachmann, S., Peters, J., Engler, E., Ganten, D., Mullins, J. (1992) Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int.* 41(1): 24-36.
- Batchu, S. N., Lee, S.B., Samokhvalov, V., Chaudhary, K.R., El-Sikhry, H., Weldon, S.M., Seubert, J.M. (2012) Novel soluble epoxide hydrolase inhibitor protects mitochondrial function following stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90(6): 811-23.
- Bito, V., de Waard, M.C., Biesmans, L., Lenaerts, I., Ozdemir, S., van Deel, E., Abdel-Mottaleb, Y., Driesen, R., Holemans, P., Duncker, D.J., Sipido, K.R. (2010) Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodelling or hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 86(1): 72-81.
- Campbell, W.B., Imig, J.D., Schmitz, J.M., Falck, J.R. (2017) Orally Active Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70(4): 211-224.
- Cao, J., Tsenovoy, P.L., Thompson, E.A., Falck, J.R., Touchon, R., Sodhi, K., Rezzani, R., Shapiro, J.I., Abraham, N.G. (2015) Agonists of epoxyeicosatrienoic acids reduce infarct size and ameliorate cardiac dysfunction via activation of HO-1 and Wnt1 canonical pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 116-117: 76-86.
- Červenka, L., Husková, Z., Kopkan, L., Kikerlová, S., Sedláková, L., Vaňourková, Z., Alánová, P., Kolář, F., Hammock, B.D., Hwang, S.H., Imig, J.D., Falck, J.R., Sadowski, J., Kompanowska-Jeziarska, E., Neckář, J. (2018) Two pharmacological epoxyeicosatrienoic acid-enhancing therapies are effectively antihypertensive and reduce the severity of ischemic arrhythmias in rats with angiotensin II-dependent hypertension. *J. Hypertens.* 36(6): 1326-1341.
- Chytilová, A., Borchert, G.H., Mandíková-Alánová, P., Hlaváčková, M., Kopkan, L., Khan, M.A., Imig, J.D., Kolář, F., Neckář, J. (2015) Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta. Physiol. (Oxf.)* 214(1): 97-108.
- del Pilar Valle, M., García-Godos, F., Woolcott, O.O., Marticorena, J.M., Rodríguez, V., Gutiérrez, I., Fernández-Dávila, L., Contreras, A., Valdivia, L., Robles, J., Marticorena, E.A. (2006) Improvement of myocardial perfusion in coronary patients after intermittent hypobaric hypoxia. *J. Nucl. Cardiol.* 13(1): 69-74.
- Demirel, H.A., Powers, S.K., Zergeroglu, M.A., Shanely, R.A., Hamilton, K., Coombes, J., Naito, H. (2001) Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J. Appl. Physiol.* (1985) 91(5): 2205-12.

