

**Univerzita Karlova  
2. lékařská fakulta**

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**Mgr. Šárka Jíchová**

Úloha metabolitů kyseliny arachidonové  
v regulaci krevního tlaku u experimentálních modelů  
ANG II-dependentní formy hypertenze

The Role of Arachidonic Acid Metabolites  
in Regulation of Blood Pressure in Experimental Models  
of Angiotensin II-Dependent Hypertension

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc. MBA

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26.2. 2020

ŠÁRKA JÍCHOVÁ

Podpis

KARLOVA UNIVERZITA

JÍCHOVÁ, Šárka. *Úloha metabolitů kyseliny arachidonové v regulaci krevního tlaku u experimentálních modelů ANG II-dependentní formy hypertenze. [The Role of Arachidonic Acid Metabolites in Regulation of Blood Pressure in Experimental Models of Angiotensin II-Dependent Hypertension]*. Praha, 2020. 111 s. Dizertační práce (Ph.D.). Institut klinické a experimentální medicíny v Praze, Centrum experimentální medicíny. Školitel Červenka, Luděk.

### **Poděkování**

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Lud'ku Červenkovi, CSc. MBA za odborné vedení, pomoc a cenné rady během celého studia a sepisování této práce.

Děkuji také kolegům z Oddělení kardio-renálního výzkumu Centra experimentální medicíny IKEM za pomoc s prováděním biochemických analýz a zejména pak kolegyním MVDr. Zuzaně Honetschlägerové, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Huskové, Ph.D.

Děkuji také své rodině za podporu a trpělivost v průběhu celého studia, zejména své mamince.

## Abstrakt

**Úvod:** Metabolickou dráhou cytochromů P-450 vznikají z kyseliny arachidonové dvě hlavní skupiny produktů: epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) a 19 a 20-hydroxyeikosatetraenové kyseliny (19- a 20- HETE). Tyto metabolity hrají důležitou roli v regulaci krevního tlaku, zánětlivých reakcích organismu, regulaci vylučování sodíku a dalších důležitých fyziologických procesech.

**Hypotéza:** Naše studie byly založeny na hypotéze, že abnormality v produkci a zároveň funkci těchto metabolitů vznikající cestou cytochromu P450, významným způsobem přispívají k patofyziologii angiotenzin II-dependentní formy hypertenze.

**Cíl:** Zjistit, zda zvýšením koncentrací těchto metabolitů v ledvinné tkáni dosáhneme příznivého účinku výši krevního tlaku u ANG II – dependentního potkaního modelu hypertenze.

**Metodika:** K navýšení koncentrace EETs jsme zvolili dvojí přístup. V první části experimentu jsme podávali inhibitor solubilní epoxidové hydrolázy cAUCB (cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy]benzoová kyselina, 26 mg.l<sup>-1</sup> v pitné vodě), enzymu zodpovědného za inaktivaci biologicky aktivních forem EETs. V druhé části experimentu jsme použili syntetický EETs analog EET-A (sodium 2-(Z-(13-(3-pentyl)ureido)-tridec-8-enamido) malonát) v dávce 10 mg.kg<sup>-1</sup> v pitné vodě. Pro zvýšení renální koncentrace 20-HETE jsme použili fenofibrát (Lipanthyl 265M) v dávce 3,2 g.kg<sup>-1</sup> diety.

**Výsledky:** Léčba sEH i analogem EET-A zmírnila rozvoj maligní hypertenze u našich potkaních modelů, nicméně zřejmě hlavně díky oslabení vazokonstrikční osy RAAS a aktivaci té vazodilatační. Léčba fenofibrátem také skutečně významně oslabovala rozvoj maligní hypertenze, nicméně jsme u těchto zvířat nenaměřili zvýšenou koncentraci 20-HETE, ačkoliv jsme u nich v souladu s literaturou pozorovali aktivaci CYP4A enzymu (zodpovědný za tvorbu 20-HETE u potkanů). Zdá se, že hlavní mechanismus snížení krevního tlaku byl v této části především spojen s interakcí fenofibrátu přímo s genem pro renin Ren2, čímž byla utlumena prohypertenzní osa RAAS.

**Závěr:** Potvrdili jsme naši hypotézu, že intrarenální nedostatek EETs významně přispívá k patofyziologii angiotenzin II-dependentní formy hypertenze u našich potkaních modelů.

**Klíčová slova:** maligní hypertenze, renin-angiotenzin-aldosteronový systém, cytochrom P450, epoxyeikosatrienové kyseliny, 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina, EET-A, solubilní epoxidová hydroláza, fenofibrát

## Abstract

**Introduction:** Two major product groups originate from the arachidonic acid metabolic pathway of cytochromes P450: epoxyeicosatrienoic acid (EETs) and 19 and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (19- and 20-HETE). These metabolites play an important role in the regulation of blood pressure, inflammatory responses, regulation of sodium excretion and other crucial physiological processes.

**Hypothesis:** Our studies were based on the hypothesis that abnormalities in the production and function of these cytochrome P450 metabolites significantly contribute to the pathophysiology of hypertension development, in particular in the angiotensin II-dependent models.

**Objective:** To investigate if the increased bioavailability of the above-mentioned metabolites in the kidney tissue will result in blood pressure reduction in the ANG II - dependent rat model of hypertension.

**Methods:** The two methods to increase the concentration of EETs was chosen. In the first part of the study, we administered a soluble epoxide hydrolase inhibitor cAUCB [cis-4- [4- (3-adamantan-1-yl-ureido) cyclohexyloxy] benzoic acid, at a dose of 26 mg.l<sup>-1</sup> administered in drinking water], an enzyme responsible for inactivation of biologically active forms of EETs. In the second series of the experiments we applied a synthetic EET analogue, called EET-A [(sodium 2- (Z- (13- (3-pentyl) ureido) –tridec-8-enamido) malonate), at a dose of 10 mg.kg<sup>-1</sup> administered in drinking water]. To increase the renal concentration of 20-HETE, we used fenofibrate (Lipanthyl 265M) at a dose of 3.2 g.kg<sup>-1</sup> of food.

**Results:** Both treatments (with cAUCB and EET-A analogue) mitigated the development of malignant hypertension in our rat models, probably due to the suppression of the vasoconstrictive axis and activation of the vasodilatory axis of RAAS. Treatment with fenofibrate also significantly attenuated the development of malignant hypertension, however, we did not observe an increased concentration of 20-HETE in these animals, although we observed the activation of the CYP4A enzyme (responsible for the formation of 20-HETE in rats). We suspect that the main mechanism underlying the blood pressure reduction in this case might be primarily associated with the direct interaction of fenofibrate with the renin Ren2 gene, which resulted in the attenuation of the prohypertensive axis of RAAS.

**Conclusion:** We confirmed that EETs intrarenal deficiency might significantly contribute to the pathophysiology of angiotensin II-dependent form of hypertension in our rat models.

**Key words:** malignant hypertension, renin-angiotensin-aldosterone system, cytochrome P450, epoxyeicosatrienoic acid, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, EET-A, soluble epoxide hydrolase, fenofibrate

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Seznam zkratek</b> .....	9
<b>1 Teoretický úvod</b> .....	11
1.1 Hypertenze .....	11
1.2 Patogeneze hypertenze .....	11
1.3 Regulace krevního tlaku .....	12
1.4 Tlakově-natriuretický mechanismus ledvin .....	13
1.5 Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS) .....	14
1.6 Metabolity kyseliny arachidonové .....	16
1.6.1 Cyklooxygenázová dráha .....	16
1.6.2 Lipoxygenázová dráha .....	16
1.6.3 Dráha cytochromů P450 (CYP) .....	16
1.6.3.1 Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) .....	17
1.6.3.2 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina (20-HETE) .....	21
<b>2 Hypotéza dizertační práce</b> .....	24
<b>3 Cíle dizertační práce</b> .....	24
<b>4 Metody a materiál</b> .....	25
4.1 Pokusná zvířata .....	25
4.1.1 TGR(Ren2)27 potkani .....	25
4.1.2 TGR(CYP1a1-Ren2) potkani .....	26
4.2 Chemikálie a metody .....	26
4.2.1 Stanovení hodnot ANG II, EETs, DHETEs, 20-HETE v plasmě a ledvině .....	27
4.2.2 Stanovení koncentrace albuminu v moči .....	28
4.2.3 Stanovení genové exprese sledovaných genů .....	28
4.2.4 Stanovení proteinové koncentrace CYP4A, CYP2C23 epoxygenázy a sEH v ledvinové kůře .....	29
4.2.5 Stanovení plasmatické reninové aktivity .....	30
4.2.6 Stanovení nitrátů/nitritů v moči .....	30
4.2.7 Příprava materiálu na histologické vyšetření .....	30
4.2.8 Stanovení míry glomerulosklerotického postižení .....	30

4.2.9 Stanovení míry tubulointersticiálního poškození .....	31
4.2.9.1 Statistická analýza .....	31
<b>5 Antihypertenzní účinek inhibice solubilní epoxidové hydrolázy</b>	
<b>u TGR(Ren2)27 potkanů .....</b>	<b>32</b>
5.1 Reakce ledvinového autoregulačního mechanismu průtoku krve ledvinou (RBF), glomerulární filtrace (GFR) a vylučování sodíku na snížený arteriální tlak .....	32
5.1.1 Experimentální protokol .....	32
5.1.2 Chirurgická příprava na akutní experiment s redukcí RPT .....	34
5.1.3 Chirurgická příprava na akutní experiment – kontrolní protokol.....	34
5.1.4 Výsledky .....	36
5.2 Posouzení plasmatických a renálních koncentrací ANG II, EETs, DHETEs a 20-HETE. Stanovení exprese korového CYP2C23 a sEH v ledvině .....	40
5.2.1 Protokol .....	40
5.2.2 Výsledky .....	40
5.3 Diskuze .....	42
5.4 Závěr .....	44
<b>6 Podávání analogu epoxyeikosatrienových kyselin (EET-A) za účelem</b>	
<b>snížení angiotenzin II-dependentní hypertenze .....</b>	<b>45</b>
6.1 Úvod a cíle .....	45
6.2 Účinek preventivní léčby EET-A analogem a ACEi na hodnoty krevního tlaku, albuminurie, absolutního i frakčního vylučování sodíku a orgánové poškození srdce a ledvin .....	45
6.2.1 Protokol .....	45
6.2.2 Technika implantace radiovysílačů .....	46
6.2.3 Výsledky.....	48
6.3 Vliv podávání EET-A a ACEi od začátku indukce hypertenze (preventivní protokol) na aktivitu a produkci jednotlivých komponent RAAS, EETs a 20-HETE v plasmě a ledvinách .....	53
6.3.1 Protokol .....	53
6.3.2 Výsledky .....	54
6.4 Účinek časně léčby EET-A analogem současně od počátku hypertenze na průtok krve ledvinou a glomerulární filtraci .....	62
6.4.1 Protokol .....	62

6.4.2	Výsledky .....	63
6.5	Účinek pozdní léčby EET-A analogem u již plně rozvinuté hypertenze (léčebný protokol) na krevní tlak, hemodynamiku, autoregulaci, exkreční funkce a morfologii ledvin .....	65
6.5.1	Protokol .....	65
6.5.2	Výsledky .....	66
6.6	Diskuze .....	69
6.7	Závěr .....	72
<b>7</b>	<b>Zmírnění hypertenze u angiotenzin II-dependentních hypertenzních potkanů zvýšením produkce 20-HETE v organismu .....</b>	<b>74</b>
7.1	Úvod a cíle .....	74
7.2	Zhodnocení úlohy RAAS a CYP-450 vázané $\omega$ -hydroxylázové dráhy v metabolismu kyseliny arachidonové v časném stádiu rozvoje maligní hypertenze .....	75
7.2.1	Protokol .....	75
7.2.2	Výsledky .....	76
7.3	Účinek léčby fenofibrátem na krevní tlak, RAAS, metabolity kyseliny arachidonové a expresi sledovaných CYP enzymů .....	77
7.3.1	Protokol .....	77
7.3.2	Výsledky .....	78
7.4	Účinek léčby fenofibrátem na renální funkční parametry .....	84
7.4.1	Experimentální protokol .....	84
7.4.2	Kontrolní protokol .....	85
7.4.3	Výsledky .....	85
7.5	Diskuze .....	88
7.6	Závěr .....	89
<b>8</b>	<b>Souhrnná diskuze .....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Summary .....</b>	<b>92</b>
<b>11</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>93</b>
<b>12</b>	<b>Publikační činnost .....</b>	<b>110</b>



## Seznam zkratek

2K1C	2 kidney 1 clip model hypertenze
20-HETE	20-hydroxyeikosatetraenová kyselina
AA	kyselina arachidonová
ACE	angiotenzin I konvertující enzym
ACE2	angiotenzin II konvertující enzym
ACEi	inhibitor ACE
ADH	antidiuretický hormon
ANG 1-7	angiotenzin 1-7
ANG I	angiotenzin I
ANG II	angiotenzin II
AT1 receptor	angiotenzin II receptor 1
cAUCB	inhibitor solubilní epoxidové hydrolázy
COX	cyklooxygenáza
COX-1	cyklooxygenáza 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
CT	prahový cyklus
DHETEs	dihydroxyeikosatrienové kyseliny
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
EET-A	analog epoxyeikosatrienových kyselin
EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
ENaK	epiteliální sodíkový kanál
ET-1	endothelin-1
FE <sub>Na</sub>	frakční vylučování sodíku
GFR	glomerulární filtrace
GSI	glomerulosklerotický index
HanSD	Hannover Sprague-Dawley potkan
HETEs	hydroxyeikosatetraenové kyseliny
IBC	indol-3-karbinol
LOX	lipoxygenáza
LT	leukotrien
LXS	lipoxin

MAP	střední arteriální tlak
MCP-1	monocytický chemoatraktorní protein 1
MK	metabolická klec
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NEP	neprilysin
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NHE-3	$\text{Na}^+/\text{H}^+$ výměník
Nrf-2	nuclear erythroid-related factor-2
OECT	objem extracelulární tekutiny
$\text{O}_2^-$	superoxidový aniont
PCR	periferní cévní rezistence
PG	prostaglandin
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
qPCR	kvantitativní PCR
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RBF	průtok krve ledvinou
RPT	renální perfúzní tlak
sEH	solubilní epoxidová hydroláza
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SV	srdeční výdej
THOP-1	thimet-olygopeptidáza
TI	tubulointersticiální index
TK	krevní tlak
TX	tromboxany
$U_{\text{ISO}}V$	absolutní vylučování 8-isoprostanů
$U_{\text{Na}}V$	absolutní vylučování sodíku
$U_{\text{NO}_x}V$	absolutní vylučování nitrátů/nitritů
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Hypertenze

Hypertenze je chronické onemocnění, které se projevuje dlouhodobým zvýšením krevního tlaku nad 140/90 mmHg. V případech vážné hypertenze může tlak vystoupat až k hodnotám 250/170 mmHg. Závažnost hypertenze je přímo úměrná závažnosti následků. V dlouhodobém časovém úseku však mohou i ty nejmírnější formy hypertenze způsobovat velmi vážná orgánová poškození a tím zkracovat lidský život. Nejzávažnějšími postiženími v důsledku vysokého krevního tlaku jsou:

- 1) zatížení srdce (hypertrofie levé srdeční komory), jímž se následně zvyšuje pravděpodobnost srdečního selhání často končící smrtí pacienta,
- 2) závažné poškození mozkových cév, které zvyšuje pravděpodobnost mozkové mrtvice a poškození ledvin vedoucí až k jejich selhání.

## 1.2 Patogeneze hypertenze

Podle příčin vzniku rozlišujeme hypertenzi na primární (dříve esenciální) a sekundární, která vzniká jako následek nějakého jiného onemocnění (endokrinního, renálního, cévního). V celosvětové populaci převládá primární hypertenze (95 %), na jejímž vzniku se podílí celá řada patogenetických mechanismů (dědičnost, vlivy vnějšího prostředí, porucha endogenních regulačních mechanismů).

Za hlavní příčinu vzniku arteriální hypertenze se na základě desetiletí výzkumů pokládá narušení regulace dvou mechanismů: regulace udržování objemu extracelulární tekutiny = objemově závislá hypertenze nebo regulace periferní cévní resistance = vazokonstrikční hypertenze (Guyton A.C. et al., 1995; Navar L.G. a Majid D.S., 1996).

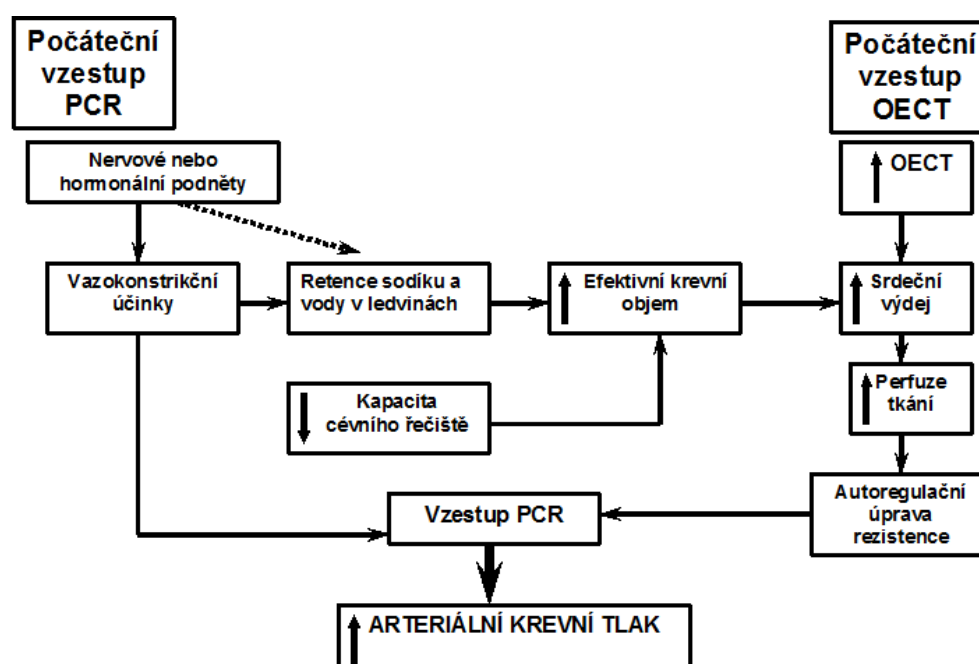
### **Objemově závislá hypertenze**

Za primární příčinu objemově závislé hypertenze se považuje zvýšený minutový výdej srdce. Trvalá hypervolemie se rozvíjí pro nedostatečnost natriurézy a regulace objemu renin-angiotenzin-aldosteronovým systémem (RAAS), antidiuretickým hormonem (ADH) nebo pro sníženou kapacitu glomerulární filtrace. Zvýšení cirkulujícího objemu zvyšuje průtok krve tkáněmi, spouští autoregulaci, která pak zvyšuje cévní rezistenci (Guyton A.C. et al., 1995).

## Vazokonstrikční hypertenze

Porucha autoregulace na tkáňové úrovni vede ke zvýšení periferní cévní rezistence. Nevyváženost nervové, hormonální nebo endoteliální regulace vede k vzestupu hladiny intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a trvalé kontrakci hladké svaloviny stěny cévní (Folkow B., 1982; Navar L.G., 1997).

Problematika příčin vyvolávajících esenciální hypertenzi je značně komplikovaná, jednotlivé mechanismy se navzájem kombinují. Vzájemný vztah mezi regulací obou dvou hlavních typů esenciální hypertenze znázorňuje obr. 1.



Obr. 1 Znázornění dvou hlavních patofyziologických mechanismů hypertenze (volně podle Navara L.G., 1997).

## 1.3 Regulace krevního tlaku

Krevní tlak je funkcí srdečního výdeje (SV) a periferní cévní rezistence (PCR). Účinná regulace krevního tlaku je jedním z hlavních předpokladů udržení homeostázy v organismu. Pro tuto regulaci využívá organismus četných nástrojů, které se jednak liší mechanismem účinku a jednak pohotovostí, s jakou mohou být uplatněny. Zatímco krátkodobé mechanismy se především soustřeďují na omezení srdečního výdeje a regulaci periferní cévní rezistence, dlouhodobé snaží regulovat množství objemu extracelulární tekutiny (OECT). Ta je dána především rovnováhou  $\text{Na}^+$  iontů v organismu.

Rozlišujeme mechanismy:

**1. Krátkodobé (vteřiny – minuty):**

baroreceptorová zpětná vazba,  
ischemický mechanismus centrální nervové soustavy,  
chemoreceptory.

**2. Střednědobé (minuty – hodiny):**

změna objemu intersticiální tekutiny,  
renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS).

**3. Dlouhodobé (hodiny – dny):**

vyučování solí a vody ledvinami (tlakově-natriuretický mechanismus ledvin).

V dnešní době převládá názor, že z hlediska regulace krevního tlaku jsou nejdůležitějšími mechanismy poslední dva zmiňované, čili renin-angiotenzin-aldosteronový systém a tlakově-natriuretický mechanismus ledvin.

## **1.4 Tlakově-natriuretický mechanismus ledvin**

Již v 60. letech minulého století byly provedeny pokusy, které potvrdily velice úzký vztah mezi regulací krevního tlaku a ledvinami. Bylo prokázáno, že zvýšení krevního tlaku je úzce spojeno se sníženou schopností ledvin vyloučit dostatečné množství sodíku (Langstan J.B. et al., 1963; Coleman T.G. a Guyton A.C., 1969; Hall J.E. et al., 1980). Vliv regulace krevního tlaku ledvinami a špatně fungujícího tlakově-natriuretického aparátu na jeho výši byl potvrzen i v mnohých transplantačních studiích. Zvířecím modelům trpícím hypertenzí byly transplantovány ledviny z normotenzního zvířete. Po rekonvalescenci došlo u těchto zvířat k normalizaci tlaku (Kawabe K. et al., 1978; Heller J. et al., 1993). Naopak, transplantace ledvin z hypertenzních zvířat často vedla k rozvoji hypertenze u zdravých zvířat. Ke stejným poznatkům se dospělo i v klinických studiích. U pacientů, kteří získali ledvinový štěp od dárce s genetickými předpoklady k hypertenzi, došlo k nárůstu krevního tlaku. Opačný účinek byl také pozorován v případě hypertenzních pacientů s chronickým selháváním ledvin, kterým se po transplantaci štěpu od normotenzního dárce snížil krevní tlak (Curtis J.J. et al., 1983; Guidi E. et al., 1985; Guidi E. et al., 1996; Leeuw P.W. et al., 1997).

Hlavní princip tohoto mechanismu je založen na přímé úměře mezi renálním perfúzním tlakem (RPT) a vylučováním sodíku. Pokud se akutně zvýší RPT, dojde ke zvýšenému vylučování sodíku. To vyvolá pokles OECT a tím poklesne i systémový tlak. S poklesem systémového tlaku poklesne i RPT a zvýšené vylučování sodíku je zastaveno. Tímto mechanismem jsou ledviny schopny regulovat krevní tlak a udržovat ho v normotenzních hodnotách. Této zpětné vazbě se říká tlakově-natriuretický mechanismus ledvin (Guyton A.C. et al., 1995; Hall J.E. et al., 1999). Vzhledem k tomu, že ke zvýšení vylučování sodíku dochází i za konstantního průtoku krve ledvinou a glomerulární filtrace, tak ke zvýšení natriurézy musí docházet snížením tubulární reabsorpce sodíku (Granger J.P., 1992; Navar L.G. a Majid D.S., 1996).

## 1.5 Renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS)

Hlavními komponenty RAAS jsou angiotenzin II (ANG II), jeho metabolity a aldosteron. Metabolická dráha ANG II začíná v ledvinách, kde je z juxtaglomerulárních buněk uvolňována kyselá proteáza renin, která štěpí angiotenzinový prekurzor angiotenzinogen na angiotenzin I (ANG I). Tento deka-peptid, který vykazuje velmi nízkou aktivitu, slouží především jako zásobárna pro ANG II. Koncentrace reninu je určována glukokortikoidy, hormony štítné žlázy a estrogeny (Ganong W.F., 2005). ANG I je poté angiotenzin I konvertujícím enzymem (ACE) přeměněn na mnohonásobně biologicky aktivnější oktapeptid ANG II, který má zároveň také mnohem kratší poločas rozpadu. ANG II bývá peptidázami degradován během několika sekund (Carey R.M. a Siragy H.M., 2003). V krevních cévách vyvolává vazokonstrikci a ovlivňuje epiteliální reabsorpci soli a vody ve střevě (Navar L.G. et al., 1999). Také stimuluje uvolňování aldosteronu, uvolňování katecholaminů z dřeně nadledvin a ze zakončení sympatických nervů. Stimuluje chuť na slané a pocit žízně. ANG II také přispívá k zánětu a fibróze ledvin, což má za následek změny v renálních funkcích a ve výši krevního tlaku (Siragy H.M., 2006).

Posledním článkem řetězce je aldosteron, který je produkován kůrou nadledvin a jeho produkce je stimulována zvýšenou expresí ANG II. Aldosteron způsobuje zpětnou resorpci  $\text{Na}^+$  iontů a vody v ledvinných tubulech z primární moči a naopak vylučování  $\text{K}^+$  a  $\text{H}^+$  iontů. Mechanismem účinku je jeho podpora syntézy specifické bílkoviny, která se podílí na vstřebávání  $\text{Na}^+$  iontů. Regulace produkce aldosteronu se děje zpětnovazebným mechanismem, tzn. zvýšením tlaku a koncentrací  $\text{Na}^+$  v krvi se produkce aldosteronu brzdí.

Bylo prokázáno, že nepřiměřeně zvýšená aktivita RAAS přispívá k trvalému zvýšení krevního tlaku (TK) a rozvoji tzv. angiotenzin II (ANG II)-dependentní formy hypertenze (Hall J.E. a Brands M.W., 2000; Kobori H. et al., 2007).

Nicméně, kromě dominantně vazokonstrikční dráhy vedoucí od angiotenzinogenu až k ANG II disponuje RAAS ještě neméně důležitou vedlejší metabolickou drahou. Tou je přeměna ANG II působením angiotenzin konvertujícím enzymem 2 (ACE2) na heptapeptid angiotenzin 1-7 (ANG 1-7) (Donoghue M. et al., 2000; Tipnis S.R. et al., 2000). ANG II může být na ANG 1-7 také metabolizován z angiotenzinu I enzymy neprilysinem (NEP) nebo thimet-oligopeptidázami (THOP-1) (Chappell M.C. et al., 1998; Stanziola L. et al., 1999; Campbell D.J. et al., 2004). Nedávné studie prokazují důležitost tohoto heptapeptidu v regulaci krevního tlaku. Jeho účinek je zprostředkován přes Mas receptor spřažený s G-proteinem a tím dochází k aktivaci signálních drah zodpovědných za mnohé pozitivní účinky této druhé větve RAAS (Santos R.A.S. et al., 2003 a 2013). Tyto účinky jsou zcela antagonistické vůči příbuznému ANG II. Dosud u něj byly popsány především vazodilatační účinky na cévní endotel (Brosnihan K.B. et al., 1996). K vazodilataci ANG 1-7 zřejmě dochází díky jím zprostředkovanému uvolňování NO a prostaglandinů (Almeida A.P. et al., 2000). Dále byl popsán jeho pozitivní vliv na snížení pravděpodobnosti vzniku ischemicko-reperfúzní arytmie (De Mello W.C., 2004). Zvýšená koncentrace ANG 1-7 v kardiomyocytech vedla také ke snížení míry hypertrofie levé srdeční komory u hypertenzních zvířecích modelů (Santos R.A.S. et al., 2004). Kromě pozitivního vlivu na kardiovaskulární systém, hraje ANG 1-7 roli i v regulaci filtrační schopnosti ledvin. Bylo prokázáno, že blokuje zpětné vychytávání sodných iontů v nefronu a tím přispívá k natriuríze a diuréze (Simões E Silva A.C. et al., 1998).

V poslední době však přibývá důkazů, že v patofyziologii ANG II-dependentní formy hypertenze má důležitější úlohu interakce RAAS s ostatními vazoaktivními systémy než samotná aktivita RAAS a že porušení rovnováhy mezi vazodilatačními (natriuretickými) a vazokonstrikčními (natriumretenčními) systémy na úrovni ledvin je hlavním mechanismem odpovědným za rozvoj a udržení ANG II-dependentní formy hypertenze (Kobori H. et al., 2007). A právě mezi ostatními vazoaktivními systémy je nyní zdůrazňována úloha metabolitů, které vznikají z kyseliny arachidonové cestou cytochromu P-450 (CYP) (Campbell W.B. a Fleming I., 2010; Williams J.M. et al., 2010; Imig J.D., 2012).

## **1.6 Metabolity kyseliny arachidonové**

Důležitost kyseliny arachidonové (AA) v organismu je již dlouhou dobu známa. Je jednou z hlavních složek plazmatických membrán a je také významným substrátem širokého spektra enzymů, které dávají vzniknout velkému množství různých biologicky aktivních látek (prostaglandiny (PG), tromboxany (TX) aj.). Rozlišujeme tři nejdůležitější metabolické cesty: cyklooxygenázovou dráhu, lipoxygenázovou dráhu a dráhu cytochromů P450 (CYP).

### **1.6.1 Cyklooxygenázová dráha**

Cyklooxygenáza (COX) vytváří z kyseliny arachidonové prostaglandiny. Mají mnoho účinků, které se různí podle typu orgánu. V ledvinách jsou prostaglandiny důležitými přenašeči informace o svalovém tonu, homeostáze solí a vody. Hlavními enzymy této dráhy jsou cyklooxygenáza 1 (COX-1) a cyklooxygenáza 2 (COX-2). COX-2 je především aktivní v ledvinách. Hlavním průlomem, který vyzdvihl potenciální význam eikosanoidů byl objev, že aspirin inhibuje COX enzymy a formování PG (Breyer M.D. et al., 2001; Kroetz D.L. a Zeldin D.C., 2002).

### **1.6.2 Lipoxygenázová dráha**

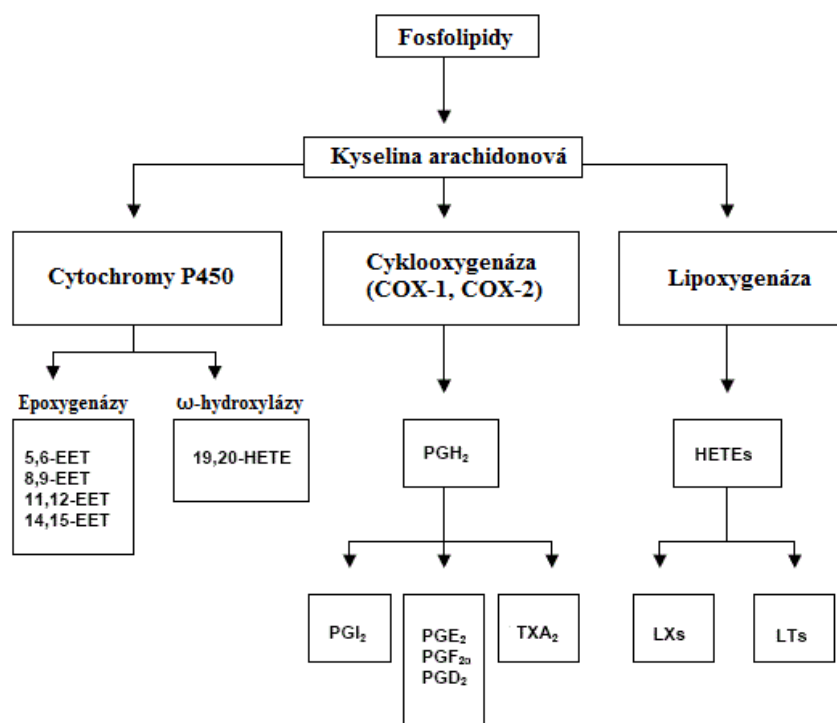
Další cestou je lipoxygenázová dráha (LOX), která je zodpovědná za tvorbu hydroxyeikosatetraenových kyselin (HETEs), lipoxinů (LXS) a leukotrieny (LT). Tyto metabolity jsou zapojeny do plicních reakcí při astmatu, zánětu a aterosklerózy (Sharma J.N. a Mohammed L.A., 2006; Capra V. et al., 2007). LT antagonisté jsou v současné době využívány pro léčbu astmatu (Ribeiro J.D. et al., 2006).

### **1.6.3 Dráha cytochromů P450 (CYP)**

CYP epoxygenázy cytochromu P450 tvoří velkou rodinu enzymů společného původu s konzervovanou prostetickou hemovou skupinou, které katalyzují NADPH-dependentní oxidaci endogenních i exogenních substrátů. Je to velmi rozsáhlá skupina s mnoha podskupinami obsahujícími velké množství enzymů. Jednotlivé enzymy se mezidruhově liší expresí v jednotlivých orgánech i funkcí (Capdevila J. et al., 1981; Imaoka S. et al., 2005), která se ještě věkem může měnit (Li D. et al., 2000). Původně byly první cytochromy P-450 objeveny v játrech, ale později byla jejich exprese prokázána i



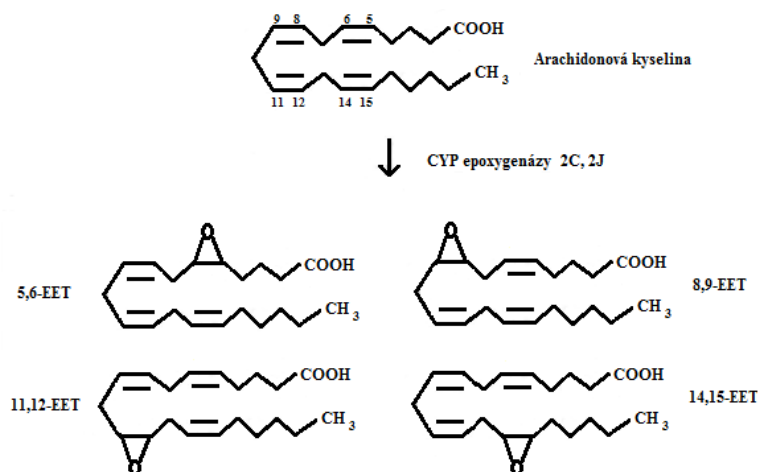
v jiných orgánech (plíce, ledviny, mozek, srdce, pankreas, leukocyty) (Roman R.J., 2002). Metabolickou dráhou cytochromů P-450 vznikají z kyseliny arachidonové dvě hlavní skupiny produktů. Prvními jsou epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs), které vznikají činností CYP s epoxygenázovou aktivitou. Druhými jsou pak 19- a 20-hydroxyeikosatetraenové kyseliny, které vznikají činností  $\omega$ -hydroxylázy. Obě skupiny produktů jsou pak dále upravovány  $\beta$ -oxidací, esterifikací a dalšími reakcemi a dávají vzniknout dalším aktivním metabolitům s rozmanitými funkcemi v organismu. Tyto metabolity hrají důležitou roli v regulaci krevního tlaku, zánětlivých reakcích organismu, regulaci vylučování sodíku a dalších důležitých fyziologických procesech (Roman R.J., 2002; Sarkis A. et al., 2004; Fleming I. a Busse R., 2006).



Obr. 2 Dráhy metabolitů kyseliny arachidonové.

### 1.6.3.1 Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs)

EETs jsou parakrinní látky s významnými vazodilatačními a natriuretickými účinky. Epoxygenázy zodpovědné za tvorbu EETs patří do tříd CYP2C a CYP2J a jsou produkovány endoplasmatickým retikulem (Capdevila J.H. a Falck J.R., 2002). Na kostru arachidonové kyseliny navazují jednu epoxidovou skupinu a podle umístění epoxidové skupiny rozlišujeme čtyři regioizomery: 5,6-EETs, 8,9-EETs, 11,12-EETs a 14,15-EETs (Capdevila J.H. a Falck J.R., 2001).



Obr. 3 Jednotlivé EETs.

Jsou produkovány buňkami endotelu a předpokládá se, že především působí na hladkou svalovinu cév. Jejich účinek je hlavně autokrinní a parakrinní. Hlavní limitací biologického účinku EETs v organismu je jejich rychlé odbourávání solubilní epoxidovou hydrolázou (sEH) na biologicky fakticky neúčinné dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETEs) (Zeldin D.C., 2001; Sudhahar V. et al., 2010). Výjimku tvoří 5,6-EETs, které jsou z velké části rezistentní proti účinku sEH (Morisseau C. a Hammock B.D., 2005; Nayeem M.A. et al., 2010).

## Účinky EETs

### Regulace napětí cévního endotelu

EETs (především 14,15-EETs a 11,12-EETs) jsou hojně syntetizovány v endoteliálních buňkách. Působením bradykininu, acetylcholinu nebo napětíového stresu dochází k jejich uvolnění do okolí buněk (Campbell W.B. et al., 1996; Huang A. et al., 2005; Campbell W.B. a Falck J.R., 2007). EETs poté působí na buňky hladké svaloviny, v nichž navázáním G-proteinu aktivují kalcium-dependentní  $K^+$  kanály (Li P.L. a Campbell W.B., 1997; Gauthier K.M. et al., 2005). Následně dochází k výstupu  $K^+$  z buňky, tím pádem hyperpolarizaci membrány a tím relaxaci svalové buňky. Na tomto principu je založen vazodilatační potenciál EETs (Roman R.J., 2002; Fleming I. a Busse R., 2006; Spector A.A. a Norris A.W., 2007). U potkanů byl tento vazodilatační účinek pozorován v renálním řečišti (Imig J.D. et al., 1996).

## **Vylučování sodíku**

V případě působení EETs na vylučování sodíku byla doložena především aktivita 11,12-EETs (Imig J.D. et al., 1996). Na myších, potkaních i králičích modelech bylo prokázáno, že 11,12-EETs blokují epiteliální vápníkový kanál (ENaK) v kortikálním sběrném kanálku (Capdevila J.H. a Wang W., 2013; Wang W.H. et al., 2014). Tím zabraňují zpětnému vychytávání  $\text{Na}^+$  v této části glomerulu a tudíž přispívají ke zvýšené natriuríze a s ní spojenému snižování krevního tlaku. K dalšímu vylučování  $\text{Na}^+$  přispívají EETs tím, že v proximálním tubulu inhibují  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  výměník (NHE-3) (Staudinger R. et al., 1994; Imig J.D., 2000; Roman R.J., 2002; Dos Santos E.A. et al., 2004; Wei Y. et al., 2004 a 2006).

## **Regulace krevního tlaku**

Díky výše zmíněným schopnostem EETs relaxovat hladké svalové buňky (tím snižovat konstrikci cévního endotelu) a zvyšovat natriurizu v ledvinách byl předpokládán i jejich antihypertenzní potenciál. Ve studiích, kde byla u hypertenzních potkaních modelů (spontánně hypertenzní potkani, potkani krmení vysoko-tukovou dietou) zablokována dráha degradace aktivních EETs inhibicí sEH, byl tento jejich účinek pozorován (Jung O. et al., 2005; Huang H. et al., 2007). Problematika EETs byla (a stále je) intenzivně studována a celá řada nedávných studií (včetně článků naší skupiny) prokázala, že snížená tkáňová dostupnost EETs v důsledku zvýšené aktivity sEH významným způsobem přispívá k patofyziologii hypertenze a hypertenznímu orgánovému poškození (Imig J.D., 2010 a 2012; Honetschlägerová Z. et al., 2011[a] a 2011[b]; Neckář J. et al., 2012; Červenka L. et al., 2018).

## **Kardioprotektivní účinky**

Gen CYP2J2 kóduje hlavní epoxygenázu zodpovědnou za produkci EETs v buňkách lidského srdce (Wu S. et al., 1996). U transgenních myší se zvýšenou expresí tohoto genu (CYP2J2-TG) byl pozorován protektivní účinek vůči arytmií u hypertrofického srdce. Dále pak zvýšená exprese CYP2J2 snižovala citlivost vůči komorové tachykardii při tlakovém přetížení srdce a potlačovala indukovatelnost síňové fibrilace při  $\beta$ -adrenergní stimulaci (Westphal C. et al., 2013). U jiného modelu transgenních myší (sEH knock-out myší) byl pozorován pozitivní účinek na regeneraci srdečního svalu po ischemii a na rozsah ischemicko-reperfúzního poškození (Chaudhary K.R. et al., 2013).

Také na dalších myších, potkaních, králičích a psích modelech byl prokázán pozitivní vliv EETs na rozsah infarktu myokardu, na regeneraci myokardu po ischemii

(Nithipatikom K. et al., 2006; Seubert J.M. et al., 2006; Gauthier K.M. et al., 2007; Neckář J. et al., 2018) a zmírnění ischemicko-reperfúzního poškození (Seubert J.M. et al., 2004 a 2006; Nithipatikom K. et al., 2006). Účinek EETs se pravděpodobně odehrává přes ATP senzitivní K<sup>+</sup> kanály, Ca<sup>2+</sup> aktivované K kanály a PI3K, jak bylo prokázáno použitím specifických inhibitorů (Gross G.J et al., 2013; Chaudhary K.R., et al., 2013; Westphal C. et al., 2013). Dalším kardioprotektivním účinkem, který byl popsán, je schopnost EETs významně přispět k angiogenezi a tím k zotavení postinfarktové srdeční tkáně (Zhao Q. et al., 2018).

### **Kancerogeneze**

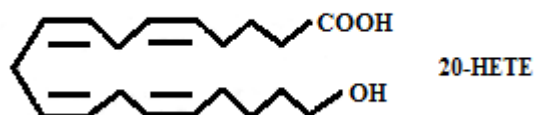
O něco méně pozitivní se ukázala schopnost EETs indukovat angiogenezi přes VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) i u patologických jevů, jako je vaskularizace tumoru (Yang S. et al., 2009). Schopnost indukovat angiogenezi i u nádorů obrátila pozornost mnoha pracovišť na roli EETs v samotném nádorovém onemocnění. Byla popsána stimulační schopnost EETs na nádorový růst a zároveň byla prokázána zvýšená exprese CYP2J2 v mnoha typech nádorů u zvířecích modelů (Jiang J.G. et al., 2007; Yang S. et al., 2009; Pozzi A. et al., 2010; Skrypnik N. et al., 2014).

### **Protizánětlivé účinky**

Kromě výše zmíněných kardio a renoprotektivních účinků byly u EETs pozorovány také zajímavé protizánětlivé účinky. Ať už u transgenních zvířat se zvýšenou expresí CYP2J2 nebo u sEH knock-out zvířat byla v reakci na stimulaci tkáně endotoxinem pozorována snížená zánětlivá odpověď ve srovnání s kontrolními skupinami (Deng Y. et al., 2011; Oni-Orisan A. et al., 2013). Dosavadní výsledky naznačují, že protizánětlivý účinek EETs spočívá ve snížené aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF-κB) signální dráhy, e-selektinu a monocytického chemoatraktorního proteinu 1 (MCP-1) (Oni-Orisan A. et al., 2013). Podobných pozitivních protizánětlivých účinků bylo dosaženo i v jiné práci, která studovala protektivní protizánětlivý účinek 14,15-EETs na plicní endoteliální buňky vystavené kondenzátu cigaretového kouře a tím i následnému riziku rozvinutí chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN). Ve studii bylo prokázáno, že 14,15-EETs tlumily zánětlivou reakci u buněčné linie plicního epitelu v reakci na cigaretový kouřový kondenzát. Princip mechanismu je vysvětlován pozorovanou zvýšenou expresí Nrf-2 (nuclear erythroid-related factor-2). Tento gen je zodpovědný za regulaci skupiny genů s antioxidantními a protizánětlivými funkcemi (Li Y. et al., 2016).

