

Imię i nazwisko autora pracy	Agnieszka Kij
Rok urodzenia autora pracy	1987
Imię i nazwisko promotora pracy	promotor: Dr hab. Maria Walczak, prof. UJ promotor pomocniczy: Dr Kamil Kuś
Wydział	Farmaceutyczny
Instytut/Katedra	Katedra i Zakład Toksykologii
Dziedzina wg klasyfikacji KBN	04 nauki farmaceutyczne
Nadawany tytuł	doktor n. farmaceutycznych
Tytuł pracy w jęz. polskim	Ocena profilu eikozanoidów w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonna naczyniowego
Tytuł pracy w jęz. angielskim	The assessment of eicosanoid profile in animal models of endothelial dysfunction

Streszczenie

Śródbłonek naczyniowy uważany jest za największy narząd wewnątrzwydzielniczy człowieka, który przeciwdziała procesom zapalnym oraz zakrzepowym za sprawą szeregu uwalnianych przekaźników, między innymi prostacykliny (PGI₂), tlenku azotu (NO) oraz śródbłonkowych czynników hiperpolaryzujących (EDHF). Upośledzenie prawidłowej funkcji śródbłonka naczyniowego może być przyczyną lub konsekwencją rozwoju wielu stanów patofizjologicznych, w tym schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz chorób nowotworowych. Wśród aktywnych biologicznie lipidów wpływających na fenotyp tego narządu znajdują się eikozanoidy. Ocena roli tych przekaźników lipidowych w chorobach przebiegających z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego, wymaga szczegółowego scharakteryzowania profilu eikozanoidów z różnych szlaków enzymatycznych i nieenzymatycznych ich biosyntezy.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie i walidacja metod bioanalitycznych z wykorzystaniem systemu UPLC-MS/MS do jednoczesnego oznaczania stężenia eikozanoidów w próbkach biologicznych, a następnie zastosowanie tych metod do oceny profilu wybranych przekaźników lipidowych z różnych szlaków metabolizmu kwasu arachidonowego, w zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, takich jak myszy model niedoboru tlenku azotu (NO), nadciśnienia tętniczego krwi oraz przerzutującego raka sutka. W przeprowadzonych badaniach *in vivo* oceniono również zmiany profilu eikozanoidów wywołane farmakologiczną modulacją funkcji śródbłonka naczyniowego, w wybranych mysich modelach dysfunkcji tego narządu.

W ramach pracy doktorskiej opracowano i zwalidowano dwie oryginalne metody jednoczesnego oznaczania eikozanoidów w próbkach biologicznych z zastosowaniem systemu UPLC-MS/MS. Pierwsza z opracowanych metod pozwoliła na oznaczenie stężenia metabolitów PGI₂ oraz tromboksanu A₂ (TXA₂) w osoczu i moczu myszy, podczas gdy druga metoda umożliwiła oznaczenie 20 eikozanoidów powstających z udziałem cyklooksygenaz (COX), lipooksygenaz (LOX), izoenzymów cytochromu P450 (CYP450) oraz reakcji nieenzymatycznych, w osoczu oraz homogenatach płuc myszy. Wśród walidowanych parametrów metod znajdowały się liniowość, selektywność, dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycy oraz stabilność analizów. Opracowane metody spełniały założone kryteria walidacji i mogły być stosowane do oznaczania stężenia eikozanoidów w badanych próbkach biologicznych oraz oceny profilu eikozanoidów, w wybranych zwierzęcych modelach dysfunkcji śródbłonka naczyniowego.

Badania w mysim modelu niedoboru NO, wywołanym podawaniem estru metylowego N ω -nitro-L-argininy (L-NAME), wykazały, że zahamowanie syntazy NO zwiększa aktywność płytek krwi, biosyntezę naczynioochronnych eikozanoidów ze szlaku COX-2 oraz biosyntezę N-metylonikotynamidu (MNA). Egzogenny MNA w warunkach niedoboru NO przyczynił się do poprawy funkcji śródbłonna poprzez zwiększenie systemowej biodostępności NO oraz zmniejszenie aktywności płytek krwi, wykazując efekt niezależny od aktywności COX-2.

W mysim modelu nadciśnienia tętniczego krwi, wywołanym podawaniem angiotensyny II, rozwój dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi było związane przede wszystkim ze zwiększoną biosyntezą naczynioskurczowego kwasu 20-hydroksyeikozatetraenowego (20-HETE), powstającego ze szlaku CYP450. Zahamowanie aktywności trombiny przez dabigatran nie wpłynęło na ciśnienie tętnicze krwi u myszy z wywołanym nadciśnieniem tętniczym krwi, lecz poprawiło funkcję śródbłonna naczyniowego u tych zwierząt, między innymi poprzez zmniejszenie nadmiernej biosyntezy 20-HETE, zwiększenie biodostępności NO oraz nasilenie aktywności szlaku COX-2.

