

2016

NOVÉ STRATEGICKÉ PRÍSTUPY V EXPERIMENTÁLNEJ KARDIOPROTEKCII



PREVEDA

Editori: Miroslav Ferko, Pavol Farkaš
Preveda, 2016

ISBN 978-80-970712-9-5

NOVÉ STRATEGICKÉ PRÍSTUPY V EXPERIMENTÁLNEJ KARDIOPROTEKCII

Editori

Ing. Miroslav Ferko, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Ing. Pavol Farkaš, PhD., Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava

Autori

MUDr. Marek Záležák, PhD., Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Štefan Lukáč, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

Mgr. Veronika Ledvényiová-Farkašová, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

MUDr., Tatiana Ravingerová DrSc., Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Mgr. Lucia Griecsová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Mgr. Ivana Kancirová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Mgr. Magdaléna Jašová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Recenzenti

Doc. PharmDr. Adriana Adameová, PhD., Farmaceutická fakulta UK, Katedra farmakológie a toxikológie, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava

MUDr. Ján Styk, CSc., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

MUDr. RNDr. Angelika Púzserová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie Sienki-ewiczova 1, 813 71 Bratislava

RNDr. Barbara Szeiffová-Báčová, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Doc. RNDr. Iveta Waczulíková, PhD., Oddelenie biomedicínskej fyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava

PharmDr. Tomáš Rajtík, PhD., Farmaceutická fakulta UK, Katedra farmakológie a toxikológie, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava

RNDr. Oľga Uličná, CSc., Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

EDITORIÁL

Vedecká monografia pod názvom „Nové strategické prístupy v experimentálnej kardioprotekcii“ ponúka prehľad aktuálnych, vysoko odborných štúdií z oblasti základného kardiovaskulárneho výskumu. Experimentálny výskum v oblasti srdcovo-cievnych ochorení tvorí nosný pilier pre úspešnú liečbu a prevenciu kardiovaskulárnych ochorení. Vedecká monografia je prierezom nových poznatkov, ktoré v sebe zahrňujú výskum adaptačných odpovedí a mechanizmov ochrany patologicky ovplyvneného myokardu s prihliadnutím na vek a pohlavné rozdiely. Prezentované výsledky poskytujú informácie o aktivácii protektívnych procesov, vedúcich k zvýšeniu tolerancii srdca voči ischemickému poškodeniu. Zároveň poukazuje na dôležitosť detailného poznania vplyvu rizikových faktorov zodpovedných za vznik srdcovo-cievnych ochorení, súvisiacich so životným štýlom.

Vedecká monografia poskytuje aktuálny prehľad strategických postupov využívajúcich ku kardioprotekcii procesy endogénnej ochrany, akými sú ischemický preconditioning, ako aj neinvazívny spôsob zvýšenia ischemickej tolerancie srdca, pri ktorom sa spúšťačí ischemický impulz aplikuje na mieste vzdialenom od miesta očakávaného protektívneho efektu, klinicky aplikovateľný preconditioning „na diaľku“, tzv. „remote“ ischemický preconditioning.

Významná časť monografie je venovaná štúdiu energetickej udržateľnosti myokardu počas jeho patologickej záťaže so zreteľom na funkciu mitochondrií. Dôležitou súčasťou sú informácie o možnosti prevencie kardiovaskulárnych ochorení ovplyvnením endotelu – spoločného miesta, kde pôsobia rôzne rizikové faktory kardiovaskulárnych chorôb.

Autori jednotlivých kapitol prihliadali pri vytváraní tohto súborného diela na významnú vlastnosť, akou je schopnosť myokardu čiastočne sa adaptovať na patologický podnet. Prihladajúc na tento dôležitý poznatok prebieha v myokarde oproti patologickým podnetom celý rad kompenzačných mechanizmov, ktorých výsledkom je udržanie funkcie srdca a následne jeho prežívanie.

Oblasť výskumu kompenzačných mechanizmov účinných v procesoch endogénnej ochrany myokardu, ku ktorému prispieva i táto monografia sa ukazuje byť ako perspektívna metóda v podmienkach zvýšených energetických nárokov patologicky zaťaženého myokardu.

Prezentované poznatky sú vhodné ako podporný študijný materiál pre študentov lekárskeho a prírodných vied. Na svoje si prídu nadšenci experimentálnej kardioprotekcie, fyziológie, patofyziológie, molekulárnej biológie, biochémie, ale aj biofyziky.

Editori

OBSAH

Profil autorov kapitol	5
Recenzie kapitol monografie	7
Vplyv rizikových faktorov ischemickej choroby srdca na odolnosť srdca voči ischemickému poškodeniu <i>Marek Zálešák</i>	12
Ovplyvnenie endotelu flavonoidmi ako možnosť prevencie kardiovaskulárnych ochorení <i>Štefan Lukáč</i>	27
Účinnosť aktivácie vlastných kardioprotektívnych mechanizmov v závislosti od pohlavia a veku <i>Veronika Ledvényiová-Farkašová, Tatiana Ravingerová</i>	41
Vplyv dospievania na odpoveď myokardu na ischemiu a na adaptačné procesy v srdci potkana: štúdium molekulárnych mechanizmov <i>Lucia Griecsová</i>	60
Mitochondrie ako hlavné efektory mechanizmov endogénnej ochrany myokardu <i>Ivana Kancirová, Magdaléna Jašová</i>	72

PROFIL AUTOROV KAPITOL

MUDr. Marek Zálešák, PhD., absolvoval doktorandské štúdium v rokoch 2011 až 2015 z odboru fyziológia živočíchov na Ústave pre výskum srdca SAV, kde momentálne pôsobí ako vedecký pracovník. Podieľal sa na riešení viacerých projektov zameraných na štúdium vplyvu rizikových fakto-mulovanej v in vitro podmienkach a krátkotrvajúceho ischemického stresu – ischemického preconditioningu) na vnútrobunkové adaptačné mechanizmy (PI3K/Akt signálna dráha) srdca a odolnosť srdca voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu na čiastočné objasnenie horšej prognózy akútneho infarktu myokardu pri komorbiditách.

Štefan Lukáč je aktuálne tesne pred ukončením štúdia na Lekárskej fakulte UK v Bratislave v odbore všeobecné lekárstvo. Od prvého ročníka sa aktívne zapája do študentskej vedeckej činnosti, kde sa dominantne zaoberal problematikou oxidačného stresu a jeho významu v patogeneze chorôb. Za svoje práce získal viaceré ocenenia na konferenciách doma i v zahraničí (Budapešť, Dublin), rovnako i akademické pochvaly dekana LF UK a rektora UK. Zúčastnil sa študijných pobytov a stáží na Georg-August Universität v Göttingene a Allgemeines Krankenhaus vo Viedni. Aktívne pracuje aj v Akademickom senáte Lekárskej fakulty a vedie Team ŠVOČ na LF.

Mgr. Veronika Ledvényiová-Farkašová, PhD., pracuje ako vedecký pracovník (postdoktorand) na Oddelení srdcovej fyziológie a patofyziológie Ústavu pre výskum srdca SAV, kde v roku 2015 ukončila doktorandské štúdium pod vedením MUDr. Tatiany Ravingerovej, DrSc. Dr. Farkašová sa venuje predovšetkým výskumu problematiky pohlavných rozdielov v odolnosti srdca voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu v rôznych experimentálnych modeloch. Zároveň študuje potenciálny vplyv pohlavia na účinnosť aktivácie vlastných kardioprotektívnych procesov a potenciálne molekulárne mechanizmy v pozadí s dôrazom na úlohu PI3K/Akt dráhy.

MUDr., Tatiana Ravingerová DrSc., z Ústavu výskumu srdca SAV, je vedúcou Oddelenia srdcovej fyziológie a patofyziológie, ktoré rieši vybrané problémy teoretickej a experimentálnej kardiológie. Dr. Ravingerová dosiahla významné výsledky v oblasti výskumu endogénnych adaptačných mechanizmov v myokarde a ochrany voči ischemickému poškodeniu srdca. Výrazné úspechy dosiahla aj vo výskume odolnosti srdca voči ischemii v diabetickom myokarde, kde sa zaoberala molekulárnymi mechanizmami kardioprotekcie a ich zmenami v „chorom“ myokarde. V súčasnosti sa vo svojej vedecko-výskumnej činnosti venuje štúdiu nových postupov pri ochrane srdca pred akútnou ischemiou v organizme, ktorý je zaťažený civilizačnými chorobami, napr. metabolickými poruchami, stresom, zvýšeným tlakom krvi, ako aj možností obnovenia zníženého adaptačného potenciálu srdca.

Mgr. Lucia Griecsová je doktorandkou Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. V rámci doktorandského štúdia pôsobí na Oddelení srdcovej fyziológie a patofyziológie na Ústave pre výskum srdca SAV. Už od bakalárskej práce sa venuje skúmaniu vplyvu rizikových faktorov na kardiovaskulárny systém. Vo svojej dizertačnej práci sa zameriava hlavne na výskum vplyvu starnutia na odolnosť myokardu voči ischemii a na adaptačné procesy v srdci potkana. Zaoberá sa aj skúmaním molekulárnej podstaty ischemického preconditioningu v závislosti od veku a snaží sa objasniť v akom vekovom štádiu začína dochádzať k zmenám v signalizačných kaskádach preconditioningu, a teda v účinnosti týchto ochranných adaptačných mechanizmov.

Mgr. Ivana Kancirová je absolventkou študijného programu Biomedicínska fyzika na Fakulte matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave. Magisterské štúdium ukončila v roku 2013. V súčasnosti pokračuje v štúdiu na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave v odbore Fyziológia živočíchov a zároveň pôsobí vo funkcii doktorandky na Oddelení biochémie Ústavu pre výskum srdca SAV. Pracuje v oblasti výskumu kardioprotektívnych mechanizmov vedúcich k ochrane a zmenšeniu ischemického poškodenia myokardu. Sústreďuje sa predovšetkým na výskum kardioprotektívnej intervencie nazvanej ischemický preconditioning „na diaľku“ alebo remote ischemický preconditioning. Snaží sa objasniť, akú úlohu zohráva bioenergetika myokardu v spomínanom procese kardioprotekcie s ohľadom na respiračnú aktivitu mitochondrií a ich schopnosť produkovať energiu.

Mgr. Magdaléna Jašová od skončenia štúdia odboru Fyziológia živočíchov a etológia na Prírodovedeckej fakulte v Bratislave v roku 2013 pôsobí ako postgraduálna študentka Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave na Oddelení biochémie Ústavu pre výskum srdca SAV. Magdaléna Jašová sa počnúc diplomovou prácou zaoberá problematikou endogénnej ochrany myokardu indukovanej nielen akútnou fázou diabetes mellitus, ale aj rôznymi formami preconditioningu, t.j. remote ischemický preconditioning či farmakologický preconditioning. Orientuje sa na výskum funkčných a štruktúrnych vlastností srdcových mitochondrií využitím stanovenia biochemických a biofyzikálnych parametrov membránovej fluidity, aktivity mitochondriovej ATP syntázy a obsahu konjugovaných diénov. Je spoluautorkou dvoch vedeckých článkov a prvoautorokov jedného vedeckého článku.

RECENZIE KAPITOL MONOGRAFIE

Vplyv rizikových faktorov ischemickej choroby srdca na odolnosť srdca voči ischemickému poškodeniu

Marek Zálešák

Monografia autora MUDr. M. Zálešáka, PhD. predstavuje zaujímavú experimentálnu štúdiu zameranú na stále aktuálnu problematiku – ischémiu myokardu v prítomnosti metabolických a osmotických zmien. Cenným prínosom štúdie je tiež štúdium stimulovanej odolnosti myokardu voči ischémiu a uvoľňovania špecifického markera poškodenia kardiomyocytov, tzv. srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny (h-FABP). Práca tak pre-pája patofyziologické poznatky o ischémiu myokardu, diagnostickú možnosť vzhľadom na skoré uvoľnenie markera a ne/farmakologické možnosti zvyšujúce rezistenciu voči ischemickému ataku.

