

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MVDr. Zuzana Honetschlägerová

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

The role of epoxyeicosatrienoic acids in blood pressure
and renal function regulation in the experimental
models of hypertension

Dizertační práce

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

Praha, 2018

Poděkování

Děkuji svým školitelům, doc. MUDr. Věře Čertíkové Chábové, Ph.D. a prof. MUDr. Lud'ku Červenkovi, CSc. MBA za odborné vedení, pomoc a cenné rady během celého studia a sepisování této práce.

Poděkování patří také kolegům z Oddělení kardio-renálního výzkumu Centra experimentální medicíny IKEM za pomoc s prováděním biochemických analýz a zejména pak Mgr. Zuzaně Huskové, Ph.D. za bezmeznou každodenní technickou a přátelskou podporu.

Děkuji také své rodině a přátelům za podporu a trpělivost v průběhu celého studia.

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, 14.5.2018

.....

UNIVERZITA KARLOVA

Honetschlägerová, Zuzana. *Úloha epoxyeikosatrienových kyselin v regulaci krevního tlaku a renálních funkcí u experimentálních modelů hypertenze. [The role of epoxyeicosatrienoic acids in blood pressure and renal function regulation in the experimental models of hypertension]*. Praha, 2018. 97 s. Dizertační práce (Ph.D.). Institut Klinické a Experimentální Medicíny, Centrum experimentální medicíny. Školitel Čertíková Chábová, Věra.

Abstrakt

Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs), metabolity kyseliny arachidonové, ovlivňují vaskulární tonus i renální tubulární transport sodíku a vody, a tak se mohou účastnit kontroly krevního tlaku. Inhibice enzymu solubilní epoxid hydrolázy (sEH), která snižuje degradaci EETs na biologicky neaktivní dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs), vede k významnému zmírnění maligní hypertenze u transgenních potkanů. Hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů byla navozena podáním diety s obsahem indol-3-karbinolu (I3C, 0,3 %). V samostatných pokusech byl sledován vliv podávání inhibitoru sEH c-AUCB, inhibitoru NO syntázy L-NAME a inhibice renin-angiotensin-aldosteronového systému. Léčba inhibitorem sEH zmírnila rozvoj hypertenze, zlepšila renální funkce, zejména schopnost autoregulace, a zvýšila poměr EETs/DHETs v ledvině u Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Snižování krevního tlaku vedlo ke zmírnění srdeční hypertrofie a intersticiálního poškození tkáně ledvin. Zlepšení renálních mechanismů je pravděpodobně zodpovědné za antihypertenzní efekt inhibitoru sEH. Antihypertenzní účinky inhibitoru sEH jsou u ANG II-dependentní formy maligní hypertenze závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a oxidu dusnatého (NO). Snižování krevního tlaku a renoprotektivní účinky léčby inhibitorem sEH jsou zcela zrušeny po zablokování tvorby NO. Pozorované antihypertenzní a renoprotektivní účinky této farmakologické cesty by mohly být příslibem vývoje dalších antihypertenzních léků.

Klíčová slova

Arachidonová kyselina, cévní tonus, epoxyeikosatrienové kyseliny, maligní hypertenze, oxid dusnatý, renální tubulární transport sodíku a vody, solubilní epoxid hydroláza.

Abstract

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs), metabolites of arachidonic acid, influence vascular tone and renal tubular sodium and water transport and thus have been implicated in the control of blood pressure. Inhibition of the enzyme soluble epoxide hydrolase (sEH), which reduces EETs degradation to biologically inactive dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs), leads to a substantial attenuation of malignant hypertension in transgenic rats. Hypertension in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats was induced through a dietary administration of indole-3-carbinol (I3C, 0,3 %). Separate experiments studied the effect of sEH inhibitor c-AUCB, NO synthase inhibitor L-NAME and inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system. Treatment with sEH inhibitor attenuated the development of hypertension, improved renal function, mainly autoregulation, and increased the renal EETs/DHETs ratio in Cyp1a1-Ren-2 rats. Lowering of blood pressure leads to the reduction of heart hypertrophy and kidney interstitial injury. The improvement of renal mechanisms is likely responsible for the antihypertensive effect of sEH inhibitor. Antihypertensive actions of sEH inhibition in this ANG II-dependent form of malignant hypertension are dependent on the interactions of endogenous bioavailability of EETs and nitric oxide (NO). Blood pressure lowering and renoprotective actions of the treatment with sEH inhibitor are completely abolished after blockade of NO production. The observed antihypertensive and renoprotective effects of this novel pharmacological approach provide a potentially new direction in the antihypertensive therapy.

Keywords

Arachidonic acid, epoxyeicosatrienoic acids, malignant hypertension, nitric oxide, renal tubular sodium and water transport, soluble epoxide hydrolase, vascular tone.

Obsah	5
Seznam použitých zkratk	8
1. TEORETICKÝ ZÁKLAD	11
1.1 Mnohostranný systém regulace arteriálního krevního tlaku	11
1.1.1 Úvod	11
1.1.1.1 Krátkodobé mechanismy regulace krevního tlaku	12
1.1.1.2 Střednědobé mechanismy regulace krevního tlaku	12
1.1.1.3 Dlouhodobé mechanismy regulace krevního tlaku	13
1.1.1.3.1 Autoregulace v ledvinách	13
1.1.1.3.2 Tlakově-natriuretický mechanismus	14
1.1.2 Ledviny a hypertenze	16
1.1.2.1 Renin-angiotenzinový systém	17
1.1.3 Metabolity cytochromu P450	19
1.1.3.1 Hydroxyeikosatetraenové kyseliny	21
1.1.3.2 Epoxyeicosatrienové kyseliny	23
1.1.4 Experimentální model hypertenze	26
2. Hypotézy a cíle dizertační práce	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 Úvod k experimentům	29
3.2 Metodika	29
3.2.1 Zvířata a dieta	29
3.2.2 Chemikálie	30
3.2.3 Statistická analýza	30
3.3 Vliv inhibice solubilní epoxid hydrolázy na hypertenzi a poškození ledvin u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů	31
3.3.1 Cíl studie	31
3.3.2 Protokol č. 1	31
3.3.2.1 Měření krevního tlaku a exkretčních funkcí ledvin	31
3.3.2.2 Stanovení hodnot ANG II, EETs, DHETs	

	a c-AUCB v plasmě a ledvině	32
	3.3.2.3 Stanovení CYP2C23 epoxygenázy a sEH v ledvinné kůře a dřeni	32
	3.3.2.4 Stanovení plasmatické reninové aktivity a koncentrace nitrátů/nitritů v moči	33
3.3.3	Protokol č. 2	33
	3.3.3.1 Renální clearancové studie ke stanovení renální hemodynamiky	33
3.3.4	Výsledky	34
	3.3.4.1 Krevní tlak a exkreční funkce ledvin	34
	3.3.4.2 Koncentrace ANG II, hodnoty EETs, DHETs a proteinová exprese epoxygenázy a sEH	37
	3.3.4.3 Hemodynamika ledvin	38
3.3.5	Diskuze	40
3.3.6	Závěr	44
3.4	Inhibice solubilní epoxid hydrolázy zlepší zhoršenou tlakovou natriurézu a zmírní rozvoj hypertenze a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů	45
3.4.1	Cíl práce	45
3.4.2	Protokoly	45
	3.4.2.1 Série č. 1: Odpověď glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou a na vylučování sodíku ledvinou při snižování renálního arteriálního tlaku	45
	3.4.2.2 Série č. 2: Efekt chronické inhibice solubilní epoxid hydrolázy a blokátoru AT ₁ receptoru na srdeční hypertrofii, proteinurii, poškození glomerulů ledvin, tubulointersticiální poškození ledvin a stanovení koncentrace EETs a DHETs v ledvinné tkáni	47
3.4.3	Výsledky	48
	3.4.3.1 Experimentální protokol č. 1: Odpověď glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou a na vylučování sodíku ledvinou při snižování renálního arteriálního tlaku	48
	3.4.3.2 Experimentální protokol č. 2: Efekt chronické inhibice solubilní epoxid hydrolázy a blokátoru AT ₁ receptoru na srdeční	

	hypertrofii, proteinurii, poškození glomerulů ledvin, tubulointersticiální poškození ledvin a stanovení koncentrace EETs a DHETs v ledvinné tkáni	52
3.4.4	Diskuze	55
3.4.5	Závěr	59
3.5	Léčba pomocí L-NAME zrušila antihypertenzní a renoprotektivní účinek inhibice solubilní epoxid hydrolázy u ANG II-dependentní hypertenze	60
3.5.1	Cíl práce	60
3.5.2	Protokoly	60
	3.5.2.1 Experimentální protokol č. 1: Vliv na krevní tlak, albuminurii, vylučování nitrátů/nitritů močí, 8-isoprostanů, peroxidu vodíku, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, koncentrace EETs, DHETs a ANG II v ledvinách a morfologie ledvin	60
	3.5.2.2 Experimentální protokol č. 2: Vliv na hemodynamiku a exkreční funkce ledvin	62
3.5.3	Výsledky	63
	3.5.3.1 Experimentální protokol č. 1: Vliv na krevní tlak, albuminurii, vylučování nitrátů/nitritů močí, 8-isoprostanů, peroxidu vodíku, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, koncentrace EETs, DHETs a ANG II v ledvinách a glomerulární a tubulointersticiální poškození ledvin	63
	3.5.3.2 Experimentální protokol č. 2: Vliv na hemodynamiku a exkreční funkce	70
3.5.4	Diskuze	72
3.5.5	Závěr	76
3.6	Souhrnná diskuze	76
3.7	Souhrn	79
3.8	Summery	79
	Literatura	80

Seznam použitých zkratk

AA	arachidonová kyselina
AC	adenylcykláza
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ACE 2	angiotenzin-konvertující enzym 2
ADH	antidiuretický hormon
AI	autoregulační index
ANG I	angiotenzin I
ANG II	angiotenzin II
APA	aminopeptidáza
APN	aminopeptidáza N
AT ₁ , AT ₂	receptory pro angiotenzin II typu 1 a 2
ATP	adenosintrifosfát
BW	tělesná hmotnost (body weight)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
c-AUCB	<i>cis</i> -4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoic acid
CO	oxid uhelnatý
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom
DHETs	dihydroxyeikosatrienové kyseliny
EDHF	endoteliální hyperpolarizační faktor
EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
EH	epoxid hydroláza
ENaC	epiteliální natriový kanál

eNOs	endoteliální NO syntáza
FE _{Na}	frakční vylučování sodíku
GFR	glomerulární filtrace
GSI	glomerulosklerotický index
HETEs	hydroxyeikosatetraenové kyseliny
I3C	indol-3-karbinol
iTGR	transgenní kmen potkanů (Cyp1a1-Ren-2) s indukovatelnou hypertenzí
K _{Ca}	vápníkem aktivovaných draselný kanál
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
LO	lipoxygenáza
LTs	leukotrieny
LXs	lipoxiny
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
NO _x	koncentrace nitrátů/nitritů
PCR	periferní cévní odpor
PGs	prostaglandiny
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza
PKD	průtok krve dření
PKL	průtok krve ledvinou
PL	fosfolipáza
PPL	průtok plasmy ledvinou
PT	proximální tubulus

PTH	parathormon
PRA	plasmatická reninová aktivita
RAS	renin-angiotenzinový systém
RAT	renální arteriální tlak
SAT	střední arteriální tlak
sEH	solubilní epoxid hydroláza
sEH _i	inhibitor solubilní epoxid hydrolázy
SEM	střední chyba průměru (standard error of the mean)
SKT	systolický krevní tlak
TALH	tlusté raménko Henleovy kličky
TBARS	reaktivní látky s kyselinou thiobarbiturovou
TGF	tubuloglomerulární zpětná vazba
TK	krevní tlak
T _x	tromboxany
U _{Na} V	absolutní (denní) vylučování sodíku
UNO _x V	vylučování nitritů/nitrátů močí
UV	denní diuréza (urine volume)
VSMC	buňka hladkého svalu
WI	příjem vody (water intake)

1. TEORETICKÝ ZÁKLAD

1.1 Mnohostranný systém regulace arteriálního krevního tlaku

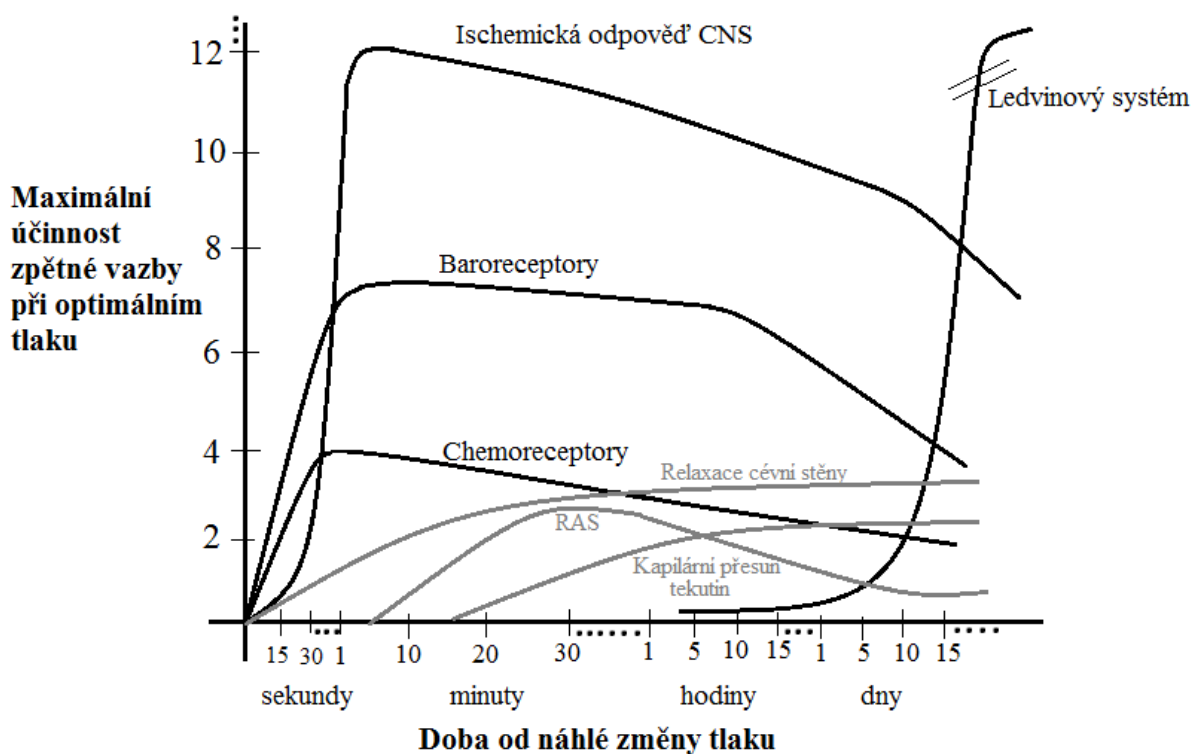
1.1.1 Úvod

Předpokladem účinné tkáňové perfuze jsou stálé nebo alespoň přibližně stálé hodnoty systémového arteriálního krevního tlaku. Pouze takto se vytváří tlakový spád a rezerva nutná pro nezávislé rozdělování krve podle potřeb jednotlivých orgánů. Stálost krevního tlaku je proto zajišťována mnohočetnými regulačními mechanizmy.

Hodnota arteriálního tlaku je dána součinem srdečního výdeje a periferního odporu cév.

Srdeční výdej je závislý na plnění srdce za diastoly, které je určeno mírou naplnění cirkulační soustavy. Hodnotu periferního cévního odporu určují hodnoty metabolických potřeb tkání.

Tkáně mohou měnit průsvit cév a přísun krve dle svých požadavků na přívod živin a odvod metabolitů (Veselý, 2002).



Obrázek č. 1: Regulace krevního tlaku dle rychlosti nástupu účinku a doby trvání (modifikováno podle Guytona).

Podle rychlosti nástupu účinku a doby trvání se dělí mechanismy regulace arteriálního krevního tlaku do tří skupin (obr. č. 1):

- Krátkodobé mechanismy regulace krevního tlaku
- Střednědobé mechanismy regulace krevního tlaku
- Dlouhodobé mechanismy regulace krevního tlaku

1.1.1.1 Krátkodobé mechanismy regulace krevního tlaku

Hlavní roli akutního mechanismu regulace arteriálního tlaku hraje nervový systém. Jeho nejdůležitější charakteristikou je schopnost zvýšit hodnotu arteriálního krevního tlaku během několika sekund. Receptory jsou v cévním řečišti v oblastech vysokého i nízkého tlaku. Ve vysokotlaké oblasti jde především o baroreceptorový reflex, chemoreceptorový reflex a o tzv. ischemickou odpověď centrálního nervového systému. Arteriální baroreceptory jsou stimulovány v tlakovém rozmezí 80–180 mm Hg, arteriální chemoreceptory mezi 40–80 mm Hg a ischemické receptory se stávají intenzivně aktivní pod hranicí arteriálního tlaku 30 mm Hg (Guyton et al. 1969). Efektorem je v tomto případě zvýšení aktivity sympatiku.

Reflexní odpověď, včetně reflexu Bainbridgeova, lze vyvolat i z receptorů nízkého tlaku v srdečních síních a pulmonálních arteriích. Při Bainbridgeově reflexu dochází po dilataci srdečních síní k tachykardii zvýšením aktivity srdečního sympatiku a snížením aktivity eferentních srdečních vláken nervu vagu (Guyton et al. 2011).

Tato krátkodobá kontrola má rychlý nástup, ale omezenou časovou účinnost. Baroreceptory se na novou hodnotu krevního tlaku adaptují v průběhu asi tří dnů a dále fungují stejně, pouze na jiné hodnotě krevního tlaku.

V krátkodobé regulaci se uplatňují i humorální mechanismy. Jde především o adrenalin a noradrenalin, které prodlužují a potencují účinek vyvolaný z přímého nervového zásobení cév. Jejich vyplavení vede také k vazokonstrikci a zvýšení frekvence a síly srdeční kontraktility.

1.1.1.2 Střednědobé mechanismy regulace krevního tlaku

Střednědobé mechanismy regulace krevního tlaku působí v rámci desítek minut až několika hodin. Patří sem relaxace cévní stěny při zvýšení krevního tlaku a přesun tekutin mezi intra- a extravazálním prostorem v kapilárním úseku cirkulace (Guyton et al. 1969). Dále sem můžeme zařadit humorální působení, a to vazokonstrikční účinek systému renin – angiotenzin (RAS), viz kapitola 1.2.1.

1.1.1.3 Dlouhodobé mechanismy regulace krevního tlaku

Dlouhodobé mechanismy regulace krevního tlaku jsou schopny rozvinout své účinky v plné intenzitě po několika hodinách a přetrvávají dny. Jedná se o přímé spojení mezi arteriálním tlakem a vyrovnanou bilancí iontů a tekutin. Jedinečnost dlouhodobých mechanismů spočívá v přizpůsobení objemu tekutin v cirkulaci kapacitě krevního řečiště. Tím se významně odlišují od krátkodobých a střednědobých mechanismů, které pracují se změnami kapacity řečiště. Objem tekutin v těle a náplň cirkulace kolísají se změnami příjmu a výdeje tekutin. Nadbytek nebo deficit objemu extracelulární tekutiny má obvykle za následek zvýšení nebo snížení objemu krve. To vede k rozpoznání receptory v kardiovaskulárním systému. Signály jsou dále přeneseny do ledvin, kde dochází ke změně exkrece sodíku a vody, a tím k nápravě vzniklé nerovnováhy (Navar, 2005).

Ledviny jsou navíc schopny detekovat v oblasti juxtaglomerulárního aparátu změny perfuzního tlaku aferentní arterioly. Tato schopnost vnitřní renální autoregulace je plně nezávislá na vnějších nervových či humorálních vlivech (Carlström et al. 2015).

Výkonným orgánem dlouhodobě působících mechanismů jsou ledviny, které jsou zodpovědné za vyrovnanou bilanci tekutin (Navar, 2005). Pokud není funkce ledvin porušena, je kompenzační schopnost dlouhodobých mechanismů téměř neomezená. Zdravé ledviny vrací krevní tlak do normálních mezí, dokud nedosáhnou jeho úplné nápravy (Veselý, 2002).

Ledviny udržují hodnoty krevního tlaku těmito způsoby:

- Autoregulací průtoku krve
- Tlakově-natriuretickým mechanismem

1.1.1.3.1 Autoregulace v ledvinách

Cílem renální autoregulace je udržení stabilní glomerulární filtrace (GFR) a průtoku krve ledvinou (PKL), což funguje jako ochrana glomerulárních kapilár před nadměrnými výkyvy arteriálního tlaku. Regulaci PKL zajišťují aferentní a eferentní arterioly, jež koordinovanými změnami průsvitu dokonale regulují krevní zásobení ledvin. Renální autoregulace je zprostředkována myogenní odpovědí a tubuloglomerulární zpětnou vazbou.

Myogenní odpověď je vlastní cévnímu řečišti více orgánů, jako jsou např. játra, mozek, myokard a kosterní svaly. V ledvinách je pozorována hlavně v aferentních arteriolách. Ve srovnání s nimi eferentní arterioly disponují pouze poloviční odpovědí (Zhao et al. 2016). Myogenní odpověď je způsobena kontraktilní reakcí buněk hladkého svalstva cév na napětí

cévní stěny. Při zvýšení intravaskulárního tlaku dochází ke konstrikcí aferentní arterioly a následnému zvýšení vaskulární rezistence. Tím se zabrání nadměrnému roztažení cév a výraznému vzestupu PKL (Just, 2007; Layton, 2015). Díky této autoregulaci je zachován relativně stálý průtok krve tkáněmi.

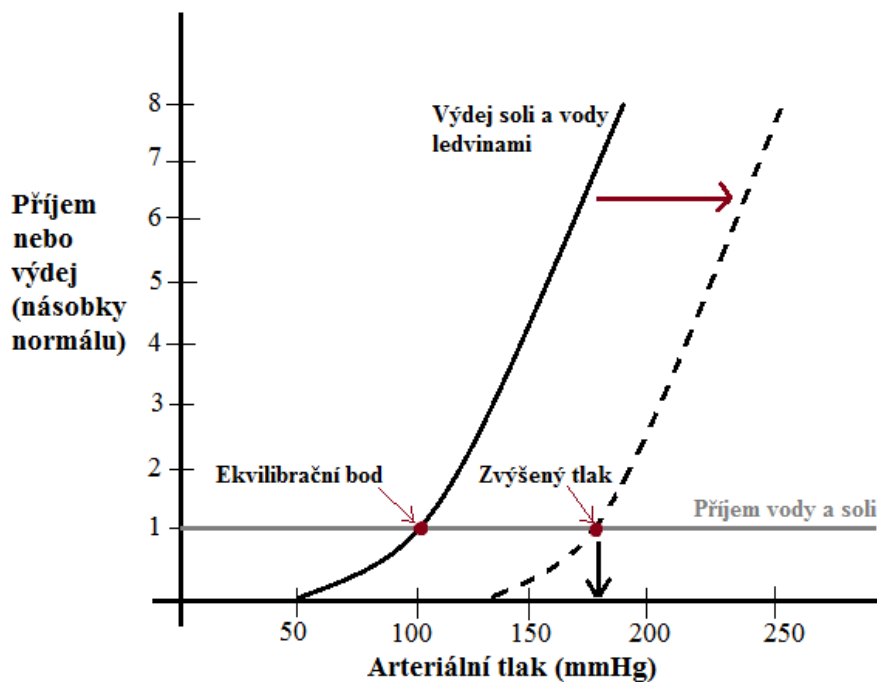
Dalším klíčovým autoregulačním mechanismem je *tubuloglomerulární zpětná vazba* (TGF). TGF je regulační mechanismus specifický pro ledviny. Za výkon tubuloglomerulární zpětné vazby je odpovědný tzv. juxtaglomerulární aparát. Juxtaglomerulární aparát představuje významnou strukturální součást renin-angiotenzinového systému (Peti-Peterdi, 2010).

Nachází se v kůře ledvin v místě, kde se konec vzestupného raménka Henleovy kličky dotýká glomerulu, z něhož pochází, a stěny aferentní arterioly. V tomto místě je tubulární epitel modifikovaný a vytváří *macula densa*. Stěna aferentní arterioly obsahuje juxtaglomerulární buňky, které secernují renin. Juxtaglomerulární buňky, *macula densa* a extraglomerulární mesangiální buňky tvoří juxtaglomerulární aparát (Heller, 1995). Při zvýšení arteriálního tlaku a následném zvýšení glomerulární filtrace dochází k většímu přílivu tubulární tekutiny a dodávky NaCl do oblasti *macula densa*. Zde dochází k aktivaci NaK₂Cl kotransportéru a transportu Na a Cl do buněk. Následné změny vedou k uvolnění specifických mediátorů a modulátorů buňkami *macula densa*, které ovlivňují prostřednictvím kalciových iontů tonus aferentní arterioly. Mezi vazoaktivní působky, jež způsobují vazokonstrikci a zvyšují tonus arterioly, patří adenosin, ATP, tromboxan A₂, prostaglandin H₂ a superoxidový aniont. Naopak mezi vazoaktivní působky, jež způsobují vazodilataci, patří NO, oxid uhelnatý, epoxyeikosatrienové kyseliny a prostaglandin E₂ (Carlström et al. 2015).

1.1.1.3.2 Tlakově-natriuretický mechanismus

Renální tlakově-natriuretický systém je dominantním mechanismem v dlouhodobé regulaci arteriálního tlaku a objemu tělesných tekutin. Tlaková natriuréza a tlaková diuréza je schopnost ledvin měnit výdej soli a vody v závislosti na změně renálního arteriálního tlaku. Takovéto změny v exkreci sodíku a vody pokračují tak dlouho, dokud nedojde k rovnováze tělesných tekutin a návratu arteriálního tlaku k normálním hodnotám. Proto je možné považovat systém renální tlakové diurézy/natriurézy za nekonečný (O'Connor et al. 2010). Mechanismus tlakové diurézy/natriurézy plně funguje pouze u zdravých ledvin, které jsou schopny vyloučit potřebné množství sodíku a vody. V opačném případě dochází k rozvoji hypertenze. Při středním arteriálním tlaku 50 mm Hg je výdej moče u lidí nulový, při tlaku 100 mm Hg je normální a při tlaku 200 mm Hg se výdej moče zvýší 6 - 8x. Účinek krevního tlaku na diurézu zobrazuje tzv. renální funkční křivka, viz. obr. č. 2.

Místo, kde se renální funkční křivka kříží s křivkou příjmu vody a soli, se nazývá ekvilibrační bod. I při zvýšení krevního tlaku o 1 mm Hg převládá výdej soli a vody nad jejich příjmem, dokud se arteriální tlak nevrátí zpět do ekvilibračního bodu. Existují pouze dvě cesty, kdy se při změně tlaku může změnit hodnota ekvilibračního bodu, a to posunem křivky nebo změnou příjmu soli a vody (Guyton et al. 2011).



Obrázek č. 2: Účinek krevního tlaku na výdej močů, diurézu, zobrazuje tzv. renální funkční křivka (modifikováno podle Guytona).

Při tlakové natriuríze nedochází ke zvýšení glomerulární filtrace, ale k přímé inhibici reabsorbce sodíku působením modulátorů pocházejících z dřeně ledvin. Průtok krve dření (PKD) skrze síť cév *vasa recta* je slabě autoregulován, roste při zvýšení renálního arteriálního tlaku a naopak klesá při snížení renálního arteriálního tlaku (Ivy et al. 2014). Při zvýšení průtoku se zvýší renální intersticiální hydrostatický tlak, který je přenesen na celou ledvinu. Inhibice reabsorbce Na^+ je způsobena jednak vlivem změn Starlingových sil skrze epitelium a také důsledkem inhibice $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměníku v proximálním tubulu. Mezi modulátory působící parakrinně či autokrinně, jež regulují PKD patří ATP, 20-HETE, endotelin-1, oxid dusnatý, superoxid a peroxid vodíku. Při zvýšení průtoku krve *vasa recta* dochází k uvolnění NO, jež zvýší tlakovou natriurízu utlumením myogení odpovědi (snížením vaskulární rezistence) a inhibicí $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -kotransportéru (snížení reabsorbce Na^+ v Henleově kličce). Uvolnění NO je zprostředkováno mechanickými stimuly, jako jsou natažení cévní stěny, tlak, smykové tření

a koncentrace iontů. Při zvýšeném intraluminálním toku ve vzestupné části Henleovy kličky dochází také k silné stimulaci produkce NO a peroxidu vodíku se superoxidem. Akutní a chronické studie ukazují, že syntéza peroxidu vodíku a superoxidu ve dřeňové části ledviny může významně ovlivnit PKD a reabsorpci sodíku, přičemž jejich zvýšení vede k rozvoji hypertenze a posunu křivky doprava. Naopak zvýšení oxidu dusnatého má opačný, natriuretický efekt a posunuje renální funkční křivku doleva. Pro dosažení normální tlakově-natriuretické rovnováhy je důležité vyvážení mezi produkcí oxidu dusnatého a superoxidu s peroxidem vodíku (Cowley et al. 2015; O'Connor et al. 2010).

1.1.2 Ledviny a hypertenze

Ledviny zabezpečují vyrovnanou bilanci tekutin a iontů. Porušení této křehké rovnováhy způsobí posun nebo změnu sklonu renální funkční křivky doprava. Stávající tlak potom nemůže zajistit dostatečnou tlakovou diurézu, což vede k akumulaci tekutin, expanzi extracelulárního prostoru a dochází k hypertenzi. Zvýšením arteriálního tlaku dochází k obnovení vyrovnané bilance sodíku a vody. Pokud však jsou ledviny trvale poškozeny, nejde jen o přechodné zvýšení arteriálního tlaku, ale dojde k jeho ustálení na novou hodnotu, která je schopna udržet vyrovnanou bilanci (Veselý, 2002).

Z patofyziologického hlediska se hypertenze rozděluje na:

- hypertenzi objemového typu – dochází k nadměrné produkci faktorů, které stimulují ledviny k retenci sodíku (např. hyperaldosteronismus).
- hypertenzi vazokonstrikčního typu – silný vazokonstrikční účinek ANG II nebo jiných mediátorů způsobí zmenšení kapacity cévního řečiště a zvýšení periferního cévního odporu (PCR).

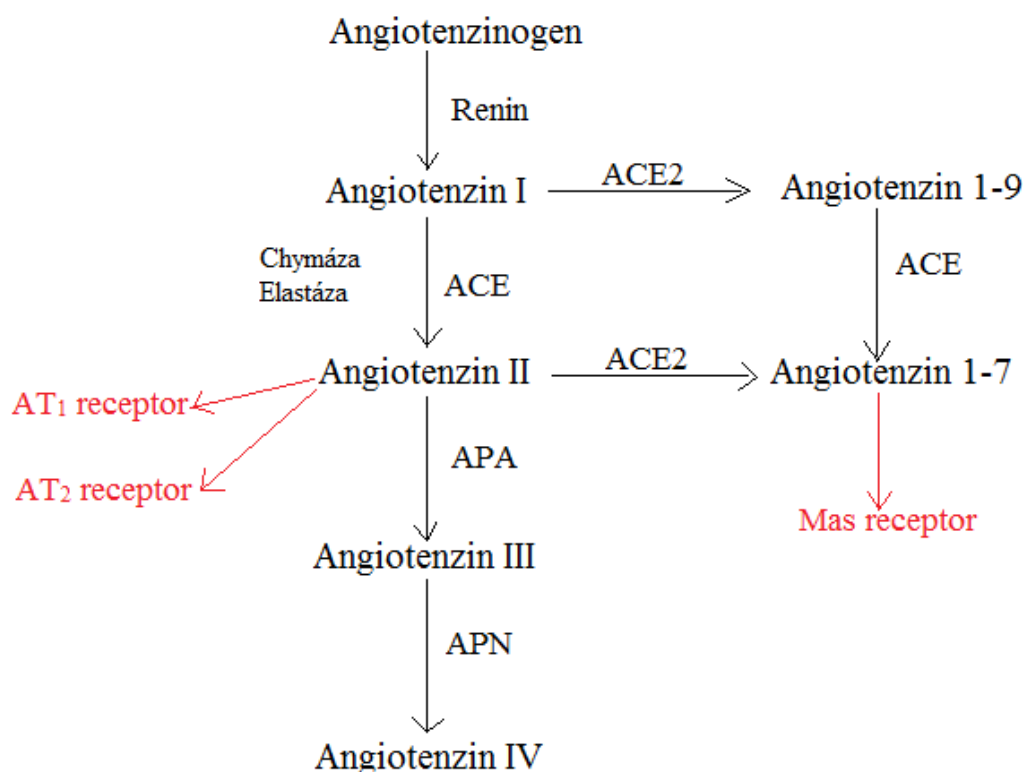
1.1.2.1 Renin-angiotenzinový systém

Renin-angiotenzinový systém (RAS) hraje životně důležitou roli ve fyziologických procesech kardiovaskulárního systému. Nejedná se jen o endokrinní systém, ale jeho působení v mnoha tkáních a orgánech je autokrinní, parakrinní a intrakrinní (Ferrão et al. 2014).

