

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Úloha renální dysfunkce v patofyziologii progresu chronického srdečního selhání: preklinické studie na zvířecích modelech.

The role of renal dysfunction in pathophysiology of congestive heart failure progression: preclinical animal studies.

Petr Kala

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Kardiologické klinice 2. LF UK a FNM a v Centru experimentální medicíny IKEM.

Školitel: prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.
Kardiologická klinika 2. LF UK a FNM

Konzultant: prof. MUDr. Luděk Červenka, CSc., MBA
Centrum experimentální medicíny, IKEM

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové Fyziologie a patofyziologie člověka dne v odhod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA
Fyziologický ústav 1. LF UK

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAUK č. 32218 a GAUK č. 68121.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5 (tel. 224 435 836).

Obsah

Obsah	3
Abstrakt.....	5
Abstract	6
1. Úvod do problematiky	7
1.1. Chronické srdeční selhání.....	7
1.2. Kardiovaskulární systém a ledviny.....	7
1.3. Eikosanoidy	8
1.3.1. Epoxyeikosatrienové kyseliny	9
1.3.2. 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina	9
2. Hypotézy a cíle disertační práce.....	11
3. Materiál a metodika	12
3.1. Pokusná zvířata - HanSD a TGR(Ren2)27 potkani.....	12
3.2. Chemikálie	12
3.2. Metody	13
3.2.1. Aorto-kavální píštěl	13
3.2.2. Echokardiografie.....	13
3.2.3. Tlakově-objemová analýza levé komory srdeční.....	13
4. Výsledky	15
4.1. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A).....	15
4.1.1. Hodnocení aktivity RAAS, SNS a CYP metabolitů a enzymů v časných fázích srdečního selhání u ACF TGR.....	15
4.1.2. Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na srdeční funkce u ACF TGR	15
4.1.3. Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na renální hemodynamiku a funkce u ACF TGR.....	16
4.1.4. Vliv dlouhodobé monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na mortalitu, albumiurii a srdeční funkce u ACF TGR.....	16
4.2. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi).....	18
4.2.1. Vliv monoterapie sEHi a kombinované léčby sEHi s ACEi na přežívání ACF TGR.....	18

4.2.2. Vliv monoterapie sEHi a kombinované léčby sEHi s ACEi na váhy orgánů a renální funkce u ACF TGR.....	18
4.2.3. Pohlavní rozdíly v mortalitě HanSD a TGR po ACF: efekt monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi s sEHi	19
5. Diskuze	21
5.1. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A)	21
5.1.1. Aktivita neurohumorálních systémů u srdečního selhání navozeného ACF.....	21
5.1.2. Vliv terapeutických režimů na přežívání.....	21
5.2. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi).....	22
5.3. Vliv monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání HanSD i TGR samic a samců po vytvoření ACF	23
6. Závěr	24
7. Souhrn	26
8. Summary	27
9. Použitá literatura	28
10. Přehled publikační činnosti.....	32

Úloha renální dysfunkce v patofyziologii progresu chronického srdečního selhání: preklinické studie na zvířecích modelech.

Abstrakt

Práce se zabývá úlohou a možnostmi farmakologického ovlivnění eikosanoidů, zejména kyselin epoxyeikosatrienových (EETs), epoxygenázových metabolitů kyseliny arachidonové (AA), u animálního modelu chronického srdečního selhání (CHSS) navozeného objemovým přetížením po vytvoření aorto-kavální píštěle (ACF) u hypertenzních transgenních potkanů (TGR). Potvrdili jsme sníženou tkáňovou koncentraci EETs v myokardu levé komory a v ledvině, pravděpodobně způsobenou zvýšenou degradací pomocí solubilní epoxid hydrolázy (sEH). Farmakoterapie perorálním analogem EET (EET-A) zlepšila přežívání ACF TGR oproti neléčené skupině, ale bez statisticky významného zlepšení při kombinaci EET-A s inhibítorem angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACEi). Příznivý vliv terapie EET-A byl dán zlepšením srdečních parametrů a změnšením plicní kongesce, nikoliv zmírněním renální dysfunkce. U ACF TGR samců (nikoli u samic) měla kombinace sEH inhibitoru (sEHi) s ACEi horší přežívání oproti monoterapii ACEi. Naše výsledky podporují další budoucí výzkum a možné využití farmakologického ovlivnění CYP-dependentního metabolismu AA, zejména analogů EETs, v terapii srdečního selhání a zdůrazňují význam testování nových farmakologických přístupů u obou pohlaví, včetně preklinických studií.

Klíčová slova

chronické srdeční selhání, chronické renální selhání, cytochrom P450, EET-A, epoxyeikosatrienové kyseliny, renin-angiotenzin-aldosteronový systém, solubilní epoxid hydroláza, tlakově-objemová analýza

The role of renal dysfunction in pathophysiology of congestive heart failure progression: preclinical animal studies.

Abstract

The thesis describes effects and pharmacological targets of eicosanoids, especially epoxyeicosatrienoic acids (EETs) that are epoxygenase metabolites of arachidonic acid (AA), in animal model of congestive heart failure (CHF) induced by volume overload via aorto-caval fistula (ACF) in hypertensive transgenic rats (TGR). Our data show that ACF TGR exhibits tissue deficiency of EETs in the left ventricle and kidney, probably mainly caused by increased EETs degradation by soluble epoxide hydrolase (sEH). Treatment by orally active EET analogue (EET-A) improved the survival rate in ACF TGR compared to placebo. However, after adding EET-A to angiotensin-convertase enzyme inhibitor (ACEi) treatment, the survival of ACF TGR only tended to improve compared with the effects of EET-A or ACEi given alone. The protective effects of EET-A treatment were mediated by improving cardiac parameters and reducing lung congestion, not dominantly by renal mechanisms. We also found that among male (not in female) the combination of sEH inhibitor (sEHi) and ACEi treatment worsened the mortality of ACF TGR compared to ACEi monotherapy. Our data support the notion that targeting the CYP-dependent epoxygenase pathway of AA should be considered in attempts to develop new pharmacological strategies for HF treatment and enhance the importance of testing the gender differences in pre- and clinical studies.

Keywords

chronic kidney disease, congestive heart failure, cytochrome P450, EET-A, epoxyeicosatrienoic acid, pressure-volume analysis, renin-angiotensin-aldosterone system, soluble epoxide hydrolase

1. Úvod do problematiky

1.1. Chronické srdeční selhání

Chronické srdeční selhání (CHSS) je jednou z nejvýznamnějších globálních příčin mortality a morbidit. Odhady prevalence uvádí 2-3 % v rozvinutých zemích s roční incidencí až 300 na 100 tis. obyvatel (Conrad *et al.* 2018; Metra & Teerlink 2017). Za poslední desetiletí se prevalence onemocnění v rozvinutých zemích zvýšila o 23 % (Conrad *et al.* 2018), je odhadováno, že do roku 2030 se má dále zvýšit až o 46 % a ještě více zatížit zdravotnické systémy (Savarese & Lund 2017).