Použité metodické prístupy sú adekvátne k stanoveným cieľom. Výsledky práce sú vecne popísané, rozdiely medzi príslušnými porovnávajúcimi skupinami správne štatisticky vyhodnotené. Diskusia je kritickým zhodnotením vlastných výsledkov a konfrontáciou s inými podobnými štúdiami, ktoré spoločne navrhujú prítomnosť mechanizmov v zistených protektívnych alebo myokard poškodzujúcich dejoch.

Na základe prezentovaných výsledkov možno konštatovať, že kardioprotektívne pôsobenie ischemického preconditioning-u je sprevádzané s poklesom uvoľnenia markera poškodenia h-FABP, a že naopak hyperglykémia ale nie hyperosmotické prostredie zvyšuje uvoľňovanie tohto markera na ischémiu adaptovaných srdciach a to aj napriek porovnateľnému vplyvu na veľkosť infarktového ložiska.

Záverom by som rada vyjadrila sumárne kladné hodnotenie monografie, ktoré zahŕňa ocenenie vedeckého zámeru, kvalitu spracovania a konfrontáciu výsledkov a ambíciu prepojenia štúdie s klinickými situáciami.

Doc. PharmDr. Adriana Adameová, PhD.

Predložený rukopis má 29 strán a obsahuje rizikové faktory ischemickej choroby srdca, rozoberá problematiku hypercholesterolémie, hypertenzie, diabetu melitus a problematiku stabilnej a nestabilnej angíny pectoris. V experimentálnej časti

rozoberá vplyv simulovanej hyperglykémie a ischemického preconditioningu, popisuje materiál a metódy, hodnotenie veľkosti infarktového ložiska a analýzu h-FABP (srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny) uvoľňovaného zo srdca. Bohatá je výsledková časť a diskusia ako aj množstvo použitej literatúry.

Cieľom práce bolo prispieť k rozšíreniu poznatkov týkajúcich sa vplyvu rizikových faktorov vzniku srdcovocievnych ochorení, súvisiacich so životným štýlom na ochranu srdca pred ischemicko-reperfúznym poškodením.

Z najvýznamnejších dosiahnutých výsledkov uvádzam: Výsledky experimentov potvrdili ochranný účinok hyperglykémie a ischemického preconditioningu pri perfúzii srdca roztokom s normoglémiou voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu. Napriek tomu srdcia vystavené ischemickému preconditioningu v podmienkach hyperglykémie vykazovali väčší rozsah ischemicko-reperfúzneho poškodenia v porovnaní so srdcami, ktoré neboli vystavené ischemickému preconditioningu. Kombinácia ischemického preconditioningu a hyperglykémie má negatívny účinok na odolnosť srdca voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu, podobne ako nestabilnej angíny pectoris na prognózu následného akútneho infarktu myokardu. Príčinou zníženej odolnosti srdca vystavených ischemickému preconditioningu pri hyperglykémii môže byť zlyhanie regulácie bunkových ochranných mechanizmov.

Prácu hodnotím kladne, lebo štúdium vplyvu rizikových faktorov srdca na ischemickú toleranciu môže mať potenciálne uplatnenie v klinickej praxi pri určovaní prognózy akútneho infarktu myokardu.

MUDr. Ján Styk, CSc.

Ovplyvnenie endotelu flavonoidmi ako možnosť prevencie kardiovaskulárnych ochorení

Štefan Lukáč

Pozoruhodné je, že uvedený prehľadový článok je napísaný študentom všeobecného lekárstva. V práci sa mladý medik zaoberá možnosťami prevencie kardiovaskulárnych ochorení ovplyvnením endotelu prírodnými látkami zo skupiny flavo-

noidov. Dnes už vieme, že významnou, ba až nepostrádateľnou súčasťou obehového systému je endotel. Hoci ide len o jednu vrstvu buniek, udržiava cievnu homeostázu, čím zasahuje do funkcie mnohých orgánov. Predstavy o úlohe endotelu, ako len anatomicky definovanej bariéry oddelujúcej krv od okolitého tkaniva, sa zmenili iba koncom 20. storočia. Rozvoj poznatkov o endoteli viedol aj k objasneniu spoločného miesta kde pôsobia rôzne rizikové faktory kardiovaskulárnych chorôb. Všetky známe kardiovaskulárne rizikové faktory, ako sú napríklad hypertenzia, hypercholesterolémia, diabetes mellitus, fajčenie, či vek vedú k endotelovej dysfunkcii. Endotelová dysfunkcia vzniká vo včasných štádiách aterosklerózy a má kľúčové postavenie v celom jej procese. Hoci pri niektorých liečivách, ako sú statíny alebo inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu, sa dokázal priaznivý vplyv na obnovu endotelovej funkcie, do popredia záujmu sa čoraz viac dostávajú aj rastlinné polyfenolické látky, najmä flavonoidy. V ostatných rokoch sa sústreďuje klinická, vedecká, ale i spoločenská pozornosť na prevenciu, ale aj terapiu kardiovaskulárnych chorôb prírodnými flavonoidmi. Zatiaľ však neexistujú veľké klinické štúdie, ktoré by priaznivý dopad flavonoidov na kardiovaskulárnu morbiditu a mortalitu preukázali. Avšak v experimentoch na zvieratách a niektorých klinických štúdiách uskutočnené na malých počtoch pacientov tieto látky zlepšujú endotelovú funkciu a dávajú veľmi sľubné výsledky. Na tomto mieste treba doplniť autora práce, nakoľko aj výsledky viacerých slovenských výskumníkov preukázali, že extrakty z hrozna a vína obsahujúce polyfenoly, vrátane flavonoidov, môžu mať pozitívny účinok na funkciu cievnej steny, najmä na funkciu endotelovej vrstvy. Navyše naši pracovníci dokázali, že okrem preventívneho účinku, zmes polyfenolických látok z červeného vína môže mať aj terapeutické účinky.

Cievny endotel sa stal cieľom pre farmakoterapiu rôznych ochorení. Problematika tejto práce je preto dôležitá nielen v základnom výskume, ale aj v klinickej praxi, preto sa skúmaniu biologických účinkov flavonoidov treba aj naďalej intenzívne venovať. Autorovi preto patrí vďaka za napísanie tejto prehľadovej práce. Dúfam, že mu daná problematika nebude ľahostajná ani po skončení štúdia medicíny a získané poznatky využije aj v reálnej klinickej praxi.

MUDr. RNDr. Angelika Púzserová, PhD.

Práca Štefana Lukáča bola vypracovaná na Lekárskej fakulte UK v Bratislave. Autor v predložennom rukopise detailne podáva informácie o endoteli, jeho stavbe, funkcii, ako aj o endotelovej dysfunkcii. Rovnako podrobne venuje svoju pozornosť skupine polyfenolových látok-flavonoidom, kde dáva do popredia najmä na ich protektívne účinky.

Autor v rukopise zdôrazňuje, že endotel je vysokošpecializovaný orgán podieľajúci sa na regulácii mnohých procesov. Jeho poškodením vzniknutá endotelová dysfunkcia potencuje rozvoj rôznych ochorení ciev. V tejto časti autor upozorňuje na prevenciu ochorení, ovplyvnením endotelu v štádiu dysfunkcie a to za použitia flavonoidov.

Tieto poznatky, ktoré sú veľmi kvalitne spracované, autor podložil s množstvom prác zahraničných a domácich autorov.

RNDr. Barbara Szeiffová-Báčová, PhD.

Účinnosť aktivácie vlastných kardioprotektívnych mechanizmov v závislosti od pohlavia a veku

Veronika Ledvényiová-Farkašová,
Tatiana Ravingerová

Táto experimentálna štúdia uskutočnená na laboratórnych potkanoch je zameraná na rozšírenie poznatkov o pohlavných rozdieloch v kardioprotektívnych mechanizmoch ischemického „preconditioning-u“ u rôznych vekových kategórií ako aj o pohlavných rozdieloch v odolnosti myokardu pri ischemii. Významnou súčasťou endogénnych kardioprotektívnych signálnych kaskád preconditioningu je aj aktivácia fosfatidylinozitol 3-kinázy (PI3K) a proteínkinázy B (Akt). Cieľom autorov bolo aj poznanie molekulárnych endogénnych kardioprotektívnych mechanizmov, preto sa autorky zamerali hlavne na objasnenie vplyvu pohlavia a veku v aktivácii signálnej kaskády PI3K/Akt. Vybraná problematika je veľmi dôležitá, nakoľko boli pozorované pohlavné rozdiely nielen v prevalencii, ale aj v patogenéze rôznych ochorení vrátane kardiovaskulárnych chorôb.

Výsledky práce potvrdili vyššiu toleranciu myokardu samíc voči ischemicko-reperfúznemu (I/R) poškodeniu v porovnaní s myokardom samcov, čo bolo zachované aj počas starnutia samíc. Zistením, že zvýšená tolerancia voči I/R poškodeniu bola spojená so zvýšenou hladinou aktivovanej Akt v kardiomyocytoch samíc, naznačuje možnú

príčinu v pohlavných rozdieloch v odolnosti srdca voči ischémiu a reperfúzi už za bazálnych podmienok. Navyše, zvýšená odolnosť srdca samíc voči letálnemu poškodeniu bola potlačená inhibíciou PI3K/Akt dráhy. Okrem toho výsledky práce potvrdzujú význam PI3K/Akt signalizácie aj v kardioprotektívnych mechanizmoch preconditioningu. Avšak na rozdiel od významnej úlohy PI3K/Akt v antiinfarktovom účinku preconditioningu, zdá sa, že táto dráha nie je zapojená do jeho antiarytmického účinku. V prípade samcov sa antiarytmický ako aj antiinfarktový účinok ischemického preconditioningu prejavil v rôznych vekových kategóriách. Zaujímavé bolo zistenie, že v prípade samcov bol vplyv veku na arytmogenezu výraznejší ako v prípade samíc. V súvislosti s vekom, veľkosť infarktu myokardu po I/R poškodení nebola ovplyvnená vekom ani u samcov ani u samíc. Okrem toho, však autorky zistili, že starnutie čiastočne mení odpoveď srdca na ischémiu a ovplyvňuje aj potenciál pre aktiváciu endogénnej kardioprotekcie. Navyše predpokladajú, že u samíc dochádza k vekovo špecifickej aktivácii PI3/Akt dráhy. Záverom práce konštatuje, že ischemický preconditioning aplikovaný v štúdiu poskytuje dostatočný antiinfarktový účinok v srdci oboch pohlaví, avšak je výraznejší u samcov a nie je ovplyvnený vekom. Výsledky poukazujú aj na pohlavne, ako aj vekovo závislý účinok preconditioningu a aktivácie PI3K/Akt dráhy v procese navodenia kardioprotekcie.

Práca okrem vlastných zaujímavých výsledkov poskytuje veľmi dobrý prehľad odbornej literatúry v študovanej problematike, ktorú autorky rozdelili do niekoľkých ucelených častí zameraných na problematiku vplyvu pohlavia na kardiovaskulárny systém, pohlavné rozdiely z hľadiska zlyhania srdca, vplyvu pohlavia na vznik arytmií, významu estrogénov v kardioprotekcii, základnú charakteristiku estrogénových receptorov, molekulárne mechanizmy pohlavných rozdielov v odolnosti kardiovaskulárneho systému a endogénne ochranné mechanizmy v srdci, navodenej najmä účinkom ischemického preconditioningu. Výsledky práce nepochybne dopĺňajú vedomosti v tejto komplexnej oblasti výskumu.

Som presvedčená, že získané výsledky tejto práce budú prínosom nielen v základnom výskume, ale aj v klinickej praxi.

MUDr. RNDr. Angelika Púzserová, PhD.