Substrátem RAS je angiotenzinogen, glykoprotein uvolňovaný z jater do cirkulace. Ten je dále štěpen reninem na dekapeptid angiotenzin I (ANG I) (Paul et al. 2006). Renin je uvolňován z juxtaglomerulárních buněk jako odpověď na tři stimuly: 1. snížení arteriálního tlaku, což je detekováno baroreceptory, 2. snížení dodávky sodíku do *macula densa*, 3. zvýšení sympatické nervové aktivity (Ferrão et al. 2014). Angiotenzin I je dále štěpen angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE) na angiotenzin II (ANG II). ACE je membránově vázaná metaloproteináza, která se exprimuje ve vysokých koncentracích na povrchu endoteliálních buněk (Paul et al. 2006). Vedle ACE existují ještě další enzymy, a to humánní chymáza a potkaní elastáza-2, které tvoří alternativní cestu vzniku angiotenzinu II (Becari et al. 2011). Angiotenzin III, který se tvoří z angiotenzinu II pomocí aminopeptidázy A (APA) a indukuje vylučování aldosteronu. Angiotenzin IV, který vzniká z angiotenzinu III působením aminopeptidázy N (APN), má důležitou roli v centrálním nervovém systému a v proliferativních procesech. Angiotenzin 1-7, který působí vazodilatačně a anti-proliferativně přes Mas receptor, vykazuje opačné účinky než angiotenzin II (Becari et al. 2011). Navíc má angiotenzin 1-7 významné diuretické a natriuretické účinky (Ferrão et al. 2014).

Zjednodušené schéma renin-angiotenzinového systému je na obrázku č. 3.

Hlavní efektorovou molekulou tohoto systému je angiotenzin II, jehož účinek je zprostředkován přes AT₁ a AT₂ receptory. Angiotenzin II je klíčový hormon, který ovlivňuje funkci prakticky všech orgánů, včetně srdce, ledvin, mozku a vaskulatury, kde má jak prospěšné, tak patologické účinky (Mehta et al. 2007). Přímým působením ANG II dochází ke konstrikcí hladkých svalových buněk ve stěně cév, zvýšené kontraktilitě myokardu, stimulaci produkce aldosteronu, uvolnění katecholaminů, stimulaci aktivity sympatiku a pocitu žízně. ANG II také reguluje transport sodíku z epiteliálních buněk střev a ledvin. Navíc kromě této endokrinní role místně produkovaný ANG II vyvolává zánět, hypertrofii, hyperplazii, mitogenezi, apoptózu, migraci a diferenciaci buněk, reguluje genovou expresi bioaktivních substancí a aktivuje různé intracelulární pochody, což může vše přispívat k tkáňovému poškození (Kobori et al. 2007). Pokud je aktivován RAS, vazba ANG II na AT₁ receptory vyvolá vazokonstrikci, zatímco AT₂ receptory působí jako protiváha AT₁ receptorů a způsobují vazodilataci (Fyhrquist et al. 2008).



Obrázek č. 3: Zjednodušené schéma renin-angiotenzinového systému. ACE – angiotenzin konvertující enzym, ACE2 - angiotenzin konvertující enzym 2, APA – aminopeptidáza A, APN - aminopeptidáza N.

Jelikož hypertenze je příčinou i následkem poškození ledvin, je zřejmé, jakou klíčovou roli hrají ledviny v rozvoji hypertenze. V experimentálních studiích bylo prokázáno, že transplantace ledviny od geneticky hypertenzního dárce je schopna vyvolat hypertenzi u geneticky normotenzního příjemce (Rettig et al. 2005). A naopak, že hypertenze může být normalizována transplantací kontrolních ledvin od normotenzních dárců hypertenzním příjemcům, kterým byly ledviny odstraněny. Hypertenze u normotenzních potkanů vyvolaná příjmem hypertenzní ledviny je spojena se zhoršenou natriurézou a pozitivní sodíkovou rovnováhou, která se však objevuje až po zvýšení krevního tlaku, ne před ním. Proto zatím zůstává neobjasněno, jakým specifickým mechanismem u normotenzních jedinců způsobí ledviny od hypertenzních dárců hypertenzi (Ivy et al. 2014).

Hodnoty ANG II v ledvinách jsou mnohem vyšší než v okolní plazmě, což nasvědčuje tomu, že ANG II není pouze filtrován z plazmy, ale tvořen na místě. Ledviny exprimují všechny důležité komponenty RAS, jako je angiotenzinogen, renin a ACE. Takto místně syntetizovaný ANG II může působit na nukleární, cytoplasmatické a na povrchu buněk umístěné AT₁ a AT₂

receptory (Ferrão et al. 2014). V ledvinách jsou AT₁ receptory exprimovány v průběhu celého nefronu, v glomerulu a renální vaskulatuře. V proximálním tubulu, tlusté části vzestupného raménka Henleovy kličky, distálním tubulu a sběrných kanálcích ledvin AT₁ receptory podporují zpětnou reabsorpci sodíku. V cévách mají AT₁ receptory také velmi důležitý vliv na regulaci sodíku. Renální vazokonstrikce způsobená ANG II snižuje průtok krve dření, což následně omezí exkreci sodíku (Crowley et al. 2006). Klinické i preklinické studie ukazují, že ANG II má zásadní roli v patogenezi hypertenze a renálního poškození v důsledku nepřiměřené aktivace AT₁ receptorů (Kobori et al. 2007; Kopkan et al. 2009). Genetické odstranění AT₁ receptorů v proximálním tubulu ledvin u transgenního kmene myši je dostačující k tomu, aby se snížil krevní tlak navzdory normální cévní odpovědi. Vyřazením této cesty se změní exprese klíčového transportéru sodíku (Na⁺/H⁺ výměníku), sníží se reabsorbce sodíku v proximálním tubulu a tím dochází k významné ochraně proti hypertenzi. Proximální tubulus jako je tedy klíčovým místem regulace krevního tlaku a tlakové natriurézy (Gurley et al. 2011).

1.1.3 Metabolity cytochromu P450

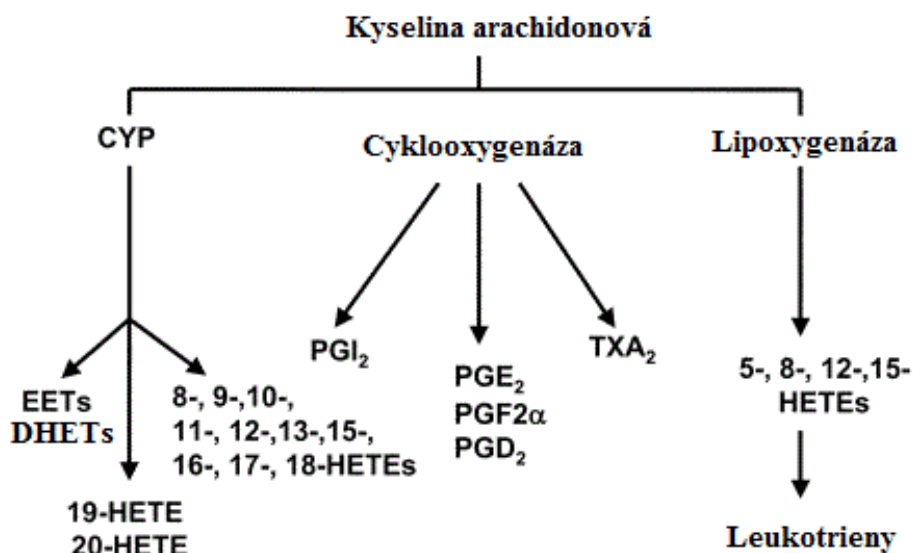
Epoxyeikosatrienové kyseliny a 20-hydroxeikosatetraenová kyselina byly již v předchozích kapitolách zmíněny jako molekuly, které se podílejí na regulaci krevního tlaku. Jejich společnou charakteristikou je vznik z kyseliny arachidonové.

Kyselina arachidonová (5,8,11,14 - eikosatetraenová kyselina) je ω-6-polynenasycená mastná kyselina, která se do těla dostává potravou nebo je syntetizována z esenciální kyseliny linolové. Kyselina arachidonová je hlavní součástí fosfolipidů všech buněčných membrán. Hydrolýzou fosfolipidové membrány fosfolipázou A2 dochází k přeměně kyseliny arachidonové na biologicky aktivní molekuly lipidické povahy, které se nazývají eikosanoidy. Po uvolnění do extracelulárního prostoru působí eikosanoidy na cílové buňky autokrinně či parakrinně (Dennis et al. 2011; Meirer et al. 2014).

Kyselina arachidonová je metabolizována třemi hlavními cestami: cyklooxygenázovou (COX), lipoxygenázovou (LO) a cestou cytochromu P450 (CYP) (obr. č. 4).

Cyklooxygenázovou cestou vznikají prostaglandiny (PGs) a tromboxany (Tx).

Cestou lipoxygenázovou vznikají hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs), leukotrieny (LTs) a lipoxiny (LXs), které se významně podílejí na patogenezi stavů jako je astma, zánět a ateroskleróza. (Meirer et al. 2014; Imig, 2012).



Obrázek č. 4: Zjednodušené schéma metabolismu kyseliny arachidonové. EETs - epoxyeikosatrienové kyseliny, DHETs – dihydroxyeikosatrienové kyseliny, HETE - hydroxyeikosatetraenová kyselina, PG – prostaglandiny, TX – tromboxany.

Enzymy cytochromu P450 jsou na membránu vázané enzymy obsahující hem. Nejčastěji jsou lokalizované v játrech, kde se podílí na metabolizaci léčiv a jiných cizorodých látek.

V extrahepatálních tkáních jako např. v mozku, ledvinách, plicích, srdci a v kardiovaskulárním systému metabolizují endogenní substráty, mezi které patří vitamíny, steroidy a mastné kyseliny včetně kyseliny arachidonové (Roman, 2002).

Cesta cytochromu P450 zahrnuje dvě odlišné enzymatické aktivity, CYP hydroxylázu a CYP epoxygenázu. Enzym CYP hydroxyláza produkuje hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETE), jako je 20-HETE, která vykazuje vazokonstrikční a prozánětlivé účinky. CYP epoxygenáza produkuje epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs), které mají vazodilatační a protizánětlivé účinky, přičemž se významně podílejí na dlouhodobé regulaci arteriálního tlaku (Fleming, 2007). EETs a HETEs jsou velmi nestabilní sloučeniny, které jsou rychle přeměněny β -oxidací na méně aktivní produkty. Tak se stávají vynikajícím substrátem pro řetězovou reakci, neboť se mohou v tkáních dále metabolizovat CYP enzymy, cyklooxygenázou nebo lipoxygenázou.

V ledvinách hrají metabolity kyseliny arachidonové významnou roli v kontrole renálních funkcí a vaskulárního tonu. Jejich exprese ve vaskulárních a tubulárních strukturách ledvin se podílí na transportu tekutin a elektrolytů a také autoregulační schopnosti ledvin. Lokalizace a

exprese CYP epoxygenáz je regulována hormonálními a parakrinními faktory, mezi které patří angiotenzin II, endotelin 1, parathormon, epidermální růstový faktor, dopamin, oxid dusnatý a široká škála peptidových hormonů. V různých tkáních a krevních cévách jsou lokalizované specifické CYP epoxygenázy (Roman, 2002; Imig, 2012).

1.1.3.1 Hydroxyeikosatetraenové kyseliny

Kyselina arachidonová je metabolizována enzymy cytochromu P450 z rodiny CYP4A, CYP4B a CYP4F na hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETE). Jejich exprese a hormonální regulace se liší v závislosti na tom, ve které tkáni se nacházejí.

Hlavním metabolitem této cesty je 20-HETE. Syntéza a následné uvolnění 20-HETE je regulováno angiotenzinem II, serotoninem, endotelinem-1, jinými růstovými faktory, dietou, věkem či pohlavím. Vysokotučná dieta inhibuje syntézu CYP4A, a tím snižuje produkci 20-HETE, zatímco dieta s vysokým obsahem sodíku zvyšuje expresi u všech isoform CYP 4A. Syntéza 20-HETE může být v renálních a mozkových arteriích inhibována oxidem dusnatým (NO), oxidem uhelnatým (CO) a superoxidovými radikály (Wu et al. 2014).

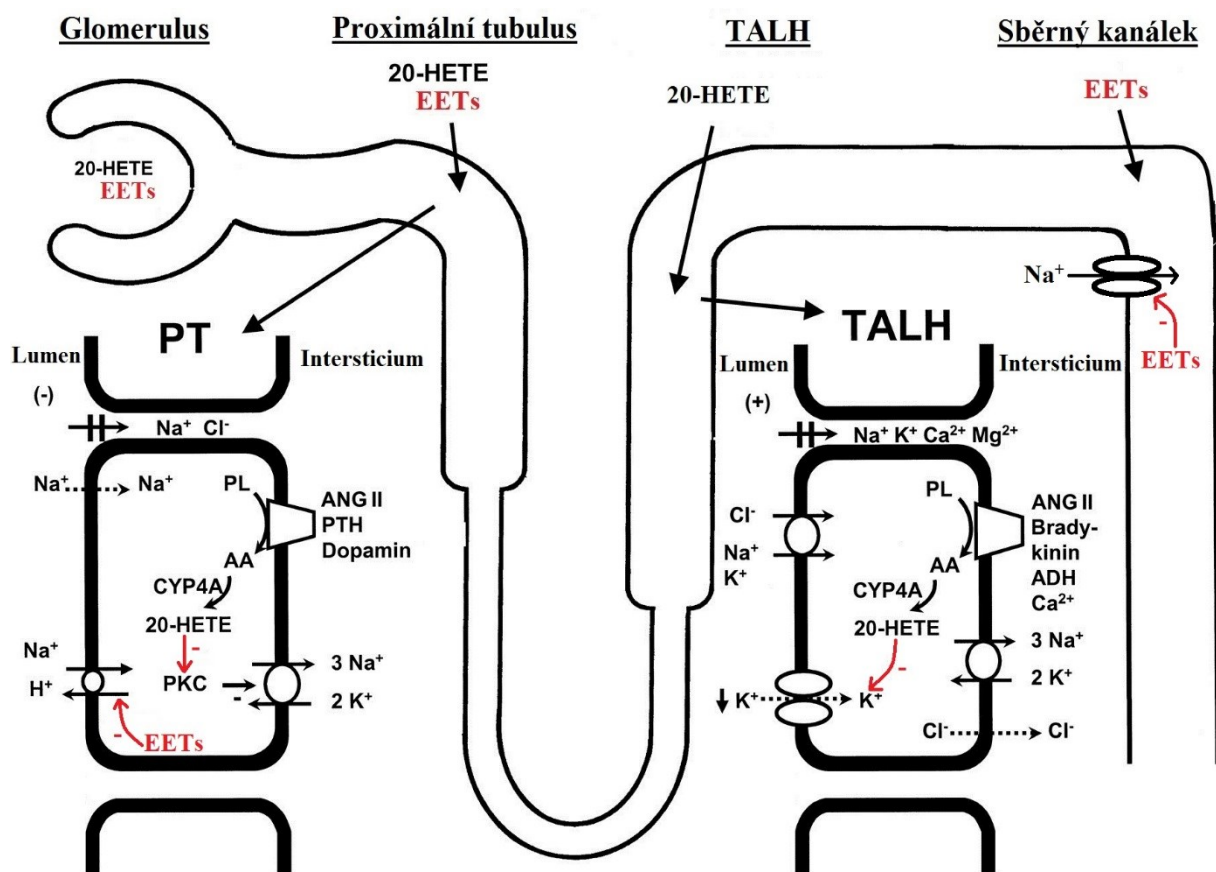
Dosavadní studie ukazují, že 20-HETE hraje důležitou roli v regulaci vaskulárního tonu (Fan et al. 2015). 20-HETE je produkována v renálních a cerebrálních arteriích, kde působí jako vazokonstriktor. Přes aktivaci protein kinázy, mitogeny aktivované kinázy, tyrosin kinázy a Rho kinázy dochází k bloádě vápníkem aktivovaného draslíkového kanálu. Tím se sníží membránový potenciál, což vede k aktivaci napětově řízeného vápníkového kanálu L typu. Zvýší se tok vápníku do buňky a dochází ke stahu hladkého svalu cév (Roman, 2002).

Produkce 20-HETE je zvýšena ve vaskulárním řečišti u mnoha hypertenzních modelů zvířat s endoteliální dysfunkcí. Endoteliální dysfunkce je spojena s věkem a různými onemocněními, například hypertenzí, diabetem, aterosklerózou a hyperlipidemií. Typickým znakem endoteliální dysfunkce je snížení biologické dostupnosti NO, které je způsobeno zhoršenou syntézou NO endoteliemi a/nebo zvýšenou inaktivací NO kyslíkovými radikály (Fan et al. 2016).

V nefronu je syntéza 20-HETE lokalizována do proximálního tubulu, tlustého vzestupného raménka Henleovy kličky, glomerulu a preglomerulárních arteriol. Inhibice tvorby 20-HETE zhoršuje myogenní odpověď aferentní arterioly a TGF odpověď ledvin (Fan et al. 2016). 20-HETE zprostředkovává transport sodíku a vody regulací různých kanálů a kotransportů podle toho, v které části tubulu se nachází. V proximálním tubulu 20-HETE inhibuje aktivitu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$ přes protein kinázu C, čímž zvyšuje vylučování sodíku. V dřevňové části tlustého raménka Henleovy kličky blokuje $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázu}$, 70 pS K^+ kanál spolu s $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$

kotransportérem, a tím brání vylučování K^+ do lumen a reabsorpci Na^+ . Díky tomu se sníží transepiteliální potenciál a transport chloridů a nedochází k pasivnímu transportu kationtů do intersticia (Wu et al. 2014; Oto et al. 1999, obr. č. 5). V ledvinách se tedy 20-HETE účastní regulace arteriálního tlaku přes tlakovou natriurézu, která spočívá ve zvýšení průtoku krve dřením, renálního intersticiálního hydrostatického tlaku a v inhibici transportu Na^+ v proximálním tubulu. Zvýšení renálního perfuzního tlaku přispívá ke zvýšení hodnot 20-HETE v kůře ledvin (Cowley et al. 1996).

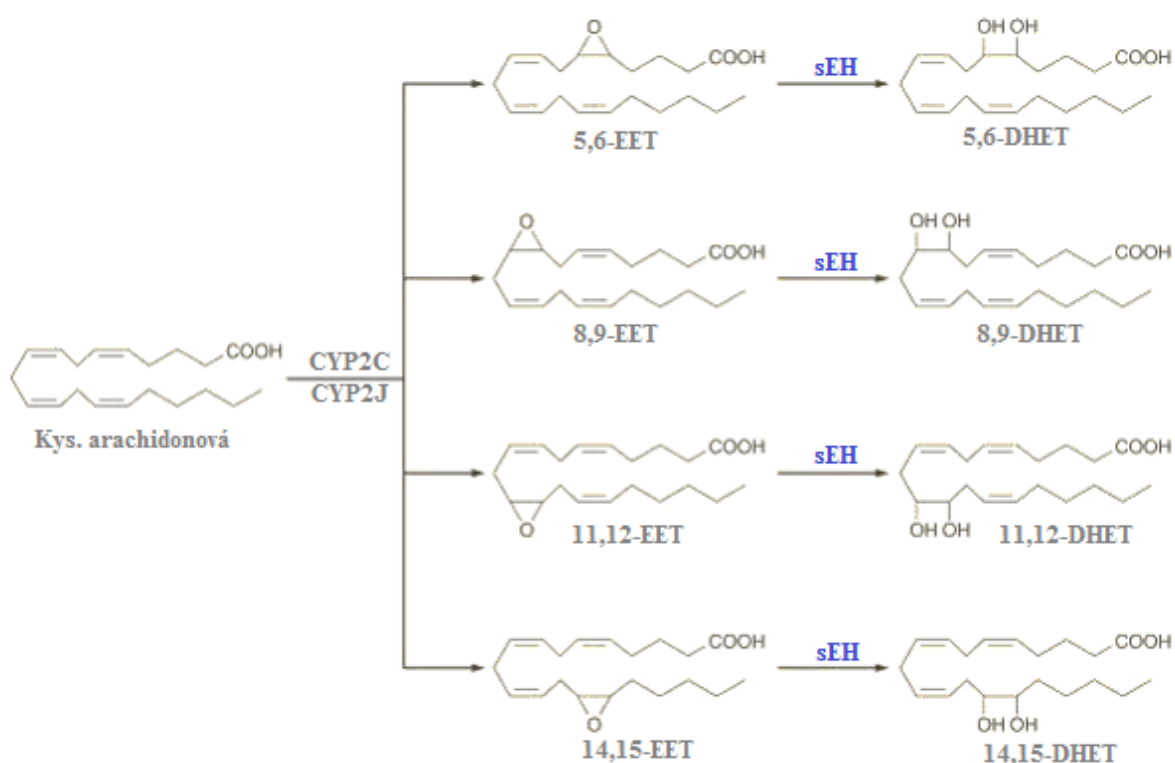
Role 20-HETE v regulaci krevního tlaku proto není jednoznačná. Na jedné straně způsobuje vazokonstrikci a vaskulární dysfunkci, na straně druhé inhibuje reabsorpci sodíku v ledvinách.



Obrázek č. 5: Působení 20-HETE a EETs v proximálním tubulu, tlustém vzestupném raménku Henleovy klíčky a sběrných kanálcích ledvin (modifikováno podle Romana). PT – proximální tubulus, TALH - tlusté raménko Henleovy klíčky, 20-HETE – 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina, EETs – epoxyeikosatrienové kyseliny, PL – fosfolipáza, AA – kys. arachidonová, ANG II – angiotenzin II, PTH – parathormon, PKC – proteinkináza C, CYP4A - enzym cytochromu P450 z rodiny 2C, ADH – antidiuretický hormon.

1.1.3.2 Epoxyeikosatrienové kyseliny

Epoxyeikosatrienové kyseliny vznikají z kyseliny arachidonové především působením enzymů cytochromu P450 z rodiny CYP2C a CYP2J. Všechny čtyři regioisomery epoxyeikosatrienových kyselin 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET vykazují vazodilatační aktivitu. Mezi nejsilnější vazodilatátory patří isomery 11,12-EET a 14,15-EET, zatímco isomery 5,6-EET, 8,9-EET mohou působit i vazokonstrikčně aktivací tromboxanových receptorů (Imig, 2012). CYP2C23 a CYP2C44 byly identifikovány jako hlavní epoxygenázy CYP2C v potkaních a myších ledvinách a jsou převážně producenty regioisomeru 11,12-EETs. Strukturální vzorce isomerů epoxyeikosatrienových kyselin jsou na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6: Strukturální vzorce isomerů epoxyeikosatrienových kyselin. Převzato z: Imig, 2012. CYP2C,

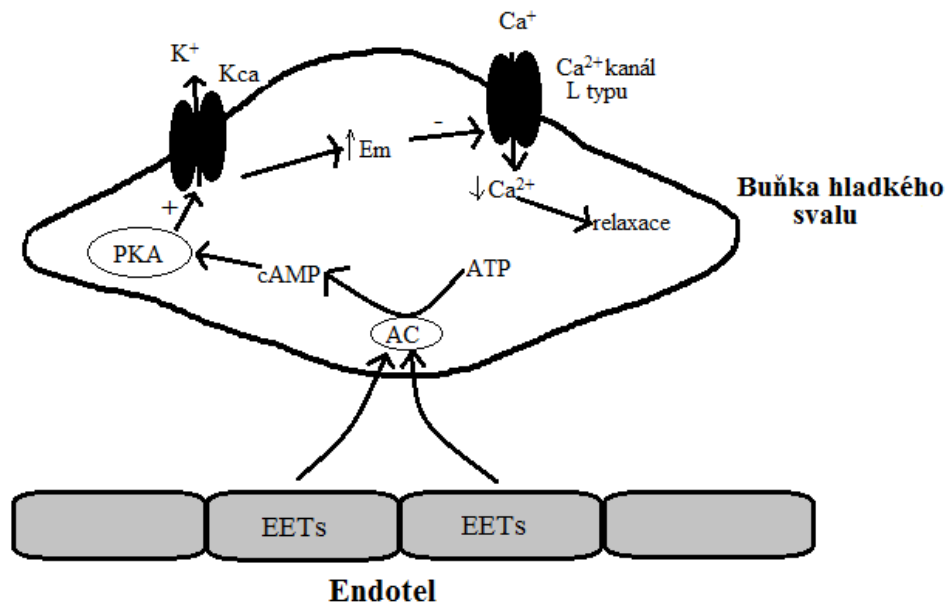
CYP2J - enzymy cytochromu P450 z rodin 2C a 2J, sEH - solubilní epoxid hydroláza, 5,6-EETs – 5,6-epoxyeikosatrienová kyselina, 5,6-DHET – 5,6-dihydroxyeikosa-trienová kyselina, 8,9-EETs – 8,9-epoxyeikosatrienová kyselina, 8,9-DHET – 8,9-dihydroxy-eikosatrienová kyselina, 11,12-EETs – 11,12-epoxyeikosatrienová kyselina, 11,12-DHET – 11,12 dihydroxyeikosatrienová kyselina, 14,15-EETs – 14,15-epoxyeikosatrienová kyselina, 14,15-DHET – 14,15-dihydroxyeikosatrienová kyselina.

Ve většině buněk a tkání mohou být EETs buď přeměněny cytosolickou epoxid hydrolázou na dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) nebo degradovány β -oxidací nebo začleněny do celulárních fosfolipidů (Capdevila et al. 2013).

Přeměnou EETs enzymem solubilní epoxid hydrolázou (sEH) na biologicky méně aktivní dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) se snižuje množství EETs, a tím i jejich prospěšné kardiovaskulární vlastnosti (Elmarakby, 2012). U savců existuje solubilní a mikrosomální forma enzymu epoxid hydrolázy (EH) a nedávno objevená EH3 s rozdílnými subcelulárními lokalizacemi a substrátovou selektivitou. Zatímco mikrosomální forma se podílí na likvidaci exogenních látek, forma solubilní metabolizuje epoxidy endogenních mastných kyselin, karcinogenní xenobiotika a uplatňuje se v regulaci kardiovaskulárních funkcí v rámci přeměny EETs na DHETs. EH3 nemá tak důležitou roli v metabolismu epoxidů mastných kyselin, ale vzhledem k její distribuci v kůži, plicích, žaludku a jícnu bude její úloha spíše spočívat v detoxikaci cizorodých látek právě v těchto tkáních (Hoopes et al. 2017). U savců se sEH nachází v mnoha tkáních, jako jsou ledviny, srdce, játra, plíce, vaječníky a její lokalizace v buňkách je soustředěna do cytosolu, liposomů a peroxysomů. Inhibicí enzymu sEH dochází k bloádě přeměny EETs na DHETs, což vede ke zvýšení biologické dostupnosti EETs ve tkáních. Tím by se mohly inhibitory sEH stát novou možností léčby kardiovaskulárních chorob, neboť jejich vazodilatační efekt byl prokázán na mnoha modelech experimentální hypertenze, jako jsou spontánně hypertenzní potkani, ANG II-dependentní hypertenze, Ren-2 transgenní potkani a DOCA-sůl sensitivní hypertenze (Honetschlägerová et al. 2011; Koeners et al. 2011; Sporková et al. 2011; Manhiani et al. 2009). Inhibice sEH také snížila vysoký krevní tlak u zvířat s metabolickým syndromem a u zvířat krmených vysokoslanou dietou (Elmarakby, 2012). Významná je lokalizace sEH v červených krvinkách. Červené krvinky slouží jako rezervoár a transportér EETs. V membráně vázané EETs mohou být hydrolyzovány a uvolněny a následně se mohou podílet na regulaci vaskulárního tonu (Jiang et al. 2011). Inhibice sEH tak umožňuje zvýšit plazmatické hodnoty EETs.

EETs produkované v endoteliálních buňkách, mají významné antihypertenzní vlastnosti a hrají důležitou roli v angiogenezi, ateroskleróze a jiných kardiovaskulárních onemocněních. EETs působí protizánětlivě, fibrinolyticky a také angiogenně tím, že aktivují endoteliální proliferaci a migraci. Na druhou stranu inhibují proliferaci buněk hladkého svalů, ale hlavně působí jako vazodilatátor a endoteliální hyperpolarizační faktor (EDHF).

EETs působí na buňky hladkého svalu buď aktivací membránového receptoru, nebo intracelulárním mechanismem. Není vyloučena ani možnost existence více než jednoho druhu receptoru EETs. EETs aktivují vápníkem aktivované draselných kanály (K_{Ca}) buněk hladkého svalu (VSMC). Následně dochází k výstupu draslíku, membránové hyperpolarizaci a relaxaci VSMC (Spector et al. 2015; Imig et al. 2005). Působení EETs v cévách zobrazuje obr. č. 7. Takto působící endoteliální hyperpolarizační faktor se vyskytuje na mnoha místech vaskulárního řečiště, včetně renálního (Elmarakby, 2012; Bellien et al. 2013).



Obrázek č. 7: Působení EETs v cévách. AC- adenylcykláza, ATP – adenosintrifosfát, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, K_{Ca} – kalcium aktivovaný kaliový kanál, PKA – proteinkináza A.

Otázkou však je, zda opravdu za snížením krevního tlaku pomocí inhibice sEH stojí přímé vazodilatační účinky EETs. Skupina Hercule a spol. zkoumala u myši vzájemné vaskulární působení mezi eikosanoidy cytochromu P450, sEH a NO. Zjistili, že za vazodilatační účinky EETs je zodpovědná jejich schopnost aktivovat endoteliální NO syntázu, která vede k následnému uvolnění NO.

V ledvinách vznikají EETs v epiteliálních buňkách proximálních tubulů, sběrných kanálků a v endoteliálních buňkách renálního krevního řečiště. Přítomnost EETs v ledvinách byla potvrzena i v mezangiálních buňkách glomerulu, kde blokují Na^+/H^+ výměník, a tím mohou přispívat k regulaci glomerulární filtrace. V renální mikrovaskulatuře, konkrétně v aferentní arteriole, působí jako EDHF.

Kromě regulace vaskulárního tonu se EETs podílí na regulaci natriurézy. V proximálním tubulu ledvin blokují Na^+/H^+ výměník a tím snižují reabsorpci sodíku (Kopkan et al. 2012). Dalším místem působení EETs v ledvinách jsou sběrné kanálky ledvin, kde blokují epiteliální natriový kanál (ENaC), což má za následek inhibici reabsorbce sodíku a vody (Roman, 2002; Lee et al. 2010; Khan et al. 2014; Fan et al. 2015; obr. č. 5).

Natriuretické účinky a přímé vazodilatační působení EETs na renální vaskulaturu hrají důležitou roli v jejich antihypertenzních vlastnostech. EETs reagují na konstrikci renální arterioly při zvýšení krevního tlaku, stejně tak jako na vazokonstrikční působení endotelinu-1 a ANG II (Sporková et al. 2016; Elmarakby, 2012; Imig et al., 2000). Proto podání stabilních EETs analogů či inhibitorů sEH s následným snížením konverze EETs na DHETs, které vede ke zvýšené dostupnosti EETs, by mohlo být jedním z mechanismů léčby hypertenze.