### 1.6.3.2 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina (20-HETE)

Na rozdíl od EETs není vazoaktivní účinek 20-HETE tak jednostranný. U 20-HETE se dají pozorovat účinky obojího typu, jak vazokonstrikční, čili přispívající k hypertenzi, tak natriuretické, které naopak pomáhají hypertenzi zmírňovat. Proto také studium účinku 20-HETE na regulaci krevního tlaku není nijak jednoduché.



Obr. 4 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina.

Předpokládá se, že v periferním cévním a renálním řečišti převládá vazokonstrikční efekt 20-HETE, přičemž v ledvinách způsobuje 20-HETE navíc i natriurézu. Nelze tudíž tak jednoznačně tvrdit, jak tomu bylo u EETs, že zvýšení či naopak snížení koncentrace 20-HETE pozitivně či negativně ovlivní výši krevního tlaku. 20-HETE má dva hlavní typy účinků: vaskulární a renální.

#### Vaskulární účinky 20-HETE

Bylo prokázáno, že 20-HETE je významná vazokonstrikční látka v periferním a obzvláště v renálním řečišti (zde preferenčně způsobuje vazokonstrikci aferentní arterioly s následným poklesem glomerulární filtrace). Odpovědný mechanismus za tuto vazokonstrikci je nyní znám. 20-HETE blokuje sodíkem aktivované draslíkové kanály a zvyšuje vodivost kalciových kanálů L-typu, což obojí ve svém důsledku způsobí vzestup intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a depolarizaci hladkých svalových buněk s následnou vazokonstrikcí (Zou A.P. et al., 1996[a]; Williams J.M. et al., 2010).

20-HETE zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby, což sekundárně přispívá k zachování snížené glomerulární filtrace ledviny vyvolané primárně vazokonstrikčním účinkem 20-HETE na aferentní arteriolu, což ve svém důsledku podporuje retenci sodíku (Zou A.P. et al., 1994; Roman R.J., 2002).

Bylo rovněž prokázáno, že 20-HETE kromě vlastních přímých vazokonstrikčních účinků významně potencují vaskulární reaktivitu pro ANG II a endothelin-1 (ET-1), čímž dále přispívají k vazokonstrikci v odporovém a renálním řečišti (Imig J.D. et al., 2000; Alonso-Galicia M. et al., 2002).

Minimálně u třech experimentálních modelů hypertenze, a to u genetického modelu spontánně hypertenzního potkana (SHR), u modelu androgen-indukované hypertenze a modelu ANG II-infundovaných hypertenzních potkanů, byla prokázána zvýšená koncentrace 20-HETE v periferním a renálním řečišti (Alonso-Galicia M. et al., 2002; Singh H. et al., 2007). Navíc u těchto modelů bylo zjištěno, že chronická farmakologická blokáda tvorby 20-HETE, která prokazatelně snižuje vaskulární koncentrace 20-HETE, vykazovala významné antihypertenzní účinky (Joly E. et al., 2006; Kaergel E. et al., 2002). V neposlední řadě existují studie, které velice přesvědčivě dokazují, že ANG II stimuluje tvorbu 20-HETE v periferním a renálním řečišti a že právě tato zvýšená vaskulární produkce 20-HETE je z velké části odpovědná za dlouhodobé prohypertenzní účinky ANG II u modelů hypertenze, kde je různými mechanismy aktivován RAAS (Williams J.M. et al., 2010; Cheng J. et al., 2012). Všechny tyto výsledky poměrně jednoznačně svědčí o prohypertenzních účincích 20-HETE a po dlouhou dobu byla 20-HETE takto vnímána, avšak tento pohled opomíjel její renální účinky.

### **Renální účinky 20-HETE**

20-HETE inhibuje reabsorpci sodíku v proximálním tubulu mechanismem tlumícím aktivitu  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPázy (Quigley R. et al., 2000; Roman R.J., 2002). 20-HETE také inhibuje reabsorpci sodíku v Henleově kličce mechanismem, který primárně blokuje draslíkový kanál v luminální membráně, což sekundárně způsobuje útlum  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  kotransportéru v tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky (Wang W.H. et al., 1996; Roman R.J., 2002).

U genetického modelu sůl-senzitivní hypertenze (kmene Dahl sůl-senzitivních potkanů) byl prokázán deficit v intrarenální produkci 20-HETE v oblasti vzestupného raménka Henleovy kličky a také bylo prokázáno, že tento deficit přispívá ke zvýšené tubulární reabsorpci sodíku v této oblasti nefronu u daného kmene ve srovnání s kontrolním (tj. sůl-rezistentním) kmenem (Zou A.P. et al., 1996[b]). Rovněž bylo prokázáno, že chronická farmakologická blokáda intrarenální tvorby 20-HETE zhoršila fungování tlakově-natriuretického mechanismu ledviny a následně zhoršila rozvoj sůl-senzitivní formy hypertenze u původně sůl-rezistentního kmene Dahlových potkanů (Hoagland K.M. et al., 2003[a] a 2003[b]). Naopak, buď geneticky nebo farmakologicky navozené zvýšení intrarenální koncentrace 20-HETE zlepšilo fungování tlakově-natriuretického mechanismu ledvin a zmírnilo rozvoj hypertenze u sůl-senzitivního kmene Dahlových potkanů (Alonso-Galicia M. et al., 1998; Hoagland K.M. et al., 2003[a] a 2003[b]; Williams J.M. et al., 2012). Všechny tyto výsledky souhrnně ukazují, že na

úrovni ledvin působí 20-HETE významně natriuretický a to svědčí pro antihypertenzní účinky, tedy minimálně u modelů sůl-senzitivní hypertenze.

Na základě současných znalostí je patrné, že 20-HETE má na jedné straně účinky, které přispívají k rozvoji hypertenze, tzv. prohypertenzní, a to zejména vazokonstrikční účinky 20-HETE na cévní tonus a tubuloglomerulární zpětnou vazbu, a na druhé straně mají účinky, které brání rozvoji hypertenze, a to především natriuretickými účinky 20-HETE na úrovni nefronu ledvin.

Stejně jako u předcházejících EETs je i tento metabolit kyseliny arachidonové dáván do souvislosti s nádorovým onemocněním (především se vznikem metastáz), a to opět především schopností angiogeneze (Chen P. et al., 2005). Kromě podpory tvorby nových cév zřejmě 20-HETE přispívá k samotné proliferační schopnosti rakovinové tkáně. Například, pokud byly buňky lidského gliomu geneticky upraveny tak, aby se zvýšila exprese CYP4A (enzymu zodpovědného za tvorbu 20-HETE) a tím i koncentrace 20-HETE ve tkáni, došlo ke stimulaci proliferace. Pokud byla poté tato tkáň transplantována do mozků potkanů, byl u nich pozorován desetinásobně větší tumor, než u zvířat, kterým byly implantovány buňky gliomu bez úpravy (Guo A.M. et al., 2008).

## **2 Hypotéza dizertační práce**

Naše studie byly založeny na hypotéze, že abnormality v produkci a zároveň funkci metabolitů kyseliny arachidonové, vznikající cestou cytochromu P450, významným způsobem přispívají k patofyziologii angiotenzin II-dependentní formy hypertenze.

## **3 Cíle dizertační práce**

- 3.1 Zjistit, zda zvýšení biologické dostupnosti EETs způsobené bloádou solubilní epoxidové hydrolázy zmírní rozvoj angiotenzin II-dependentní formy hypertenze a přidruženého hypertenzního orgánového poškození.
- 3.2 Zjistit, zda léčba pomocí analogu epoxyeikosatrienových kyselin (EET-A) zmírní rozvoj angiotenzin II-dependentní formy hypertenze a přidruženého hypertenzního orgánového poškození.
- 3.3 Zjistit, zda farmakologicky navozené zvýšení intrarenálních koncentrací 20-HETE zmírní rozvoj angiotenzin II-dependentní formy hypertenze a přidruženého hypertenzního orgánového poškození.



## 4 Metody a materiál

### 4.1 Pokusná zvířata

#### 4.1.1 TGR(Ren2)27 potkani

TGR(Ren2)27 potkani byli prvním transgenním potkaním modelem pro výzkum hypertenze. Vytvořila je laboratoř prof. Mullinse metodou mikroinjekce DBA/2J Ren2 úseku transgenní DNA (myší gen pro renin) do zralého čerstvě oplodněného oocytu Hannover Sprague-Dawley potkana (dále jen HanSD) (Mullins J.J. et al., 1990). Takto upravené oocyty transplantovali do náhradních samic (Langheinrich M. et al., 1996). Narozené potomstvo následně otestovali, zda došlo k úspěšnému začlenění cizorodé DNA do potkaniho genomu. Tato homozygotně transgenní zvířata ve čtyřech týdnech věku začnou rozvíjet hypertenzi, která dosahuje svých maximálních hodnot v devátém týdnu věku zvířat (až 300 mmHg systolického krevního tlaku) (Mullins J.J. et al., 1990). Tito potkani se především používají jako model levostranného srdečního selhání, ke kterému obvykle dochází brzy po dosažení maximálních hodnot tlaku (De Boer R.A. et al., 2004).

Pro naše pokusy jsme používali zvířata heterozygotní, která vznikla zkřížením homozygotního TGR(Ren2)27 samce s transgen-negativní HanSD samicí. Heterozygotní zvířata vykazují mírnější klinické symptomy, tlak ve věku devíti týdnů dosahuje maximálně 240 mmHg a nedochází u nich záhy k srdečnímu selhání. Vložený gen Ren2 je lokalizován na autozómu, tudíž hypertenzi trpí samci i samice. Nicméně byl v míře závažnosti hypertenze výrazný dimorfismus. Samci rozvíjejí hypertenzi průměrně o 30–40 mmHg vyšší (Opočenský M. et al., 2004). Tato skutečnost podporuje teorii stimulačního vlivu androgenů na RAAS (Langheinrich M. et al., 1996; Engler S. et al., 1998). Ve snaze předejít výkyvům ve sledovaných parametrech vlivem estrálních cyklů samic, používali jsme v našich pokusech výhradně samce.

Všechna zvířata byla chována na základě platných směrnic a zavedené praxe v Centru experimentální medicíny IKEM a pocházela z chovných párů poskytnutých Max Delbrück Center for Molecular Medicine (Berlin, Německo). Zvířata byla chována v cyklu světlo/tma (12 h světlo a 12 h tma) a krmena standardní normoslanou dietou (0,45% NaCl, 19–21% obsah proteinů) pro laboratorní potkany vyrobenou firmou SEMED (Praha, ČR).

#### 4.1.2 TGR(CYP1a1-Ren2) potkani

V roce 2001 vytvořila skupina prof. Mullinse další potkaní model hypertenze tzv. TGR(CYP1a1-Ren2) potkany. Do DNA potkana byl opět vložen gen pro myší renin Ren2 s tím rozdílem, že byl ještě před něj umístěn CYP1a1 promotor. Tento promotor není kontinuálně exprimován, i když katalyzuje oxidaci velkého množství endogenních lipofilních sloučenin a xenobiotik, ale jeho produkce roste v přítomnosti různých aryl-uhlovodíků, např. indol-3-karbinolu (I3C) (Mitchell K.D. et al., 2006). I3C se přirozeně vyskytuje v rostlinách z čeledi brukvovitých – Brassicaceae (Minich D.M. a Bland J.S., 2007). Toto uspořádání umožňuje u tohoto kmene řídit expresi vloženého transgenu aktivací promotoru podáním určité látky v dietě (Kantachavesiri S. et al., 2001). Transgenní renin Ren2 byl vložen do Y-chromozómu, tudíž jsou jeho nositeli pouze samci.

V našich pokusech jsme zvířatům indukovali hypertenzi přidáním indol-3-karbinolu (0,3% I3C) do standardní diety. Potkani již čtvrtý den od začátku indukce začali vykazovat klinické příznaky vážné hypertenze (úbytek váhy, polyurie) a po týdnu indukce již dosahovali hodnot kolem 200 mmHg středního arteriálního tlaku (MAP). Tento chorobný stav si zvířata udržela po celou dobu administrace I3C v dietě. Po odebrání I3C z potravy potkanům by tlak postupně opět klesal až k normotenzním hodnotám, pokud již během hypertenzní periody nedošlo k vážnému orgánovému poškození. V nepřítomnosti I3C v potravě byla zvířata zcela normotenzní, nevykazovala žádné známky onemocnění a sloužila jako normotenzní kontroly (Kantachavesiri S. et al., 2001).

Všechna zvířata byla chována na základě platných směrnic a zavedené praxe v Centru experimentální medicíny IKEM a pocházela z chovných párů poskytnutých Center of Cardiovascular Science (University of Edinburgh, UK). Zvířata byla chována v cyklu světlo/tma (12 h světlo a 12 h tma) a krmena standardní normoslanou dietou (0,45% NaCl, 19–21% obsah proteinů) pro laboratorní potkany vyrobenou firmou SEMED (Praha, ČR).

## 4.2 Chemikálie a metody

**cAUCB:** inhibitor sEH (cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy] benzoová kyselina). Roztok inhibitoru jsme připravili rozpuštěním 26 ml krystalického cAUCB v 5 ml etanolu (Penta, Praha, ČR) a 150 mg (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrinu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Do roztoku jsme přidali hydrogen uhličitán sodný (3 ml.l<sup>-1</sup>) pro zachování zásaditého pH roztoku. Poté jsme roztok 5 min sonikovali. Roztok byl podáván v pitné lahvi ad libitum. Tento protokol přípravy i dávka byl používán již v našich

předešlých studiích (Honetschlägerová Z. et al., 2011[a] a 2011[b]; Sporková A. et al., 2011), v nichž jsme si ověřili, že je koncentrace cAUCB pro maximální antihypertenzní účinek dostatečná.

**fenofibrát:** komerční název Lipanthyl 267M (Laboratories Fournier S.A., Dijon, Francie) jsme u vybraných skupin potkanů přimíchali do standardní diety v koncentraci 3,2 g fenofibrátu/1 kg diety. Monitorovali jsme jak tělesnou hmotnost, tak množství zkonsumované potravy, abychom si byli jisti, že potkani přijímali denní dávku fenofibrátu v koncentraci  $188 \pm 2,9$  mg fenofibrátu/kg hmotnosti zvířete. Tato dávka již byla odzkoušena předešlými studiemi jakožto dostačující pro účinnou aktivaci CYP4A enzymu (Wilson T.W. et al., 1998; Shatara R.K. et al., 2000).

**dieta s indol-3-karbinolem:** standardní dieta s obsahem 0,3% indol-3-karbinolu byla připravena firmou SEMED (Praha, ČR).

**analog 14,15-epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A):** chemický vzorec je sodium 2-(Z-(13-(3-pentyl)ureido)-tridec-8-enamido) malonát a v předešlých studiích bylo prokázáno, že je vhodný pro in vivo experimenty (Imig J.D. et al., 2010). EET-A jsme podávali v pitné vodě v koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  tělesné hmotnosti. Tato koncentrace byla dříve ověřena jako účinná farmakokinetickými a následně in vivo studiemi (Falck J.R. et al., 2009; Imig J.D. et al., 2010; Hye Khan M.A. et al., 2014). Navíc naše předběžná data ukazovala, že tato dávka je dostatečná pro dosažení plasmatické koncentrace EET-A  $IC_{50}$ . EET-A analog byl vytvořen firmou J.R.F.'s laboratory.

**inhibitor ACE (ACEi):** pro inhibici angiotenzin konvertujícího enzymu jsme použili běžně dostupné a klinicky užívané farmakum Gopten 2 mg (Abbot, Praha, ČR). Účinnou látkou je trandolaprilum. Léčivo jsme podávali potkanů v pitné vodě, ad libitum, v koncentraci 6 mg/l. Jak výsledky této práce potvrdily, dávka byla dostatečná pro plnou blokádu rozvoje hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů po indukci hypertenze I3C.

#### 4.2.1 Stanovení hodnot ANG II, EETs, DHETEs, 20-HETE v plasmě a ledvině

Zvířata jsme usmrtili dekapitací a ihned jsme jim odebrali plnou krev do předchlazené zkumavky (4 °C) obsahující inhibitory (5 mmol/l EDTA, 10 μmol/l pepstatinu, 1,25 mmol/l 1,10-phenanthrolinu). Izolované ledviny jsme osušili a zvážili. Tkáň z jedné ledviny jsme použili pro stanovení koncentrace ANG II. Ledvinu jsme homogenizovali v předchlazeném metanolu. Vzorke krve i homogenizované tkáně jsme centrifugovali 10 min při 3 000 x g a 4 °C. Oddělenou plasmu jsme vysráželi v předchlazeném etanolu (4 °C) a centrifugovali jsme ji 10 min 3 000 x g při 4 °C.

Supernatanty jsme vysušili ve vakuové centrifuze (SpeedVac Concentrator SPD101B, Savant Instruments, New York, USA) a uložili do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další zpracování. Plasmatickou a renální koncentraci ANG II jsme změřili radioimunologicky pomocí komerčního kitu (Euro-Diagnostika Co., Malmö, Švédsko) (Kopkan L. et al., 2005; Vaňourková Z. et al., 2006; Husková Z. et al., 2010). Koncentrace EETs, DHETEs a 20-HETE v ledvinové kůře jsme nechali stanovit metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC – MS/MS) (Imig J.D. et al., 2005; Huang H. et al., 2007) firmou Lipidomix GmbH (Berlin, Německo).

#### 4.2.2 Stanovení koncentrace albuminu v moči

Koncentraci albuminu v moči potkanů jsme měřili pomocí komerčně dodávaného kitu Rat Albumin ELISA Kit (AssayMax<sup>TM</sup>, St. Charles, MO, USA).

#### 4.2.3 Stanovení genové exprese sledovaných genů

Celkovou RNA jsme extrahovali z jaterní tkáně pomocí RNAzol® RT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) podle pokynů výrobce. Čistotu a koncentraci RNA jsme stanovili pomocí spektrofotometru (DeNovix, Inc., Wilmington, DE, USA). Nejprve jsme celkovou RNA převedli reverzní transkripcí do cDNA a poté jsme stanovili relativní expresi kvantifikací za použití kitu One Step SYBR® PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit II (TAKARA BIO INC, Shiga, Japonsko) v celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$ . Všechny vzorky byly analyzovány v tripletech. Primery byly navrženy softwarem Primer3 (verze 4.0.0) (Koressaar T. a Remm M., 2007; Untergasser A. et al., 2012).

Sekvence primerů byly:

CYP4A: foward 5' - CTCTTACTTGCCAGAATGGAG -3'  
reverz 5' - GACTTGGATACCCTTGGGTA -3'

CYP2C23: foward 5' - GATGCTGTCTTCCGTCATGC -3'  
reverz 5' - GTAATAGGCTTGATGTCAAG -3'

Ren2: foward 5' - GCCTCAGCAAGACTGATTCC -3'  
reverz 5' - ATATTCATGTAGCTCTTCCC -3'

Mas-r: foward 5' - CATCTCTCCTCTCGGCTTTG -3'  
reverz 5' - CCTCATCCGGAAGCAAAGG -3'

ACE: foward 5' - TCCTATTCCCGCTCATCTGC -3'  
reverz 5' - CCAGCCCTTCTGTACCATT -3'

ACE2: foward 5' - GAATGCGACCATCAAGCGTC -3'  
 reverz 5' - CAAGCCCAGAGCCTACGAT -3'

AT1<sub>(A+B)</sub>: foward 5' - CCAAGATGACTGCCCCAAG -3'  
 reverz 5' - ATCACCACCAAGCTGTTTCC -3'

β-aktin: foward 5' - TGA CTGACTACCTCATGAAGA -3'  
 reverz 5' - CACGTCACACTTCATGATG -3'

PCR amplifikace jsme prováděli s použitím ViiA™7 Real-time PCR systému (Applied Biosystems, Life Biotechnology, Carlsbad, CA, USA) podle reakčních parametrů doporučených výrobcem, za použití 100 ng RNA na reakci. Jako endogenní kontrolní gen jsme použili β-aktin a negativní kontroly obsahovaly vodu místo cDNA. Ve všech experimentech byla vypočtena relativní exprese genu metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , která je často používanou metodou pro relativní kvantifikaci v experimentech qPCR (Winer J. et al., 1999; Schmittgen T.D. et al., 2000; Livak K.J. a Schmittgen T.D., 2001).

Ct (prahový cyklus) je cyklus, při kterém hladina fluorescence dosáhne určité hodnoty (práh). Tato metoda přímo využívá Ct informace generované ze systému qPCR pro výpočet relativní genové exprese v cílových a referenčních vzorcích s použitím referenčního genu jako normalizátoru. Za normalizátory byly použity housekeeping geny, jako je β-aktin (GAPDH, 18S rRNA), protože jejich hladiny exprese zůstávají relativně stabilní v reakci na jakoukoli léčbu (Livak K.J. a Schmittgen T.D., 2001; Bas A. et al., 2004; Morse D.L. et al., 2005). Konečné výsledky jsme vyjádřili jako n-násobný rozdíl v genové expresi mezi β-aktinovou mRNA a kalibrační mRNA takto:

$$\text{násobek genové exprese} = \sqrt{-\Delta\Delta Ct}$$

kde  $\Delta Ct$  hodnoty každého vzorku a kalibrátoru byly stanoveny odečtením průměrné hodnoty Ct mRNA β-aktinu od průměrné hodnoty Ct cílového genu.

#### **4.2.4 Stanovení proteinové koncentrace CYP4A, CYP2C23 epoxygenázy a sEH v ledvinové kůře**

Proteinovou expresi CYP4A, CYP2C23 a sEH (protilátky: ab140635, ab53944, ab96695, ABCAM, Cambridge, UK) jsme stanovili metodou Westernblot (Zhao X. et al., 2004; Ai D. et al., 2007; Huang H. et al., 2007) pomocí chemiluminiscenčního činidla ECL

(GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Bloty jsme nasníмали luminiscenčním analyzátořem (LAS-33 3000, FUJI PHOTO FILM CO, Tokyo, Japonsko). Denzitometřicky jsme zhodnotili intenzitu jednotlivých vzorků a normalizovali jsme s kontrolním proteinem  $\beta$ -aktinem (protilátka: ab8227, ABCAM, Cambridge, UK).

#### 4.2.5 Stanovení plasmatické reninové aktivity

Získanou plasmu jsme analyzovali pro stanovení reninové aktivity metodou nepřímé radioimunoanalýzy dle instrukcí dodavatele komerčního kitu (REN-CT2, CIS Bio International, Saclay, Francie). Výsledky byly vyjádřeny jako ng/ml/h z vytvořeného ANG I (Véniant M. et al., 1995; Campbell D.J. et al., 2009).

#### 4.2.6 Stanovení nitrátů/nitritů v moči

Koncentraci nitrátů/nitritů (Nox) jsme změřili kolorimetřicky za použití komerčního kitu (Assay design, Ann Arbor, MI, USA).

#### 4.2.7 Příprava materiálu na histologické vyšetřeni

Ledvinovou tkáň jsme fixovali ve 4% paraformaldehydu a parafinu, rozdělili jsme ji na 4  $\mu$ m řízky a obarvili pro demonstraci glykogenových a kolagenových depozit.

#### 4.2.8 Stanovení míry glomerulosklerotického postižení

Náhodně jsme vybrali sto nabarvených glomerulů a stupeň glomerulárního poškození jsme stanovili semikvantitativní metodou bodování (Maric C. et al., 2004): stupeň 0, normální glomeruly; stupeň 1, sklerotická oblast až 25% (minimální skleróza); stupeň 2, sklerotická oblast 25–50% (střední skleróza); stupeň 3, sklerotická oblast 50–75% (středně těžká skleróza); stupeň 4, sklerotická oblast 75–100% (těžká skleróza). Glomerulosklerotický index (GSI) jsme vypočetli použitím následujícího vzorce:

$$GSI = \frac{(1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times n4)}{n0 + n1 + n2 + n3 + n4}$$

kde  $n_x$  je počet glomerulů v každém stupni glomerulosklerózy. Tuto analýzu provedl pozorovatel bez znalosti rozdělení zvířat do léčených/neléčených skupin.

#### **4.2.9 Stanovení míry tubulointersticiálního poškození**

Kortikální tubulointersticiální poškození jsme hodnotili dle definice prof. Nakana pro hodnocení míry zánětlivé buněčné infiltrace, tubulární dilatace, atrofie a intersticiální fibrózy (Nakano Y. et al., 2008). Míru poškození jsme stanovovali semikvantitativně pomocí následující stupnice: stupeň 0, žádné abnormální nálezy; 1, mírný (<25 % kůry); 2, střední (25–50 % kůry); 3, těžké (>50 % kůry). Léze jsme hodnotili v minimálně 30 náhodných a nepřekrývajících se polích ledvinové kůry.

#### **4.2.10 Statistická analýza**

Všechny hodnoty jsme vyjádřili jako průměr  $\pm$  SEM. Všechny výsledky jsme zpracovali za pomoci programu Graph-PadPrism7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) pomocí Student's t-testu, Wilcoxonova testu pro nepárová data, popřípadě metodou jednocestná ANOVA. Ke statistickému vyhodnocení v rámci skupin jsme použili dvoucestnou metodu ANOVA pro opakovaná měření pomocí Tukey-Kramerova testu (pro analýzu autoregulace průtoku krve ledvinou (renal blood flow; RBF) a glomerulární filtrace (glomerular filtration rate; GFR). Hodnoty překračující 95% hranici pravděpodobnosti ( $p < 0,05$ ) jsme považovali za statisticky významné.

## **5 Antihypertenzní účinek inhibice solubilní epoxidové hydrolázy u TGR(Ren2)27 potkanů**

Vědecké studie za poslední tři desetiletí zjistily, že EETs mají významné biologické účinky na regulaci cévního tonu a zejména na kontrolu renálního tubulárního transportu sodíku (Roman R.J., 2002; Campbell W.B. a Fleming I., 2010; Imig J.D. et al., 2012). Bylo prokázáno, že EETs způsobují vazodilataci stimulací vápníkem řízených draslíkových kanálů (Li P.L. a Campbell W.B., 1997; Roman R.J., 2002; Campbell W.B. a Fleming I., 2010). EETs jsou také považovány za další z endotelin odvozených hyperpolarizačních faktorů, které zprostředkovávají vazodilataci zcela nezávislou na prostaglandinech a oxidu dusnatém. Jejich působení je zcela protichůdné vazokonstrikčnímu účinku ANG II (Kohagura K. et al., 2000; Wang D. et al., 2003; Lee C.R. et al., 2010; Imig J.D., 2012). Antihypertenzní potenciál EETs je limitován jejich rychlým odbouráváním solubilní epoxidovou hydrolázou (sEH). Tento enzym přeměňuje bioaktivní EETs na dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETEs) s téměř nulovou aktivitou (Yu Z. et al., 2000).

V této části práce jsme chtěli ověřit antihypertenzní účinky EETs u angiotenzin II-dependentního potkaního modelu hypertenze tím, že jsme sEH inhibovali, abychom tak dosáhli zvýšené koncentrace EETs v ledvinách a tím posílili jejich antihypertenzní účinek (Honetschlägerová Z. et al., 2011[a] a 2011[b]; Sporková A. et al., 2011; Neckář J. et al., 2012). Předpokládali jsme, že hypertenzní zvíře bude po bloádě sEH vykazovat snížení systémového tlaku, a to především díky zlepšenému fungování tlakově-natriuretického mechanismu ledvin.

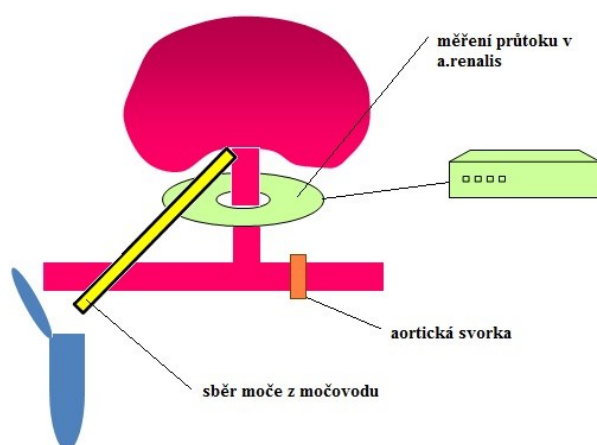
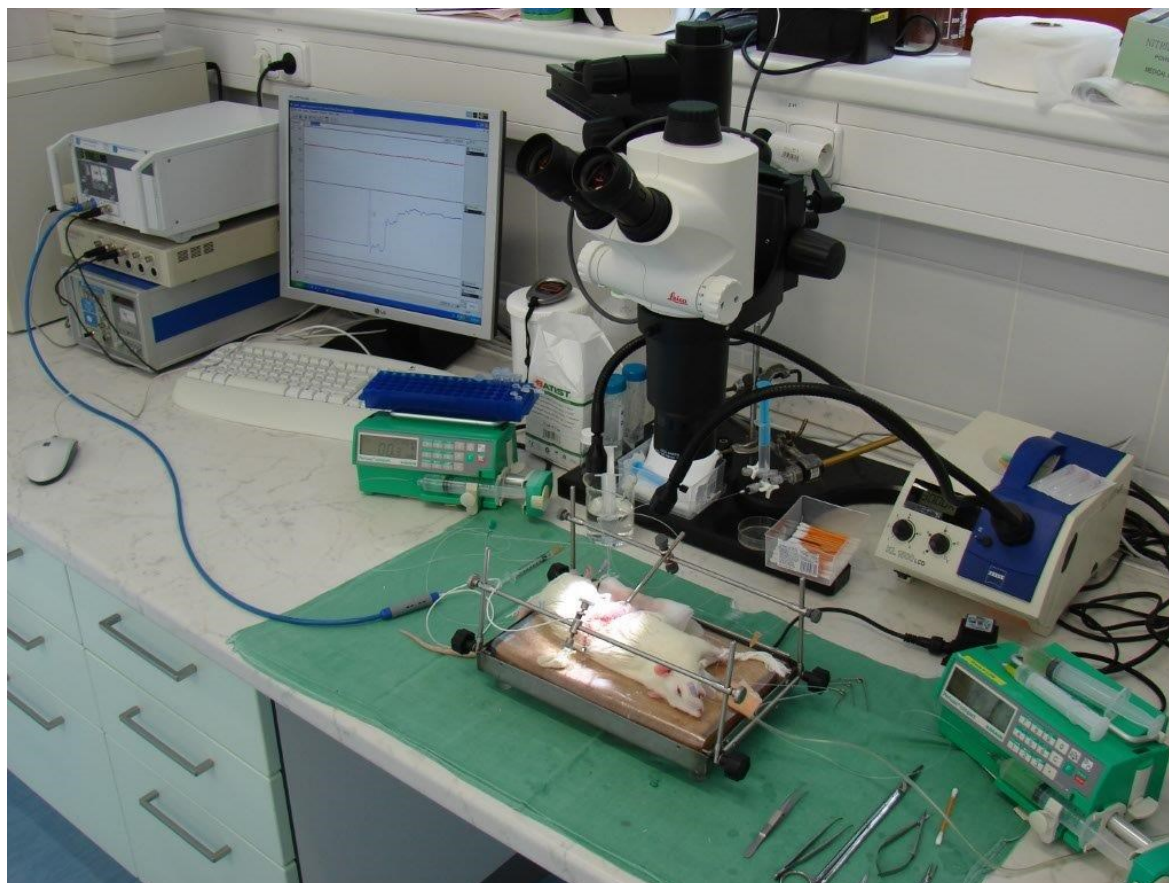
### **5.1 Reakce ledvinového autoregulačního mechanismu průtoku krve ledvinou (RBF), glomerulární filtrace (GFR) a vylučování sodíku na snížený arteriální tlak**

#### **5.1.1 Experimentální protokol**

V pokusu jsme použili 86–90 dní staré samce potkanů kmene TGR(Ren2)27. Jako kontrolní zvířata jsme použili stejně staré samce kmene HanSD. Potkani byli rozděleni do osmi experimentálních skupin. Čtyřem skupinám jsme dva dny před začátkem experimentu



podali inhibitor sEH cAUCB (cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy] benzoová kyselina) o koncentraci 26 mg.l<sup>-1</sup> v pitné vodě. Protokol pro testování autoregulačních schopností ledviny byl již dříve popsán (Wang C.T. et al., 2000) a v pracích naší laboratoře také opakovaně použit (Erbanová M. et al., 2009; Honetschlägerová Z. et al., 2011[a]; Sporková A. et al., 2011).



Obr. 5 Ilustrační foto potkana při akutním autoregulačním pokusu. Zvíře leží v narkóze na vyhřívaném stolku, má nasazenou aortální svorku pro regulaci renálního perfúzního tlaku, průtokovou sondu na měření RBF a má katetrizovaný močovod pro sběr moče během periody.

Obr. 6 Schéma izolované ledviny.

### **5.1.2 Chirurgická příprava na akutní experiment s redukcí RPT**

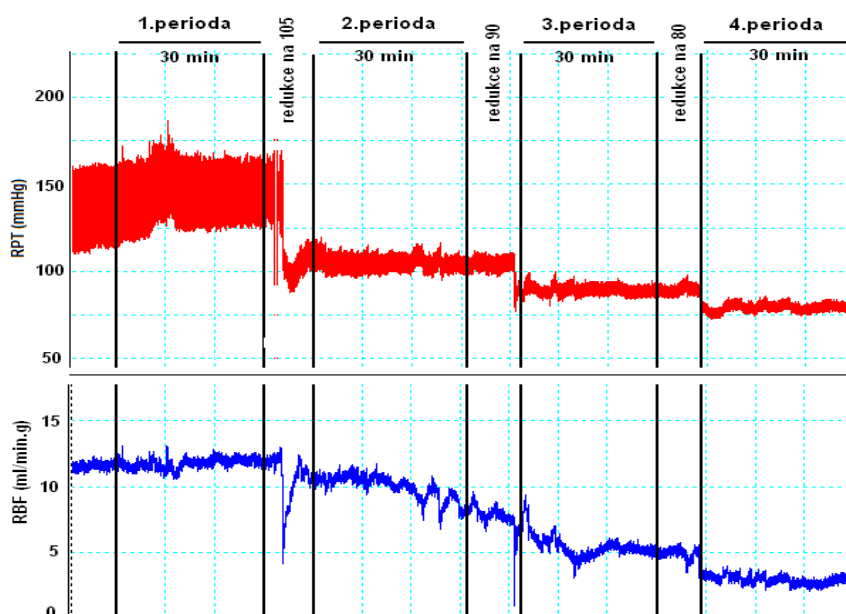
Zvířata jsme na začátku pokusu uvedli do celkové anestézie Thiopentalem (50 mg/kg, VUAB pharma, Roztoky, ČR) a uložili na termoregulační operační stolky. Pro zajištění volného dýchání jsme zvířeti provedli tracheostomii. Na tracheální trubičku jsme umístili nástavec s přívodem 95% kyslíku, 5% oxidu uhličitého. Pravou jugulární artérii jsme katetřovali PE-50 katetrem za účelem infuze fyziologického roztoku (0,9% NaCl, B. Braun, Melsungen, Německo) doplněného o bovinní albumin (6%, Sigma Chemicals Co, Praha, ČR), abychom zajistili dostatečné zavodnění organismu a administraci anestetik. Do pravé femorální arterie v oblasti třísla jsme zavedli PE-50 katetr pro monitorování krevního tlaku během pokusu (PowerLab/4SP, ADInstruments, Oxford, UK) a pro odebírání vzorků krve v jednotlivých experimentálních periodách. Zvířeti jsme izolovali levou ledvinu a na levou renální arterii nasadili průtokovou sondu (1RB, Transonic Systems, Altron Medical Electronic GmbH, Německo) pro měření průtoku krve ledvinou. Pro sběr moči během pokusu jsme katetřovali levý močovod PE-10 katetrem. Po postoperační ekvilibraci (50 min) jsme vyměnili potkanovi infuzní roztok s obsahem fyziologického roztoku za roztok s albuminem a polyfruktosanem inulinem (7,5%, Inutest, Laevosan, Linz, Rakousko), abychom mohli stanovit glomerulární filtraci v jednotlivých částech pokusu. Měřili jsme 4 clearencové periody po 30 minutách, během nichž byl potkanovi postupně snižován renální perfúzní tlak (RPT) pomocí aortální svorky na 105 mmHg, 90 mmHg a 80 mmHg. Během pokusu jsme měřili potkanovi střední arteriální tlak, průtok krve ledvinou a odebírali vzorky moče a krve na stanovení hodnot glomerulární filtrace, vylučování sodíku a množství vyloučené moče. Po skončení těchto period jsme ukončili pokus předávkováním zvířete vysokou dávkou Thiopentalu, který způsobil bezbolestné a nestresující utracení.

### **5.1.3 Chirurgická příprava na akutní experiment – kontrolní protokol**

Pro stanovení vlivu chirurgie a samotného experimentu (především jeho délky) na hemodynamiku ledvin jsme provedli nejprve u čtyř skupin zvířat kontrolní protokol, který zahrnoval celý chirurgický postup (viz kap.5.1.2) a po ekvilibraci byly měřeny také čtyři clearencové periody, ale bez redukce RPT.

Zvířata jsme rozdělili do těchto experimentálních skupin:

- 1) normotenzní kontrolní protokol (n = 10)
- 2) normotenzní + cAUCB kontrolní protokol (n = 9)
- 3) hypertenzní kontrolní protokol (n = 10)
- 4) hypertenzní + cAUCB kontrolní protokol (n = 11)
- 5) normotenzní experimentální protokol (n = 9)
- 6) normotenzní + cAUCB experimentální protokol (n = 9)
- 7) hypertenzní experimentální protokol (n = 12)
- 8) hypertenzní + cAUCB experimentální protokol (n = 12)



Obr. 7 Časový záznam průběhu hodnot středního arteriálního tlaku měřeného ve femorální artérii (červená křivka) a průtoku krve a. renalis (modrá křivka).

Míru glomerulární filtrace jsme měřili kolorimetricky pomocí podávaného polyfruktosanu. Objem vyloučené moče byl měřen gravimetricky sběrem během každé sledované periody. Z těchto vzorků jsme následně stanovili i množství vyloučeného sodíku metodou plamenové fotometrie (BWB-BIO Flame Photometer, BWB Technologies Ltd. Newbury, UK). Autoregulační index pro průtok krve ledvinou jsme vypočítali dříve popsanou metodou dle vzorce  $\frac{[RBF_2 - RBF_1]}{[RPT_2 - RPT_1]}$  (Semple S.J. a De Wardener H.E., 1959). Stejného vzorce jsme použili i pro výpočet autoregulačního indexu GFR. Hodnoty kolem

nuly představovaly ideální autoregulaci, čím byly hodnoty vyšší, tím větší bylo narušení autoregulačního mechanismu ledvin.

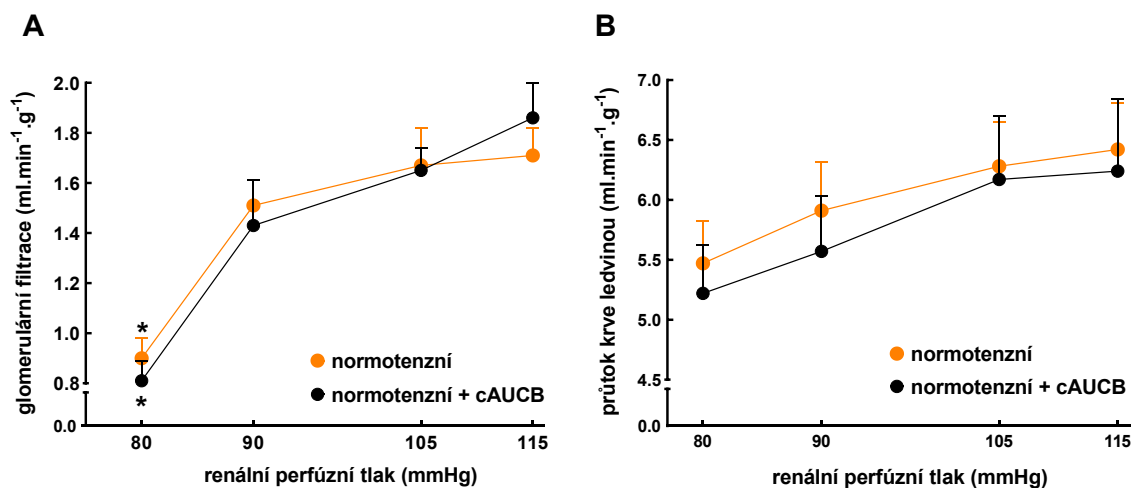
#### 5.1.4 Výsledky

Všechny počáteční hodnoty (1. perioda) středního arteriálního tlaku, průtoku krve ledvinou, glomerulární filtrace, natriurézy i frakčního vylučování sodíku před začátkem cíleného snižování RPT jsme zaznamenali v tabulce 1. Dle předpokladu, hypertenzní neléčení potkani měli vysoký střední arteriální tlak a úměrně tomu i významně zvýšenou diurézu. Naproti tomu, hypertenzní zvířata, která byla před samotným pokusem zaléčena inhibítorem sEH, nevykazovala žádné známky hypertenze a střední arteriální tlak měla jen lehce zvýšený oproti kontrolním skupinám. Léčení hypertenzní potkani měli také nezměněné hodnoty diurézy a oproti ostatním skupinám vykazovali významně sníženou natriurézu. Samotná léčba inhibítorem neměla žádný vliv na hodnoty měřené u kontrolních normotenzních zvířat.

