Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Michał Biernacki

Wpływ inhibitora FAAH, URB597, na równowagę redoks oraz mediatory lipidowe w organizmie szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym

Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk farmaceutycznych

Białystok 2018

Streszczenie

Nadciśnienie tętnicze jest najbardziej rozpowszechnioną chorobą układu krążenia, przy czym ze względu na przyczynę rozwoju nadciśnienia tętniczego wyróżnia się nadciśnienie samoistne (pierwotne) oraz wtórne. W regulacji ciśnienia krwi biorą udział endokannabinoidy, w tym anandamid, który za pośrednictwem receptorów kannabinoidowych, głównie receptorów CB_1 oraz innych receptorów takich jak TRPV1 oraz PPARγ, jak również poprzez metabolity endokannabinoidów, w tym prostacykliny, które mogą powodować rozszerzanie naczyń krwionośnych. Dlatego sugeruje się, że zastosowanie inhibitorów hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (FAAH) metabolizującej anandamid, powinno spowodować obniżenie ciśnienia krwi.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy doktorskiej było wykazanie wpływu przewlekłego podawania inhibitora FAAH, N-cykloheksylokarbaminianu 3-3'-karbamoilodifenylu - URB597, na układ endokannabinoidowy oraz równowagę redoks i w konsekwencji na poziom mediatorów lipidowych powstających w wyniku reakcji zależnych od RFT oraz przemian enzymatycznych w narządach miąższowych (wątroba i nerka) szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym.

Badania przeprowadzono na:

1. szczurach szczepu Wistar [4-5 tygodniowe] z wywołanym nadciśnieniem wtórnym przez nefrektomię i przez 6 tygodni podskórne podawanie soli DOCA wraz z dietą o wysokim stężeniu soli oraz szczurach szczepu Wistar poddanych nefrektomii. Szczury przez ostatnie dwa tygodnie otrzymywały, co 12 godzin, dootrzewnowo URB597.
2. szczurach z nadciśnieniem pierwotnym (SHRs) oraz szczurach szczepu Wistar Kyoto [8-10 tygodniowe]. Szczury przez ostatnie dwa tygodnie, co 12 godzin, otrzymywały dootrzewnowo URB597.

Zarówno w wątrobie jak i nerce szczurów z nadciśnieniem pierwotnym (SHR) jak i wtórnym (DOCA-salt) stwierdzono wzrost poziomu endokannabinoidów, co skutkowało nasileniem ekspresji receptorów CB_1 i CB_2. Towarzyszyła temu wzmożona aktywność enzymów generujących RFT: oksydazy NADPH i oksydazy ksantynowej i w konsekwencji zwiększony poziom RFT. Ponadto w obu tkankach obserwowano obniżenie aktywności podstawowych enzymów antyoksydacyjnych [Cu,Zn-SOD, CAT i GSH-Px] oraz stężenia nieenzymatycznych związków o działaniu antyoksydacyjnym [GSH, witaminy A,E i C]. Wykazano, że zmiany w aktywności antyoksydacyjnej związane były również ze zmianami w aktywności transkrypcyjnej czynnika Nrf2, który poprzez indukcję ekspresji oksygenazy hemowej (HO-1) posiada znaczenie w regulacji ciśnienia krwi. Aktywność Nrf2 zależna jest od ekspresji szeregu inhibitorów [Keap1 i Bach1] i aktywatorów [KAP1, p21, p62, p-cJun, p-ERK ½], których poziom ulegał zmianom w nadciśnieniu. Przesunięcie równowagi redoks w kierunku procesów oksydacyjnych skutkowało zaistnieniem stresu oksydacyjnego, co zostało potwierdzone podwyższeniem poziomu uszkodzeń oksydacyjnych składników komórek, w tym fosfolipidów błonowych, białek oraz DNA, a także podwyższeniem poziomu czynników prozapalnych [NFκB i TNFα].

Wielokrotne podawanie inhibitora FAAH, URB597, szczurom z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym podwyższa poziom endokannabinoidów, w tym głownie anandamidu, co w konsekwencji prowadzi do zmiany ekspresji receptorów kannabinoidowych oraz TRPV1 zależnie od rodzaju nadciśnienia i analizowanego narządu. Nasilenie ekspresji receptorów CB_2 sprzyja inhibicji enzymów prooksydacyjnych (oksydazy NADPH i oksydazy ksantynowej) odpowiedzialnych za generację anionorodnika ponadtlenkowego, co skutkowało obniżonym poziomem RFT oraz obniżeniem ekspresji czynników prozapalnych (NFκB, TNFα). Ponadto po podaniu inhibitora URB597 dochodzi również do nasilenia ekspresji receptorów CB_1. W związku z tym obserwuje się zaburzenia w systemie antyoksydacyjnym, szczególnie w poziomie/aktywności przeciwutleniaczy zaangażowanych w ochronę fosfolipidów [CAT, GSH-Px, GSSG-R, GSH, witaminy A i E]. Inhibitor URB597 powoduje zmiany ekspresji aktywatorów jak i inhibitorów czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w wątrobie i nerce szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak i wtórnym, jednak nie powoduje istotnych zmian w ekspresji czynnika Nrf2. W nadciśnieniu pierwotnym dochodzi do podwyższenia ekspresji HO-1, a odwrotny efekt występuje w nadciśnieniu wtórnym zarówno w wątrobie jak i nerce. URB597 wpływa także na podwyższenie, w stosunku do zwierząt z nadciśnieniem, peroksydacji lipidów, ocenianych w postaci reaktywnych α,β-nienasyconych aldehydów. Zatem można sugerować, że obserwowane w niniejszej pracy różnokierunkowe modyfikacje ekspresji receptorów kannabinoidowych oraz TRPV1 mogą być odpowiedzialne za stopień nasilenia stresu oksydacyjnego i w konsekwencji za poziom oksydacyjnych modyfikacji składników komórek.