Experimentálna práca autoriek Veroniky Ledvényiovej-Farkašovej a Tatiany Ravingerovej svojím zameraním patrí do oblasti výskumu ochrany srdca voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu, navodenej tzv. ischemickým preconditioningom (IP). Práca prináša pôvodné výsledky, ktoré sa viažu k aktivácii vlastných protektívnych mechanizmov v srdci potkanov kmeňa Wistar v podmienkach IP. Konkrétne si autorky dali za cieľ preskúmať aktiváciu signálnej kaskády fosfatidylinozitol 3-kinázy/proteínkinázy B (PI3K/Akt), ktorej úloha v procese adaptácie srdca už bola experimentálne preukázaná vo viacerých štúdiách. Štúdium aktivácie dráhy PI3K/Aktv podmienkach IP autorky sledovali v dvoch vekových skupinách a laboratórny experiment rozšírili o faktor pohlavia. Adaptačné a ochranné mechanizmy v experimentálnych skupinách, ktoré predstavovali kombinácie úrovni veku a pohlavia, boli hodnotené aj na základe kvantifikovania rozsahu infarktového ložiska a vzniknutých reperfúzných arytmií. Svoj experimentálny zámer autorky viac než dostatočujúco zdôvodňujú v prvej časti práce, ktorú tvorí kompilácia doterajších poznatkov o problematike, fenoméne IP, ako aj o predpokladaných signálnych dráhach a efektoroch zapojených do kardioprotekcie. Metodická časť je spracovaná prehľadne, získané výsledky autorky štatisticky spracovali a medziskupinové rozdiely testovali analýzou variancie. Výsledky popisnej a inferenčnej štatistiky prezentujú v tabuľkovej a grafickej forme, pričom výsledky jasne ukazujú na interakciu veku a pohlavia v sledovaných charakteristikách zvolených pre hodnotenie účinku IP. Pre doteraz nízky počet prác publikovaných v tejto oblasti mohli autorky zhodnotiť svoje nálezy len obmedzene – o to viac sú ich výsledky, ktoré upozorňujú na fakt, že pri štúdiu a hodnotení pohlavných rozdielov v účinku IP a aktivácii PI3K/Akt dráhy treba prihliadať na vek, cenným príspevkom pre výskum možností, ako zvýšiť toleranciu srdca k ischémiu a využiť fenomén ischemického preconditioningu nielen v klinickej praxi, ale aj v oblasti verejného zdravotníctva.

Doc. RNDr. Iveta Waczulíková, PhD.

Vplyv dospievania na odpoveď myokardu na ischémiu a na adaptačné procesy v srdci potkana: štúdium molekulárnych mechanizmov

Lucia Griecsová

V predloženej experimentálnej štúdii bol sledovaný vplyv veku organizmu na schopnosť indukcie adaptačných a kardioprotektívnych procesov pri ischemicko-reperfúznom (IR) poškodení u potkanov. Práca bola rozšírená aj o štúdium efektivity vplyvu ischemického preconditioningu (IPC) v troch vekových skupinách zvierat – u mladých jedincov (1,5 mesiaca), mladších dospelých jedincov (3 mesiace) a u starších dospelých jedincov (6 mesiacov). Adaptačné a ochranné mechanizmy v jednotlivých skupinách boli sledované ako na úrovni letálneho ireverzibilného poškodenia a elektrickej aktivity srdca (veľkosť infarktového ložiska a vznik reperfúzných arytmií), tak aj na úrovni molekulárnych markerov kaskády PI3K/Akt/eNOS, konkrétne celkových a fosforylovaných foriem proteínov Akt a eNOS, ktoré sa považujú za dôležité na zlepšenie endotelovej dysfunkcie a koronárneho prietoku. Výsledky uvedenej práce potvrdili vplyv samotného veku na zhoršenie adaptačnej odpovede po IR poškodení ako na úrovni bunkovej smrti a arytmogenézy (1,5 mes. < 3 mes. < 6 mes.), tak aj na úrovni zníženej expresie molekulárnych markerov Akt/p-Akt a eNOS. Čo je zaujímavé, uvedená práca poukázala na klesajúci vplyv IPC so stúpajúcim vekom vzhľadom na veľkosť infarktu a výskyt reperfúzných arytmií, čo môžu predstavovať dôležitý oporný bod pri translačných štúdiách s prihliadnutím na vek pacientov. Okrem toho, výsledky práce poukazujú na dôležitosť zachovania dostatočnej aktivity protektívnej signálnej kaskády PI3K/Akt/eNOS pri obnovení prietoku a stabilizácii elektrickej aktivity – zníženie arytmogenézy a zmenšenie infarktu po IR poškodení myokardu. Takéto výsledky môžu byť cenné pri základnom farmakologickom výskume, ako aj pri klinických translačných štúdiách.

PharmDr. Tomáš Rajtík, PhD.

Rukopis Lucii Griecsovej vypracovaný na Ústave pre výskum srdca SAV sa venuje najmä efektu starnutia na adaptáciu srdca (ischemický preconditioning), ale aj objasneniu molekulárnej podstaty preconditioningu v závislosti od veku.

V úvodnej časti predloženej experimentálnej vedeckej práce autorka kvalitne spracovala infor-

mácie o ischemickej chorobe srdca ako aj ochrane srdca pred ischémiou cestou adaptácie, preconditioningu. Veľmi podrobne rozoberá signálne dráhy preconditioningu a ich zmeny ovplyvnené vekom.

Metódy skúmania odpovedajú jasne stanoveným cieľom, ktoré autorka vo výsledkovej časti plne splnila. Výsledky, ktoré sú prehľadne opísané a uvedené v grafoch autorka v diskusnej časti porovnáva a konfrontuje s množstvom zahraničných a domácich publikácií s obdobnou tematikou.

Na základe získaných výsledkov autorka v poslednej časti zhrnula všetky poznatky, no najmä poukázala na význam ďalších štúdií proteínov zahrnutých v protektívnej bunkovej signalizácii.

RNDr. Barbara Szeiffová-Báčová, PhD.

Mitochondrie ako hlavné efekторы mechanizmov endogénnej ochrany myokardu

Mgr. Ivana Kancirová, Mgr. Magdaléna Jašová

V monografii sa autorky Ivana Kancirová a Magdaléna Jašová zamerali na štúdium mitochondrií srdca, ktoré sú chápané ako efekторы mechanizmov jeho endogénnej ochrany. Prínosom v tejto súvislosti je štúdium a porovnanie kardioprotekcie pomocou ischemického preconditioningu a remote ischemického preconditioningu na mitochondrie srdca. Takéto sledovanie významne prispieva k rozšíreniu teoretického poznania a bezpochyby má priamy výstup i pre klinickú prax, pretože ukazuje ako tieto dve formy preconditioningu pripravujú srdce na zvýšenú záťaž a ako sa prejavujú v procese jeho endogénnej ochrany.

Mitochondrie sú unikátne organely eukariotických buniek, ktoré okrem produkcie energie vo forme ATP kontrolujú celý rad ďalších funkcií, vrátane schopnosti adaptovať bunku na nové podmienky prostredníctvom signálnych dráh a remodelovať ich štruktúru a dynamiku. Metodológia a metodické postupy použité v experimente sú v súlade s vytýčeným cieľom. Výsledky sú spracované adekvátnymi štatistickými metódami a správne zrozumiteľne popísané. Diskusia je vecná, nechýba v nej porovnanie výsledkov štúdie s inými podobnými. Autorky kriticky zhodnotili svoje výsledky a navrhujú ďalšie riešenie problematiky.

Výsledky ukázali, že remote ischemický preconditioning indukuje prostredníctvom endogénnej

protektie zmeny vo funkčných parametroch srdcových mitochondrií najmä s ohľadom na biofyzikálny stav membrán. Remote ischemický preconditioning zvýšil fluiditu mitochondriovej membrány počas fáz ischemicko-reperfúzneho poškodenia a indukoval tvorenie voľných radikálov v stabilizačnej fáze. Zvýšená tvorba voľných kyslíkových radikálov nespôsobila rigidizáciu membrány. Tento poznatok dovoľuje predpoklad, že voľné kyslíkové radikály majú signálny charakter, ktorý smeruje k iniciovaniu kardioprotektívnych endogénnych mechanizmov.

Záverom konštatujem, že monografia splnila vedecký zámer v celom rozsahu. Výsledky sú kvalitne spracované a správne hodnotené. Diskusia konfrontuje poznatky, je kritická. Výsledky sú prínosom pre teoretické poznanie i klinickú prax. Na základe tohto konštatovania hodnotím predloženú monografiu kladne.

RNDr. Oľga Uličná, CSc.

Rôzne formy preconditioningu vyvolávajú protektívne funkčné a štrukturálne zmeny v myokarde, ktoré sú súčasťou procesu endogénnej ochrany myokardu.

Cieľom práce bolo objasniť, akým spôsobom remote preconditioning propagujúci kardioprotektívny účinok na úrovni mitochondriových membrán ovplyvňuje nasledovné funkčné parametre

mitochondrií v patologicky zaťaženom myokarde: a) fluidita resp. tekutosť mitochondriovej membrány; b) aktivitu respiračného reťazca mitochondrií a c) produkciu kyslíkových radikálov mitochondriami.

Remote preconditioning pozostával z 3 cyklov 5 min. ischemie a následnej 5 min. reperfúzie pravej zadnej končatiny použitím tlakovej manžety.

Výsledky práce ukázali, že remote preconditioning spôsobuje zvýšenie fluidity mitochondriálnych membrán vo všetkých fázach ischemicko-reperfúzneho testu a indukuje tvorbu voľných kyslíkových radikálov počas stabilizačnej fázy. Vyšavenie izolovaných srdiec ischemicko-reperfúznemu poškodeniu malo za následok zníženie aktivity mitochondriálnej ATP-syntázy, ako aj pokles v ADP-stimulovanej respirácii, bez vplyvu na bazálnu respiráciu mitochondrií. Zvýšený obsah oxidovanej izoformy koenzýmu CoQ9ox odrážajúci poškodenie dýchacieho reťazca počas globálnej ischemie a reperfúzie myokardu sprevádzalo zníženie fluidity mitochondriových membrán.

Prácu hodnotím veľmi kladne z dôvodu, že zvýšenú tvorbu voľných kyslíkových radikálov nesprevádzal proces rigidizácie membrán mitochondrií a preto pripisujú voľným kyslíkovým radikálom prevážne signálny charakter smerovaný ku iniciácii kardioprotektívnych endogénnych mechanizmov.

MUDr. Ján Styk, CSc.