- Ferdinandy, P., Schulz, R., Baxter, G.F. (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev.* 59(4): 418-58.
- Freimann, S., Scheinowitz, M., Yekutieli, D., Feinberg, M.S., Eldar, M., Kessler-Icekson, G. (2005) Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45(6): 931-8.
- Hamilton, K.L., Quindry, J.C., French, J.P., Staib, J., Hughes, J., Mehta, J.L., Powers, S.K. (2004) MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free. Radic. Biol. Med.* 37(9): 1360-8.
- Hrdlička, J., Neckář, J., Papoušek, F., Husková, Z., Kikerlová, S., Vaňourková, Z., Vernerová, Z., Akat, F., Vašinová, J., Hammock, B.D., Hwang, S.H., Imig, J.D., Falck, J.R., Červenka, L., Kolář, F. (2019) Epoxyeicosatrienoic Acid-Based Therapy Attenuates the Progression of Postischemic Heart Failure in Normotensive Sprague-Dawley but Not in Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats. *Front. Pharmacol.* 10: 159.
- Hrdlička, J., Neckář, J., Papoušek, F., Vašinová, J., Alánová, P., Kolář, F. (2016) Beneficial effect of continuous normobaric hypoxia on ventricular dilatation in rats with post-infarction heart failure. *Physiol Res.* 65(5): 867-870.
- Kompa, A.R., Wang, B.H., Xu, G., Zhang, Y., Ho, P.Y., Eisennagel, S., Thalji, R.K., Marino, J.P. Jr, Kelly, D.J., Behm, D.J., Krum, H. (2013) Soluble epoxide hydrolase inhibition exerts beneficial anti-remodeling actions post-myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 167(1): 210-9.
- Lennon, S.L., Quindry, J.C., French, J.P., Kim, S., Mehta, J.L., Powers, S.K. (2004) Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta. Physiol. Scand.* 182(2): 161-9.
- Li, N., Liu, J.Y., Timofeyev, V., Qiu, H., Hwang, S.H., Tuteja, D., Lu, L., Yang, J., Mochida, H., Low, R., Hammock, B.D., Chiamvimonvat, N. (2009) Beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in myocardial infarction model: Insight gained using metabolomic approaches. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47(6): 835-45.
- Lundeberg, T., Kohler, R., Bucinskaite, V., Eriksson, S.V. (1998) Physical exercise increases survival after an experimental myocardial infarction in rats. *Cardiology* 90(1): 28-31.
- Maslov, L.N., Naryzhnaia, N.V., Tsubulnikov, S.Y., Kolar, F., Zhang, Y., Wang, H., Gusakova, A.M., Lishmanov, Y.B. (2013) Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. *Life. Sci.* 93(9-11): 373-9.
- Merabet, N., Bellien, J., Glevarec, E., Nicol, L., Lucas, D., Remy-Jouet, I., Bounoure, F., Dreano, Y., Wecker, D., Thuillez, C., Mulder, P. (2012) Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52(3): 660-6.
- Motoki, A., Merkel, M.J., Packwood, W.H., Cao, Z., Liu, L., Iliff, J., Alkayed, N.J., Van Winkle, D.M. (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): H2128-34.
- Musch, T.I., Moore, R.L., Smaldone, P.G., Riedy, M., Zelis, R. (1989) Cardiac adaptations to endurance training in rats with a chronic myocardial infarction. *J. Appl. Physiol.* (1985) 66(2): 712-9.
- Naghshin, J., Rodriguez, R.H., Davis, E.M., Romano, L.C., McGaffin, K.R., O'Donnell, C.P. (2012) Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure. *J. Appl. Physiol.* (1985). 113(5): 791-8.
- Neckář, J., Hsu, A., Hye Khan, M.A., Gross, G.J., Nithipatikom, K., Cyprová, M., Benák, D., Hlaváčková, M., Sotáková-Kašparová, D., Falck, J.R., Sedmera, D., Kolář, F., Imig, J.D. (2018) Infarct size-limiting effect of epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B is mediated by hypoxia-inducible factor-1 α via downregulation of prolyl hydroxylase 3. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 315(5): H1148-H1158.
- Neckář, J., Hye Khan, M.A., Gross, G.J., Cyprová, M., Hrdlička, J., Kvasilová, A., Falck, J.R., Campbell, W.B., Sedláková, L., Škutová, Š., Olejníčková, V., Gregorovičová, M., Sedmera, D.,