Klinický průběh onemocnění je ve většině případů progresivní, ale nelineární, charakterizovaný epizodami akutních dekompenzací, i navzdory narůstající péči (Chaudhry & Stewart 2016). Prognóza pacientů s CHSS není příznivá, uvádí se roční mortalita od 6-7 % u stabilních pacientů s CHSS, přes 25 % u akutního nebo akutně dekompenzovaného CHSS, po 75 % u pokročilého či terminálního CHSS (Chaudhry & Stewart 2016; Metra & Teerlink 2017). Celkově je 5letá mortalita od diagnostikování CHSS kolem 50 %, což je horší než u většiny nádorových onemocnění (Riehle & Bauersachs 2019). ***Proto je urgentně potřeba vyvíjet nové farmakologické a nefarmakologické intervence vedoucí k udržení stabilní fáze CHSS a zlepšení prognózy pokročilého CHSS, k čemuž je zásadním předpokladem detailní znalost patofyziologie studovaná na animálních modelech.***

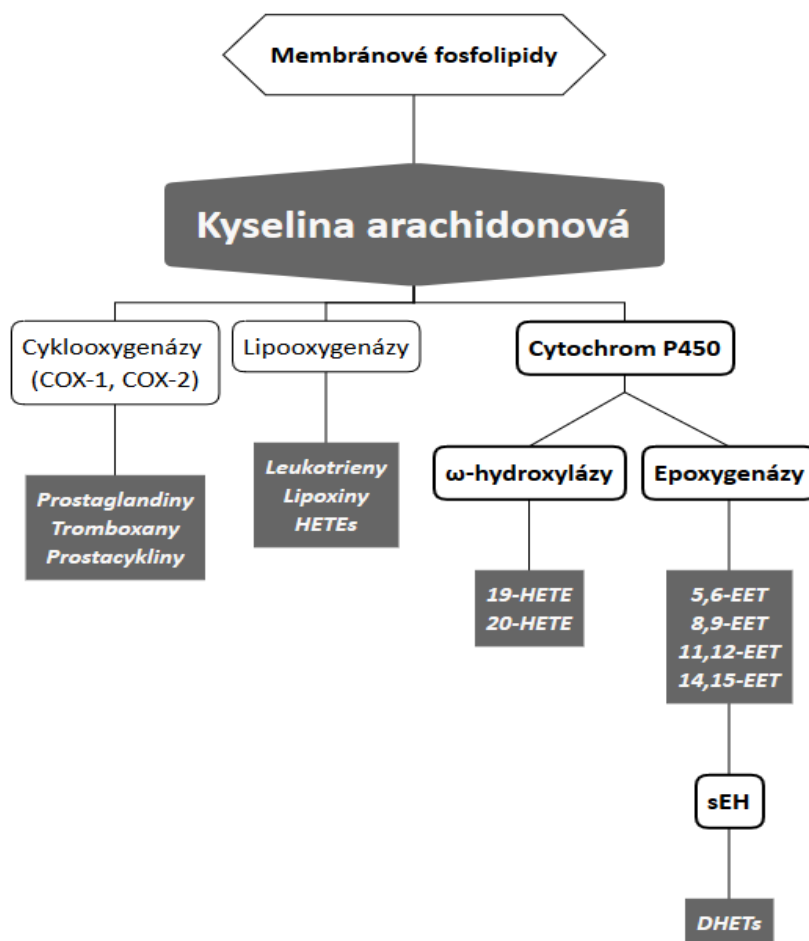
1.2. Kardiovaskulární systém a ledviny

Pacienti s CHSS mají často více komorbidit, včetně renální dysfunkce, uvádí se, že prevalence chronického onemocnění ledvin (CKD) s glomerulární filtrací (GFR) pod 60 ml/min/1,73m² u pacientů s CHSS je 40-50 % (McAlister *et al.* 2004; Van Deursen *et al.* 2014). Naopak pouze okolo 17 % pacientů s CHSS má normální filtrační frakci s GFR nad 90 ml/min/1,73m² (McAlister *et al.* 2004). GFR je nezávislým prognostickým prediktorem pro rozvoj i progresi kardiovaskulárních onemocnění, včetně CHSS (Damman *et al.* 2009). Více než 60 % pacientů s CKD mají nějakou formu kardiovaskulárního onemocnění a závažnost CKD silně

koreluje s prognózou. U pacientů s GFR pod 60 ml/min/1,73m² je riziko rozvoje CHSS 3krát větší než u zdravé populace (Kottgen *et al.* 2007).

1.3. Eikosanoidy

Kyselina arachidonová (AA), významná složka buněčných membránových fosfolipidů, je metabolizována 3 hlavními cestami - cyklooxygenázovou drahou na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany; lipoxygenázovou drahou na lipoxiny, leukotrieny a hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs) a enzymy z rodiny cytochromu P-450 - ω -hydroxylázami na hydroxyeikosatetraenové kyseliny (HETEs) a epoxygenázami na epoxyeikosatrienové kyseliny (EETs) (Obr. 1). Vzniklé produkty jsou dále upravovány β -oxidací, esterifikací a dalšími reakcemi a dávají tím vzniknout vícero aktivním metabolitům s rozmanitými funkcemi v organismu; hrají důležitou úlohu v regulaci krevního tlaku, při zánětlivých procesech, v regulaci vylučování sodíku i ledvinných, plicních a srdečních funkcí (Imig *et al.* 2022; Vacková *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2018).



Obr. 1 Metabolity kyseliny arachidonové.

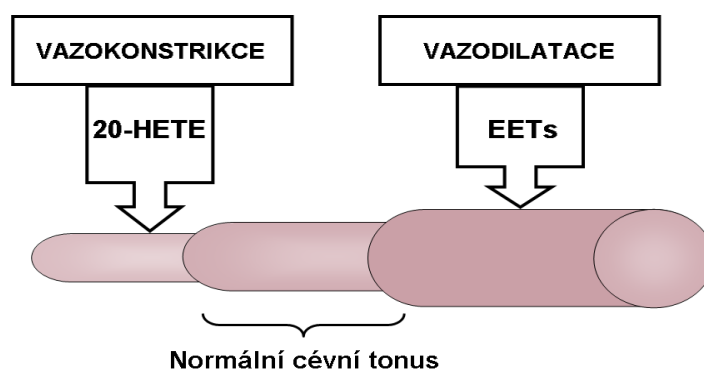
1.3.1. Epoxyeikosatrienové kyseliny

EETs jsou parakrinní látky s významnými vazodilatačními, natriuretickými a kardioprotektivními vlastnostmi (Imig *et al.* 2022). Rozlišujeme 4 základní izomery, podle umístění epoxidové skupiny, které vznikají z AA účinkem epoxygenáz třídy CYP2C a CYP2J: 5,6-EETs, 8,9-EETs, 11,12-EETs a 14,15-EETs. Jejich zastoupení se liší druhově i orgánově, a rovněž se mění v průběhu stárnutí (Imig 2019; Roman 2002). EETs jsou produkovány buňkami endotelu a působí zejména autokrinně a parakrinně na hladkou svalovinu cév. Limitací jejich biologického účinku je rychlé odbourávání solubilní epoxidovou hydrolázou (sEH) na biologicky neúčinné dihydroxyeikosatrienové kyseliny (DHETs) (Nayeem *et al.* 2010; Sudhahar *et al.* 2010).

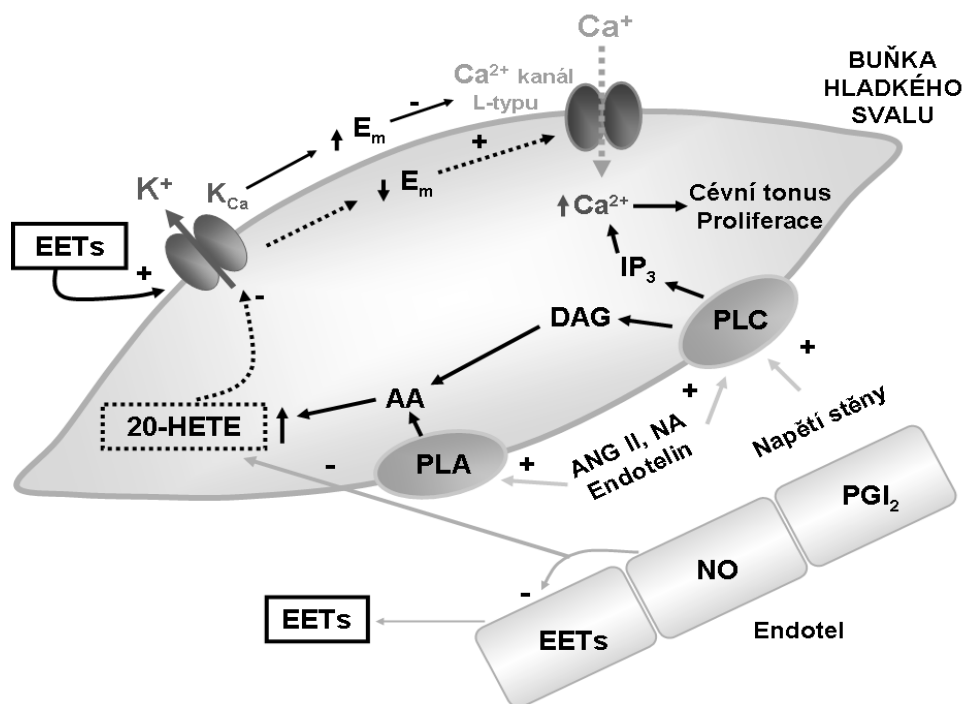
1.3.2. 20-hydroxyeikosatetraenová kyselina

Oproti EETs jsou účinky 20-HETE na kardiovaskulární systém komplexnější, protože jednak působí vazokonstrikčně a má tím pádem hypertenzní potenciál, na druhou stranu v ledvinách zvyšuje natriurézu.