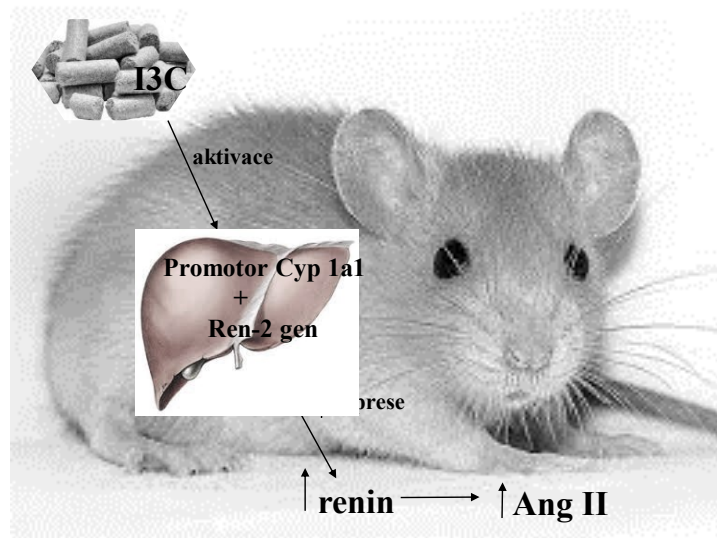
1.1.4 Experimentální model hypertenze

Transgenní kmen (Cyp1a1-Ren-2) s indukovatelnou hypertenzí – iTGR

V naší práci jsme použili transgenní kmen potkanů, který představuje model ANG II – dependentní formy hypertenze. Myší Ren-2 reninový gen byl spojen s 11,5 kb fragmentem Cyp1a1 a následně vložen do genomu Fisher 344 potkanů (Kantachavesiri et al. 2001). Cyp1a1 není stále 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 et al. 2006). I3C se přirozeně vyskytuje v rostlinách z čeledi brukvovitých - Brassicaceae (Minich et al. 2007).

Myší Ren-2 gen je u tohoto modelu exprimován hlavně v játrech po indukci promotoru Cyp1a1 xenobiotikem I3C obsaženým v dietě (Kantachavesiri et al. 2001; obr. č 8). Zvýšená exprese reninového genu Ren-2 vede k nárůstu plazmatické reninové aktivity a následnému vzestupu plazmatických a intrarenálních hodnot ANG II. To vede u transgen-positivních potkanů k rozvoji ANG II – dependentní formy hypertenze, zatímco transgen-negativní (Fisher F 344) potkani zůstanou normotenzní (Kantachavesiri et al. 2001; Mitchell et al. 2006; Vaňourková et al. 2006; Jichová et al. 2016; Howard et al. 2012; Peters et al 2008, 2012; Sporková et al. 2014; Honetschlägerová et al. 2013). Po vysazení I3C z diety nedochází k expresi myšího Ren-2 genu a krevní tlak opět klesá. Jde tedy o reverzibilní proces, který navíc umožňuje v závislosti na době a dávce podání I3C přesně ovládat rozvoj ANG II – dependentní formy hypertenze (Kantachavesiri et al. 2001; Mitchell et al. 2006;

Howard et al. 2012). Místem integrace transgenu je chromozom Y, tudíž lze studovat tento model jen na samcích (Kantachuvesiri et al. 2001).



Obrázek č. 8: Zjednodušené schéma exprese myšního Ren-2 genu a rozvoj ANG II – dependentní hypertenze.

Při dlouhodobém podání I3C v koncentraci 0,3% v dietě dochází k vzestupu složek endogenního renin-angiotenzinového systému a rozvoji maligní hypertenze. To má za následek snížení tělesné hmotnosti, letargii, piloerekcii, hemolytickou anémii a rozvoj retinopatie (Huang et al. 2012; Patterson et al. 2005).

V ledvinách vede maligní hypertenze k výrazné vazokonstrikci a vaskulárním lézím, mezi které patří např. myointimální proliferace, fibrinoidní nekróza a obliterující endarteritida interlobulární a aferentní arterioly (Mitchell et al. 2005). To vše má za následek ischemii ledviny.

Cyp1a1-Ren-2 potkani s maligní hypertenzí vykazují snížené hodnoty glomerulární filtrace (GFR) a průtoku krve ledvinou (PKL). Nadměrná aktivace AT₁ receptorů vyvolaná ANG II také významně zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby jak u normotenzních zvířat, tak u zvířat s ANG II – dependentní formou hypertenze. Tyto modulační účinky ANG II na renální hemodynamiku a na citlivost glomerulární zpětné vazby jsou tak jedním z možných

mechanismů, který může vést k rozvoji maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren 2 potkanů (Huang et al. 2012).

Cyp1a1-Ren2 transgenní potkani s maligní hypertenzí mají zvýšený oxidační stres. Zvýšené hladiny superoxidového aniontu a snížená biologická dostupnost oxidu dusnatého přispívají ke zvýšené renální vaskulární rezistenci a vysokému arteriálnímu krevnímu tlaku.

Renoprotektivní vazodilatační efekt oxidu dusnatého by mohl hrát významnou roli v prevenci renální vazokonstrikce, a tím přispívat k udržení renální hemodynamiky po indukci maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (Patterson et al. 2005)

2. Hypotézy a cíle dizertační práce

Dizertační práce je založena na následujících hypotézách:

- a) Podání inhibitoru sEH, *cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoové kyseliny (*c*-AUCB) (Hwang et al. 2007), zmírní rozvoj hypertenze a zhoršené renální funkce u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí.
- b) Inhibice sEH obnoví tlakovou natriurézu v ledvinách a tím přispívá ke snížení hypertenze a následného poškození cílových orgánů, zejména ledvin a srdce.
- c) Vazodilatační účinky eikosanoidů jsou převážně způsobeny jejich schopností aktivovat endoteliální NO syntázu (eNOs) s následným uvolněním NO do vaskulatury.

Cíle dizertační práce:

- a) Ověřit účinnost inhibitoru sEH pomocí monitorování krevního tlaku a renálních funkcí u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí.
- b) Charakterizovat účinky chronické léčby inhibitorem sEH (*c*-AUCB) na autoregulaci renální hemodynamiky, na schopnost tlakové natriurézy ledvin a na rozvoj renálního poškození a hypertenzí vyvolanou srdeční hypertrofií.
- c) Zjistit, zda snížení krevního tlaku pomocí inhibitoru sEH je způsobeno EETs zprostředkovanou zvýšenou biologickou dostupností NO a prozkoumat úlohu intrarenální interakce CYP metabolitů s RAS a NO v patofyziologii ANG II-dependentní formy maligní hypertenze.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Úvod k experimentům

Nepřiměřená aktivace renin-angiotenzinového systému zásadně přispívá k patofyziologickým mechanismům ANG II-dependentní formy hypertenze (Hall et al. 1980; Navar et al. 1996; Červenka et al. 1998). Jak už bylo řečeno výše, metabolity cytochromu P450 jsou významnými regulátory kardiovaskulárních a renálních funkcí (Fleming, 2001; Roman, 2002; Imig, 2005; Capdevila et al. 2007). Natriuretické účinky a přímé vazodilatační působení EETs hrají důležitou roli v jejich antihypertenzních vlastnostech. Zvýšení biologické dostupnosti EETs s využitím jejich protektivních kardiovaskulárních účinků by se mohlo stát jednou z možností léčby hypertenze.

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

3.2 Metodika

Pokusy byly provedeny v souladu s pokyny a směrnicemi stanovenými Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání v Institutu Klinické a Experimentální Medicíny v Praze.

3.2.1 Zvířata a dieta:

Všechny pokusy byly provedeny na samcích Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů ve věku 2 měsíců. Zvířata použita v této studii byla chována v Centru experimentální medicíny IKEM z chovných zvířat dodaných z Centra kardiovaskulárního výzkumu Univerzity Edinburgu ve Spojeném Království. Zvířata byla chována v cyklu světlo/tma (12 hodin světlo a 12 hodin tma). Dieta použitá v pokusech byla vyrobena firmou SEMED (Praha 4, Česká Republika). Potkani byli krmeni dietou s obsahem I3C (indukování potkani) nebo dietou bez obsahu I3C (neindukování potkani). Jako kontrolní zvířata byli použiti transgen-negativní (Fisher F 344)

potkani.

3.2.2 Chemikálie

Roztok inhibitoru sEH (c-AUCB) pro podání v pitné vodě se připravoval každý třetí den (Sporková et al. 2001; Neckář et al. 2012; Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b). Krystalický c-AUCB (13 mg nebo 26 mg) byl rozpuštěn v etanolu (5ml) a cyklodextrinu (150 mg) a po 5 minutách sonikace byl vzniklý roztok přidán do 1 litru pitné vody. Dále byl přidán hydrogenuhličitan (3 ml/l), aby nedošlo k vysrážení rozpuštěných látek při nízkém pH. Cyklodextrin a hydrogenuhličitan byly také přidány do pitné vody pro neléčené potkany, abychom se ujistili, že tyto substance neovlivňují renální funkce. Příjem tekutin u potkanů v popsáných experimentech byl přibližně 15 ml za den, což odpovídalo zhruba dennímu příjmu 200 nebo 400 µg c-AUCB. Použitím rozdílné koncentrace c-AUCB jsme docílili efektu léčby závislého na dávce. S dávkou 26 mg c-AUCB jsme pokračovali v dalších studiích, neboť jsme zjistili, že tato léčba významně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze a výrazně zvyšuje koncentrace EETs v ledvinné tkáni u Cyp11a1-Ren-2 transgenních potkanů (Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b). N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) byl podáván v pitné vodě v dávce 600 mg/l, což je dávka, která plně blokuje aktivitu NOS (Zicha et al. 2009). K zablokování aktivity RAS byla použita kombinace ACE inhibitoru trandolaprilu (Gopten, Abbot, Praha, ČR, v dávce 6 mg/l pitné vody) a AT₁ antagonisty losartanu (Lozap, Zentiva, Praha, ČR, v dávce 100 mg/l v pitné vodě). Naše nedávné studie ukázaly, že takto vysoké dávky inhibitoru ACE a AT₁ kompletně zabránily rozvoji hypertenze a poskytly větší kardio- a renoprotekci než použití dávek běžně užívaných k léčbě hypertenze (Kujal et al. 2010).

3.2.3 Statistická analýza

Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Statistická analýza dat byla provedena použitím GraphPadPrism software (Graph Pad Software, San Diego, California, USA) pomocí Student testu, Wilcoxonova testu pro nepárová data, popřípadě one-way ANOVA. Ke statistickému srovnání uvnitř skupin byla užita ANOVA pro opakovaná měření pomocí Student-Newman-Keulsova testu (např. analýza autoregulace průtoku krve ledvinou a glomerulární filtrace). Hodnoty překračující 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$) byly považovány za statisticky významné.

3.3 Vliv inhibice solubilní epoxid hydrolázy na hypertenzi a poškození ledvin u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů

3.3.1 Cíl studie:

Zjistit, zda podání inhibitoru sEH, *cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoové kyseliny (*c*-AUCB), zmírní rozvoj hypertenze a zhoršené renální funkce u transgenních potkanů s indukovanou expresí myšího Ren-2 reninového genu.

3.3.2 Protokol č. 1:

3.3.2.1 Měření krevního tlaku a exkrečních funkcí ledvin:

Samcům Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů, vážícím 250 ± 20 g, byly implantovány telemetrické sondy TA11PA-C40 (Data Sciences International, St. Paul, Minnesota, USA) pro kontinuální měření krevního tlaku během experimentu. Zvířata byla anestetizována kombinací tiletamin - zolazepam (8 mg/kg, intramuskulárně) a xylazin (4 mg/kg, intramuskulárně). Přes incizi v linea alba došlo k odhalení břišní aorty, která byla krátce uzavřena pro vložení katetru telemetrické sondy. Katetr byl na místě zajištěn pomocí tkáňového lepidla. Tělo sondy bylo přišito k břišní stěně podél břišní incize, která byla následně také zašita. Dále byla zašita kůže. Stehy se mohly odstranit za 7 – 10 dní po zhojení rány. Za 10 – 12 dní rekonvalescence bylo zahájeno každodenní měření bazálních hodnot krevního tlaku (Husková et al. 2010).

Zvířata byla náhodně rozdělena do následujících experimentálních skupin:

1. Neindukovaní neléčení potkani (n = 8)
2. Neindukovaní + *c*-AUCB potkani (13 mg/l, n = 6)
3. Neindukovaní + *c*-AUCB potkani (26 mg/l, n = 6)
4. I3C-indukovaní neléčení potkani (n = 8)
5. I3C-indukovaní + *c*-AUCB potkani (13 mg/l, n = 8)
6. I3C-indukovaní + *c*-AUCB potkani (26 mg/l, n = 8)

Bazální hodnoty krevního tlaku byly měřeny nepřetržitě po dobu 7 dnů (den 1-7). Podávání inhibitoru *c*-AUCB bylo zahájeno 48 hodin před přechodem na dietu bez obsahu I3C nebo

s obsahem 0,3 % I3C (den 5). Dietou s obsahem I3C byla indukována hypertenze po dobu 12 dnů (den 7-18). Implantovaná zvířata s telemetrickými sondami byla umístěna do metabolických klecí před a po podání inhibitoru a diety (dny 4, 9, 14 a 18) abychom vyhodnotili denní vylučování sodíku a proteinurii (Vaněčková et al. 2007; Husková et al. 2010).

V jiné sérii Cyp1a1-Ren-2 potkanů bez telemetrie (n = 6 v každé experimentální skupině) se sbírala moč, abychom srovnali renální exkreční parametry intaktních zvířat s potkany, jež při chirurgické intervenci byli katetrizováni telemetrickými sondami.

Na konci pokusu byli všichni potkani dekapitováni pro získání vzorků krve a ledvin pro další analýzy.

3.3.2.2 Stanovení hodnot ANG II, EETs, DHETs, c-AUCB v plasmě a ledvině

Hodnoty ANG II v plasmě a ledvině byly měřeny radioimunologicky použitím komerčně používaného kitu (Euro-Diagnostika Co., Malmö, Švédsko) (Kopkan et al. 2005; Vaňourková et al. 2006; Husková et al. 2010). Bezprostředně po dekapitaci byla do předchlazené (4 °C) zkumavky s inhibitory (5 mmol/l EDTA, 10 µmol/l pepstatin, 1,25 mmol/l 1,10-phenanthrolin) sbírána plná krev. Ledviny byly okamžitě odříznuty, osušeny a zváženy. Jedna ledvina na stanovení ANG II byla homogenizována v předchlazeném metanolu. Vzorky krve i homogenáty z ledvin byly centrifugovány po dobu 10 minut při 3 000 x g a 4°C. Po odstředění krve byla oddělena plasma, která byla následně vysrážena v předchlazeném (4 °C) etanolu a vše bylo zcentrifugováno při 3 000 x g, 4 °C, po dobu 10 minut. Supernatanty ze vzorků krve i ledvin byly vysušeny ve vakuové centrifuze (Speedvac concentrator SPD101B, Savant Instruments, New York, USA) a uchovány při -80 °C před vlastním stanovením koncentrací ANG II.

Hodnoty metabolitů kyseliny arachidonové, EETs a DHETs, byly měřeny v kůře druhé ledviny. Vzorky byly extrahovány a analyzovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC – MS/MS) (Imig et al. 2005; Huang et al. 2007).

3.3.2.3 Stanovení CYP2C23 epoxygenázy a sEH v ledvinné kůře a dřeni

Expres proteinu CYP2C23 epoxygenázy a sEH v ledvinné kůře a dřeni byla stanovena imunoblotovou analýzou (Zhao et al. 2004; Ai et al. 2007; Huang et al. 2007). Detekce byla dokončena zvýrazňující chemiluminiscencí pomocí Western blotu (ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Bloty byly následně prohlédnuty luminiscenčním analyzátozem (LAS-

3000, FUJI PHOTO FILM CO, Tokyo, Japonsko). Proužková intenzita byla změřena denzitometricky a hodnoty byly normalizovány pro β -actin.

3.3.2.4 Stanovení plasmatické reninové aktivity a koncentrace nitrátů/nitritů v moči

Oddělená frakce plasmy byla podrobena chemické analýze na stanovení plasmatické reninové aktivity pomocí nepřímé radioimunoanalýzy (REN-CT2, CIS bio international, Francie). Výsledky byly vyjádřeny jako ng/ml/hod z vytvořeného ANG I (Véniant et al. 1995; Campbell et al. 2009). V moči byly měřeny koncentrace nitrátů/nitritů (NO_x) kolometricky (Assay design, Ann Arbor, MI, USA) (Kopkan and Majid, 2005).

3.3.3 Protokol č. 2:

3.3.3.1 Renální clearancové studie ke stanovení renální hemodynamiky

Cyp1a1-Ren-2 potkani bez telemetrických sond byli náhodně rozděleni do experimentálních skupin:

1. Neindukovaní neléčení potkani (n = 8)
2. Neindukovaní + c-AUCB potkani (26 mg/l, n = 9)
3. I3C-indukovaní neléčení potkani (n = 9)
4. I3C-indukovaní + c-AUCB potkani (26 mg/l, n = 9)

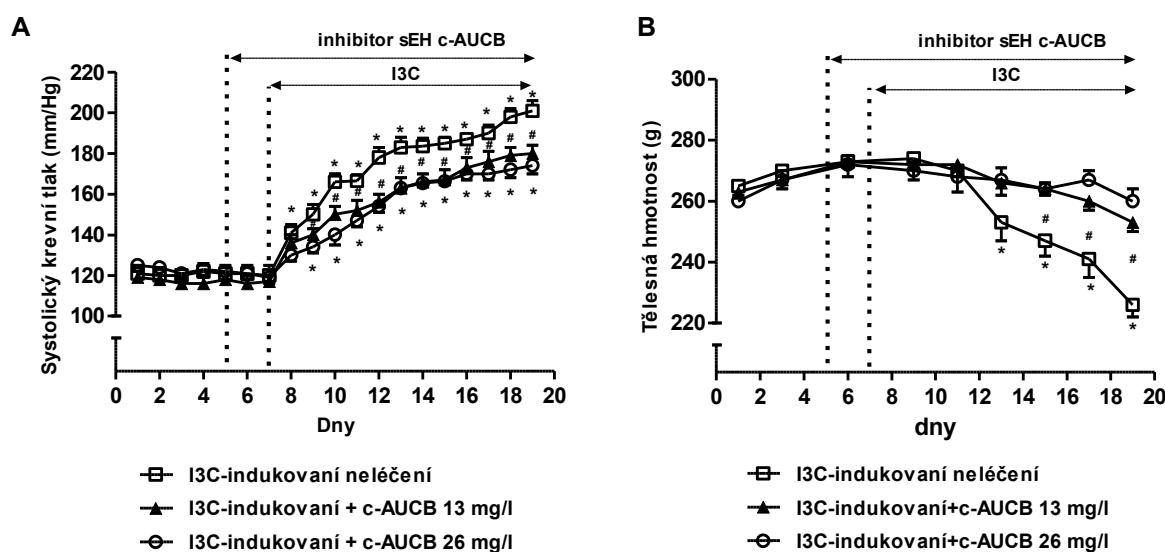
Potkani byli vystaveni vyšší dávce inhibitoru sEH po dobu 13 dní a podávání diety s obsahem 0,3 % I3C po dobu 11 dní. Po skončení léčby byli potkani anestetizováni thiopentalem sodným (60 mg/l, intraperitoneálně) a umístěni na termoregulační stolek pro udržení tělesné teploty 37 - 37,5 °C. K udržení volných dýchacích cest byla provedena tracheostomie a zevní konec tracheostomické kanyly vložen do komůrky, do které byla kontinuálně přiváděna zvlhčená směs 95%O₂/5% CO₂ pro zlepšení stability arteriálního tlaku u anestetizovaných zvířat (Kopkan et al. 2005; Mitchell et al. 2006). Pravá jugulární žíla byla zakanylována kanylou PE-50 k aplikaci infuzních roztoků a případnému přidávání anestetika. Další kanyla byla umístěna do pravé femorální arterie a sloužila ke kontinuální monitoraci arteriálního tlaku a odběrům krve. Střední arteriální tlak (SAT) byl monitorován tlakovým převaděčem (model MLT 1050) a ukládán do počítače pomocí systému na sběr dat (PowerLAB/4SP,

ADInstruments, UK). Po suprapubické incizi byl vybaven močový měchýř, který byl tupou preparací uvolněn před břišní stěnu a byl do něj zaveden katetr na sbírání moče. V průběhu chirurgického výkonu jsme podávali fyziologický roztok obsahující 6 % bovinní sérový albumin (BSA, Sigma Chemical Co., Praha, ČR) rychlostí 20 μ l/min. Po skončení výkonu byl infundován fyziologický roztok obsahující 0,6 % BSA, 1,5 % kyselinu paraaminohippurovou (PAH, Merck, Sharp & Dohme, West point, PA, USA) a 7,5 % polyfruktosan (Inutest, Laevosan, Linz/Donau, Rakousko) taktéž stejnou rychlostí. Následovala ekvilibrační perioda trvající jednu hodinu, umožňující zvířeti dosáhnout stabilizovaného stavu. Poté probíhaly dva 30-ti minutové experimentální intervaly, ve kterých byla sbírána moč a odebrána krev na hodnocení průtoku plasmy ledvinou, clearance a vylučování sodíku.

3.3.4 Výsledky

3.3.4.1 Krevní tlak a exkreační funkce ledvin

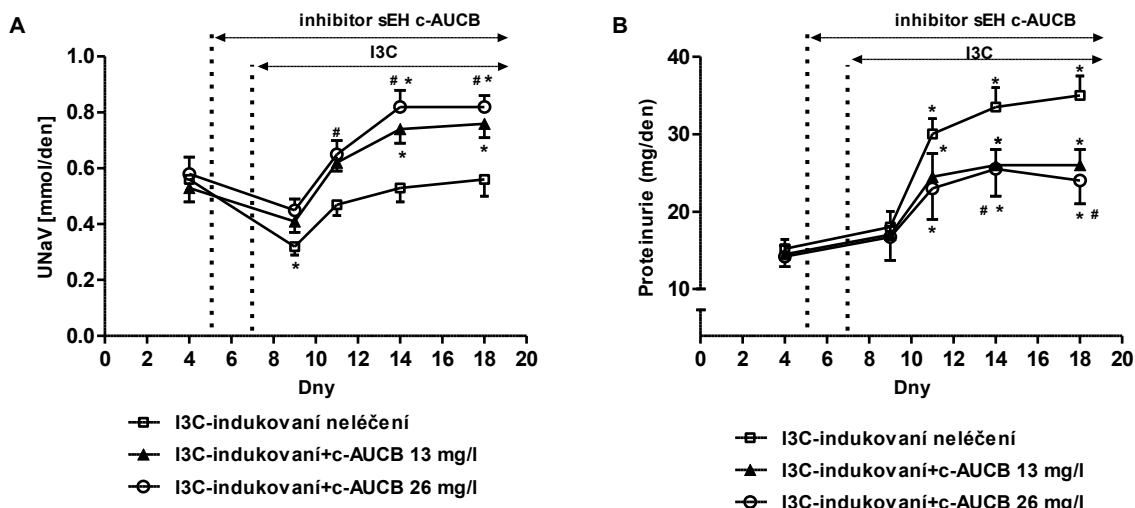
Krevní tlak u radiotelemetrického měření během experimentu zůstal u neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů v normotenzním rozmezí (na začátku experimentu 124 ± 6 a na konci experimentu 126 ± 7 mm Hg). Léčba inhibítorem sEH v dávkách 13 a 26 mg/l u těchto neindukovaných normotenzních zvířat neovlivnila systolický krevní tlak (SKT) (123 ± 4 na 121 ± 3 při dávce 13 mg/l a 119 ± 5 na 118 ± 4 mm Hg při dávce 26 mg/l). Podání diety s obsahem 0,3 % I3C vedlo k výrazné hypertenzi (graf 1A) a signifikantní ztrátě tělesné hmotnosti (graf 1B). Tito potkani vykazovali také další známky maligní hypertenze jako polyurii, polydypsii, nahrbený postoj a piloerекci. Nebyl u nich pozorován zvýšený příjem potravy ve srovnání s neindukovanými potkany ($9,3 \pm 1,1$ vs. $11,7 \pm 1,5$ g/den). U skupiny I3C-indukovaných potkanů, kteří byli léčeni inhibítorem c-AUCB s dávkou 13 nebo 26 mg/l, byl rozvoj hypertenze signifikantně snížen (graf 1A), stejně tak ztráta hmotnosti byla výrazně zmenšena (graf 1B) včetně ostatních příznaků maligní hypertenze. Exkrece sodíku (U_{NaV}) a proteinurie byla stanovena ze sběru moče za 24 hod z metabolických klecí před a během léčby. Exkrece sodíku u neindukovaných neléčených potkanů ($0,6 \pm 0,045$ mmol/den)



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

nebyla signifikantně odlišná ve srovnání se skupinou neindukovaných léčených c-AUCB (13 a 26 mg/l) potkanů ($0,59 \pm 0,055$ mmol/den při dávce 13 mg/l a $0,645 \pm 0,05$ mmol/den při dávce 26 mg/l).

Podání I3C vedlo u I3C-indukovaných neléčených potkanů k významnému snížení U_{NaV} v 9. dni pokusu, t. j. 2 dny po podání induktoru, a následně se exkrece sodíku vrátila k normě (graf 2A). c-AUCB léčba zvýšila u I3C-indukovaných potkanů U_{NaV} již po dvou dnech podávání (den pokusu 9) a dále 11. 14. a 18. den experimentu ve srovnání s neléčenými zvířaty (graf 2A). Obě dávky c-AUCB změnily U_{NaV} v podobném rozsahu. U neindukovaných neléčených potkanů se objevila nepatrná proteinurie ($15,45 \pm 1,05$ mg/den), léčba s c-AUCB s dávkou 13 a 26 mg/l nezpůsobila žádné změny ($14,8 \pm 1,4$ mg/den při dávce 13 mg/l a $14,45 \pm 1,2$ mg/den při dávce 26 mg/l). Inhibitor c-AUCB však signifikantně zmírnil značnou proteinurii u potkanů krměných I3C (graf 2B), což poukazuje na renoprotektivní účinky inhibice sEH u hypertenzních transgenních potkanů.



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

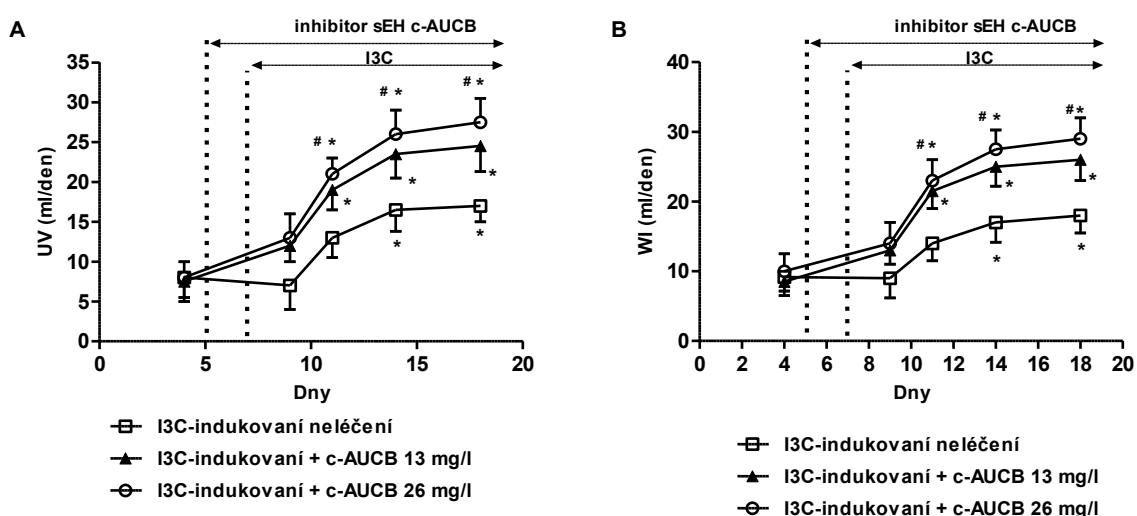
Denní diuréza (urine volume, UV) a příjem vody (water intake, WI) se v průběhu experimentu u neindukovaných a neléčených zvířat nezměnila. Léčba s c-AUCB signifikantně neovlivnila UV u neindukovaných zvířat, i když určitý rostoucí trend je zde vidět (tabulka 1). Graf 3A ukazuje změny v UV a graf 3B změny ve WI u I3C-indukovaných neléčených a léčených zvířat. I3C-indukování potkani vykazovali signifikantní zvýšení UV a WI, které se ještě zvýraznilo během podávání c-AUCB léčby 11., 14. a 18. den pokusu.

Tabulka č. 1: Tělesná hmotnost (BW), exkrece sodíku (U_{NaV}), denní diuréza (UV), nitráty/nitrity (UNO_{xV}) a plasmatická reninová aktivita (PRA) na konci experimentálního protokolu u intaktních Cyp1a1-Ren-2 potkanů (bez telemetrie).

Skupina	n	BW (g)	U_{NaV} (mmol/den)	UV (ml/den)	UNO_{xV} (μ mol/den)	PRA (ANG I ng/ml/hod)
Neindukování neléčení	6	284 \pm 5	0.64 \pm 0.05	7.8 \pm 1.6	3.6 \pm 0.2	26.8 \pm 5.3
Neindukování + c-AUCB 13 mg/l	6	278 \pm 4	0.69 \pm 0.04	8.2 \pm 1.4	3.2 \pm 0.1	42.8 \pm 8.1
Neindukování + c-AUCB 26 mg/l	6	281 \pm 5	0.72 \pm 0.06	8.5 \pm 1.7	3.9 \pm 0.2	44.1 \pm 11.6
I3C-indukování neléčení	6	232 \pm 3*	0.58 \pm 0.06	17.6 \pm 2.4*	2.1 \pm 0.2*	98.2 \pm 14.3*
I3C-indukování + c-AUCB 13 mg/l	6	249 \pm 4*#	0.79 \pm 0.04#	24.4 \pm 2.7*#	2.4 \pm 0.1*	106.8 \pm 16.3*
I3C-indukování + c-AUCB 26 mg/l	6	258 \pm 5*#	0.85 \pm 0.05#	26.7 \pm 2.9*#	2.6 \pm 0.3*	132.8 \pm 18.7*

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

V jiné sérii pokusů u intaktních Cyp1a1-Ren-2 potkanů bez telemetrie byly bazální hodnoty i dané změny ve BW, U_{NaV} , UV, WI během podávání I3C a léčby c-AUCB velmi podobné těm, které jsme viděli u chronicky katetrizovaných zvířat s telemetrickými sondami. To nás ujistilo v tom, že funkční odpovědi potkanů během experimentu nemohou být způsobené chirurgií a chronickou přítomností sond. Tabulka 1 sumarizuje rozdíly mezi jednotlivými skupinami na konci experimentu. Dále se ukázalo, že léčba c-AUCB neovlivňuje signifikantně nižší hodnoty exkrece NOx u I3C-indukovaných zvířat. Rovněž tak na zvýšení hodnot PRA neměla léčba s c-AUCB žádný vliv u I3C-indukovaných zvířat (tabulka 1).