Bazální hodnoty	normotenzní	normotenzní + cAUCB	hypertenzní	hypertenzní + cAUCB
tělesná hmotnost (g)	327 ± 10	332 ± 9	340 ± 11	345 ± 12
MAP (mmHg)	110 ± 3	113 ± 2	149 ± 3 <sup>@</sup>	123 ± 3*
GFR (ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,61 ± 0,17	1,83 ± 0,19	1,93 ± 0,27	1,85 ± 0,14
RBF (ml.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	6,18 ± 0,22	5,91 ± 0,45	7,42 ± 0,62	7,39 ± 0,61
U <sub>Na</sub> V (μmol.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,09 ± 0,37	0,98 ± 0,35	1,75 ± 0,36	0,54 ± 0,09*
FE <sub>Na</sub> (%)	0,91 ± 0,26	0,84 ± 0,22	1,27 ± 0,26	0,49 ± 0,08*
diuréza (μl.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	11,86 ± 2,94	9,98 ± 2,65	18,42 ± 2,42*	9,12 ± 1,49

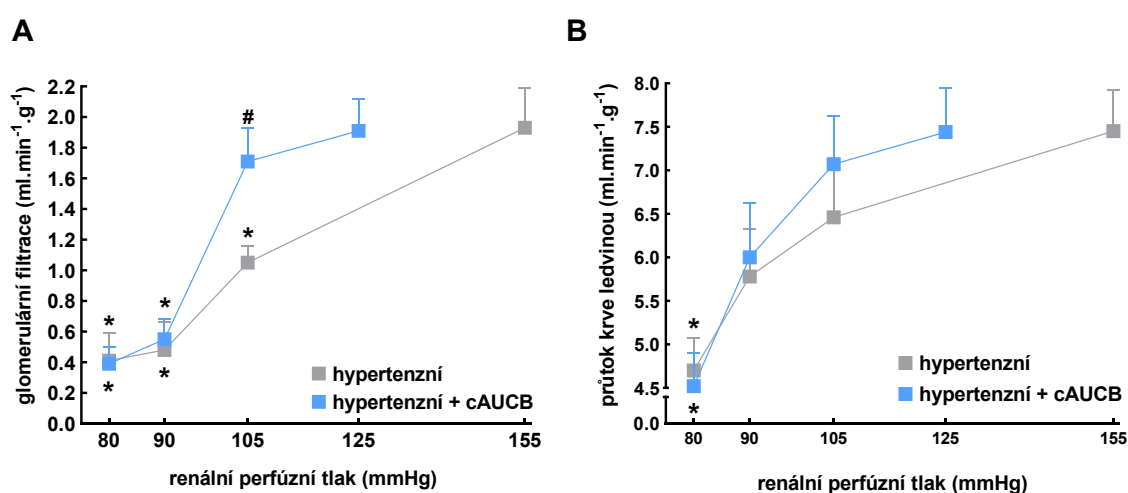
Tab. 1 Bazální hodnoty sledovaných funkčních parametrů pravé ledviny (\* p < 0,05 vs. neoznačené skupiny, @ p < 0,05 všechny skupiny).

V grafu 1A, 1B je znázorněna efektivita autoregulace průtoku krve ledvinou a glomerulární filtrace sledované ledviny normotenzních potkanů při postupném snižování MAP. Postupná redukce tlaku nezpůsobila žádnou významnou změnu fungování autoregulačních mechanismů ledvin s výjimkou posledního poklesu na 80 mmHg (4. perioda) u neléčených normotenzních potkanů, u nichž v tomto případě významně poklesl autoregulační index glomerulární filtrace (z hodnot 1,71 ± 0,11 na 0,9 ± 0,08 ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>). Naproti tomu léčení normotenzní potkani nevykazovali žádné významné změny ve sledovaných parametrech autoregulačního mechanismu ledvin.



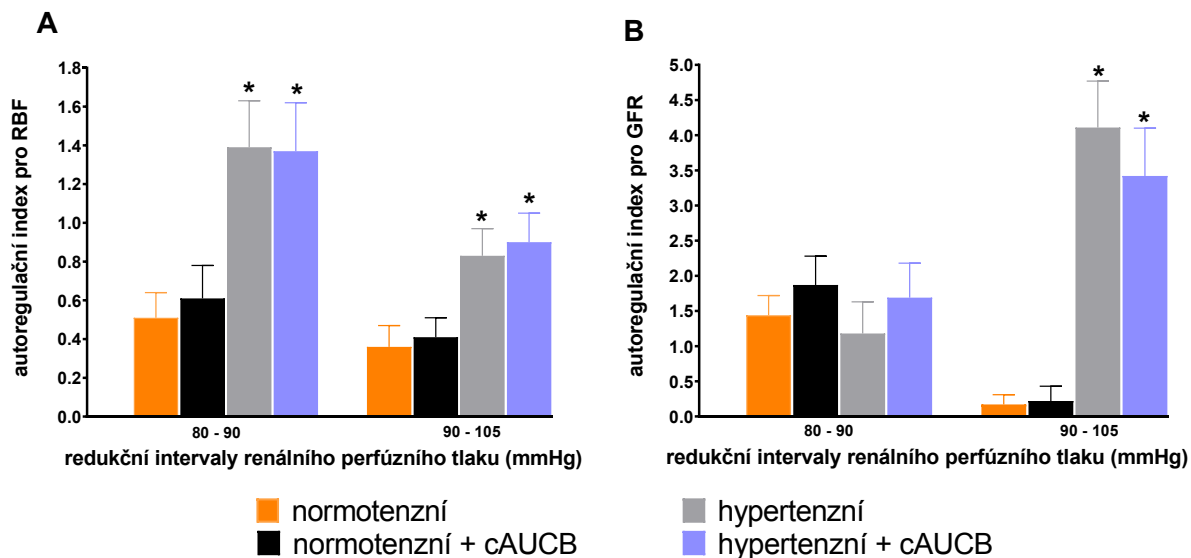
Graf 1 Vliv redukce renálního arteriálního tlaku svorkou na hodnoty glomerulární filtrace (A) a průtoku krve ledvinou (B) u léčených i neléčených normotenzních potkanů (\* p < 0,05 vs. počáteční neredukovaný tlak).

V grafu 2 jsme znázornili reakci RBF a GFR při postupném snižování tlaku u TGR(Ren2)27 potkanů. Neléčení hypertenzní potkany, významně zhoršenou autoregulaci v obou sledovaných parametrech. Již redukce RPT na 105 mmHg způsobila u neléčených hypertenzních potkanů významné snížení filtračních schopností ledviny. Léčba hypertenzních potkanů inhibitorem sEH nezlepšila ani u jednoho parametru účinnost autoregulace (ve srovnání s neléčenými hypertenzními zvířaty).



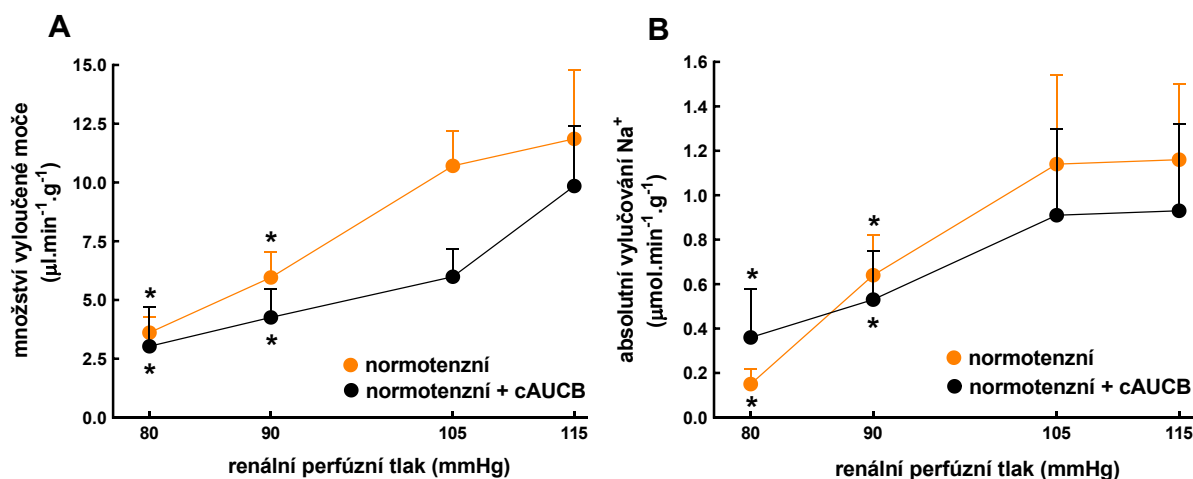
Graf 2 Vliv redukce renálního arteriálního tlaku svorkou na hodnoty glomerulární filtrace (A) a průtoku krve ledvinou (B) u hypertenzních léčených i neléčených potkanů (\* p < 0,05 vs. počáteční neredukovaný tlak).

Ve shodě s předešlými dvěma grafy i srovnání autoregulačních indexů prokázalo významně zhoršenou autoregulaci RBF i GFR u hypertenzních neléčených zvířat a ani přidání cAUCB do pitné vody nezpůsobilo zlepšení autoregulačních funkcí ledvin hypertenzních zvířat ve sledovaných parametrech (viz graf 3).



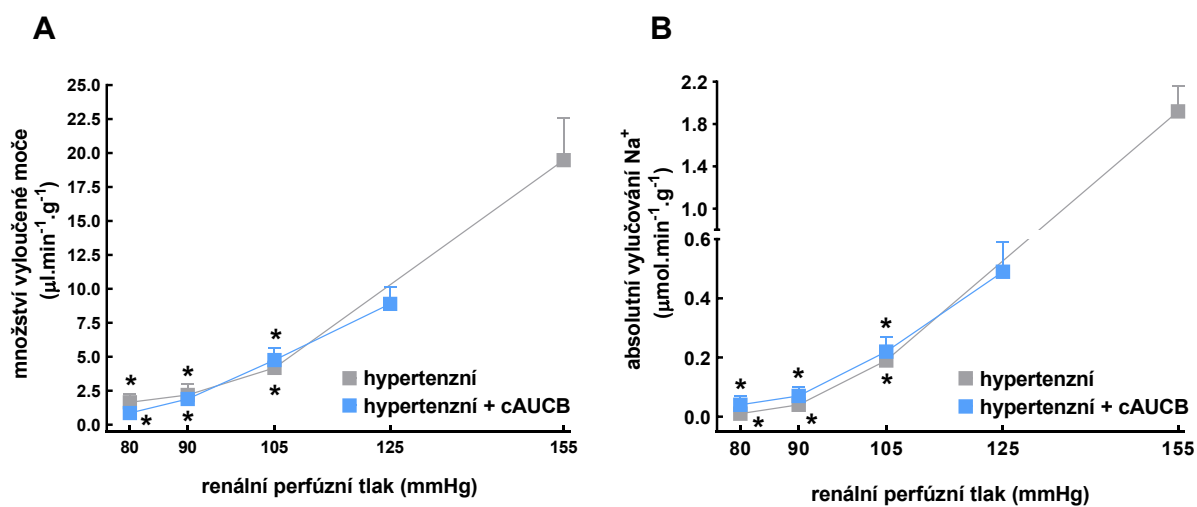
Graf 3 Hodnoty autoregulačních indexů (počítaných metodou Semple a de Wardener) pro průtok krve ledvinou (A) a pro glomerulární filtraci (B) u všech skupin potkanů (\*  $p < 0,05$  vs. počáteční neredukovaný tlak).

U normotenzních skupin neměla léčba inhibítorem sEH žádný statisticky významný vliv na množství vyloučené moče ani na množství vyloučeného sodíku. Ani postupná redukce RPT nevykazovala rozdílnou reakci u léčených vs. neléčených normotenzních zvířat (viz graf 4).



Graf 4 Vliv redukce renálního perfúzního tlaku svorkou na hodnoty diurézy (A) a absolutní vylučování sodíku (B) u normotenzních potkanů (\* p < 0,05 vs. počáteční neredukovaný tlak).

Hypertenzní potkani reagovali na redukcí RPT statisticky významným poklesem objemu diurézy i natriurézy ve vztahu k normotenzním kontrolám. Nicméně, léčba pomocí cAUCB nijak nezlepšila reakci sledovaných exkretčních mechanismů léčených zvířat (viz graf 5).



Graf 5 Vliv redukce renálního arteriálního tlaku svorkou na hodnoty diurézy (A) a absolutní vylučování sodíku (B) u hypertenzních potkanů (\* p < 0,05 vs. počáteční neredukovaný tlak).

## 5.2 Posouzení plasmatických a renálních koncentrací ANG II, EETs, DHETEs a 20-HETE. Stanovení exprese korového CYP2C23 a sEH v ledvině

### 5.2.1 Protokol

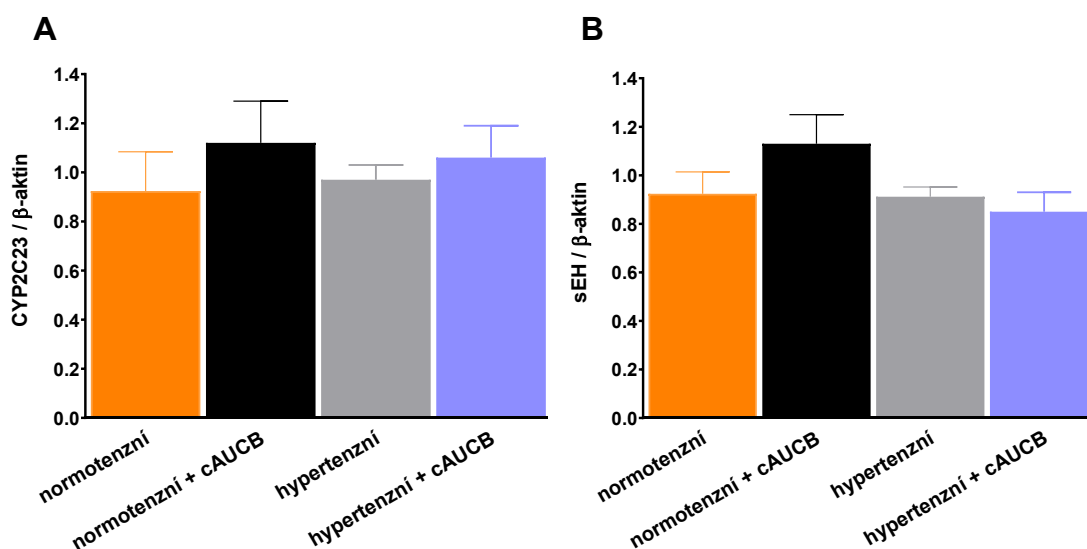
Vzhledem k tomu, že anestetizovaná zvířata mají vyšší hladiny plazmatického i renálního ANG II než bdělá zvířata (Husková Z. et al., 2006[a] a 2006[b]), použili jsme pro účely stanovení koncentrací ANG II, EETs a dalších biochemických parametrů oddělenou sérii zvířat. Po dvoudenním zaléčení vybraných skupin inhibitorem cAUCB byli všichni potkani usmrceni dekapitací. Poté byly odebrány vzorky krve a tkání na následnou analýzu. Jednotlivé parametry jsme stanovili metodami uvedenými v kap. 4.2.

Rozdělení do skupin:

- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) normotenzní neléčený (n = 8) | 3) hypertenzní neléčený (n = 9) |
| 2) normotenzní + cAUCB (n = 8)  | 4) hypertenzní + cAUCB (n = 10) |

### 5.2.2 Výsledky

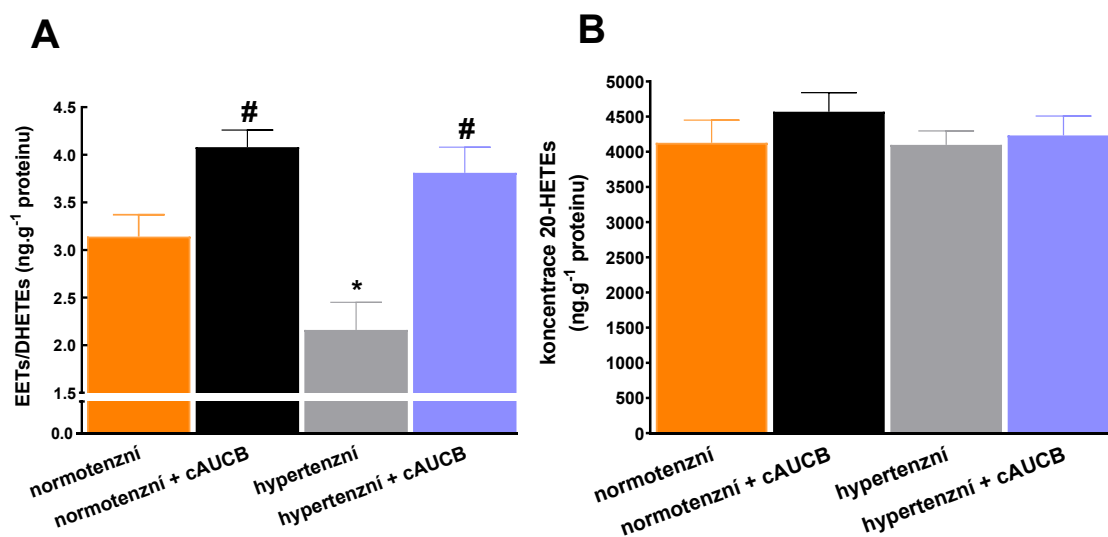
Densitometrická analýza westerblottů pro proteinové produkty genů CYP2C23 a sEH nenašla žádný statisticky významný rozdíl v proteinové expresi mezi normotenzními a hypertenzními zvířaty, a to ani ve vztahu k léčbě inhibitorem sEH (viz graf 6).



Graf 6 Míra proteinové exprese genů pro CYP2C23 (A) a sEH (B) v porovnání s mírou exprese  $\beta$ -aktinu u normotenzních potkanů i hypertenzních potkanů léčených cAUCB vs. neléčených (\*  $p < 0,05$  vs. počáteční neredukovaný tlak).



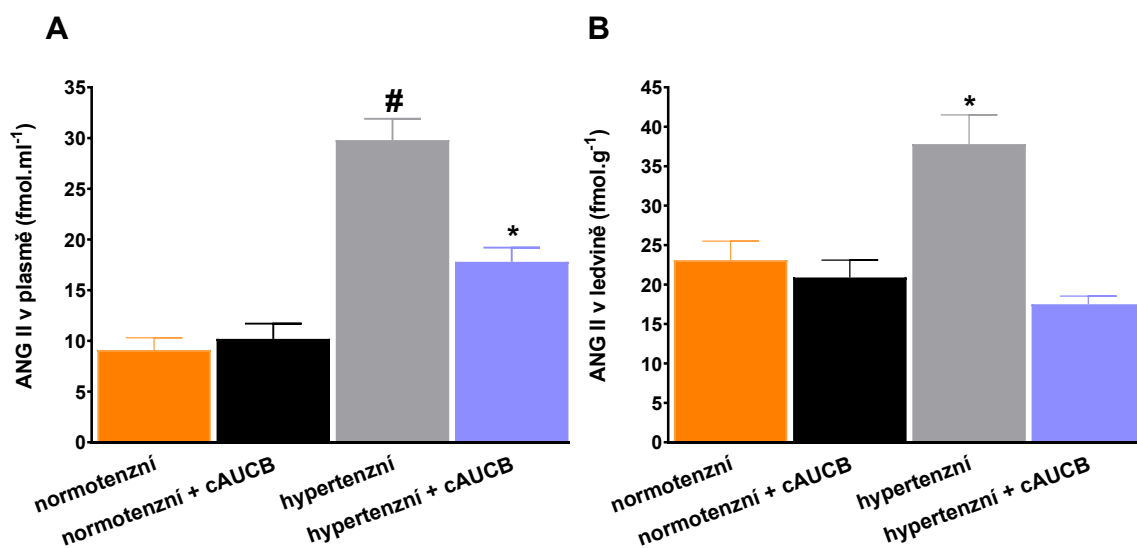
Ve shodě s jinými autory (Honetschlägerová Z. et al., 2011[a]; Wagner K.M. et al., 2017) blokáda solubilní epoxidové hydrolázy skutečně zvyšovala biologickou dostupnost aktivní formy těchto kyselin, tím že zabraňovala jejich hydrolýze (viz graf 7A). Ke zvýšení došlo u normotenzních kontrolních skupin potkanů (normotenzní  $2,16 \pm 0,29$  vs. normotenzní + cAUCB  $3,14 \pm 0,23$  ng.g<sup>-1</sup>) i u transgenních zvířat (hypertenzní  $2,16 \pm 0,29$  vs. hypertenzní + cAUCB  $3,81 \pm 0,27$  ng.g<sup>-1</sup>). Rozdíl mezi skupinou léčenou inhibitorem a skupinou neléčených hypertenzních potkanů byl statisticky významný. Hypertenzní neléčení potkani, ve srovnání s normotenzními zvířaty, vykazovali také statisticky významně nižší poměr EETs/DHETEs. Naproti tomu léčba cAUCB neměla žádný významný vliv na množství 20-HETE v ledvinové tkáni (viz graf 7B).



Graf 7 Poměr EETs/DHETEs v ledvinové tkáni u všech léčených i neléčených skupin (A), koncentrace 20-HETEs v ledvinové tkáni (B) (\* p < 0,05 vs. neléčení normotenzní; # p < 0,05 vs. neléčení hypertenzní).

Plasmatická koncentrace ANG II byla vyšší u neléčených hypertenzních potkanů než u neléčených normotenzních zvířat (normotenzní  $9 \pm 1$  vs. hypertenzní  $30 \pm 2$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Léčba inhibitorem sEH nijak významně neovlivnila hladinu ANG II u normotenzních kontrolních potkanů, nicméně významně snížila koncentraci ANG II u hypertenzních zvířat ( $18 \pm 1$  fmol.ml<sup>-1</sup>) (viz graf 8A). Velmi podobných výsledků jsme dosáhli i při měření tkáňového ANG II v ledvině. Hladina ANG II byla u neléčených hypertenzních potkanů statisticky významně vyšší než u neléčených normotenzních (normotenzní  $23 \pm 2$  vs. hypertenzní  $38 \pm 4$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Stejně jako u plasmatického ANG

II léčba inhibítorem významně snížila množství ANG II u transgenních potkanů ( $17,5 \pm 1$  fmol.ml<sup>-1</sup>) oproti kontrolním potkanům ( $20,9 \pm 2,2$  fmol.ml<sup>-1</sup>) (viz graf 8B).



Graf 8 Koncentrace ANG II v plasmě (A) a koncentrace ANG II v ledvinové tkáni (B) (\*  $p < 0,05$  vs. neléčení normotenzní; #  $p < 0,05$  vs. neléčení hypertenzní).

### 5.3 Diskuze

Námi získaná data odporovala předpokládané hypotéze, že by antihypertenzní účinek byl zprostředkovan díky EETs řízenému zlepšení autoregulace renální hemodynamiky a oploštění tlakově-natriuretické křivky. Zůstává otázkou, jakým mechanismem tedy vlastně došlo ke zmírnění hypertenze u TGR(Ren2)27 léčených potkanů? V našem pokusu léčba TGR(Ren2)27 potkanů inhibítorem sEH (v souladu s naším předpokladem) skutečně snižovala systémový krevní tlak a tento pokles byl asociován s nárůstem biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů. Tento nárůst jsme vyjádřili poměrem koncentrací EETs/DHETEs. Nicméně, v rozporu s naší hypotézou jsme v souvislosti s normalizací krevního tlaku u hypertenzních zvířat nezaznamenali zlepšení efektivity fungování autoregulačních mechanismů ledvin. Většina studií vydaných za posledních třicet let, které se zabývaly vlastnostmi EETs, popsala jejich významnou úlohu v regulaci vaskulárního napětí a v kontrole transportu sodíku v renálních tubulech (Roman R.J., 2002; Campbell W.B. a Fleming I., 2010; Imig J.D., 2012). Mechanismus vazodilatačního účinku EETs na cévní stěnu byl opakovaně spojován se stimulací vodivých vápníkových kanálů (Li P.L. a Campbell W.B., 1997; Roman R.J., 2002; Campbell W.B. a Fleming I., 2010).

Vzhledem k tomu, že došlo u TGR(Ren2)27 potkanů ke snížení plasmatických a normalizaci intrarenálních hladin ANG II, předpokládáme, že hlavním mechanismem zodpovědným za snížení krevního tlaku je utlumení produkce nebo distribuce ANG II. Této hypotéze odpovídají i výsledky předešlých studií, které prokázaly, že hlavním faktorem přispívajícím k chorobně vysokému krevnímu tlaku je neadekvátní aktivace intrarenálního RAAS (Kobori H. et al., 2007). Vliv zvýšeného ANG II na sklon křivky tlakově-natriuretického vztahu naznačuje, že akutní účinek snížení TK vyvolaný inhibicí RAAS je primárně způsoben změnami celkové periferní cévní rezistence (Kline R.L. a Liu F., 1994; Wang C.T. et al., 2000). Tento názor je také podpořen studií na homozygotních a heterozygotních TGR(Ren2)27 potkanech, v níž bylo prokázáno, že akutní inhibice RAAS (způsobená akutní intravenózní administrací ACE inhibitoru – kaptoprilu) končila náhlým hlubokým poklesem TK, který byl převážně zprostředkován sníženou periferní cévní resistencí (Vaněčková I. et al., 2012). Navíc naše data ukázala, že léčba cAUCB nezměnila koncentraci ANG II u HanSD potkanů. Studie Henrich a kol. objevil, že 14,15 EETs nemění bazální uvolňování reninu stimulovaného isoproterenolem v řezech ledvinové kůry (Henrich W.L. et al., 1992). Je tedy možné, že zvýšená biologická dostupnost EETs tlumila aktivitu vloženého myšího Ren2 reninového genu u námi zkoumaných transgenních zvířat a tím způsobila snížení koncentrace ANG II u TGR(Ren2)27 potkanů, zatímco koncentrace ANG II u HanSD potkanů zůstala beze změny. Bohlender a kol. prokázal, že regulace reninových koncentrací a aktivit u TGR(Ren2)27 je extrémně komplikovaná, protože musíme brát v úvahu koncentrace a aktivity obou reninů (Bohlender J. et al., 1998). Předešlé studie ukázaly, že zvýšené koncentrace ANG II v ANG II dependentních modelech hypertenze jsou výsledkem kombinace zvýšené produkce ANG II z endogenních intrarenálních komponentů a zvýšeného vylučování cirkulujícího ANG II přes AT1 receptory. Lze tedy předpokládat, že normalizace koncentrací intrarenálního ANG II u cAUCB léčených TGR(Ren2)27 potkanů je důsledkem řízeného potlačení produkce intrarenálního ANG II a že utlumení intrarenální reninové aktivity kombinované se sníženým příjmem ANG II z cirkulace přes AT1 receptor způsobí snížení plasmatické koncentrace ANG II.

Důležitou roli hraje v patogenezi ANG II závislé formy hypertenze oxidativní stres. V našich předešlých studiích jsme zjistili, že TGR(Ren2)27 potkani vykazují zvýšený intrarenální oxidativní stres, který působí jako renální vasokonstriktor, má antinatriuretický efekt a modeluje renální funkci u prehypertenzních TGR(Ren2)27 (Kopkan L. et al., 2007). Z toho usuzujeme, že normalizace intrarenální koncentrace ANG II v cAUCB léčených

TGR(Ren2)27 může redukovat zvýšený oxidativní stres a alespoň částečně přispívat k antihypertenznímu účinku u těchto zvířat (Kopkan L. et al., 2007). Na základě výše diskutovaných výsledků se domníváme, že základním mechanismem zodpovědným za snižování krevního tlaku inhibítorem cAUCB je kombinace zvýšené biologické dostupnosti EETs (a tím i jejich zvýšeného vaskulárního účinku) se značným utlumením RAAS aktivity.

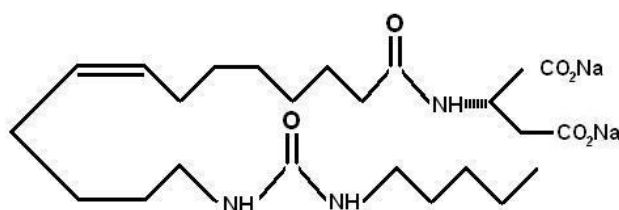
## **5.4 Závěr**

Námi dosažené výsledky v této studii prokázaly, že léčba cAUCB snižovala krevní tlak u hypertenzních potkanů. Léčba tímto inhibítorem rovněž zvyšovala biologickou dostupnost EETs u hypertenzních i normotenzních potkanů. Na rozdíl od naší hypotézy tyto účinky nebyly spojeny s žádným statisticky významným zlepšením renální autoregulace RBF, GFR nebo tlakově natriuretického mechanismu ledvin. Léčba cAUCB nečekaně způsobila významné snížení hladiny ANG II v plazmě a normalizaci koncentrace ANG II v ledvinách až na úroveň normotenzních zvířat. Navíc naše data ukázala, že léčba cAUCB nezměnila úroveň ANG II u normotenzních potkanů.

## 6 Podávání analogu epoxyeikosatrienových kyselin (EET-A) za účelem snížení angiotenzin II-dependentní hypertenze

### 6.1 Úvod a cíle

Z obavy, že podávání cAUCB potkanům může přímo interagovat s expresí samotného transgenu Ren2, jsme se rozhodli zkoumat antihypertenzní účinky EETs jiným přístupem. Místo abychom zabránili jejich odbourávání, chtěli jsme vyzkoušet podávání syntetického analogu EET-A (analog 14,15-EETs) velkoryse poskytnutým laboratoří prof. Johna R. Falcka (Division of Chemistry, Department of Biochemistry, University of Texas Southwestern, Dallas, TX, USA) (Falck J.R. et al., 2009; Imig J.D. et al., 2010; Hye Khan M.A. et al., 2014). Tento ve vodě rozpustný analog by měl být schopen navodit stejné účinky jako vysoce nestabilní EETs.



Obr. 8 Vzorec EET-A (sodium 2-(Z-(13-(3-pentyl)ureido)-tridec-8-enamido) malonát).

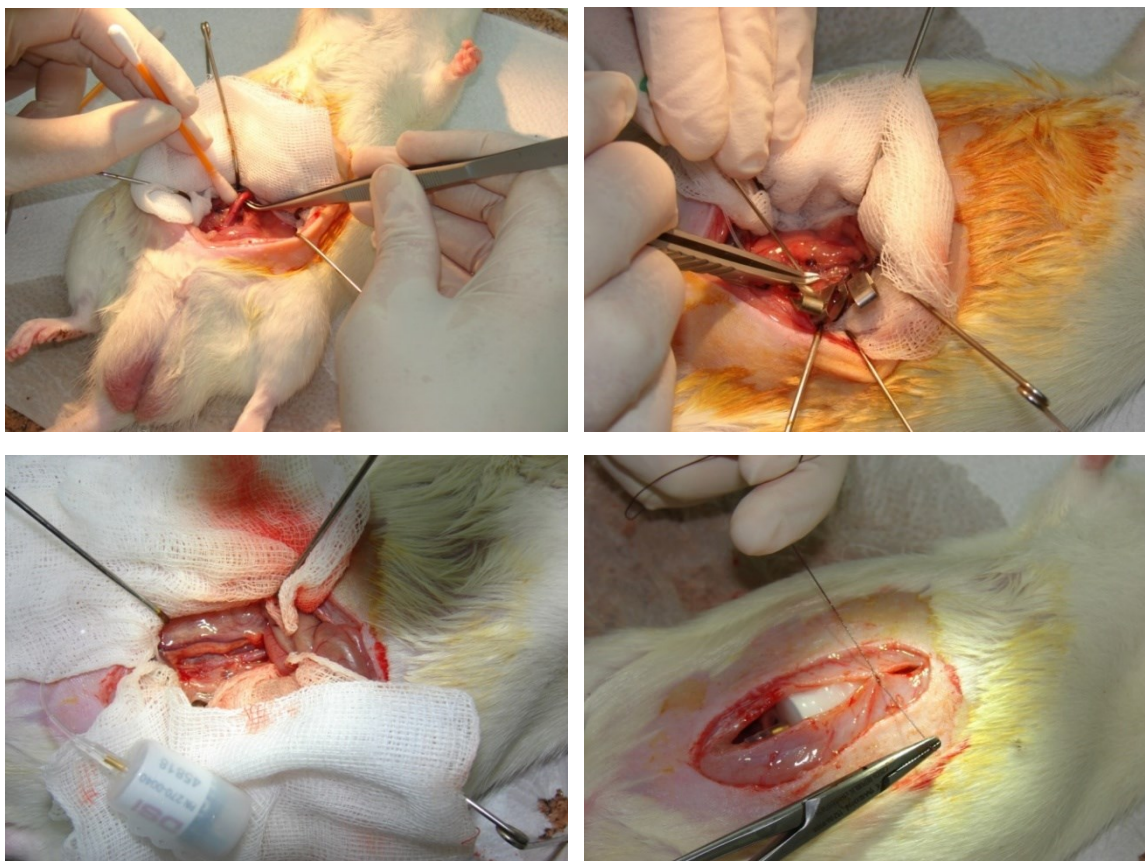
### 6.2 Účinek preventivní léčby EET-A analogem a ACEi na hodnoty krevního tlaku, albuminurie, absolutního i frakčního vylučování sodíku a orgánové poškození srdce a ledvin

#### 6.2.1 Protokol

V pokusu jsme použili TGR(CYP1a1-Ren2) potkany samčího pohlaví, věk 8 týdnů, váha 330–350 g. V souladu s doporučeními pro měření krevního tlaku u experimentálních zvířat jsme pro sledování míry hypertenze pokusným zvířatům implantovali telemetrické sondy TA11PA-C40 (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) 10 dní před samotným experimentem. Tato technologie nám umožnila monitorování pěti parametrů po 24 h u plně bdělých a volně se pohybujících zvířat.

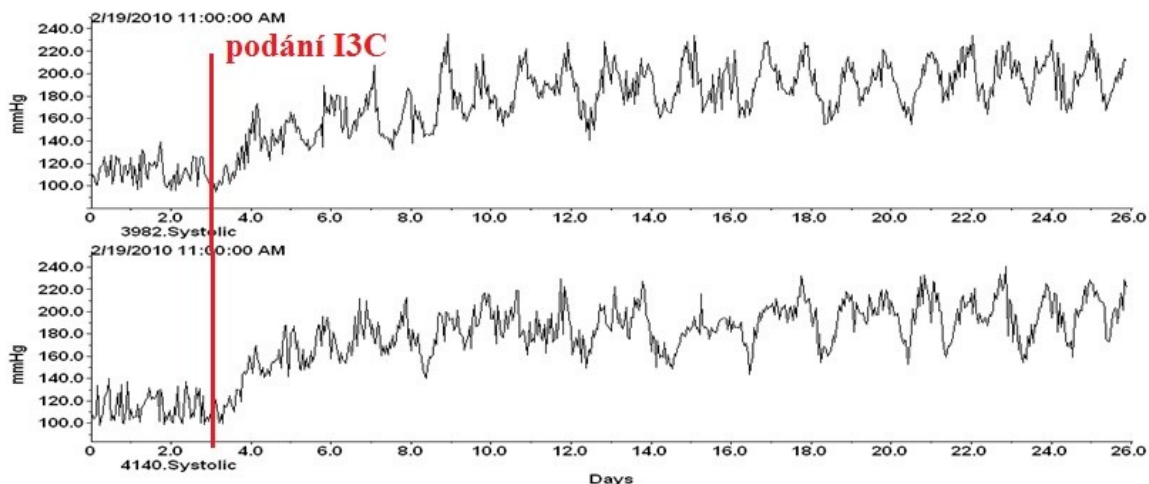
### 6.2.2 Technika implantace radiovysílačů

Potkani byli anestetizováni kombinací tiletaminu se zolazepamem (8 mg/kg, Zoletil, Virbac SA, Carros Cedex, Francie) a xylazinu (4 mg/kg, Rometar, Spofa, Praha, ČR). Podélným řezem ve střední linii břicha jsme otevřeli břišní dutinu, střeva jsme posunuli ke straně, tak abychom zpřístupnili břišní aortu.



Obr. 9 Zavedení katetru radiotelemetrické sondy do aorty potkana.

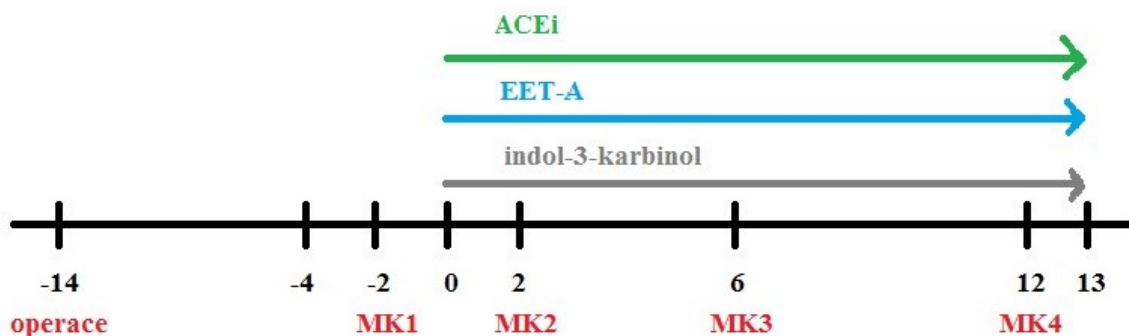
Aortu jsme krátce zasvorkovali, vsunuli konec měřícího katetru radiovysílače a vše jsme fixovali tkáňovým lepidlem (Histoacryl, B. Braun Surgical, Rubí, Španělsko). Vlastní radiovysílač jsme pomocí vstřebatelného chirurgického šití (Chirlac EP 1,5 – USP 4/0, Chirmax, CHIRANA T. Injecta, Praha) připevnili k břišní stěně v průběhu sešití svalové vrstvy tak, aby došlo k úplnému uzavření břišní dutiny. Kůži jsme následně sešili (silk fibre 3/0 USP, Resorba, Nürnberg, Německo). Stehy jsme vyjmuli zhruba po 7 dnech, kdy byla rána dostatečně zhojena.



Obr. 10 Několikadenní záznam radiotelemetrického měření systolického tlaku u dvou zvířat (ilustrační obr.).

Po deseti dnech od operace jsme umístili chovné nádoby s potkany na snímací desky a pomocí radiového ovládání zapnuli implantované telemetrické sondy. Poté, co jsme se před započítím vlastního experimentu 4denním měřením bazální hodnoty tlaku u všech skupin, přesvědčili, že jsou všechny sondy správně implantovány, všechna zvířata normotenzní a bez známek hemodynamických malignit, jsme začali náš preventivní protokol současným podáním diety s 0,3% I3C pro vyvolání nárůstu TK a zároveň EET-A a ACE inhibitoru. Během trvání experimentu (13 dní) jsme –2., 2., 6. a 12. den umístili zvířata do metabolických klecí (MK 1–4) pro 24 h sběr moče za účelem stanovení diurézy, albuminurie, frakčního i absolutního vylučování sodíku (popis metodiky viz kap. 4.2). Na konci experimentu jsme zvířata usmrtili vysokou dávkou thiopenthalu sodného (Sandoz, Basel, Švýcarsko) a odebrali jsme obě ledviny na stanovení míry renálního tkáňového poškození (viz kap. 4.2). Pro stanovení míry hypertrofického postižení srdce jsme využili stanovení poměru váhy levé srdeční komory k délce tibie.

Schéma preventivního protokolu

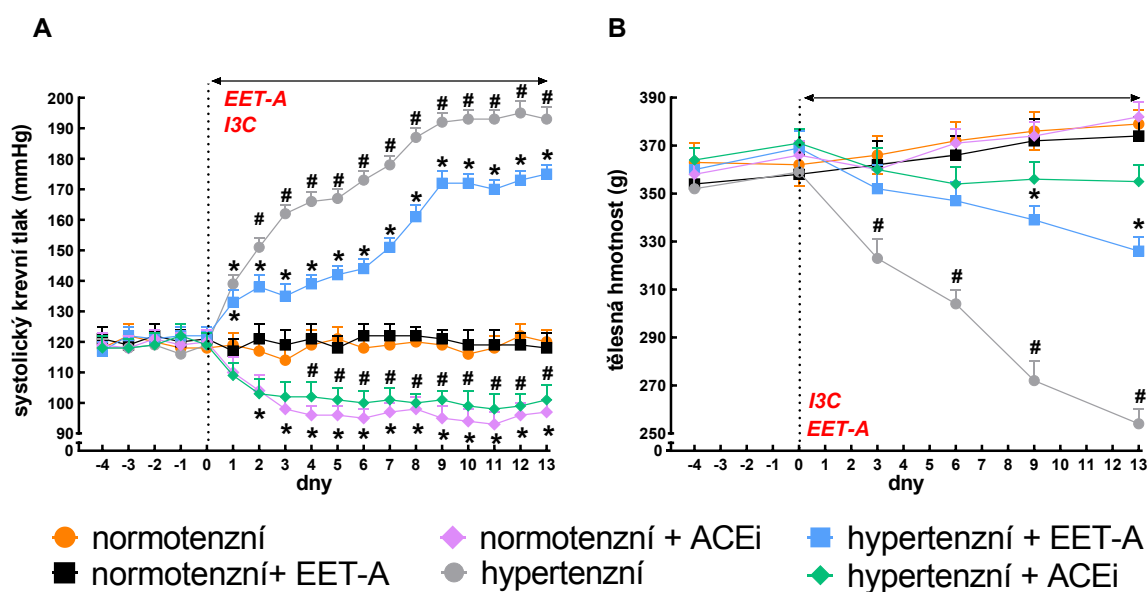


Zvířata jsme rozdělili do šesti experimentálních skupin:

- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1) normotenzní neléčení (n = 6)     | 4) hypertenzní neléčení (n = 8)     |
| 2) normotenzní léčení EET-A (n = 6) | 5) hypertenzní léčení EET-A (n = 9) |
| 3) normotenzní léčení ACEi (n = 6)  | 6) hypertenzní léčení ACEi (n = 7)  |

### 6.2.3 Výsledky

Z grafu 9A je zřejmé, že neindukovaná neléčená skupina zůstala v průběhu celého pokusu normotenzní a ani léčba EET-A analogem výši krevního tlaku nezměnila. Léčba normotenzních potkanů inhibítorem ACE však způsobila statisticky významný pokles krevního tlaku (normotenzní  $120 \pm 4$  vs. normotenzní + ACEi  $97 \pm 4$  mmHg; 13. den). Skupina potkanů, které jsme v den 0 podali I3C v dietě, začala okamžitě rozvíjet vážnou hypertenzi.



Graf 9 Sledování změn hodnot systolického krevního tlaku (A) a tělesné hmotnosti (B) v průběhu celého experimentu (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty v rámci skupiny, #  $p < 0,05$  vs. indukovaná skupina ve stejný den pokusu).