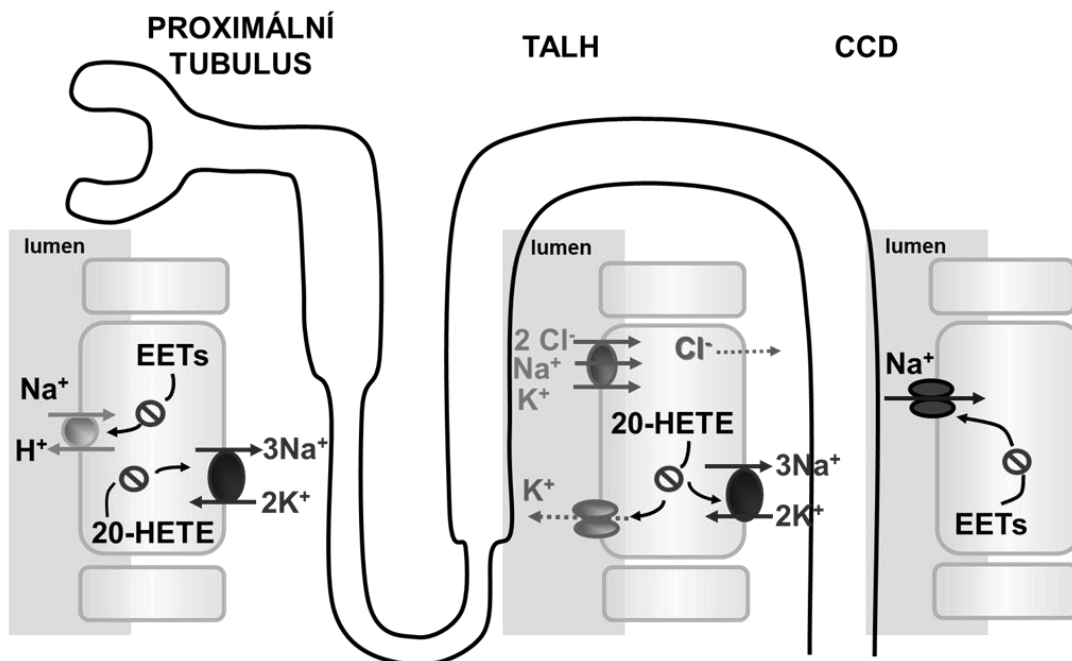
U experimentálních i genetických modelů hypertenze, srdečního i renálního selhání, je produkce a rovnováha EETs a 20-HETE narušena. Proto se předpokládá, že správně zvolené farmakologické ovlivnění těchto drah by mohlo vést k novým potenciálním terapeutickým možnostem (Imig *et al.* 2022; Kaseda *et al.* 2018).



Obr. 2 Vaskulární účinky EETs a 20-HETE.



Obr. 3 Mechanizmy působení EETs a 20-HETE na buňku hladkého svalu (upraveno dle Zhang et al. 2018). PLA – fosfolipáza A, PLC – fosfolipáza C, PGI₂ – prostaglandin I₂, IP₃ – inositoltrifosfát, DAG – diacylglycerol, E_m – membránové napětí



Obr. 4 Mechanizmy působení EETs a 20-HETE na nefron (upraveno dle Zhang et al. 2018). TALH – tlustý segment vzestupného raménka Henleho kličky, CCD – korová část sběracího kanálku

2. Hypotézy a cíle disertační práce

Na základě výše zmíněných aktuálních znalostí předpokládáme, že **zvýšení tkáňové dostupnosti EETs, navozené podáváním analogu EETs (EET-A) nebo inhibicí sEH (sEHi), zmírní rozvoj kardiální a renální dysfunkce alepší průběh a přežívání animálního CHSS.**

Cílem našeho preklinického projektu bylo **prokázat snížení tkáňové (kardiální a renální) dostupnosti biologicky aktivních EETs u animálního modelu CHSS (ACF TGR) a zhodnotit vliv farmakologických možností ovlivnění tohoto systému na přežívání, kardiální a renální funkce:**

- 1) ACF TGR + monoterapie **EET-A** vs. monoterapie **ACEi**, vs. kombinovaná terapie **ACEi + EET-A** a vs. **placebo** (voda)
- 2) ACF TGR + kombinovaná terapie **ACEi + sEHi** vs. monoterapie **ACEi** a vs. **placebo** (voda)

Dalším cílem bylo **zhodnotit pohlavní rozdíly v odpovědi na léčbu ACF TGR kombinovanou terapií ACEi + sEHi.**

3. Materiál a metodika

3.1. Pokusná zvířata - HanSD a TGR(Ren2)27 potkani

Potkani TGR(Ren2)27 (dále TGR) byli vyšlechtěni z Hannover Sprague-Dawley (dále HanSD) metodou mikroinjekce DBA/2J Ren2 úseku transgenní DNA (myší gen pro renin) do zralého čerstvě oplodněného oocytu HanSD potkana (Mullins *et al.* 1990). Vzhledem k tomu, že jsme se v našich projektech nezaměřovali přímo na zkoumání patofyziologie rozvoje srdečního selhání na podkladě extrémní aktivace RAAS, používali jsme heterozygotní zvířata, která vznikla zkřížením transgen-negativní HanSD samice s homozygotním TGR samcem, a která rozvíjejí mírnější hypertenzi s maximálním systolickým krevním tlakem ve věku devíti týdnů kolem 240 mmHg a nedochází u nich k srdečnímu selhání (Opočenský *et al.* 2004).

Všechna zvířata byla chována na základě platných směrnic a zavedené praxe v Centru experimentální medicíny Institutu Klinické a Experimentální Medicíny (IKEM, Praha). Zvířata byla chována v cyklu světlo/tma (12 h světlo a 12 h tma) a krmena standardní normoslanou, normoproteinemickou dietou (0,45% NaCl, 19–21% obsah proteinů) vyrobenou firmou SEMED (Praha, ČR) pro laboratorní potkany.

3.2. Chemikálie

Inhibitor ACE (ACEi): pro inhibici angiotenzin konvertujícího enzymu jsme použili běžně dostupné, klinicky užívané a ve vodě rozpustné farmakum Gopten 2 mg (Abbot, Praha, ČR) s účinnou látkou trandolapril, které bylo podáváno potkanům v pitné vodě *ad libitum*, v koncentraci 6 mg/l. Tato koncentrace byla v předešlých pracích naší laboratoře validovaná jako dostatečná k inhibici RAAS u tohoto modelu (Jíchová *et al.* 2016).

Analog 14,15-epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A): chemickým vzorcem sodium 2-(Z-(13-(3-pentyl)ureido)-tridec-8-enamido) malonát je zavedený analog EETs, vhodný pro *in vivo* experimenty (Imig *et al.* 2010). Podává se také v pitné

vodě, v koncentraci 10 mg/kg tělesné hmotnosti, jejíž účinnost byla ověřena farmakokinetickými *in vivo* studiemi (Khan *et al.* 2014; Walkowska *et al.* 2021).

cAUCB (sEHi): chemickým vzorcem cis-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)cyclohexyloxy] benzoová kyselina, je inhibitor sEH, jehož roztok jsme připravili rozpuštěním 26 mg krystalického cAUCB a 150 mg (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrinu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) v 5 ml etanolu (Penta, Praha, ČR). Roztok jsme 5 min sonikovali a poté doplnili do litru. Pro zachování zásaditého pH roztoku jsme přidali hydrogen uhličitán sodný (3 ml/l). Roztok byl podáván v pitné lahvi *ad libitum*. Tento protokol přípravy i dávka byly používány i v předešlých studiích naší laboratoře (Honetschlägerová *et al.* 2011b, 2011a; Sporková *et al.* 2011), v nichž jsme si ověřili, že koncentrace cAUCB je pro inhibici sEH dostatečná.