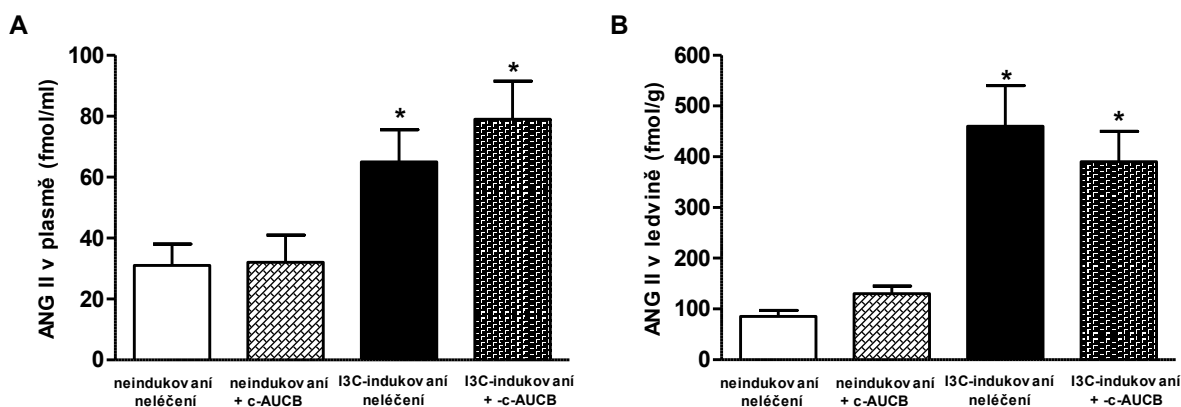
Graf č. 3: Průběh denní diurézy (UV) (A) a příjmu vody (water intake, WI) (B) u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů a efekt inhibitoru sEH pomocí c-AUCB (13 a 26 mg/l) (n = 8 v každé skupině).

* $p < 0,05$ vs. bazální hodnoty, # $p < 0,05$ vs. I3C-indukování neléčení potkani.

3.3.4.2 Koncentrace ANG II, hodnoty EETs, DHETs a proteinová exprese epoxygenázy a sEH

Na konci experimentálního protokolu byly stanoveny hodnoty ANG II v plasmě a kůře ledvin. (graf 4). Podání I3C vedlo k signifikantnímu nárůstu hodnot ANG II v plasmě i kůře ledvin ve srovnání s neindukovanými skupinami, což potvrzuje fakt, že tento model reprezentuje ANG II-dependentní formu hypertenze. Léčba inhibítorem c-AUCB neměla žádný vliv na hodnoty ANG II v plasmě a tkáni ledvin jak u neindukovaných, tak I3C-indukovaných potkanů. Ačkoli podání I3C neovlivnilo hodnoty EETs, léčba inhibítorem sEH c-AUCB zvýšila koncentrace EETs v kůře ledvin u neindukovaných i I3C-indukovaných skupin (graf 5A). DHETs, produkty degradace EETs, byly signifikantně vyšší u skupin I3C-indukovaných

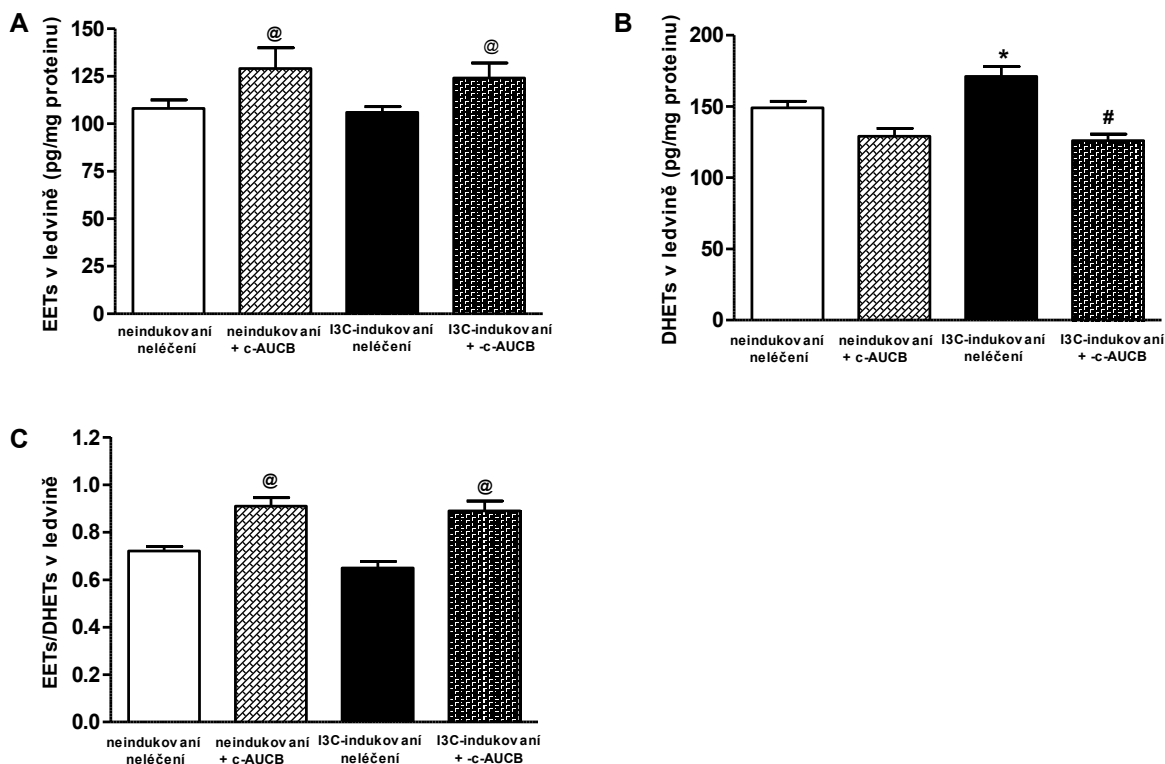
neléčených potkanů než neindukovaných skupin (graf 5B). Inhibice sEH nezměnila koncentrace DHETs u neindukovaných potkanů, ale výrazně snížila hodnoty DHETs u I3C-indukovaných potkanů. Výrazně zvýšený poměr EETs/DHETs u I3C-indukovaných i neindukovaných zvířat léčených c-AUCB ukazuje účinnost inhibitoru sEH (graf 5C). Imunoblot analýza neprokázala žádné změny v expresi proteinu CYP2C23 a sEH v ledvině kůře a dřeni mezi jednotlivými skupinami (obrázek 8). Analyzovaná data zobrazuje tabulka 2. Podobných výsledků jsme dosáhli při stanovení proteinové exprese CYP2C11 epoxygenázy. V této studii data ukazují, že jak podání I3C, tak léčba pomocí c-AUCB neovlivňuje expresi epoxygenázových enzymů.



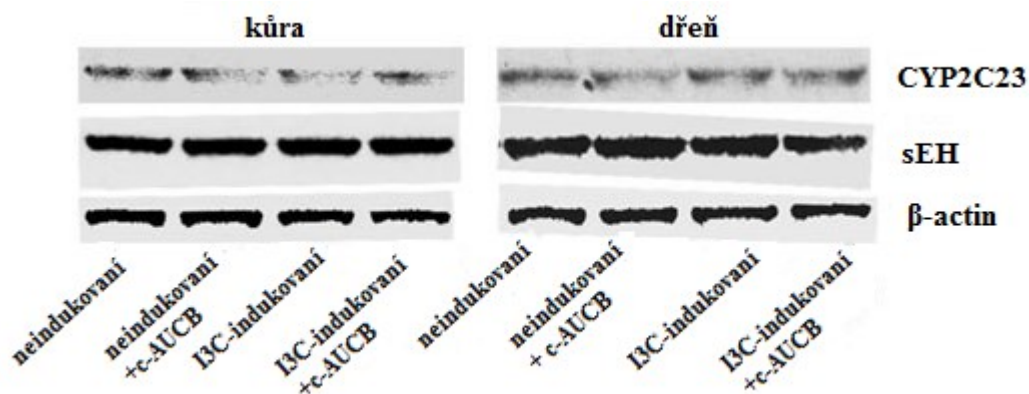
Graf č. 4: Hodnoty ANG II v plasmě (A) a kůře ledvin (B) na konci experimentu u Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 6-8). *p < 0,05 vs. neindukované skupiny.

3.3.4.3 Hemodynamika ledvin

V jiné sérii pokusů byly na konci stejného experimentálního protokolu provedeny renální clearancové pokusy v anestézii. Jelikož obě dávky c-AUCB vykazovaly podobné odpovědi v chronické studii, byla použita pouze vyšší dávka inhibitoru (26 mg/l) pro určení středního arteriálního tlaku (SAT) a renálních funkčních parametrů u neindukovaných a I3C-indukovaných potkanů. Léčba inhibitorem c-AUCB signifikantně neovlivnila žádný parametr ledvin u neindukovaných zvířat (graf 6 a 7). U I3C-indukovaných zvířat však léčba inhibitorem c-AUCB signifikantně zmírnila rozvoj hypertenze (graf 6A) a normalizovala průtok plasmy ledvinou (PPL) (graf 6B), který byl po dietě s I3C značně zmenšen. Jak je vidět z grafu 7A, glomerulární filtrace zůstala nezměněna u všech skupin. Avšak u I3C-indukovaných potkanů vykazovala c-AUCB léčba vyšší vylučování sodíku než u neléčených potkanů (graf 7B).



Graf č. 5: Hodnoty epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) (A) a dihydroxyeikosatrienových kyselin (DHETs) (B) v kůře ledvin na konci experimentu u Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 6-8) a EETs/DHETs poměr (C), jako indikátor účinnosti léčby c-AUCB. [@]p < 0,05 vs. neléčené skupiny; ^{*}p < 0,05 vs. neindukované skupiny; [#]p < 0,05 vs. I3C-indukování neléčení potkanů.



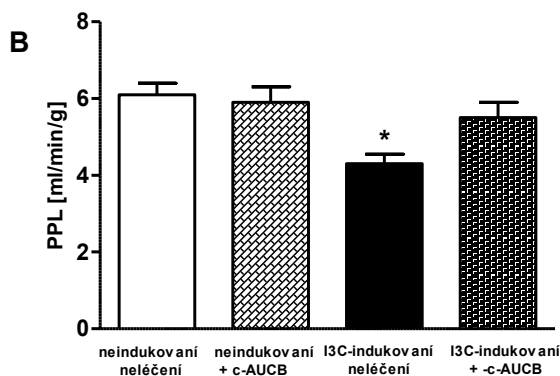
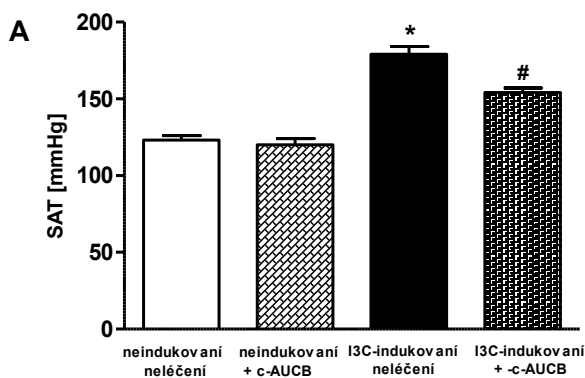
Obrázek č. 8: Proteinová exprese epoxygenázy CYP2C23 a solubilní epoxid hydrolázy (sEH) v ledvině kůře a dřeni na konci experimentálního protokolu Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Mezi skupinami nejsou signifikantní rozdíly.

Tabulka č. 2: Proteinová exprese epoxygenázy CYP2C23 a solubilní epoxid hydrolázy (sEH) v ledvinné kůře a dřeni na konci experimentálního protokolu Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Mezi skupinami nejsou signifikantní rozdíly.

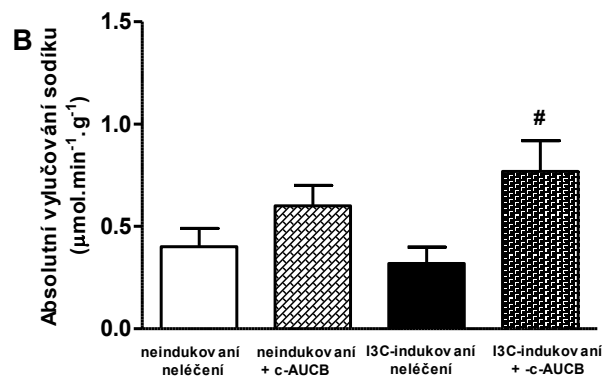
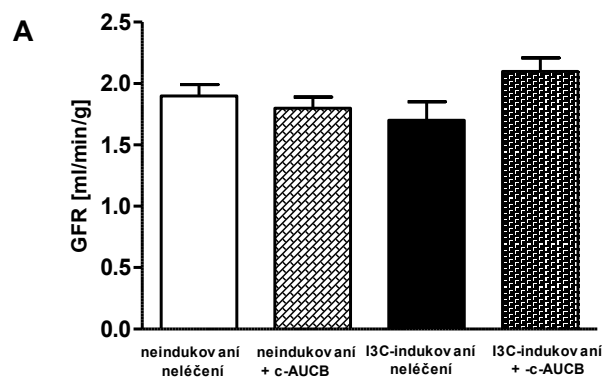
Skupina	n	Poměr protein/ β -aktin			
		CYP2C23 kůra	CYP2C11 dřeh	sEH kůra	sEH dřeh
Neindukovaní neléčení	8	1.13 \pm 0.16	1.04 \pm 0.11	0.99 \pm 0.18	0.89 \pm 0.14
Neindukovaní + c-AUCB	8	1.08 \pm 0.19	1.05 \pm 0.13	0.97 \pm 0.20	0.90 \pm 0.15
I3C-indukovaní neléčení	9	1.14 \pm 0.23	1.04 \pm 0.19	1.06 \pm 0.22	0.99 \pm 0.17
I3C-indukovaní + c-AUCB	9	1.17 \pm 0.19	1.07 \pm 0.20	1.04 \pm 0.19	1.01 \pm 0.16

3.3.5 Diskuze

Léčba inhibítorem sEH, hlavního enzymu katalyzující degradaci EETs na biologicky neaktivní DHETs (Imig, 2005; Capdevila et al. 2007; Inceoglu et al. 2007), se ukázala být účinnou ve snižování krevního tlaku u několika modelů hypertenze, včetně ANG II indukované hypertenze (Imig et al. 2005; Jung et al. 2005; Huang et al. 2007; Loch et al. 2007). Tato studie ukazuje, že orální podávání nového inhibítora sEH c-AUCB signifikantně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Významnější je však to, že tato studie prokázala vliv inhibice sEH na renální hemodynamiku a exkreční funkce iTGR. Inhibitor c-AUCB zlepšuje reální funkce a signifikantně chrání ledviny snížením proteinurie. Tato data jasně ukazují, že antihypertenzní efekt léčby c-AUCB u Cyp1a1-Ren-2 potkanů je alespoň z části způsoben popisovanými renálními mechanismy. Naše výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi u ANG II infundovaných potkanů a myší (Zhao et al. 2004; Imig et al. 2005; Jung et al. 2005). Vysoká účinnost inhibítora sEH c-AUCB může být připsána jeho lepším farmakokinetickým vlastnostem, především jeho možnosti podávání v pitné vodě a snadné rozpustitelnosti (Hwang et al. 2007). Tak může být c-AUCB použit v relativně malém množství, které přitom odpovídá dávce s maximálním farmakologickým účinkem. Zdvojnásobení dávky neprokázalo žádný další efekt u potkanů bez telemetrie, avšak došlo k ovlivnění renálních exkrečních parametrů u potkanů s telemetrií. Proto jsme dále pro renální clearancové pokusy a pro stanovení koncentrace ANG II, hodnot EETs, DHETs použili dvojnásobnou dávku c-AUCB. Je také důležité zmínit, že c-AUCB léčba neovlivnila krevní tlak ani renální exkreční parametry u normotenzních neindukovaných potkanů.



Graf č. 6: Střední arteriální tlak (SAT) (A) a průtok plasmy ledvinou (PPL) (B) u anestetizovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 8-9). *p < 0,05 vs. neindukované skupiny, #p < 0,05 vs. I3C-indukovaní neléčení potkani.



Graf č. 7: Glomerulární filtrace (GFR) (A) a absolutní vylučování sodíku (B) u anestetizovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů vystavených účinkům I3C a c-AUCB (n = 8-9). #p < 0,05 vs. I3C-indukovaní neléčení potkani.

V předchozí studii (Vaňourková et al. 2006) jsme ukázali, že rychlý rozvoj maligní hypertenze je spojen se zvýšením plasmatických koncentrací ANG II již během 24 hodin a progresivním nárůstem koncentrace ANG II ve tkáních během dlouhodobého podávání I3C. V této studii I3C způsobil značné zvýšení RAS aktivity (renin a ANG II). c-AUCB léčba však nezměnila aktivitu RAS v plasmě ani ledvině, a přesto došlo ke změně tlaku a natriurézy. Pravděpodobně to může být způsobeno zvýšením biologické dostupnosti epoxy lipidů, především EETs. Ačkoli se zdají být absolutní změny v renálním metabolismu EETs relativně malé, je možné, že i tak malé změny v hodnotách EETs nebo jiných epoxy lipidů mohou významně měnit renální funkce (Imig et al. 2005; Jung et al. 2005; Čertíková Chábová et al. 2007; Huang et al. 2007). Naše data mohou být také vysvětlena rychlým obratem EETs, který neumožňuje jejich dlouhodobé hromadění v ledvině. Absolutní množství tedy není zvýšené tolik, jako celkový obrat. To je v souladu s předchozími studiemi, kde zvýšené koncentrace DHETs u hypertenzních I3C-indukovaných potkanů poukazovaly na vyšší

degradaci EETs ve srovnání s normotenzními neindukovanými potkany. Proto je lepší za indikátor účinnosti inhibitoru sEH považovat poměr epoxidů/diolů než samotné hodnoty EETs (Zhao et al. 2004; Imig et al. 2005; Hwang et al. 2007). Zvýšený poměr EETs/DHETs tak v naší studii prokázal signifikantní účinnost c-AUCB inhibovat enzym sEH a snížit tak degradaci EETs.

Neschopnost zvýšit hodnoty EETs může přispívat k patogenezi hypertenze (Yu et al. 2000; Zhao et al. 2004; Capdevila et al. 2007; Manhiani et al. 2009). V naší studii jsme také zjistili, že na konci experimentu byly hodnoty EETs v kůře ledvin neměnné u I3C-indukovaných potkanů stejně tak jako u neindukovaných normotenzních potkanů, hodnoty EETs se tedy nemohou zvýšit, když exprese epoxygenázy zůstala beze změn. Naše data tak naznačují relativní nedostatek EETs během endogenní produkce ANG II (Zhao et al. 2004).

Nejvyšší aktivita sEH byla prokázána v játrech a ledvinách, což ještě více podporuje možnost jejího místního působení. Podávání exogenního ANG II způsobuje up-regulaci endoteliální sEH (Zhao et al. 2004; Ai et al. 2007), což může dále snížit místní dostupnost EETs. I když v této studii nebyla exprese proteinu sEH v ledvině signifikantně rozdílná mezi I3C-indukovanými a neindukovanými potkany, pravděpodobně byla zvýšená katalytická aktivita sEH (Imig, 2006; Ai et al. 2007), což vedlo k následnému vzestupu hodnot DHETs v ledvině u I3C-indukovaných hypertenzních potkanů.

Interakce oxidu dusnatého (NO) a eikosanoidů je jedním z předpokládaných mechanismů účinku EETs (Oyekan et al. 1999; Jiang et al. 2007; Hercule et al. 2009) a její zkoumání je i jedním z cílů této dizertační práce. Proto jsme stanovili exkreci NO_x močí jako endogenního ukazatele metabolismu NO a jeho aktivity. U I3C-indukovaných potkanů jsme zjistili sníženou koncentraci NO_x v moči poukazující na snížení produkce NO během rozvoje maligní hypertenze. Léčba c-AUCB s dávkou 13 a 26 mg/l signifikantně nezměnila exkreci NO_x v moči u I3C-indukovaných ani neindukovaných potkanů. Výsledky tak ukazují, že antihypertenzní a natriuretické účinky c-AUCB nemůžeme připisovat zvýšeným hladinám NO. Tato data tak nepodpořila tvrzení o pozitivní vzájemné interakci EETs a NO (Hercule et al. 2009). Je však možné, že uvolnění NO mohou způsobovat DHETs, které jsou díky c-AUCB léčbě sníženy. Tato studie však poskytuje jen mechanický pohled na tuto interakci. Proto bude potřeba provést více experimentů, abychom byli o tomto tvrzení přesvědčeni. Cyp1a1-Ren-2 potkani vystavení dietě s obsahem I3C vykazují těžkou hypertenzi spojenou s proteinurií (Kantachavesiri et al. 2001; Mitchell et al. 2006; Ortiz et al. 2007), což můžeme v této studii jenom potvrdit. Navzdory zvýšenému ANG II u těchto potkanů, obě dávky c-AUCB signifikantně zmírnily proteinurii v podobném rozsahu, což poukazuje na

renoprotektivní účinky blokátoru sEH (Imig et al. 2005; Jung et al. 2005; Huang et al. 2007; Hwang et al. 2007). Renoprotektivní účinky inhibitoru sEH byly potvrzeny také ve studii na spontánně hypertenzních obézních potkanech, u kterých došlo působením inhibitoru sEH k významnému snížení albuminurie a progresivní glomerulosklerózy (Imig et al. 2012). Navíc c-AUCB léčba zabránila počáteční retenci sodíku, která byla pozorována u I3C-indukovaných neléčených potkanů. Následně u stejných zvířat zlepšila natriurézu ve dni 14 a 18. Tím naše data podporují názor, že EETs nezasahují jenom do regulace vaskulárního tonu, ale ovlivňují přímo tubulární transport sodíku v ledvinách (Capdevila et al. 2007; Imig 2009). Tento účinek je lokalizován do proximálního tubulu, kde EETs regulují tubulární transport sodíku díky inhibici Na^+/H^+ výměníku na apikální membráně tubulárních buněk (Roman, 2002; Dos Santos et al. 2004; Imig, 2005). Ve sběrných kanálcích ledvin působí EETs také jako inhibitor Na^+ , K^+ -ATPázy a k amiloridu senzitivnímu transportu sodíku (Wei et al. 2004; Sun et al. 2006). V souladu s tím jsme zjistili větší natriurézu a diurézu u I3C-indukovaných potkanů léčených c-AUCB, což může přispívat k antihypertenznímu účinku. Navíc zde byl mírný, i když ne signifikantní, vzestup natriurézy a diurézy u neindukovaných zvířat. Zvýšená citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby způsobená aktivitou ANG II byla popsána u Cyp1a1-Ren-2 potkanů (Mitchell & Mullins, 2005) i přes udržovanou glomerulární filtraci. Naše práce ukázala, že EETs vykazují přímý tubulární účinek při léčbě c-AUCB, ale nemají znatelný efekt na glomerulární filtraci. Proto můžeme pouze spekulovat o tom, zda zvýšené hodnoty EETs během léčby c-AUCB mohou modulovat tubuloglomerulární zpětnou vazbu u Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Navzdory tomu lze potvrdit, že zvýšení biologické dostupnosti EETs v ledvině pomocí inhibice sEH zlepšuje renální hemodynamiku a renální funkce u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a tak může signifikantně zmenšovat rozvoj maligní hypertenze u tohoto modelu.

Renální clearancové studie potvrdily výskyt renální vazokonstrikce u Cyp1a1-Ren-2 potkanů (Mitchell et al. 2006). c-AUCB léčba snížila arteriální tlak a normalizovala průtok plasmy ledvinou u I3C-indukovaných potkanů. Ačkoli zde nebyl žádný signifikantní efekt na glomerulární filtraci, exkrece sodíku byla vyšší u c-AUCB léčených potkanů vystavených působení I3C ve srovnání s neléčenými zvířaty. To dále podporuje názor, že inhibice sEH působí na přímý tubulární transport bez velkého vlivu na filtrované množství sodíku. Pokud tedy předpokládáme inhibici přímého tubulárního transportu sodíku pomocí EETs (Wei et al. 2004; Sun et al. 2006), je potom myslitelné tvrdit, že objevené natriuretické účinky v této studii jsou modulovány zvýšenou biologickou dostupností EETs v ledvině během inhibice sEH. Celkově tedy naše data demonstrují, že sledované renální mechanismy mohou

signifikantně přispívat k antihypertenzním účinkům inhibitoru sEH u Cyp1a1-Ren-2 potkanů s indukovanou maligní hypertenzí.

3.3.6 Závěr

Naše výsledky ukazují, že výrazné zvýšení endogenních hodnot EETs způsobené inhibicí sEH, signifikantně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů především zlepšením hemodynamiky ledvin a zvýšeným vylučováním sodíku. Tyto sledované antihypertenzní a renoprotektivní účinky inhibitoru sEH c-AUCB poskytují přesvědčivý důkaz o možnosti nového přístupu v antihypertenzní terapii.

3.4 Inhibice solubilní epoxid hydrolázy zlepšuje zhoršenou tlakovou natriurézu a zmírní rozvoj hypertenze a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů

3.4.1. Cíl práce

1. Charakterizovat účinek chronické léčby nového inhibitoru sEH (c-AUCB) na autoregulaci renální hemodynamiky, tlakovou natriurézu a rozvoj hypertenzí vyvolané srdeční hypertrofií u Cyp1a1-Ren-2 potkanů s indukovanou hypertenzí.
2. Srovnání účinku chronické blokády AT₁ receptorů a chronické inhibice sEH na krevní tlak, renální funkce a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u tohoto modelu ANG II-dependentní formy maligní hypertenze.

3.4.2. Protokoly

3.4.2.1 Série č. 1: Odpověď glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou a vylučování sodíku ledvinou při snižování renálního arteriálního tlaku

V předešlých studiích jsme zjistili, že po podání 0,3 % I3C v dietě po dobu jedenácti dní vznikne u Cyp1a1-Ren-2 maligní hypertenze. Byla použita stejná dávka (26 mg/l) i stejný léčebný protokol pomocí c-AUCB jako v minulé studii (Honetschlägerová et al. 2011a). Zvířata, která byla vystavena účinkům blokády AT₁ receptoru, dostávala losartan v pitné vodě (100 mg/l, Lozap, Zentiva, Praha, Česká republika). Předchozí studie prokázaly, že tato dávka zabrání rozvoji hypertenze u tohoto modelu potkanů (Erbanová et al. 2009; Williams et al. 2010). Vlastní den experimentu (11 dní po indukci reninového genu) byli potkani připraveni na akutní renální funkční studii:

Potkani byli anestetizováni thiopentalem sodným (60 mg/l, intraperitoneálně) a umístěni na termoregulační stolek pro udržení tělesné teploty 37 - 37,5 °C. K udržení volných dýchacích cest byla provedena tracheostomie a zevní konec tracheostomické kanyly velikosti PE-240 byl vložen do komůrky, do které byla kontinuálně přiváděna zvlhčená směs 95 % O₂/ 5 % CO₂ pro zlepšení stability arteriálního tlaku u anestetizovaných zvířat (Kopkan et al. 2005; Mitchell et al. 2006).

Pravá jugulární žíla byla zakanylována kanylou PE-50 k aplikaci infuzních roztoků a případnému přidávání anestetika. Levá femorální arterie byla katetrizována kanylou PE-50,

kteřá umožňovala kontinuální monitoraci arteriálního tlaku a odběry krve. Střední arteriální tlak (SAT) byl monitorován tlakovým převaděčem (model MLT 1050) a ukládán do počítače pomocí komputelizovaného systému sběru dat (PowerLAB/4SP, ADInstruments, UK).

Levou ledvinu jsme zpřístupnili bočním řezem, izolovali od okolní tkáně a umístili do plexisklové komůrky. Kanylace levého ureteru byla provedena kanylou velikosti PE-10 pro sběr moče z izolované ledviny.

Aortální svorka byla umístěna na aortu nad odstupem renální arterie pro následnou regulaci renálního arteriálního tlaku (RAT).

Na renální arterii byla umístěna ultrazvuková sonda (1RB, Transonic Systems, Altron Medical Electronic GmbH, Německo), která měřila průtok krve ledvinou, jež byl zaznamenáván do počítače.

V průběhu chirurgie jsme podávali fyziologický roztok obsahující 6 % bovinní sérový albumin (BSA, Sigma Chemical Co., Praha, ČR) rychlostí 40 μ l/min. Po skončení chirurgie byl infundován fyziologický roztok obsahující 1 % BSA a 7,5 % polyfruktosan inulin (Inutest, Laevosan, Linz/Donau, Rakousko) taktéž stejnou rychlostí.

Následovala ekvilibrační perioda trvající 50 minut, umožňující zvířeti dosáhnout stabilizovaného stavu před započítáním jedné 30-ti minutové kontrolní periody při fyziologické hodnotě RAT. U skupin, u kterých byl použit jen kontrolní protokol, následovaly ještě další 3 kontrolní periody se sběrem moče při fyziologickém RAT. U skupin, u kterých byl použit experimentální protokol, následovaly další tři periody se sběrem moče při redukcích renálního tlaku na hodnoty 120, 100 a 85 mm Hg. Po každé redukci renálního tlaku následovala pětiminutová ekvilibrace. Odběr krve byl proveden po druhé a čtvrté periodě na stanovení hodnot glomerulární filtrace a vylučování sodíku.

Objem moče byl měřen gravimetricky a koncentrace sodíku v moči plamenovou fotometrií. Polyfruktosan a inulin v moči a plasmě byl měřen kolorimetricky. Clearance inulinu byla použita jako odhad glomerulární filtrace. Hodnoty byly přepočteny na gram váhy ledviny. Frakční exkrece sodíku byla vypočítána podle standardního vzorce. Autoregulační index (AI) průtoku krve ledvinou byl vypočten metodou Sempla a Wardenera (Semple, Wardener, 1959) pomocí vzorce: $AI = [(RBF2 - RBF1)/RBF1] / [(RAP2 - RAP1)/RAP1]$. Stejný vzorec byl použit i pro stanovení AI glomerulární filtrace. Hodnota nula u AI značí ideální autoregulaci, hodnoty jakkoli vyšší naopak zhoršenou autoregulaci ledvin.