Vplyv rizikových faktorov ischemickej choroby srdca na odolnosť srdca voči ischemickému poškodeniu

Marek Zálešák

Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
marek.zalesak@savba.sk

ABSTRAKT

Ischemická choroba srdca (IHS) je najčastejšou príčinou úmrtia vo vyspelých krajinách. Vzniká v dôsledku aterosklerózy koronárnych tepien, ktorá znižuje ich prietok a zabraňuje adekvátnej perfúzii myokardu. Rizikovými faktormi (RF) vzniku IHS je starnutie a prítomnosť patologických stavov, ako sú diabetes mellitus, hypertenzia, hypercholesterolémia, ktoré súvisia s nezdravým životným štýlom. Prejavom IHS môžu byť aj ischemické epizódy nestabilnej anginy pectoris (NAP) schopné navodiť adaptačnú odpoveď srdca, ktorá znižuje rozsah letálneho poškodenia myokardu pri následnom akútnom infarkte myokardu (AIM) – najzávažnejšej forme IHS. NAP možno teda považovať za klinický ekvivalent ischemického preconditioningu (IP), najznámejšej formy endogénnej kardioprotekcie. Súčasťou mechanizmu IP je stimulácia membránových receptorov špecifickými ligandmi uvoľnenými pri ischemickom strese, modulácia aktivity proteínkináz v sarkoplazme a inhibícia apoptózy. Viaceré klinické štúdie potvrdili, že vplyv NAP na prognózu AIM závisí od kombinácie viacerých komorbidít, ktoré súvisia so životným štýlom. Preto sa experimentálna časť práce zameriava na vplyv hyperglykémie (HG) simulovanej *in vitro* podmienkach perfúziou izolovaných srdiec potkanov roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy na ochranný účinok IP voči ischemicko-reperfúznemu (I/R) poškodeniu. Odolnosť srdca, respektíve závažnosť I/R poškodenia sme posudzovali na základe hodnotenia veľkosti infarktového ložiska (IS) v rizikovej oblasti myokardu a množstva markera poškodenia kardiomyocytov (h-FABP – srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny) uvoľneného zo srdca. Výsledky experimentov potvrdili ochranný účinok HG a IP pri perfúzii srdiec roztokom so štandardnou koncentráciou

glukózy – normoglykémii (NG) voči I/R poškodeniu. Napriek tomu, srdcia vystavené IP v podmienkach HG vykazovali väčší rozsah I/R poškodenia v porovnaní so srdcami, ktoré neboli vystavené IP. Kombinácia IP a HG má teda negatívny účinok na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu, podobne ako NAP na prognózu následného AIM pri komorbiditách. Príčinou zníženej odolnosti srdiec vystavených preconditioningu pri HG môže byť zlyhanie regulácie bunkových ochranných mechanizmov. Štúdium kombinovaného vplyvu RF na ischemickú toleranciu môže mať potenciálne uplatnenie v klinickej praxi pri predikcii prognózy AIM u polymorbidných pacientov.

Kľúčové slová: rizikové faktory, ischemický preconditioning, diabetes mellitus, simulovaná hyperglykémia, ischemicko-reperfúzne poškodenie.

ABSTRACT

Ischemic heart disease (IHD) is the most frequent cause of death in developed countries. It is a consequence of atherosclerotic process connected with narrowing of coronary arteries preventing adequate coronary flow. Risk factors (RF) of IHD are associated with ageing and pathological conditions, such as diabetes mellitus, hypertension, hypercholesterolemia related with unhealthy lifestyle. Unstable angina pectoris (UAP) and its ischemic episodes is a manifestation of IHD able to induce adaptive heart response and to alleviate lethal heart injury due to acute myocardial infarction (AIM) – the most severe form of IHD. Therefore, UAP could be considered as a clinical equivalent of ischemic preconditioning (IP), the well-known form of endogenous cardioprotection. Mechanisms of the IP include stimulation of receptors by specific ligands released during ischemic stress, modulation

of sarcoplasmic protein kinases activity and inhibition of apoptosis. Several studies showed that influence of UAP on AIM prognosis depends on combination of lifestyle-related comorbidities. Therefore, the experimental part of this study is focused on the impact of hyperglycemia (HG) simulated in „in vitro“ conditions using perfusion of isolated rat hearts by solution with elevated glucose on IP-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion (I/R) injury. The heart resistance or severity of I/R injury was verified by determination of the size of infarction (IS) in myocardial risk area and the amount of marker of cell injury (h-FABP – heart type fatty acid binding protein) released from perfused heart. The results confirmed the protection mediated by HG or IP in the hearts perfused by solution with standard glucose concentration – normoglycemia (NG) against I/R injury. However, in HG the IP-hearts exhibited more extensive I/R injury than non-preconditioned hearts. Therefore, the combination of HG and IP exerts the negative effect to heart resistance likewise the UAP impairs AMI prognosis in comorbidities. The probable cause of impaired resistance of preconditioned hearts under HG may be failed regulation of cell survival mechanism. The study of combined influence of RF on ischemic tolerance may be potentially useful in clinical practice in prediction of AIM prognosis in polymorbidities.

Key words: risk factors, ischemic preconditioning, diabetes mellitus, simulated hyperglycemia, ischemia-reperfusion injury.

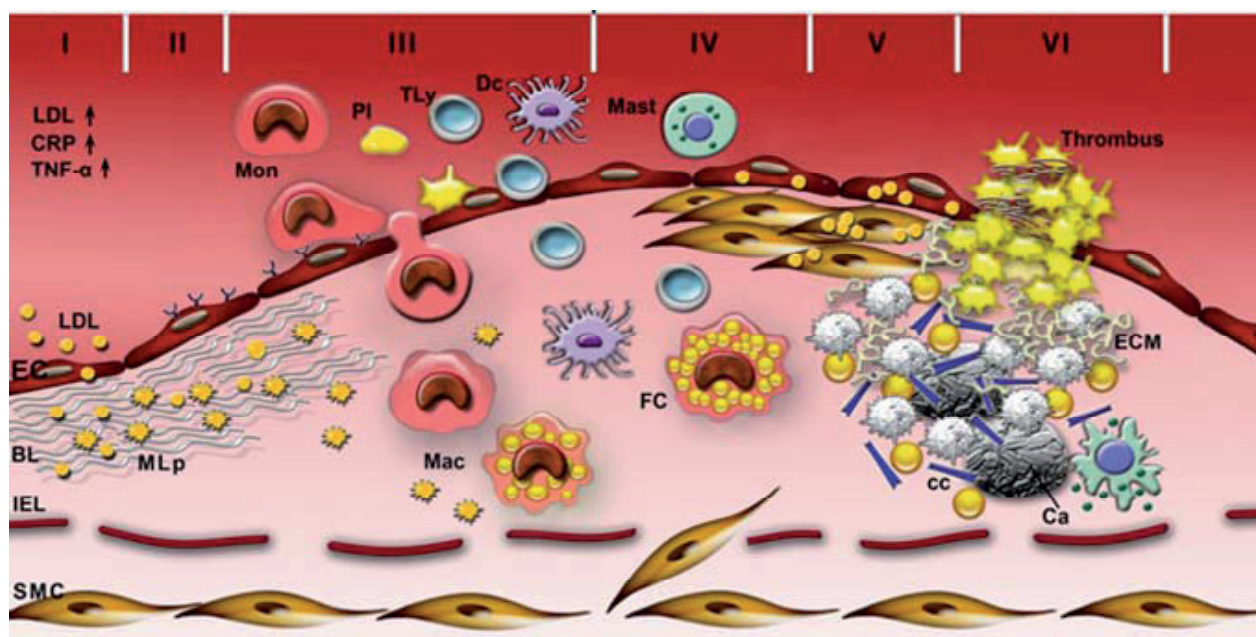
ÚVOD

Ischemická choroba srdca (ICHS) a choroby kardiovaskulárneho systému často pridružené ICHS, ako sú aneuryzma aorty alebo renálne vaskulárne choroby, predstavujú až 40 % príčin všetkých úmrtí. Výskyt ICHS sa zvyšuje s narastajúcim vekom ako dôsledok aterosklerózy koronárnych artérií. Vývoj patologických zmien artérií súvisiacich s aterosklerózou podporuje prítomnosť rizikových faktorov súvisiacich s nezdravým životným štýlom. Medzi najčastejšie rizikové faktory patrí fajčenie, diabetes mellitus, hypertenzia, dyslipidémia a abnormálna obezita.

Rýchly vývoj aterosklerotických lézií v dôsledku pôsobenia rizikových faktorov sa klinicky prejavuje ako nestabilná angina pectoris (NAP). U pacientov s NAP je zvýšené riziko vzniku závažnej formy ICHS

spojenej s trvalým poškodením srdca – akútneho infarktu myokardu (AIM). Viaceré klinické štúdie preukázali, že za určitých okolností pacienti s NAP majú lepšiu prognózu AIM v porovnaní s pacientmi, u ktorých sa ischemické epizódy NAP pred infarktom nevyskytovali. Preto tento jav možno prirovnávať k experimentálne navodenej adaptácii srdca na ischemický stres označovanej ako ischemický preconditioning (IP) (Švorc a kol., 2003).

IP navodený krátkotrvajúcim ischemickým stresom zvyšuje odolnosť a zmierňuje rozsah nevratného poškodenia srdca (infarktu) po následnej dlhotrvajúcej ischemii a prípadnej reperfúzií pri obnove koronárneho prietoku (I/R, ischemicko-reperfúzne poškodenie). Spúšťačom vnútrobunkových adaptačných procesov je stimulácia špecifických receptorov na sarkoplazmatickej membráne ligandami (adenozín, opioidy, adrenalín, bradykinín), ktoré sa uvoľňujú počas pôsobenia stresového faktora (Murry a kol., 1986; Tyagi a Tayal, 2002). Signál je ďalej sprostredkovaný aktiváciou viacerých vnútrobunkových proteínkináz. Medzi vnútrobunkové mechanizmy, ktoré priamo navodzujú zvýšenie odolnosti srdca voči ischemii patrí aktivácia draslíkových kanálov v sarkoplazmatickej membráne a mitochondriách (Rourke, 2004), zatváranie pórov prechodnej priepustnosti membrán mitochondrií (mPTP) (Downey a kol., 2007) a v oneskorenej fáze IP zvýšená expresia antioxidantných enzýmov, endotelovej NO-syntázy a proteínov teplotného šoku, ktoré sa podieľajú na obnove nižších štruktúr stresom denaturovaných proteínov (Korthuis a kol., 1998). Otváranie draslíkových kanálov v sarkoplazmatickej membráne spôsobuje skrátenie fázy 2 akčného potenciálu a zabraňuje preťaženiu bunky vápnikom, ktoré charakterizuje I/R poškodenie (Ošťádal a Kolář, 1999). Otváranie draslíkových kanálov membrán mitochondrií spôsobuje zvýšenie koncentrácie draslíka v mitochondriách, ktoré podporuje energetický metabolizmus bunky. Draslíkový prúd do matrixu mitochondrie a následné vylučovanie draslíka K^+/H^+ výmenníkovým systémom vybíja protónový gradient na vnútornej membráne mitochondrie. Vybíjanie gradientu má za následok jeho kompenzačnú novotvorbu, obnovu oxidatívnej fosforylácie, využitia kyslíka a tvorby ATP pri obnove koronárneho prietoku (Rourke, 2004). Zatváranie mPTP zabraňuje mechanizmom bunkovej smrti, ktoré zahŕňajú uvoľňovanie niektorých proapoptotických proteínov, cytochrómu C, prokaspázy-9 a faktora indukujúceho apoptózu z mitochondrií (Crompton, 1999).



Obr. 1. Štádiá tvorby aterosklerotického plaku (Simionescu a Sima, 2012). I. št. zvýšenej priepustnosti endotelu pri náraste plazmatickej koncentrácie lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL), C-reaktívneho proteínu (CRP), Tumor nekrotizujúceho faktora; II. št. inkorporácie oxidovaných a glykovaných LDL častíc do intimy artérií vo forme modifikovaných lipoproteínov (MLp); III. št. aktivácie trombocytov (Pl), T-lymfocytov (T-Ly), dendritových buniek (Dc) a monocytov (Mon) na aktívne makrofágy (Mac) fagocytujúce MLp a ich premeny na penové bunky (FC) tvoriace lipidové prúžky; IV. št. migrácie buniek hladkej svaloviny (SMC) z média do intimy a vzniku fibróznej čiapky; V. št. fibrolipidového plaku; VI. št. ukladania cholesterolových kryštálov (cc) vápnika a následná ruptúra fibróznej čiapky, vytvorenie trombu v mieste ruptúry, zúženie prievitu ciev.

Patologické stavy súvisiace s nezdravým životným štýlom (diabetes mellitus, hypertenzia, dyslipidémia) môžu regulovať vnútrobunkové adaptačné mechanizmy podobne ako IP. Výsledný efekt ich pôsobenia na odolnosť srdca voči ischémii závisí od ich vzájomnej kombinácie a dĺžky pôsobenia.

ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDCA

Ischemická choroba srdca (ICHS) je označenie skupiny chorôb, ktorých podstatou je ischémia (nedostatočná perfúzia) myokardu vznikajúca v dôsledku patologického procesu v koronárnom riečisku. Najčastejším patologickým procesom spôsobujúcim vznik ICHS je ateroskleróza (Ross, 1999). Ateroskleróza predstavuje komplex zmien v intime artérií, súvisiacich s poškodením endotelu s následnou kumuláciou lipidov, najmä glykovaných a oxidovaných a lipoproteínov s nízkou hustotou (ox-LDL), zápalových buniek a v konečnom dôsledku k tvorbe fibróznej čiapky, ktorá zužuje prievit artérie. Následná kumulácia depozitov vápnika a cholesterolu zvyšuje riziko ruptúry fibróznej čiapky a vzniku krvnej zrazeniny, kto-

rá vedie k výraznejšej obštrukcii ciev (Vohnout a Rašlová, 2009; Obr. 1).

Podľa charakteru ložiska aterosklerózy rozlišujeme tri základné formy ICHS. Podstatou stabilnej anginy pectoris (SAP) je chronická čiastočná obštrukcia koronárnej artérie stabilným ložiskom aterosklerózy, ktorá znemožňuje adekvátnu perfúziu myokardu pri rôznych stupňoch záťaže (Albrecht, 2013). Pojem „angina pectoris“ prvýkrát použil Heberden v roku 1768 (z gréckeho „ancho“ – škrtím a latinského „pectus“ – hrudník) pre typickú zvieravú bolesť hrudníka trvajúcej niekoľko minút, ktorou sa angina pectoris prejavuje. Komplikáciou SAP môže byť nestabilná angina pectoris (NAP) spojená s ruptúrou fibróznej čiapky, následnou trombotizáciou v mieste defektu. NAP zvyšuje riziko totálnej pretrvávajúcej oklúzie koronárnej artérie pri akútnom infarkte myokardu (AIM), ktoré má za následok nevratné poškodenie myokardu (Kaski a kol., 1996). Nenávratne poškodené kardiomyocyty nie sú schopné udržať normálnu distribúciu iónov v intracelulárnom a extracelulárnom prostredí a obnoviť aeróbny metabolizmus po obnovení koronárneho prietoku. Dôsledkom je porušená iónová homeostáza a zvýšená tvorba

voľných kyslíkových radikálov (Ruis-Meana a Garcia-Dorado, 2009). Reperfúzia (obnova koronárneho prietoku) po dlhotrvajúcej ťažkej ischémii teda zhoršuje prognózu ischemického poškodenia a je príčinou I/R poškodenia srdca (Hearse 1997).

RIZIKOVÉ FAKTORY ISCHEMICKEJ CHOROBY SRDCA

ICHS ako dôsledok aterosklerózy koronárneho riečiska môže postihovať všetkých jedincov, avšak pravdepodobnosť jej vzniku zvyšuje prítomnosť určitých rizikových faktorov (RF). RF sú definované ako určité klinické, alebo laboratorné znaky (biochemické, hematologické, psychologické, zmeny na EKG) bez manifestných príznakov, ktorých prítomnosť je spojená so signifikantne vyšším relatívnym rizikom vzniku choroby. Na zistenie súvislosti medzi RF a vznikom patologického procesu je potrebné uskutočniť epidemiologické prospektívne štúdie zamerané na vyhodnotenie korelácie výskytu RF s incidenciou komplikácii aterosklerózy (Žák a kol., 2011). Medzi významné prospektívne štúdie hodnotiace RF patria WHO MONICA a Štúdia siedmich krajín, ktoré identifikovali fajčenie, dyslipidémiu, hypertenziu ako hlavné RF vzniku ICHS (Keys a kol., 1984; Löwel a kol., 2005). Zoznam RF rozšírila Framinghamská štúdia o diabetes mellitus, fyzickú inaktivitu a obezitu (O'Donnell a Elosua, 2008). Ďalšia významná epidemiologická štúdia, INTERHEART, identifikovala a zoradila podľa významnosti 9 rizikových faktorov: 1. Zvýšený pomer apolipoproteínu B (hlavný lipoproteín LDL častíc) a apolipoproteínu A1 (hlavný lipoproteín HDL častíc) (ApoB/apoA1), 2. Fajčenie, 3. Diabetes mellitus, 4. Hypertenzia, 5. Abdominálna obezita, 6. Psychosociálne faktory, 7. Znížená denná konzumácia ovocia a zeleniny, 8. Nedostatok pohybovej aktivity, 9. Nadmerná konzumácia alkoholu (Yusuf, 2004). RF rozdeľujeme na tie, ktoré súvisia a ktoré nesúvisia s nezdravým životným štýlom. V rámci štúdia vplyvu RF súvisiacich so životným štýlom na mortalitu je potrebné eliminovať vplyv veku a vrodených dispozícií (familiárne dyslipidémie) zavedením tzv. európskej štandardnej populácie, ktorá zahŕňa skupinu ľudí vo veku 35 – 74 rokov (Müller-Nordhorn a kol., 2008). Okrem vyššieho veku a vrodených dispozícií medzi RF, ktoré nesúvisia so životným štýlom, patrí mužské pohlavie. U mužov v hispánskej časti populácie USA sa zistil častejší výskyt diabetes mellitus, hyperlipidémie a hypertenzie ako u žien (Kaplan a kol., 2014).

RF ICHS spojené so životným štýlom, ako sú hypertenzia, diabetes mellitus, dyslipidémia a chronický stres, zvyšujú riziko aj rozsah poškodenia srdca pri infarkte. Naopak, niektoré stresové podnety, ako je akútne zvýšená hladina glukózy v krvi, môžu navodiť v srdci adaptačné procesy, výsledkom ktorých je zvýšenie odolnosti srdca voči nevratnému poškodeniu pri infarkte, podobne ako po prechodnej ischémii. ICHS sa často vyskytuje v kombinácii s uvedenými patologickými procesmi a vnútrobunkové mechanizmy I/R poškodenia myokardu a adaptácie môžu navzájom interferovať. Výsledný efekt pôsobenia RF na odolnosť srdca voči ischémii pravdepodobne závisí od ich vzájomnej kombinácie, trvania a pohlavia jedinca (Ravingerová a kol., 2012).

Hypercholesterolémia

Vplyv hyperlipidémie, resp. hypercholesterolémie (HCH) indukovanej diétou s vysokým príjmom tukov na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu nie je jednoznačný. Viacero experimentálnych štúdií uvádza odlišné výsledky v závislosti od trvania diéty a zvieracieho modelu. U králikov mala 3-dňová alebo 8-týždňová vysokocholesterolová diéta za následok väčší rozsah infarktového ložiska v porovnaní s kontrolnými skupinami. Naopak, 12-týždňová vysokocholesterolová diéta u myši a 2- a 3-týždňová vysokocholesterolová diéta u králikov viedla ku zvýšeniu odolnosti srdca voči I/R poškodeniu, ktoré sa prejavilo menším rozsahom infarktu alebo lepšou obnovou funkčných parametrov (Ferdinandy, 2003). Jednou z príčin rozdielného účinku HCH na odolnosť srdca voči ischémii môže byť aktivácia p38 MAP-kinázy, ktorá zohráva úlohu v procesoch adaptácie ako aj apoptózy, programovanej bunkovej smrti (Ravingerová a kol., 2003a).

Hypertenzia

Význam hypertenzie ako RF sa zvyšuje v kombinácii s inými RF súvisiacimi so životným štýlom (fajčenie, zvýšená hladina plazmatického cholesterolu, diabetes mellitus) (Conroy a kol., 2003) a v pokročilom štádiu. Pri chronickej arteriálnej hypertenzii sa u pacientov vyvíja hypertrofia ľavej komory, ktorá je spojená so zníženým výkonom srdca a zvýšenou koronárnou rezistenciou (Fröhlich a kol., 1992). V experimentálnych podmienkach sa zistilo, že pri rozvoji hypertrofie ľavej komory zohráva kľúčovú úlohu p38 MAP kináza (Behr a kol.,

2001). Zníženie odolnosti srdca pri hypertenzii potvrdzuje aj horšia obnova systolicko-diastolickej funkcie, koronárneho prietoku, zvýšená cievna rezistencia u hypertenzných potkanov po obnovení koronárneho prietoku v porovnaní s normálnymi potkanmi (Chen a kol., 2000).

Diabetes mellitus, hyperglykémia

Experimentálne aj klinické pozorovania dokazujú, že acyklická forma glukózy (0,02 % celkovej hladiny glukózy) podlieha oxidácii iónmi prechodných kovov za vzniku voľných radikálov. Toxický účinok acyklickej glukózy môže spočívať aj v nenzýmovej (Maillardovej) reakcii s proteínovými časticami za vzniku Schiffových zásad (Čársky, 2008). Progresia týchto zmien pri diabetes mellitus vedie k poškodeniu membránových štruktúr, iónových transportných mechanizmov ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a Na^+/H^+ výmenníkových systémov, Na^+/K^+ a Ca^{2+} ATP-áz) v bunkách myokardu (Ravingerová a kol., 2011). Zníženie aktivity iónových transportných mechanizmov v diabetických srdciach môže mať paradoxne ochranný účinok. Pri zníženej aktivite $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ počas ischémie nedochádza k výmene naakumulovaného Na^+ za Ca^{2+} , čo zabraňuje vápnikovému preťaženiu pri obnovení perfúzie (Tani a Neeli, 1988, 1989). S miernejším preťažením kardiomyocytov Ca^{2+} pri I/R poškodení diabetických srdíc v porovnaní s nediabetickými súvisí aj miernejšia vnútrobunková acidóza pri zníženej aktivite anaeróbnej glykolyzy v dôsledku obmedzeného vstupu glukózy do buniek (Feuvray, Lopashuk, 1997). Miernejšia vnútrobunková acidóza vysvetľuje zníženú aktivitu Na^+/H^+ a $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ výmenníka a miernejšie preťaženie bunky iónmi Ca^{2+} (Pringle a kol., 1997).

Vplyv hyperglykémie alebo diabetes mellitus (DM) na odolnosť srdca voči ischémii závisí od trvania diabetického stavu. Ochranný účinok hyperglykémie sa vo všeobecnosti pripisuje jej akútnej fáze. Spojenej so zvýšenou aktivitou proteínkináz regulovaných extracelulárnymi signálmi – ERK $\frac{1}{2}$ (Strnisová a kol., 2003), proteínkinázy B – Akt (Ravingerová a kol. 2011), proteínkinázy C – PKC a zvýšenou syntézou proteínov teplotného šoku (Balakumar a Sharma, 2012). V akútnej fáze (1 – 2 týždne) diabetického stavu indukovaného streptozotocínom (STZ) bol pozorovaný menší rozsah infarktu a porovnateľný (Ravingerová a kol., 2003b), alebo znížený výskyt arytmií spolu so zníženou produkciou laktátu počas ischémie (Ravingerová a kol., 2000)

a miernejšie preťaženie buniek Ca^{2+} a Na^+ a stratami K^+ a Mg^{2+} (Tosaki a kol., 1996). V chronickej fáze (8 týždňov) DM indukovaného STZ rozsah infarktu a porucha iónovej homeostázy bola porovnateľná s kontrolnými podmienkami a závažnosť arytmií dokonca zvýšená (Ravingerová a kol., 2003b; Tosaki a kol., 1996). U psov s chronickým DM sa zistila zhoršená obnova funkčných parametrov počas reperfúzie (Haider a kol., 1977). Zníženú odolnosť srdca v chronickom štádiu potvrdzujú aj klinické štúdie, ktoré väčšinou uvádzajú horšiu prognózu AIM a častejší výskyt komplikácií, ako je zlyhanie srdca alebo náhla smrť diabetických pacientov (Jaffe a kol., 1984, Stone a kol., 1989).