3.2. Metody

3.2.1. Aorto-kavální píštěl

Aorto-kavální píštěl (ACF) byla vytvořena mikrochirurgicky na podkladě původního popisu (Garcia & Diebold 1990) dle zavedeného protokolu v naší laboratoři (Melenovsky *et al.* 2011, 2012a) po ukončeném 8. týdnu života potkanů, po dalších dvou týdnech byla zahájena léčba.

3.2.2. Echokardiografie

Echokardiografie potkanů probíhala po 2, anebo 20 týdnech farmakoterapie na anestezovaných zvířatech (Thiopental, VAUB Pharma, ČR, dávka 50 mg/kg) přímo před invazivní tlakově-objemovou analýzou levé komory srdeční na animálním ultrazvukovém přístroji Vevo® 2100 Imaging System se sondou MS250S (13–24 MHz), (FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, ON, Canada) dle upraveného potkaního protokolu zavedeného v naší laboratoři (Melenovsky *et al.* 2012b).

3.2.3. Tlakově-objemová analýza levé komory srdeční

Invazivní tlakově-objemová analýza levé komory srdeční (pressure-volume analýza, P-V analýza) byla prováděna bezprostředně po echokardiografickém

vyšetření na stále iniciálně anestetizovaných potkanech. Protokol přípravy P-V analýzy a samotné hemodynamické měření parametrů LK byl adaptovaný dle původní práce na potkanech (Pacher *et al.* 2008). Po skončení měření byl pokus ukončen předávkováním zvířete vysokou dávkou Thiopentalu, který způsobil bezbolestné a nestresující utracení.

4. Výsledky

4.1. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A)

4.1.1. Hodnocení aktivity RAAS, SNS a CYP metabolitů a enzymů v časných fázích srdečního selhání u ACF TGR

Byl pozorován významný rozdíl v aktivitě CYP-dependentní epoxygenázové cestě metabolismu AA. V ledvině i v LK byla snížena zejména koncentrace 11,12-EETs a 14,15-EETs, která byla doprovázena významným zvýšením jejich biologicky inaktivních metabolitů (DHETs). Biologická dostupnost aktivních EETs, daná poměrem EETs / DHETs, byla v ledvině i v LK snížena o 65 % u skupiny TGR ACF oproti TGR kontrolám. Proteinová exprese enzymu zodpovědného za produkci EETs nebyla v ledvině ani v LK TGR ACF oproti TGR kontrolám významně ovlivněna, ale v LK TGR ACF byla oproti TGR kontrolám významně vyšší exprese proteinu sEH, enzymu dominantně degradujícího EETs na inaktivní DHETs.

4.1.2. Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na srdeční funkce u ACF TGR

Neléčení ACF TGR vykázali významně vyšší váhu plic než kontrolní TGR, což poukazuje na výraznou plicní kongesci. Monoterapie EET-A nenormalizovala žádný z váhových parametrů u ACF TGR. Naopak monoterapie ACEi i kombinace ACEi s EET-A významně snížili celkovou váhu srdce, váhu LK, PK i plic až na úroveň kontrolních TGR.

Neléčení ACF TGR měli echokardiograficky zvýšený systolický objem i srdeční výdej (důsledek píštěle), výrazně zvětšené rozměry LK i PK a snížení RWT (relative wall thickness), značící excentrickou hypertrofii. Dále byla u ACF TGR patrná systolická dysfunkce LK (měřená ejekční frakcí a frakčním zkrácením LK) s neporušenou systolickou funkcí PK (měřeno změnou plochy PK – fraction area change – FAC), oproti kontrolním TGR. Žádná z monoterapií nezabránila těmto

změnám, kombinovaná terapie ACEi a EET-A zmírnila srdeční hypertrofii (tloušťku přední a spodní stěny LK) u ACF TGR oproti neléčeným ACF TGR.

Invazivní P-V analýza LK ukázala, že neléčení ACF TGR měli významně nižší maximální tlak v LK, $(+dP/dt)_{max}$ i $(-dP/dt)_{max}$, dále snížený end-systolický tlakově-objemový vztah (ESPVR), předtížením modifikovanou systolickou prací (PRSW), sníženou celkovou periferní cévní rezistenci (TPR) a zvýšenou tenzi ve stěně LK (wall stress) oproti kontrolním TGR, žádná z terapií neměla vliv na tyto parametry. Navíc, neléčení ACF TGR vykázali výrazně zvýšený end-diastolický tlak v LK, end-diastolický objem LK a prodlouženou relaxační konstantu tau v porovnání s kontrolními TGR, tyto parametry zlepšily všechny léčebné režimy (monoterapie ACEi, EET-A i jejich kombinace).

4.1.3. Vliv dvoutýdenní monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na renální hemodynamiku a funkce u ACF TGR

Neléčení ACF TGR měli nižší střední arteriální tlak (MAP) než kontrolní TGR, podobný jako kontrolní HanSD. Všechny terapeutické režimy (monoterapie ACEi, EET-A i jejich kombinace) významně snížily arteriální tlak u ACF TGR na srovnatelné hladiny mezi sebou. Nebyl rozdíl mezi skupinami v míře glomerulární filtrace (GFR). Neléčení ACF TGR vykázali výrazně snížený průtok krve ledvinou (PKL) (téměř 40 % relativní redukce), dále snížení diurézy, absolutní natriurézy i frakční exkrece sodíku oproti kontrolním TGR, čemuž žádný terapeutický režim významně nezabránil.

4.1.4. Vliv dlouhodobé monoterapie EET-A a kombinované terapie EET-A s ACEi na mortalitu, albumiurii a srdeční funkce u ACF TGR

Všichni kontrolní (bez ACF) HanSD i TGR potkání přežili do konce experimentu (22 týdnů po ACF, 20 týdnů terapie). Neléčení ACF TGR začali umírat ve dne +3 (17 dní po vytvoření ACF) a ke dni +70 byli všichni mrtví. Terapeutické režimy významně zvýšili přežívání ACF TGR oproti neléčené skupině s procentuálním přežitím na konci experimentu 45,5 % (monoterapie EET-A), 59,4 % (monoterapie ACEi) a 71 % (kombinace EET-A a ACEi), rozdíly mezi

terapeutickými skupinami nebyly významné (ACF TGR + EET-A vs. ACF TGR + ACEi, $p = 0,25$; ACF TGR + EET-A vs. ACF TGR + EET-A + ACEi, $p = 0,20$; ACF TGR + ACEi vs. ACF TGR + EET-A + ACEi, $p = 0,83$; neléčení ACF TGR vs. všechny terapeutické skupiny, $p < 0,05$; kontrolní TGR vs. všechny terapeutické skupiny, $p < 0,05$).

Na začátku experimentu (den 0, tj. 2 týdny po ACF / sham proceduře) vykázali kontrolní TGR 20krát vyšší albuminurii než kontrolní HanSD potkani. Ve skupině ACF TGR byla albuminurie 2 týdny po vytvoření ACF 2,5krát nižší než u kontrolních TGR, což bylo pravděpodobně způsobeno iniciální renální hypoperfuzí krátce po vytvoření ACF a následném poklesu krevního tlaku.

Všechny terapeutické režimy snížily albuminurii u ACF TGR, výrazněji při terapii s ACEi (monoterapie ACEi i kombinace ACEi s EET-A) oproti monoterapii EET-A, kdy byly hodnoty albuminurie na konci experimentu nižší než u kontrolních HanSD potkanů ($0,14 \pm 0,02$ a $0,13 \pm 0,02$ vs. $3,9 \pm 0,2$ mg/24 h; $p < 0,05$ pro oba režimy – ACEi i ACEi + EET-A).