Transgenní potkani byli rozděleni do následujících skupin:

1. Neindukovaní neléčení potkani + kontrolní protokol (n = 6)
2. Neindukovaní neléčení potkani + experimentální protokol (n = 13)
3. Neindukovaní potkani léčení c-AUCB + kontrolní protokol (n = 7)
4. Neindukovaní potkani léčení c-AUCB + experimentální protokol (n = 11)
5. Neindukovaní potkani léčení losartanem + kontrolní protokol (n = 6)
6. Neindukovaní potkani léčení losartanem + experimentální protokol (n = 10)
7. Indukovaní neléčení potkani + kontrolní protokol (n = 7)
8. Indukovaní neléčení potkani + experimentální protokol (n = 13)
9. Indukovaní potkani léčení c-AUCB + kontrolní protokol (n = 7)
10. Indukovaní potkani léčení c-AUCB + experimentální protokol (n = 13)
11. Indukovaní potkani léčení losartanem + kontrolní protokol (n = 6)
12. Indukovaní potkani léčení losartanem + experimentální protokol (n = 11)

3.4.2.2 Série č. 2: Vliv chronické inhibice solubilní epoxid hydrolázy a blokátoru AT₁ receptoru na srdeční hypertrofii, proteinurii, poškození glomerulů ledvin, tubulointersticiální poškození ledvin a na koncentraci EETs a DHETs v ledvinné tkáni

Potkani byli rozděleni do následujících experimentálních skupin a vystaveni stejnému chronickému experimentálnímu protokolu jako v sérii č. 1:

1. Neindukovaní neléčení potkani (n = 7)
2. Neindukovaní potkani léčení c-AUCB (n = 6)
3. Neindukovaní potkani léčení losartanem (n = 6)
4. Indukovaní neléčení potkani (n = 8)
5. Indukovaní potkani léčení c-AUCB (n = 8)
6. Indukovaní potkani léčení losartanem (n = 8)

Moč pro stanovení proteinurie byla sbírána před (72 hodin) a po (10 dní) zahájení podávání diety s nebo bez obsahu I3C (Honetschlägerová et al. 2011a). 11. den byli potkani dekapitováni a byla jim odebrána jedna ledvina pro stanovení ledvinného glomerulárního poškození a kortikálního intersticiálního poškození pomocí metod běžně prováděných v naší laboratoři (Čertíková Chábová et al. 2007; Čertíková Chábová et al. 2010). Ledvina byla zafixována ve 4 % formaldehydu, dehydratována a zalita do parafinu. Jednotlivé obarvené

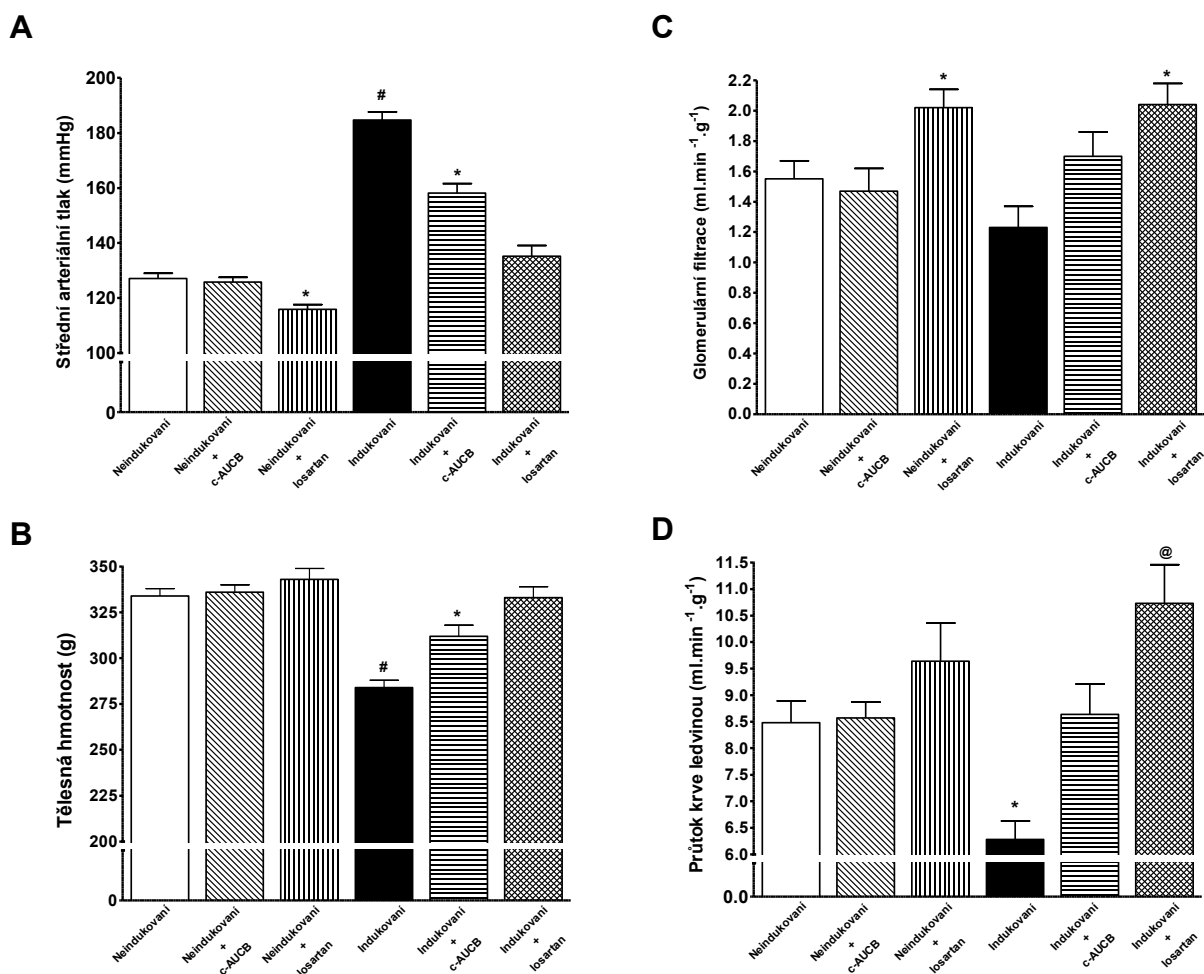
řezy byly semikvantitativně vyhodnoceny s počítáním 50-ti glomerulů v každé ledvině a vypočtením glomerulosklerotického indexu (GSI). Metodu stanovení renálního kortikálního a tubulointersticiálního poškození (Nakano et al. 2008) jsme použili v předchozí studii (Kujal et al. 2010). Semikvantitativně se hodnotily infiltrace zánětlivými buňkami, dilatace tubulů a jejich atrofie a intersticiální fibróza. Léze byly vyhodnoceny nejméně ve třiceti náhodných nepřekrývajících se zorných polích kůry ledvin.

Hodnoty metabolitů kyseliny arachidonové, EETs a DHETs, byly měřeny v kůře ledvin a analyzovány stejně jako v předchozí studii (viz. 3.3.2.2).

3.4.3 Výsledky

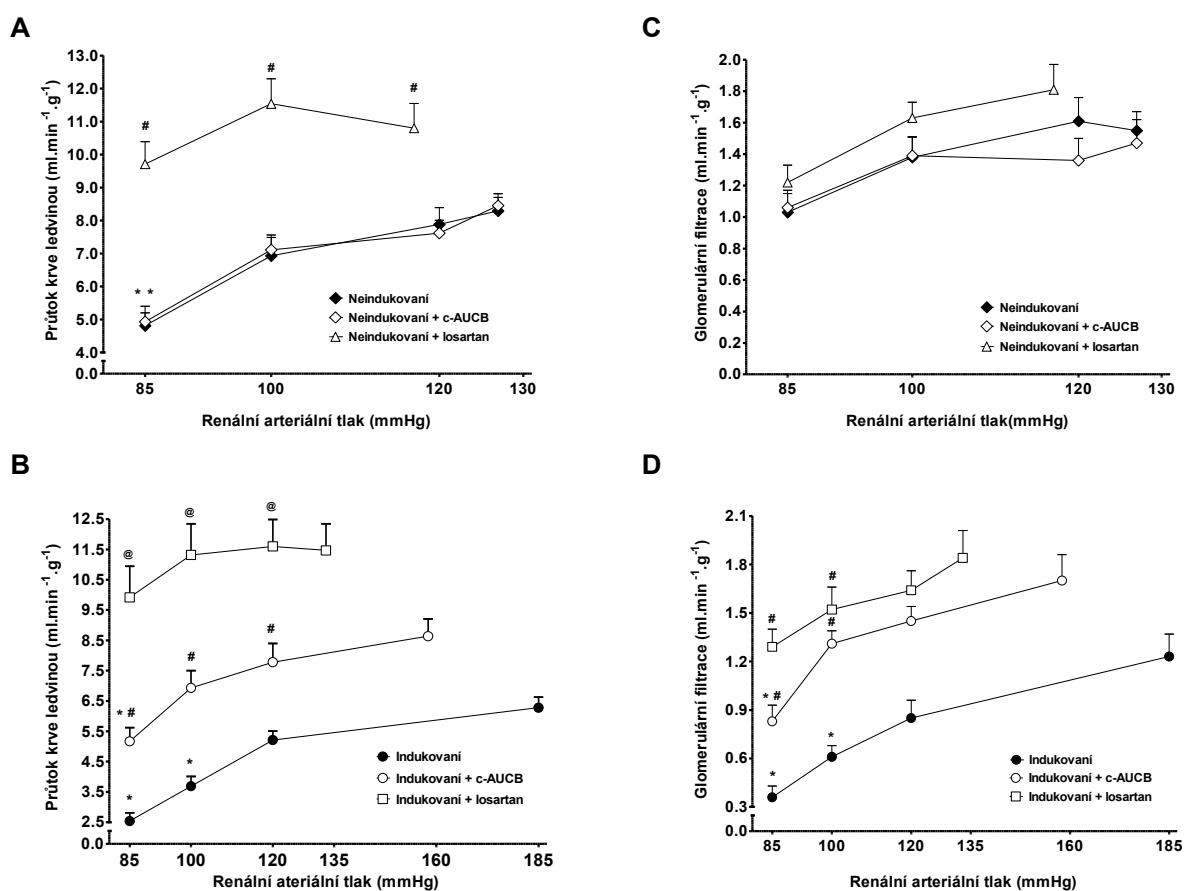
3.4.3.1 Experimentální protokol č. 1: Odpověď glomerulární filtrace, průtoku krve ledvinou a vylučování sodíku ledvinou při snižování renálního arteriálního tlaku

Bazální hodnoty (průměrné hodnoty od skupin kontrolního i experimentálního protokolu získané během první clearancové periody při fyziologickém renálním arteriálním tlaku) středního arteriálního tlaku (SAT), tělesné hmotnosti, PKL a GFR jsou zobrazeny v grafu č. 8. c-AUCB léčba neovlivnila SAT, tělesnou hmotnost, PKL ani GFR u neindukovaných zvířat ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany. Na druhou stranu léčba losartanem signifikantně snížila SAT a GFR, ale neovlivnila tělesnou hmotnost a PKL u normotenzních neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 potkanů. Podání diety s 0,3 % I3C vedlo k výrazné hypertenzi (graf 8A) spojené se silným váhovým úbytkem (graf 8B) ve srovnání s neindukovanými zvířaty. Navíc neléčení I3C-indukovaní potkani vykazovali známky maligní hypertenze, jako jsou letargie, nahrbený postoj a piloerekce (Vaňourková et al. 2006; Honetschlägerová et al. 2011a). c-AUCB léčba zmírnila rozvoj hypertenze, zmenšila ztrátu tělesné hmotnosti a zabránila snížení PKL u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. Léčba losartanem zamezila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti, navíc také zabránila snížení PKL a dokonce způsobila jeho zvýšení u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými normotenzními potkany (graf 8D). Jak vidíme na grafu 9A a 9C u neindukovaných potkanů neměla c-AUCB léčba vliv na autoregulační schopnost PKL a GFR při redukcích RAT. Léčba losartanem neovlivnila autoregulační schopnost GFR u neindukovaných potkanů. Avšak u těchto potkanů zvýšila nejen bazální hodnoty PKL, ale dokonce zlepšila jejich autoregulaci i při nejnižší hodnotě RAT ($p < 0,05$) (graf 9A). Jak je vidět na grafu 9B byl PKL při bazálních hodnotách RAT



Graf č. 8: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku (SAT) (A), tělesné hmotnosti (B), glomerulární filtrace (GFR) (C) a průtoku krve ledvinou (PKL) (D) u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů krmených normální krmnou dávkou (neindukováni) nebo dietou s obsahem 0,3 % I3C (I3C-indukováni). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty, @p < 0,05 vs. neindukováni neléčení potkani.

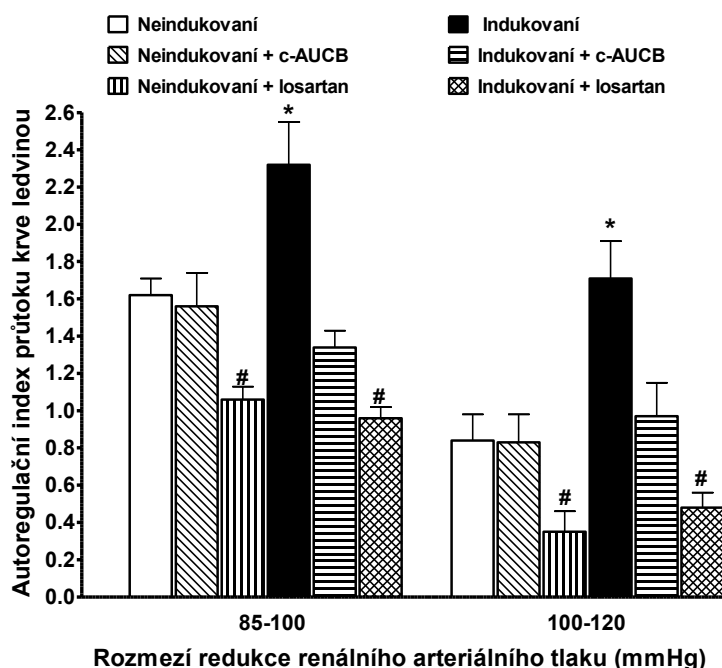
signifikantně nižší u neléčených I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými potkany ($6,28 \pm 0,35$ vs. $8,29 \pm 0,41$ ml/min/g, $p < 0,05$) a redukce RAT vedla k signifikantnímu poklesu PKL již při hodnotě 100 mm/Hg. Na druhou stranu c-AUCB léčba u I3C-indukovaných potkanů nejenom zabránila snížení PKL při bazálních hodnotách RAP, ale dokonce výrazně zlepšila autoregulační schopnost PKL až na hodnoty pozorované u neindukovaných zvířat. Léčba losartanem u indukovaných potkanů zvýšila PKL při bazálních hodnotách RAT ($11,47 \pm 0,88$ ml/min/g) a udržela autoregulační schopnost dokonce i při nejnižších hodnotách RAT (graf 9B).



Graf č. 9: Vztah mezi renálním arteriálním tlakem (RAT) a průtokem krve ledvinou (A a B) a mezi RAT a glomerulární filtrací (C a D) u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krmených buď normální dietou (neindukovani), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukovani). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. bazální hodnoty, #p < 0,05 vs. neléčení potkani, @p < 0,05 vs. c-AUCB léčení potkani.

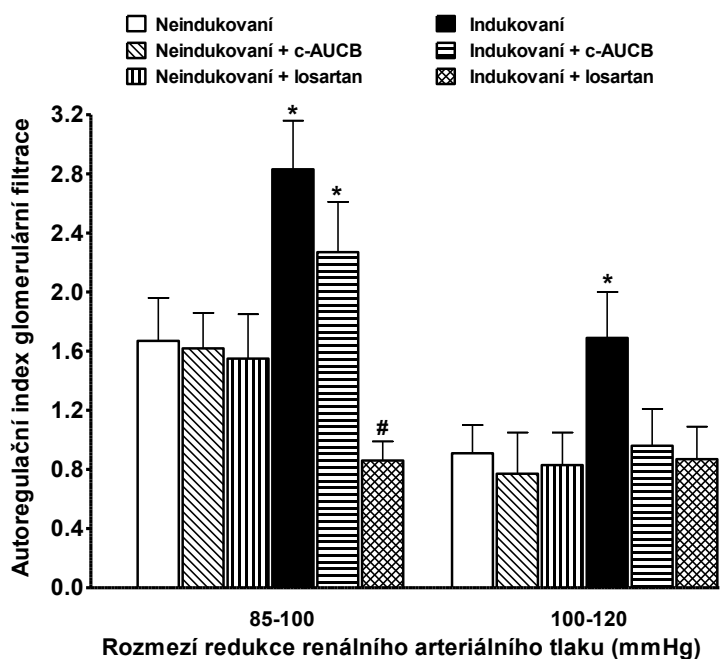
Podobně je vidět na grafu 9D, že I3C-indukovani neléčení potkani reagovali na redukcí RAT signifikantním snížením GFR a léčba jak c-AUCB, tak losartanem značně zlepšila autoregulační schopnost GFR.

Graf 10 ukazuje autoregulační schopnost PKL a GFR použitím autoregulačního indexu podle metody Semple a Wardenera. Výsledky ukazují, že I3C-indukovani neléčení potkani vykazují signifikantně zhoršenou autoregulační schopnost PKL a GFR již při redukcí RAT ze 120 na 100 mmHg. To bylo ještě více patrné při redukcí RAT na konečných 85 mmHg. Léčba s c-AUCB neovlivnila autoregulační index u neindukovaných potkanů, ale normalizovala

A

Graf č. 10: Autoregulační index PKL (A) a GFR (B)

při redukcích renálního arteriálního tlaku z hodnot 120 na 100 mmHg a ze 100 na 85 mmHg. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty, # $p < 0,05$ vs. veškeré hodnoty.

B

autoregulační index PKL a GFR u I3C-indukovaných potkanů při redukcí tlaku ze 120 na 100 mmHg. Při redukcí RAT ze 100 na 85 mmHg však už zhoršený index PKL a GFR nezlepšila. Na druhou stranu léčba losartanem nejen že obnovila autoregulační index PKL i GFR u I3C-indukovaných potkanů, ale dokonce zlepšila autoregulační index PKL u neindukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany.

Jak je vidět z grafu 11, hodnoty absolutního a frakčního vylučování sodíku a diurézy

nejsou signifikantně rozdílné při spontánních hladinách RAT u neindukovaných c-AUCB léčených a neléčených potkanů. Redukce RAT vedla u obou těchto skupin k podobné odpovědi. Avšak léčba losartanem vedla k významnému snížení v absolutním i frakčním vylučování sodíku a diurézy při spontánních hladinách RAT ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany. Na grafu 11 D – F není vidět žádný signifikantní rozdíl v absolutním a frakčním vylučování sodíku a diuréze při bazálních hodnotách RAT mezi neléčenými a c-

AUCB léčenými a losartanem léčenými I3C-indukovanými potkany. Redukce RAT vedla k mnohem většímu snížení absolutního a frakčního vylučování sodíku a diurézy u I3C-indukovaných neléčených potkanů než u I3C-indukovaných potkanů léčených c-AUCB nebo losartanem.

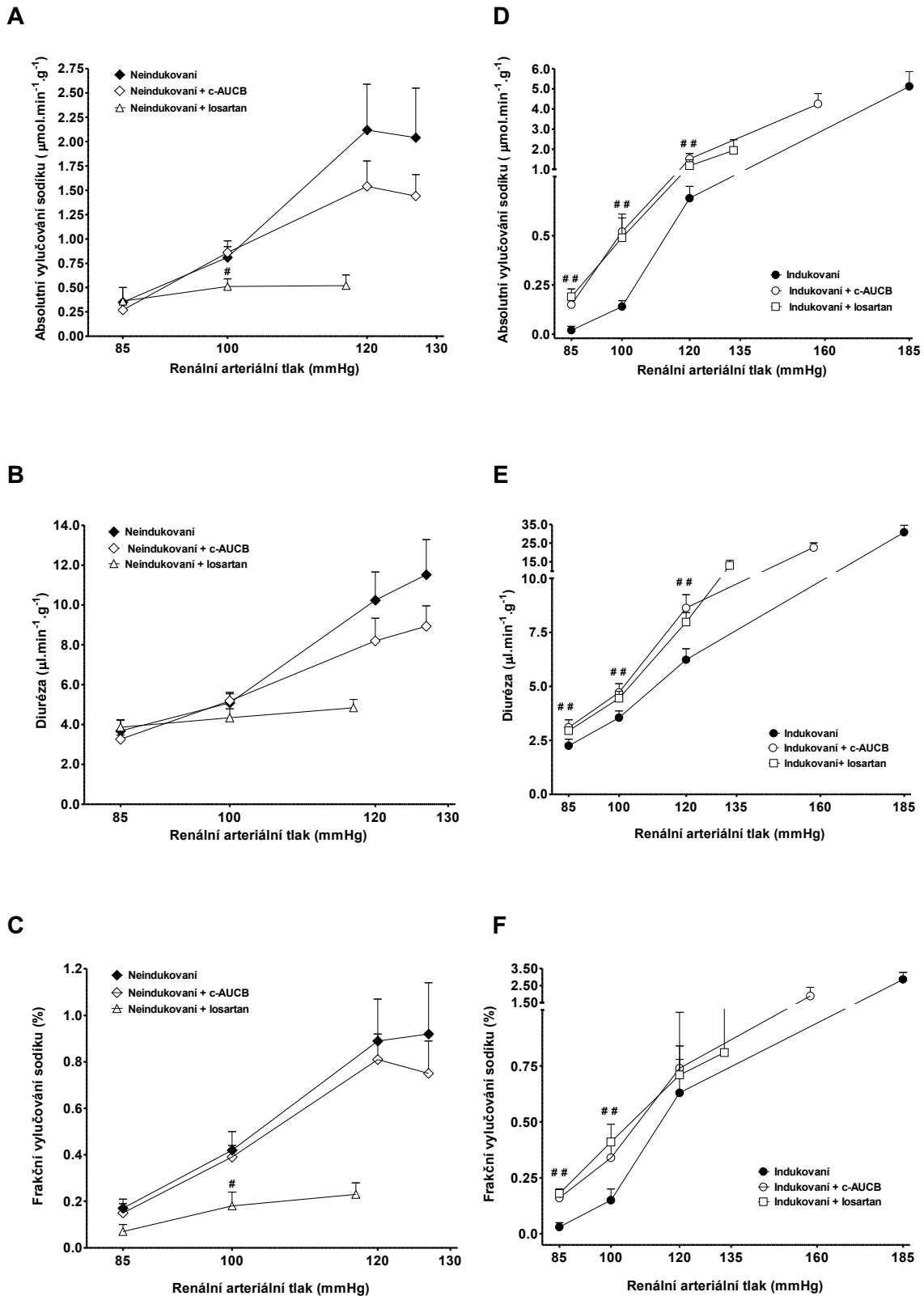
Neléčení a c-AUCB léčení nebo losartanem léčení neindukovaní potkani i I3C-indukovaní potkani, kteří byli vystaveni kontrolnímu protokolu, nevykazovali v průběhu experimentu žádné signifikantní změny v renální hemodynamice ani v exkrečních funkcích ledvin. Proto zde nejsou tato data prezentována.

3.4.3.2 Experimentální protokol č. 2: Účinek chronické inhibice solubilní epoxid hydrolázy a blokátoru AT₁ receptoru na srdeční hypertrofii, proteinurii, poškození glomerulů ledvin, tubulointersticiální poškození ledvin a koncentrace EETs a DHETs v ledvinné tkáni

Naše výsledky ukazují, že I3C-indukovaní a neléčení potkani vyvinuli zřetelnou srdeční hypertrofii, vyjádřenou jako poměr váhy levé komory k délce tibiae (graf 12A), dále výraznou proteinurii (graf 12B) a značný stupeň renálního glomerulárního a tubulointersticiálního poškození ve srovnání s neindukovanými normotenzními potkany (graf 12C a 12D). c-AUCB léčba signifikantně zmírnila rozvoj srdeční hypertrofie, proteinurie a zvýšení glomerulosklerotického indexu (GSI) a tubulointersticiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů. Léčba losartanem kompletně zabránila rozvoji srdeční hypertrofie, proteinurie a zrušila zvýšení GSI a tubulointersticiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů.

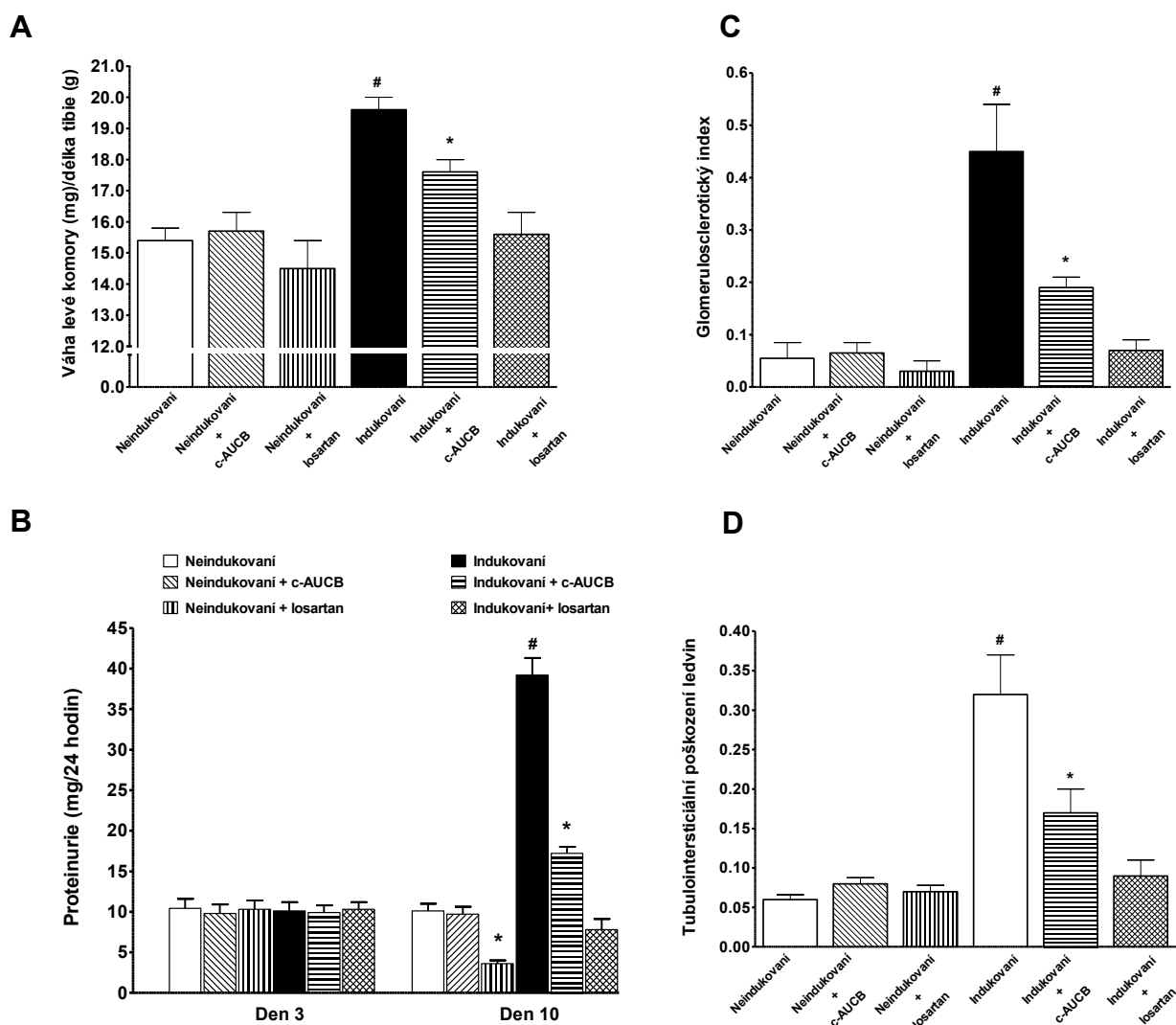
Neindukovaní normotenzní Cyp1a1-Ren-2 potkani vykazovali malou proteinurii a minimální stupeň renálního glomerulárního a tubulointersticiálního poškození, přičemž léčba c-AUCB významně neovlivnila žádný z těchto parametrů (graf 12). Navíc léčba losartanem signifikantně snížila proteinurii 10. den experimentu u neindukovaných normotenzních potkanů.

Obrázek 9 ukazuje reprezentativní histologický řez ledvinou od neindukovaných (A), I3C-indukovaných neléčených (B), c-AUCB léčených I3C-indukovaných (C) a losartanem léčených I3C-indukovaných (D) transgenních potkanů.



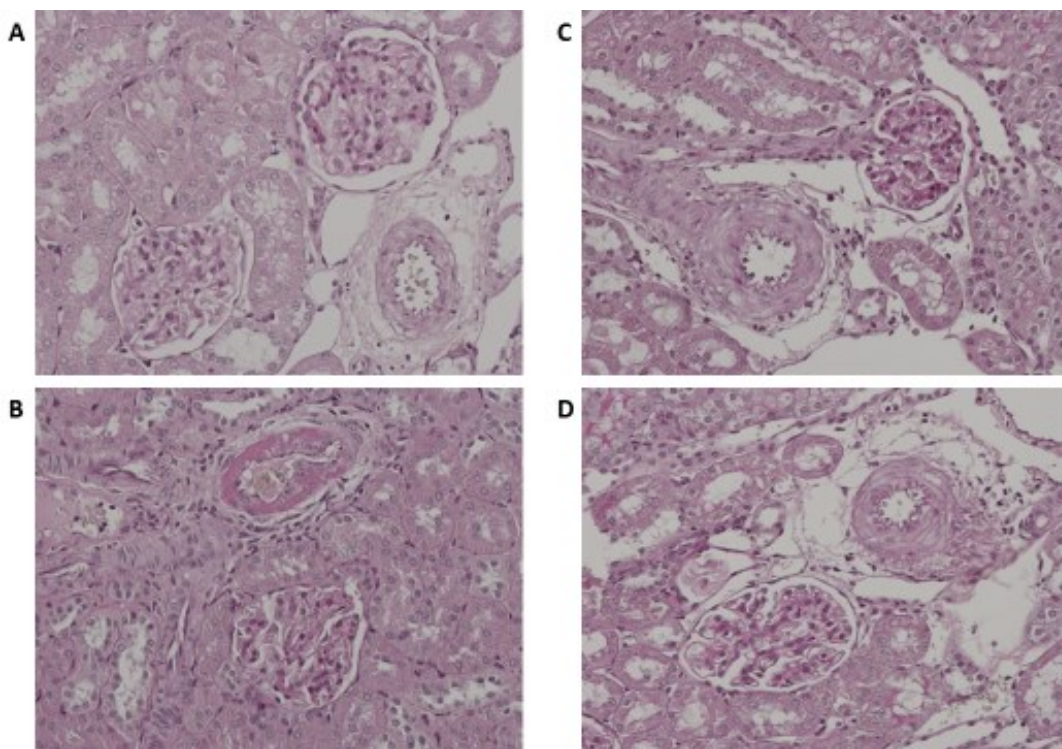
Graf č. 11: Vztah mezi renálním arteriálním tlakem a absolutním (A a D) a frakčním vylučováním sodíku (C a F) a diurézy (B a E) u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krměných buď normální dietou (neindukovani), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukovani). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru.

#p < 0,05 vs. hodnoty u neléčených potkanů.



Graf č. 12: Poměr srdeční levé komory k délce tibia (A), proteinurie za bazálních podmínek (den 3) a na konci experimentu (den 10) (B), glomerulosklerotický index (C) a tubulointerstiální poškození ledvin (D) u Cyp1a1-Ren-2 potkanů krmených buď normální dietou (neindukovani), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-indukovani). c-AUCB značí léčbu inhibítorem sEH, losartan značí léčbu antagonistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty.

Z grafu 13A je patrné, že neléčení a losartanem léčení I3C-indukovani potkani vykazují signifikantní snížení koncentrace EETs v kůře ledvin. Léčba c-AUCB zabránila snížení hodnot EETs v ledvině u I3C-indukovani potkanů. Navíc c-AUCB léčba u neindukovani stejně jako u I3C-indukovani vedla k signifikantnímu snížení koncentrací



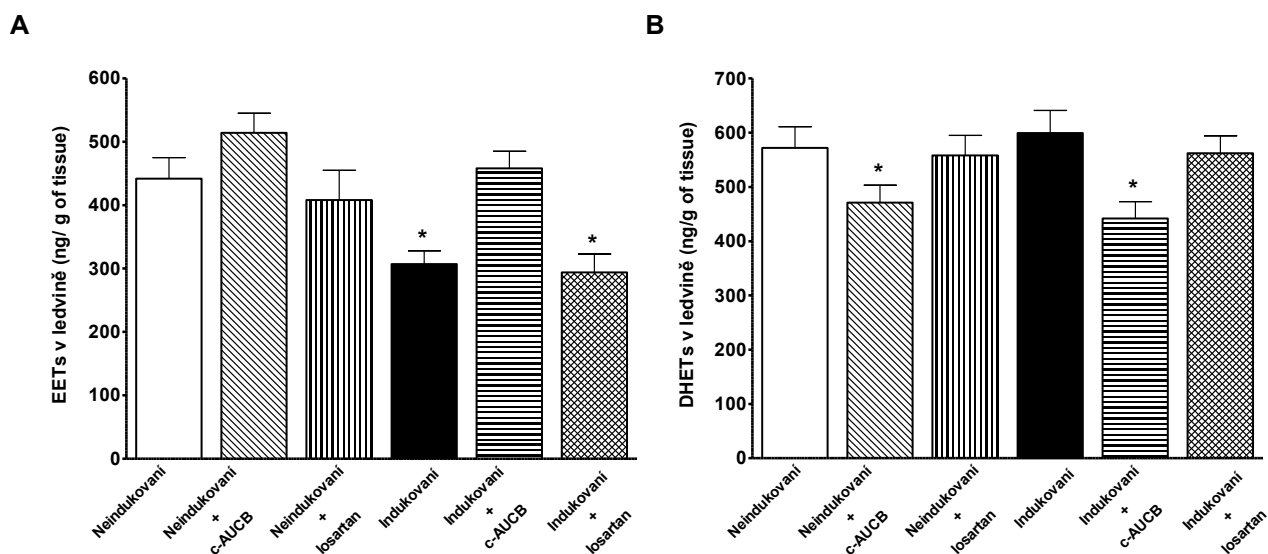
Obrázek č. 9: Histologické řezy ledvinou od neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (A), I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (B), I3C-indukovaných c-AUCB a losartanem léčených Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (C a D).