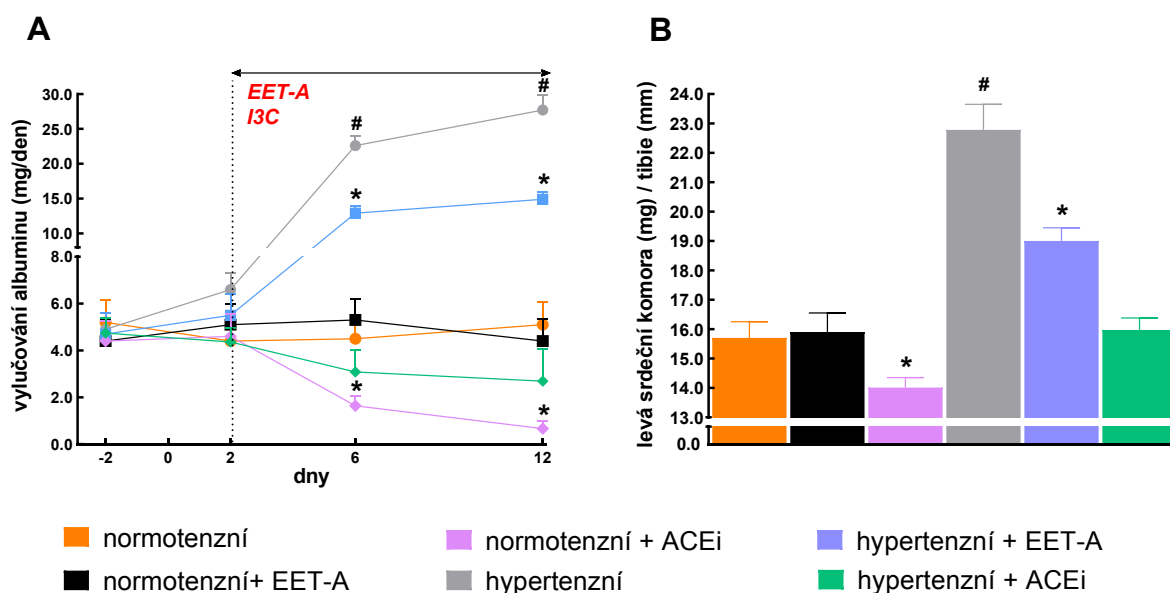
Na konci pokusu měla tato zvířata systolický krevní tlak  $193 \pm 4$  mmHg. Skupina, které jsme zároveň s indolovou dietou podávali analog EET-A, začala rozvíjet hypertenzi později a mnohem mírněji. Tento trend si zachovala až do konce pokusu, kdy poslední den byl rozdíl mezi tlaky těchto dvou skupin stále statisticky významný (hypertenzní  $193 \pm 4$  vs. hypertenzní + EET-A  $175 \pm 3$  mmHg; 13. den). Podávání ACEi společně s indukcí



hypertenze I3C zcela zamezilo nárůstu krevního tlaku a indukovaní potkani léčení ACE inhibitorem měli naopak podstatně nižší krevní tlak než kontrolní normotenzní skupina (normotenzní  $120 \pm 4$  vs. hypertenzní + ACEi  $101 \pm 5$  mmHg; 13. den).

Indukovaná hypertenzní zvířata, která jsme nijak neléčili, vykazovala strmý pokles tělesné hmotnosti (viz graf 9B). Tento pokles byl ovšem významně zmírněn u zvířat, která byla společně s indukcí i léčena analogem EET-A. Léčbou ACEi jsme poklesu tělesné hmotnosti u indukovaných zvířat zcela zabránili.

Co se týče exkrečních funkcí, normotenzní neléčení potkani vykazovali po celou dobu experimentu zcela minimální albuminurii a ani léčba EET-A analogem tuto skutečnost nezměnila (normotenzní  $5,1 \pm 0,95$  vs. normotenzní + EET-A  $4,4 \pm 0,95$  mg.den<sup>-1</sup>; den 12.) (viz graf 10A). Naproti tomu indukce hypertenze u tohoto kmene vedla k prudkému nárůstu albuminurie (normotenzní  $5,1 \pm 0,95$  vs. hypertenzní  $27,7 \pm 2,2$  mg.den<sup>-1</sup>; den 12.). Léčbou EET-A jsme dosáhli statisticky významného snížení albuminurie (hypertenzní  $27,7 \pm 2,2$  vs. hypertenzní + EET-A  $14,9 \pm 1,1$ ; den 12.). U potkanů, kterým jsme současně s I3C podávali i ACEi, nedošlo k žádnému zvýšenému vylučování albuminu (normotenzní  $5,1 \pm 0,95$  vs. hypertenzní + ACEi  $2,69 \pm 1,36$  mg/den; den 12.).



Graf 10 Míra albuminurie (A) v průběhu celého experimentu (měření v metabolických klecích ve dnech -2., 2., 6., 12.) a rozvoj hypertrofického poškození srdce (B) na konci experimentu (den 13.) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty v rámci skupiny, #  $p < 0,05$  vs. indukovaná skupina ve stejný den pokusu nebo na konci pokusu).

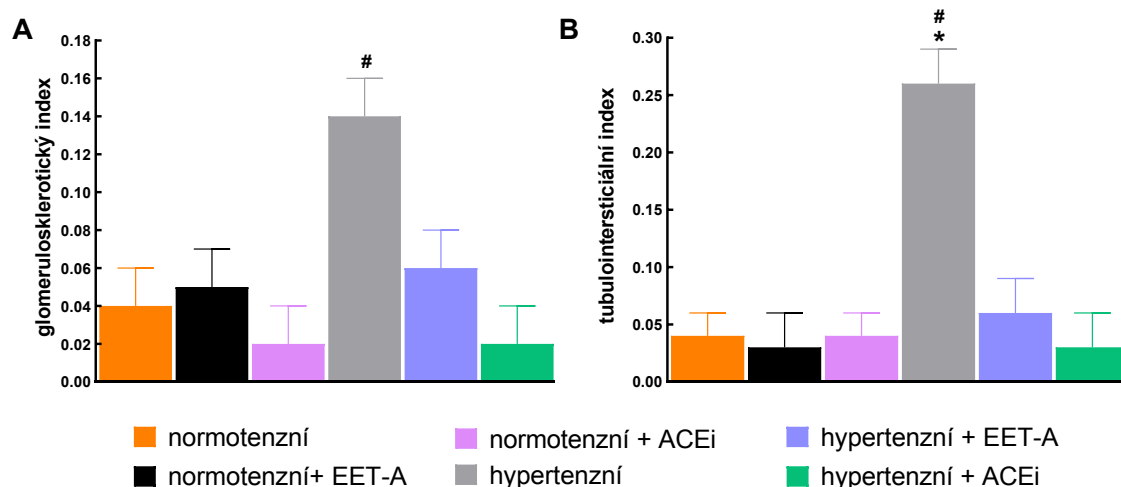
Graf 10B znázorňuje, do jaké míry bylo na konci experimentu (den 13.) postiženo srdce zvířat v jednotlivých skupinách. Žádná normotenzní skupina zvířat nevykazovala žádné známky hypertrofie levé srdeční komory. Naopak hypertenzní neléčení potkani měli významně zvětšenou svalovinu levé srdeční komory. Podávání analogu EET-A hypertrofii levé srdeční komory významně snížilo a léčba ACEi jí zcela zabránila.

U neléčených normotenzních zvířat jsme zaznamenali velmi nízké indexy glomerulosklerotického (GSI) a tubulointersticiálního (TI) poškození. Léčba EET-A analogem ani ACEi neměla žádný vliv na míru renálního poškození (viz graf 11A, 11B a tabulka 2). Naše neléčená hypertenzní zvířata v tomto pokusu vykazovala statisticky významně zvýšené hodnoty GSI a TI. Léčba analogem stejně tak i ACE inhibitorem zabránila významnějšímu poškození renálního parenchymu.

	normotenzní neléčení	normotenzní + EET-A	normotenzní + ACEi	hypertenzní neléčení	hypertenzní + EET-A	hypertenzní + ACEi
GSI	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,14 ± 0,02 <sup>#</sup>	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,02
TI	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,26 ± 0,03 <sup>*#</sup>	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,03

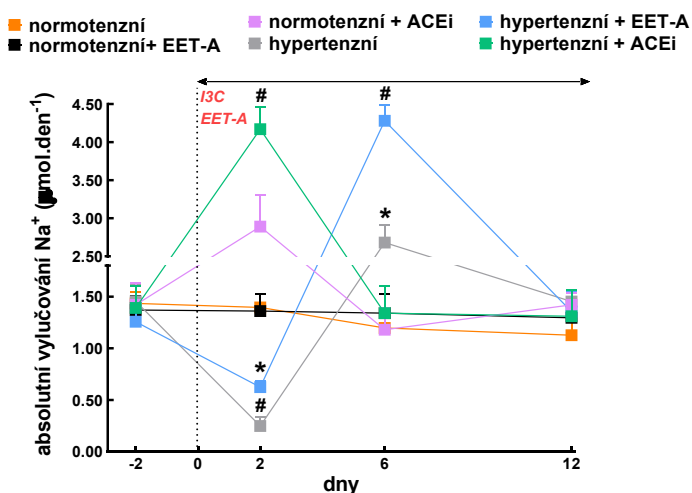
Tab. 2 Hodnoty glomerulosklerotického (GSI) a tubulointersticiálního (TI) poškození (\* p < 0,05 vs. normotenzní neléčené skupiny, <sup>#</sup> p < 0,05 všechny skupiny).

Kromě konkrétně změřených jednotlivých parametrů byli hypertenzní neléčení potkani apatičtí, měli naježenou srst, nahrbený postoj a trpěli polydipsií a polyurií. Léčená indukovaná zvířata (ACEi i EET-A) vykazovala podstatně zdravější fenotyp než zvířata hypertenzní neléčená.



Graf 11 Indexy glomerulosklerotického (A) a tubulointersticiálního (B) poškození ledvin na konci experimentu (den 13.) (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená neindukovaná skupina, <sup>#</sup> p < 0,05 vs. všechny skupiny).

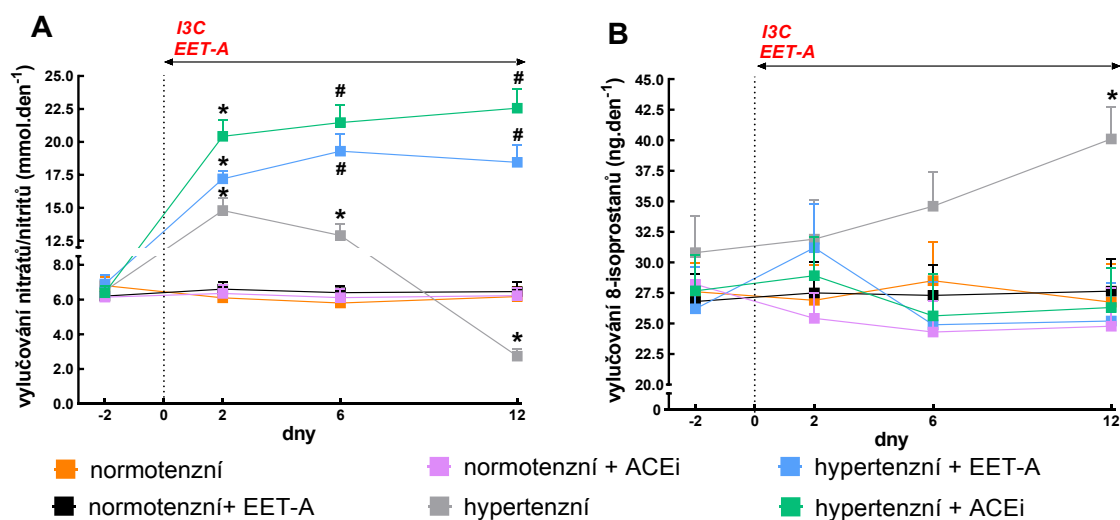
V grafu 12 jsou znázorněny výsledky měření koncentrací jednotlivých sledovaných látek v moči zvířat v průběhu pokusu. Z hlediska absolutního vylučování sodíku si všechny normotenzní skupiny zachovávaly stejný objem natriurézy bez statisticky významných odchylek. U skupiny hypertenzních neléčených zvířat jsme nejdříve během druhého metabolického měření (den 2.) zaznamenali statisticky významný pokles natriurézy (normotenzní  $1,395 \pm 0,13$  vs. hypertenzní  $0,248 \pm 0,09 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ ), který se ale v průběhu pokusu zase vyrovnal, a naopak v den třetího metabolického měření (den 6.) byla natriuréza významně vyšší (normotenzní  $1,197 \pm 0,195$  vs. hypertenzní  $2,68 \pm 0,23 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ ). Hypertenzní potkani léčení EET-A vykazovali stejný trend jako hypertenzní potkani neléčení s tím rozdílem, že první propad v hodnotách natriurézy nebyl tak hluboký (normotenzní  $1,395 \pm 0,13$  vs. hypertenzní + EET-A  $0,624 \pm 0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{den}^{-1}$ ) a byl i statisticky významně menší než pokles u hypertenzních neléčených zvířat (hypertenzní  $0,248 \pm 0,19$  vs. hypertenzní + EET-A  $0,624 \pm 0,06 \mu\text{mol}\cdot\text{den}^{-1}$ ). Nicméně, mezi druhým a třetím metabolickým měřením hodnoty  $U_{\text{Na}}V$  prudce narostly a dosáhly téměř čtyřnásobku hodnot normotenzních kontrolních skupin (normotenzní  $1,197 \pm 0,195$  vs. hypertenzní + EET-A  $4,28 \pm 0,21 \mu\text{mol}\cdot\text{den}^{-1}$ ). Nárůst  $U_{\text{Na}}V$  byl statisticky významný vzhledem k hodnotám hypertenzních neléčených potkanů (hypertenzní  $2,68 \pm 0,23$  vs. hypertenzní + EET-A  $4,28 \pm 0,21 \mu\text{mol}\cdot\text{den}^{-1}$ ). Skupina zvířat léčená v průběhu pokusu ACEi měla hladinu vylučovaného sodíku významně zvýšenou vůči všem skupinám již při druhém metabolickém měření (den 2.) (normotenzní  $1,395 \pm 0,13$  a hypertenzní  $2,68 \pm 0,23$  vs. hypertenzní + ACEi  $4,17 \pm 0,29 \mu\text{mol}\cdot\text{den}^{-1}$ ). Nicméně, na konci pokusu (den 12.) byly hodnoty absolutního vylučování sodíku hypertenzních skupin již normalizovány a v podstatě totožné s hodnotami normotenzních skupin.



Graf 12

Hodnoty absolutního vylučování sodíku v daných bodech experimentu (měření v metabolických klecích ve dnech -2., 2., 6., 12.) (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, #  $p < 0,05$  vs. všechny skupiny).

Míru oxidativního stresu, kterému byla zvířata v průběhu pokusu vystavena, jsme změřili na základě dvou samostatných parametrů: měřením poměrů koncentrací nitrátů/nitritů v moči za 24 h (viz graf 13A) a stanovením množství vyloučených 8-isoprostanů v moči taktéž za 24 h (viz graf 13B).



Graf 13 Hodnoty vylučování nitrátů/nitritů (A) a 8-isoprostanů (B) v daných bodech experimentu (měření v metabolických klecích ve dnech -2., 2., 6., 12.) (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, #  $p < 0,05$  vs. všechny skupiny).

U všech normotenzních skupin jsme nezaznamenali žádné zvýšení hodnot nitrátů/nitritů po celou dobu experimentu.

U hypertenzních neléčených potkanů se hodnoty  $U_{NOx}V$  nejdříve významně zvýšily (normotenzní  $6,1 \pm 0,6$  vs. hypertenzní  $14,8 \pm 0,95$   $mmol.den^{-1}$ ; den 2.), nicméně v průběhu pokusu hodnoty zase klesly. Na konci experimentu byla hodnota vylučování nitrátů/nitritů významně pod úroveň normotenzních skupin (normotenzní  $6,17 \pm 0,54$  vs. hypertenzní  $2,74 \pm 0,44$   $mmol.den^{-1}$ ; den 12.). U obou léčených hypertenzních skupin jsme také sledovali počáteční nárůst  $U_{NOx}V$ , ale léčba u nich zabránila konečnému poklesu vylučování  $NO_3/NO_2$ . Hodnoty obou léčených skupin i ke konci pokusu zůstávaly signifikantně zvýšené (normotenzní  $6,17 \pm 0,542$  vs. hypertenzní + EET-A  $18,45 \pm 1,29$  a hypertenzní + ACEi  $22,56 \pm 1,47$   $mmol.den^{-1}$ ; den 12.). Při měření množství vylučovaných 8-isoprostanů jsme v průběhu celého experimentu nezaznamenali žádné významné změny s výjimkou hypertenzních neléčených potkanů, u nichž tyto hodnoty postupně narůstaly. Na konci experimentu byl již rozdíl statisticky významný (normotenzní  $26,74 \pm 3,12$  vs. hypertenzní  $40,1 \pm 2,62$   $ng.den^{-1}$ ; den 12.).

## 6.3 Vliv podávání EET-A a ACEi od začátku indukce hypertenze (preventivní protokol) na aktivitu a produkci jednotlivých komponent RAAS, EETs a 20-HETE v plasmě a ledvinách

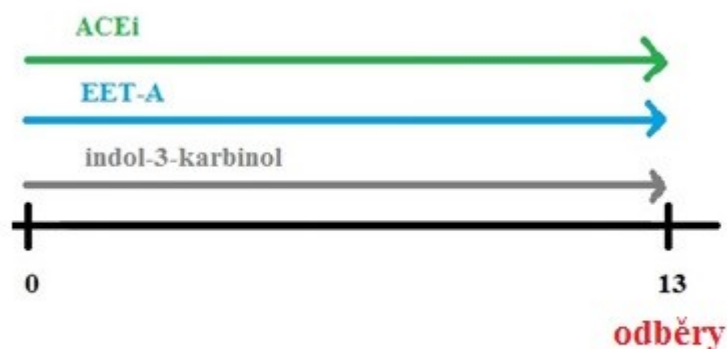
### 6.3.1 Protokol

Z důvodu všeobecně přijímaného i námi potvrzeného faktu, že anestezie a chirurgie zásadně zvyšuje množství uvolněného plasmatického i tkáňového reninu (Fox J. et al., 1992; Husková Z. et al., 2006[b] a 2010), jsme pro tuto část experimentu použili novou sérii zvířat (TGR(CYP1a1-Ren2)), samci, věk 8 týdnů, váha 330–350 g, preventivní protokol), kterou jsme na konci pokusu (den 13.) za účelem odebrání vzorků dekapitovali.

Potkany jsme rozdělili do stejných experimentálních skupin:

- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) normotenzní neléčení (n = 7) | 4) hypertenzní neléčení (n = 7) |
| 2) normotenzní + EET-A (n = 7)  | 5) hypertenzní + EET-A (n = 7)  |
| 3) normotenzní + ACEi (n = 7)   | 6) hypertenzní + ACEi (n = 7)   |

Schéma preventivního protokolu



Koncentraci ANG II jsme stanovili radioimunologickou metodou za použití komerčně dodávaného kitu (postup viz kap. 4.2). Dále jsme stanovili aktivitu ACE metodou sledování množství potřebného enzymu pro uvolnění 1  $\mu$ mol kyseliny hippurové za min/l séra při 37 °C. Jistou představu o míře plasmatické aktivity jsme získali i poměrem mezi ANG I/ANG II, který je také věrohodným ukazatelem aktivity angiotenzin konvertujícího enzymu (Bürgelová M. et al., 2009; Červenka L. et al., 2015; Hampl V. et al., 2015). Plasmatickou a tkáňovou aktivitu reninu, angiotenzin konvertujícího enzymu

(ACE) a hladin ANG (1-7) jsme měřili způsobem uvedeným v kap. 4.2. Dále jsme stanovili míru genové exprese pro Ren2 transgen, receptory pro ANG II (AT1) a ANG 1-7 (Mas), dále pak expresi genů pro ACE a ACE2 enzymy (postup viz kap. 4.2). Množství námi sledovaných metabolitů kyseliny arachidonové EETs a DHETEs ve vzorcích kůry ledvin jsme nechali stanovit metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC – MS/MS) firmou Lipidomix GmbH (Berlin, Německo).

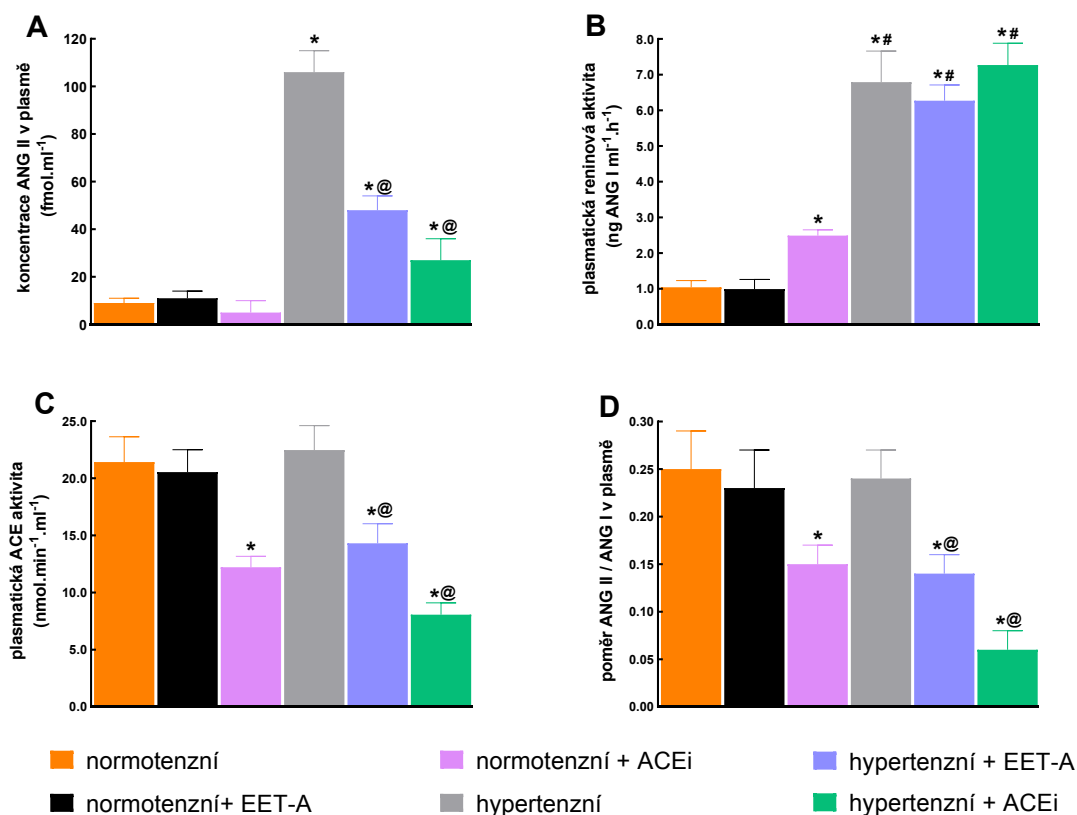
### 6.3.2 Výsledky

Jak zobrazuje graf 14A, hladina ANG II byla u hypertenzních neléčených zvířat výrazně vyšší než u normotenzních neléčených zvířat (normotenzní  $9 \pm 2$  vs. hypertenzní  $106 \pm 9$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Ani léčba EET-A ani ACEi neměla u normotenzních léčených skupin žádný vliv na koncentrace ANG II v plasmě. Nicméně, u hypertenzních skupin léčba EET-A analogem snížila hladinu cirkulujícího ANG II na polovinu (hypertenzní  $106 \pm 9$  vs. hypertenzní + EET-A  $48 \pm 6$  fmol.ml<sup>-1</sup>) a léčba ACEi na třetinu (hypertenzní  $106 \pm 9$  vs.  $27 \pm 9$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Léčba jednou či druhou látkou výrazně snižovala plasmatickou hladinu ANG II, ale ani v jednom případě ji zcela nenormalizovala.

Reninová plasmatická aktivita byla významně vyšší u hypertenzních neléčených zvířat než u normotenzních neléčených (normotenzní  $1,04 \pm 0,19$  vs. hypertenzní  $6,79 \pm 0,87$  fmol.ml<sup>-1</sup>) (viz graf 14B). Podávání EET-A analogu nijak významně nezměnilo reninovou aktivitu u normotenzních (normotenzní  $1,04 \pm 0,19$  vs. normotenzní + EET-A  $0,99 \pm 0,27$  fmol.ml<sup>-1</sup>) ani hypertenzních zvířat (hypertenzní  $6,79 \pm 0,87$  vs. hypertenzní + EET-A  $6,27 \pm 0,44$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Naproti tomu léčba ACEi významně zvýšila aktivitu reninu u normotenzních zvířat (normotenzní  $1,04 \pm 0,19$  vs. normotenzní + ACEi  $2,49 \pm 0,16$  fmol.ml<sup>-1</sup>). Na reninovou aktivitu hypertenzních zvířat nemělo podávání ACEi žádný významný vliv (hypertenzní  $6,79 \pm 0,87$  vs. hypertenzní + ACEi  $7,27 \pm 0,61$  fmol.ml<sup>-1</sup>).

Hodnoty grafu 14C ukazují, že plasmatická aktivita ACE nebyla významně rozdílná mezi normotenzními a hypertenzními neléčenými zvířaty (normotenzní  $21,42 \pm 2,21$  vs. hypertenzní  $22,47 \pm 2,14$  nmol.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>). V souladu s očekáváním však léčba ACEi významně snížila ACE aktivitu u normotenzních zvířat (normotenzní  $21,42 \pm 2,21$  vs. normotenzní + ACEi  $12,21 \pm 0,96$  nmol.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>) na rozdíl od EET-A, jehož podávání aktivitu ACE u normotenzních zvířat nijak neovlivnilo (normotenzní  $21,42 \pm 2,21$  vs. normotenzní + EET-A  $20,54 \pm 1,96$  nmol.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>). Je zajímavé, že léčba EET-A i ACEi významně snížila plasmatickou aktivitu ACE hypertenzních zvířat (hypertenzní  $22,42 \pm 2,14$  vs. hypertenzní + EET-A  $14,31 \pm 1,71$  a hypertenzní + ACEi

$8,06 \pm 1,04 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V grafu 14D jsme stanovili míru aktivity metodou poměru ANG II/ANG I a je zřejmé, že výsledky zcela korelují s metodou první (viz graf 14C).



Graf 14 Hodnoty plasmatické koncentrace ANG II (A), plasmatické reninové aktivity (B), plasmatické aktivity angiotenzin konvertujícího enzymu (C) a poměru ANG II/ANG I v plasmě (D) na konci pokusu (den 13.) (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*, @ p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).

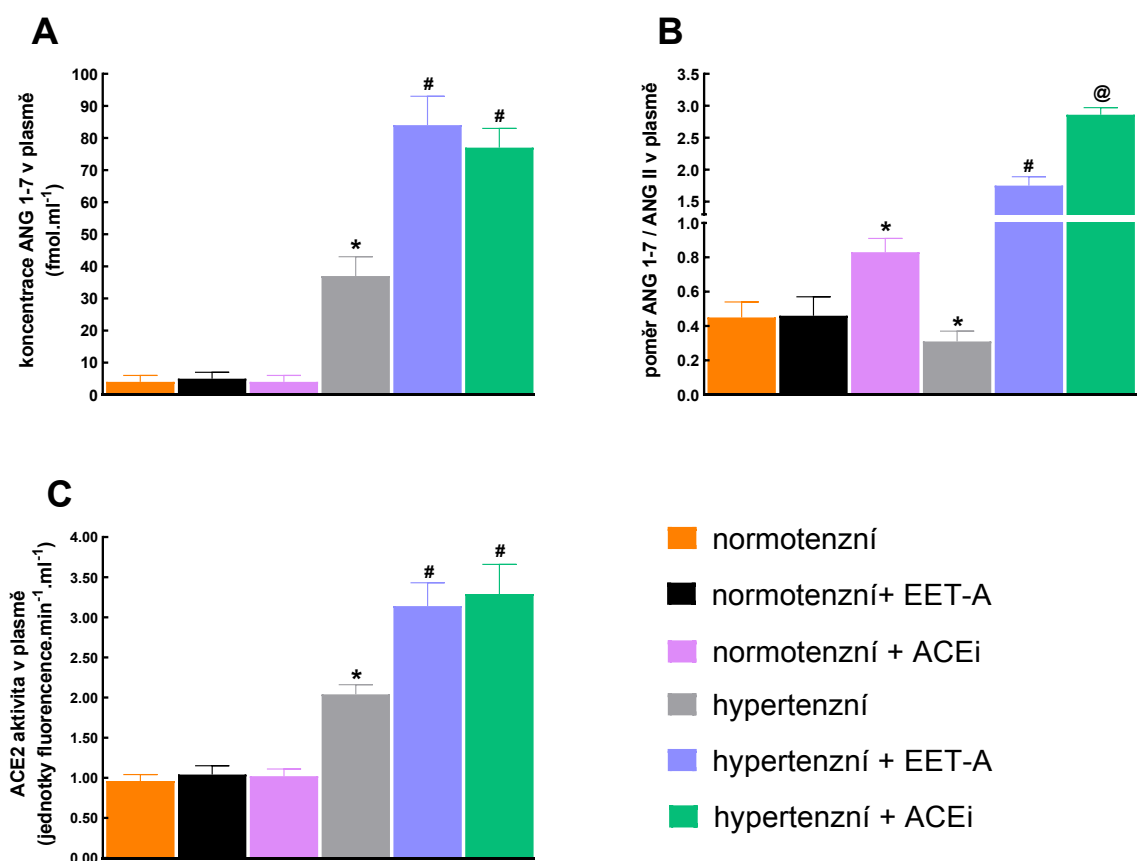
Plasmatická koncentrace ANG 1-7 byla ve srovnání s normotenzními významně zvýšena u neléčených hypertenzních zvířat (normotenzní  $4 \pm 2$  vs. hypertenzní  $37 \pm 6 \text{ fmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (viz graf 15A). Léčba EET-A ani ACEi nijak významně nezměnila množství ANG 1-7 v plasmě testovaných skupin normotenzních potkanů (normotenzní  $4 \pm 2$  vs. normotenzní + EET-A  $5 \pm 2$  a normotenzní + ACEi  $4 \pm 2 \text{ fmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Nicméně, léčba oběma farmaky způsobila nárůst hladin ANG 1-7 u obou léčených hypertenzních skupin (hypertenzní  $37 \pm 6$  vs. hypertenzní + EET-A  $84 \pm 9$  a hypertenzní + ACEi  $77 \pm 6 \text{ fmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Graf 15C, který znázorňuje aktivitu ACE2, zcela koreluje s výsledky předešlého grafu plasmatické koncentrace ANG 1-7, hypertenzní zvířata mají aktivitu ACE2

významně zvýšenou ve srovnání s normotenzními zvířaty (normotenzní  $0,96 \pm 0,08$  vs. hypertenzní  $2,04 \pm 0,1$  jednotek fluorescence.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>). Léčba oběma sledovanými látkami nezměnila míru exprese ACE2 u normotenzních skupin, ale významně ji zvýšila u léčených hypertenzních skupin ve srovnání se skupinou neléčenou (hypertenzní  $2,04 \pm 0,12$  vs. hypertenzní + EET-A  $3,14 \pm 0,29$  a hypertenzní + ACEi  $3,29 \pm 0,37$  jednotek fluorescence.min<sup>-1</sup>.ml<sup>-1</sup>).

Graf 15B ukazuje rovnováhu mezi vazodilatační a vazokonstrikční osou RAAS vyjádřenou poměrem mezi koncentrací cirkulujícího ANG 1-7 a ANG II (dvou nejdůležitějších členů obou os). Poměr mezi těmito dvěma peptidy byl už dříve považován jako důvěryhodný ukazatel pro zhodnocení míry aktivace ACE2/ANG 1-7 osy (Elsed K. M. et al., 2008; Husková Z. et al., 2016). Naše data ukazují, že hypertenzní neléčení potkanů mělo hodnotu poměru významně nižší než potkanů normotenzní, a to v neprospěch vazodilatační osy představované ANG 1-7 (normotenzní  $0,45 \pm 0,09$  vs. hypertenzní  $0,31 \pm 0,06$  ANG II/ANG 1-7). Léčba normotenzních potkanů pomocí EET-A nijak poměr mezi oběma peptidy neovlivnila (normotenzní  $0,45 \pm 0,09$  vs. normotenzní + EET-A  $0,46 \pm 0,11$  ANG II/ANG 1-7), avšak léčba ACEi způsobila u normotenzní skupiny dvojnásobný nárůst (normotenzní  $0,45 \pm 0,09$  vs. normotenzní + ACEi  $0,83 \pm 0,08$  ANG II/ANG 1-7). Na rozdíl od normotenzní skupiny léčba hypertenzních potkanů analogem EET-A vyvolala téměř šestnásobný nárůst poměru ANG II/ANG 1-7 (hypertenzní  $0,31 \pm 0,06$  vs. hypertenzní + EET-A  $1,75 \pm 0,14$  ANG II/ANG 1-7) a léčba ACEi dokonce devítinásobný (hypertenzní  $0,31 \pm 0,06$  vs. hypertenzní + ACEi  $2,86 \pm 0,11$  ANG II/ANG 1-7).

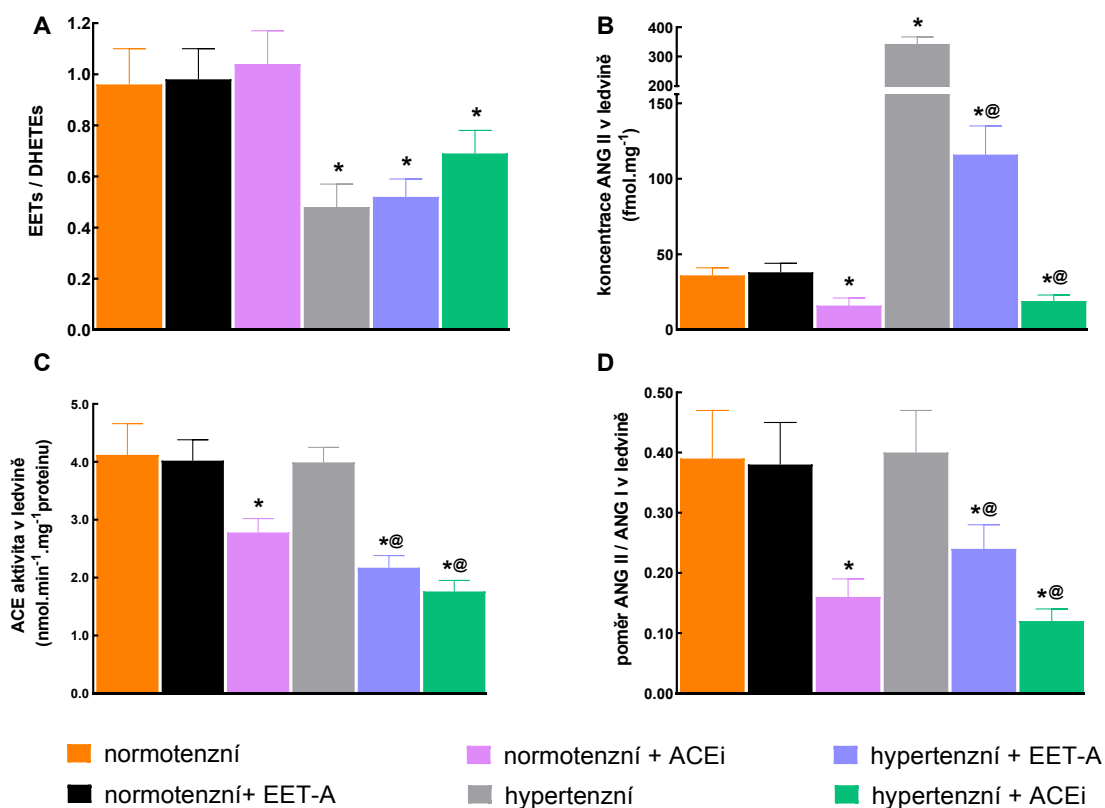




Graf 15 Hodnoty plasmatické koncentrace ANG 1-7 (A), poměru mezi cirkulujícími ANG II/ANG 1-7 (B) a plasmatické aktivity angiotenzin II konvertujícího (C) na konci pokusu (den 13.) (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, #  $p < 0,05$  vs. všechny skupiny označené \*, @  $p < 0,05$  vs. hypertenzní skupina).

Graf 16A znázorňuje intrarenální biologickou dostupnost aktivních epoxygenázových metabolitů vyjádřenou poměrem biologicky aktivních EETs a jejich neaktivních forem DHETEs. Tento poměr byl statisticky významně nižší u hypertenzních neléčených zvířat ve srovnání s normotenzní neléčenou skupinou. Léčba analogem EET-A ani ACEi tento poměr nezměnila u žádné ze skupin. Graf 16B ukazuje desetinásobný nárůst renální koncentrace ANG II u hypertenzní neléčené skupiny ve srovnání s normotenzní neléčenou. Léčba EET-A nezměnila renální koncentraci ANG II u normotenzní skupiny, ale u hypertenzních potkanů způsobila trojnásobný pokles. Naproti tomu léčba ACEi způsobila pokles renální koncentrace ANG II u normotenzních i hypertenzních zvířat. Oba grafy 16C a 16D, znázorňující aktivitu ACE v ledvině měřenou oběma zmíněnými metodami (postup viz kap. 4.2), jsou v podstatě shodné a ukazují, že jsme nepozorovali žádný rozdíl v aktivitě ACE u normotenzních ani hypertenzních

neléčených skupin. Léčba EET-A nijak aktivitu u normotenzních zvířat nezměnila. Léčba EET-A snížila aktivitu ACE pouze u hypertenzních potkanů. Léčba inhibítorem ACE významně snížila aktivitu tohoto enzymu u normotenzní i hypertenzní skupiny. Veškeré hodnoty jsme shrnuli v tabulce 3.



Graf 16 Hodnoty poměru EETs/DHETEs v ledvině (A), renální koncentrace ANG II (B), renální aktivita angiotenzin konvertujícího enzymu (C) a poměr mezi renálním ANG II/ANG I (D) (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*, @ p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).

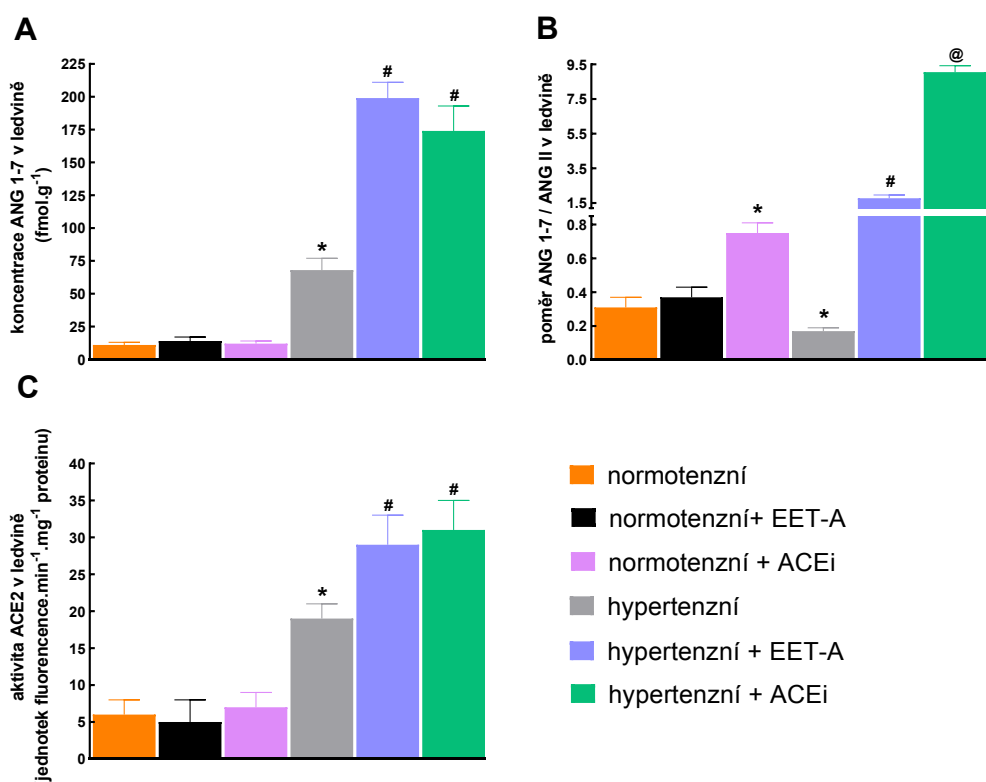
	normotenzní neléčení	normotenzní + EET-A	normotenzní + ACEi	hypertenzní neléčení	hypertenzní + EET-A	hypertenzní + ACEi
ANG II	36±5	38±6	16±5*	343±24*	116±19* <sup>@</sup>	19±4* <sup>@</sup>
EETs/DHETEs	0,96±0,14	0,98±0,12	1,04±0,13	0,48±0,09*	0,52±0,07*	0,69±0,09*
ACE aktivita	4,12±0,54	4,02±0,36	2,78±0,24*	3,99±0,26	2,17±0,21* <sup>@</sup>	1,76±0,19* <sup>@</sup>
ANG II/ANG I	0,39±0,08	0,38±0,07	0,16±0,03*	0,4±0,07	0,24±0,04* <sup>@</sup>	0,12±0,02* <sup>@</sup>

Tab. 3 Hodnoty poměru EETs/DHETEs v ledvině, renální koncentrace ANG II, renální aktivita angiotenzin konvertujícího enzymu a poměr mezi renálním ANG II/ANG I (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*, @ p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).

Grafy 17A, 17B, 17C se zabývají koncentrací 1-7, aktivitou ACE2 a poměrem ANG 1-7/ANG II v ledvině a vykazují stejný vzor chování jednotlivých parametrů jako grafy 15A, 15B, 15C mapující chování vazodilatační osy RAAS v plasmě. Hodnoty shrnuty v tabulce 4.

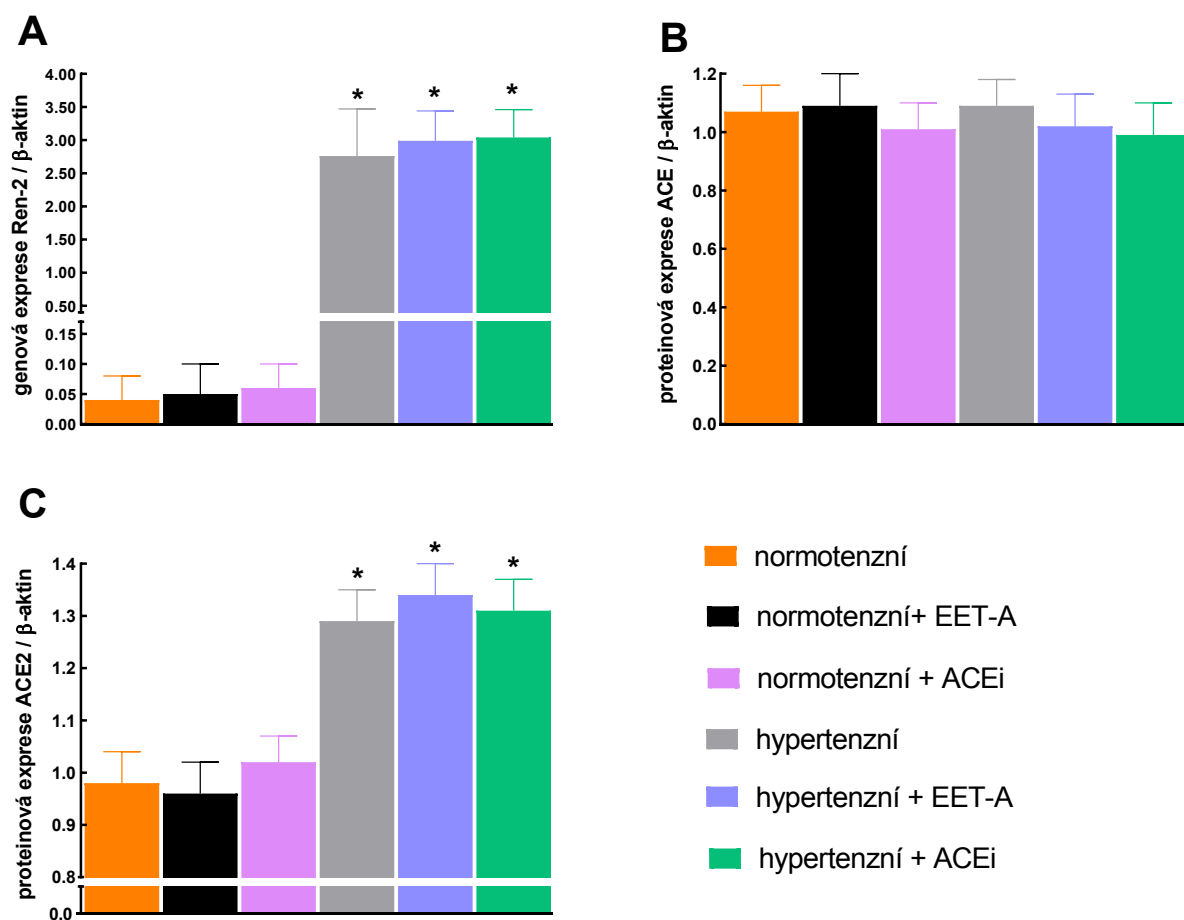
	normotenzní neléčení	normotenzní + EET-A	normotenzní + ACEi	hypertenzní neléčení	hypertenzní + EET-A	hypertenzní + ACEi
koncentrace ANG 1-7	11 ± 2	14 ± 3	12 ± 2	68 ± 9*	199 ± 12#	174 ± 19#
ACE2 aktivita	6 ± 2	5 ± 3	7 ± 2	19 ± 2*	29 ± 4#	31 ± 4#
ANG 1-7/ ANG II	0,31 ± 0,06	0,37 ± 0,06	0,75 ± 0,06*	0,17 ± 0,02*	1,77 ± 0,19#	9,05 ± 0,37@

Tab. 4 Hodnoty koncentrace ANG 1-7 v ledvině, renální aktivity angiotenzin II - konvertujícího enzymu a poměr mezi renálním ANG 1-7/ANG II (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*, @ p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).