Stupeň bilaterální srdeční a LK hypertrofie na konci experimentu (22 týdnů po ACF) byl u obou monoterapií podobný jako u neléčené skupiny ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře. Kombinovaná terapie ACEi s EET-A významně zmírnila rozvoj bilaterální srdeční hypertrofie a plicní kongesce oproti monoterapiím ACEi či EET-A.

Echokardiograficky byly na konci experimentu u všech terapeutických režimů zvětšeny systolický i diastolický rozměr LK oproti neléčené skupině ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře. Zároveň došlo u všech skupin k podobně výraznému zhoršení funkce PK oproti časným fázím srdečního selhání (série 2), hodnoceno parametrem změny plochy PK (FAC).

Invazivní P-V analýza LK u přeživších potkanů na konci experimentu ukázala zvýšený end-diastolický objem a tlak v LK u obou monoterapeutických režimů, který byl srovnatelný s hodnotami neléčených ACF TGR 4 týdny po ACF proceduře, avšak kombinovaná terapie ACEi s EET-A end-diastolický tlak v LK

snížila na úroveň pozorovanou u kontrolní TGR skupiny, u end-diastolického objemu LK se jednalo o nesignifikantní trend k jeho zmenšení.

Všechny skupiny ACF TGR měli oproti TGR kontrolám na konci experimentu snížené systolické i diastolické hemodynamické parametry (ESPVR, EDPVR, PRSW). ACF TGR s monoterapiemi ACEi i EET-A měli vyšší napětí stěny LK (wall stress) v porovnání s kontrolními TGR, ale kombinovaná terapie ACEi s EET-A tento parametr významně snížila na úroveň srovnatelnou s kontrolními TGR.

4.2. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi)

4.2.1. Vliv monoterapie sEHi a kombinované léčby sEHi s ACEi na přežívání ACF TGR

Všichni HanSD i TGR potkani po sham proceduře přežili do konce experimentu (51 týdnů po ACF). Neléčení ACF TGR začali významněji umírat 3 týdny po ACF a po 29. týdnu již nežil žádný. Monoterapie ACEi zvýšila přežívání na konečných 84 % ($p < 0,05$ oproti neléčeným ACF TGR). Kombinovaná léčba sEHi a ACEi zlepšila přežívání na 53 % oproti neléčeným ACF TGR ($p < 0,05$), avšak oproti monoterapii ACEi byla významně horší ($p < 0,05$).

4.2.2. Vliv monoterapie sEHi a kombinované léčby sEHi s ACEi na váhy orgánů a renální funkce u ACF TGR

Kontrolní TGR měli výraznou srdeční (zejména levokomorovou) hypertrofii (vyjádřenou poměrem váhy LK k délce tibie) v porovnání s kontrolními HanSD potkany ($p < 0,05$). U neléčených ACF TGR došlo k další progresi hypertrofie oproti kontrolním TGR ($p < 0,05$). Monoterapie ACEi a také jeho kombinace se sEHi významně snížila celkovou srdeční i LK hypertrofii až k hodnotám srovnatelným s kontrolními TGR.

U váhy PK nebyl pozorován rozdíl mezi kontrolními TGR a HanSD potkany, neléčení ACF TGR však měli váhu PK významně zvýšenou oproti kontrolním TGR ($p < 0,05$), což ukazuje na rozvoj i pravostranné srdeční hypertrofie. Oba terapeutické režimy významně snížily hypertrofii PK na podobnou úroveň.

Neléčení ACF TGR měli vyšší váhu plic oproti kontrolním TGR i HanSD, což značí rozvoj plicní kongesce u ACF TGR ($p < 0,05$). Obě léčby ji významně zmírnily, ovšem stále nad úroveň kontrolních TGR ($p < 0,05$). Nebyl pozorován rozdíl u váhy jater a ledvin mezi skupinami.

Kontrolní TGR byli výrazně hypertenzní oproti kontrolním HanSD ($p < 0,05$). Neléčení ACF TGR měli nižší arteriální tlak (TK) než kontrolní TGR, ale stále zůstával vyšší než u kontrolních HanSD ($p < 0,05$). Terapeutické režimy srovnatelně snížily TK u ACF TGR v porovnání s neléčenými ACF TGR na úroveň dokonce nižší než kontrolní HanSD ($p < 0,05$).

Nebyl pozorován rozdíl v PKL u kontrolních TGR a HanSD, neléčení ACF TGR měli ale výrazně nižší PKL ($p < 0,05$), GFR se mezi skupinami výrazně nelišila. Neléčení ACF TGR měli dále nižší diurézu a absolutní i frakční exkreci sodíku v porovnání s kontrolními HanSD i TGR ($p < 0,05$). Monoterapie ACEi a ani kombinovaná léčba ACEi se sEHi významně nezvrátily pokles PKL, ani nenormalizovala žádný z parametrů sodíkové exkrece.

4.2.3. Pohlavní rozdíly v mortalitě HanSD a TGR po ACF: efekt monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi s sEHi

Všichni HanSD samci i samice po sham proceduře přežili do konce experimentu (51 týdnů po ACF). Neléčení ACF HanSD samci a samice začali výrazně umírat kolem týdne 15 (16 týdnů po ACF), průběh a konečné procento přežití bylo u obou pohlaví srovnatelné. U samců přežilo 7 z 26 zvířat (27 %), u samic 8 z 27 (30 %, $p > 0,05$). Monoterapie ACEi zlepšila průběh u ACF HanSD, samci i samice začali umírat až po 35 týdnech a finální procento přežití bylo u samců i samic podobné. U kombinované léčby ACEi a sEH byly výsledky obdobné jako u monoterapie ACEi, u samců i samic.

Všichni kontrolní TGR samci i samice přežili do konce experimentu. Neléčení samci ACF TGR začali umírat v týdnu 2 (3 týdny po ACF) a všichni zemřeli do týdne 20. Neléčené samice ACF TGR začali umírat v týdnu 4 (5 týdnů po ACF) a celkové přežití bylo 32 %. Monoterapie ACEi zlepšila přežívání u samců i samic s

podobným celkovým procentem přežití 74 % (samci) a 65 % (samice), ($p > 0,05$). Kombinovaná léčba ACEi a sEHi také zlepšila přežívání u samců ACF TGR oproti neléčené skupině s celkovým přežitím 38 %, což bylo významně horší než u monoterapie ACEi ($p < 0,05$). Naopak kombinovaná léčba ACEi a sEHi zlepšila průběh u samic ACF TGR a s konečným procentem přežití 84 % byl naznačen i trend ke zlepšení oproti ACEi monoterapii ($p > 0,05$).

5. Diskuze

5.1. Analog epoxyeikosatrienové kyseliny (EET-A)

5.1.1. Aktivita neurohumorálních systémů u srdečního selhání navozeného ACF

Aktivita vazoaktivních / neurohumorálních systémů byla hodnocena v časné fázi srdečního selhání navozeného ACF (2 týdny po ACF proceduře, v době těsně před zahájením terapeutických režimů v dalších sériích). Naše data naznačují, že ACF u tohoto modelu ANG II-dependentní hypertenze vede k časnější aktivaci intrarenální a systémové vazodilatační / natriuretické osy RAAS (dle koncentrací ANG 1-7 a poměru ANG 1-7 / ANG II) oproti té vazokonstrikční / sodíkoretenční, která se dle neurohumorální hypotézy podílí na dlouhodobé progresi srdečního selhání. Naše výsledky jsou v souladu se zjištěním, že zvýšený poměr ANG 1-7 / ANG II predikuje kompenzovanou fázi CHSS (Wang *et al.* 2020). Souhrnně se tedy v tuto dobu jedná o časnou fázi kompenzovaného srdečního selhání bez hyperaktivace dlouhodobě maladaptivních neurohumorálních systémů.

Při zaměření na další vazoaktivní systémy jsme zjistili sníženou tkáňovou dostupnost biologicky aktivních EETs v ledvině a v myokardu LK u ACF TGR, což nebylo dáno jejich sníženou produkcí (dle proteinové exprese CYP2C23 a CYP2J3), ale spíše zvýšenou degradací na biologicky méně aktivní DHETs, navíc jsme v ledvině i v myokardu LK detekovali zvýšenou proteinovou expresi sEH, enzymu, který se podílí na metabolizování EETs na DHETs. To podpořilo naši hypotézu a zkoumání terapeutických režimů s EET analogem a inhibítorem sEH.