DHETs v ledvinné tkáni (graf 13B). Při použití poměru EETs/DHETs, což nejlépe představuje intrarenální účinnost biologicky aktivních metabolitů epoxygenázy, je vidět, že je tento poměr významně nižší u I3C-indukovaných neléčených potkanů ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany (graf 13C). Tento poměr nebyl ovlivněn léčbou s losartanem, ale c-AUCB léčba významně zvýšila tento poměr u I3C-indukovaných stejně jako u neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

3.4.4 Diskuze

Prvním důležitým zjištěním této studie bylo, že chronická léčba inhibitorem sEH c-AUCB zmírňuje rozvoj maligní hypertenze a zabrání snížení PKL u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

Autoregulační indexy v rozmezí redukce arteriálního tlaku od 120 – 100 a od 100 – 85 jasně poukazují na zhoršenou autoregulační schopnost PKL a GFR u I3C-indukovaných neléčených



Graf č. 13: Epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs)

(A) a dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs)

(B) a poměr EET/DHETs v kůře ledvin (C) na

konci experimentálního protokolu u Cyp1a1-Ren-

2 potkanů krmených buď normální dietou

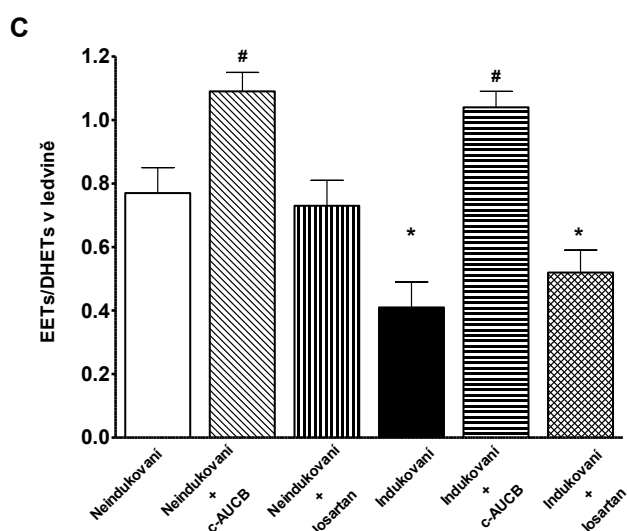
(neindukovani), nebo dietou s 0,3 % I3C (I3C-

indukovani). c-AUCB značí léčbu inhibi-
torem sEH, losartan značí léčbu antago-

nistou AT₁ receptoru. *p < 0,05 vs. neo-

značené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny

hodnoty.



potkanů ve srovnání s neindukovanými normotenzními potkany. Druhým důležitým zjištěním

tedy bylo, že chronická inhibice aktivity sEH pomocí c-AUCB nejen že zabránila snížení

PKL, ale také zřetelně lépe udržela autoregulaci PKL a GFR při daných RAT u I3C-

indukovaných potkanů než u I3C-indukovaných neléčených potkanů. Dále chronická c-AUCB

léčba signifikantně zlepšila sklon křivky tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů ve

srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. A právě zlepšení doprava posunuté křivky

tlakové natriurézy je pravděpodobně hlavním mechanismem zodpovědným za antihypertenzní

účinky chronické inhibice sEH c-AUCB u ANG II-dependentní formy maligní hypertenze.

EETs se podílí na regulaci vaskulárního tonu a antagonismu vazokonstrikčních účinků ANG

II, ale také přímo ovlivňují tubulární transport sodíku (Cambell et al. 2007; Capdevila et al.

2007; Roman, 2002; Imig et al. 2001; Imig, 2010). Naše předchozí (Honetschlägerová et al.

2011a) a nynější výsledky ukazují, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují sníženou intrarenální dostupnost biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů (vyjádřenou jako poměr EETs/DHETs) ve srovnání s neindukovanými potkany. Tento poměr byl signifikantně zvýšen pomocí c-AUCB léčby. Můžeme tedy předpokládat, že zvýšení biologické dostupnosti EETs u I3C-indukovaných potkanů je zodpovědné za zlepšení bazálních hodnot PKL, autoregulační schopnosti PKL a GFR při odpovědi na redukci RAT a posunu křivky tlakové natriurézy. Toto tvrzení je podpořeno naším nedávným zjištěním, že c-AUCB léčba výrazně zvýšila poměr EETs/DHETs beze změn zvýšené plasmatické a renální RAS aktivity u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (Honetschlägerová et al. 2011a). To naznačuje, že změny v renálních funkcích a krevním tlaku při léčbě s c-AUCB by měly být primárně připsány změnám v biologické dostupnosti EETs, než změnám v aktivitě RAS. Existují dva hlavní mechanismy, jak může zvýšená biologická dostupnost EETs zlepšit zhoršenou autoregulační schopnost renální hemodynamiky a zhoršenou tlakově-natriuretickou odpověď u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

Prvním mechanismem je vazodilatační působení EETs, které působí jako endoteliální hyperpolarizační faktor, jež je nezávislý na NO a prostaglandinu. Takto se vyskytuje na mnoha místech vaskulárního řečiště, včetně renálního (Roman, 2002; Imig, 2001; Imig, 2010). Navíc bylo prokázáno, že EETs působí antagonisticky vůči vazokonstrikčnímu účinku ANG II (Imig et al. 2001). Zvýšené hladiny EETs při c-AUCB léčbě tedy vedou k vazodilataci a následné normalizaci PKL u I3C-indukovaných potkanů.

Druhý možný mechanismus účinku EETs je inhibice reabsorbce sodíku v proximálním tubulu blokadí Na^+/H^+ výměníku (Kopkan et al. 2012) a také snížení reabsorbce sodíku ve sběrných kanálcích ledvin blokadí epiteliálního sodíkového kanálu (ENaC) (Khan et al. 2014; Fan et al. 2015). ENaC hrají důležitou roli při změnách ve vylučování sodíku při redukci RAT (Navar et al. 1996; Majid et al. 1994). Z naší studie nejsme schopni určit specifický transportér, který je zodpovědný za natriurézu způsobenou c-AUCB léčbou. Avšak vylepšení tubulárních funkcí je pravděpodobně zodpovědné za zlepšení tlakové natriurézy u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

I když tato studie přesně neurčila, jak zvýšená biologická dostupnost EETs přispívá svými vazodilatačními a tubulárními účinky k funkci ledvin, je možné předpokládat, že kombinace obou mechanismů je zodpovědná za zlepšení autoregulační schopnosti PKL a GFR a zlepšení tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů. Toto tvrzení je silně podpořeno naší předchozí studií na Goldblattovském modelu ANG II-dependentní formy hypertenze (2K1C =

2 ledviny, 1 klip), u které jsme zjistili antihypertenzní účinek c-AUCB léčby zprostředkovaný zlepšením PKL a vylučováním sodíku (Sporková et al. 2011).

Třetím zjištěním této studie bylo, že chronická léčba s antagonistou AT₁ receptoru losartanem úplně zabránila rozvoji hypertenze, zhoršení PKL a autoregulační schopnosti PKL a GFR a tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů. Navíc jsme prokázali, že chronická léčba losartanem nezměnila koncentrace EETs a DHETs u I3C-indukovaných potkanů, což naznačuje, že antihypertenzní účinky nejsou způsobeny zvýšenou biologickou dostupností intrarenálních EETs. Tyto údaje ukázaly, že AT₁ receptory zprostředkované změny v autoregulační schopnosti ledvin a tubulární reabsorbce jsou zodpovědné za zhoršení tlakové natriurézy u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Toto tvrzení je v souladu s předchozími studiemi ukazujícími, že intrarenální zvýšení ANG II a porucha autoregulace renální hemodynamiky a tlakové natriurézy způsobené právě ANG II vedla k rozvoji maligní formy hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů (Erbanová et al. 2009). Právě nepřiměřená aktivita AT₁ receptorů způsobená zvýšenými koncentracemi plasmatického a renálního ANG II hraje důležitou roli v rozvoji hypertenze a s tím spojeným tkáňovém poškození u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s maligní hypertenzí.

Čtvrtým zjištěním bylo, že chronická c-AUCB léčba nejen že snížila rozvoj hypertenze, ale vykazovala značné kardioprotektivní a renoprotektivní účinky, kterými byly snížení srdeční hypertrofie, proteinurie, a glomerulárního a tubulointersticiálního poškození ledvin u I3C-indukovaných potkanů. Stejných výsledků jsme dosáhli v jedné z našich předchozích studií u transgenních potkanů s expresí myšího Ren-2 genu [TGR(mRen2)], který představuje jiný běžně používaný transgenní model ANG II-dependentní formy hypertenze (Čertíková et al. 2007). Ukázalo se, že změněná produkce a/nebo aktivita CYP eikosanoidů přispívá k rozvoji hypertenze a hypertenzí způsobenému tkáňovému poškození (Čertíková et al. 2007; Čertíková et al. 2010). Ve studiích Kujala a spol. a Kima a spol. měla inhibice sEH u hypertenzních nefrektomovaných TGR potkanů také významný renoprotektivní efekt a zmírnila tak signifikantně progresi chronického renálního selhání (Kujal et al. 2014; Kim et al. 2015). U potkanů s metabolickým syndromem indukovaným dietou byla také vidět prospěšnost dlouhodobého podávání inhibitoru sEH, po kterém došlo ke zmírnění příznaků metabolického syndromu (Iyer et al. 2011). Avšak naše studie jako první jasně ukazuje, jak chronická farmakologická inhibice sEH signifikantně zvyšuje koncentrace biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů, vykazuje dlouhodobé antihypertenzní účinky a poskytuje ochranu srdce i ledvin u našeho modelu ANG II-dependentní maligní hypertenze. Vzhledem k prospěšnému efektu c-AUCB léčby můžeme vzít v úvahu dva možné mechanismy účinku.

První z nich může být přisuzován účinkům snižování krevního tlaku, což je vždy spojeno s redukcí tkáňového poškození (Imig, 2010; Zao et al. 2004; Kujal et al. 2010). Druhý mechanismus účinku může vycházet ze studie na diabetických Goto-Kaizaki potkanech infundovaných ANG II a vystavených vysokoslané dietě, kde inhibice sEH způsobila bez snížení krevního tlaku ochranu ledvin před tkáňovým poškozením, což bylo provázeno snížením infiltrace makrofágů v ledvině (Olearczyk et al. 2009). Podobného výsledku bylo dosaženo u diabetických spontánně hypertenzních potkanů, u kterých byla po inhibici sEH indukována hem-oxygenáza-1 s renoprotektivními účinky (Elmarakby et al. 2013). Naše studie však neurčila specifický mechanismus zodpovědný za ochranu proti tkáňovému poškození, a proto bude nutné k této problematice provést v budoucnu další výzkum.

3.4.5 Závěr

Naše výsledky ukazují, že chronická inhibice sEH pomocí c-AUCB významně zmírňuje rozvoj maligní hypertenze a hypertenzí způsobené tkáňové poškození u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Dále jsme zjistili, že c-AUCB léčba značně zlepšuje autoregulační schopnost PKL a GFR a normalizuje utlumenou tlakovou natriurézu. A právě zlepšení doprava posunuté křivky tlakové natriurézy je pravděpodobně hlavním mechanismem zodpovědným za antihypertenzní účinky chronické inhibice sEH c-AUCB u ANG II-dependentní formy maligní hypertenze.

3.5 Léčba pomocí L-NAME zrušila antihypertenzní a renoprotektivní účinek inhibice solubilní epoxid hydrolázy u ANG II-dependentní hypertenze

3.5.1 Cíl práce

1. Zjistit, zda snížení krevního tlaku pomocí inhibitoru sEH je způsobeno EETs zprostředkovanou zvýšenou biologickou dostupností NO.
2. Pro detailnější porozumění, jakou roli hraje intrarenální interakce CYP metabolitů s RAS a NO v patofyziologii ANG II-dependentní formy maligní hypertenze, stanovit intrarenální koncentrace ANG II, EETs, DHETs, a koncentraci NOx, 8-isoprostanu, peroxidu vodíku a reaktivní látky s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) v moči u normotenzních a hypertenzních zvířat.

3.5.2 Protokoly:

3.5.2.1 Experimentální protokol č. 1: Vliv inhibice sEH na krevní tlak, albuminurii, vylučování nitrátů/nitritů močí, 8-isoprostanů, peroxidu vodíku, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, koncentraci EETs, DHETs a ANG II v ledvinách a morfologii ledvin

Pro přímé měření krevního tlaku jsme u experimentálních zvířat použili radiotelemetrický systém (Kurtz et al. 2005). Samcům Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s iniciální vahou 330 ± 6 g byly implantovány telemetrické sondy TA11PA-C40 (Data sciences, St. Paul, Minnesota, USA) pro kontinuální měření krevního tlaku v průběhu experimentálních period, jak již bylo popsáno výše (Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b). Po 10-ti dnech zotavení z chirurgie byl potkanům měřen bazální krevní tlak po dobu 3 dní. Potom byla zahájena léčba s inhibitorem sEH (c-AUCB) nebo s kombinací inhibitoru ACE a antagonisty AT₁ receptoru (Gopten + Lozap). Po 48 hodinách se začala potkanům podávat dieta s nebo bez obsahu 0,3 % I3C a příslušným skupinám potkanů také L-NAME (600 mg/l) v pitné vodě po dobu 3 dní. Zvolili jsme tento typ protokolu, neboť bylo zjištěno, že po 3 dnech indukce 0,3 % I3C dojde k maximální aktivaci reninového genu a hypertenze dosáhne nejvyšší hodnoty (Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b; Kantachavesiri et al. 2001; Vaňourková et al. 2006; Husková et al. 2010; Howard et al. 2012). Na konci experimentu, tj. po 5-ti dnech od zahájení c-AUCB léčby, byli potkani umístěni do

metabolických klesí pro sběr moče, ze které jsme stanovili denní vylučování albuminu, NO_x, Uiso, peroxid vodíku a TBARS, což je látka, která se používá pro stanovení malondialdehydu. Malondialdehyd je produkt peroxidace lipidů, další marker endogenní superoxidové aktivity. (Neckář et al. 2012; Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b; Sasser et al. 2012; Kopkan et al. 2010). Na konci byli potkani dekapitováni a byly radioimunoanalýzou měřeny plasmatické a tkáňové hodnoty ANG II, jak bylo popsáno výše v kapitole 3.3.2.2.

Hodnoty metabolitů kyseliny arachidonové (EETs a DHETs) byly měřeny v kůře ledvin a analyzovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC – MS/MS) – viz. kapitola 3.3.2.2.

Pro stanovení glomerulárního poškození ledvin byla použita pravá ledvina, která byla rychle vyňata z těla potkana, zafixována ve 4 % formaldehydu a zalita do parafinu. Jednotlivé hematoxylin-eosinem barvené řezy byly semikvantitativně vyhodnoceny s počítáním 100 glomerulů v každé ledvině (Honetschlägerová et al. 2011b; Kujal et al. 2010): stupeň 0 – normální nález, stupně 1 – 4 – sklerotické oblasti v glomerulu v rozsahu 25 – 100 %.

Glomerulosklerotický index (GSI) byl vypočten podle vzorce:

$$GSI = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$
, kde n_x je počet glomerulů v každém stupni glomerulosklerózy.

Metodu stanovení tubulointersticiálního poškození (Nakano et al. 2008) jsme použili v dřívější studii (Kujal et al. 2010). Semikvantitativně se hodnotily infiltrace zánětlivými buňkami, ztlustění bazální membrány tubulů, dilatace tubulů a jejich atrofie a intersticiální fibróza. Léze byly vyhodnoceny nejméně ve 30-ti náhodných nepřekrývajících se zorných polích kůry ledvin, které byly následovně vyhodnoceny: stupeň 0 – žádné tubulointersticiální poškození, stupeň 1 - tubulointersticiální poškození < 25 %, stupeň 2 - tubulointersticiální poškození z 25 – 50 % a stupeň 3 - tubulointersticiální poškození > 50 %. Tato metoda se běžně používá v naší laboratoři a umožňuje nám srovnávat různé výsledky z našich studií a vyhodnocovat tak hypertenzi způsobené tkáňové poškození (Neckář et al. 2012; Honetschlägerová et al. 2011b; Kujal et al. 2010; Čertíková et al. 2010; Vaněčková et al. 2012).

Potkani TGR (Cyp1a1-Ren-2) byli rozděleni do následujících skupin:

1. I3C-indukování + neléčení (n = 7)
2. I3C-indukování + c-AUCB (n = 7)
3. I3C-indukování + L-NAME (n = 7)
4. I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB (n = 7)
5. I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda (n = 7)
6. Neindukování + neléčení (n = 6)
7. Neindukování + c-AUCB (n = 6)
8. Neindukování + L-NAME (n = 7)
9. Neindukování + L-NAME + c-AUCB (n = 7)
10. Neindukování + L-NAME + RAS blokáda (n = 6)

3.5.2.2 Experimentální protokol č. 2: Vliv na hemodynamiku a exkreční funkce ledvin

Otestovali jsme následující experimentální skupiny vystavené stejnému protokolu jako TGR (Cyp1a1-Ren-2) potkani v sérii č. 1:

1. I3C-indukování + neléčení (n = 8)
2. I3C-indukování + c-AUCB (n = 9)
3. I3C-indukování + L-NAME (n = 9)
4. I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB (n = 9)
5. I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda (n = 9)
6. Neindukování + neléčení (n = 8)
7. Neindukování + c-AUCB (n = 8)
8. Neindukování + L-NAME (n = 9)
9. Neindukování + L-NAME + c-AUCB (n = 9)
10. Neindukování + L-NAME + RAS blokáda (n = 8)

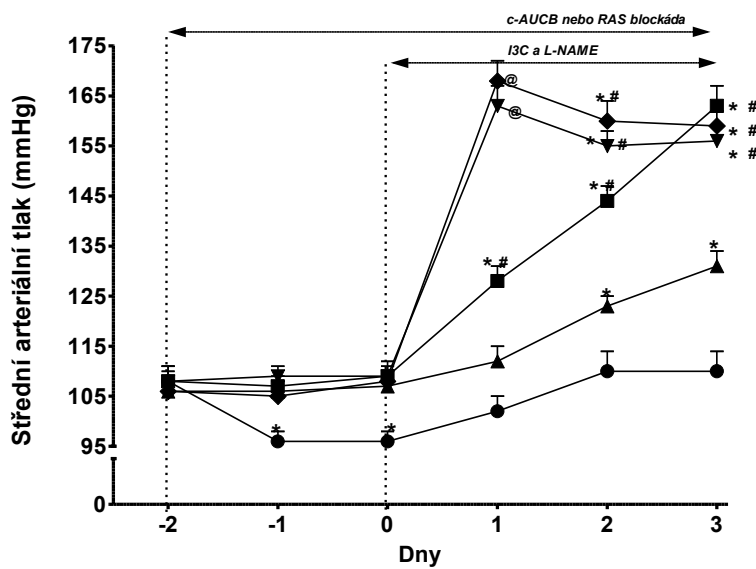
Pro stanovení renální hemodynamiky a exkrečních parametrů ledvin byli potkani na konci experimentálního protokolu anestezováni a vystaveni akutnímu clearancovému pokusu podle stejného postupu jako v předchozích studiích (Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b).

3.5.3 Výsledky

3.5.3.1 Experimentální protokol č. 1: Vliv inhibice sEH na krevní tlak, albuminurii, vylučování nitrátů/nitritů močí, 8-isoprostanů, peroxidu vodíku, látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou, koncentraci EETs, DHETs a ANG II v ledvinách a glomerulární a tubulointerstiální poškození ledvin

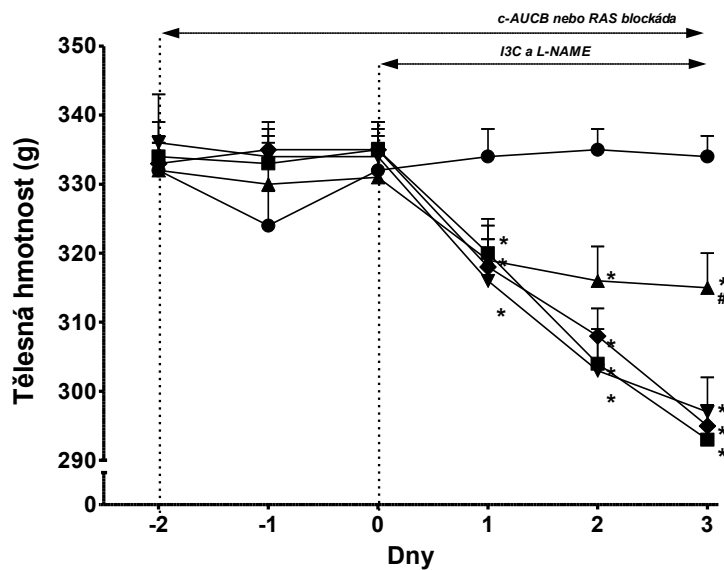
A

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

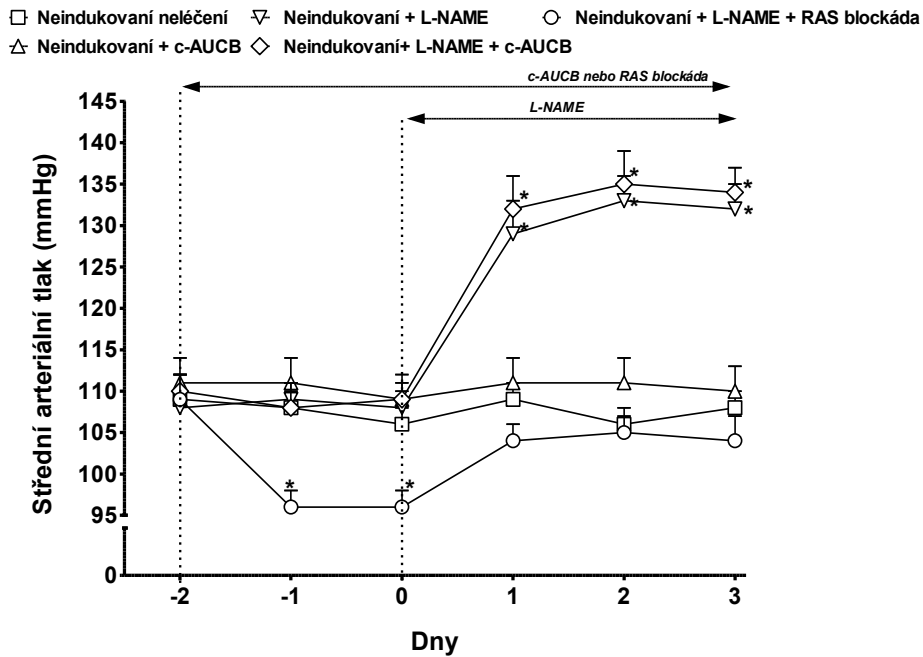


B

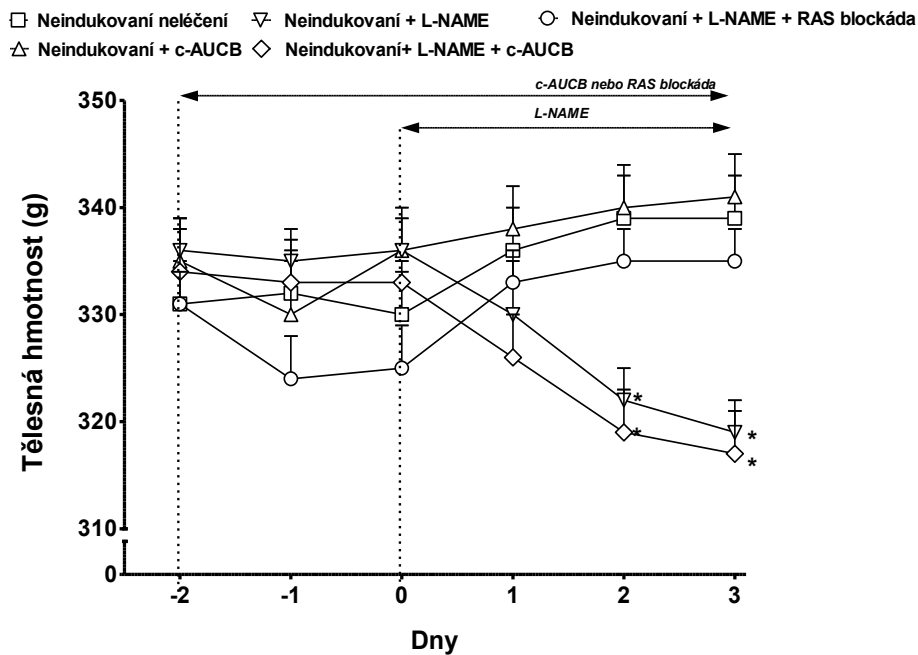
- I3C-indukování neléčení ▾ I3C-indukování + L-NAME ● I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda
▲ I3C-indukování + c-AUCB ◆ I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB



C



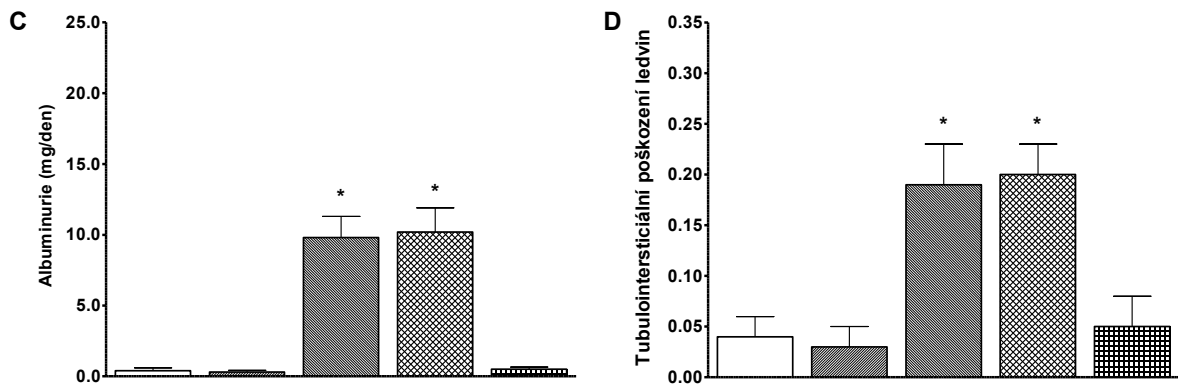
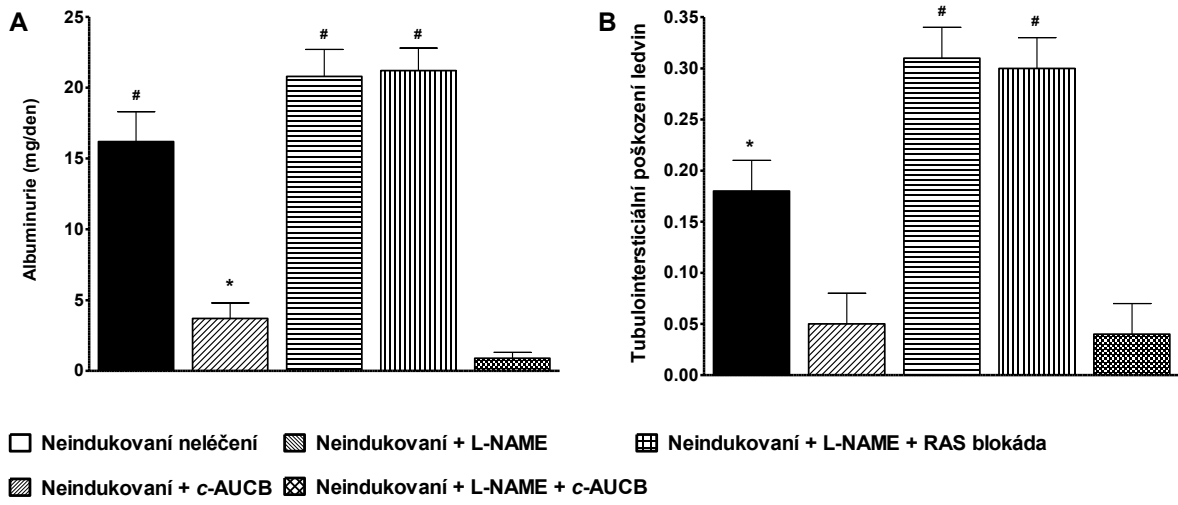
D



Graf č. 14: Průběh středního arteriálního tlaku (měřeno radiotelemetricky) (A a C) a tělesné hmotnosti (B a D) u I3C-indukovaných (A a B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotným inhibitorem sEH c-AUCB nebo L-NAME a porovnání buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. * $p < 0,05$ vs. bazální hodnoty, # $p < 0,05$ vs. c-AUCB neoznačené hodnoty ve stejném časovém okamžiku, @ $p < 0,05$ vs. všechny hodnoty ve stejném časovém okamžiku.

Graf 14 A a B ukazuje, že indukce indol-3-karbinolem vedla k těžké hypertenzi, kdy střední arteriální tlak vzrostl ze 108 ± 3 na konečných 163 ± 4 mmHg. Hypertenze byla spojena se značným váhovým úbytkem ze 334 ± 5 na 293 ± 5 g. Podání L-NAME u I3C-indukovaných zvířat přechodně zvýšilo krevní tlak ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany (163 ± 4 vs. 128 ± 3 mmHg, $p < 0,05$, 1. den po nasazení I3C). Při pozdějších měřeních byl však střední arteriální tlak podobný jako u I3C-indukovaných neléčených potkanů. c-AUCB léčba zmírnila rozvoj hypertenze a váhový úbytek u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. Na druhou stranu kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME u I3C-indukovaných potkanů nesnížila krevní tlak, ani nezabránila váhovému úbytku ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba zabránila zvýšení SAT a váhovému úbytku u I3C-indukovaných potkanů. Jak ukazuje graf 14C, zůstal SAT u neindukovaných potkanů v normotenzních mezích v průběhu celé experimentální periody a ani c-AUCB na něj neměla vliv. Podobný průběh můžeme vidět také u tělesné hmotnosti. Podání L-NAME vedlo u neindukovaných potkanů k rychlému a zřetelnému zvýšení SAT ze 108 ± 2 na 132 ± 3 mmHg ($p < 0,05$), což bylo spojeno se signifikantním snížením tělesné hmotnosti ze 336 ± 3 na 319 ± 3 g ($p < 0,05$). Kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME u neindukovaných potkanů nezabránila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s L-NAME léčenými neindukovanými potkany. Podobně jako tomu bylo u I3C-indukovaných potkanů, kombinovaná RAS a NOS blokáda zabránila zvýšení SAT a snížení tělesné hmotnosti u neindukovaných potkanů (graf 14C a D). Z grafu 15A je patrná zvýšená albuminurie u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neindukovanými potkany ($16,2 \pm 2,1$ vs. $0,4 \pm 0,2$ mg/24hod, $p < 0,05$). c-AUCB léčba signifikantně zmírnila stupeň albuminurie u I3C-indukovaných potkanů. Podání L-NAME ještě zhoršilo stupeň albuminurie u I3C-indukovaných potkanů a kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME nezabránila zvýšení albuminu v moči u I3C-indukovaných zvířat. Na druhou stranu kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba kompletně zabránila zvýšení albuminu v moči u I3C-indukovaných zvířat až na hodnoty, které můžeme vidět u neindukovaných neléčených potkanů (graf 15A). Jak je vidět z grafu 15C, neměla c-AUCB léčba žádný vliv na albuminurii u neindukovaných potkanů. Podání L-NAME způsobilo značné zvýšení albuminurie ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($9,8 \pm 1,5$ vs. $0,4 \pm 0,2$ mg/24 hod, $p < 0,05$) a podobné hodnoty měli jedinci s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME (graf 15C). Podobně jako u I3C-indukovaných potkanů kombinovaná RAS a NOS blokáda úplně zabránila zvýšení albuminurie u neindukovaných potkanů.

■ I3C-indukování neléčení ▨ I3C-indukování + L-NAME ▩ I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda
 ▨ I3C-indukování + c-AUCB ▩ I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB



Graf č. 15: Albuminurie (A a C) a tubulointerstiální poškození ledvin (B a D) u I3C-indukovaných (Aa B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotným inhibítorem sEH c-AUCB nebo NO inhibítorem L-NAME a kombinací c-AUCB a L-NAME nebo kombinací RAS blokády a L-NAME. *p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty.