Stabilná a nestabilná angina pectoris

NAP, ktorá je jedným z rizikových faktorov vzniku AIM, sa zároveň považuje za klinický ekvivalent IP zmierňujúci rozsah nevratného poškodenia srdca pri infarkte (Švorc a kol., 2003). Protektívny účinok NAP potvrdzuje aj retrospektívna analýza údajov získaných zo štúdií *Trombolysis in myocardial infarction studies-4, 9B* (TIMI-4, TIMI-9B). Pacienti s príznakmi 24 hodín pred AIM vykazovali nižší výskyt komplikácií AIM (srdcové zlyhanie, náhla smrť) a menší rozsah infarktového ložiska určený hladinou kreatínkinázy (marker poškodenia kardiomyocytov) v krvi v porovnaní s pacientmi bez predchádzajúcej NAP. Výsledky uvedených štúdií dokazujú, že NAP je ekvivalentom skorej fázy IP (Kloner a kol., 1995; Kloner a kol., 1998). V štúdií Nakagawu a kol. (1995) sa tiež zistila lepšia obnova ejekčnej frakcie po infarkte u pacientov, ktorí mali posledné ischemické epizódy NAP niekoľko dní pred infarktom, ako u pacientov bez predchádzajúcej NAP. Teda NAP môže aktivovať mechanizmy včasnej aj oneskorenej fázy kardioprotekcie. Ochranný účinok série epizód krátkotrvajúcej ischémie bol potvrdený aj u pacientov so SAP v kombinácii s fyzickou aktivitou. Prechodná ischémia spôsobená opakovanou fyzickou záťažou pri SAP môže navodiť adaptačné mechanizmy, ktoré postupne skracujú trvanie ischemických bolestí a znižujú incidenciu ischemických arytmií (Li a kol., 2003). Dlhodobé obmedzenie koronárneho prietoku pri SAP vedie k dočasnému zníženiu kontrakility pri zachovanej viabilite kardiomyocytov, tzv. hibernácii myokardu (Krupička a kol., 1999). Podobne hibernácia myokardu predstavuje jednu z foriem adaptácie srdca na znížený krvný prietok a ochranný fenomén podobne ako IP (Bolli, 1992).

Viaceré klinické štúdie tiež poukázali na žiadny, alebo negatívny vplyv angíny pectoris na prognózu následného AIM u pacientov s DM alebo hypertenziou, ktorý sa prejavil zvýšením mortality (Behar a kol., 1992; Ishihara a kol., 2001). Negatívny účinok série krátkotrvajúcich ischemických atakov na odolnosť srdca sa zistil aj v experimentálnych podmienkach u potkanov s hyperlipidémiou (Juhász a kol., 2004). V *in vivo* experimentoch na psoch s otvoreným hrudníkom akútna hyperglykémia indukovaná kontinuálnym intravenóznym podávaním glukózy celkom oslabil ochranný účinok IP voči dlhotrvajúcej ischemii navodenej oklúziou koronárnej artérie (Kernsten a kol., 1998, Vlado a kol., 2011). Výsledky uvedených prác naznačujú, že adaptačný účinok krátkotrvajúceho ischemického stresu v kombinácii s inými patologickými stavmi môže byť oslabený.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ ŠTÚDIE – VPLYV SIMULOVANEJ HYPERGLYKÉMIE A ISCHEMICKÉHO PRECONDITIONINGU NA ODOLNOSŤ SRDCA VOČI ISCHEMII

Epidemiologické a experimentálne štúdie potvrdili, že patologické stavy, ktoré zvyšujú riziko ICHS resp. AIM, ako sú NAP, diabetes mellitus, hypertenzia, hypercholesterolémia sa u pacientov často vyskytujú súčasne a ich modulačné účinky na odolnosť srdca a prognózu AIM sa navzájom ovplyvňujú. Medzi často využívané metódy experimentálnej kardiológie patrí koronárna oklúzia *in vivo* u zvierat s otvoreným hrudníkom a izolácia a perfúzia srdca podľa Langendorffa *in vitro*. *In vivo* experimenty umožňujú študovať odolnosť srdca a adaptačné mechanizmy na stresové podnety na úrovni celého organizmu. Perfúzia izolovaného srdca živným roztokom v *in vitro* podmienkach eliminuje vplyv zápalovej odpovede na stresový podnet a nervovú a hormonálnu reguláciu srdca. Umožňuje tak študovať ochranné mechanizmy voči I/R na úrovni srdca (Döring a Dehnert, 1988). Experimenty na izolovaných srdciach potkanov preukázali ochranný účinok akútnej fázy STZ-indukovaného diabetes mellitus, ktorý zmierňoval závažnosť ischemiou indukovaných arytmií (Ravingerová a kol., 2000) aj rozsah infarktu (Matejčíková

a kol., 2008), podobne ako *in vivo* pokusy uskutočnené na potkanoch s otvoreným hrudníkom (Ravingerová a kol., 2003). Štandardné podmienky pri perfúzii izolovaného srdca však rovnako eliminujú aj pôsobenie patologických stavov, ktoré charakterizujú experimentálne skupiny. Preto sme sa v experimentálnej časti práce zamerali na štúdium vplyvu hyperglykémie simulovanej perfúziou izolovaného srdca roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy, ischemického preconditioningu a kombinácie oboch faktorov na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu.

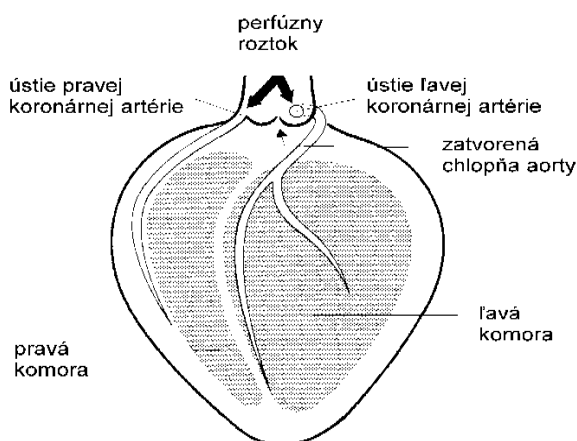
Závažnosť a rýchlosť vývoja patologických zmien myokardu pri I/R poškodení sme posudzovali na základe hodnotenia rozsahu infarktového ložiska v rizikovej oblasti myokardu a uvoľňovania srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny (h-FABP – biomarker poškodenia kardiomyocytov) zo srdca do perfúzneho média. V súčasnosti je známych 9 typov FABP proteínov. Usporiadanie aminokyselinových jednotiek určuje ich špecifickosť pre jednotlivé orgány (Veerkamp a kol., 1999). Viacero klinických štúdií potvrdilo, že práve h-FABP, zastúpený najmä v srdci, je veľmi špecifický (Alhadi a Fox, 2004) a včasný marker AIM, ktorého uvoľňovanie začína už 20 minút po vzniku ischemie a hladina v krvi dosahuje maximum po 3 hodinách (Chan a kol., 2004; Cavus a kol., 2006). Práve rýchle uvoľňovanie h-FABP bolo dôvodom jeho využitia ako kardiomarkera v našich experimentoch s relatívne krátkym trvaním protokolu ischemie a reperfúzie. Rýchle uvoľňovanie h-FABP, ale podstatne nižšie hladiny v sére ako pri infarkte sa vyskytujú aj pri NAP, pre ktorú nie je charakteristické letálne poškodenie srdca spojené s nekrózou (Tsuiji a kol., 1993). Preto h-FABP v sére môže byť zároveň markerom ľahšieho poškodenia myokardu k čomu pravdepodobne prispieva jeho nízka molekulová hmotnosť a lokalizácia v sarkoplazme (Špirková a kol., 2005).

Ďalším cieľom bolo odlíšiť vplyv metabolických účinkov zvýšenej koncentrácie glukózy od vplyvu jej osmotických vlastností na odolnosť srdca voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu a účinnosť IP. Hyperosmóza perfúzneho média bez zvýšenia koncentrácie energetických substrátov myokardu bola dosiahnutá pridaním manitolu do perfúzneho média v koncentrácii rovnajúcej sa prebytočnej koncentrácii glukózy v perfúznom médiu pri simulovanej hyperglykémii.

MATERIÁL A METÓDY

Model izolovaného srdca

Po rýchlej excízii z hrudnej dutiny boli srdcia umiestnené do chladeného (4 °C) heparinizovaného fyziologického roztoku a do 60 sekúnd umiestnené do perfúzneho zariadenia (ADInstruments, Nemecko). V experimentoch bola využitá metóda retrográdnej perfúzie podľa Langendorffa (Obr. 2), ktorá spočíva v kanylácii a perfúzii srdca cez vypreparovanú aortu pri konštantnom tlaku 75 mmHg a teplote 37 °C. Srdcia boli perfundované Krebsovým-Henseleitovým (KH) roztokom s koncentraciou (v mM): NaCl 118,0; KCl 3,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,18; CaCl₂ 2,5; glukózy 11,0 alebo 22,0; prípadne glukózy 11,0 a manitolu 11,0. Roztok bol sytený zmesou plynov O₂ a CO₂ v objemovom pomere 95 : 5.



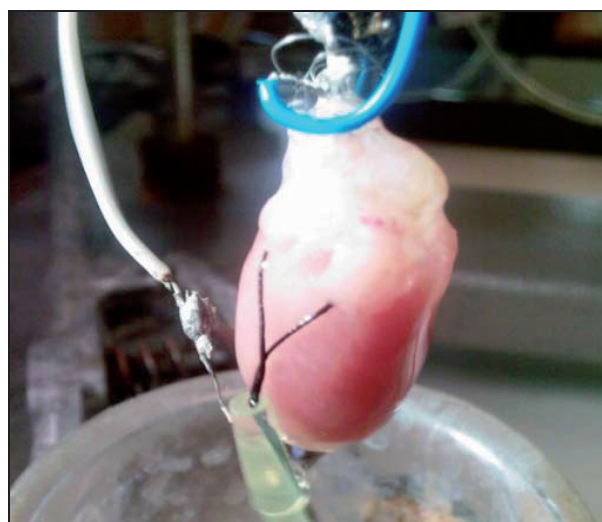
Obr. 2. Schéma retrográdnej perfúzie srdca podľa Langendorffa (upravené podľa Döring a Dehnert, 1988). Vo fáze diastoly pri zatvorených aortálnych chlopniach perfúzný roztok prúdi cez kanylovanú aortu a koronárne tepny do srdca, vo fáze systoly prúdi cez koronárne žily a pľúcnicu von zo srdca.

Protokol ischemie a reperfúzie

Každý experimentálny protokol sa začal obdobi 20-minútovej **fázy stabilizácie**, ktorej cieľom bolo dosiahnuť stálosť funkčných parametrov: koronárneho prietoku – CF, frekvencie akcie srdca (HR), tlaku vyvinutému v ľavej komore (rozdiel medzi systolickým a diastolickým tlakom – LVDP), maximálnej rýchlosti nárastu ($+dP/dt_{max}$) a poklesu ($-dP/dt_{max}$) systolického tlaku ako miery kontrakcie a relaxácie. Tlakové parametre boli snímané pomocou katétra s plastovým balónikom zavedeného do

dutiny ľavej komory spojeného s tlakovým snímačom (MLP844, ADInstruments, Nemecko). Balónik bol naplňaný vodou, pokiaľ diastolický tlak nebol ustálený na hodnote 5 – 7 mmHg. Elektrická aktivita srdca bola snímaná pomocou dvojice elektród, jednej spojenej s povrchom ľavej komory a druhej štandardnej umiestnenej na aortálnej kanyle.

Po ustálení funkčných parametrov sme vyvolali 30-minútovú ischemiu oklúziou zostupného ramena ľavej koronárnej artérie (LAD) – **regionálna ischemia** (Obr. 3). Po regionálnej ischemii bol koronárny prietok LAD obnovený a nasledovala 120-minútová **reperfúzia**. Po 30-minútovej ischemii dochádza k výraznému ireverzibilnému poškodeniu myokardu, ktoré sa paradoxne zhoršuje v priebehu následnej reperfúzie. Hovoríme o **I/R poškodení**. V skupinách s ischemickým preconditioningom boli srdcia vystavené sérii dvoch cyklov 5-minútovej ischemie a 5-minútovej reperfúzie pred navodením 30-minútovej ischemie. Počet experimentov v jednotlivých experimentálnych skupinách bol 5 – 8.