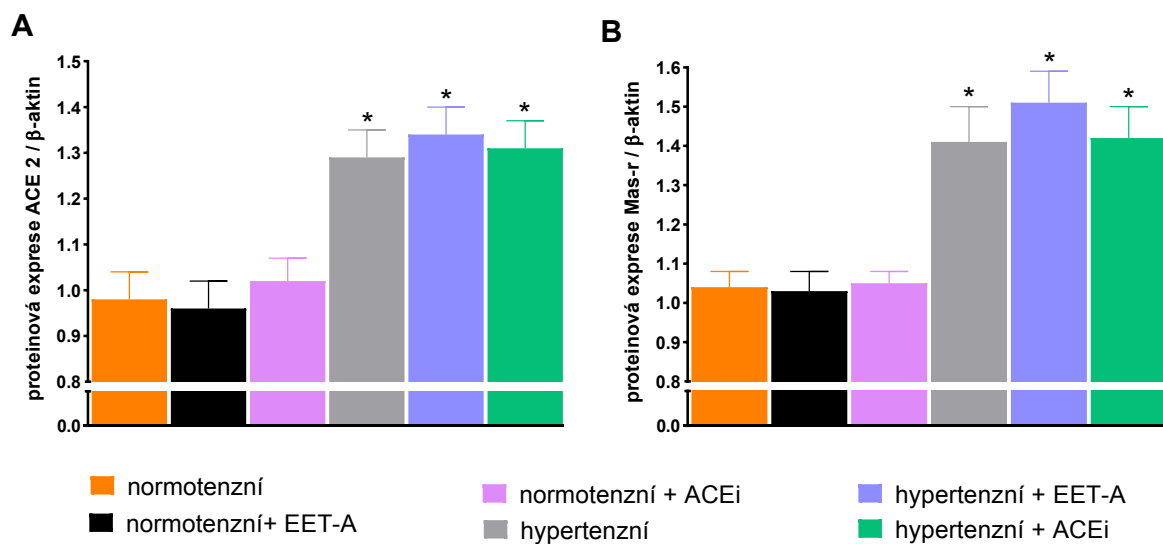
Graf 17 Hodnoty koncentrace ANG 1-7 v ledvině (A), poměru mezi renálním ANG 1-7/ANG II (B), renální aktivity angiotenzin II – konvertujícího enzymu (C) (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*, @ p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).

Genová exprese Ren2 byla mnohonásobně zvýšená u všech tří hypertenzních indukovaných skupin ve srovnání se skupinami normotenzními, což potvrzuje, že podávání I3C v potravě skutečně způsobilo masivní transkripci tohoto transgenu a léčba ani jednou látkou tuto expresi a tudíž samotnou podstatu tohoto experimentálního modelu nepotlačovala (viz graf 18A). Grafy 18B a 18C znázorňují genovou expresi ACE a AT1 (obou subtypů a+b). Indukce hypertenze obě hodnoty nijak neovlivnila a ani léčba oběma farmaky nijak nezměnila míru exprese těchto dvou genů.



Graf 18 Genová exprese myšního transgenu Ren2 vztažená k expresi  $\beta$ -aktinu (A), proteinová exprese angiotenzin – konvertujícího enzymu (B) proteinová exprese angiotenzin II – konvertujícího enzymu (C) (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina).

Poslední dva grafy této série (graf 19A a 19B) znázorňují genovou expresi ACE2 a Mas-receptoru. Je patrné, že indukce Ren2 způsobila i masivní stimulaci exprese obou genů a ani léčba EET-A nebo ACEi tuto expresi nezmírnila. Souhrnné výsledky všech grafů 18 a 19 jsou uvedeny v tabulce 5.



Graf 19 Hodnoty proteinové relativní exprese vztažené ke koncentraci  $\beta$ -aktinu ACE2 v ledvině (A) a Mas-receptoru v ledvině (B) (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina).

	neindukování neléčení	neindukování + EET-A	neindukování + ACEi	indukování neléčení	indukování + EET-A	indukování + ACEi
Ren2	0,04 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,04	2,76 $\pm$ 0,71*	2,99 $\pm$ 0,45*	3,04 $\pm$ 0,42*
ACE	1,07 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,11
AT1	0,97 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,09
ACE2	0,98 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,05	1,29 $\pm$ 0,06*	1,34 $\pm$ 0,06*	1,31 $\pm$ 0,06*
Mas-r	1,04 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,03	1,41 $\pm$ 0,09*	1,51 $\pm$ 0,08*	1,42 $\pm$ 0,08*

Tab. 5 Hodnoty relativní genové exprese myšního transgenu Ren2, proteinové exprese angiotenzin – konvertujícího enzymu a angiotenzin II – konvertujícího enzymu. Hodnoty proteinové relativní exprese AT1 receptoru v ledvině a Mas-receptoru v ledvině (\*  $p < 0,05$  vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina).

## **6.4 Účinek časné léčby EET-A analogem od počátku rozvoje hypertenze na průtok krve ledvinou a glomerulární filtraci**

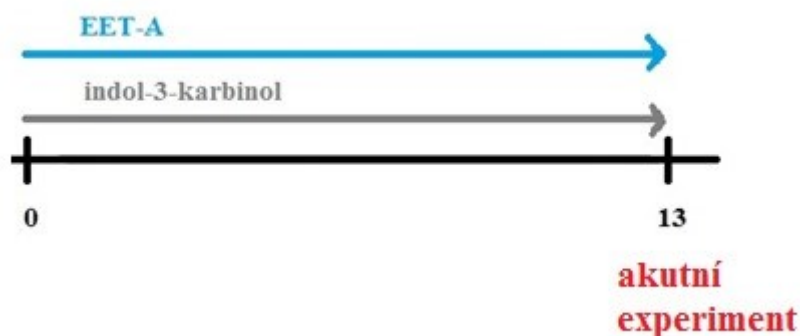
### **6.4.1 Protokol**

V pokusu jsme použili TGR(CYP1a1-Ren2) potkany samčího pohlaví, věk 8 týdnů, váha 330–350 g. Třináct dní před samotným akutním experimentem jsme vybrané skupiny indukovali I3C a podali jsme jim EET-A v pitné vodě. V den samotného akutního experimentu jsme zvířata uspali thiopentalem sodným (60 mg/kg i.p., VUAB Pharma, Roztoky, ČR). Na anestetizovaných zvířatech jsme provedli chirurgickou přípravu na akutní experiment s postupným snižováním renálního perfúzního tlaku (viz kap. 5.1.2). Po postoperační ekvilibraci (50 min) byl vyměněn potkanovi infuzní roztok za roztok, který obsahoval kromě fyziologického roztoku s albuminem ještě polyfruktosan inulin (7,5%, Inutest, Laevosan, Linz, Rakousko), abychom mohli stanovit glomerulární filtraci v jednotlivých periodách pokusu. Po 50 min ekvilibrace jsme začali experiment postupným snižováním renálního perfúzního tlaku naloženou svorkou. V první periodě jsme monitorovali pouze bez redukce, nedotčený arteriální tlak zvířete, v dalších dvou periodách jsme postupně snižovali tlak na 115 mmHg a na 95 mmHg. Každá perioda trvala 30 min a mezi jednotlivými periodami jsme vždy nechávali 5 min pauzu na ekvilibraci tlaku. Během každé periody jsme jímali moč do zkumavky pro pozdější stanovení GFR a míru diurézy. Pro kontrolu vlivu chirurgie a délky experimentu na výsledky jsme připravili sérii skupin s kontrolním protokolem, která zahrnovala celou operační proceduru, avšak bez redukce RPT.

Experimentální skupiny:

- 1) normotenzní neléčení + kontrolní protokol (n = 6)
- 2) normotenzní neléčení + experimentální protokol (n = 8)
- 3) normotenzní + EET-A + kontrolní protokol (n = 6)
- 4) normotenzní + EET-A + experimentální protokol (n = 8)
- 5) hypertenzní neléčení + kontrolní protokol (n = 6)
- 6) hypertenzní neléčení + experimentální protokol (n = 9)
- 7) hypertenzní + EET-A + kontrolní protokol (n = 6)
- 8) hypertenzní + EET-A + experimentální protokol (n = 9)

## Schéma preventivního protokolu



### 6.4.2 Výsledky

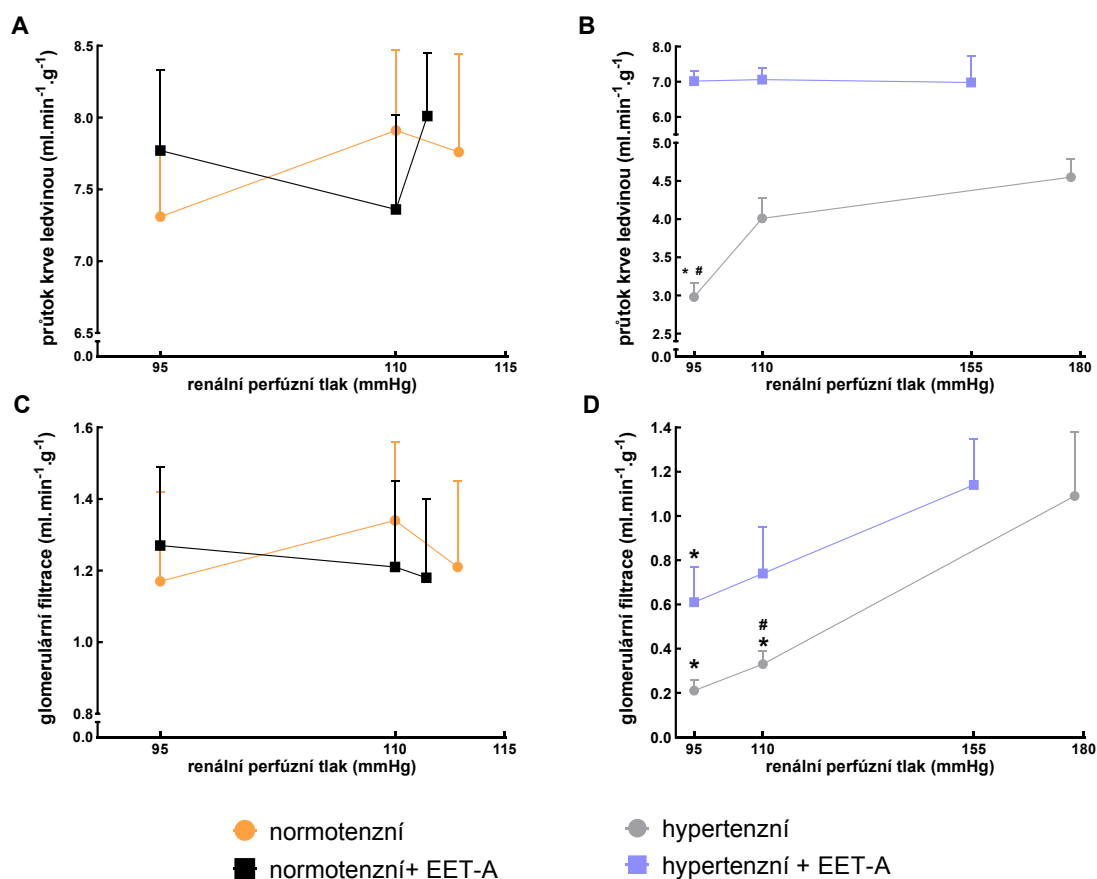
Bazální hodnoty MAP, renální hemodynamiky a vylučování elektrolytů jsme shrnuli v tabulce 6. Průměrné hodnoty jsme získali sloučením hodnot první clearančové periody obou skupin (experimentální + kontrolní protokol). Léčba EET-A skutečně zmírnila rozvoj hypertenze u hypertenzních léčených zvířat ve srovnání s normotenzními kontrolami. Léčba EET-A také zabránila snížení průtoku ledvinou u hypertenzních léčených zvířat. Ostatní uvedené parametry léčba EET-A nijak významně nezměnila.

	normotenzní neléčení	normotenzní + EET-A	hypertenzní neléčení	hypertenzní + EET-A
MAP	114 ± 3	115 ± 4	179 ± 3 <sup>#</sup>	156 ± 4 <sup>*#</sup>
GFR	1,22 ± 0,25	1,16 ± 0,19	1,06 ± 0,28	1,17 ± 0,22
RBF	7,81 ± 0,54	8,04 ± 0,47	4,59 ± 0,24 <sup>*</sup>	7,02 ± 0,61
U <sub>NaV</sub>	0,76 ± 0,27	0,79 ± 0,26	1,19 ± 0,28	1,07 ± 0,24
FE <sub>Na</sub>	0,81 ± 0,22	0,84 ± 0,23	1,01 ± 0,24	0,98 ± 0,26
diuréza	8,92 ± 0,71	9,22 ± 0,61	16,18 ± 2,61 <sup>*</sup>	16,02 ± 2,12 <sup>*</sup>

Tab. 6 Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP), glomerulární filtrace (GFR), průtoku krve ledvinou (RBF), absolutního vylučování sodíku (U<sub>NaV</sub>), frakčního vylučování sodíku (FE<sub>Na</sub>) a diurézy (\* p < 0,05 vs. kontrolní neléčená normotenzní skupina, <sup>#</sup> p < 0,05 vs. všechny skupiny označené \*).

Grafy 19A, 19C znázorňují reakci glomerulární filtrace (GFR) a průtoku krve ledvinou na postupné snižování renálního perfúzního tlaku (RPT) u normotenzních zvířat. Jak je vidět v obou grafech, změna RPT ani u jednoho z parametrů nezpůsobila statisticky významný rozdíl, což je v souladu s dříve potvrzeným faktem, že autoregulační

mechanismus ledvin zdravého jedince je schopen kompenzovat změny RPT až k hodnotám 90 mmHg. Graf 19B představuje průtok krve ledvinou u zvířat hypertenzních. Bazální hodnoty hypertenzních neléčených zvířat byly významně nižší (normotenzní  $7,81 \pm 0,54$  vs. hypertenzní  $4,59 \pm 0,24$  ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>). Podávání EET-A nejen že vyústilo u hypertenzních zvířat v mnohem vyšší bazální hodnoty (hypertenzní  $4,59 \pm 0,24$  vs. hypertenzní + EET-A  $7,02 \pm 0,61$  ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>), ale také zabránilo poklesu RBF při redukcí RPT. Autoregulační mechanismus RBF ledvin léčených hypertenzních zvířat byl tudíž srovnatelný s normotenzními skupinami. Poslední graf této série (graf 19D) ukazuje, že i když byl bazální RPT u neléčené skupiny signifikantně vyšší než u léčených (hypertenzní  $179 \pm 3$  vs. hypertenzní + EET-A  $156 \pm 4$  mmHg), GFR měla přesto srovnatelné hodnoty (hypertenzní  $1,06 \pm 0,28$  vs. hypertenzní + EET-A  $1,17 \pm 0,22$  ml.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>). Nicméně, ačkoliv redukce RPT způsobily poklesy GFR u obou skupin, hodnoty léčených zvířat stále zůstávaly vyšší (v případě první redukce na 110 mmHg statisticky významně, při redukcí na 95 již ne tak významně, ale stále s velkým rozdílem).



Graf 19 Vyjádření vztahu mezi renálním arteriálním tlakem, průtokem krve ledvinou u normotenzních (A) a hypertenzních skupin (B). Vztah hodnot renálního arteriálního tlaku ke glomerulární filtraci u normotenzních (C) a hypertenzních skupin (D) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty, #  $p < 0,05$  vs. odpovídající hodnoty na stejné hodnotě tlaku u druhé skupiny).



## 6.5 Účinek pozdní léčby EET-A analogem u již plně rozvinuté hypertenze (léčebný protokol) na krevní tlak, hemodynamiku, autoregulaci, exkreční funkce a morfologii ledvin

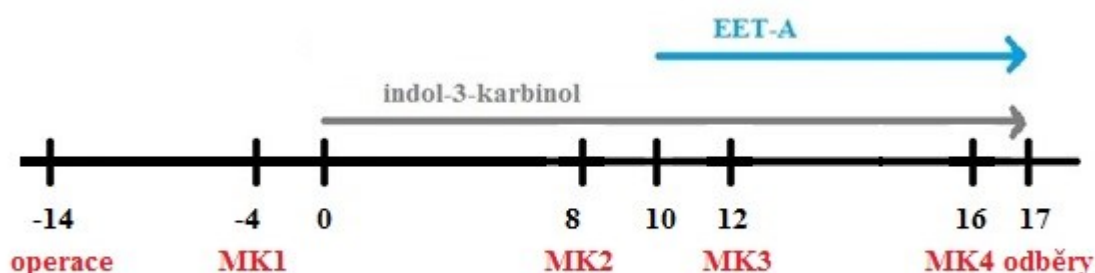
### 6.5.1 Protokol

Na stejné skupiny zvířat (co do věku, váhy, kmene i pohlaví) jsme aplikovali stejný protokol implantace telemetrických sond (viz kap. 6.2.2). Průběh pokusu je znázorněn na schématu níže. Hlavním velkým rozdílem oproti protokolu „preventivnímu“ bylo, že jsme léčbu analogem EET-A zahájili o 10 dní později než samotnou indukci hypertenze. V průběhu pokusu jsme zvířata umístili 4x na 24 h do metabolických klecí (MK 1–4). Pro posouzení vlivu metabolismu kyseliny arachidonové cestou enzymů z rodiny cytochromů P450 jsme 17. den pokusu zvířata usmrtili dekapitací a odebrali vzorky pro stanovení jednotlivých biochemických parametrů. Všechny jednotlivé hodnoty jsme vyhodnotili metodami uvedenými v kap. 4.2.

Vzhledem k tomu, že jsme si nebyli jisti, zda bude mít pozdní léčba na již etablovanou hypertenzi vůbec nějaký účinek, provedli jsme nejprve pouze pilotní experiment se třemi skupinami:

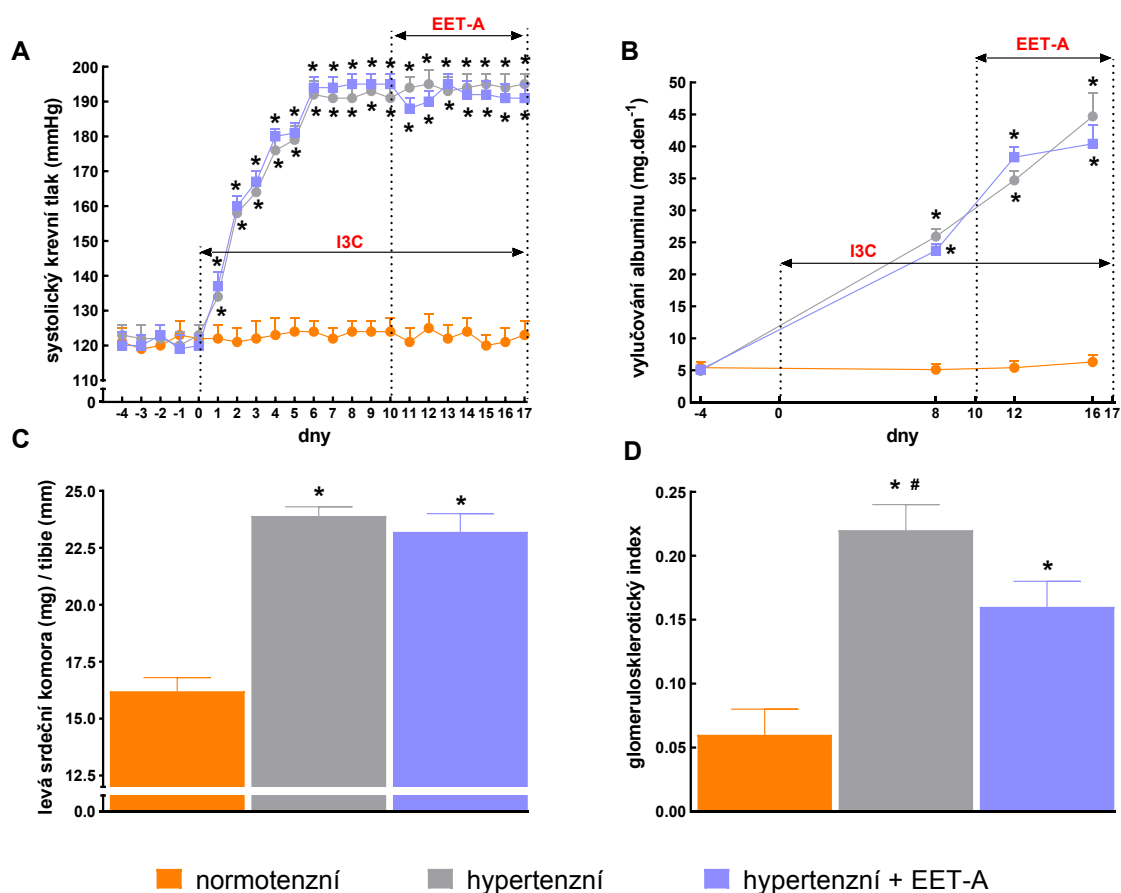
- 1) normotenzní neléčení (n = 7)
- 2) hypertenzní neléčení (n = 9)
- 3) hypertenzní + EET-A (n = 11)

Schéma léčebného protokolu



## 6.5.2 Výsledky

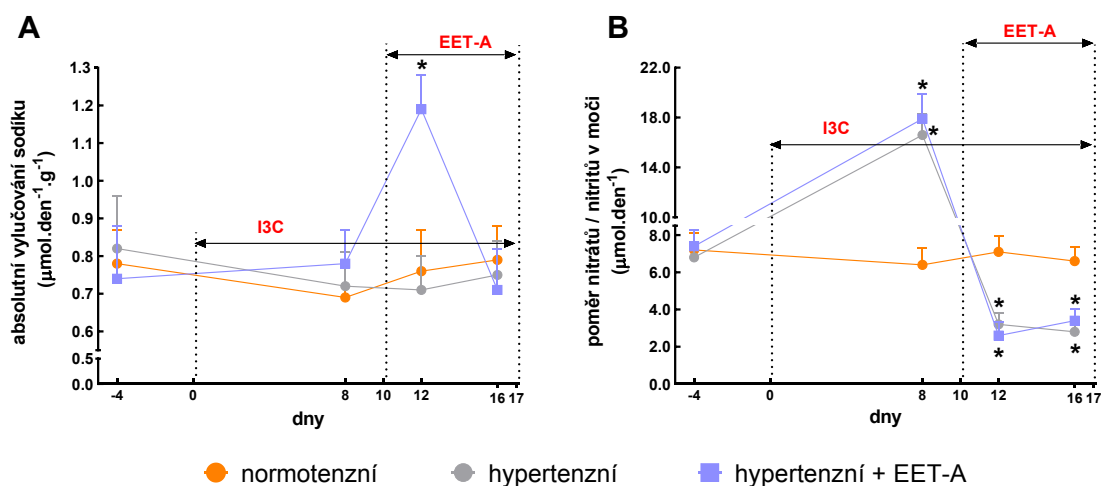
Graf 20A mapuje rozvoj výše krevního tlaku po stimulaci transkripce Ren2 genu podáním I3C v potravě. Desetidenní indukce pomocí I3C diety způsobila rozvoj velmi vážné hypertenze u obou skupin (hypertenzní  $195 \pm 3$  a hypertenzní + EET-A  $191 \pm 4$  mmHg). Následné podání EET-A nemělo žádný vliv na výši krevního tlaku v porovnání s preventivním protokolem. Podání EET-A také nemělo žádný příznivý efekt ani na albuminurii (hypertenzní  $44,7 \pm 3,7$  vs. hypertenzní + EET-A  $40,4 \pm 2,9$  mg.den<sup>-1</sup>) (viz graf 20B) ani na hypertrofii levé srdeční komory (hypertenzní  $23,9 \pm 0,4$  vs. hypertenzní + EET-A  $23,2 \pm 0,8$  mg.mm<sup>-1</sup>) (viz graf 20C).



Graf 20 Průběh nárůstu systolického krevního tlaku v průběhu experimentu a vliv léčby na jeho výši (A), míra vylučovaného množství albuminu v průběhu rozvoje hypertenze (B) (\* p < 0,05 vs. bazální hodnoty normotenzní skupiny). Levostranná srdeční hypertrofie charakterizovaná poměrem váhy levé srdeční komory k délce tibie (C) a postižení renálního parenchymu vyjádřené glomerulosklerotickým indexem (D) (p < 0,05 vs. neléčená normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. všechny skupiny).

V grafu 20D je znázorněno výrazné poškození ledvinového parenchymu u hypertenzních neléčených zvířat, které je vyjádřeno glomerulosklerotickým indexem. Nicméně, léčba EET-A toto poškození mírně, přesto statisticky významně snížila (hypertenzní  $0,22 \pm 0,02$  vs. hypertenzní + EET-A  $0,16 \pm 0,02$ ).

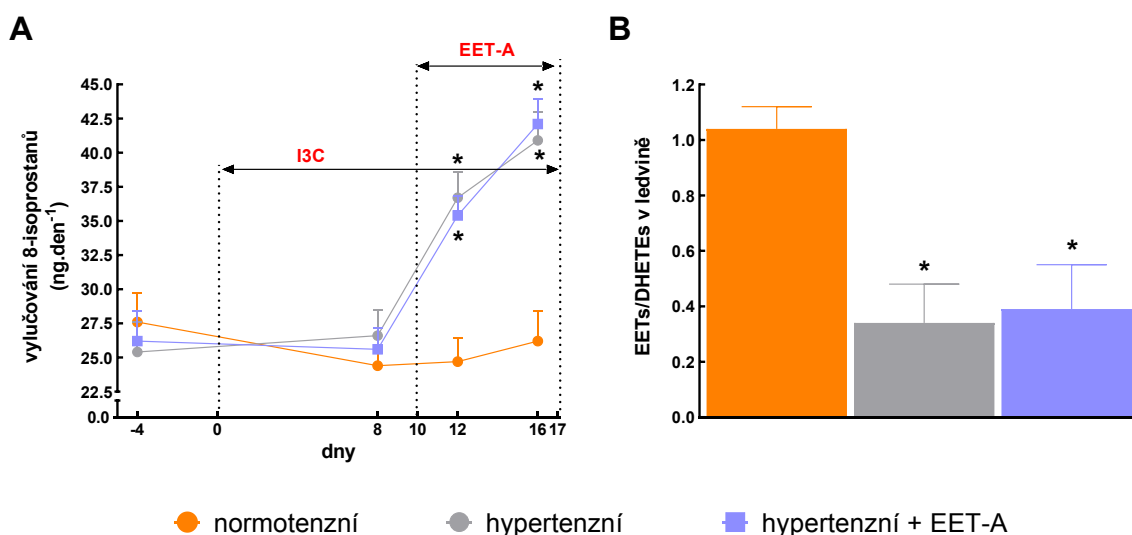
U hypertenzních léčených potkanů jsme po dvou dnech léčby zaznamenali prudký nárůst absolutního vylučování sodíku ve srovnání s hypertenzní neléčenou skupinou (hypertenzní  $0,71 \pm 0,09$  vs. hypertenzní + EET-A  $1,19 \pm 0,09 \mu\text{mol.den}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ). Na konci pokusu se míra vylučování sodíku vrátila k hodnotám srovnatelným s oběma zbývajících skupinami (viz graf 21A). Hypertenzní neléčení potkani vykazovali zvýšenou aktivitu NO syntázy charakterizovanou zvýšeným poměrem nitrátů/nitritů vzhledem k normotenzním zvířatům (normotenzní  $6,4 \pm 0,9$  vs. hypertenzní  $16,6 \pm 1,65 \mu\text{mol.den}^{-1}$ ) (viz graf 21B). Léčba analogem aktivitu NO syntázy nezměnila (hypertenzní  $16,6 \pm 1,65$  vs. hypertenzní + EET-A  $17,9 \pm 1,95 \mu\text{mol.den}^{-1}$ ).



Graf 21 Hodnoty absolutního vylučování sodíku v průběhu pokusu (A) a aktivita NO syntázy vyjádřená poměrem koncentrací nitrátu k nitritům v moči (B) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty).

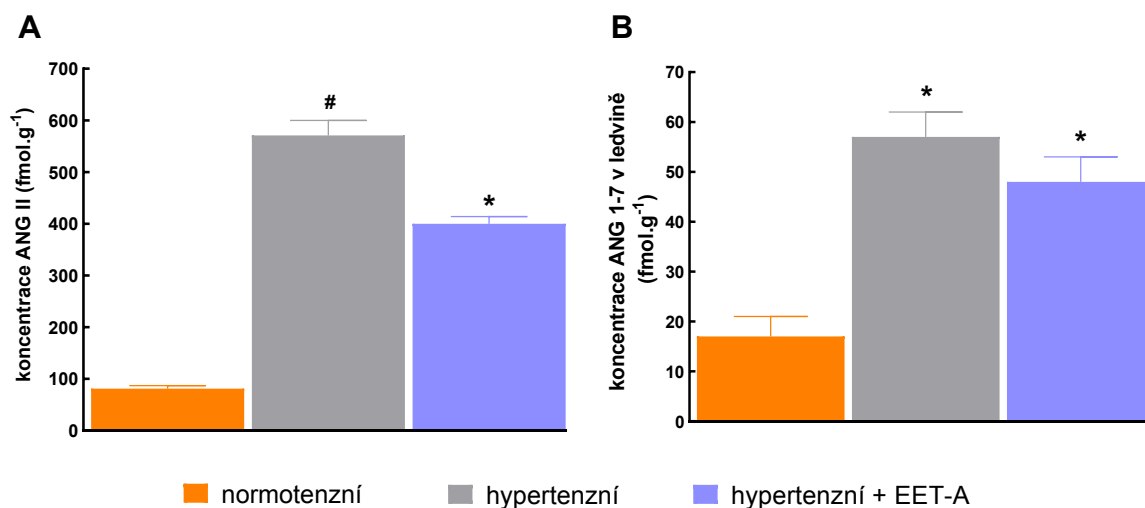
Při srovnání s normotenzní skupinou se v průběhu pokusu u hypertenzních neléčených zvířat koncentrace 8-isoprostanů v moči (značící narůstající oxidativní stres) prudce zvyšovala (normotenzní  $26,2 \pm 2,2$  vs. hypertenzní  $40,9 \pm 2,1 \text{ ng}.\text{den}^{-1}$ , den 16.) a ani léčba analogem tuto skutečnost nezměnila (hypertenzní  $40,9 \pm 2,1$  vs. hypertenzní + EET-A  $42,1 \pm 1,8 \text{ ng}.\text{den}^{-1}$ , den 16.) (viz graf 22A). V grafu 22B jsme zaznamenali poměr EETs/DHETEs v kůře ledvin na konci pokusu (den 18.). U hypertenzních neléčených potkanů jsme ve shodě s předešlými studiemi (Honetschlägerová Z. et al., 2011[a]) a

2011[b]) naměřili snížený poměr biologicky aktivní formy EETs ve srovnání s normotenzní skupinou (normotenzní  $1,04 \pm 0,08$  vs. hypertenzní  $0,34 \pm 0,14$  EETs/DHETEs) (viz graf 22B). Léčba analogem nijak neovlivnila míru poměru EETs/DHETEs ve srovnání s hypertenzní skupinou (hypertenzní  $0,34 \pm 0,14$  vs. hypertenzní + EET-A  $0,39 \pm 0,16$  EETs/DHETEs).



Graf 22 Hodnoty vylučování 8-isoprostanů v průběhu pokusu (A) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty). Množství biologicky aktivních EETs vyjádřený poměrem EETs k DHETEs v ledvině (B) (\*  $p < 0,05$  vs. normotenzní skupina).

U hypertenzních neléčených potkanů jsme naměřili 7x vyšší koncentraci renálního ANG II oproti normotenzní skupině (normotenzní  $81 \pm 6$  vs. hypertenzní  $571 \pm 29$  fmol.g<sup>-1</sup>) (viz graf 23A). Léčba analogem EET-A koncentraci renálního ANG II statisticky významně snížila vzhledem k hypertenzní skupině (hypertenzní  $571 \pm 29$  vs. hypertenzní + EET-A  $400 \pm 14$  fmol.g<sup>-1</sup>). Graf renální koncentrace ANG 1-7 (viz graf 23B) vykazoval stejný vzor jako graf pro renální koncentraci ANG II (viz graf 23A). Hypertenzní skupině jsme naměřili statisticky významně vyšší koncentrace ANG 1-7 v ledvinové kůře (normotenzní  $17 \pm 4$  vs. hypertenzní  $57 \pm 5$  fmol.g<sup>-1</sup>) a léčba EET-A koncentraci ANG 1-7 u hypertenzních potkanů nijak významně neovlivnila (hypertenzní  $57 \pm 5$  vs. hypertenzní + EET-A  $48 \pm 5$  fmol.g<sup>-1</sup>).



Graf 23 Renální koncentrace ANG II (A) a ANG 1-7 (B) (\* p < 0,05 vs. normotenzní skupina, # p < 0,05 vs. hypertenzní skupina).

## 6.6 Diskuze

Již dříve bylo pozorováno, že endogenní EETs inhibují reabsorpci sodíku v proximálním tubulu blokováním  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  výměníku (Madhun Z.T. et al., 1991) a blokováním ENaK kanálů v kortikálních sběrných kanálcích (Sakairi Y. et al., 1995; Hye Khan M.A. et al., 2014). Tato zjištění podporují teorii, že antihypertenzní účinek EETs je spojen s jejich schopností zvýšit vylučování sodíku ledvinami (Lee C.R. et al., 2010; Sporková A. et al., 2011; Elmarakby A.A., 2012; Neckář J. et al., 2012; Fan F. et al., 2015; Imig J.D., 2015). V naší studii jsme pozorovali, že v rané fázi hypertenze měli potkani významně zvýšený  $U_{\text{NO}_x}$ . Tato skutečnost podporuje koncept, že u ANG II-dependentního modelu hypertenze hraje zvýšená aktivita intrarenální NO syntázy (a tudíž zvýšená produkce NO) renoprotektivní roli a pomáhá kompenzovat vazokonstrikční účinek zvýšeného cirkulujícího i tkáňového ANG II (Sigmon D.H. a Beierwaltes W.H., 1993; Navar L.G. et al., 2000). Naše dřívější studie navíc prokázala, že renální NO kriticky působí proti zvýšenému vazokonstrikčnímu účinku ANG II po indukci hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) transgenních potkanů (Honetschlägerová Z. et al., 2013). V předešlých studiích bylo prokázáno, že zvýšená produkce  $\text{O}_2$  a následná snížená biologická dostupnost NO přispěly ke zvýšené vaskulární citlivosti k dlouhodobým tlakovým účinkům ANG II u ANG II-dependentních modelů hypertenze (Kawada N. et al., 2002; Reckelhoff J.F. a Romero J.C., 2003; Kopkan L. et al., 2007). Kromě toho je známo, že endogenní  $\text{O}_2$  přímo stimuluje renální tubulární reabsorpci vedoucí k retenci sodíku a

může tak přispívat ke zvýšení TK u různých forem hypertenze včetně modelu závislého na ANG II (Sigmon D.H. a Bieirwaltes W.H., 1993; Navar L.G. et al., 2000; Reckelhoff J.F. a Romero J.C., 2003; Majid D.S.A. a Kopkan L., 2007). Bylo také zjištěno, že eikosanoidy odvozené od CYP vyvolaly vazodilataci převážně aktivací NOS (eNOS) s následným zvýšením biologické dostupnosti NO (Hercule H.C. et al., 2009), a prokázáno, že zvýšená hladina O<sub>2</sub> přispěla ke zvýšení renální vaskulární resistance a zvýšení TK u TGR(CYP1a1-Ren2) transgenních potkanů s maligní ANG II-dependentní hypertenzí (Patterson M.E., 2008). Z výsledků našich pokusů usuzujeme, že zvýšená biologická dostupnost NO během vývojové i udržovací fáze hypertenze spojená se zabráněním zvýšení produkce O<sub>2</sub> mohla výrazně přispět k snížení TK a renoprotektivním účinkům preventivní léčby pomocí EET-A u maligní formy ANG II-dependentní formy hypertenze. Naše analýza RAAS odhalila, že preventivně podávaný EET-A inhiboval tvorbu ANG II v krevním oběhu i ledvinách na úrovni blokády ACE. Tomu odpovídalo i pozorování skupin preventivně léčených ACE inhibítorem, které vykazovaly stejný vzorec chování komponent RAAS jako EET-A léčená zvířata. Pozoruhodné potlačení aktivity RAAS pomocí EET-A, zejména jeho intrarenální složky, se nám jeví jako kriticky důležité, protože je nyní dobře známo, že nevhodná aktivace ledvinového RAAS, a tudíž její zesílené působení, je hlavním prohypertenzním mechanismem odpovědným za vývoj ANG II-dependentní hypertenze (Kobori H. et al., 2007). Zvláště zajímavé je zjištění, že léčba EET-A blokovala aktivitu RAAS na úrovni ACE. To je v souladu i s dřívějšími poznatky, že ACE zprostředkovaná tvorba ANG II v ledvinách je nezávislým faktorem podílejícím se na vývoji hypertenze a že blokáda ledvinového ACE výrazně zmírnila hypertenzi vyvíjející se v reakci na infuzi ANG II (Gonzalez-Villalobos R.A. et al., 2013). Zajímavá jsou zjištění týkající se osy ACE2 – ANG 1-7 – Mas receptor. Předpokládá se, že tato osa působí kontraproduktivně k vazokonstrikční ose ACE – ANG II – AT1, zejména za podmínek zvýšené aktivity RAAS (Bürgelová M. et al., 2009; Ferrario C.M., 2011; Červenka L. et al., 2015; Hampl V. et al., 2015; Husková Z. et al., 2016). Zjistili jsme, že chronická léčba EET-A hypertenzních potkanů zvýšila aktivitu ACE2 a koncentraci ANG 1-7 v plasmě i ledvinách. Zdá se, že velmi důležitá je právě ona zvýšená aktivita ACE2, protože právě tento enzym tvoří ANG 1-7 a to z ANG I i ANG II (Ferrario C.M., 2011). Kombinace těchto dvou syntetických drah enzymu ACE2 může vysvětlovat námi nalezené výsledky, a sice zvýšenou aktivitu ACE2, zvýšenou koncentrací ANG 1-7 a sníženou koncentrací ANG II. Stěžejním mechanismem by tedy mohlo být nejprve vyčerpání ANG I pro tvorbu ANG 1-7, který by tak nebyl dostupný pro syntézu ANG II enzymem ACE, a

také vyčerpání již stávajícího ANG II za účelem přeměny opět na ANG 1-7. Pokud ještě vezmeme do úvahy pozorované snížení aktivity ACE v ledvinách a plasmě, je zřejmé, že léčba EET-A posouvá celý komplex drah zapojených do syntézy peptidů angiotenzinu směrem k tvorbě ANG 1-7. Zdá se tedy, že toto je hlavním mechanismem antihypertenzního účinku EET-A v našem experimentu a podporuje to již dříve předjímaný názor, že stěžejní rolí vazodilatační osy RAAS je působit proti té vazokonstrikční (Ferrario C.M. et al., 1991; Ferrario C.M., 2011; Červenka L. et al., 2015). Souhrnně naše data naznačují, že potlačení cirkulujících a zejména intrarenálních hladin ANG II v kombinaci s aktivací vazodilatační osy RAAS jsou nejpravděpodobnějšími hlavními mechanismy odpovědnými za antihypertenzní a renoprotektivní účinky preventivně EET-A léčených hypertenzních potkanů. Pozorovaný posun vyvážení vazodilatační a vazokonstrikční osy RAAS je pravděpodobně modifikován změnami biologické dostupnosti NO a aspoň částečně obratem produkce kyslíkových radikálů. Stav obou systémů poté společně určuje vylučování sodíku ledvinami, periferní i renální vaskulární morfologii a funkci se zjevnými důsledky pro konečnou hladinu TK a konečný stav orgánů. Dalším zjištěním této studie bylo, že pozdní léčba EET-A analogem neměla žádný příznivý vliv na výši TK, závažnost již rozvinuté hypertenze nebo míru orgánového poškození. Je však pozoruhodné, že i když pozdní léčba EET-A snížila koncentraci ANG II v ledvině, přesto hladina ANG II zůstala stále výrazně zvýšena a blízká hladině pozorované u neléčených hypertenzních potkanů. U pozdní léčby nebyl prokázán ani nárůst dostupnosti ANG 1-7, zvýšení biologické dostupnosti NO ani zvýšení prevence oxidačního stresu. Vazokonstrikční osa RAAS zůstala v protokolu pozdní léčby stále nepřiměřeně aktivována a na rozdíl od léčby preventivní jsme nezaznamenali žádnou zvýšenou aktivaci vazodilatační. Stručně řečeno, kombinace minimálního potlačení zvýšených hladin ANG II, bez zvýšení ANG 1-7, snížené intrarenální biologické dostupnosti NO a zvýšeného oxidativního stresu vysvětluje nepřítomnost antihypertenzních a organoprotektivních účinků pozdní léčby pomocí EET-A. Naše interpretace všech těchto výsledků vychází z představy, že včasná léčba sice zlepšila, nicméně nenormalizovala hodnoty jednotlivých členů prohypertenzní osy RAAS, NO, oxidačního stresu a rychlosti vylučování sodíku ledvinami. Z toho důvodu jsme pozorovali pouze útlum, nikoliv zvrácení hypertenze a orgánového poškození. Lze tedy předpokládat, že naše tzv. pozdní léčba nemohla mít již žádný příznivý efekt na plně rozvinutou hypertenzi z toho důvodu, že změny vaskulárních funkcí, morfologie renální tkáně i myokardu již byly nevratné.