Na druhou stranu z grafu 15B je vidět, jak I3C-indukování neléčení potkani vykazují silnější ledvinné tubulointerstiální poškození ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,04 \pm 0,02$, $p < 0,05$). c-AUCB léčba zabránila zvýšení ledvinného tubulointerstiálního poškození u I3C-indukovaných zvířat. Podání L-NAME významně zhoršilo stupeň ledvinného tubulointerstiálního poškození u I3C-indukovaných potkanů a kombinace s c-AUCB tomu nijak nezabránila. Na druhou stranu kombinovaná blokáda RAS a NOS normalizovala stupeň ledvinného tubulointerstiálního poškození na hodnoty u neindukovaných neléčených potkanů. c-AUCB léčba u neindukovaných potkanů neovlivnila stupeň ledvinného tubulointerstiálního poškození, avšak podání L-NAME způsobilo jeho značné zvýšení ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($0,19 \pm 0,03$ vs. $0,03 \pm$

0,02, $p < 0,05$) a opět současná c-AUCB a L-NAME léčba neměla na toto zvýšení žádný vliv. Stejně jako u L-NAME léčených I3C-indukovaných potkanů, RAS blokáda kompletně zabránila zvýšení ledvinného tubulointersticiálního poškození u neindukovaných potkanů (graf 15D).

Přehled v tabulce č. 3 ukazuje, že I3C-indukování neléčení potkani měli signifikantně vyšší vylučování nitrátů/nitritů (NO_x) močí než neindukování neléčení potkani. c-AUCB léčba signifikantně snížila vylučování NO_x u I3C-indukovaných potkanů, ale neměla žádný vliv u neindukovaných potkanů. Podání L-NAME vedlo ke značné redukci ve vylučování NO_x jak u I3C-indukovaných, tak i u neindukovaných potkanů. Kombinovaná léčba c-AUCB s L-NAME nebo RAS blokáda s L-NAME nijak neovlivnila vylučování NO_x u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů. Jak je vidět z této tabulky, nebyly zde žádné signifikantní rozdíly ve vylučování 8-isoprostanů, peroxidu vodíku ani látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou v průběhu jakéhokoli léčebného protokolu u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů.

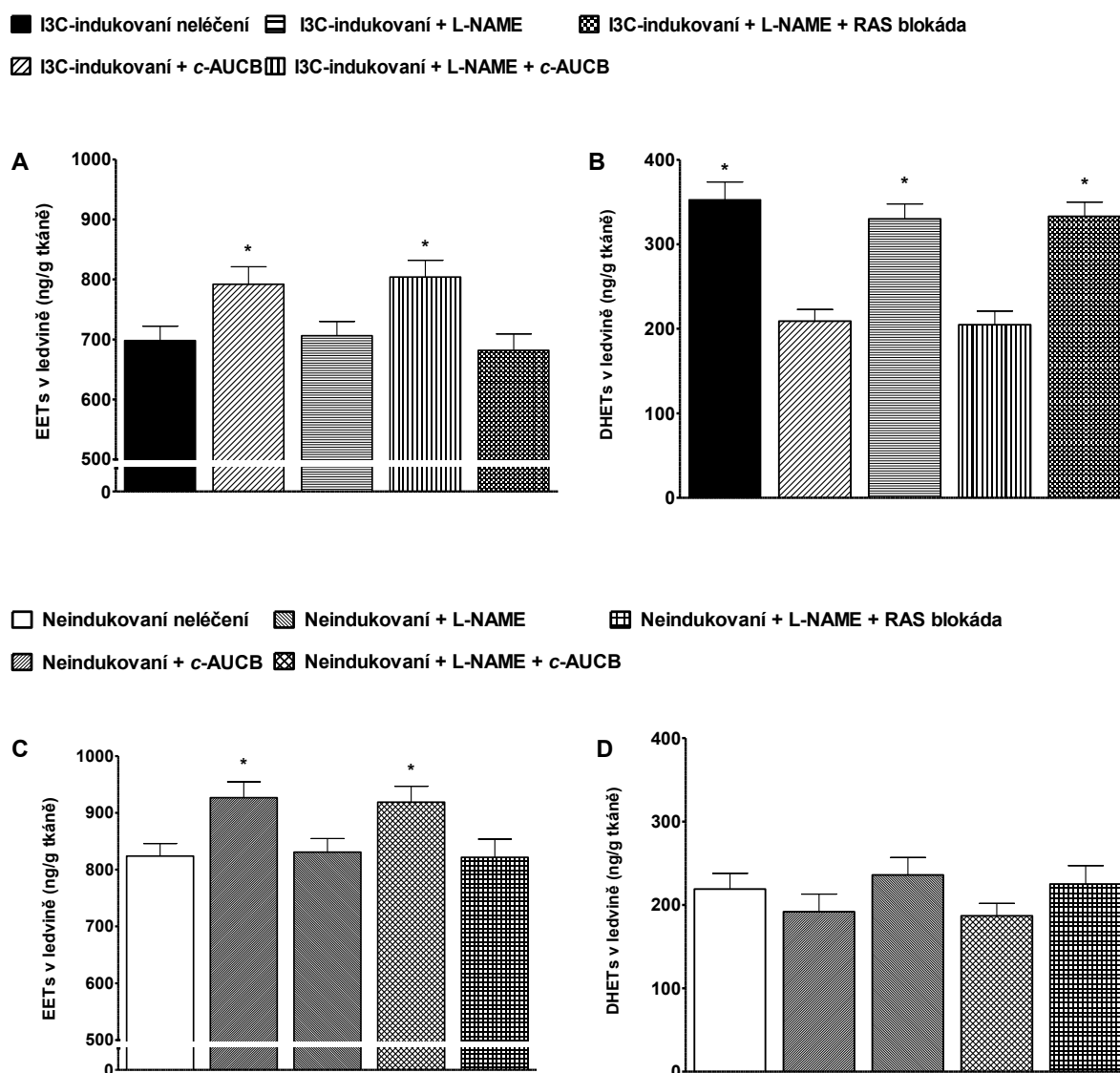
Tabulka č. 3: Data získaná z metabolických klecí

Skupina	U _{NO_xV} (μmol /den)	I _{isoV} (ng/den)	U _{TBARSV} (μmol /den)	U _{H₂O₂V} (μmol /den)
I3C-indukování neléčení	19,68 ± 1,44#	21,74 ± 2,45	0,24 ± 0,06	0,46 ± 0,09
I3C-indukování + c-AUCB	9,88 ± 0,91*	19,86 ± 1,74	0,32 ± 0,07	0,37 ± 0,07
I3C-indukování + L-NAME	4,09 ± 0,99	21,72 ± 1,24	0,27 ± 0,05	0,41 ± 0,05
I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB	4,14 ± 0,56	22,14 ± 1,96	0,25 ± 0,04	0,43 ± 0,05
I3C-indukování + L-NAME + RAS bl.	3,89 ± 1,01	20,72 ± 2,71	0,31 ± 0,06	0,39 ± 0,07
Neindukování neléčení	11,98 ± 0,91*	25,14 ± 2,02	0,27 ± 0,04	0,43 ± 0,06
Neindukování + c-AUCB	10,42 ± 0,96*	20,81 ± 1,96	0,32 ± 0,06	0,47 ± 0,09
Neindukování + L-NAME	4,12 ± 0,56	22,42 ± 1,76	0,29 ± 0,05	0,38 ± 0,06
Neindukování + L-NAME + c-AUCB	4,89 ± 0,64	19,86 ± 2,64	0,31 ± 0,06	0,42 ± 0,06
Neindukování + L-NAME + RAS bl.	5,04 ± 0,86	25,17 ± 2,89	0,28 ± 0,07	0,43 ± 0,07

c-AUCB - léčba inhibítorem sEH, I3C – indol-3-karbinol, I_{isoV} – vylučování 8-isoprostanů močí, L-NAME – léčba inhibítorem NO syntázy, RAS – renin-angiotenzin systém, U_{H₂O₂V} – vylučování peroxidu vodíku močí, U_{NO_xV} -vylučování nitrátů/nitritů močí, U_{TBARSV} – vylučování látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty, # $p < 0,05$ vs. všechny hodnoty.

Graf 16 a17 sumarizuje dostupnost biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů vyjádřených buď jako biologicky aktivní EETs, biologicky neaktivní DHETs nebo jako poměr EETs/DHETs. Jak je vidět z grafu 17 byl tento poměr u I3C-indukovaných potkanů signifikantně nižší než u neindukovaných neléčených potkanů ($1,98 \pm 0,25$ vs. $3,74 \pm 0,19$, $p < 0,05$). Samotná c-AUCB léčba nebo kombinovaná léčba c-AUCB s L-NAME signifikantně zvýšila poměr EETs/DHETs jak u I3C-indukovaných tak u neindukovaných potkanů (graf 17A a B). Avšak tento vzrůst byl mnohem vyšší u I3C-indukovaných než u

neindukovaných potkanů. Zvýšení poměru EETs/DHETs bylo u I3C-indukovaných potkanů výsledkem kombinace signifikantního zvýšení koncentrace EETs (698 ± 24 vs. 804 ± 28 ng/g tkáně, $p < 0,05$, když srovnáme I3C-indukované neléčené potkany vs. I3C-indukované c-AUCB léčené potkany) a signifikantního snížení koncentrace DHETs (350 ± 21 vs. 205 ± 16 ng/g tkáně, $p < 0,05$) (graf 16A a B). Na druhou stranu u neindukovaných potkanů bylo zvýšení v poměru EETs/DHETs výsledkem signifikantního zvýšení koncentrace EETs (824 ± 22 vs. 927 ± 28 ng/g tkáně, $p < 0,05$, když srovnáme neindukované neléčené a neindukované c-AUCB léčené potkany) (graf 16C).

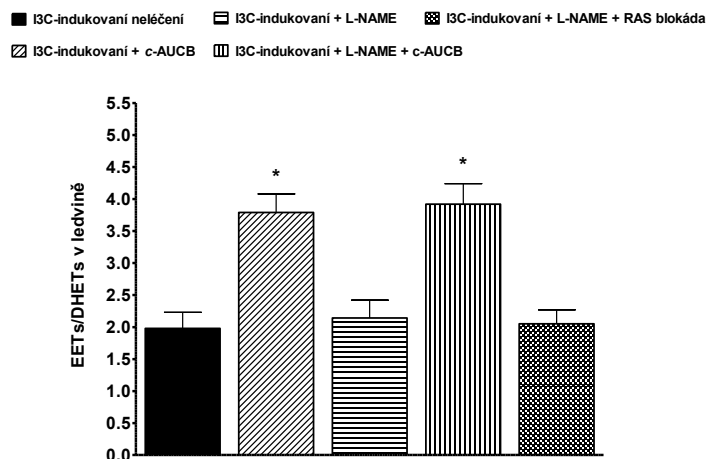


Graf č. 16: Hladiny epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) (A a C) a dihydroxyeikosatrienových kyselin (DHETs) (B a D) v ledvině u I3C-indukovaných (A a B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotným inhibítorem sEH c-AUCB nebo L-NAME a porovnání buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME, nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty.

c-AUCB léčba u neindukovaných potkanů měla tendenci ke snížení koncentrace DHETs ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany, ale bez dosažení statistické významnosti (192 ± 21 vs. 219 ± 19 ng/g tkáně) (graf 16D). Samotné podání L-NAME nebo kombinace RAS blokády a L-NAME léčby nezměnilo signifikantně poměr EETs/DHETs jak u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů (graf 17). Jak ukazuje graf 18, jsou koncentrace ANG II v plasmě a ledvině signifikantně vyšší u I3C-indukovaných neléčených potkanů než u neindukovaných neléčených potkanů (68 ± 5 vs. 25 ± 3 fmol/ml a 262 ± 14 vs. 86 ± 5 fmol/g, $p < 0,05$). c-AUCB léčba signifikantně nezměnila koncentrace ANG II v plasmě a ledvině jak u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů. Samotné podání L-NAME nebo kombinované léčby L-NAME s c-AUCB nebo RAS blokádou vedlo k signifikantnímu snížení

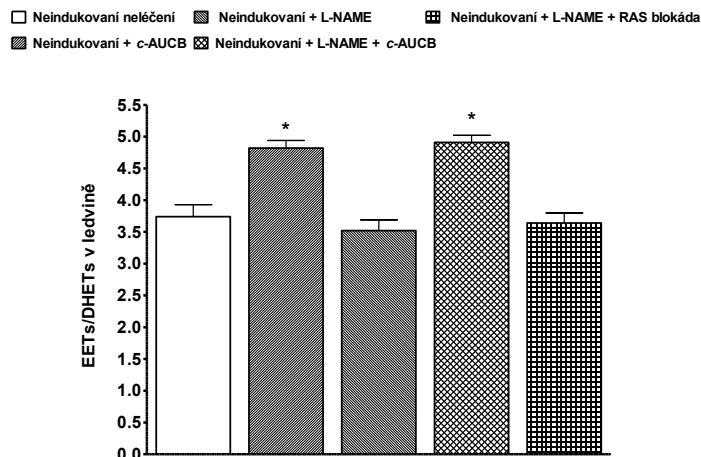
hodnot ANG II v plasmě a ledvině jak u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů.

A

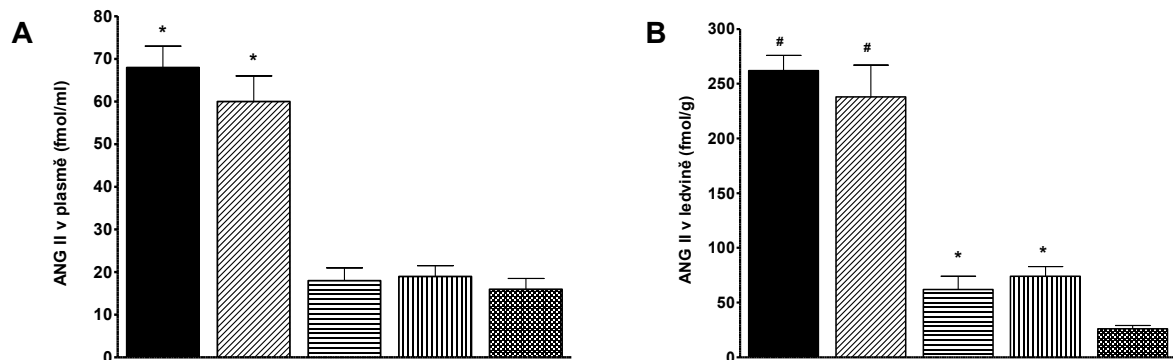


Graf č. 17: Poměr EETs/DHETs v ledvině u I3C-indukovaných a neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů a efekt léčby samotného inhibitoru sEH c-AUCB nebo L-NAME a buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. * $p < 0,05$ vs. neoznačené hodnoty.

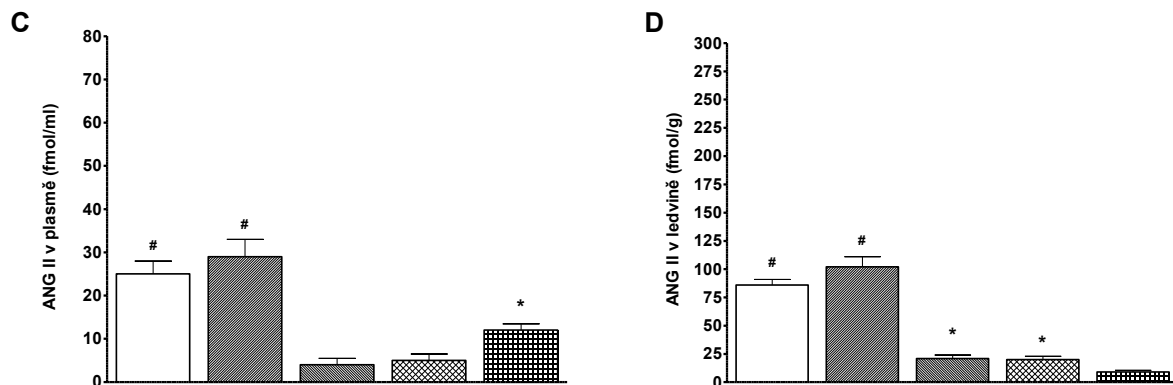
B



■ I3C-indukování neléčení ▨ I3C-indukování + L-NAME ▩ I3C-indukování + L-NAME + RAS blokáda
 ▤ I3C-indukování + c-AUCB ▧ I3C-indukování + L-NAME + c-AUCB



□ Neindukování neléčení ▨ Neindukování + L-NAME ▩ Neindukování + L-NAME + RAS blokáda
 ▤ Neindukování + c-AUCB ▧ Neindukování + L-NAME + c-AUCB



Graf č. 18: Hladiny ANG II v plasmě (A a C) a ledvině (B a D) u I3C-indukovaných (A a B) a neindukovaných (C a D) Cyp1a1-Ren-2 transgenických potkanů a efekt léčby samotným inhibítorem sEH c-AUCB nebo L-NAME a porovnání buď s kombinovanou léčbou c-AUCB a L-NAME nebo kombinovanou RAS blokádou a L-NAME léčbou. *p < 0,05 vs. neoznačené hodnoty, #p < 0,05 vs. všechny hodnoty.

3.5.3.2 Experimentální protokol č. 2: Vliv na hemodynamiku a exkreční funkce ledvin

Tabulka 4a a 4b sumarizuje data (průměr z 2 clearančových period) středního arteriálního tlaku, renální hemodynamiky a vylučování elektrolytů. I3C-indukování neléčení potkani vykazovali signifikantně nižší PKL ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany ($p < 0,05$). c-AUCB léčba zabránila snížení PKL u I3C-indukovaných potkanů, ale signifikantně nezměnila PKL u neindukovaných potkanů. Podání L-NAME vedlo k nápadné redukci PKL, ale současné podávání L-NAME a c-AUCB léčby nezabránilo jeho snížení u I3C-indukovaných ani u neindukovaných potkanů. Kombinovaná RAS blokáda a L-NAME

lčba nepatrně zmírnila snížení PKL u I3C-indukovaných a neindukovaných potkanů ve srovnání se zvířaty léčenými samotným L-NAME (v obou případech $p < 0,05$).

Je vidět, že I3C-indukování neléčení potkanů měli tendenci ke snížení glomerulární filtrace ve srovnání s neindukovanými neléčenými potkany, ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti.

Při c-AUCB léčbě tato tendence ve snížení GFR zmizela, u neindukovaných zvířat nebyla GFR ovlivněna. Podání L-NAME způsobilo značné snížení GFR u I3C-indukovaných i neindukovaných potkanů. Ani kombinovaná léčba c-AUCB a L-NAME ani kombinovaná RAS blokáda a L-NAME léčba nezmírnila snížení GFR u I3C-indukovaných nebo neindukovaných potkanů ve srovnání se zvířaty léčenými samotným L-NAME.

Tabulka č. 4a, 4b: Bazální hodnoty středního arteriálního tlaku, renálních funkcí a vylučovaných elektrolytů

Tabulka 4a:

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

Tabulka 4b:

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

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

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

3.5.4 Diskuze

První a nejdůležitější zjištění této studie ukazuje antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické léčby inhibítorem sEH c-AUCB u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s maligní hypertenzí, jež byly však kompletně zrušeny doprovodným podáváním NOS inhibitoru L-NAME. Stejně jako v předchozích studiích byl tento nedostatek antihypertenzních a renoprotektivních účinků při této kombinované léčbě přítomen i přes signifikantní zvýšení biologické dostupnosti epoxygenázových metabolitů vyjádřené poměrem EETs/DHETs. Naše předchozí (Honetchlägerová et al. 2011a; Honetchlägerová et al. 2011b) a současné výsledky ukazují, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují sníženou intrarenální dostupnost biologicky aktivních epoxygenázových metabolitů. Navíc intrarenální zvýšení poměru EETs/DHETs a tím i biologické dostupnosti EETs je výrazně vyšší u I3C-indukovaných než neindukovaných potkanů a nebylo vůbec ovlivněno současným podáním L-NAME. Tato data tak potvrzují fakt, že absence antihypertenzních a renoprotektivních účinků u I3C-indukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů léčených současně c-AUCB a L-NAME nemůže být způsobena nedostatkem biologické dostupnosti EETs.

Navíc naše data názorně ukázala, že I3C-indukovaní neléčení Cyp1a1-Ren-2 transgenní potkani mají výrazně vyšší hodnoty vylučování NO_x než neindukovaní neléčení potkani. Tato data tak značí, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují, podobně jako u jiných modelů ANG II-dependentní hypertenze, zvýšenou intrarenální aktivitu NOS pro udržení renální hemodynamiky, která působí proti vazokonstrikčnímu účinku zvýšených plasmatických a intrarenálních hodnot ANG II (Kopkan et al. 2007; Chin et al. 1998; Navar et al. 2000). Toto tvrzení je podpořeno dalšími studiemi (např. Patterson et al. 2008), který zjistil, že NO vzniklý z neuronální NOS vykazuje výrazný renální vazodilatační účinek po indukci hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 potkanů. V našich studiích jsme zjistili, že ačkoli chronická léčba c-AUCB u I3C-indukovaných potkanů vykazovala antihypertenzní účinky, vedla k signifikantní redukci ve vylučování NO_x ve srovnání I3C-indukovanými neléčenými potkany.

Tato data vzbuzují pochybnosti o původní hypotéze, že účinky inhibice sEH na krevní tlak jsou způsobeny zvýšenou dostupností NO (Hercule et al. 2009). Je také možné, že redukováný krevní tlak u I3C-indukovaných c-AUCB léčených Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů spíše vede ke snížení intrarenální aktivity NO následkem zmenšeného smykového stresu, což jak je známo, je významný stimul pro syntézu a uvolnění NO (Wilcox, 2000; Kone, 2004).

Podání L-NAME buď samostatně nebo v kombinaci s c-AUCB nebo s inhibitorem ACE a antagonistou AT₁ receptoru vedlo k významné redukci ve vylučování NO_x u I3C-indukovaných tak neindukovaných potkanů. Nedostatek antihypertenzních účinků kombinované c-AUCB a L-NAME léčby u I3C-indukovaných potkanů může být způsoben značnou redukcí endogenní biologické dostupnosti NO. Na druhou stranu u žádné z experimentálních skupin není signifikantní rozdíl ve vylučování 8-isoprostanů, peroxidu vodíku ani látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou. Tyto výsledky tak ukazují, že akutní změny v produkci reaktivních kyslíkových radikálů nehrají důležitou roli v patofyziologii časného stadia rozvoje maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů.

Když tato zjištění shrneme, tak antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické inhibice sEH pomocí c-AUCB u modelu ANG II-dependentní formy maligní hypertenze jsou spíše kriticky závislé na endogenní biologické dostupnosti NO než na přímých účincích zvýšené dostupnosti EETs. To je důležité zjištění této studie, které poskytuje vysvětlení výsledků studií prováděných za poslední 3 desetiletí, které odhalily, že EETs vykazují důležité biologické účinky v regulaci vaskulárního tonu a renálních tubulárních transportů sodíku (Cambell et al. 2010; Roman, 2002; Imig, 2012). V proximálním tubulu ledvin EETs inhibují reabsorpci sodíku blokováním Na⁺/H⁺ výměníku (Kopkan et al. 2012) a ve sběracích kanálcích ledvin také snižují reabsorpci sodíku blokováním epiteliálního sodíkového kanálu (Roman, 2002; Lee et al. 2010; Khan et al. 2014; Fan et al. 2015). Právě díky jejich působení na vylučování sodíku jsou připisovány EETs antihypertenzní účinky. Ukázalo se, že buď absolutní intrarenální nedostatek EETs nebo neschopnost patřičně zvýšit intrarenální hodnoty EETs jsou zapojeny do patofyziologie určitých forem ANG II-dependentních a sůl-senzitivních hypertenzí (Imig, 2012; Li et al. 2008; Zao et al. 2004; Imig et al. 2005). Narušená funkce EETs společně s ovlivněním cesty NO a endotelinu-1 přispívá k endoteliální dysfunkci u pacientů s esenciální hypertenzí (Bellien et al. 2013). Dále se ukázalo, že endoteliální EETs a NO se spoluúčastní na modulaci koronární myogenní konstrikce u samičího pohlaví myši. U samic WT (wild-type) a KO (sEH-knockout) myši se pomocí

snížení exprese enzymu sEH zvýšily vaskulární/tkáňové hodnoty EETs, což vedlo ke snížení koronární rezistence a následnému zvýšení průtoku krve koronárním řečištěm. V případě inhibice EETs byl tento efekt zrušen. Podání L-NAME naprosto setřelo rozdíly mezi WT a KO, což prokazuje vzájemnou interakci EETs a NO (Froogh et al. 2016). Vzhledem k předchozím studiím z různých zdrojů a také na základě našich výsledků z nedávných studií můžeme říct, že efekt chronické inhibice sEH na snížení krevního tlaku je závislý na přímém vazodilatačním účinku EETs a jejich přímém ovlivnění renálního tubulárního transportu sodíku (Imig, 2012; Huang et al. 2007; Sporková et al, 2011; Honetschlägerová et al. 2011a; Honetschlägerová et al. 2011b; Capdevilla et al. 2007). Nynější data však spíše naznačují, že antihypertenzní působení inhibice sEH je závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a NO. Nicméně pro popsání zúčastněných specifických mechanismů bude potřeba udělat ještě další studie.

Druhým hlavním zjištěním bylo, že podání L-NAME u I3C-indukovaných a neindukovaných potkanů bylo spojeno s výraznou redukcí plasmatických a renálních hodnot ANG II. Z toho důvodu náš hlavní zájem vedl k otázce: Jaké jsou základní mechanismy zodpovědné za potlačení zvýšených plasmatických a renálních hodnot ANG II u L-NAME léčených I3C-indukovaných a neindukovaných Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů?

První možné vysvětlení může být spojeno se zachovalou schopností negativní zpětné vazby baroreceptorového mechanismu při sekreci reninu a ANG II u L-NAME léčených I3C-indukovaných a neindukovaných potkanů (Castrop et al. 2010; Hall et al. 2010). Avšak proti tomuto tvrzení stojí naše výsledky získané od I3C-indukovaných potkanů neléčených L-NAME, kteří navzdory podobným hodnotám hypertenze nevykazovali žádné potlačení hodnot ANG II.

Druhé možné vysvětlení, z našeho pohledu pravděpodobnější, je spojeno s úlohou NO při sekreci reninu. Na základě současných dostupných informací, se zdá, že NO funguje jako stimulační faktor sekrece reninu (Castrop et al. 2010). Toto tvrzení by odpovídalo našim výsledkům, kdy podání L-NAME vedlo k supresi uvolnění reninu a následné supresi hodnot ANG II u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů. Avšak je důležité zmínit, že vzájemný vztah mezi krevním tlakem a parakrinním působením NO v řízení RAS systému je poněkud komplexní (Castrop et al. 2010; Schweda et al. 2011). Z tohoto důvodu bude nutné provést doplňující studie věnující se této problematice, jež jsou bohužel nyní nad rámec naší práce. Naše data týkající se plasmatických a renálních koncentrací ANG II mají velký význam, neboť předchozí studie předpokládají, že snížení biologické dostupnosti NO vede k tomu, že chybí protiváha aktivitě RAS. RAS systém může být potom nepřiměřeně aktivován, což by

vedlo k rozvoji a udržení hypertenze u tohoto modelu potkanů (Zatz et al. 1998; Torok, 2008; Kopkan et al. 2009). Existuje také možnost, že chronická inhibice NOS pomocí L-NAME dokonce aktivuje systémový a tkáňový RAS. Avšak tyto závěry byly získány ze studií, které hodnotily úlohu RAS nepřímo pomocí farmakologické blokády RAS (Zhou et al. 2005). Existuje pouze několik studií, které přímo měřily a prezentovaly buď hodnoty reninu, jako faktoru limitujícího míru aktivace RAS, nebo koncentrace ANG II, jako hlavního efektoru RAS. Ukázali tak, že aktivita RAS může být buď zvýšena (Zatz, 1998; Ribeiro et al. 1992; Salazar et al. 1992), nezměněna (Verhagen et al. 1999; Jover et al. 1993) nebo snížena (Navaro-Cid et al. 1994) při odezvě na chronickou inhibici NOS. Tato rozporuplná zjištění spíše podporují představu nekorigované nebo zvýšené aktivity RAS jako jeden z hlavních mechanismů zodpovědných za rozvoj hypertenze a následného poškození cílových orgánů v průběhu chronické inhibice NOS. Přestože ANG II byl významně snížen u L-NAME potkanů, blokáda RAS zabránila zvýšení krevního tlaku a vykazovala významné renoprotektivní účinky, což naznačuje, že RAS hraje stále důležitou roli v patofyziologii hypertenze a hypertenzního renálního poškození. Toto tvrzení je také podpořeno další studií (Verhagen et al. 1999), který ukázal, že citlivost k záporným účinkům endogenního ANG II v rozvoji renálního poškození je zvýšena v průběhu chronické inhibice NOS navzdory nezměněným nebo dokonce potlačeným hodnotám ANG II.

Avšak plasmatické a renální hodnoty ANG II jsou v naší studii potlačeny po 3 dnech inhibice NOS, což může být i přiměřená fyziologická odpověď na zvýšený krevní tlak a renální perfuzní tlak u L-NAME potkanů, která alespoň částečně nahrazuje absenci vazodilatačního a natriuretického působení NO u L-NAME léčených potkanů. Vezmeme-li v úvahu důležitost aktivace RAS v patofyziologii maligní hypertenze, především u Cyp1a1-Ren-2 transgenických potkanů (Husková et al. 2010; Mitchell et al. 2006; Erbanová et al. 2009; Howard et al. 2012), je nutné podotknout, že bez kompenzační suprese ANG II by vážnost hypertenze a renální dysfunkce byla mnohem výraznější.

Zvláštní zájem naší studie směřoval k farmakologické blokáde RAS systému u L-NAME léčených potkanů, u kterých došlo k významné redukci ANG II (koncentrace ANG II v ledvině byly dokonce podstatně nižší než u neléčených neindukovaných potkanů), normalizaci krevního tlaku, ale nezabránilo snížení renálních hemodynamických parametrů u I3C-indukovaných stejně jako neindukovaných potkanů. Tato zjištění nás ujistila v tom, že intrarenální NO nejen že působí proti vazokonstrikčnímu účinku ANG II, ale také se fyziologicky uplatní svými výraznými renálními vazodilatačními účinky nutnými k udržení renální hemodynamiky (Wilcox, 2000; Kone, 2004).

3.5.5 Závěr

Naše výsledky ukazují, že antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické inhibice sEH u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s maligní hypertenzí jsou kompletně zrušeny při současném podávání inhibitoru NOS L-NAME. Tato zjištění ukázala, že antihypertenzní působení inhibitoru sEH u ANG II-dependentní maligní formy hypertenze je závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a NO a podpořilo tak názor, že NO hraje důležitou roli zprostředkovávající antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické inhibice sEH.

3.6 Souhrnná diskuze

První hypotézou, kterou jsme zkoumali, bylo, že podání inhibitoru sEH, *cis*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyl-oxy]-benzoové kyseliny (*c*-AUCB) (Hwang et al. 2007), zmírní rozvoj hypertenze a zhoršené renální funkce u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí. Tato hypotéza byla potvrzena. V první studii klesl krevní tlak po podání inhibitoru sEH *c*-AUCB, což bylo potvrzeno telemetrickým měřením. Je důležité zmínit, že *c*-AUCB léčba nezměnila aktivitu RAS v plasmě ani ledvině, a přesto došlo ke snížení tlaku, byly tedy ovlivněny mechanismy, které tento účinek zprostředkují (viz. kapitola 3.3.4). Poškození ledvin se projevilo funkčně proteinurií a histologicky glomerulosklerózou a tubulointersticiálním poškozením. Léčba inhibitorem sEH ovlivnila příznivě jak funkční parametry v ledvinách, tak histologické změny. Došlo k normalizaci průtoku krve ledvinou a signifikantnímu poklesu proteinurie. Navíc *c*-AUCB léčba zabránila počáteční retenci sodíku a zvýšila exkreci sodíku bez významného efektu na glomerulární filtraci u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s neléčenými (viz. kapitola 3.3.4). Naše data tak potvrzují, že EETs nezasahují jenom do regulace vaskulárního tonu, ale ovlivňují přímo tubulární transport sodíku v ledvinách. Histologické změny v ledvinách se při léčbě *c*-AUCB také rozvinuly v podstatně menší míře.