Obr. 3. Koronárna oklúzia navodená stlačením svaloviny okolo cievy naložením ligatúry chirurgickou ihlou a zafixovaná plastovým uzáverom (fotografia: Ústav pre výskum srdca SAV).

Rozdelenie experimentálnych protokolov

1. Kontrolná skupina srdca vystavených dlhotrvajúcej regionálnej ischemii a reperfúzii perfundovaných KH roztokom so štandardnou koncentraciou glukózy (NG) 11,0 mM.
2. Kontrolná skupina srdca vystavených dlhotrvajúcej regionálnej ischemii, reperfúzii a hyper-

glykémii simulovanej perfúziou KH roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy 22,0 mM počas celého experimentu.

3. Kontrolná skupina srdc vystavených dlhotrvajúcej regionálnej ischémii, reperfúzií a hyperosmóze navodenej perfúziou KH roztokom so štandardnou koncentráciou glukózy a koncentráciou manitolu 11,0 mM počas celého experimentu.
4. Srdcia vystavené ischemickému preconditioningu, dlhotrvajúcej regionálnej ischémii, reperfúzií, perfundované štandardným KH roztokom so štandardnou koncentráciou glukózy.
5. Srdcia vystavené ischemickému preconditioningu, dlhotrvajúcej regionálnej ischémii a reperfúzií v podmienkach simulovanej hyperglykémie.
6. Srdcia vystavené ischemickému preconditioningu, dlhotrvajúcej regionálnej ischémii a reperfúzií v podmienkach hyperosmózy perfúzneho média navodenej manitolom.

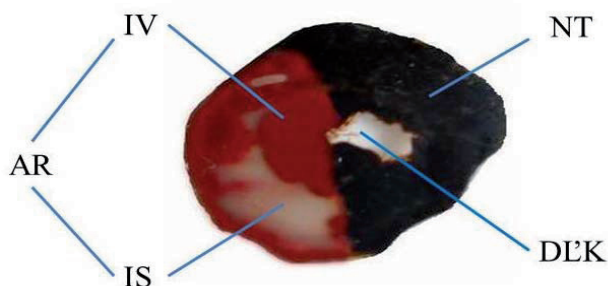
Hodnotenie veľkosti infarktového ložiska

Na hodnotenie veľkosti infarktového ložiska bola použitá metóda dvojitého farbenia aplikáciou roztokov KMnO_4 a trifenyltetrazóliumchloridu (TTC) s teplotou 37°C cez aortu na farebné odlíšenie plôch normálneho neischemizovaného, ischemického prežívajúceho a nekrotického tkaniva na rezoch srdca (Obr. 4).

Po ukončení 30-minútovej regionálnej ischémie, 2-hodinovej reperfúzie a opätovnej koronárnej oklúzii sme srdcia perfundovali (3 mL) roztokom KMnO_4 , aby sme farebne odlíšili neischemický myokard. Po vypláchnutí prebytočného KMnO_4 fyziologickým roztokom a uvoľnení koronárnej oklúzie sme srdcia premyli 10 mL 1 % tlmivým roztokom trifenyltetrazóliumchloridu (TTC). Následne boli srdcia inkubované v tomto roztoku 30 minút pri teplote 37°C a potom umiestnené do 10 % roztoku formaldehydu. Po 24 hodinách boli srdcia nakrájané na 1 – 2 mm rezy a odstránené predsiene spolu s pravou komorou. Rezy boli potom umiestnené na ďalších 72 hodín do formaldehydu na fixáciu farebného kontrastu medzi prežívajúcim a nekrotickým ischemickým tkanivom. Pripravené rezy boli umiestnené medzi priehľadné plastové platničky a obrysy farebných kontrastov spolu s dutinou ľavej komory zakreslené na celofánovú fóliu. Z fólie boli obrysy zosnímané elektronickým perom a vyhodnotené nekomerčným planimetrickým softvérom (E. Traasdahl, Troms, Norway).

Tmavofialová oblasť predstavuje neischemické normálne perfundované tkanivo počas celého experimentu zafarbené roztokom KMnO_4 . Červená oblasť predstavuje ischemické prežívajúce tkanivo, kde interakcia dehydrogenáz a ich koenzýmov s TTC sa prejavuje farebnou reakciou vzniku formazanu. Bledá oblasť predstavuje odumreté tkanivo s neaktívnymi dehydrogenázami, kde k farebnej reakcii s TTC nedochádza.

Ischemické viabilné (IV, prežívajúce) a ischemické odumreté (IS, infarktové) tkanivo predstavujúce rizikovú oblasť myokardu (AR) a spolu s neischemickým normálnym tkanivom (NT) predstavujú celkovú oblasť ľavej komory (ĽK). Rozsah infarktu je vyjadrený podielom IS z celej AR v percentách (obr. 14).



Obr. 4. Rez zafarbenou ľavou komorou (fotografia: Ústav pre výskum srdca SAV). AR – celková riziková oblasť ľavej komory; IV – ischemické prežívajúce tkanivo zafarbené na červeno; IS – infarktové odumreté tkanivo nezafarbené; NT – neischemické tkanivo zafarbené KMnO_4 ; ĽK – dutina ľavej komory.

Analýza h-FABP uvoľňovaného zo srdc

H-FABP sa stanovoval vo vzorkách perfúzneho roztoku vytekajúcom zo srdc cez pľúcnicu. Roztok sa zbieral počas celej fázy stabilizácie, dlhotrvajúcej koronárnej oklúzie, a reperfúzie. Zbieranie roztoku počas reperfúzie bolo rozdelené na sériu šiestich 20 min. trvajúcich odberov. Podmienkou spracovania vzoriek boli hodnoty koronárneho prietoku patriace do kalibrovaného intervalu v každom štádiu experimentu. Vzorky získaného perfúzneho roztoku z jednotlivých odberov boli dialyzované cez noc oproti destilovanej vode pri teplote 4°C pomocou rúrovitej dialyzačnej celulózovej membrány a magnetického miešadla. Jeden mL každej vzorky dialyzovaného roztoku bol napipetovaný do Eppendorfovej skúmavky, zmrazený pri teplote -20°C a kompletne lyofilizovaný. Lyofilizované vzorky boli následne nariedené roztokom

na riedenie na objem 110 μL . Vo vzorkách boli stanovené koncentrácie h-FABP.

Princípom stanovenia koncentrácie h-FABP vo vzorkách bola kvantitatívna sendvičová imunoanalýza (ELISA) pozostávajúca z laboratórnej sady (CUSABIO). Postup prebiehal podľa manuálu. Špecifické anti-h-FABP protilátky boli vopred naviazané na mikroplatničku. Vzorky štandard a perfúzneho roztoku s objemom 100 μL boli pipetované do jamiek mikroplatničky, kde reagovali s imobilizovanými protilátkami. Po 2-hodinovej inkubácii pri teplote 37 °C a odstránení prebytočnej tekutiny nasledovala inkubácia 1 hod. s anti-h-FABP protilátkou konjugovanou s biotínom (100 μL na jamku). Po premytí jamiek a vysušení jamiek nasledovala inkubácia 1 hod. s red'kovkovou peroxidázou (100 μL na jamku) pri teplote 37 °C. Po odstránení nenaviazaných substancií nasledovala inkubácia peroxidázy s TMB-substrátom pri teplote 37 °C. O 30 min. bola farebná reakcia zastavená, spektrofotometricky vyhodnotená pri vlnovej dĺžke 450 nm a hodnoty koncentrácie h-FABP vo vzorkách stanovené podľa kalibračnej krivky.

Súčin hodnoty koncentrácie a objemu odobraťého perfúzneho roztoku v príslušnom štádiu experimentu predstavoval látkové množstvo uvoľneného h-FABP zo srdca v tomto štádiu. Rešpektujúc spôsob spracovania a nanášania objemov vzoriek na platničku, zistené hodnoty látkových množstiev boli vynásobené číslom 0,09. Táto konštanta predstavuje zjednodušenie matematického výrazu $\frac{100}{1000} \times \frac{100}{110}$. Postupným súčtom upravených hodnôt sme získali celkové hodnoty vylúčeného markera bunkového poškodenia v jednotlivých štádiách experimentu, pomocou ktorých sme

zostavili kumulatívne krivky uvoľňovaného množstva h-FABP z perfundovaného srdca (Obr. 6 – 8).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Výsledky sú prezentované ako priemery $\pm$ stredné chyby priemerov (SEM). Štatistickú významnosť rozdielov medzi skupinami sme hodnotili multifaktoriálnou analýzou (ANOVA) s následným Student-Newman-Keuls U testom. Kritériom pre štatistickú významnosť bola hodnota $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Bazálne hodnoty hemodynamických parametrov izolovaných srdc potkanov

Priemerné hodnoty hemodynamických parametrov meraných v poslednej minúte stabilizácie v jednotlivých skupinách sú uvedené v Tab. 1. Medzi nameranými hodnotami v jednotlivých skupinách neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely.

Vplyv simulovanej hyperglykémie, hyperosmotického prostredia a ischemického preconditioningu na rozsah infarktu

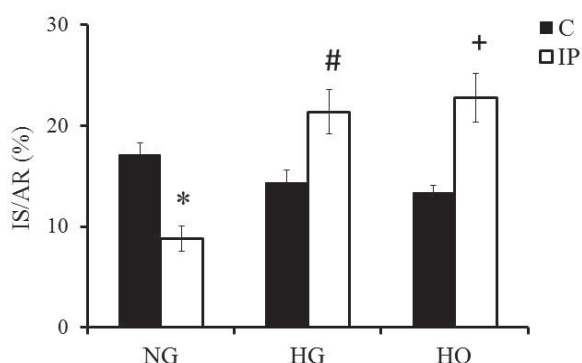
Pri štandardných NG podmienkach srdcia vystavené ischemickému preconditioningu vykazovali signifikantne menší rozsah rozsahu infarktu po dlhotrvajúcej koronárnej oklúzii a reperfúzii v rizikovej oblasti myokardu (IS/AR), ako srdcia kontrolnej skupiny, ktoré neboli vystavené IP ($8,8 \pm 1,0$ % vs. ($17,1 \pm 1,2$) %, $p < 0,05$). Srdcia vystave-

Tab. 1. Bazálne hemodynamické parametre izolovaných srdc potkanov

Skupina	Základné hemodynamické parametre izolovaného srdca potkana				
	H	CF	LVDP	$+(dP/dt)_{\max}$	$-(dP/dt)_{\max}$
	min^{-1}	mL min^{-1}	mm of Hg	mm s^{-1}	mm s^{-1}
C/NG	254 ± 16	$8,7 \pm 1,0$	$74,7 \pm 9,9$	1959 ± 290	1138 ± 206
IP/NG	238 ± 16	$10,0 \pm 1,0$	$76,8 \pm 9,6$	1995 ± 349	1164 ± 213
C/HG	238 ± 11	$10,7 \pm 1,1$	$85,9 \pm 7,0$	2161 ± 258	1409 ± 123
IP/HG	230 ± 20	$10,6 \pm 0,7$	$73,3 \pm 9,2$	2062 ± 213	1242 ± 113
C/HO	228 ± 16	$8,3 \pm 0,8$	$75,2 \pm 6,5$	2334 ± 204	1819 ± 738
IP/HO	202 ± 18	$6,7 \pm 0,5$	$64,4 \pm 5,6$	1326 ± 110	1027 ± 93

C – Kontrolné skupiny; IP – skupiny vystavené ischemickému preconditioningu; NG – srdcia perfundované štandardným KH roztokom; HG – simulovaná hyperglykémia; HO – srdcia perfundované KH roztokom s obsahom manitolu, hyperosmóza; HR – frekvencia srdca; CF – koronárny prietok; LVDP – maximálny tlak vyvinutý ľavou komorou (systolický mínus diastolický tlak); $(dP/dt)_{\max}$ – maximálna rýchlosť vzostupu tlaku vyvinutého ľavou komorou; $-(dP/dt)_{\max}$ – maximálna rýchlosť poklesu tlaku vyvinutého ľavou komorou.

né IP v podmienkach simulovanej hyperglykémie vykazovali väčší rozsah infarktu oproti kontrolnej skupine ($21,4 \pm 2,2$ % vs. $14,3 \pm 1,3$ %, $p < 0,05$), podobne ako pri hyperosmóze navodenej manitolom ($22,76 \pm 2,4$ % vs. $13,4 \pm 0,6$ %, $p < 0,05$). Pokles pomeru IS/AR v kontrolných skupinách pri simulovanej hyperglykémii alebo hyperosmóze oproti štandardným podmienkam nebol štatisticky významný (Obr. 5).