5.1.2. Vliv terapeutických režimů na přežívání

Prokázali jsme výrazně příznivý vliv monoterapií EET-A i ACEi na snížení mortality u ACF TGR. To podporuje naši výše zmíněnou hypotézu negativního vlivu snížené tkáňové dostupnosti biologicky aktivních EETs u CHSS.

Naše výsledky demonstrují zlepšení přežívání u modelu ACF TGR s oběma monoterapiemi, i když každá působí přes jiný humorální systém, což indukuje

hypotézu, že by kombinovaná terapie pomocí EET-A a ACEi mohla zlepšit přežívání nad rámec monoterapií. Toto však v naší studii nebylo potvrzeno. I když procento přežití na konci experimentu bylo u kombinované terapie numericky vyšší než u monoterapií, nedosáhlo statistické signifikance. Experiment byl ukončen podle protokolu po 20 týdnech terapie, bohužel nevíme, zda by se příznivý efekt kombinované terapie neprojevil později. Tuto úvahu podporují výsledky echokardiografie a váhy orgánů u přeživších potkanů na konci experimentu, kde byl pozorován příznivý efekt kombinované terapie na celkovou srdeční i samostatnou PK a LK hypertrofii a na plicní kongesci oproti monoterapiím. Navíc, invazivní P-V analýza LK u těchto přeživších potkanů prokázala u kombinované terapie snížení end-diastolického tlaku v LK a snížení napětí stěny LK (wall stress) oproti monoterapiím.

Přesné mechanismy příznivého ovlivnění end-diastolického objemu, tlaku a izovolumické relaxace LK s následnou sníženou plicní kongescí v kritické fázi srdečního selhání u ACF TGR nejsou do detailu objasněny, ačkoliv víme, že tento efekt kombinované terapie ACEi s EET-A není dán snížením afterloadu, protože nedošlo ke snížení celkové periferní rezistence (TPR), jak po 2 týdnech léčby, tak na konci přeživací série. Proto bychom rádi v budoucnu studovali tyto příznivé terapeutické efekty na buněčné a subcelulární úrovni např. analýzou exprese messenger RNA (mRNA) v myokardu LK.

5.2. Inhibitor solubilní epoxid hydrolázy (sEHi)

Hlavním zjištěním této studie je, že přidání sEHi k zavedené terapii ACEi nezlepšilo přežívání a ani neovlivnilo rozvoj renální dysfunkce u ACF TGR, kombinovaná léčba měla naopak horší přežívání než monoterapie ACEi, pro což nemáme jasné vysvětlení, pouze pracovní hypotézu.

Bylo prokázáno, že jak zavedená antihypertenzní léčba ACEi (přes intrarenální blokádu RAAS (Gonzalez-Villalobos *et al.* 2013; Kobori *et al.* 2007), tak i sEHi (zvýšení intrarenálních EETs a vazodilatační a natriuretický efekt (Elmarakby 2012; Fleming 2014; Imig *et al.* 2021)) působí snížení krevního tlaku. Proto by

kombinovaná léčba, navíc při progresivní renální dysfunkci, a tím pádem snižování eliminace léčiv, mohla v dlouhodobém působení vést k poklesu krevního tlaku pod úroveň renálních autoregulačních schopností (Carlström *et al.* 2015). To by mohlo vést k dalšímu zhoršování renálních funkcí a zvýšení mortality ACF TGR na této kombinované léčbě. Avšak naše data z tohoto experimentu ukázala, že se arteriální tlak třetí týden po ACF významně nelišil u kombinované léčby (96 ± 3 mmHg) a monoterapie ACEi (101 ± 3 mmHg, $p > 0,05$). V obou případech zůstával arteriální tlak v mezích renální autoregulace. Bohužel jsme ale neprováděli hodnocení delšího vlivu léčby na krevní tlak, což by vyžadovalo dlouhodobé telemetrické monitorování u neanestezovaných zvířat.

5.3. Vliv monoterapie ACEi a kombinované léčby ACEi a sEHi na přežívání HanSD i TGR samic a samců po vytvoření ACF

Nezjistili jsme významný rozdíl v přežívání po vytvoření ACF mezi neléčenými samci a samicemi HanSD potkanů, což je v souladu s naším nedávným zjištěním, že normotenzní HanSD potkani nevykazují žádné významné pohlavní rozdíly u modelu CHSS indukovaného ACF (Červenka *et al.* 2016). Zároveň námi sledované terapeutické režimy, jak v monoterapii ACEi, tak v kombinaci se sEHi, měly podobný vliv na HanSD samce i samice po ACF. Dále jsme prokázali postupné snížení účinnosti monoterapie ACEi u pokročilého CHSS při dlouhodobém sledování u samců i samic po ACF, kdy po 35. týdnu začali obě pohlaví významně umírat. To podporuje nutnost kombinovaných terapeutických přístupů s cílením na více patofyziologických mechanismů progresu CHSS, včetně hledání nových farmakologických možností (Braunwald 2015; Kassi *et al.* 2018; McDonagh *et al.* 2021). Navíc zjištění, že přidání sEHi do kombinace s ACEi dále nezlepšilo přežívání u ACF HanSD oproti monoterapii ACEi, je v souladu s naší nedávnou prací, kde monoterapie sEHi nezlepšila významně přežívání u samců ACF HanSD navzdory zvýšení myokardiální a renální tkáňové dostupnosti EETs na úroveň zjištěnou u kontrolních potkanů (Červenka *et al.* 2015). HanSD potkani tedy

nevykazují významné pohlavní rozdíly v průběhu CHSS navozeném ACF a ani v odpovědi na terapeutické režimy s ACEi a sEHi.

U hypertenzních TGR potkanů byly výsledky rozdílné. Zjistili jsme, že TGR samci mají po vytvoření ACF statisticky signifikantně vyšší mortalitu než TGR samice. Monoterapie ACEi měla srovnatelný protektivní vliv na průběh ACF navozeného CHSS u samců i samic, avšak kombinovaná léčba ACEi a sEHi měla u samců a samic TGR opačný efekt: zvýšila mortalitu u ACF TGR samců, ale snížila ji u ACF TGR samic, oproti monoterapii ACEi. Hypertenzní TGR potkani tedy vykazují výrazné pohlavní rozdíly v průběhu CHSS navozeného ACF i v efektu farmakoterapie sEHi. Při budoucích studiích zkoumajících patofyziologické aspekty CHSS u hypertenzních potkanů s aktivovaným RAAS (TGR) a potenciálně nové terapeutické možnosti by se experimenty měly provádět na obou pohlavích.

Limitací této práce je, že jsme detailněji nezkoumali pohlavní rozdíly na srdeční funkci měřené echokardiograficky či invazivní P-V analýzou LK.

6. Závěr

V rámci naší hypotézy se podařilo prokázat snížení tkáňové dostupnosti EETs v myokardu LK a ledvině u animálního modelu CHSS ACF TGR. To bylo dáno zejména jejich zvýšenou degradací pomocí sEH na neaktivní metabolity.

Zároveň jsme ověřili, že farmakologické přístupy zvyšující dostupnost EETs vedou ke zlepšení průběhu a přežívání tohoto modelu CHSS. V kombinaci s ACEi byl u EET-A pozorován nesignifikantní trend ke zlepšení přežívání daný především zlepšením srdečních parametrů a snížením plicní kongesce. Neprokázali jsme však významný protektivní vliv této kombinované léčby na renální funkce u ACF TGR. Kombinovaná léčba pomocí sEH s ACEi zlepšila přežívání ACF TGR oproti placebo, ale nevedla k zmírnění mortality, či renální dysfunkce oproti monoterapii ACEi, u samců (nikoliv u samic) vedla dokonce k signifikantnímu zhoršení přežívání.

Autor práce se podílel ve spolupráci s kolegy Centra experimentální medicíny Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) na provádění metod všech dílčích projektů této práce, zejména samostatně prováděl všechna echokardiografická a invazivní hemodynamická vyšetření srdce. Statisticky zpracovával získané výsledky a interpretoval je spolu se svým školitelem a konzultantem.