Biorąc pod uwagę brak oczekiwanego obniżenia ciśnienia krwi u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym jak i wtórnym otrzymujących inhibitor FAAH – URB597 oraz indukcję zaburzeń metabolicznych zarówno wątroby jak i nerki badany inhibitor FAAH nie może być sugerowany jako związek z wyboru do przeciwdziałania nadciśnieniu tętniczemu u ludzi.

Abstract

Hypertension is the most common disorder of the circulatory system. Based on the reason of occurrence, hypertension is classified as either essential hypertension (primary) or secondary hypertension. Endocannabinoids, such as anandamides, are involved in regulating blood pressure, which takes place via cannabinoid receptors, mainly CB_1, but also other receptors such as TRPV1 and PPARγ, as well as endocannabinoid metabolites, including prostacyclin, which may cause blood vessel dilation. That is why it is suggested that the use of inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH), which metabolizes anandamides, should result in reducing blood pressure.

With this in mind, the aim of this doctoral thesis was to identify the effect of chronic administration of the FAAH inhibitor URB597 - [3-(3-Carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate - on the endocannabinoid system and redox balance, and, consequently, on the level of lipid mediators produced in ROS-related reactions as well as enzymatic transformation in parenchymal organs (liver and kidneys) of rats with primary and secondary hypertension.

The study was conducted on:

1. Wistar rats [4-5 weeks old] with secondary hypertension induced through nephrectomy followed by 6 weeks of subcutaneous DOCA salt infusions and salt-rich diet, and Wistar rats after nephrectomy. During the final two weeks of the study, the rats were treated with intraperitoneal administrations of URB597, every 12 hours.
2. spontaneously hypertensive rats (SHRs) and Wistar Kyoto rats [8-10 weeks old]. During the final two weeks of the study, the rats were treated with intraperitoneal administrations of URB597, every 12 hours.

Both liver and kidney tissues of primary (SHR) and secondary (DOCA-salt) hypertension indicated elevated levels of endocannabinoids, resulting in intensified expression of CB_1 and CB_2 receptors. This was accompanied by an enhanced activity of ROS-generating enzymes: NADPH oxidase and xanthine oxidase, leading to increased ROS levels. Also, both tissues demonstrated decreased activity of basic antioxidant enzymes [Cu,Zn-SOD, CAT i GSH-Px] and lower concentration of non-enzymatic compounds with antioxidant effects [GSH, vitamins A, E, and C]. It has indicated that the changes in antioxidative activity were also related to the changes in Nrf2 transcription factor activity, which through the induction of heme oxygenase (HO-1) expression also plays a role in blood pressure regulation. Nrf2 activity depended on the expression of a range of inhibitors [Keap1 and Bach1] and activators [KAP1, p21, p62, p-cJun, p-ERK ½], whose levels changed in hypertension. The shift of redox balance towards oxidative processes resulted in oxidative stress confirmed by increased oxidative damage cell components, such as membrane phospholipids, proteins, and DNA, as well as elevated levels of proinflammatory factors [NFκB and TNFα].

Multiple administrations of the FAAH inhibitor URB597 in rats with primary and secondary hypertension increases the level of endocannabinoids, mainly anandamide, which, consequently, leads to a change in cannabinoid receptor expression and TRPV1, depending on the type of hypertension and examined organ. Elevated expression of CB_2 receptors contributes to the inhibition of prooxidative enzymes (NADPH oxidase and xanthine oxidase) which are responsible for generating superoxide anion free radicals, resulting in decreased ROS levels and reduced expression of proinflammatory factors (NFκB, TNFα). Also, administration of URB597 leads to increased expression of CB_1 receptors. This is related to the observed abnormalities in the antioxidative system, especially in the level/activity of antioxidants involved in phospholipid protection [CAT, GSH-Px, GSSG-R, GSH, vitamins A and E]. The URB597 inhibitor causes changes in the expression of both activators and inhibitors of Nrf2 transcription factor in the liver and kidneys of rats with primary and secondary hypertension, yet it does not result in significant changes in Nrf2 expression. Essential

hypertension is accompanied by an increased expression of HO-1 while an opposite effect is seen in secondary hypertension, both in the liver and kidneys. URB597 administration results in increased lipid peroxidase, compared to hypertensive animals, measured as reactive α,β-unsaturated aldehydes. It may therefore be assumed that the various modifications of cannabinoid receptor and TRPV1 expression presented in this thesis may be responsible for the degree of oxidative stress and, in consequence, for the level of oxidative modification of cellular components.

Taking into account the lack of expected reduction of high blood pressure in rats with primary and secondary hypertension after the administration of FAAH inhibitor URB597, and the induction of metabolic disorders in the liver and kidney, the studied FAAH inhibitor should not be a compound of choice for counteracting arterial hypertension in humans.