## 6.7 Závěr

### Preventivní protokol

Prvním hlavním zjištěním této studie bylo, že léčba TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů analogem EET-A zmírnila vývoj maligní hypertenze. Kromě pozitivního vlivu na krevní tlak jsme u léčených zvířat také pozorovali podstatně lepší stav ledvin charakterizovaný sníženou albuminurií, tubulointersticiálním poškozením a glomerulosklerózou. EET-A terapie zabránila obvyklému poklesu RBF, ke kterému dochází u hypertenzních zvířat, jakož i hypertrofii levé srdeční komory. Kromě toho léčba EET-A nejenže zabránila snížení RBF, ale také zabránila narušení její autoregulace. Léčba EET-A zmírnila počáteční pokles  $U_{NaV}$  (den 2.) ve srovnání se skupinou hypertenzních neléčených zvířat a naopak v průběhu pokusu významně zvýšila  $U_{NaV}$  u hypertenzních EET-A léčených potkanů (den 6.). Na konci pokusu byly však hodnoty  $U_{NaV}$  u všech skupin opět srovnatelné. Abychom osvětlili možné mechanismy ochranného působení EET-A, snažili jsme se analyzovat změny aktivit oxidu dusnatého, oxidačního stresu a RAAS včetně osy ACE2 – ANG 1-7 – Mas receptor. Zjistili jsme, že  $U_{NOxV}$  se u neléčených hypertenzních potkanů nejprve zvyšoval a následně klesal až k bazálním hodnotám. Naopak  $U_{ISOV}$  se u hypertenzních zvířat postupně zvyšovalo, až bylo na konci experimentu významně vyšší než u normotenzních potkanů. Je pozoruhodné, že léčba EET-A u hypertenzních zvířat zabránila konečnému poklesu  $U_{NOxV}$  a zvýšení  $U_{ISOV}$ . Je také zajímavé, že léčba ACE inhibitorem vykazovala velmi podobné (pokud ne přímo identické) účinky na  $U_{NOxV}$  a  $U_{ISOV}$  jako léčba EET-A. Souhrnně se dá říci, že v našem experimentu léčba hypertenzních potkanů pomocí EET-A i ACEi zvýšila biologickou dostupnost NO a snížila koncentrace superoxidu ( $O_2$ ). Bohužel, současné údaje nám neumožňovaly určit mechanismy, na nichž jsou tyto účinky založeny. Bez ohledu na přesný mechanismus je zřejmé, že zvýšená biologická dostupnost NO a snížená produkce  $O_2$  by mohla významně přispívat k antihypertenzním účinkům EET-A a ACEi u hypertenzních potkanů. Také jsme zjistili, že podávání EET-A hypertenzním potkanům snížilo renální i plasmatické hladiny ANG II a naopak zvýšilo koncentraci ANG 1-7, zejména intrarenální dostupnost ANG 1-7 a plasmatickou ACE2 aktivitu. Závěrem lze říci, že léčba orálně aktivním EET-A v rané fázi hypertenze podstatně zmírnila její rozvoj a poškození koncových orgánů. Léčba potlačila aktivitu prohypertenzní osy RAAS a zvýšila aktivitu její vazodilatační osy.



### **Léčebný protokol**

Na rozdíl od preventivního protokolu nemělo léčebné (opožděné) podávání EET-A žádný příznivý účinek na plně rozvinutou hypertenzi. U potkanů vystavených tomuto léčebnému protokolu jsme nepozorovali žádné podstatné snížení srdeční hypertrofie nebo tkáňového poškození ledvin.

## **7 Zmírnění hypertenze u angiotenzin II-dependentních hypertenzních potkanů zvýšením produkce 20-HETE v organismu**

### **7.1 Úvod a cíle**

Ačkoliv klinické i experimentální studie poukazyvaly, že za rozvojem maligní hypertenze stojí abnormální aktivita RAAS (Fleming S., 2000; Collidge T.A., 2004; Poulter N.R., 2015), detailní výzkum byl limitován absencí vhodného experimentálního modelu. Toto omezení bylo překonáno vytvořením inbrední transgenové linie potkana TGR(CYP1a1-Ren2) se schopností indukovatelného rozvinutí hypertenze.

V souladu s ostatními autory i naše pracovní skupina na tomto modelu dříve pozorovala, že rozvoj typické maligní hypertenze není pouze jednoduchým výsledkem zvýšené aktivity RAAS, ale také vzájemným narušením vztahů s ostatními vazoaktivními systémy (Vaňourková Z. et al., 2006; Husková Z. et al., 2010; Sporková A. et al., 2014). Pro nás velmi zajímavým objevem byla především narušená rovnováha v koncentracích některých metabolitů kyseliny arachidonové u maligních hypertenzních zvířat. V mnoha studiích (vč. našich) byl rozvoj ANG II – dependentní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) transgenických potkanů doprovázen sníženou intrarenální koncentrací epoxyeikosatrienových kyselin (EETs). Vzhledem k tomu, že EETs významně snižují cévní tonus v periferním řečišti a inhibují renální tubulární transport vody a sodíku, jsou tak zapojeny do dlouhodobé regulace krevního tlaku (Roman R.J., 2002; Elmarakby A.A., 2012; Fleming I., 2014; Imig J.D., 2015). Na rozdíl od epoxygenáz je však role metabolitů kyseliny arachidonové vznikající aktivitou  $\omega$ -hydroxylázy v patofyziologii ANG II-dependentní maligní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů dosud opomíjena. 20-HETE je účinný vazokonstriktor v periferním cévním řečišti a jeho interakce s RAAS spočívá především v posílení prohypertenzních účinků RAAS u ANG II modelů (Williams J.M. et al., 2010; Hoopes S.L. et al., 2015). 20-HETE také inhibuje reabsorpci sodíku v proximálním tubulu a tlustém raménku vzestupné Henleovy kličky (Escalante B. et al., 1994; Quigley R. et al., 2000; Yu M. et al., 2007) a tak by mohla zvýšená koncentrace 20-HETE podél renálního tubulu podporovat natriurézu a jít proti svým vazokonstrikčním účinkům (Roman R.J., 2002; Williams J.M. et al., 2010; Fan F. et al., 2015).

Vzhledem k nejisté roli 20-HETE při vzniku a rozvoji maligní hypertenze (brány v potaz její protichůdné účinky) jsme předpokládali, že intrarenální deficit 20-HETE a následná absence jeho natriuretického účinku přispívá k rozvoji ANG II – dependentní maligní formě hypertenze. Pro navýšení 20-HETE v organismu potkana jsme použili fenofibrát (komerční název Lipanthyl 267M, Laboratories Fournier S.A., Dijon, Francie) běžně užívaný lék na snižování hladiny volných triglyceridů, u kterého bylo opakovaně prokázáno, že indukuje expresi genu pro CYP4A (Roman R.J., 2002; Fan F. et al., 2015). CYP4A je enzym ze skupiny  $\omega$ -hydroxyláz, který je u potkanů zodpovědný za produkci 20-HETE z kyseliny arachidonové. Předpokládali jsme, že fenofibrátem indukovaná zvýšená renální produkce 20-HETE by mohla přispět ke zlepšení maligní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů. Abychom tuto teorii potvrdili, rozhodli jsme se u našich zvířat měřit vliv dlouhodobého podávání fenofibrátu na rozvoj maligní hypertenze, intrarenální koncentraci a expresi 20-HETE a jednotlivých komponent RAAS. Mnohé předešlé studie (vč. našich) také prokázaly zhoršenou autoregulační efektivitu ledvin a oploštěnou tlakově-natriuretickou křivku u tohoto kmene potkanů. Obojí zásadně přispívá k rozvoji maligní hypertenze (Opay A.L. et al., 2006; Erbanová M. et al., 2009; Honetschlägerová Z. et al., 2011[a]). Z tohoto důvodu jsme v rámci experimentu chtěli otestovat, zda léčba fenofibrátem nebude mít také vliv na účinnost tlakově-natriuretického a autoregulačního mechanismu ledvin.

## **7.2 Zhodnocení úlohy RAAS a CYP-450 vázané $\omega$ -hydroxylázové dráhy v metabolismu kyseliny arachidonové v časném stádiu rozvoje maligní hypertenze**

### **7.2.1 Protokol**

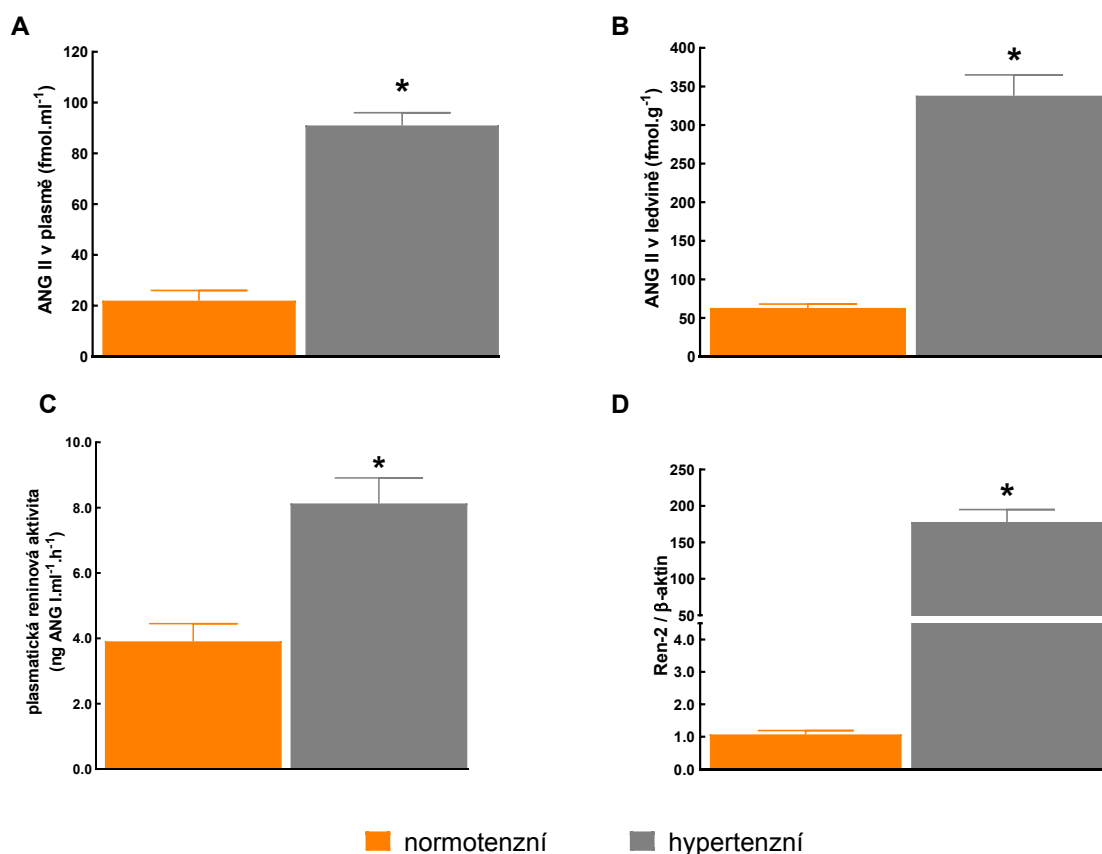
Cílem této části výzkumu bylo stanovení stupně aktivace RAAS a  $\omega$ -hydroxylázové dráhy kyseliny arachidonové v počátečním stádiu rozvoje ANG II – dependentní maligní hypertenze. V pokusu jsme použili jako v předešlé studii TGR(CYP1a1-Ren2) potkany, kteří rozvíjejí maligní hypertenzi po podání I3C v potravě. Experiment jsme provedli na 330–350 g vážících samcích rozdělených do dvou skupin:

- 1) normotenzní TGR(CYP1a1-Ren2) n = 8
- 2) hypertenzní TGR(CYP1a 1-Ren2) n = 10

Druhé skupině jsme po dobu 4 dnů podávali I3C v potravě. Po čtyřech dnech této indukce jsme pokus ukončili dekapitací zvířat a následným odběrem vzorků na všechny námi sledované biochemické analýzy. Ihned po usmrcení jsme zvířatům odebrali plnou krev pro stanovení koncentrace ANG II v plasmě. Dále jsme zvířatům odebrali ledviny na stanovení koncentrací ANG II, EETs, DHETEs, 20-HETE, CYP4A a genových expresí CYP4A, CYP2C23 v ledvinové tkáni. Odebrali jsme také játra pro stanovení genové exprese Ren2 (popis metodiky viz kap. 4.2).

## 7.2.2 Výsledky

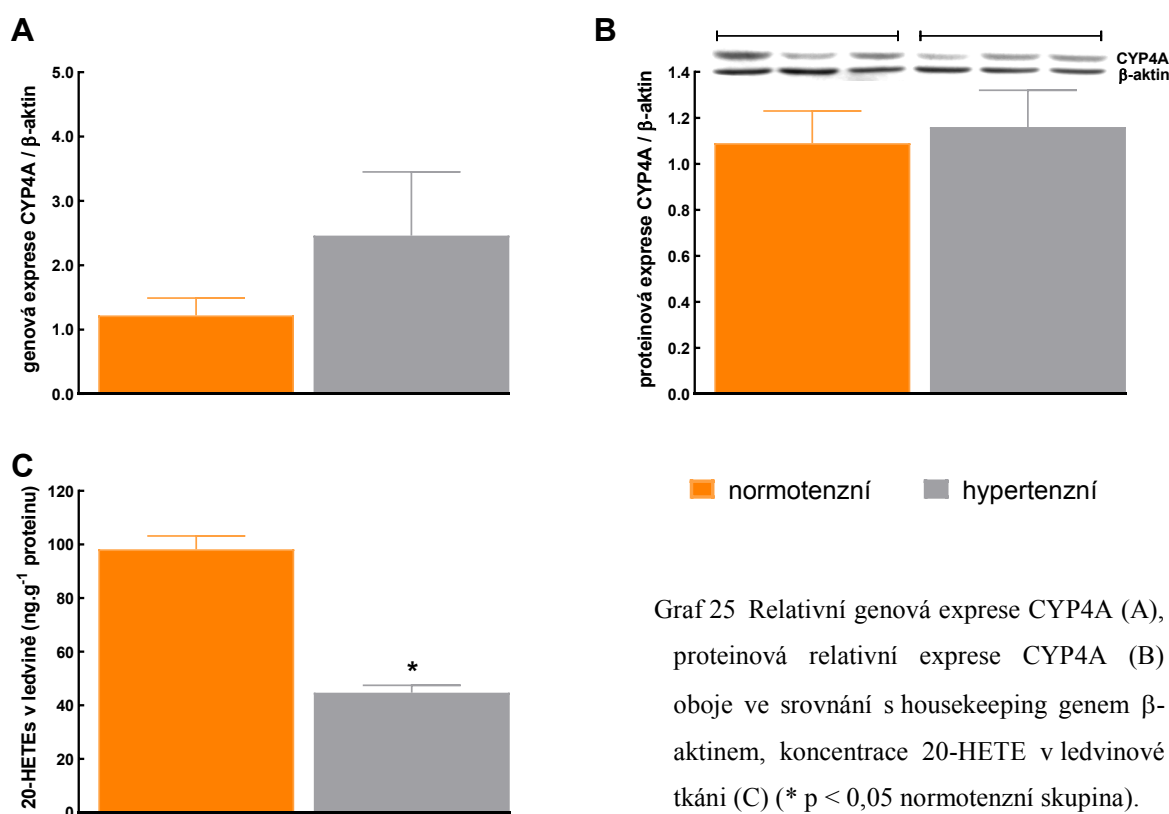
Indukce genové exprese reninu podáním I3C v potravě způsobila u hypertenzních zvířat očekávanou zvýšenou genovou expresí Ren2 transgenu (více jak 200x) (viz graf 24D). Společně se zvýšenou reninovou expresí v důsledku indukce narostla statisticky významně reninová enzymová aktivita (normotenzní  $3,91 \pm 0,54$  vs. hypertenzní  $8,13 \pm 0,78$  ANG I ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (viz graf 24C).



Graf 24 Koncentrace ANG II v plasmě (A), koncentrace ANG II v ledvinové tkáni (B), plasmatická reninová aktivita (C), relativní genová exprese Ren2 v játrech (D) ve srovnání s housekeeping genem  $\beta$ -aktinem (\*  $p < 0,05$  normotenzní skupina).

Ve shodě s reninovou aktivitou jsme naměřili u indukovaných zvířat i statisticky významný nárůst plasmatické (normotenzní  $22 \pm 4$  vs. hypertenzní  $91 \pm 5$  fmol.ml<sup>-1</sup>) i renální (normotenzní  $63 \pm 5$  vs. hypertenzní  $338 \pm 27$  fmol.g<sup>-1</sup>) koncentrace ANG II ve srovnání s neindukovanými skupinami (viz graf 24A, 24B).

Podávání I3C nezvýšilo genovou expresi ani proteinovou koncentraci enzymu CYP4A (viz graf 25A, 25B). U hypertenzní skupiny jsme naměřili sníženou renální koncentraci 20-HETE (normotenzní  $98 \pm 5$  vs. hypertenzní  $44 \pm 3$  ng.g<sup>-1</sup>) (viz graf 25C).



Graf 25 Relativní genová exprese CYP4A (A), proteinová relativní exprese CYP4A (B) oboje ve srovnání s housekeeping genem β-aktinem, koncentrace 20-HETE v ledvinové tkáni (C) (\* p < 0,05 normotenzní skupina).

### 7.3 Účinek léčby fenofibrátem na krevní tlak, RAAS, metabolity kyseliny arachidonové a expresi sledovaných CYP enzymů

#### 7.3.1 Protokol

V této části pokusu jsme opět použili samce kmene TGR(CYP1a1-Ren2) o váze 330–350 g. Podle doporučení pro studie kardiovaskulárních funkcí u malých experimentálních zvířat jsme použili k měření tlaku a dalších kardiovaskulárních parametrů radiotelemetrické sondy TA11PA-C40 (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA). Tato nová technologie nám umožnila monitorování pěti parametrů po 24 h

u plně bdělých volně se pohybujících zvířat. Popis protokolu implantace sond v kap. 6.2.1. Monitorování kardiovaskulárních parametrů bylo zahájeno po 7 dnech rekonvalescence.

Zvířata jsme rozdělili do těchto experimentálních skupin:

- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1) normotenzní + neléčení (n = 6)   | 3) hypertenzní + neléčení (n = 8)   |
| 2) normotenzní + fenofibrát (n = 7) | 4) hypertenzní + fenofibrát (n = 8) |

Následující 4 dny jsme měřili bazální hodnoty tlaku u všech zvířat před zahájením léčby a indukci hypertenze. Po 4denním sledování jsme zvířata utratili dekapitací a odebrali vzorky plasmy, ledvin a jater pro změření všech námi sledovaných hodnot (způsobem uvedeným v kap. 4.2).

Na základě získaných výsledků jsme se rozhodli ještě celý pokus zopakovat s prodlouženou dobou působení léčby. Opět jsme po implantaci radiotelemetrických sond rozdělili zvířata do stejných experimentálních skupin, s tím rozdílem, že jsme pokus ukončili až po 12 dnech indukce a léčby.

Zvířata byla rozdělena do těchto experimentálních skupin:

- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1) normotenzní + neléčení (n = 6)   | 3) hypertenzní + neléčení (n = 8)   |
| 2) normotenzní + fenofibrát (n = 7) | 4) hypertenzní + fenofibrát (n = 8) |

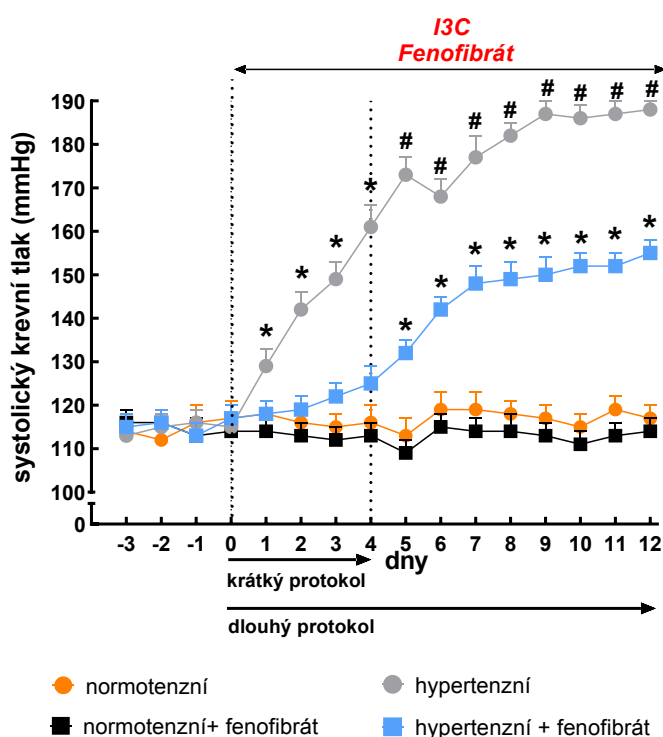
## 7.3.2 Výsledky

### Krátký protokol (4 dny)

Výsledky měření tlaku a prospívání zvířat v průběhu krátkého protokolu jsme spojili společně s výsledky protokolu dlouhého a jsou znázorněny v grafu 26. Během prvních čtyř dnů indukce a léčby nedošlo k žádnému statisticky významnému nárůstu krevního tlaku u indukovaných léčených zvířat ve srovnání s neindukovanými skupinami. Na rozdíl od toho, skupina indukovaných neléčených zvířat vykazovala již od prvního dne indukce statisticky významný nárůst středního arteriálního tlaku ve srovnání s neindukovanými skupinami. Po dobu krátkého protokolu jsme nezaznamenali statisticky významné zhoršené prospívání zvířat, ale byl již patrný trend úbytku váhy u indukovaných zvířat (výraznější u zvířat neléčených) (viz graf 27).

## Dlouhý protokol (12 dní)

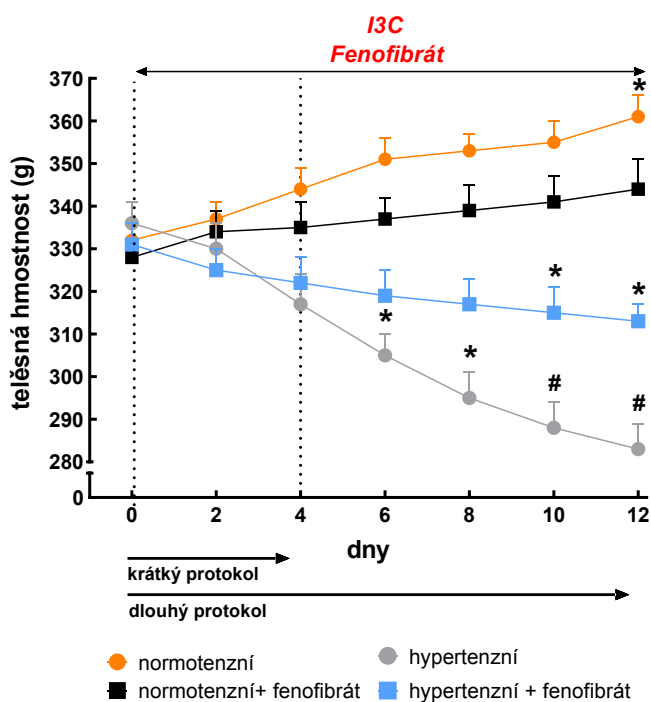
Skupiny potkanů, kterým jsme nepodávali I3C v potravě zůstaly po celou dobu pokusu normotenzní, a to i v případě skupiny léčené fenofibrátem. Naproti tomu skupiny, kterým jsme podali I3C, začaly postupně rozvíjet hypertenzi. Nicméně, byl statisticky významný rozdíl v rychlosti a míře hypertenze u indukovaných skupin v důsledku léčby fenofibrátem. Léčená zvířata začala rozvíjet hypertenzi s pětidenním zpožděním a ani na konci pokusu (12. den) nedosahovala tak závažných hodnot jako zvířata neléčená (hypertenzní  $182 \pm 2$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $154 \pm 3$  mmHg) (viz graf 26).



Graf 26 Sledování systolického krevního tlaku v reálném čase v průběhu krátkého i dlouhého protokolu u všech čtyř sledovaných skupin (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty v rámci skupiny, #  $p < 0,05$  vs. ostatní skupiny ve stejný den pokusu,  $p < 0,05$ ).

Současně s rozvíjející se maligní hypertenzí vykazovala hypertenzní neléčená zvířata známky špatného zdravotního stavu: polydipsii, nahrbené držení těla, naježenou srst a úbytek váhy (viz graf 27). Naproti tomu indukovaní potkani, kteří byli léčeni po celou dobu pokusu fenofibrátem, vykazovali podstatně lepší zdravotní stav: menší úbytek váhy (hypertenzní  $-51 \pm 4$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $-18 \pm 3$  g) a normální chování bez známek stresu. Množství přijímané potravy jsme v průběhu pokusu monitorovali u všech skupin a žádné jeho statisticky významné snížení jsme nezaznamenali (pouhé snížení o 6 % u indukovaných neléčených zvířat). Velké ubývání na váze indukovaných neléčených zvířat tudíž nesouviselo ani tak se sníženým příjmem potravy, ale bylo spíše důsledkem

akcelerované tlakově vázané natriurézy a s ní spojené zvýšené diurézy, přičemž žádná ze skupin zvířat nevykazovala klinicky významné známky dehydratace.

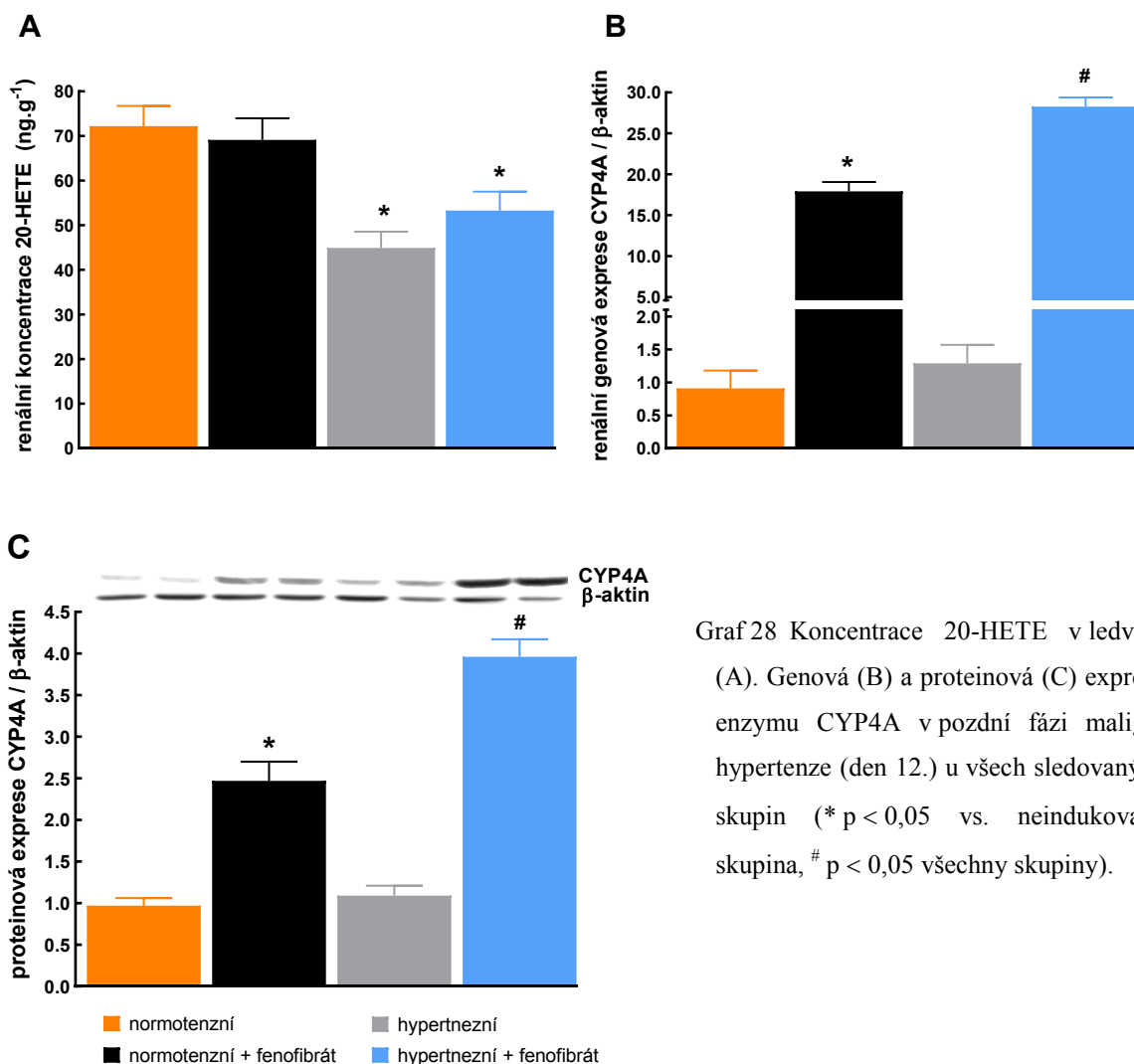


Graf 27 Sledování změn tělesné hmotnosti v průběhu krátkého i dlouhého protokolu u všech sledovaných zvířat (\* p < 0,05 vs. bazální hodnoty v rámci skupiny, # p < 0,05 vs. ostatní skupiny ve stejný den pokusu).

Léčba fenofibrátem ve shodě s předchozími studiemi skutečně i u našich léčených skupin vykazovala trend zvýšené genové exprese a proteinové koncentrace CYP4A v ledvinové tkáni, rozdíl však nebyl dostatečně statisticky významný (viz graf 28B, 28C).

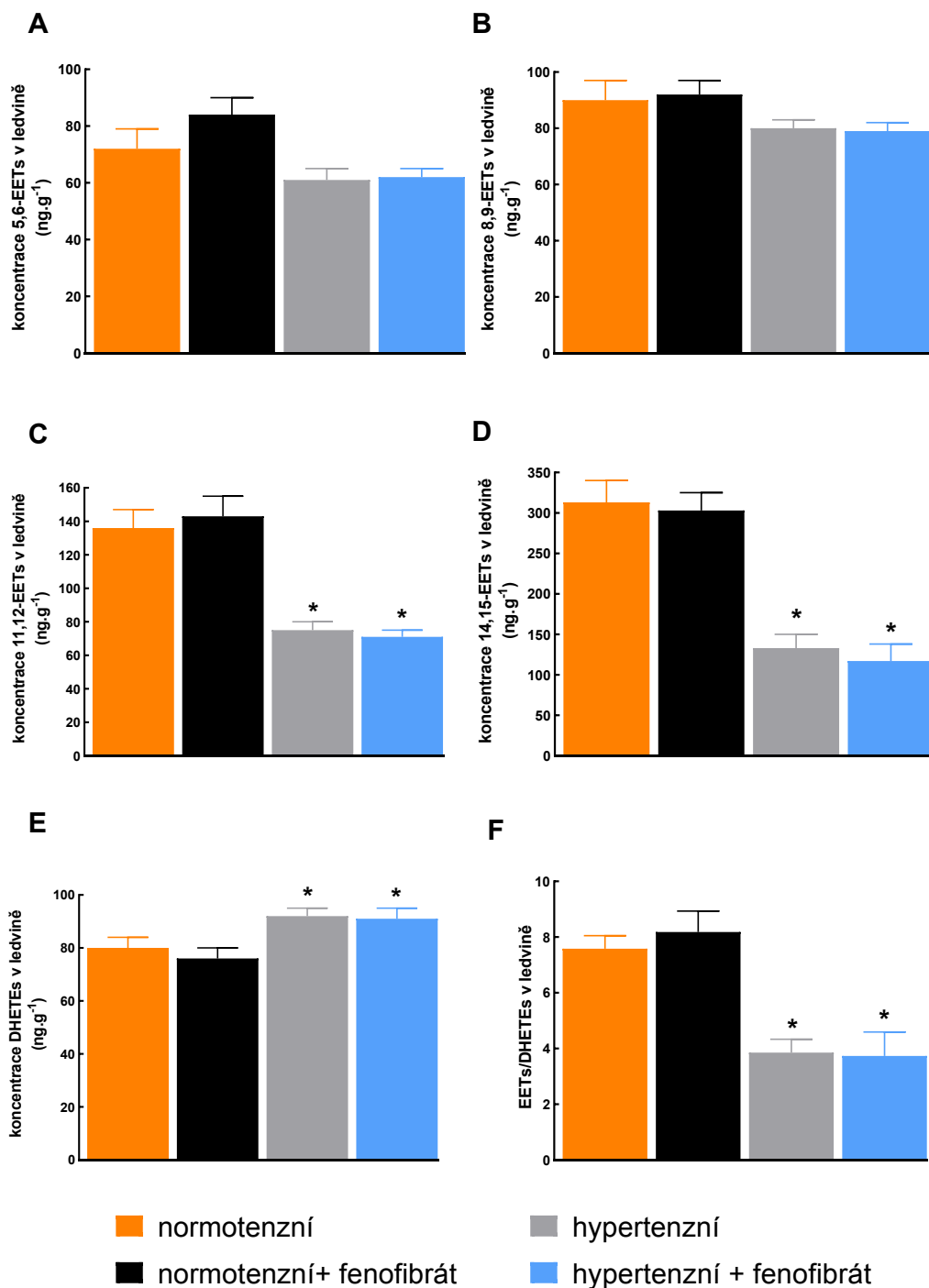
Nicméně, navzdory zvýšené stimulaci CYP4A léčba fenofibrátem nezvýšila koncentraci 20-HETE v ledvinové tkáni (viz graf 28A).





Graf 28 Koncentrace 20-HETE v ledvině (A). Genová (B) a proteinová (C) exprese enzymu CYP4A v pozdní fázi maligní hypertenze (den 12.) u všech sledovaných skupin (\* p < 0,05 vs. neindukovaná skupina, # p < 0,05 všechny skupiny).

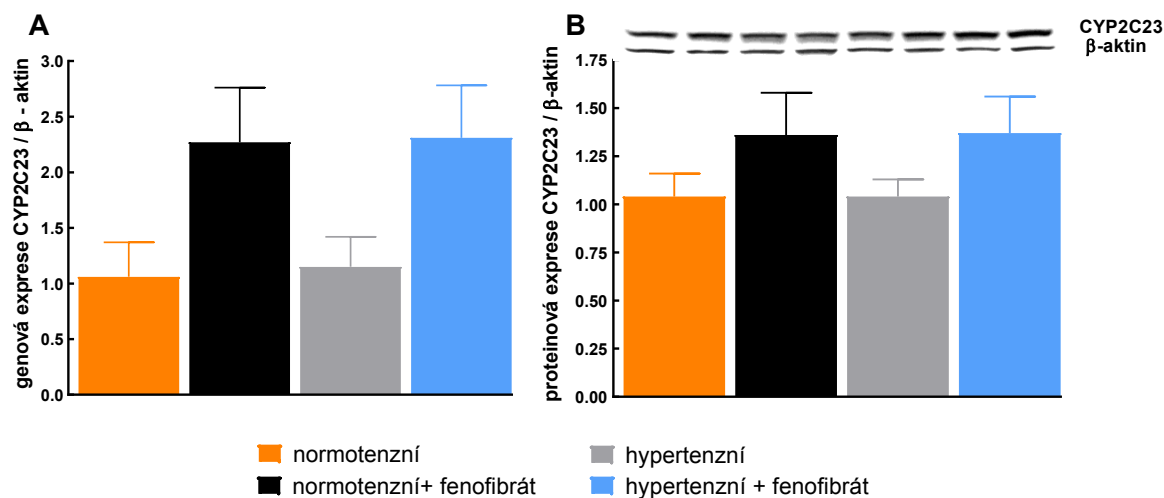
Indukování hypertenzní potkani také vykazovali statisticky snížené koncentrace některých EETs (11,12-EETs a 14,15-EETs) (viz graf 29C, 29D), tedy těch, které jsou považovány za převažující v ledvinové tkáni (Roman R.J., 2002; Fleming I., 2014; Capdevila J.H. et al., 2015). Hladiny zbývajících EETs (5,6 EETs a 7,8 EETs) zůstaly nezměněny (viz graf 29A, 29B). Relativní poměr všech EETs vůči jejich neaktivním metabolitům DHETEs byl statisticky snížen u obou hypertenzních skupin (normotenzní  $7,58 \pm 0,47$  vs. hypertenzní  $3,85 \pm 0,48$  a hypertenzní + fenofibrát  $3,73 \pm 0,86$  EETs/DHETEs) (viz graf 29F).



Graf 29 Hodnoty renálních koncentrací epoxyeikosatrienových kyselin: 5,6-EETs (A), 8,9-EETs (B), 11,12-EETs (C), 14,15-EETs (D). Koncentrace biologicky neaktivních DHETEs (E). Relativní poměr mezi biologicky aktivními EETs a jejich neaktivními produkty DHETEs (F). Všechny hodnoty byly stanoveny v pozdní fázi hypertenze (den 12.) (\*  $p < 0,05$  vs. normotenzní skupiny).

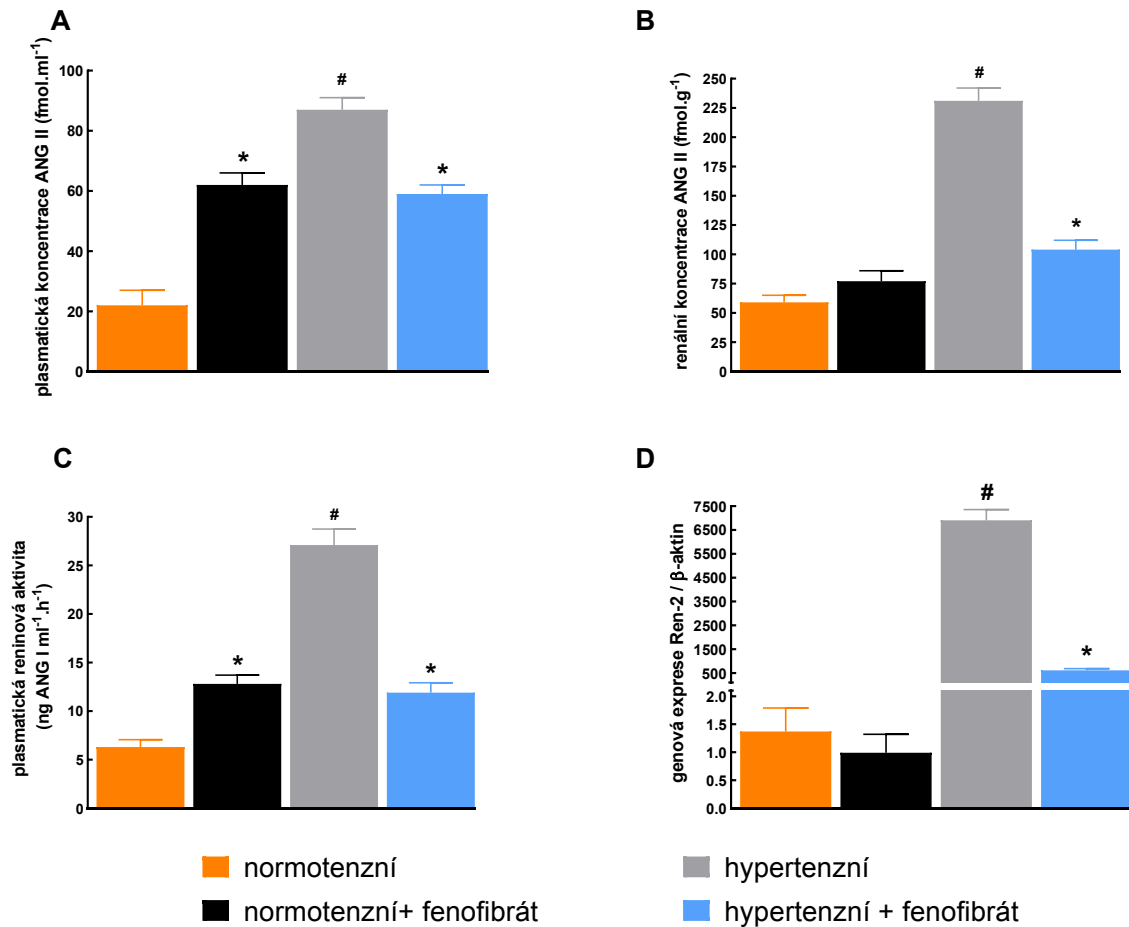
Zajímavou skutečností bylo že, ačkoliv jsme při měření genové exprese ani proteinové koncentrace enzymu CYP2C23 (hlavního genu zodpovědného za produkci EETs u potkanů) nezískali žádné statisticky významné rozdíly, byla jasně patrná stimulace

této metabolické dráhy u zvířat léčených fenofibrátem (neindukovaných i indukovaných potkanů) (viz graf 30A, 30B).



Graf 30 Genová (A) a proteinová (B) exprese enzymu CYP2C23 u všech sledovaných skupin. Všechny hodnoty byly stanoveny v pozdní fázi hypertenze (den 12.).

Podávání I3C v potravě způsobilo velmi silnou stimulaci RAAS, projevující se jak statisticky významně zvýšenou koncentrací ANG II v plasmě (normotenzní  $22 \pm 5$  vs. hypertenzní  $87 \pm 4$  fmol.ml<sup>-1</sup>) i ledvinách (normotenzní  $59 \pm 6$  vs. hypertenzní  $231 \pm 11$  fmol.g<sup>-1</sup>), tak zvýšenou plasmatickou reninovou aktivitou (normotenzní  $6,3 \pm 0,76$  vs. hypertenzní  $27,1 \pm 1,64$  ng ANG I ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Léčba fenofibrátem významně snížila plasmatickou (hypertenzní  $87 \pm 4$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $59 \pm 3$  fmol.ml<sup>-1</sup>) i renální (hypertenzní  $231 \pm 11$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $104 \pm 8$  fmol.g<sup>-1</sup>) koncentraci ANG II u indukovaných potkanů. Stejně tak stimulace maligní hypertenze vedla ke zvýšené plasmatické reninové aktivitě u indukovaných neléčených potkanů a léčba fenofibrátem toto zvýšení významně tlumila (hypertenzní  $27,1 \pm 1,64$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $11,9 \pm 1,02$  ng ANG I ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (viz graf 31A, 31B, 31C). Abychom prozkoumali samotný účinek fenofibrátu na tento modelový organismus, změřili jsme míru genové exprese transgenu Ren2 u jednotlivých experimentálních skupin. Zjistili jsme, že léčba fenofibrátem statisticky významně ztlumila expresi samotného transgenu (viz graf 31D).