Přínosnost této práce je zejména v průkazu snížené tkáňové dostupnosti EETs u tohoto modelu CHSS a komplexním zhodnocení vlivu různých farmakologických přístupů k jejímu zvýšení na přežívání, srdeční a ledvinné funkce, kde byl prokázán příznivý mortalitní efekt zejména zlepšením srdečních parametrů a snížením plicní kongesce. Tato animální data podporují další výzkum, včetně klinického, v oblasti eikosanoidů a CHSS, který by v budoucnu mohl pomoci v diagnostice a terapii.

7. Souhrn

Na našich datech jsme prokázali snížení tkáňové dostupnosti EETs v myokardu LK i v ledvině již v časných fázích srdečního selhání navozeného objemovým přetížením pomocí ACF u TGR, což se může spolupodílet na rozvoji kardiorenálního syndromu a progresi srdečního selhání do fatálního konce. Proto jsme se zaměřili na farmakologické možnosti zvýšení tkáňové dostupnosti EETs:

1) Monoterapie EET-A oddálila manifestaci srdečního selhání a zlepšila přežívání ACF TGR. U kombinace EET-A s ACEi jsme zejména ke konci experimentu pozorovali nesignifikantní zlepšující se trend oproti monoterapii ACEi. I přes rozvoj renální dysfunkce u modelu ACF TGR nebyly prokázány renoprotektivní účinky terapií EET-A či ACEi. Příznivý vliv na přežívání byl zprostředkován zlepšením srdečních parametrů, především snížením bilaterální srdeční hypertrofie a nižší plicní kongescí, což bylo zvláště výrazné u kombinované léčby EET-A s ACEi.

2) Přidání sEHi do kombinace k ACEi nevedlo k zmírnění progresu CHSS, či zlepšení přežívání u ACF TGR, u samců vedla dokonce k signifikantnímu zhoršení. Navíc nebylo pozorováno ani zlepšení renálních funkcí. Proto se zvyšování dostupnosti EETs pomocí blokády sEH v kombinaci s ACEi nejeví jako vhodná léčebná strategie u CHSS.

3) Dále jsme zjistili, že u animálního modelu CHSS indukovaného ACF vykazuje monoterapie ACEi podobné příznivé účinky u TGR samců i samic. Naopak kombinovaná léčba ACEi se sEHi měla rozdílný efekt: zvýšila mortalitu samců ACF TGR (oproti monoterapii ACEi) a snížila ji u samic. To naznačuje, že u CHSS a hypertenze se zvýšenou aktivitou RAAS, má pohlaví významný vliv na průběh a přežívání CHSS. Proto by měly být pohlavní rozdíly v preklinických studiích hodnoceny.

Naše výsledky souhrnně podporují další budoucí výzkum a možné využití farmakologického ovlivnění CYP-dependentní epoxygenázové dráhy metabolismu AA, zejména analogů EETs, v terapii srdečního selhání.

8. Summary

Our data show that the ACF TGR in the early phase of CHF exhibits substantial tissue deficiency of EETs in the left ventricle and kidney. That might significantly contribute to developing cardiorenal syndrome and progression of HF to the fatal end. Therefore we investigated the pharmacological options to increase the bioavailability of the EETs:

1) EET-A treatment delays the onset of decompensation of HF and improves the survival rate in ACF TGR. In combination therapy by EET-A and ACEi, the survival of ACF TGR only tended to improve compared with ACEi monotherapy. Although ACF TGR develops severe renal dysfunction, we did not prove the renoprotective effects of either EET-A or ACEi. Beneficial actions on survival were mediated by improving cardiac parameters, i.e., reducing bilateral cardiac hypertrophy and lung congestion. That was particularly pronounced after the combined treatment with EET-A and ACEi.

2) The addition of sEHi to ACEi treatment did not provide better protection against CHF progression or increase the survival rate in ACF TGR; indeed, the rate decreased significantly among males. We did not prove any improvement of renal functions either. Thus, increasing tissue EETs via sEH inhibition in combination with ACEi does not seem to be a promising approach to attenuate renal dysfunction and further progression of CHF.

3) We further found that the treatment with ACEi alone displayed similar beneficial effects on the course of ACF-induced HF in male and female TGR. In contrast, the combined therapy with ACEi and sEHi showed sex-dependent effects: it increased mortality (relative to ACEi treatment alone) in males and reduced it in female rats. Thus, our study strongly suggests that in HF individuals in whom hypertension and increased RAS activity run in parallel, the patients' sex is a co-determinant of the rate of progression of HF. Therefore, in pre-clinical studies, sex-linked differences should be seriously considered.

Our data strongly support the notion that targeting the CYP-dependent epoxygenase pathway of AA, especially EET analogs, should be considered in developing new pharmacological strategies for HF treatment.

9. Použitá literatura

1. Braunwald, E. (2015). The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet (London, England)*, **385**(9970), 812–824.
2. Carlström, M., Wilcox, C. S., & Arendshorst, W. J. (2015). Renal autoregulation in health and disease. *Physiological Reviews*, **95**(2), 405–511.
3. Červenka, L., Melenovský, V., Husková, Z., ... Sadowski, J. (2015). Inhibition of soluble epoxide hydrolase does not improve the course of congestive heart failure and the development of renal dysfunction in rats with volume overload induced by aorto-caval fistula. *Physiological Research*, **64**(6), 857–873.
4. Červenka, L., Škaroupková, P., Kompanowska-Jezierska, E., & Sadowski, J. (2016). Sex-linked differences in the course of chronic kidney disease and congestive heart failure: a study in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats with volume overload induced using aorto-caval fistula. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **43**(10), 883–895.
5. Chaudhry, S. P., & Stewart, G. C. (2016). Advanced Heart Failure: Prevalence, Natural History, and Prognosis. *Heart Failure Clinics*, **12**(3), 323–333.
6. Conrad, N., Judge, A., Tran, J., ... Rahimi, K. (2018). Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *The Lancet*, **391**(10120), 572–580.
7. Damman, K., van Deursen, V. M., Navis, G., Voors, A. A., van Veldhuisen, D. J., & Hillege, H. L. (2009). Increased Central Venous Pressure Is Associated With Impaired Renal Function and Mortality in a Broad Spectrum of Patients With Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**(7), 582–588.
8. Elmarakby, A. A. (2012). Reno-protective mechanisms of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **302**(3). doi:10.1152/AJPREGU.00606.2011
9. Fleming, I. (2014). The Pharmacology of the Cytochrome P450 Epoxygenase/Soluble Epoxide Hydrolase Axis in the Vasculature and Cardiovascular Disease. *Pharmacological Reviews*. doi:10.1124/pr.113.007781
10. Garcia, R., & Diebold, S. (1990). Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovascular Research*, **24**(5), 430–432.
11. Gonzalez-Villalobos, R. A., Janjoulia, T., Fletcher, N. K., ... McDonough, A. A. (2013). The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, **123**(5), 2011–2023.
12. Honetschlägerová, Z., Sporková, A., Kopkan, L., ... Červenka, L. (2011a). 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. *Journal of Hypertension*, **29**(8), 1590–601.
13. Honetschlägerová, Z., Z Husková, Z., Vaňourková, Z., ... Kopkan, L. (2011b). Renal mechanisms contributing to the antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *The Journal of Physiology*, **589**(Pt 1), 207–219.
 14. Imig, J. D. (2019). Epoxyeicosanoids in hypertension. *Physiological Research*, **68**(5), 695–704.
 15. Imig, J. D., Cervenka, L., & Neckar, J. (2021). Epoxylipids and soluble epoxide hydrolase in heart diseases. *Biochemical Pharmacology*, **195**, 114866.
 16. Imig, J. D., Cervenka, L., & Neckar, J. (2022). Epoxylipids and soluble epoxide hydrolase in heart diseases. *Biochemical Pharmacology*, **195**, 114866.
 17. Imig, J. D., Elmarakby, A., Nithipatikom, K., ... Falck, J. R. (2010). Development of epoxyeicosatrienoic acid analogs with in vivo anti-hypertensive actions. *Frontiers in Physiology*, **1**. doi:10.3389/FPHYS.2010.00157
 18. Jichová, Š., Doleželová, Š., Kopkan, L., Kompanowska-Jeziarska, E., Sadowski, J., & Červenka, L. (2016). Fenofibrate Attenuates Malignant Hypertension by Suppression of the Renin-angiotensin System: A Study in Cyp1a1-Ren-2 Transgenic Rats. *The American Journal of the Medical Sciences*, **352**(6), 618–630.
 19. Kaseda, R., Tsuchida, Y., Gamboa, J. L., ... Kon, V. (2018). Angiotensin receptor blocker vs ACE inhibitor effects on HDL functionality in patients on maintenance hemodialysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **28**(6), 582–591.
 20. Kassi, M., Hannawi, B., & Trachtenberg, B. (2018). Recent advances in heart failure. *Current Opinion in Cardiology*, **33**(2), 249–256.
 21. Khan, M. A. H., Falck, J. R., Manthati, V. L., Campbell, W. B., & Imig, J. D. (2014). Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates angiotensin II hypertension and kidney injury. *Frontiers in Pharmacology*, **5**(SEP), 1–7.
 22. Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L. G., & Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacological Reviews*, **59**(3), 251–287.
 23. Kottgen, A., Russell, S. D., Loehr, L. R., ... Coresh, J. (2007). Reduced kidney function as a risk factor for incident heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, **18**(4), 1307–1315.
 24. McAlister, F. A., Ezekowitz, J., Tonelli, M., & Armstrong, P. W. (2004). Renal Insufficiency