Svémi experimenty jsme tak ověřili účinnost inhibitoru sEH pomocí monitorování krevního tlaku a renálních funkcí u Cyp1a1-Ren-2 transgenních potkanů s indukovatelnou hypertenzí a první cíl práce jsme splnili.

Naše druhá hypotéza, že inhibice sEH obnoví tlakovou natriurézu v ledvinách a tím přispěje ke snížení hypertenze a následnému poškození cílových orgánů, zejména ledvin a srdce, se potvrdila. Chronická inhibice aktivity sEH pomocí *c*-AUCB nejen že zabránila snížení PKL,

ale také lépe udržela autoregulaci PKL a GFR při daných RAT u I3C-indukovaných potkanů než u I3C-indukovaných neléčených potkanů. Dále chronická c-AUCB léčba signifikantně zlepšila sklon křivky tlakové natriurézy u I3C-indukovaných potkanů ve srovnání s I3C-indukovanými neléčenými potkany. Toto je pravděpodobně hlavní mechanismus zodpovědný za antihypertenzní účinky chronické inhibice sEH c-AUCB u ANG II-dependentní formy maligní hypertenze (viz. kapitola 3.4.3.1).

Poškození ledvin jako cílového orgánu bylo již diskutováno v předchozí kapitole. Pokud jde o postižení srdce, u neléčených I3C-indukovaných potkanů byla prokázána srdeční hypertrofie. Vzhledem k délce protokolů nedošlo u našich experimentálních zvířat k renálnímu ani srdečnímu selhání. Je pravda, že toto by mohlo být považováno za slabinu našich experimentů. U maligní hypertenze je však obtížné provádět dlouhodobé pokusy, zejména z důvodu velké úmrtnosti kontrolních neléčených I3C-indukovaných skupin. Pokud je nám známo, jediná studie s dlouhodobým pozorováním (12 týdnů), byla publikována v r. 2009 (Peters et al. 2009), ale k indukci byla použita poloviční dávka I3C a nebyl hodnocen tlak ani parametry poškození ledvin. Navíc nebyl zkoumán vliv jakékoliv léčby. Pokud jde o hodnocení srdečního poškození, výsledky byly podobné jako v našich studiích, nedomníváme se tedy, že by prodloužení experimentů přineslo zcela odlišné poznatky, i když vyloučeno to samozřejmě není.

Léčba c-AUCB v našich pokusech výrazně zmírnila rozvoj renálního poškození a hypertenzi vyvolané srdeční hypertrofie (viz. kapitola 3.4.3.2). Tímto jsme splnili druhý cíl práce. Naši třetí hypotézou bylo, že vazodilatační účinky eikosanoidů jsou převážně způsobeny jejich schopností aktivovat endoteliální NO syntázu (eNOs) s následným uvolněním NO do vaskulatury. V tomto směru nelze naše výsledky prohlásit za zcela jednoznačné ani za jednoduše interpretovatelné. Základní a nezpochybnitelnou informací je zjištění, že podání L-NAME neovlivnilo produkci EETs, ani poměr EETs/DHETs. Změna produkce nebo dostupnosti EETs nemůže tedy být příčinou pozorovaných výsledků.

Již v úvodní studii jsme zjistili, že vylučování nitrátů a nitritů močí jako ukazatelů produkce NO v ledvině se neliší po podání c-AUCB od hodnot u neléčených potkanů, což hovoří proti této hypotéze. V tomto uspořádání měli neléčení i léčení I3C-indukovaní potkani stejné množství nitritů i nitrátů v moči a spíše nižší než neindukovaní (tabulka č. 1, kapitola 3.3.4.1). Zaměřili jsme se tedy časné stadium rozvoje hypertenze ihned po indukci.

Při akutním třídním sledování měli neléčení I3C-indukovaní potkani výrazně zvýšené vylučování NO_x močí, ale přesto se u nich rychle rozvíjela hypertenze. Podání c-AUCB snížilo NO_x v moči na méně než polovinu a snížilo krevní tlak. Jak jsme již uvedli dříve,

pokles NO je pravděpodobně důsledkem snížení smykového tření při snížení tlaku a nemá za následek sníženou účinnost blokády sEH. L-NAME výrazně snížil dostupnost NO, což zcela eliminovalo příznivé účinky blokády sEH, ale nezrušilo příznivý efekt blokády RAS, přestože hodnoty NO zůstaly při kombinaci L-NAME a trandolaprilu s losartanem stejně nízké (viz. kapitola (tabulka č. 3, kapitola 3.5.3.1).

Tato data vzbuzují pochybnosti o původní hypotéze, že účinky inhibice sEH na krevní tlak jsou způsobeny zvýšenou produkcí NO (Hercule et al. 2009). Hypotéza číslo 3 se tedy nepotvrdila.

Z našich výsledků však přesto vyplývá velmi těsný vztah dostupnosti NO a účinku EETs. Z grafu č. 14 (viz. kapitola 3.5.3.1) plyne, že dostupnost NO je důležitá jak pro zpomalování rozvoje hypertenze po indukci, tak pro udržení normálního tlaku u neindukovaných potkanů, protože L-NAME vede během jednoho dne ke stejné hypertenzi, která se po indukci jinak rozvíjí 3 dny. Navíc naše data ukázala, že I3C-indukovaní neléčení Cyp1a1-Ren-2 transgenní potkani mají výrazně vyšší hodnoty vylučování NO_x než neindukovaní neléčení potkani v časném stadiu rozvoje hypertenze, i když později tento rozdíl mizí (tab.1). Tato data tak značí, že I3C-indukovaní neléčení potkani vykazují, podobně jako u jiných modelů ANG II-dependentní hypertenze, zvýšenou intrarenální aktivitu NOS pro udržení renální hemodynamiky, která působí proti vazokonstrikčnímu účinku ANG II.

Podání L-NAME také potlačilo účinek inhibice sEH, pokud jde o vliv na krevní tlak a frakční exkreci sodíku, což znamená, že c-AUCB sice nezvyšuje podle našich výsledků dostupnost NO, ale její účinek je přesto touto dostupností podmíněn.

Když tato zjištění shrneme, tak antihypertenzní a renoprotektivní účinky chronické inhibice sEH pomocí c-AUCB u modelu ANG II-dependentní formy maligní hypertenze jsou spíše závislé na endogenní biologické dostupnosti NO než na přímých účincích zvýšené dostupnosti EETs. Nicméně pro popsání specifických mechanismů, které se na tom podílejí, bude potřeba udělat ještě další studie. Přesto můžeme prohlásit, že třetí cíl, tedy zjistit, zda snížení krevního tlaku pomocí inhibitoru sEH je způsobeno EETs zprostředkovanou zvýšenou biologickou dostupností NO, a blíže popsat úlohu intrarenální interakce CYP metabolitů s RAS a NO v patofyziologii ANG II-dependentní formy maligní hypertenze, jsme splnili.

3.7 Souhrn

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

Antihypertenzní účinky inhibítoru sEH jsou u ANG II-dependentní formy maligní hypertenze závislé na interakci endogenní biologické dostupnosti EETs a NO. Snížení krevního tlaku a renoprotektivní účinky léčby inhibítorem sEH byly zcela zrušeny zablokováním tvorby NO pomocí L-NAME. Blokáda sEH je účinná v krátké době i u maligní hypertenze a mohla by tedy představovat jednu z cest vývoje nových antihypertenziv.

3.8 Summary

Treatment with the sEH inhibitor c-AUCB substantially attenuates development of malignant hypertension and improves the impaired renal function in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. It seems that the renal mechanisms are likely responsible for the antihypertensive effect of c-AUCB treatment. Lowering of blood pressure leads to the reduction of heart hypertrophy and kidney interstitial injury.

Antihypertensive actions of sEH inhibitor in this ANG II-dependent form of malignant hypertension are dependent on the interactions of endogenous bioavailability of EETs and NO. Blood pressure lowering and renoprotective actions of the treatment with sEH inhibitor are completely abolished after blockade of nitric oxide production with L-NAME.

In a short time, the sEH blockade is effective even in malignant hypertension, so thus it could be one of the ways in the development of new antihypertensive drugs.

Literatura

1. Ai D, Fu Y, Guo D, Tanaka H, Wang N, Tang C, Hammock BD, Shyy JY & Zhu Y (2007). Angiotensin II up-regulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9018–9023.
2. Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Sep;44(9):914-9.
3. Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, Lucas D, Monteil C, Gutierrez L, Vendeville C, Dreano Y, Mercier A, Thuillez C, Joannides R. Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered nitric oxide and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation.* 2012 Mar 13; 125(10):1266-75.
4. Bellien J, Joannides R. Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2013 Mar; 61(3):188-96.
5. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* 2007; 49:590–596.
6. Campbell DJ, Karam H, M'enard J, Bruneval P & Mullins JJ. Prorenin contributes to angiotensin peptide formation in transgenic rats with rat prorenin expression targeted to the liver. *Hypertension* 54, 2009; 1248–1253.
7. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium dependent response. *Pflugers Arch* 2010; 459:881–895.
8. Capdevila JH, Falck JR & Imig JD. Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension. *Kidney Int* 72, 2007; 683–689
9. Capdevila J and Wang W. Role of Cyp-epoxygenase in regulating renal membrane transport and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013 Mar; 22(2): 163–169.

10. Carlström M, Wilcox CS, Arendshorst WJ. Renal autoregulation in health and disease. *Physiol Rev.* 2015 Apr; 95(2):405-511.
11. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 2010; 90:607–673.
12. Cowley AW, Jr, Roman RJ. The role of the kidney in hypertension. *JAMA.* 1996; 275:1581–1589.
13. Cowley AW Jr, Abe M, Mori T, O'Connor PM, Ohsaki Y, Zheleznova NN. Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion, and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Feb 1;308(3):F179-97.
14. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, Kim HS, Smithies O, Le TH, Coffman TM. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 21;103(47):17985-90.
15. Čertíková Chábová V, Kramer HJ, Vaněčková I, Vernerová Z, Eis V, Tesař V, et al. Effects of chronic cytochrome P-450 inhibition on the course of hypertension and end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Vascul Pharmacol* 2007; 47:145–149.
16. Čertíková Chábová V, Walkovska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kujal P, Vernerová Z, et al. Combined inhibition of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation and epoxyeicosatetraenoic degradation attenuates hypertension and hypertension-induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Clin Sci* 2010; 118:617–632
17. Červenka L, Wang CT & Navar LG. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 274, 1998; F940–945.

18. Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 2011; 111:6130–85.
19. Dos Santos EA, Dahly-Vernon AJ, Hoagland KM & Roman RJ. Inhibition of the formation of EETs and 20-HETE with 1-aminobenzotriazole attenuates pressure-natriuresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, 2004; R58–R64
20. Elmarakby AA. Reno-protective mechanisms of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):R321-30.
21. Elmarakby AA, Faulkner J, Pye C, Rouch K, Alhashim A, Maddipati KR, Baban B. Role of haem oxygenase in the renoprotective effects of soluble epoxide hydrolase inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Oct; 125(7):349-59.
22. Erbanová M, Thumovaá M, Husková Z, Vaněčková I, Vaňourková Z, Mullins JJ, et al. Impairment of the autoregulation of renal hemodynamics and of the pressure-natriuresis relationship precedes the development of hypertension in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 2009; 27:575–586.
23. Fan F, Muroya Y, Roman RJ. Cytochrome P450 eicosanoids in hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Jan; 24(1): 37–46.
24. Fan F, Ge Y, Lv W, Elliott MR, Muroya Y, Hirata T, Booz GW, Roman RJ. Molecular mechanisms and cell signaling of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular pathophysiology *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016 Jun 1; 21:1427-63.
25. Fang X, Kaduce TL, Weintraub NL, Harmon S, Teesch LM, Morisseau C, Thompson DA, Hammock BD, Spector AA. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14867-74.

26. Ferrão FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World J Nephrol.* 2014 Aug 6;3(3):64-76.
27. Fleming I, Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis.. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007 Jan; 82(1-4):60-7.
28. Froogh G, Qin J, Kandhi S, Le Y, Jiang H, Luo M, Sun D, Huang A. Female-favorable attenuation of coronary myogenic constriction via reciprocal activations of epoxyeicosatrienoic acids and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Jun 1; 310(11):H1448-54.
29. Fyhrquist F., Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008, 264, p. 224–236.
30. Graciano ML, Mouton CR, Patterson ME, Seth DM, Mullins JJ & Mitchell KD. Renal vascular and tubulointerstitial inflammation and proliferation in Cyp11a1-Ren2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, 2007; F1858–1866.
31. Gurley SB, Riquier-Brison AD, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, Snouwaert JN, Le TH, McDonough AA, Koller BH, Coffman TM. AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab.* 2011 Apr 6;13(4):469-75.
32. Guyton AC, Coleman TG, Fourcade JC, Navar LG. Physiologic control of arterial pressure. *Bull N Y Acad Med.* 1969 Sep;45(9):811-30.
33. Guyton AC, Hall JE. Local and humoral control of tissue blood flow. *Textbook of Medical Physiology*, Saunders Company. 2011; p.191-282, p.213-228.
34. Hall JE, Guyton AC, Smith MJ Jr & Coleman TG. Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin. *Am J Physiol Renal Physiol* 239, 1980, F271–F280.

35. Hall JE, Brands MW. The renin-angiotensin-aldosterone system: renal mechanisms and circulatory homeostasis.. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. The kidney: physiology and pathophysiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. pp. 1009–1046
36. Heller J. Funkce ledvin a močení. In: Přehled lékařské fyziologie (Ganong, W. F.: Review of Medical Physiology, 16th ed., Prentice Hall International Inc.), edited by Herget J. Jinočany: nakladatelství a vydavatelství H&H, 1995, p. 580-604.
37. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, da Costa Goncalves ACh, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jan;29(1):54-60.
38. Honetschlägerová Z, Husková Z, Vaňourková Z, Sporková A, Kramer HJ, Hwang SH, Tsai HJ, Hammock BD, Imig JD, Červenka L, Kopkan L. Renal mechanisms contributing to the antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Physiol.* 2011a Jan 1;589(Pt 1):207-19.
39. Honetschlägerová Z, Sporková A, Kopkan L, Husková Z, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Kujal P, Vernerová Z, Chábová VC, Tesař V, Červenka L. Inhibition of soluble epoxide hydrolase improves the impaired pressure-natriuresis relationship and attenuates the development of hypertension and hypertension-associated end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2011b Aug;29(8):1590-1601.
40. Honetschlägerová Z, Kitada K, Husková Z, Sporková A, Kopkan L, Bürgelová M, Varcabová Š, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Kujal P, Vernerová Z, Červenka L. Antihypertensive and renoprotective actions of soluble epoxide hydrolase inhibition in ANG II-dependent malignant hypertension are abolished by pretreatment with L-NAME. *J Hypertens.* 2013 Feb;31(2):321-32.

41. Hoopes S.L., Artiom Gruzdev, Matthew L. Edin, Joan P. Graves, J. Alyce Bradbury, Gordon P. Flake, Fred B. Lih, Laura M. DeGraff, and Darryl C. Zeldin. Generation and characterization of epoxide hydrolase 3 (*EPHX3*)-deficient mice. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175348.
42. Howard CG, Mitchell KD. Renal functional responses to selective intrarenal renin inhibition in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with ANG II-dependent malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):F52-9.
43. Huang H, Morisseau C, Wang J, Yang T, Falck JR, Hammock BD & Wang MH. Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, 2007, F342–349.
44. Huang L, Howard CG, Mitchell KD. Chronic direct renin inhibition with aliskiren prevents the development of hypertension in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent hypertension. *Am J Med Sci*. 2012 Oct;344(4):301-6.
45. Husková Z, Vaňourková Z, Erbanová M, Thůmová M, Opočenský M, Mullins JJ, Kramer HJ, Bürgelová M, Červenka L. Inappropriately high circulating and intrarenal angiotensin II levels during dietary salt loading exacerbate hypertension in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2010 Mar;28(3):495-509.
46. Hwang SH, Tsai HJ, Liu JY, Morisseau C & Hammock BD. Orally bioavailable potent soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J Med Chem*. 2007 Aug 9;50(16):3825-40.
47. Hye Khan MA, Pavlov TS, Christain SV, Neckář J, Staruschenko A, Gauthier KM, Capdevila JH, Falck JR, Campbell WB, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acid analogue lowers blood pressure through vasodilation and sodium channel inhibition. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Oct;127(7):463-74.
48. Chin SY, Wang CT, Majid DSW, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol* 1998; 274: F876–F882.

49. Imig JD, Pham BT, LeBlanc EA, Reddy KM, Falck JR, Inscho EW. Cytochrome P450 and cyclooxygenase metabolites contribute to the endothelin-1 afferent arteriolar vasoconstrictor and calcium responses. *Hypertension*. 2000 Jan; 35(1 Pt 2):307-12.
50. Imig JD, Zhao X, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Enhanced renal microvascular reactivity to angiotensin II in hypertension is ameliorated by the sulfonimide analog of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *J Hypertens* 2001; 19:983–992.
51. Imig JD, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilatation in response to bradykinin. *J Vasc Res* 2001; 38:247–255.
52. Imig JD. Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F496-503.
53. Imig JD. Cardiovascular therapeutic aspects of soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 24, 2006; 169–188.
54. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov*.2009 Oct; 794-805.
55. Imig JD. Targeting epoxides for organ damage in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56:329–335.
56. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev*. 2012 Jan;92(1):101-30.
57. Imig JD, Walsh KA, Khan MAH, Nagasawa T, Cherian-Shaw M, Shaw SM, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition and peroxisome proliferator activated receptor γ agonist improve vascular function and decrease renal injury in hypertensive obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Dec; 237(12): 1402–1412.

58. Inceoglu B, Schmelzer KR, Morisseau C, Jinks SL & Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82, 2007;42 -49.
59. Ito O, Roman RJ. Regulation of P-450 4A activity in the glomerulus of the rat. *Am J Physiol*. 1999 Jun; 276(6 Pt 2):R1749-57.
60. Ivy JR, Bailey MA. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *J Physiol*. 2014 Sep 15;592(18):3955-67.
61. Iyer A, Kauter K, Alam MdA, Hwang SH, Morisseau Ch, Hammock BD, Brown L. Pharmacological Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Ameliorates Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012: 758614.
62. Jellinck PH, Forkert PG, Riddick DS, Okey AB, Michnovicz JJ, Bradlow HL. Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. 1993; 45: 1129-1136.
63. Jiang JG, Chen RJ, Xiao B, Yang S, Wang JN, Wang Y, Cowart LA, Xiao X, Wang DW & Xia Y. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase activity through phosphorylation in response to epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82, 2007; 162–174.
64. Jiang H, Quilley J, Doumad AB, Zhu AG, Falck JR, Hammock BD, Stier CT Jr, Carroll MA. Increases in plasma trans-EETs and blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Jun; 300(6):H1990-6
65. Jíchová Š, Kopkan L, Husková Z, Doleželová Š, Neckář J, Kujal P, Vernerová Z, Kramer HJ, Sadowski J, Kompanowska-Jeziarska E, Reddy RN, Falck JR, Imig JD, Červenka L. Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates the development of

- malignant hypertension, but does not reverse it once established: a study in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2016 Oct;34(10):2008-25.
66. Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension* 1993; 21:944–948.
 67. Jung O, Brandes RP, Kim IH, Schweda F, Schmidt R, Hammock BD, Busse R & Fleming I. Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 45, 2005; 759–765.
 68. Just A. Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R1–R17.
 69. Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, et al. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 2001; 276:36727–36733.
 70. Kim J, Yoon SP, Toews ML, Imig JD, Hwang SH, Hammock BD, Padanilam BJ. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Jan 15; 308(2):F131-9.
 71. Kobori Hiroyuki, Masaomi Nangaku, L. Gabriel Navar and Akira Nishiyama. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacological Reviews* September 2007, 59 (3) 251-287.
 72. Koeners MP, Wesseling S, Ulu A, Sepulveda RL, Morisseau C, Braam B, Hammock BD, Joles JA. Soluble epoxide hydrolase in the generation and maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E691–E698.

73. Kopkan L, Kramer HJ, 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* 23, 2005; 1531–1539.
74. Kopkan L, Husková Z, Vaňourková Z, Thumová M, Škaroupková P, Červenka L, Majid DS. Superoxide and its interaction with nitric oxide modulates renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2007 Nov;25(11):2257-65.
75. Kopkan L, Červenka L. Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. *Physiol Res*. 2009; 58 Suppl 2:S55-67.
76. Kopkan L, Hess A, Husková Z, Červenka L, Navar LG, Majid DSW. High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol* 2010; 299:F656–F663.
77. Kopkan L, Husková Z, Sporková A, Varcabová Š, Honetschlägerová Z, Hwang SH, Tsai HJ, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Bürgelová M, Vojtíšková A, Kujal P, Vernerová Z, Červenka L. Soluble epoxide hydrolase inhibition exhibits antihypertensive actions independently of nitric oxide in mice with renovascular hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2012; 35(6):595-607.
78. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol* 2004; 24:299–315.
79. Kujal P, Čertíková Chábová V, Vernerová Z, Walkovska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Vaňourková Z, Husková Z, Opočenský M, Škaroupková P, Schejbalová S, Kramer HJ, Rakušan D, Malý J, Netuka I, Vaněčková I, Kopkan L, Červenka L. Similar renoprotection after renin-angiotensin-dependent and – independent antihypertensive therapy in 5/6-nephrectomized Ren-2 transgenic rats: are there blood pressure-independent effects? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37: 1159-1169.

80. Kujal P, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, Husková Z, Vernerová Z, Kramer HJ, Walkowska A, Kompanowska-Jezierska E, Sadowski J, Kitada K, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Červenka L. Inhibition of soluble epoxide hydrolase is renoprotective in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Mar; 41(3):227-37.
81. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurements in humans and experimental animals. Part 2: blood pressure measurements in experimental animals. *Hypertension* 2005; 45:299–310.
82. Layton AT. Recent advances in renal hemodynamics: insights from bench experiments and computer simulations. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 May 1;308(9):F951-5.
83. Lee CR, Imig JD, Edin ML, Foley J, DeGraff LM, Bradbury JA, Graves JP, Lih FB, Clark J, Myers P, Perrow AL, Lepp AN, Kannon MA, Ronnekleiv OK, Alkayed NJ, Falck JR, Tomer KB, Zeldin DC. Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice. *FASEB J*. 2010 Oct; 24(10):3770-81.
84. Li J, Carroll MA, Chander PN, Falck JR, Sangras B, Stier CT. Soluble epoxide hydrolase inhibitor, AUDA, prevents early salt-sensitive hypertension. *Front Biosci* 2008; 13:3480–3487.
85. Loch D, Hoey A, Morisseau C, Hammock BO & Brown L. Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 47, 2007;87–98.
86. Majid DSA, Navar LG. Blockade of distal nephron sodium transport attenuates pressure natriuresis in dogs. *Hypertension* 1994; 23:1040– 1045.

87. Manhiani M, Quigley JE, Knight SF, Tasoobshirazi S, Moore T, Brands MW, Hammock BD, Imig JD. Soluble epoxide hydrolase gene deletion attenuates renal injury and inflammation with DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F740–F748.
88. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jan;292(1):C82-97.
89. Meirer K, Steinhilber D, Proschak E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014 Jan;114(1):83-91.
90. Minich D. M. & Bland J. S. A review of the clinical efficacy and safety of cruciferous vegetable phytochemicals. *Nutr Rev* 65, 2007 Jun; 259–67.
91. Mitchell KD, Mullins JJ. Enhanced tubuloglomerular feedback in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Dec; 289(6):F1210-6.
92. Mitchell KD, Bagatell SJ, Miller CS, Mouton CR, Seth DM, Mullins JJ. Genetic clamping of renin gene expression induces hypertension and elevation of intrarenal angiotensin II levels of graded severity in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats. *JRAAS* 2006; 7:74–86.
93. 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: 361-370.
94. Navarro-Cid J, Sanchez A, Sáiz J, Ruilope LM, García-Estañ J, Romero JC, et al. Hormonal, renal and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol* 1994; 267: R1516–R1521.

95. Navar LG, Majid DSW. Interactions between arterial pressure and sodium excretion. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5:64–71.
96. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.* 1996 Apr;76(2):425-536.
97. Navar LG, Ichihara A, Chin SY, Imig JD. Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand* 2000; 168:139–147.
98. Navar LG. The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005 Sep;7(9):542-9.
99. Neckář J, Kopkan L, Husková Z, Kolář F, Papoušek F, Kramer HJ, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Malý J, Netuka I, Ošťádal 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* 2012; 122:513–525.
100. O'Connor PM, Cowley AW Jr. Modulation of pressure-natriuresis by renal medullary reactive oxygen species and nitric oxide. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Apr;12(2):86-92.
101. Ortiz RM, Graciano ML, Mullins JJ & Mitchell KD. Aldosterone receptor antagonism alleviates proteinuria, but not malignant hypertension in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, 2007; F1584 – 1591.
102. Olearczyk JJ, Quigley JE, Mitchell BC, Yamamoto T, Kim IH, Newman JW, et al. Administration of a substituted adamantyl urea inhibitor of soluble epoxide hydrolase protects the kidney from damage in hypertensive Goto-Kakizaki rats. *Clin Sci* 2009; 116:61–70.
103. Oyekan AO, Youseff T, Fulton D, Quilley J & McGiff JC (1999). Renal cytochrome P450 ω -hydroxylase and epoxygenase activity are differentially modified by nitric oxide and sodium chloride. *J Clin Invest* 104, 1131–1137.

104. Patterson ME, Mouton CR, Mullins JJ, Mitchell KD. Interactive effects of superoxide anion and nitric oxide on blood pressure and renal hemodynamics in transgenic rats with inducible malignant hypertension. *Oct; Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F754-F759.
105. Patterson ME, Mullins JJ, Mitchell KD. Renoprotective effects of neuronal NOS-derived nitric oxide and cyclooxygenase-2 metabolites in transgenic rats with inducible malignant hypertension. *Am J Physiol* 2008; 294: F205–F211.
106. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006 Jul; 86(3):747-803.
107. Peters J, Schlüter T, Riegel T, Peters BS, Beineke A, Maschke U, Hosten N, Mullins JJ, Rettig R. Lack of cardiac fibrosis in a new model of high prorenin hyperaldosteronism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Nov;297(5):H1845-52.
108. Peters B, Grisk O, Becher B, et al. Dose-dependent titration of prorenin and blood pressure in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats: absence of prorenin-induced glomerulosclerosis. *J Hypertens.* 2008; 26:102–109.
109. Peters BS, Dornaika R, Hosten N, et al. Regression of cardiac hypertrophy in Cyp11a1-Ren-2 transgenic rat. *J Magn Reson Imaging.* 2012; 36:373–378.
110. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21:1093–6.
111. Rettig R, Grisk O. The kidney as a determinant of genetic hypertension: evidence from renal transplantation studies. *Hypertension.* 2005 Sep; 46(3):463-8.
112. Ribeiro MO, Antune E, De Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20:298–303.

113. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002 Jan; 82(1):131-85.
114. Salazar FJ, Pinilla JM, Lo'pez F, Romero JC, Quesada T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1992; 20:113–117.
115. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.* 2013 Jan 18; 216(2):R1-R17.
116. Sasser JM, Moningka NC, Tsarova T, Baylis C. Nebivolol does not protect against 5/6 ablation/infarction induced chronic kidney disease in rats – comparison with angiotensin II receptor blockade. *Life Sci* 2012; 91:54–63.
117. Semple SJ, de Wardener HE. Effect of increased renal venous pressure on circulatory autoregulation of isolated dog kidneys. *Circ Res.* 1959; 7: 643-648.
118. Schweda F, Kurtz A. Regulation of renin release by local and systemic factors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2011; 161:1–44.
119. Spector AA, Hee-Yong Kim. Cytochrome P₄₅₀ epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr; 1851(4): 356–365.
120. Sporková A, Kopkan L, Varcabová S, Husková Z, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, 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: R1468–R1475.
121. Sporková A, Jíchová S, Husková Z, Kopkan L, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kramer HJ, Červenka L.

- Different mechanisms of acute versus long-term antihypertensive effects of soluble epoxide hydrolase inhibition: studies in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Dec;41(12):1003-13.
122. Sporková A, Reddy RN, Falck JR, Imig JD, Kopkan L, Sadowski J, Červenka L. Interlobular Arteries From 2-Kidney, 1-Clip Goldblatt Hypertensive Rats' Exhibit Impaired Vasodilator Response to Epoxyeicosatrienoic Acids. *Am J Med Sci*. 2016 May;351(5):513-9.
123. Sun P, Lin DH, Wang T, Babilonia E, Wang Z, Jin Y, Kemp R, Nasjletti A & Wang WH. Low Na intake suppresses expression of CYP2C23 and arachidonic acid-induced inhibition of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, 2006; F1192–1200.
124. Torok J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol Res* 2008; 57:813–825.
125. Vaněčková I, Kujal P, Husková Z, Vaňourková Z, Vernerová Z, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, Kramer HJ, Tesař V, Červenka L. Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35:382–392.
126. Vaňourková Z, Kramer HJ, Husková Z, Vaňečková I, Opočenský M, Chábová VC, Tesař V, Škaroupková P, Thůmová M, Dohnalová M, Mullins JJ & Červenka L. AT1 receptor blockade is superior to conventional triple therapy in protecting against end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *2006 J Hypertens* 2006; 24, 2465–2472.
127. V'eniart M, Whitworth CE, M'énard J, Sharp MGF, Gonzales MF, Bruneval P & Mullins JJ. Developmental studies demonstrate age-dependent elevation of renin activity in TGR(mRen2)27 rats. *Am J Hypertens* 8, 1995; 1167–1176.

128. Veselý J. Tlaková diuréza a arteriální hypertenze. Vydavatelství EPAVA, Olomouc. 2002; p. 51-60.
129. Verhagen AMG, Braam B, Boer P, Grone HJ, Koomans HA, Joles JA. Losartan-sensitive renal damage caused by chronic NOS inhibition does not involve increased renal angiotensin II concentrations. *Kidney Int* 1999; 56:222–231.
130. Wei Y, Lin DH, Kemp R, Yaddanapudi GS, Nasjletti A, Falck JR & Wang WH. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *J Gen Physiol* 124, 2004; 719–727.
131. Wilcox CS. L-Arginine-nitric oxide pathway.. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. *The kidney: physiology and pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. pp. 849–872.
132. Williams DE, Minolfa CP, Mullins JJ, Navar LG, Mitchell KD. AT1 receptor blockade prevents the increase in blood pressure and the augmentation of intrarenal ANG II levels in hypertensive Cyp11a1-Ren-2 transgenic rats fed a high salt diet. *Am J Med Sci* 2010; 339:356–361.
133. Wu CC, Gupta T, Garcia V, Ding Y, Schwartzman ML. 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications. *Cardiol Rev.* 2014 Jan-Feb;22(1):1-12.
134. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, Parker C, Graham L, Engler MM, Hammock BD, Zeldin DC & Kroetz DL. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 87, 2000; 992–998.
135. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32:958–964.

136. Zhao X, Yamamoto T, Newman JW, Kim IH, Watanabe T, Hammock BD, Stewart J, Pollock JS, Pollock DM & Imig JD. Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. *J Am Soc Nephrol* 15, 2004; 1244–1253.
137. Zhao L, Gao Y, Cao X, Gao D, Zhou S, Zhang S, Cai X, Han F, Wilcox CS, Li L, Lai EY. High-salt diet induces outward remodelling of efferent arterioles in mice with reduced renal mass. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016 Jul 25.
138. Zhou X, Frohlich ED. Differential effects of antihypertensive drugs on renal and glomerular hemodynamics and injury in the chronic nitric oxide-suppressed rat. *Am J Nephrol* 2005; 25:138–152.
139. Zicha J, Kuneš J, Vranková S, Jendeková L, Dobešová Z, Pintérová M, Pecháňová O. Influence of pertussis toxin pretreatment on the development of L-NAME-induced hypertension. *Physiol Res* 2009; 58:751–755.