Graf 31 Stanovení plasmatické (A) a renální (B) koncentrace ANG II. Stanovení plasmatické reninové aktivity (C) a genové exprese myšního transgenu Ren2 v jaterní tkáni (D). Všechny hodnoty byly stanoveny v pozdní fázi hypertenze (den 12.) (\*  $p < 0,05$  vs. neindukované skupiny, #  $p < 0,05$  všechny skupiny).

## 7.4 Účinek léčby fenofibrátem na renální funkční parametry

### 7.4.1 Experimentální protokol

Tato série pokusu byla ve shodě s předešlými částmi projektu opět provedena na 330–350 g vážících samcích kmene TGR(CYP1a1-Ren2). Potkani byli před začátkem samotného akutního pokusu 12 dní krmeni různými dietami v závislosti na rozdělení do experimentálních skupin:

- 1) normotenzní neléčení (n = 7)
- 2) normotenzní + fenofibrát (n = 7)
- 3) hypertenzní neléčení (n = 7)
- 4) hypertenzní + fenofibrát (n = 7)

Zvířata jsme po 12 dnech od začátku pokusu uvedli do celkové anestézie Thiopentalem (50mg/kg, VUAB pharma, Roztoky, ČR) a provedli stejnou chirurgickou přípravu na akutní autoregulační pokus (postup viz kap. 6.2.1). Měřili jsme 3 clearancové periody po 30 min, během nichž byl potkanovi postupně snižován renální perfúzní tlak (RPT) pomocí aortální svorky na 100 mmHg a 90 mmHg. Během pokusu jsme měřili potkanům střední arteriální tlak, průtok krve ledvinou a odebírali vzorky moči a krve na stanovení hodnot glomerulární filtrace, vylučování sodíku a množství vyloučené moči. Po skončení těchto period jsme ukončili pokus předávkováním zvířete vysokou dávkou Thiopentalu, který způsobil bezbolestné a nestresující utracení.

#### **7.4.2 Kontrolní protokol**

Pro stanovení vlivu chirurgie a samotného experimentu (především jeho délky) na hemodynamiku ledvin jsme provedli nejprve u čtyř skupin zvířat kontrolní protokol, který zahrnoval celý chirurgický postup (viz kap. 6.2.1) s výjimkou nasazení aortální svorky na aortu, přičemž po ekvilibraci byly měřeny také tři clearancové periody, ale bez redukce RPT.

Zvířata jsme rozdělili do těchto experimentálních skupin:

- |                                     |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) normotenzní neléčení (n = 9)     | 3) hypertenzní neléčení (n = 9)      |
| 2) normotenzní + fenofibrát (n = 9) | 4) hypertenzní + fenofibrát (n = 10) |

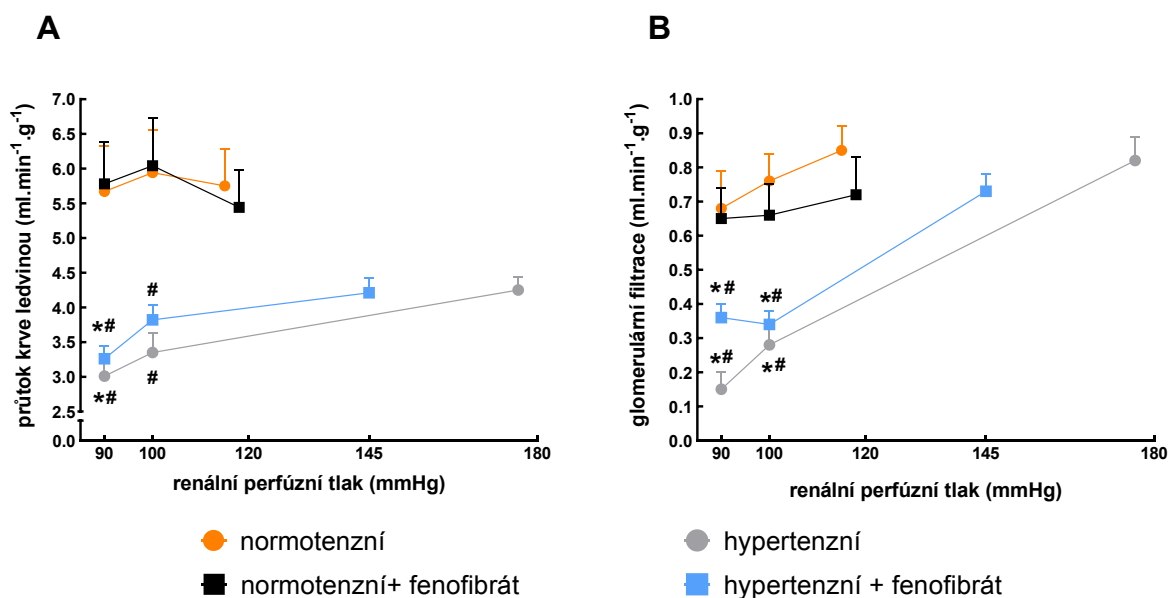
#### **7.4.3 Výsledky**

Všechny bazální hodnoty (1. perioda) středního arteriálního tlaku, průtoku krve ledvinou, glomerulární filtrace, natriurézy i frakčního vylučování sodíku před začátkem cíleného snižování RPT jsme zaznamenali v tabulce 7. Dle předpokladu měli hypertenzní neléčení potkani vysoký střední arteriální tlak a úměrně tomu i významně zvýšenou diurézu. Naproti tomu hypertenzní zvířata, která byla před samotným pokusem zaléčena fenofibrátem, vykazovala hypertenzi mnohem mírnější (hypertenzní  $177 \pm 5$  vs. hypertenzní + fenofibrát  $147 \pm 4$  mmHg). Samotná léčba fenofibrátem neměla žádný vliv na hodnoty měřené u kontrolních normotenzních zvířat.

Bazální hodnoty	normotenzní neléčení	normotenzní + fenofibrát	hypertenzní neléčení	hypertenzní + fenofibrát
MAP (mmHg)	114 ± 3	115 ± 3	177 ± 5* <sup>@</sup>	147 ± 4*
GFR (ml/min.g)	0,87 ± 0,08	0,73 ± 0,11	0,82 ± 0,09	0,75 ± 0,10
RBF (ml/min.g)	5,81 ± 0,53	5,62 ± 0,54	4,21 ± 0,16*	4,19 ± 0,18*
U <sub>Na</sub> V (μmol/min.g)	0,42 ± 0,08	0,36 ± 0,09	2,19 ± 0,41*	1,99 ± 0,28*
FE <sub>Na</sub> (%)	0,37 ± 0,06	0,39 ± 0,08	1,37 ± 0,29*	1,14 ± 0,18*
diuréza (μl/min.g)	4,01 ± 0,29	4,19 ± 0,34	20,12 ± 2,91*	16,89 ± 2,19*

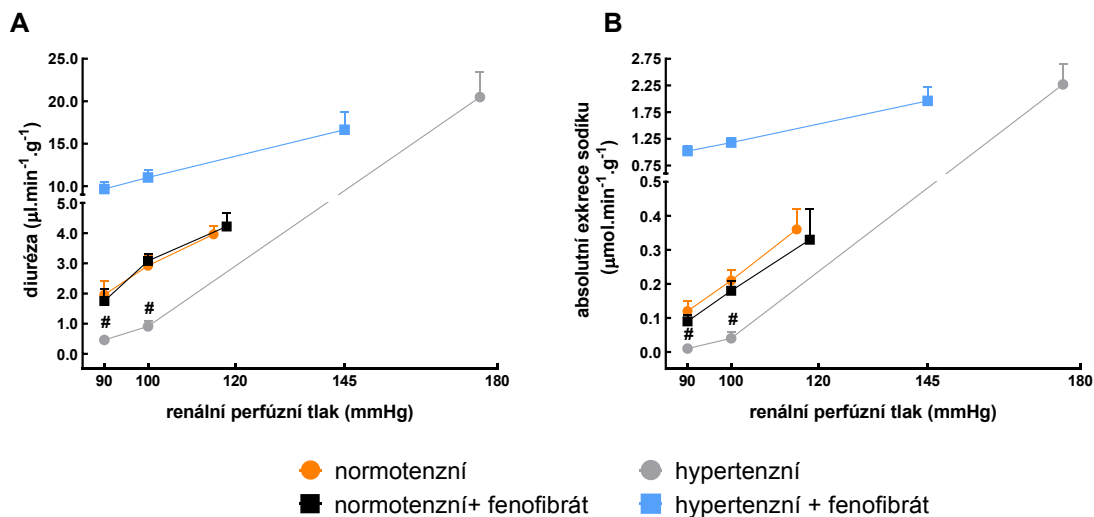
Tab. 7 Bazální hodnoty sledovaných funkčních parametrů pravé ledviny (\* p < 0,05 vs. neoznačené skupiny, <sup>@</sup> p < 0,05 všechny skupiny).

Postupná redukce RPT u normotenzních neléčených zvířat nijak nezměnila hodnoty glomerulární filtrace (GFR) ani průtoku krve ledvinou (RBF), což prokázalo, že autoregulační funkce u těchto zvířat byly velmi dobře zachovány a nijak neovlivněny samotným operačním protokolem (viz graf 32A, 32B). Jak je z grafu patrné, bazální hodnota RBF u hypertenzních zvířat byla znatelně snížena a při postupném snižování RPT svorkou došlo k jejímu prudkému poklesu (z  $4,25 \pm 0,19$  na  $3,35 \pm 0,28$  při redukci na 100 mmHg a na  $3,01 \pm 0,27 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg). Léčba fenofibrátem autoregulaci RBF nijak nezlepšila (z hodnoty  $4,21 \pm 0,22$  pokles na  $3,82 \pm 0,21$  při redukci na 100 mmHg a na  $3,26 \pm 0,19 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg). Bazální hodnoty GFR byly u všech skupin v podstatě rovnocenné, nicméně, na rozdíl od zvířat normotenzních, redukce RPT u obou hypertenzních skupin potkanů způsobila prudký pokles GFR. Hypertenzní potkani tedy měli významně zhoršenou autoregulaci glomerulární filtrace (z hodnoty  $0,82 \pm 0,07$  na  $0,28 \pm 0,05$  při redukci na 100 mmHg a na  $0,15 \pm 0,05 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg).



Graf 32 Vyjádření vztahu mezi renálním arteriálním tlakem, průtokem krve ledvinou (A) a glomerulární filtrací (B) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty, #  $p < 0,05$  vs. odpovídající hodnoty na stejné hodnotě tlaku u neindukovaných skupin).

Hypertenzní neléčení potkani vykazovali v důsledku maligní hypertenze statisticky významně větší diurézu (normotenzní  $3,96 \pm 0,29$  vs. hypertenzní  $20,49 \pm 2,89 \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) i natriurézu (normotenzní  $0,36 \pm 0,06$  vs. hypertenzní  $2,27 \pm 0,39 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ), nicméně redukce RPT způsobila u této skupiny ve srovnání s normotenzními skupinami dramatický pokles obojího. U hypertenzních zvířat množství vyloučené moče statisticky významně pokleslo z hodnot  $20,49 \pm 2,89$  na  $0,91 \pm 0,17$  při redukci na 100 mmHg a na  $0,46 \pm 0,12 \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg. Absolutní vylučování sodíku se zmenšilo (z hodnot  $2,27 \pm 0,39$  na  $0,04 \pm 0,02$  při redukci na 100 mmHg a na  $0,01 \pm 0,01 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg). Léčba fenofibrátem tento pokles statisticky významně zmírnila (viz graf 33A, 33B). Množství vyloučené moče u hypertenzních léčených zvířat pokleslo z hodnot  $16,64 \pm 2,14$  na  $11,02 \pm 0,87$  při redukci na 100 mmHg a na  $9,66 \pm 0,86 \mu\text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg. Absolutní vylučování sodíku se u léčené hypertenzní skupiny zmenšilo z hodnot  $1,96 \pm 0,26$  na  $1,18 \pm 0,09$  při redukci na 100 mmHg a na  $1,02 \pm 0,09 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  při redukci na 90 mmHg.



Graf 33 Vyjádření vztahu mezi renálním arteriálním tlakem, diurézou (A) a absolutním vylučováním sodíku (B) (\*  $p < 0,05$  vs. bazální hodnoty, #  $p < 0,05$  vs. odpovídající hodnoty na stejné hodnotě tlaku u neindukovaných skupin).

Skupiny, na kterých byl proveden pouze kontrolní protokol za účelem kontroly samotného operačního postupu a délky postupu na sledované hemodynamické a exkretční parametry, nevykazovaly žádné změny hodnot ve všech sledovaných parametrech.

## 7.5 Diskuze

V souladu s našimi předchozími studiemi jsme pozorovali, že již v rané fázi indukce hypertenze TGR(CYP1a1-Ren2) potkaní vykazovali znatelné zvýšení renálních a plasmatických koncentrací ANG II. Je to důsledkem výrazného nárůstu genové exprese Ren2 doprovázené významně zvýšenou plasmatickou reninovou aktivitou (Kantachavesiri S. et al., 2001; Mitchell K.D. et al., 2006; Husková Z. et al., 2010; Sporková A. et al., 2014). Novým poznatkem pro nás bylo, že tato aktivace prohypertenzní větve RAAS byla zároveň doprovázena statisticky významným intrarenálním poklesem 20-HETE. Toto pozorování posílilo odůvodnění naší hypotézy, že intrarenální nedostatek 20-HETE a následně jejího tubulo-transportního inhibičního účinku na zpětnou resorpci sodíku může přispívat k rozvoji maligní hypertenze u našeho potkaního modelu. Tento poznatek poskytoval pozadí pro náš předpoklad, že indukci renální CYP4A enzymové aktivity fenofibrátem může vzrůst renální koncentrace 20-HETE a svým natriuretickým účinkem zmírnit rozvoj maligní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů.

Druhým důležitým poznatkem bylo, že chronická léčba fenofibrátem TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů zásadně zmírnila nárůst systémového krevního tlaku



u indukovaných hypertenzních zvířat a ani na konci pokusu hodnota TK nedosahovala tak dramatických hodnot jako u potkanů neléčených. Navíc léčená zvířata nevykazovala typický fenotyp maligní hypertenze. Ve shodě s předešlými studiemi jsme zjistili, že léčba fenofibrátem způsobuje znatelnou renální genovou a proteinovou expresi genu CYP4A u obou léčených skupin, ale nárůst je významně vyšší u skupiny s indukovanou hypertenzí (Wilson T.W. et al., 1998; Shatara R.K. et al., 2000). Nicméně, nečekaně jsme zjistili, že ačkoliv léčba fenofibrátem skutečně zvyšovala renální CYP4A genovou a proteinovou expresi, tato změna se neprojevila zvýšením 20-HETE koncentrace, a tím nejspíš ani potencováním jejího natriuretického účinku v proximálním tubulu. Koncentrace 20-HETE u fenofibrátem léčených potkanů byla stejně snížena jako u potkanů neléčených. Otázkou je, jakým mechanismem vlastně léčba fenofibrátem zmírňuje rozvoj a vážnost maligní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů.

Analýza jednotlivých komponent RAAS odhalila, že chronická léčba fenofibrátem potlačuje plasmatickou a renální hladinu ANG II u I3C – indukovaných potkanů. Naše data ukazují, že mechanismem zodpovídajícím za potlačení ANG II formace byla inhibice samotného Ren2 transgenu tohoto kmene. Následkem této inhibice bylo celkové utlumení systémového RAAS. Mechanismus, jakým fenofibrátová léčba způsobila utlumení exprese Ren2 genu není jasný a vyžaduje důkladnější geneticko-molekulární analýzu, která je mimo rozsah této studie. Ve světle těchto poznatků nepřiměřená aktivace RAAS společně s prudkým nárůstem koncentrace ANG II v plasmě i ledvinách byla hlavním původcem rozvoje maligní hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) transgenních potkanů.

## **7.6 Závěr**

Souhrnně, výsledky naší studie ukazují, že léčba fenofibrátem zmírnila průběh maligní hypertenze u I3C – indukovaných TGR(CYP1a1-Ren2) transgenních potkanů. Hlavním mechanismem zodpovědným za fenofibrátem způsobené snížení hypertenze bylo potlačení systémové a především intrarenální formace ANG II. Fenofibrátem zprostředkované potlačení RAAS s následným snížením krevního tlaku společně s účinkem snižujícím volné lipidy by mohlo být přínosné při léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

## 8 Souhrnná diskuze

Naší první hypotézou bylo, že blokádou solubilní epoxidové hydrolázy zvýšíme biologicky dostupné aktivní formy EETs, které následně svými potencovanými vazomotorickými účinky zlepšují hemodynamiku ledvin a tlakově natriuretickou křivku. Námi získaná data však hypotéze odporovala. U zvířat pozorovali antihypertenzní účinek léčby inhibítorem sEH, ale pokles TK zřejmě nebyl zprostředkován díky zlepšeným renálním autoregulačním a natriuretickým schopnostem. V naší práci byla léčba cAUCB skutečně spojena s významným nárůstem biologicky aktivních EETs (viz graf 7A), avšak nezaznamenali jsme ani zlepšení autoregulace průtoku ledvinou (viz graf 3A) ani glomerulární filtrace (viz graf 3B). Vzhledem k tomu, že jsme u TGR(Ren2)27 léčených potkanů pozorovali pokles plasmatických i renálních hladin ANG II, předpokládáme, že hlavním mechanismem zodpovědným za antihypertenzní účinek léčby cAUCB bylo utlumení produkce a distribuce ANG II. Toto zjištění podpořilo již dříve postulovaný poznatek, že jedním z hlavních mechanismů přispívajícím k vysokému krevnímu tlaku je nepřiměřená aktivace RAAS (Kobori H. et al., 2007).

Vzhledem k tomu, že jsme nemohli vyloučit přímý vliv inhibitoru cAUCB na transkripci vloženého transgenu Ren2, rozhodli jsme se pro další studium účinku EETs v našich experimentech použít jiný postup. Místo blokády odbourávání EETs jsme použili nově vytvořený analog EET-A, jehož účinnost byla potvrzena již několika studiemi (Hye Khan M.A. et al., 2014; Skibba M. et al., 2017; Hye Khan M.A. et al., 2019). Stejně jako v předchozím experimentu léčba EET-A významně zmírnila a zpomalila rozvoj maligní hypertenze (viz graf 9A). Kromě pozitivního antihypertenzního účinku měla léčba také příznivý účinek na albuminurii a koncové orgánové poškození (ledvin i srdce) ve srovnání s hypertenzními neléčenými zvířaty (viz graf 10A, 10B, 11A, 11B). Léčba EET-A také zlepšila autoregulaci průtoku krve ledvinou (viz graf 19B) a dále biologickou dostupnost NO (vyjádřenou  $U_{NOxV}$ ), tím že zabránila jejímu poklesu na začátku rozvíjející se hypertenze u hypertenzních neléčených potkanů (viz graf 13A). Navíc léčba EET-A efektivně zabraňovala narůstání oxidativního stresu u léčených zvířat ve srovnání s neléčenými zvířaty trpícími hypertenzí. Zjištění, že léčba EET-A v rané fázi rozvoje hypertenze zvyšovala  $U_{NOxV}$ , podporuje koncept myšlenky, že právě mobilizace NO je hlavním renoprotektivním a kompenzačním účinkem u ANG II dependentní formy hypertenze (Sigmon D.H. a Beierwaltes W.H., 1993; Navar L.G. et al., 2000). Stejně jako v předešlém experimentu s inhibítorem sEH jsme i v tomto experimentu pozorovali spojení

mezi antihypertenzním účinkem a utlumením vazokonstrikční osy RAAS, a to především na úrovni ACE a plasmatické a renální koncentrace ANG II. Pro nás zvláště zajímavý byl účinek EET-A na vazodilatační osu RAAS představovanou ACE2 – ANG1-7 – Mas receptorem. Léčba analogem statisticky významně tuto osu aktivovala, neboť jsme pozorovali zvýšenou koncentraci ANG 1-7 v plasmě i ledvinách (viz graf 15A, 17A) a zvýšenou aktivitou ACE2 (viz graf 15B, 17B). Pro nás důležitým zjištěním byl i fakt, který jsme ověřili metodou relativní genové exprese, že léčba EET-A nijak nezasahovala do samotné genové exprese vloženého transgenu Ren2 (viz graf 18A). Dalším pro nás zajímavým poznatkem bylo, že pokud jsme začali s léčbou analogem až v době plně rozvinuté maligní hypertenze, neměla léčba žádný příznivý účinek, a to ani na výši TK (viz graf 20A) ani na koncové poškození orgánů (viz graf 20C, 20D). Pozdní léčba také nijak neaktivovala vazodilatační osu RAAS (viz graf 23B), nezlepšovala biologickou dostupnost NO (viz graf 21B) ani nijak nechránila před narůstající koncentrací volných radikálů (viz graf 22A). Je možné předpokládat, že aplikace léčby v době plně rozvinuté hypertenze již byla bez účinku, protože morfologické změny důležitých tkání už byly nevratné. Nelze ale vyloučit, že by dlouhodobější léčba analogem, která na našem pracovišti nebyla technicky možná, nevedla k příznivějšímu léčebnému vlivu.

V třetí části naší práce jsme se zaměřili na ještě jeden zajímavý výsledek. V průběhu našich předběžných pokusů jsme kromě námi zkoumaných alterací hladin EETs u různých modelů hypertenze (2-kidney 1-clip model, TGR(Ren2)<sup>27</sup>, TGR(CYP1a1-Ren2)) neustále zjišťovali snížené koncentrace 20-HETE u hypertenzních neléčených potkanů ve srovnání s normotenzními kontrolami. Stanovili jsme tudíž hypotézu, že kdybychom u těchto našich modelů dosáhli zvýšení koncentrace 20-HETE stimulací jejich produkce fenofibrátem, mohlo by to mít taktéž příznivý efekt na výši krevního tlaku hypertenzních zvířat. V souladu s hypotézou jsme skutečně dosáhli podáváním fenofibrátu v potravě zmírnění rozvoje hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů (viz graf 26) a pozorovali jsme významný deficit 20-HETE u potkanů s rozvinutou hypertenzí (viz graf 28A). Léčba fenofibrátem, ve shodě s jinými autory (Wilson T.W. et al., 1998; Shatara R.K. et al., 2000), stimulovala transkripci CYP4A enzymu, který je zodpovědný za produkci 20-HETE z kyseliny arachidonové u potkanů (viz graf 28B, 28C). Nečekaně jsme zjistili, že ačkoliv léčba fenofibrátem stimulovala genovou expresi CYP4A, nezaznamenali jsme zvýšenou koncentraci 20-HETE u hypertenzních léčených zvířat. Po analýze jednotlivých komponent RAAS jsme zjistili, že zřejmě hlavním důvodem, proč k utlumení hypertenze u TGR(CYP1a1-Ren2) došlo, byla samotná interakce fenofibrátu s expresí

genu pro transgen Ren2, který byl u hypertenzních léčených zvířat masivně potlačen (viz graf 31D). Mechanismus, jakým fenofibrátová léčba způsobila utlumení Ren2 není jasný a bude potřeba důkladnějších geneticko-molekulárních analýz.

## 9 Závěr

Naše výsledky ukazují, že chronická inhibice sEH u TGR(Ren2)27 potkanů měla skutečně antihypertenzní i reno- a kardioprotektivní účinky. Stejně tak podávání syntetického analogu EETs snižovalo u TGR(CYP1a1-Ren2) potkanů hypertenzi a chránilo orgány před poškozením. V obou případech byl mechanismus účinku těsně svázán s utlumením vazokonstrikční osy RAAS a stimulací té vazodilatační.

Stimulace zvýšené tvorby 20-HETE pomocí fenofibrátu měla také antihypertenzní a organoprotektivní účinek u TGR(CYP1a1-Ren2), nicméně hlavní mechanismus účinku zřejmě nesouvisel přímo s navýšením 20-HETE v organismu, ale spíše s potlačením transkripce vloženého reninového genu (tudíž samotné podstaty tohoto hypertenzního kmene).

Potvrdili jsme naši hypotézu, že intrarenální nedostatek EETs významně přispívá k patofyziologii angiotenzin II-dependentní formy hypertenze u našich potkaních modelů.

## 10 Summary

Our results show that chronic inhibition of sEH in TGR(Ren2) 27 rats resulted in antihypertensive as well as reno- and cardioprotective effects. Additionally the administration of the synthetic EETs analogue reduced blood pressure in TGR(CYP1a1-Ren2) rats and protected organs from damage. In both cases, the mechanism of action was closely associated with the suppression of the vasoconstrictive axis of RAAS and stimulation of the vasodilator axis.

Stimulation of 20-HETE production by fenofibrate also proved to be antihypertensive and organoprotective in TGR(CYP1a1-Ren2), however the main mechanism of action was not directly related to the increase in 20-HETE in the renal tissue but rather due to the suppression of transcription of the inserted renin gene.

We also confirmed our hypothesis that intrarenal deficit of EETs contribute significantly to the pathophysiology of angiotensin II – dependent form of hypertension of our rat models.

## 11 Literatura

- 1) AI D., FU Y., GUO D., TANAKA H., WANG N., TANG C., HAMMOCK B.D., SHYY J.Y., ZHU Y. *Angiotensin II Up-Regulates Soluble Epoxide Hydrolase in Vascular Endothelium in Vitro and in Vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(21): 9018–9023.
- 2) ALMEIDA A.P., FRÁBREGAS B.C., MADUREIRA M.M., SANTOS R.J., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SANTOS R.A. *Angiotensin-(1-7) Potentiates the Coronary Vasodilatory Effect of Bradykinin in the Isolated Rat Heart*. Braz J Med Biol Res 2000; 33(6): 709–713.
- 3) ALONSO-GALICIA M., FROHLICH B., ROMAN R.J. *Induction of P4504A Activity Improves Pressure-Natriuresis in Dahl S Rats*. Hypertension 1998; 31(1 Pt 2): 232–236.
- 4) ALONSO-GALICIA M., MAIER K.G., GREENE A.S., COWLEY A.W. Jr., ROMAN R.J. *Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid in the Renal and Vasoconstrictor Actions of Angiotensin II*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002; 283(1): R60–68.
- 5) BAS A., FORSBERG G., HAMMARSTRÖM S., HAMMARSTRÖM M.L. *Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, Beta-Actin and Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes*. Scand J Immunol 2004; 59(6): 566–573.
- 6) BOHLENDER J., MÉNARD J., EDLING O., GANTEN D., LUFT F.C. *Mouse and Rat Plasma Renin Concentration and Gene Expression in (mRen2)27 Transgenic Rats*. Am J Physiol 1998; 274(5): H1450–1456.
- 7) BREYER M.D., HAO C., QI Z. *Cyclooxygenase-2 Selective Inhibitors and the Kidney*. Curr Opin Crit Care 2001; 7(6): 393–400.
- 8) BROSNIHAN K.B., LI P., FERRARIO C.M. *Angiotensin-(1-7) Dilates Canine Coronary Arteries Through Kinins and Nitric Oxide*. Hypertension 1996; 27(3 Pt 2): 523–528.
- 9) BÜRGELOVÁ M., VAŇOURKOVÁ Z., THUMOVÁ M., DVOŘÁK P., OPOČENSKÝ M., KRAMER H.J., ŽELÍZKO M., MALÝ J., BADER M., ČERVENKA L. *Impairment of the Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis Contributes to the Acceleration of Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension*. J Hypertens 2009; 27(10): 1988–2000.
- 10) CAMPBELL D.J., KARAM H., MÉNARD J., BRUNEVAL P., MULLINS J.J. *Prorenin Contributes to Angiotensin Peptide Formation in Transgenic Rats With Rat Prorenin Expression Targeted to the Liver*. Hypertension 2009; 54(6): 1248–1253.
- 11) CAMPBELL D.J., ZEITZ C.J., ESLER M.D., HOROWITZ J.D. *Evidence Against a Major Role for Angiotensin Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2)*

- in Angiotensin Peptide Metabolism in the Human Coronary Circulation*. J Hypertens 2004; 22(10): 1971–1976.
- 12) CAMPBELL W.B., FALCK J.R. *Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors*. Hypertension 2007; 49(3): 590–596.
  - 13) CAMPBELL W.B., FLEMING I. *Epoxyeicosatrienoic Acids and Endothelium-Dependent Responses*. Pflugers Arch 2010; 459(6): 881–895.
  - 14) CAMPBELL W.B., GEBREMEDHIN D., PRATT P.F., HARDER D.R. *Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors*. Circ Res 1996; 78(3): 415–423.
  - 15) CAPDEVILA J., CHACOS N., WERRINGLOER J., PROUGH R.A., ESTABROOK R.W. *Liver Microsomal Cytochrome P-450 and the Oxidative Metabolism of Arachidonic Acid*. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(9): 5362–5366.
  - 16) CAPDEVILA J.H., FALCK J.R. *The CYP P450 Arachidonic Acid Monooxygenases: From Cell Signaling to Blood Pressure Regulation*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 285(3): 571–576.
  - 17) CAPDEVILA J.H., FALCK J.R. *Biochemical and Molecular Properties of the Cytochrome P450 Arachidonic Acid Monooxygenases*. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002; 68–69: 325–344.
  - 18) CAPDEVILA J.H., WANG W. *Role of Cytochrome P450 Epoxygenase in Regulating Renal Membrane Transport and Hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens 2013; 22(2): 163–169.
  - 19) CAPDEVILA J.H., WANG W., FALCK J.R. *Arachidonic Acid Monooxygenase: Genetic and Biochemical Approaches to Physiological/Pathophysiological Relevance*. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2015; 120: 40–49.
  - 20) CAPRA V., THOMPSON M.D., SALA A., COLE D.E., FOLCO G., ROVATI G.E. *Cysteinyl-leukotrienes and Their Receptors in Asthma and Other Inflammatory Diseases: Critical Update and Emerging Trends*. Med Res Rev 2007; 27(4): 469–527.
  - 21) CAREY R.M., SIRAGY H.M. *The Intrarenal Renin-Angiotensin System and Diabetic Nephropathy*. Trends Endocrinol Metab 2003; 14(6): 274–281.
  - 22) COLEMAN T.G., GUYTON A.C. *Hypertension Caused by Salt Loading in the Dog. 3. Onset Transients of Cardiac Output and Other Circulatory Variables*. Circ Res 1969; 25(2): 153–160.
  - 23) COLLIDGE T.A., LAMMIE G.A., FLEMING S., MULLINS J.J. *The Role of the Renin-Angiotensin System in Malignant Vascular Injury Affecting the Systemic and Cerebral Circulations*. Prog Biophys Mol Biol 2004; 84(2–3): 301–319.
  - 24) CURTIS J.J., LUKE R.G., DUSTAN H.P., KASHGARIAN M., WHELCHER J.D., JONES P., DIETHELM A.G. *Remission of Essential Hypertension After Renal Transplantation*. N Engl J Med 1983; 309(17): 1009–1015.

- 25) ČERVENKA L., BÍBOVÁ J., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., KRAMER H.J., HERGET J., JÍCHOVÁ Š., SADOWSKI J., HAMPL V. *Combined Suppression of the Intrarenal and Circulating Vasoconstrictor Renin-ACE-ANG II Axis and Augmentation of the Vasodilator ACE2-ANG 1-7-Mas Axis Attenuates the Systemic Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats Exposed to Chronic Hypoxia.* *Physiol Res* 2015; 64(1): 11–24.
- 26) 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-JEZIERSKA E., NECKÁŘ J. *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* 2018; 36(6): 1326–1341.
- 27) DE BOER R.A., POKHAREL S., FLESCHE M., VAN KAMPEN D.A., SUURMEIJER A.H.J., BOOMSMA F., VAN GILST W.H., VAN VELDHUISEN D.J., PINTO Y.M. *Extracellular Signal Regulated Kinase and SMAD Signaling Both Mediate the Angiotensin II Driven Progression Towards Overt Heart Failure in Homozygous TGR(mRen2)27.* *J Mol Med (Berl)* 2004; 82(10): 678–687.
- 28) DE MELLO W.C. *Angiotensin (1-7) Re-Establishes Impulse Conduction in Cardiac Muscle During Ischaemia-Reperfusion. The Role of the Sodium Pump.* *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004; 5(4): 203–208.
- 29) DENG Y., EDIN M.L., THEKEN K.N., SCHUCK R.N., FLAKE G.P., KANNON M.A., DEGRAFF L.M., LIH F.B., FOLEY J., BRADBURY J.A., GRAVES J.P., TOMER K.B., FALCK J.R., ZELDIN D.C., LEE C.R. *Endothelial CYP Epoxygenase Overexpression and Soluble Epoxide Hydrolase Disruption Attenuate Acute Vascular Inflammatory Responses in Mice.* *FASEB J* 2011; 25(2): 703–713.
- 30) DONOGHUE M., HSIEH F., BARONAS E., GODBOUT K., GOSSELIN M., STAGLIANO N., DONOVAN M., WOLFF B., ROBISON K., JEYASEELAN R., BREITBART R.E., ACTON S. *A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9.* *Circ Res* 2000; 87(5): E1–9.
- 31) DOS SANTOS E.A., DAHLY-VERNON A.J., HOAGLAND K.M., ROMAN R.J. *Inhibition of the Formation of EETs and 20-HETE With 1-aminobenzotriazole Attenuates Pressure Natriuresis.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(1): R58–68.
- 32) ELASED K.M., CUNHA T.S., MARCONDES F.K., MORRIS M. *Brain Angiotensin-Converting Enzymes: Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Processing Angiotensin II in Mice.* *Exp Physiol* 2008; 93(5): 665–675.
- 33) ELMARAKBY A.A. *Reno-protective Mechanisms of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiovascular Disease.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302(3): R321–330.

- 34) ENGLER S., PAUL M., PINTO Y.M. *The TGR(mRen2)<sup>27</sup> Transgenic Rat Model of Hypertension*. Regul Pept 1998; 77(1–3): 3–8.
- 35) ERBANOVA M., THUMOVA M., HUSKOVA Z., VANECCKOVA I., VANOURLKOVA Z., MULLINS J.J., KRAMER H.J., BÜRGELOVA M., RAKUŠAN D., ČERVENKA L. *Impairment of the Autoregulation of Renal Hemodynamics and of the Pressure-Natriuresis Relationship Precedes the Development of Hypertension in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats*. J Hypertens 2009; 27(3): 575–586.
- 36) ESCALANTE B., ERLIJ D., FALCK J.R., MCGIFF J.C. *Cytochrome P-450 Arachidonate Metabolites Affect Ion Fluxes in Rabbit Medullary Thick Ascending Limb*. Am J Physiol 1994; 266(6 Pt 1): C1775–1782.
- 37) FALCK J.R., KODELA R., MANNE R., ATCHA K.R., PULI N., DUBASI N., MANTHATI V.L., CAPDEVILA J.H., YI X.Y., GOLDMAN D.H., MORISSEAU C., HAMMOCK B.D., CAMPBELL W.B. *14,15-Epoxyeicosa-5,8,11-trienoic Acid (14,15-EET) Surrogates Containing Epoxide Bioisosteres: Influence Upon Vascular Relaxation and Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition*. J Med Chem 2009; 52(16): 5069–5075.
- 38) FAN F., MUROYA Y., ROMAN R.J. *Cytochrome P450 Eicosanoids in Hypertension and Renal Disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens 2015; 24(1): 37–46.
- 39) FERRARIO C.M. *ACE2: More of Ang-(1-7) or Less Ang II?* Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011; 20(1): 1–6.
- 40) FERRARIO C.M., BROSNIHAN K.B., DIZ D.I., JAISWAL N., KHOSLA M.C., MILSTED A., TALLANT E.A. *Angiotensin-(1-7): A New Hormone of the Angiotensin System*. Hypertension 1991; 18(5 Suppl): III126–133.
- 41) FLEMING I. *The Pharmacology of the Cytochrome P450 Epoxygenase/Soluble Epoxide Hydrolase Axis in the Vasculature and Cardiovascular Disease*. Pharmacol Rev 2014; 66(4): 1106–1140.
- 42) FLEMING I., BUSSE R. *Endothelium-Derived Epoxyeicosatrienoic Acids and Vascular Function*. Hypertension 2006; 47(4): 629–633.
- 43) FLEMING S. *Malignant Hypertension – The Role of the Paracrine Renin-Angiotensin System*. J Pathol 2000; 192(2): 135–139.
- 44) FOLKOW B. *Physiological Aspects of Primary Hypertension*. Physiol Rev 1982; 62(2): 347–504.
- 45) FOX J., GUAN S., HYMEL A.A., NAVAR L.G. *Dietary Na and ACE Inhibition Effects on Renal Tissue Angiotensin I and II and ACE Activity in Rats*. Am J Physiol 1992; 262(5 Pt 2): F902–909.
- 46) GANONG W.F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Galén Praha 2005.
- 47) GAUTHIER K.M., EDWARDS E.M., FALCK J.R., REDDY D.S., CAMPBELL W.B. *14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Represents a Transferable Endothelium-*



*Dependent Relaxing Factor in Bovine Coronary Arteries.* Hypertension 2005; 45(4): 666–671.

- 48) GAUTHIER K.M., YANG W., GROSS G.J., CAMPBELL W.B. *Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids in Vascular Regulation and Cardiac Preconditioning.* J Cardiovasc Pharmacol 2007; 50(6): 601–608.
- 49) GONZALEZ-VILLALOBOS R.M., JANJOULIA T., FLETCHER N.K., GIANI J.F., NGUYEN M.T.X., RIQUIER-BRISON A.D., SETH D.M., FUCHS S., ELADARI D., PICARD N., BACHMANN S., DELPIRE E., PETI-PETERDI J., NAVAR L.G., BERNSTEIN K.E., MCDONOUGH A.A. *The absence of intrarenal ACE protects against hypertension.* J Clin Invest 2013; 123: 2011–2023.
- 50) GRANGER J.P. *Pressure Natriuresis. Role of Renal Interstitial Hydrostatic Pressure.* Hypertension 1992; 19(1 Suppl): 19–17.
- 51) GROSS G.J., HSU A., PFEIFFER A.W., NITHIPATIKOM K. *Roles of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP) in Epoxyeicosatrienoic Acid (EET)-Induced Cardioprotection Against Infarction in Intact Rat Hearts.* J Mol Cell Cardiol 2013; 59: 20–29.
- 52) GUERIN C., GONTHIER R., BERTHOUX F.C. *Long-Term Prognosis in Malignant or Accelerated Hypertension.* Nephrol Dial Transplant 1988; 3(1): 33–37.
- 53) GUIDI E., BIANCHI G., RIVOLTA E., PONTICELLI C., QUARTO DI PALO F., MINETTI L., POLLI E. *Hypertension in Man With a Kidney Transplant: Role of Familial Versus Other Factors.* Nephron 1985; 41(1): 14–21.
- 54) GUIDI E., MENGHETTI D., MILANI S., MONTAGNINO G., PALAZZI P., BIANCHI G. *Hypertension May Be Transplanted With the Kidney in Humans: A Long-Term Historical Prospective Follow-Up of Recipients Grafted With Kidneys Coming From Donors With or Without Hypertension in Their Families.* J Am Soc Nephrol 1996; 7(8): 1131–1138.
- 55) GUO A.M., SHENG J., SCICLI G.M., ARBAB A.S., LEHMAN N.L., EDWARDS P.A., FALCK J.R., ROMAN R.J., SCICLI A.G. *Expression of CYP4A1 in U251 Human Glioma Cell Induces Hyperproliferative Phenotype in Vitro and Rapidly Growing Tumors in Vivo.* J Pharmacol Exp Ther 2008; 327(1): 10–19.
- 56) GUYTON A.C., HALL J.E., COLEMAN T.G., MANING R.D. Jr., NORMA R.A. Jr. *The Dominant Role of the Kidneys in Long-Term Arterial Pressure Regulation in Normal and Hypertensive States.* In: LARAGH J.H., BRENNER B.M. (edd.): *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* 2. vydání. Raven Press Limited New York 1995; 1311–1349.
- 57) HALL J.E., BRANDS M.W. *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Renal Mechanisms and Circulatory Homeostasis.* In: SELDIN D.W., GIEBISCH G. (edd.): *The Kidney: Physiology and Pathophysiology.* 3. vydání. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2000; 1009–1046.

- 58) HALL J.E., BRANDS M.W., HENEGAR J.R. *Angiotensin II and Long-Term Arterial Pressure Regulation: The Overriding Dominance of the Kidney*. J Am Soc Nephrol 1999; 10 Suppl 12: S258–265.
- 59) HALL J.E., GUYTON A.C., SMITH M.J. Jr., COLEMAN T.G. *Blood Pressure and Renal Function During Chronic Changes in Sodium Intake: Role of Angiotensin*. Am J Physiol 1980; 239(3): F271–280.
- 60) HAMPL V., HERGET J., BÍBOVÁ J., BAŇASOVÁ A., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., JÍCHOVÁ Š., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., SADOWSKI J., ČERVENKA L. *Intrapulmonary Activation of the Angiotensin-Converting Enzyme Type 2/Angiotensin 1-7/G-protein-Coupled Mas Receptor Axis Attenuates Pulmonary Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats Exposed to Chronic Hypoxia*. Physiol Res 2015; 64(1): 25–38.
- 61) HELLER J., SCHUBERT G., HAVLÍČKOVÁ J., THURAU K. *The Role of the Kidney in the Development of Hypertension: A Transplantation Study in the Prague Hypertensive Rat*. Pflugers Arch 1993; 425(3–4): 208–212.
- 62) HENRICH W.L., FALCK J.R., CAMPBELL W.B. *Inhibition of Renin Secretion From Rat Renal Cortical Slices by (R)-12-HETE*. Am J Physiol 1992; 263(4 Pt 2): F665–670.
- 63) HERCULE H.C., SCHUNCK W.H., GROSS V., SERINGER J., LEUNG F.P., WELDON S.M., DA COSTA GONCALVES A.C., HUANG Y., LUFT F.C., GOLLASCH M. *Interaction Between P450 Eicosanoids and Nitric Oxide in the Control of Arterial Tone in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29(1): 54–60.
- 64) HOAGLAND K.M., FLASCH A.K., ROMAN R.J. *Inhibitors of 20-HETE Formation Promote Salt-Sensitive Hypertension in Rats*. Hypertension 2003[a]; 42(4): 669–673.
- 65) HOAGLAND K.M., MAIER K.G., ROMAN R.J. *Contributions of 20-HETE to the Antihypertensive Effects of Tempol in Dahl Salt-Sensitive Rats*. Hypertension 2003[b]; 41(3 Pt 2): 697–702.
- 66) HONETSCHLÄGEROVÁ Z., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., SPORKOVÁ A., KRAMER H.J., HWANG S.H., TSAI H.J., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., ČERVENKA L., KOPKAN L. *Renal Mechanisms Contributing to the Antihypertensive Action of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition in Ren-2 Transgenic Rats With Inducible Hypertension*. J Physiol 2011[a]; 589(Pt 1): 207–219.
- 67) HONETSCHLÄGEROVÁ Z., KITADA K., HUSKOVÁ Z., SPORKOVÁ A., KOPKAN L., BÜRGELOVÁ M., VARCABOVÁ Š., NISHIYAMA A., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., ČERVENKA L. *Antihypertensive and Renoprotective Actions of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition in ANG II-Dependent Malignant Hypertension Are Abolished by Pretreatment With L-NAME*. J Hypertens 2013; 31(2): 321–332.