- and Heart Failure: Prognostic and Therapeutic Implications from a Prospective Cohort Study. *Circulation*, **109**(8), 1004–1009.
25. McDonagh, T. A., Metra, M., Adamo, M., ... Heymans, S. (2021, September 21). 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*, Eur Heart J, pp. 3599–3726.
 26. Melenovsky, V., Benes, J., Skaroupkova, P., ... Cervenka, L. (2011). Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **354**(1–2), 83–96.
 27. Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Benes, J., Torresova, V., Kopkan, L., & Cervenka, L. (2012a). The course of heart failure development and mortality in rats with volume overload due to aorto-caval fistula. *Kidney and Blood Pressure Research*, **35**(3), 167–173.
 28. Melenovsky, V., Skaroupkova, P., Benes, J., Torresova, V., Kopkan, L., & Cervenka, L. (2012b). The course of heart failure development and mortality in rats with volume overload due to aorto-caval fistula. *Kidney and Blood Pressure Research*, **35**(3), 167–173.
 29. Metra, M., & Teerlink, J. R. (2017, October 28). Heart failure. *The Lancet*, Lancet Publishing Group, pp. 1981–1995.
 30. Mullins, J. J., Peters, J., & Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, **344**(6266), 541–544.
 31. Nayeem, M. A., Zeldin, D. C., Boegehold, M. A., ... Falck, J. R. (2010). Modulation by salt intake of the vascular response mediated through adenosine A2A receptor: Role of CYP epoxygenase and soluble epoxide hydrolase. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **299**(1). doi:10.1152/ajpregu.00823.2009
 32. Opočenský, M., Dvořák, P., Kramer, H. J., ... Červenka, L. (2004). Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney and Blood Pressure Research*, **27**(4), 248–258.
 33. Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Bánkai, S., & Kass, D. A. (2008). Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature Protocols*, **3**(9), 1422–1434.
 34. Riehle, C., & Bauersachs, J. (2019). Small animal models of heart failure. *Cardiovascular Research*, **115**(13), 1838–1849.
 35. Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological Reviews*, **82**(1), 131–185.
 36. Savarese, G., & Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*, **3**(1), 7–11.
 37. Sporková, A., Kopkan, L., Varcabová, Š., ... Červenka, L. (2011). Role of cytochrome P-450

- metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney 1-clip hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **300**(6), 1468–1475.
38. Sudhahar, V., Shaw, S., & Imig, J. (2010). Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs and Vascular Function. *Current Medicinal Chemistry*, **17**(12), 1181–1190.
39. Vacková, Š., Kopkan, L., Kikerlová, S., ... Červenka, L. (2019). Pharmacological blockade of soluble epoxide hydrolase attenuates the progression of congestive heart failure combined with chronic kidney disease: Insights from studies with fawn-hooded hypertensive rats. *Frontiers in Pharmacology*, **9**(JAN).
40. Van Deursen, V. M., Urso, R., Laroche, C., ... Voors, A. A. (2014). Co-morbidities in patients with heart failure: An analysis of the European heart Failure Pilot Survey. *European Journal of Heart Failure*, **16**(1), 103–111.
41. Walkowska, A., Červenka, L., Imig, J. D., Falck, J. R., Sadowski, J., & Kompanowska-Jeziarska, E. (2021). Early Renal Vasodilator and Hypotensive Action of Epoxyeicosatrienoic Acid Analog (EET-A) and 20-HETE Receptor Blocker (AAA) in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in Physiology*, **12**. doi:10.3389/FPHYS.2021.622882
42. Wang, K., Basu, R., Poglitsch, M., Bakal, J. A., & Oudit, G. Y. (2020). Elevated Angiotensin 1-7/Angiotensin II Ratio Predicts Favorable Outcomes in Patients With Heart Failure. *Circulation. Heart Failure*, **13**(7), 95–106.
43. Zhang, C., Booz, G. W., Yu, Q., He, X., Wang, S., & Fan, F. (2018). Conflicting roles of 20-HETE in hypertension and renal end organ damage. *European Journal of Pharmacology*, **833**, 190–200.

10. Přehled publikační činnosti

Publikace, z kterých vychází tato disertační práce

1) **Kala P**, Sedláková L, Škaroupková P, Kopkan L, Vaňourková Z, Táborský M, Nishiyama A, Hwang SH, Hammock BD, Sadowski J, Melenovský V, Imig JD, Červenka L. Effect of angiotensin-converting enzyme blockade, alone or combined with blockade of soluble epoxide hydrolase, on the course of congestive heart failure and occurrence of renal dysfunction in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula. *Physiol Res*. 2018;67(3):401-415. (IF 1,880)

2) **Kala P**, Červenka L, Škaroupková P, Táborský M, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J. Sex-linked differences in the mortality in Ren-2 transgenic hypertensive rats with aorto-caval fistula: effects of treatment with angiotensin converting enzyme alone and combined with inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Physiol Res*. 2019;68(4):589-601. (IF 1,880)

3) **Kala P**, Miklovič M, Jíchová Š, Škaroupková P, Vaňourková Z, Maxová H, Gawrys O, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Imig JD, Falck JR, Veselka J, Červenka L, Aiglová R, Vicha M, Gloger V, Táborský M. Effects of Epoxyeicosatrienoic Acid-Enhancing Therapy on the Course of Congestive Heart Failure in Angiotensin II-Dependent Rat Hypertension: From mRNA Analysis towards Functional In Vivo Evaluation. *Biomedicines*. 2021; 9(8):1053. (IF 6,081)

Další publikace, které volně souvisejí s tématem disertační práce

4) **Kala P**, Bartušková H, Piřha J, Vaňourková Z, Kikerlová S, Jíchová Š, Melenovský V, Hošková L, Veselka J, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Gawrys O, Maxová H, Červenka L. Deleterious Effects of Hyperactivity of the Renin-Angiotensin System and Hypertension on the Course of Chemotherapy-Induced Heart Failure after Doxorubicin Administration: A Study in Ren-2 Transgenic Rat. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9337. (IF 5,924)

5) Jíchová Š, Gawryś O, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Melenovský V, Hošková L, Červenka L, **Kala P**, Veselka J, Čertíková Chábová V. Kidney Response to Chemotherapy-Induced Heart Failure: mRNA Analysis in Normotensive and Ren-2 Transgenic Hypertensive Rats. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(16):8475. (IF 5,924)

Publikace, které s tématem disertační práce přímo nesouvisí

6) **Kala P**, Tesař D, Hájek P, Adlová R, Veselka J. Combined percutaneous approach for aortic valve implantation in poor vascular access. *Bratisl Lek Listy.* 2020;121(8):537-540. (IF 1,278)