Rozwojowi raka sutka u myszy, wywołanego inokulacją komórek nowotworowych linii 4T1, towarzyszyła zwiększona biosynteza prozapalnych i pronowotworowych eikozanoidów ze szlaku COX oraz kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETE) powstających z udziałem LOX, podczas gdy biosynteza naczynioochronnych kwasów epoksyekozatrienowych (EET) zmniejszała się w miarę rozwoju choroby. Zablokowanie syntazy NO skutkowało zahamowaniem wzrostu guza pierwotnego oraz zmniejszeniem ilości przerzutów w płucach myszy, zwiększeniem biosyntezy eikozanoidów ze szlaków CYP450 oraz LOX. Prawdopodobnie zwiększona biosynteza EET oraz HETE wspomagała angiogenezę i przerzutowość nowotworową, w warunkach zmniejszonej biodostępności NO.

Badania *in vivo* wykonane w ramach pracy doktorskiej, wykazały heterogeny charakter zmian eikozanoidów w mysim modelu niedoboru NO, nadciśnienia tętniczego krwi oraz przerzutującego raka sutka. W świetle przedstawionych wyników badań, można wnioskować, iż zastosowanie MNA w farmakologii chorób układu sercowo naczyniowego mogłoby wspomagać prawidłową funkcję naczyń krwionośnych, podczas gdy zahamowanie aktywności trombiny oraz biosyntezy 20-HETE mogłoby znaleźć zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego krwi. W przypadku chorób nowotworowych, skuteczną terapią hamującą progresję nowotworu mogłyby być inhibitory izoenzymów CYP450 katalizujących biosyntezę EET, 20-HETE oraz lipooksygenaz uczestniczących w powstawaniu HETE.

Summary

The vascular endothelium releases a broad spectrum of antithrombotic and anti-inflammatory mediators, among others, prostacyclin (PGI₂), nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) which can act in auto-, para- as well as endocrine manner. The endothelial dysfunction is associated with the development of various human diseases such as hypertension, atherosclerosis, cancer and metastasis. Among biologically active lipids involved in the alternations of the endothelial phenotype are eicosanoids. In order to better understand the role of these lipid mediators in the impairment of endothelial function and accompanying diseases the detailed characterisation of eicosanoid profile is needed.

The aim of this study was to develop and validate a bioanalytical method for quantification of selected eicosanoids in biological samples using UPLC-MS/MS system and its application to the assessment of the eicosanoid profile in animal models of endothelial dysfunction such as a murine model of NO-deficiency, hypertension and metastatic breast cancer. Moreover, in the conducted *in vivo* experiments the effect of pharmacological modulation of endothelial function on the changes in eicosanoid biosynthesis was evaluated.

In this study, the concentration of eicosanoids in biological samples was determined using two original UPLC-MS/MS bioanalytical methods. The first method was applied to quantify metabolites of prostacyclin and thromboxane A₂ in mouse plasma and urine while the second one was used for the quantification of 20 eicosanoids biosynthesised from arachidonic acid *via* cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) and cytochrome P450 enzymes as well as in nonenzymatic manner in plasma and lung samples. The methods were validated including linearity, selectivity, accuracy, precision, recovery, matrix effect and stability of analytes. All validated parameters met the criteria of acceptance for bioanalytical methods, thus the methods were successfully applied for the evaluation of eicosanoid profile in studied murine models of endothelial dysfunction.

In murine model of NO-deficiency induced by N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment, the inhibition of NO synthase led to the increase in platelet activity, biosynthesis of COX-2-derived eicosanoids as well as N-methylnicotinamide (MNA). Interestingly, the exogenous MNA did not significantly change neither the platelet activity nor eicosanoid biosynthesis from COX-2 pathway, but improved the function of endothelium as the systemic NO bioavailability was increased in mice treated with L-NAME.

In murine model of hypertension induced by AngII the elevated blood pressure resulted in the development of endothelial dysfunction and was related with enhance biosynthesis of a potent vasoconstrictor eicosanoid such as 20-HETE formed *via* CYP450 pathway. The inhibition of thrombin activity by dabigatran did not influence the blood pressure, however it abrogated the excessive biosynthesis of 20-HETE and prevented the development of endothelial dysfunction by sustaining the systemic NO bioavailability in mice with AngII infusion.

In murine model of metastatic mammary carcinoma induced by orthotopic inoculation of 4T1 cancer cells, the disease progression was related with the intensified biosynthesis of proinflammatory and tumorigenic COX-derived prostanoids as well as hydroxyeicosatetraenoic acids (HETE) generated *via* LOX, whereas the production of CYP450-dependent endothelial protective epoxyeicosatrienoic acids (EET) was reduced. The blockade of nitric oxide synthase by L-NAME inhibited the primary tumour growth and pulmonary metastasis as well as increased the biosynthesis of EET, 20-HETE and LOX-derived HETE indicating that these lipid mediators were mainly involved in the development of cancer and facilitated the formation of secondary tumours in the lungs in NO-deficient mice.

The study shows the heterogeneity of eicosanoid profile in murine models of endothelial dysfunction such as NO-deficiency, hypertension and metastatic breast cancer. The obtained results indicate that MNA could improve the endothelial function in cardiovascular diseases, pharmacological inhibition of thrombin activity and 20-HETE biosynthesis could be an effective therapy in hypertension. The development of cancer diseases might be suppressed by blockade of EET, 20-HETE and LOX-derived HETE biosynthesis.