- 68) HONETSCHLÄGEROVÁ Z., SPORKOVÁ A., KOPKAN L., HUSKOVÁ Z., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., ČERTÍKOVÁ-CHÁBOVÁ V., TESAŘ V., ČERVENKA L. *Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Improves the Impaired Pressure-Natriuresis Relationship and Attenuates the Development of Hypertension and Hypertension-Associated End-Organ Damage in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats.* J Hypertens 2011[b]; 29(8): 1590–1601.
- 69) HOOPES S.L., GARCIA V., EDIN M.L., SCHWARTZMAN M.L., ZELDIN D.C. *Vascular Actions of 20-HETE.* Prostaglandins Other Lipid Mediat 2015; 120: 9–16.
- 70) HUANG A., SUN D., JACOBSON A., CARROLL M.A., FALCK J.R., KALEY G. *Epoxyeicosatrienoic Acids Are Released to Mediate Shear Stress-Dependent Hyperpolarization of Arteriolar Smooth Muscle.* Circ Res 2005; 96(3): 376–383.
- 71) HUANG H., MORISSEAU C., WANG J., YANG T., FALCK J.R., HAMMOCK B.D., WANG M.H. *Increasing or Stabilizing Renal Epoxyeicosatrienoic Acid Production Attenuates Abnormal Renal Function and Hypertension in Obese Rats.* Am J Physiol Renal Physiol 2007; 293(1): F342–349.
- 72) HUSKOVÁ Z., KOPKAN L., ČERVENKOVÁ L., DOLEŽELOVÁ Š., VAŇOURKOVÁ Z., ŠKAROUPKOVÁ P., NISHIYAMA A., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., SADOWSKI J., KRAMER H.J., ČERVENKA L. *Intrarenal Alterations of the Angiotensin-Converting Enzyme Type 2/Angiotensin 1-7 Complex of the Renin-Angiotensin System Do Not Alter the Course of Malignant Hypertension in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2016; 43(4): 438–449.
- 73) HUSKOVÁ Z., KRAMER H.J., THUMOVÁ M., VAŇOURKOVÁ Z., BÜRGELOVÁ M., TEPLAN V., MALÝ J., ČERVENKA L. *Effects of Anesthesia on Plasma and Kidney ANG II Levels in Normotensive and ANG II-Dependent Hypertensive Rats.* Kidney Blood Press Res 2006[a]; 29(2): 74–83.
- 74) HUSKOVÁ Z., KRAMER H.J., VAŇOURKOVÁ Z., ČERVENKA L. *Effects of Changes in Sodium Balance on Plasma and Kidney Angiotensin II Levels in Anesthetized and Conscious Ren-2 Transgenic Rats.* J Hypertens 2006[b]; 24(3): 517–527.
- 75) HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., ERBANOVÁ M., THUMOVÁ M., OPOČENSKÝ M., MULLINS J.J., KRAMER H.J., BÜRGELOVÁ M., ČERVENKA L. *Inappropriately High Circulating and Intrarenal Angiotensin II Levels During Dietary Salt Loading Exacerbate Hypertension in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats.* J Hypertens 2010; 28(3), 495–509.
- 76) HYE KHAN M.A., PAVLOV T.S., CHRISTAIN S.V., NECKÁŘ J., STARUSCHENKO A., GAUTHIER K.M., CAPDEVILA J.H., FALCK J.R., CAMPBELL W.B., IMIG J.D. *Epoxyeicosatrienoic Acid Analogue Lowers Blood Pressure Through Vasodilation and Sodium Channel Inhibition.* Clin Sci (Lond) 2014; 127(7): 463–474.

- 77) HYE KHAN M.A., STAVNIICHUK A., SATTAR M.A., FALCK J.R., IMIG J.D. *Epoxyeicosatrienoic Acid Analog EET-A Blunts Development of Lupus Nephritis in Mice*. *Front Pharmacol* 2019; 10(10): 512.
- 78) CHAPPELL M.C., PIRRO N.T., SYKES A., FERRARIO C.M. *Metabolism of Angiotensin-(1-7) by Angiotensin-Converting Enzyme*. *Hypertension* 1998; 31(1 Pt 2): 362–367.
- 79) CHAUDHARY K.R., ZORDOKY B.N.M., EDIN M.L., EL-KADI A.O.S., ZELDIN D.C., SEUBERT J.M. *Epoxyeicosatrienoic Acids Improve Postischemic Functional Recovery of Heart in Aged Mice*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013; 0: 8–17.
- 80) CHEN P., GUO M., WYGLE D., EDWARDS P.A., FALCK J.R., ROMAN R.J., SCICLI A.G. *Inhibitors of Cytochrome P450 4A Suppress Angiogenic Responses*. *Am J Pathol* 2005; 166(2): 615–624.
- 81) CHENG J., GARCIA V., DING Y., WU C.C., THAKAR K., FALCK J.R., RAMU E., SCHWARTZMAN M.L. *Induction of Angiotensin-Converting Enzyme and Activation of the Renin-Angiotensin System Contribute to 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-Mediated Endothelial Dysfunction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(8): 1917–1924.
- 82) IMAOKA S., HASHIZUME T., FUNAE Y. *Localization of Rat Cytochrome P450 in Various Tissues and Comparison of Arachidonic Acid Metabolism by Rat P450 With That by Human P450 Orthologs*. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20(6): 478–484.
- 83) IMIG J.D. *Epoxygenase Metabolites. Epithelial and Vascular Actions*. *Mol Biotechnol* 2000; 16(3): 233–251.
- 84) IMIG J.D. *Targeting Epoxides for Organ Damage in Hypertension*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56(4): 329–335.
- 85) IMIG J.D. *Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology*. *Physiol Rev* 2012; 92(1): 101–130.
- 86) IMIG J.D. *Epoxyeicosatrienoic Acids, Hypertension, and Kidney Injury*. *Hypertension* 2015; 65(3): 476–482.
- 87) IMIG J.D., ELMARAKBY A., NITHIPATIKOM K., WEI S., CAPDEVILA J.H., TUNIKI V.R., SANGRAS B., ANJIAH S., MANTHATI V.L., REDDY D.S., FALCK J.R. *Development of Epoxyeicosatrienoic Acids Analogs With in Vivo Anti-Hypertensive Actions*. *Front Physiol* 2010; 1: 157.
- 88) IMIG J.D., NAVAR L.G., ROMAN R.J., REDDY K.K., FALCK J.R. *Actions of Epoxygenase Metabolites on the Preglomerular Vasculature*. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(11): 2364–2370.
- 89) IMIG J.D., PHAM B.T., LEBLANC E.A., REDDY K.M., FALCK J.R., INSCHO E.W. *Cytochrome P450 and Cyclooxygenase Metabolites Contribute to the Endothelin-1 Afferent Arteriolar Vasoconstrictor and Calcium Responses*. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2): 307–312.

- 90) IMIG J.D., ZHAO X., ZAHARIS C.Z., OLEARCZYK J.J., POLLOCK D.M., NEWMAN J.W., KIM I.H., WATANABE T., HAMMOCK B.D. *An Orally Active Epoxide Hydrolase Inhibitor Lowers Blood Pressure and Provides Renal Protection in Salt-Sensitive Hypertension*. Hypertension 2005; 46(4): 975–981.
- 91) JIANG J.G., NING Y.G., CHEN C., MA D., LIU Z.J., YANG S., ZHOU J., XIAO X., ZHANG X.A., EDIN M.L., CARD J.W., WANG J., ZELDIN D.C., WANG D.W. *Cytochrome P450 Epoxygenase Promotes Human Cancer Metastasis*. Cancer Res 2007; 67(14): 6665–6674.
- 92) JOLY E., SEQQAT R., FLAMION B., CARON N., MICHEL A., IMIG J.D., KRAMP R. *Increased Renal Vascular Reactivity to ANG II After Unilateral Nephrectomy in the Rat Involves 20-HETE*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 291(4): R977–986.
- 93) JUNG O., BRANDES R.P., KIM I.H., SCHWEDA F., SCHMIDT R., HAMMOCK B.D., BUSSE R., FLEMING I. *Soluble Epoxide Hydrolase Is a Main Effector of Angiotensin II-Induced Hypertension*. Hypertension 2005; 45(4): 759–765.
- 94) KAERGEL E., MULLER D.N., HONECK H., THEUER J., SHAGDARSUREN E., MULLALLY A., LUFT F.C., SCHUNCK W.H. *P450-Dependent Arachidonic Acid Metabolism and Angiotensin II-Induced Renal Damage*. Hypertension 2002; 40(3): 273–279.
- 95) KANTACHUVESIRI S., FLEMING S., PETERS J., PETERS B., BROOKER G., LAMMIE A.G., MCGRATH I., KOTELEVTSYEV Y., MULLINS J.J. *Controlled Hypertension, a Transgenic Toggle Switch Reveals Differential Mechanisms Underlying Vascular Disease*. J Biol Chem 2001; 276(39): 36727–36733.
- 96) KAWABE K., WATANABE T.X., SHIONO K., SOKABE H. *Influence on Blood Pressure of Renal Isografts Between Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats, Utilizing the F1 Hybrids*. Jpn Heart J 1978; 19(6): 886–894.
- 97) KAWADA N., IMAI E., KARBER A., WELCH W.J., WILCOX C.S. *A Mouse Model of Angiotensin II Slow Pressor Response: Role of Oxidative Stress*. J Am Soc Nephrol 2002; 13(12): 2860–2868.
- 98) KEITH N.M., WAGENER H.P., BARKER N.W. *Some Different Types of Essential Hypertension: Their Course and Prognosis*. Am J Med Sci 1974; 268(6): 336–345.
- 99) KLINE R.L., LIU F. *Modification of Pressure Natriuresis by Long-Term Losartan in Spontaneously Hypertensive Rats*. Hypertension 1994; 24(4): 467–473.
- 100) KOBORI H., NANGAKU M., NAVAR L.G., NISHIYAMA A. *The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease*. Pharmacol Rev 2007; 59(3): 251–287.
- 101) KOHAGURA K., ENDO Y., ITO O., ARIMA S., OMATA K., ITO S. *Endogenous Nitric Oxide and Epoxyeicosatrienoic Acids Modulate Angiotensin II-Induced Constriction in the Rabbit Afferent Arteriole*. Acta Physiol Scand 2000; 168(1): 107–112.

- 102) KOPKAN L., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., THUMOVÁ M., ŠKAROUPKOVÁ P., ČERVENKA L., MAJID D.S.A. *Superoxide and Its Interaction With Nitric Oxide Modulates Renal Function in Prehypertensive Ren-2 Transgenic Rats*. J Hypertens 2007; 25(11): 2257–2265.
- 103) KOPKAN L., KRAMER H.J., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., ŠKAROUPKOVÁ P., THURMOVÁ M., ČERVENKA L. *The Role of Intrarenal Angiotensin II in the Development of Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats*. J Hypertens 2005; 23(8): 1531–1539.
- 104) KORESSAAR T., REMM M. *Enhancements and Modifications of Primer Design Program Primer3*. Bioinformatics 2007; 23(10): 1289–1291.
- 105) KROETZ D.L., ZELDIN D.C. *Cytochrome P450 Pathways of Arachidonic Acid Metabolism*. Curr Opin Lipidol 2002; 13(3): 273–283.
- 106) LANGHEINRICH M., LEE M.A., BÖHM M., PINTO Y.M., GANTEN D., PAUL M. *The Hypertensive Ren-2 Transgenic Rat TGR (mREN2)27 in Hypertension Research. Characteristics and Functional Aspects*. Am J Hypertens 1996; 9(5): 506–512.
- 107) LANGSTAN J.B., GUYTON A.C., DOUGLAS B.H., DORSETT P.E. *Effect of Changes in Salt Intake on Arterial Pressure and Renal Function in Partially Nephrectomized Dogs*. Circ Res 1963; 12: 508–513.
- 108) LEE C.R., IMIG J.D., EDIN M.L., FOLEY J., DEGRAFF L.M., BRADBURY J.A., GRAVES J.P., LIH F.B., CLARK J., MYERS P., PERROW A.L., LEPP A.N., KANNON M.A., RONNEKLEIV O.K., ALKAYED N.J., FALCK J.R., TOMER K.B., ZELDIN D.C. *Endothelial Expression of Human Cytochrome P450 Epoxygenases Lowers Blood Pressure and Attenuates Hypertension-Induced Renal Injury in Mice*. FASEB J 2010; 24(10): 3770–3781.
- 109) LEEUW P.W., BIRKENHÄGER W.H. *Renal Mechanisms of Blood Pressure Regulation: Clinical Evidence*. In: ZANCHETTI A., MANCIA G. (edd.): *Handbook of Hypertension: Pathophysiology of Hypertension*. 2., revidované vydání. Elsevier 1997; 17: 784–802.
- 110) LI D., BELUSA R., NOWICKI S., APERIA A. *Arachidonic Acid Metabolic Pathways Regulating Activity of Renal Na(+)-K(+)-ATPase Are Age Dependent*. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278(5): F823–829.
- 111) LI P.L., CAMPBELL W.B. *Epoxyeicosatrienoic Acids Activate K<sup>+</sup> Channels in Coronary Smooth Muscle Through a Guanine Nucleotide Binding Protein*. Circ Res 1997; 80(6): 877–884.
- 112) LI Y., YU G., YUAN S., TAN C., XIE J., DING Y., LIAN P., FU L., HOU Q., XU B., WANG H. *14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid Suppresses Cigarette Smoke Condensate-Induced Inflammation in Lung Epithelial Cells by Inhibiting Autophagy*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2016; 311(5): L970–980.
- 113) LIP G.Y., BEEVERS M., BEEVERS D.G. *Complications and Survival of 315 Patients With Malignant-Phase Hypertension*. J Hypertens 1995; 13(8): 915–924.

- 114) LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods* 2001; 25(4): 402–408.
- 115) MADHUN Z.T., GOLDTHWAIT D.A., MCKAY D., HOPFER U., DOUGLAS J.G. *An Epoxygenase Metabolite of Arachidonic Acid Mediates Angiotensin II-Induced Rises in Cytosolic Calcium in Rabbit Proximal Tubule Epithelial Cells*. *J Clin Invest* 1991; 88(2): 456–461.
- 116) MAJID D.S.A., KOPKAN L. *Nitric Oxide and Superoxide Interactions in the Kidney and Their Implication in the Development of Salt-Sensitive Hypertension*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34(9): 946–952.
- 117) MARIC C., SANDBERG K., HINOJOSA-LABORDE C. *Glomerulosclerosis and Tubulointerstitial Fibrosis Are Attenuated With 17 $\beta$ -Estradiol in the Aging Dahl Salt Sensitive Rat*. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(6): 1546–1556.
- 118) MINICH D.M., BLAND J.S. *A Review of the Clinical Efficacy and Safety of Cruciferous Vegetable Phytochemicals*. *Nutr Rev* 2007; 65(6 Pt 1): 259–267.
- 119) MITCHELL K.D., BAGATELL S.J., MILLER C.S., MOUTON C.R., SETH D.M., MULLINS J.J. *Genetic Clamping of Renin Gene Expression Induces Hypertension and Elevation of Intrarenal Ang II Levels of Graded Severity in CYP1a1-Ren2 Transgenic Rats*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7(2): 74–86.
- 120) MORISSEAU C., HAMMOCK B.D. *Epoxide Hydrolases: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 311–333.
- 121) MORSE D.L., CARROLL D., WEBERG L., BORGSTROM M.C., RANGER-MOORE J., GILLIES R.J. *Determining Suitable Internal Standards for mRNA Quantification of Increasing Cancer Progression in Human Breast Cells by Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*. *Anal Biochem* 2005; 342(1): 69–77.
- 122) MULLINS J.J., PETERS J., GANTEN D. *Fulminant Hypertension in Transgenic Rats Harboring the Mouse Ren-2 Gene*. *Nature* 1990; 344(6266): 541–544.
- 123) NAKANO Y., HIRANO T., UEHARA K., NISHIBAYASHI S., HATTORI K., AIHARA M., YAMADA Y. *New Rat Model Induced by Anti-Glomerular Basement Membrane Antibody Shows Severe Glomerular Adhesion in Early Stage and Quickly Progresses to End-Stage Renal Failure*. *Pathol Int*. 2008; 58(6): 361–370.
- 124) NAVAR L.G. *The Kidney in Blood Pressure Regulation and Development of Hypertension*. *Med Clin North Am* 1997; 81(5): 1165–1198.
- 125) NAVAR L.G., HARRISON-BERNARD L.M., IMIG J.D., WANG C.T., ČERVENKA L., MITCHELL K.D. *Intrarenal Angiotensin II Generation and Renal Effects of AT1 Receptor Blockade*. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 Suppl 12: S266–272.
- 126) NAVAR L.G., ICHIHARA A., CHIN S.Y., IMIG J.D. *Nitric Oxide-Angiotensin II Interactions in Angiotensin II-Dependent Hypertension*. *Acta Physiol Scand* 2000; 168(1): 139–147.

- 127) NAVAR L.G., MAJID D.S. *Interactions Between Arterial Pressure and Sodium Excretion*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5(1): 64–71.
- 128) NAVAR L.G., NISHIYAMA A. *Why Are Angiotensin Concentrations So High in the Kidney?* *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13(1): 107–115.
- 129) NAYEEM M.A., ZELDIN D.C., BOEGEHOLD M.A., MORISSEAU C., MAROWSKY A., PONNOTH D.S., ROUSH K.P., FALCK J.R. *Modulation by Salt Intake of the Vascular Response Mediated Through Adenosine A(2A) Receptor: Role of CYP Epoxygenase and Soluble Epoxide Hydrolase*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 299(1): R325–333.
- 130) 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. *Infarct Size-Limiting Effect of Epoxyeicosatrienoic Acid Analog EET-B Is Mediated by Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Via Down Regulation of Prolyl Hydroxylase 3*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315: H1148–H1158.
- 131) 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., OŠTÁDAL B., ČERVENKA L. *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)* 2012; 122(11): 513–525.
- 132) NITHIPATIKOM K., MOORE J.M., ISBELL M.A., FALCK J.R., GROSS G.J. *Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardioprotection: Ischemic Versus Reperfusion Injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(2): H537–542.
- 133) ONI-ORISAN A., DENG Y., SCHUCK R.N., THEKEN K.N., EDIN M.L., LIH F.B., MOLNAR K., DEGRAFF L., TOMER K.B., ZELDIN D.C., LEE C.R. *Dual Modulation of Cyclooxygenase and CYP Epoxygenase Metabolism and Acute Vascular Inflammation in Mice*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013; 104–105: 67–73.
- 134) OPAY A.L., MOUTON C.R., MULLINS J.J., MITCHELL K.D. *Cyclooxygenase-2 Inhibition Normalizes Arterial Blood Pressure in CYP1A1-REN2 Transgenic Rats With Inducible ANG II-Dependent Malignant Hypertension*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(3): F612–618.
- 135) OPOČENSKÝ M., DVOŘÁK P., MALÝ J., KRAMER H.J., BÄCKER A., KOPKAN L., VERNEROVÁ Z., TESAŘ V., ZIMA T., BADER M., GANTEN D., JANDA J., VANĚČKOVÁ I. *Chronic Endothelin Receptor Blockade Reduces End-Organ Damage Independently of Blood Pressure Effects in Salt-Loaded Heterozygous Ren-2 Transgenic Rats*. *Physiol Res* 2004; 53(6): 581–593.
- 136) PATTERSON M.E., MULLINS J.J., MITCHELL K.D. *Renoprotective Effects of Neuronal NOS-Derived Nitric Oxide and Cyclooxygenase-2 Metabolites in Transgenic Rats With Inducible Malignant Hypertension*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(1): F205–F211.



- 137) POULTER N.R., PRABHAKARAN D., CAULFIELD M. *Hypertension*. Lancet 2015; 386(9995): 801–812.
- 138) POZZI A., POPESCU V., YANG S., MEI S., SHI M., PUOLITAIVAL S.M., CAPRIOLI R.M., CAPDEVILA J.H. *The Anti-Tumorigenic Properties of Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Alpha Are Arachidonic Acid Epoxygenase-Mediated*. J Biol Chem 2010; 285(17): 12840–12850.
- 139) QUIGLEY R., BAUM M., REDDY K.M., GRIENER J.C., FALCK J.R. *Effects of 20-HETE and 19(S)-HETE on Rabbit Proximal Straight Tubule Volume Transport*. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278(6): F949–953.
- 140) RECKELHOFF J.F., ROMERO J.C. *Role of Oxidative Stress in Angiotensin-Induced Hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 284(4): R893–R912.
- 141) RIBEIRO J.D., TORO A.A.D.C., BARACAT E.C.E. *Antileukotrienes in the Treatment of Asthma and Allergic Rhinitis*. J Pediatr (Rio J) 2006; 82 (5 Suppl): S213–221.
- 142) ROMAN R.J. *P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function*. Physiol Rev 2002; 82(1): 131–185.
- 143) SAKAIRI Y., JACOBSON H.R., NOLAND T.D., CAPDEVILA J.H., FALCK J.R., BREYER M.D. *5,6-EET Inhibits Ion Transport in Collecting Duct by Stimulating Endogenous Prostaglandin Synthesis*. Am J Physiol 1995; 268(5 Pt 2): F931–F939.
- 144) SANTOS R.A.S., FERREIRA A.J., NADU A.P., BRAGA A.N.G., DE ALMEIDA A.P., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., BALATU O., ILIESCU R., REUDELHUBER T.L., BADER M. *Expression of an Angiotensin-(1-7)-Producing Fusion Protein Produces Cardioprotective Effects in Rats*. Physiol Genomics 2004; 17(3): 292–299.
- 145) SANTOS R.A.S., FERREIRA A.J., VERANO-BRAGA T., BADER M. *Angiotensin-Converting Enzyme 2, Angiotensin-(1-7) and Mas: New Players of the Renin-Angiotensin System*. J Endocrinol 2013; 216(2): R1–17.
- 146) SANTOS R.A.S., SIMOES E SILVA A.C., MARIC C., SILVA D.M.R., MACHADO R.P., DE BUHR I., HERINGER-WALTHER S., PINHEIRO S.V.B., LOPES M.T., BADER M., MENDES E.P., LEMOS V.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SCHULTHEISS H.P., SPETH R., WALTHER T. *Angiotensin-(1-7) Is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor Mas*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(14): 8258–8263.
- 147) SARKIS A., LOPEZ B., ROMAN R.J. *Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Epoxyeicosatrienoic Acids in Hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004; 13(2): 205–214.
- 148) SEMPLE S.J., DE WARDENER H.E. *Effect of Increased Renal Venous Pressure on Circulatory Autoregulation of Isolated Dog Kidneys*. Circ Res 1959; 7(4): 643–648.
- 149) SEUBERT J.M., YANG B., BRADBURY J.A., GRAVES J., DEGRAFF L.M., GABEL S., GOOCH R., FOLEY J., NEWMAN J., MAO L., ROCKMAN H.A.,

- HAMMOCK B.D., MURPHY E., ZELDIN D.C. *Enhanced Postischemic Functional Recovery in CYP2J2 Transgenic Hearts Involves Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels and p42/p44 MAPK Pathway*. *Circ Res* 2004; 95(5): 506–514.
- 150) SEUBERT J.M., SINAL C.J., GRAVES J., DEGRAFF L.M., BRADBURY J.A., LEE C.R., GORALSKI K., CAREY M.A., LURIA A., NEWMAN J.W., HAMMOCK B.D., FALCK J.R., ROBERTS H., ROCKMAN H.A., MURPHY E., ZELDIN D.C. *Role of Soluble Epoxide Hydrolase in Postischemic Recovery of Heart Contractile Function*. *Circ Res* 2006; 99(4): 442–450.
- 151) SHARMA J.N., MOHAMMED L.A. *The Role of Leukotrienes in the Pathophysiology of Inflammatory Disorders: Is There a Case for Revisiting Leukotrienes as Therapeutic Targets?* *Inflammopharmacology* 2006; 14(1–2): 10–16.
- 152) SHATARA R.K., QUEST D.W., WILSON T.W. *Fenofibrate Lowers Blood Pressure in Two Genetic Models of Hypertension*. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78(5): 367–371.
- 153) SCHMITTGEN T.D., ZAKRAJSEK B.A., MILLS A.G., GORN V., SINGER M.J., REED M.W. *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods*. *Anal Biochem* 2000; 285(2): 194–204.
- 154) SIGMON D.H., BEIERWALTES W.H. *Renal Nitric Oxide and Angiotensin II Interaction in Renovascular Hypertension*. *Hypertension* 1993; 22(2): 237–242.
- 155) SIMÕES E SILVA A.C., BELLO A.P., BARACHO N.C., KHOSLA M.C., SANTOS R.A. *Diuresis and Natriuresis Produced by Long Term Administration of a Selective Angiotensin-(1-7) Antagonist in Normotensive and Hypertensive Rats*. *Regul Pept* 1998; 74(2–3): 177–184.
- 156) SINGH H., CHENG J., DENG H., KEMP R., ISHIZUKA T., NASJLETTI A., SCHWARTZMAN M.L. *Vascular Cytochrome P450 4A Expression and 20-Hydroxyecosatetraenoic Acid Synthesis Contribute to Endothelial Dysfunction in Androgen-Induced Hypertension*. *Hypertension* 2007; 50(1): 123–129.
- 157) SIRAGY H.M. *Angiotensin II Compartmentalization Within the Kidney: Effects of Salt Diet and Blood Pressure Alterations*. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15(1): 50–53.
- 158) SKIBBA M., HYE KHAN M.A., KOLB L.L., YEBOAH M.M., FALCK J.R., AMARADHI R., IMIG J.D. *Epoxyeicosatrienoic Acid Analog Decreases Renal Fibrosis by Reducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. *Front Pharmacol* 2017; 30(8): 406.
- 159) SKRYPNYK N., CHEN X., HU W., SU Y., MONT S., YANG S., GANGADHARIAH M., WEI S., FALCK J.R., JAT J.L., ZENT R., CAPDEVILA J.H., POZZI A. *PPAR $\alpha$  Activation Can Help Prevent and Treat Non-Small Cell Lung Cancer*. *Cancer Res* 2014; 74(2): 621–631.

- 160) SPECTOR A.A., NORRIS A.W. *Action of Epoxyeicosatrienoic Acids on Cellular Function*. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292(3): C996–1012.
- 161) SPORKOVÁ A., JÍCHOVÁ Š., HUSKOVÁ Z., KOPKAN L., NISHIYAMA A., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., SADOWSKI J., KRAMER H.J., ČERVENKA L. *Different Mechanisms of Acute Versus Long-Term Antihypertensive Effects of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition: Studies in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2014; 41(12): 1003–1013.
- 162) SPORKOVÁ A., KOPKAN L., VARCABOVÁ Š., HUSKOVÁ Z., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., ČERVENKA L. *Role of Cytochrome P-450 Metabolites in the Regulation of Renal Function and Blood Pressure in 2-Kidney 1-Clip Hypertensive Rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011; 300(6): R1468–1475.
- 163) STANZIOLA L., GREENE L.J., SANTOS R.A. *Effect of Chronic Angiotensin Converting Enzyme Inhibition on Angiotensin I and Bradykinin Metabolism in Rats*. Am J Hypertens 1999; 12(10 Pt 1): 1021–1029.
- 164) STAUDINGER R., ESCALANTE B., SCHWARTZMAN M.L., ABRAHAM N.G. *Effects of Epoxyeicosatrienoic Acids on 86Rb Uptake in Renal Epithelial Cells*. J Cell Physiol 1994; 160(1): 69–74.
- 165) SUDHAHAR V., SHAW S., IMIG J.D. *Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs and Vascular Function*. Curr Med Chem 2010; 17(12): 1181–1190.
- 166) TIPNIS S.R., HOOPER N.M., HYDE R., KARRAN E., CHRISTIE G., TURNER A.J. *A Human Homolog of Angiotensin-Converting Enzyme. Cloning and Functional Expression as a Captopril-Insensitive Carboxypeptidase*. J Biol Chem 2000; 275(43): 33238–33243.
- 167) UNTERGASSER A., CUTCUTACHE I., KORESSAAR T., YE J., FAIRCLOTH B.C., REMM M., ROZEN S.G. *Primer3 – New Capabilities and Interfaces*. Nucleic Acids Res 2012; 40(15): e115.
- 168) VANĚČKOVÁ I., DOBEŠOVÁ Z., KUNEŠ J., ZICHA J. *The Effects of Repeated Delivery of Angiotensin II AT(1) Receptor Antisense on Distinct Vasoactive Systems in Ren-2 Transgenic Rats: Young vs. Adult Animals*. Hypertens Res 2012; 35(7):761–768.
- 169) VAŇOURKOVÁ Z., KRAMER H.J., HUSKOVÁ Z., VANĚČKOVÁ I., OPOČENSKÝ M., ČERTÍKOVÁ-CHÁBOVÁ V., TESAŘ V., ŠKAROUPKOVÁ P., THUMOVÁ M., DOHNALOVÁ M., MULLINS J.J., ČERVENKA L. *ATI Receptor Blockade Is Superior to Conventional Triple Therapy in Protecting Against End-Organ Damage in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats With Inducible Hypertension*. J Hypertens 2006; 24(12): 2465–2472.
- 170) VÉNIANT M., WHITWORTH C.E., MÉNARD J., SHARP M.G., GONZALES M.F., BRUNEVAL P., MULLINS J.J. *Developmental Studies Demonstrate Age-Dependent Elevation of Renin Activity in TGR(mRen2)27 Rats*. Am J Hypertens 1995; 8(12 Pt 1): 1167–1176.

- 171) WAGNER K.M., MCREYNOLDS C.B., SCHMIDT W.K., HAMMOCK B.D. *Soluble Epoxide Hydrolase as a Therapeutic Target for Pain, Inflammatory and Neurodegenerative Diseases*. *Pharmacol Ther* 2017; 180: 62–76.
- 172) WANG C.T., CHIN S.Y., NAVAR L.G. *Impairment of Pressure-Natriuresis and Renal Autoregulation in ANG II-Infused Hypertensive Rats*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(2): F319–325.
- 173) WANG D., BORREGO-CONDE L.J., FALCK J.R., SHARMA K.K., WILCOX C.S., UMANS J.G. *Contribution of Nitric Oxide, EDHF, and EETs to Endothelium-Dependent Relaxation in Renal Afferent Arterioles*. *Kidney Int* 2003; 63(6): 2187–2193.
- 174) WANG W.H., LU M., HEBERT S.C. *Cytochrome P-450 Metabolites Mediate Extracellular Ca(2+)-Induced Inhibition of Apical K<sup>+</sup> Channels in the TAL*. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1): C103–111.
- 175) WANG W.H., ZHANG C., LIN D.H., WANG L., GRAVES J.P., ZELDIN D.C., CAPDEVILA J.H. *Cyp2c44 Epoxygenase in the Collecting Duct Is Essential for the High K<sup>+</sup> Intake-Induced Antihypertensive Effect*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307(4): F453–460.
- 176) WEI Y., LIN D.H., KEMP R., YADDANAPUDI G.S.S., NASJLETTI A., FALCK J.R., WANG W.H. *Arachidonic Acid Inhibits Epithelial Na Channel via Cytochrome P450 (CYP) Epoxygenase-Dependent Metabolic Pathways*. *J Gen Physiol* 2004; 124(6): 719–727.
- 177) WEI Y., SUN P., WANG Z., YANG B., CARROLL M.A., WANG W.H. *Adenosine Inhibits ENaC via Cytochrome P-450 Epoxygenase-Dependent Metabolites of Arachidonic Acid*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(5): F1163–1168.
- 178) WESTPHAL C., SPALLEK B., KONKEL A., MARKO L., QADRI F., DEGRAFF L.M., SCHUBERT C., BRADBURY J.A., REGITZ-ZAGROSEK V., FALCK J.R., ZELDIN D.C., MÜLLER D.N., SCHUNCK W.H., FISHER R. *CYP2J2 Overexpression Protects Against Arrhythmia Susceptibility in Cardiac Hypertrophy*. *PLoS One* 2013; 8(8): e73490.
- 179) WILLIAMS J.M., FAN F., MURPHY S., SCHRECK C., LAZAR J., JACOB H.J., ROMAN R.J. *Role of 20-HETE in the Antihypertensive Effect of Transfer of Chromosome 5 From Brown Norway to Dahl Salt-Sensitive Rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302(10): R1209–1218.
- 180) WILLIAMS J.M., MURPHY S., BURKE M., ROMAN R.J. *20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid: A New Target for the Treatment of Hypertension*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56(4): 336–344.
- 181) WILSON T.W., ALONSO-GALICIA M., ROMAN R.J. *Effects of Lipid-Lowering Agents in the Dahl Salt-Sensitive Rat*. *Hypertension* 1998; 31(1 Pt 2): 225–231.
- 182) WINER J., JUNG C.K., SHACKEL I., WILLIAMS P.M. *Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain*

*Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro.* Anal Biochem 1999; 270(1): 41–49.

- 183) WU S., MOOMAW C.R., TOMER K.B., FALCK J.R., ZELDIN D.C. *Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart.* J Biol Chem 1996; 271(7): 3460–3468.
- 184) YANG S., Wei S., POZZI A., CAPDEVILA J.H. *The Arachidonic Acid Epoxygenase Is a Component of the Signaling Mechanisms Responsible for VEGF-Stimulated Angiogenesis.* Arch Biochem Biophys 2009; 489(1–2): 82–91.
- 185) YU M., LOPEZ B., DOS SANTOS E.A., FALCK J.R., ROMAN R.J. *Effects of 20-HETE on Na<sup>+</sup> Transport and Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -ATPase Activity in the Thick Ascending Loop of Henle.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 292(6): R2400–2405.
- 186) YU Z., XU F., HUSE L.M., MORISSEAU C., DRAPER A.J., NEWMAN J.W., PARKER C., GRAHAM L., ENGLER M.M., HAMMOCK B.D., ZELDIN D.C., KROETZ D.L. *Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids.* Circ Res 2000; 87(11): 992-998.
- 187) ZELDIN D.C. *Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism.* J Biol Chem 2001; 276(39): 36059–36062.
- 188) ZHAO Q., HUANG J., WANG D., CHEN L., SUN D., ZHAO C. *Endothelium-Specific CYP2J2 Overexpression Improves Cardiac Dysfunction by Promoting Angiogenesis via Jagged1/Notch1 Signaling.* J Mol Cell Cardiol 2018; 123: 118–127.
- 189) ZHAO X., YAMAMOTO T., NEWMAN J.W., KIM I.H., WATANABE T., HAMMOCK B.D., STEWART J., POLLOCK J.S., POLLOCK D.M., IMIG J.D. *Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Protects the Kidney From Hypertension-Induced Damage.* J Am Soc Nephrol 2004; 15(5): 1244–1253.
- 190) ZOU A.P., DRUMMOND H.A., ROMAN R.J. *Role of 20-HETE in Elevating Loop Chloride Reabsorption in Dahl SS/Jr Rats.* Hypertension 1996[a]; 27(3 Pt 2): 631–635.
- 191) ZOU A.P., FLEMING J.T., FALCK J.R., JACOBS E.R., GEBREMENDHIN D., HARDER D.R., ROMAN R.J. *20-HETE Is an Endogenous Inhibitor of the Large-Conductance Ca(2+)-Activated K<sup>+</sup> Channel in Renal Arterioles.* Am J Physiol 1996[b]; 270(1 Pt 2): R228–237.
- 192) ZOU A.P., IMIG J.D., ORTIZ DE MONTELLANO P.R., SUI Z., FALCK J.R., ROMAN R.J. *Effect of P-450 Omega-Hydroxylase Metabolites of Arachidonic Acid on Tubuloglomerular Feedback.* Am J Physiol 1994; 266(6 Pt 2): F934–941.

## 12 Publikační činnost autorky dizertační práce

(pozn. Varcabová je rodné příjmení autorky)

### Publikace, z kterých vychází tato dizertační práce

- 1) **VARCABOVÁ Š.**, HUSKOVÁ Z., KRAMER H.J., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KITADA K., ČERVENKA L. *Antihypertensive Action of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition in Ren-2 Transgenic Rats Is Mediated by Suppression of the Intrarenal Renin-Angiotensin System*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2013; 40(4): 273–281.
- 2) **JÍCHOVÁ Š.**, KOPKAN L., HUSKOVÁ Z., DOLEŽELOVÁ Š., NECKÁŘ J., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., KRAMER H.J., SADOWSKI J., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., REDDY R.N., FALCK J.R., IMIG J.D., ČERVENKA L. *Epoxyeicosatrienoic Acid Analog Attenuates the Development of Malignant Hypertension but Does Not Reverse It Once Established: A Study in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats*. J Hypertens 2016; 34(10): 2008–2025.
- 3) **JÍCHOVÁ Š.**, DOLEŽELOVÁ Š., KOPKAN L., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., SADOWSKI J., ČERVENKA L. *Fenofibrate Attenuates Malignant Hypertension by Suppression of the Renin-angiotensin System: A Study in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats*. Am J Med Sci 2016; 352(6): 618–630.

### Další publikace, které volně souvisejí s tématem dizertační práce

- 4) SPORKOVÁ A., KOPKAN L., **VARCABOVÁ Š.**, HUSKOVÁ Z., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., ČERVENKA L. *Role of Cytochrome P-450 Metabolites in the Regulation of Renal Function and Blood Pressure in 2-Kidney 1-Clip Hypertensive Rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011; 300(6): R1468–1475.
- 5) KOPKAN L., HUSKOVÁ Z., SPORKOVÁ A., **VARCABOVÁ Š.**, HONETSCHLÄGEROVÁ Z., HWANG S.H., TSAI H.J., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., BÜRGELOVÁ M., VOJTÍŠKOVÁ A., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., ČERVENKA L. *Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Exhibits Antihypertensive Actions Independently of Nitric Oxide in Mice with Renovascular Hypertension*. Kidney Blood Press Res 2012; 35(6): 595–607.
- 6) HONETSCHLÄGEROVÁ Z., KITADA K., HUSKOVÁ Z., SPORKOVÁ A., KOPKAN L., BÜRGELOVÁ M., **VARCABOVÁ Š.**, NISHIYAMA A., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KRAMER H.J., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., ČERVENKA L. *Antihypertensive and Renoprotective Actions of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition in ANG II-Dependent Malignant Hypertension Are Abolished by Pretreatment with L-NAME*. J Hypertens 2013; 31(2): 321–332.
- 7) SPORKOVÁ A., **JÍCHOVÁ Š.**, HUSKOVÁ Z., KOPKAN L., NISHIYAMA A., HWANG S.H., HAMMOCK B.D., IMIG J.D., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., SADOWSKI J., KRAMER H.J., ČERVENKA L. *Different Mechanisms of Acute Versus Long-Term Antihypertensive Effects of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition: Studies in Cyp11a1-Ren-2 Transgenic Rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2014; 41(12): 1003–1013.
- 8) ALÁNOVÁ P., HUSKOVÁ Z., KOPKAN L., SPORKOVÁ A., **JÍCHOVÁ 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. *Orally Active Epoxyeicosatrienoic Acid Analog Does Not*

*Exhibit Antihypertensive and Reno- or Cardioprotective Actions in Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertensive Rats.* *Vascul Pharmacol* 2015; 73: 45–56.

- 9) ČERVENKA L., BÍBOVÁ J., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., KRAMER H.J., HERGET J., JÍCHOVÁ Š., SADOWSKI J., HAMPL V. *Combined Suppression of the Intrarenal and Circulating Vasoconstrictor Renin-ACE-ANG II Axis and Augmentation of the Vasodilator ACE2-ANG 1-7-Mas Axis Attenuates the Systemic Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats Exposed to Chronic Hypoxia.* *Physiol Res* 2015; 64(1): 11–24.
- 10) SPORKOVÁ A., ČERTÍKOVÁ-CHÁBOVÁ V., DOLEŽELOVÁ Š., JÍCHOVÁ Š., KOPKAN L., VAŇOURKOVÁ Z., KOMPANOWSKA-JEZIERSKA E., SADOWSKI J., MAXOVÁ H., ČERVENKA L. *Fenofibrate Attenuates Hypertension in Goldblatt Hypertensive Rats: Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid in the Nonclipped Kidney.* *Am J Med Sci* 2017; 353(6): 568–579.

### **Publikace, které s tématem dizertační práce přímo nesouvisí**

- 11) HOŠKOVÁ L., MÁLEK I., KAUTZNER J., HONSOVÁ E., VAN DOKKUM R.P., HUSKOVÁ Z., VOJTÍŠKOVÁ A., VARCABOVÁ Š., ČERVENKA L., KOPKAN L. *Tacrolimus-Induced Hypertension and Nephrotoxicity in Fawn-Hooded Rats Are Attenuated by Dual Inhibition of Renin-Angiotensin System.* *Hypertens Res* 2014; 37(8): 724–732.
- 12) HAMPL V., HERGET J., BÍBOVÁ J., BAŇASOVÁ A., HUSKOVÁ Z., VAŇOURKOVÁ Z., JÍCHOVÁ Š., KUJAL P., VERNEROVÁ Z., SADOWSKI J., ČERVENKA L. *Intrapulmonary Activation of the Angiotensin-Converting Enzyme Type 2/Angiotensin 1-7/G-Protein-Coupled Mas Receptor Axis Attenuates Pulmonary Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats Exposed to Chronic Hypoxia.* *Physiol Res* 2015; 64(1): 25–38.
- 13) DOLEŽELOVÁ Š., JÍCHOVÁ Š., HUSKOVÁ Z., VOJTÍŠKOVÁ A., KUJAL P., HOŠKOVÁ L., KAUTZNER J., SADOWSKI J., ČERVENKA L., KOPKAN L. *Progression of Hypertension and Kidney Disease in Aging Fawn-Hooded Rats Is Mediated by Enhanced Influence of Renin-Angiotensin System and Suppression of Nitric Oxide System and Epoxyeicosanoids.* *Clin Exp Hypertens* 2016; 38(7): 644–651.
- 14) KOPKAN L., HUSKOVÁ Z., JÍCHOVÁ Š., ČERVENKOVÁ L., ČERVENKA L., SAIFUDEEN Z., EL-DAHR S.S. *Conditional Knockout of Collecting Duct Bradykinin B2 Receptors Exacerbates Angiotensin II-Induced Hypertension During High Salt Intake.* *Clin Exp Hypertens* 2016; 38(1): 1–9.

### **Řešený grant**

GAUK č. 266213 řešený v letech 2013–2017.

Úloha intrarenální aktivity 20-hydroxyeikosatetraenové kyseliny v regulaci renálních funkcí a patofyziologii angiotenzin II-dependentní formy hypertenze.