- Kolář, F., Imig, J.D. (2019) Epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B attenuates post-myocardial infarction remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond.)* 133(8): 939-951.
- Neckář, J., Kopkan, L., Husková, Z., Kolář, F., Papoušek, F., Kramer, H.J., Hwang, S.H., Hammock, B.D., Imig, J.D., Malý, J., Netuka, I., Ošťádal, B., Červenka, L. (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): 513-25.
- Noble, E.G., Moraska, A., Mazzeo, R.S., Roth, D.A., Olsson, M.C., Moore, R.L., Fleshner, M. (1999) Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J. Appl. Physiol. (1985)* 86(5): 1696-701.
- Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Fishbein, M.C., Fletcher, P.J., Spadaro, J., Kloner, R.A., Braunwald, E. (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* 44(4): 503-12.
- Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Steinberg, C., Finn, P. (1985) Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 72(2): 406-12.
- Sirish, P., Li, N., Liu, J.Y., Lee, K.S., Hwang, S.H., Qiu, H., Zhao, C., Ma, S.M., López, J.E., Hammock, B.D., Chiamvimonvat, N. (2013) Unique mechanistic insights into the beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in the prevention of cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(14): 5618-23.
- Whaley-Connell, A., Govindarajan, G., Habibi, J., Hayden, M.R., Cooper, S.A., Wei, Y., Ma, L., Qazi, M., Link, D., Karuparthi, P.R., Stump, C., Ferrario, C., Sowers, J.R. (2007) Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(1): E355-63.
- Xu, W.Q., Yu, Z., Xie, Y., Huang, G.Q., Shu, X.H., Zhu, Y., Zhou, Z.N., Yang, H.T. (2011) Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats. *Basic. Res. Cardiol.* 106(3): 329-42.
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., Hori, M. (1999) Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J. Exp. Med.* 189(11): 1699-706.

Publikace pro disertační práci / List of Publications for the Ph.D. Thesis

Hrdlička, J., Neckář, J., Papoušek, F., Vašinová, J., Alánová, P., Kolář, F. (2016) **Beneficial effect of continuous normobaric hypoxia on ventricular dilatation in rats with post-infarction heart failure.** *Physiol Res.* 65(5): 867-870. (IF = 1.461)

Neckář, J., Hye Khan, M.A., Gross, G.J., Cyprová, M., Hrdlička, J., Kvasilová, A., Falck, J.R., Campbell, W.B., Sedláková, L., Škutová, Š., Olejníčková, V., Gregorovičová, M., Sedmera, D., Kolář, F., Imig, J.D. (2019) **Epoxyeicosatrienoic acid analog EET-B attenuates post-myocardial infarction remodeling in spontaneously hypertensive rats.** *Clin. Sci. (Lond.)*. 133(8): 939-951. (IF = 5.223)

Hrdlička, J., Neckář, J., Papoušek, F., Husková, Z., Kikerlová, S., Vaňourková, Z., Vernerová, Z., Akat, F., Vašinová, J., Hammock, B.D., Hwang, S.H., Imig, J.D., Falck, J.R., Červenka, L., Kolář, F. (2019) **Epoxyeicosatrienoic Acid-Based Therapy Attenuates the Progression of Postischemic Heart Failure in Normotensive Sprague-Dawley but Not in Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats.** *Front. Pharmacol.* 10:159. (IF = 4.468)

Ostatní publikace/ Other Publications

Alánová, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlička, J., Míčová, P., Holzerová, K., Hlaváčková, M., Macháčková, K., Papoušek, F., Vašinová, J., Benák, D., Nováková, O., Kolář, F. (2017) **Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia.** *J. Appl. Physiol.* (1985) 122(6): 1452-1461. (IF = 3.256)

Adameová, A., Hrdlička, J., Szobi, A., Farkašová, V., Kopásková, K., Muráriková, M., Neckář, J., Kolář, F., Ravingerová, T., Dhalla, N.S. (2017) **Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95(10): 1163-1169. (IF = 2.210)

Lichý, M., Szobi, A., Hrdlička, J., Horváth, C., Kormanová, V., Rajtík, T., Neckář, J., Kolář, F., Adameová, A. (2019) **Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation.** *J. Cell. Mol. Med.* 23(9): 6429-6441. (IF = 4.658)

Lichý, M., Szobi, A., Hrdlička, J., Neckář, J., Kolář, F., Adameová, A. (2020) **Programmed Cell Death in the Left and Right Ventricle of the Late Phase of Post-Infarction Heart Failure.** *Int. J. Mol. Sci.* 21(20): 7782. (IF = 4.653)