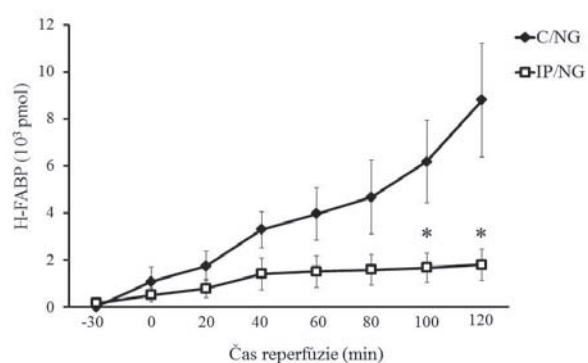


Obr. 5. Vplyv ischemického preconditioningu, hyperglykémie a hyperosmotického prostredia na veľkosť infarktového ložiska. C – Kontrolné skupiny; IP – srdcia vystavené ischemickému preconditioningu; NG – srdcia perfundované štandardným KH roztokom; HG – simulovaná hyperglykémia; HO – srdcia perfundované KH roztokom s obsahom manitolu – hyperosmóza; IS – veľkosť infarktu; AR – riziková oblasť; * – C/NG vs. IP/NG, $p < 0,05$; # – C/HG vs. IP/HG, $p < 0,05$; + – C/HO vs. IP/HO, $p < 0,05$.

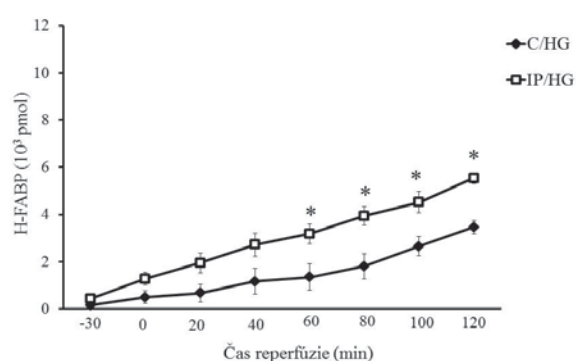
Uvoľňovanie h-FABP z myokardu do perfúzneho média počas experimentov

IP signifikantne znížil celkové množstvo h-FABP (v pmol) uvoľneného do perfúzneho média v 100. až 120. min. reperfúzie oproti kontrolnej skupine pri štandardných podmienkach (1677 ± 626 a 1808 ± 660 vs. 6189 ± 1765 a 8803 ± 2415 , $p < 0,05$) (obr. 6). Srdcia vystavené IP v podmienkach simulovanej hyperglykémie vykazovali signifikantne zvýšené uvoľnenie celkového množstva h-FABP (v pmol) do perfúzneho média od 60. minúty reperfúzie v porovnaní s kontrolnou skupinou (3183 ± 415 ; 3936 ± 396 ; 4521 ± 442 ; 5541 ± 229 vs. 1345 ± 558 ; 1812 ± 532 ; 2651 ± 415 ; 3458 ± 283 , $p < 0,05$) (Obr. 7). Podobne pri hyperosmóze navodenej manitolom v skupine srdc vystavených IP bol pozorovaný trend zvýšenia celkového množstva h-FABP uvoľneného do perfúzneho média

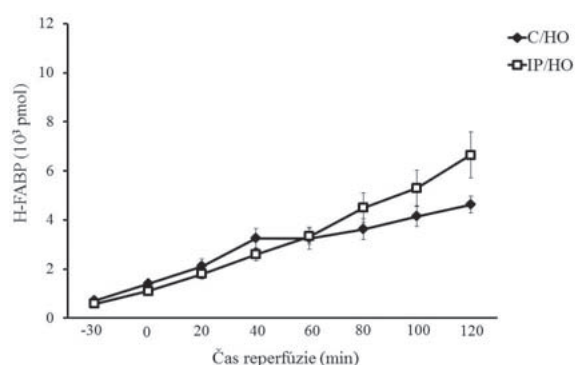
na konci dlhotrvajúcej reperfúzie oproti kontrolnej skupine (Obr. 8). V kontrolných experimentoch, kedy srdcia neboli vystavené preconditioningu, simulovaná hyperglykémia signifikantne znížila množstvo h-FABP uvoľneného v 100. a 120. minúte reperfúzie. Podobne zníženie uvoľňovania h-FABP v kontrolných experimentoch bolo pozorované aj v prípade hyperosmózy, ktoré však nedosahovalo úroveň štatistickej významnosti (Obr. 6 – 8).



Obr. 6. Kumulatívne krivky uvoľňovaného množstva h-FABP zo srdc perfundovaných štandardným KH roztokom. h-FABP – látkové množstvo srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny uvoľňované do perfúzneho média vyjadrené v 10^3 pmol; IP – srdcia vystavené ischemickému preconditioningu; C – kontrolná skupina; NG – srdcia perfundované KH roztokom so štandardnou koncentráciou glukózy; * – C/NG vs. IP/NG, $p < 0,05$.



Obr. 7. Kumulatívne krivky uvoľňovaného množstva h-FABP zo srdc pri simulovanej hyperglykémii. h-FABP – Látkové množstvo srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny uvoľňované do perfúzneho média vyjadrené v 10^3 pmol; IP – srdcia vystavené ischemickému preconditioningu; C – kontrolná skupina; HG – srdcia perfundované KH roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy; C/HG vs. IP/HG, $p < 0,05$.



Obr. 8. Kumulatívne krivky uvoľňovaného množstva h-FABP zo srdca pri navodenej hyperosmóze. h-FABP – látkové množstvo srdcového proteínu viažuceho mastné kyseliny uvoľňované do perfúzneho média vyjadrené v 10^3 pmol; IP – srdcia vystavené ischemickému preconditioningu; C – kontrolná skupina; HO – hyperosmóza navodená perfúziou srdca KH roztokom s obsahom manitolu.

DISKUSIA

Výsledky našich experimentov preukázali signifikantne znížené celkové množstvo uvoľneného h-FABP zo srdca vystavených IP v 100. a 120. minúte reperfúzie (Obr. 6) a zároveň menší rozsah infarktu v porovnaní so srdcami kontrolnej skupiny pri štandardných podmienkach (Obr. 5). Uvedené výsledky potvrdzujú, že IP spomaľuje vývin a znižuje rozsah ireverzibilného I/R poškodenia izolovaného srdca v *in vitro* podmienkach, podobne ako v prípade *in vivo* experimentov na otvorenom hrudníku u psov (Murry a kol., 1991). Uvoľňovanie h-FABP bolo zistené vo všetkých experimentoch aj v štádiu koronárnej oklúzie pri obmedzení koronárneho prietoku rizikovou oblasťou myokardu (obr. 17 – 19). Potenciálnou príčinou môže byť bazálne uvoľňovanie h-FABP z neischemického myokardu potvrdené klinickou štúdiou (Tsuji a kol., 1993), alebo vplyv kolaterálnej koronárnej cirkulácie demonštrovaný morfológickou štúdiou už v priebehu 15. až 30. minúty koronárnej oklúzie u potkanov (Jia a Sato, 1997).

Naopak, pri simulovanej hyperglykémii sme pozorovali signifikantne väčší rozsah infarktu (Obr. 5) a zvýšené uvoľňovanie h-FABP zo srdca vystavených IP od 60. minúty reperfúzie (Obr. 7). Výsledky experimentov naznačujú, že IP v podmienkach simulovanej HG má negatívny účinok na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu. Podobne znížená odolnosť srdca vystavených preconditioningu v porovnaní s kontrolnou skupinou sa prejavila aj v podmienkach indukovanej hyperosmolarity perfúzneho

média manitolom signifikantne väčším rozsahom infarktového ložiska (Obr. 5) a trendom zvýšeného celkového množstva uvoľneného h-FABP na konci reperfúzie (Obr. 8). Ako možné príčiny negatívneho vplyvu IP pri akútnej HG simulovanej v *in vitro* podmienkach na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu prichádza do úvahy viacero možností. V našich experimentoch tieto podmienky eliminovali inzulínovú stimuláciu PI3K/Akt dráhy prostredníctvom aktivácie receptorov s tyrozínkinázovou aktivitou. Dôsledkom toho môže byť oslabenie negatívnej regulácie GSK-3 β a prevencie apoptózy, podobne ako v prípade STZ-indukovaného diabetes mellitus (Yin a kol., 2012). Ochranný účinok inzulínu voči bunkovej smrti však nie je jednoznačný. Podľa iných štúdií, izolované kardiomyocyty inkubované v živnom médiu s inzulínom vykazovali zvýšenie aktivity apoptózy určenej pomerom koncentrácie proteínov Bax a Bcl-2 (Ricci a kol., 2008) alebo uvoľnením cytochrómu c z mitochondrií a aktiváciou kaspázy-3 v sarkoplazme (Rajamani a kol., 2011). Súčasťou signálnej transdukcie IP je aj PKC- δ (Schulz a kol., 2001), ktorá sa môže podieľať na procese apoptózy (Zhao a kol., 2012). Zvýšená aktivita PKC- δ bola zistená aj v kardiomyocytoch inkubovaných v živnom médiu so zvýšenou koncentráciou glukózy alebo prítomnosťou manitolu (Shizukuda a kol., 2002). Stimulácia PKC- δ môže byť ďalšou príčinou zmeny kardioprotektívneho účinku IP na nepriaznivý v podmienkach simulovanej hyperglykémie. Súčasťou mechanizmu kardioprotekcie indukovanej IP je uvoľňovanie adenosínu z myocytov pri krátkom ischemickom strese a parakrinná stimulácia adenosínových receptorov. Bunkový edém a s ním súvisiace zvýšenie priepustnosti sarkoplazmatickej membrány pri prechodnej ischémii je pravdepodobne mechanizmus umožňujúci uvoľňovanie ligandov stimulujúcich príslušné receptory spúšťajúce vnútrobunkové signálne dráhy charakteristické pre IP (Štrbák, 2011). IP zároveň následne zabraňuje väčšiemu rozsahu bunkového edému ako súčasť nevratného I/R poškodenia srdca (Diaz a kol., 2003). Zvýšenie priepustnosti sarkoplazmatickej membrány súvisiace s krátkym ischemickým stresom pri uvoľňovaní adenosínu z buniek potvrdzujú aj experimenty na kultúrach izolovaných nervových buniek inkubovaných v hypotonickom živnom médiu (Phillips a O'Regan, 2002). Zabránenie vzniku prechodného bunkového edému a uvoľňovaniu kľúčových mediátorov IP (adenosínu) pri krátkotrvajúcom ischemickom strese účinkom hyperosmotického prostredia

môže tiež objasňovať oslabenie ochranného účinku IP voči I/R poškodeniu. Význam adenosínu ako kľúčového mediátora IP potvrdila farmakologická inhibícia adenosínových receptorov v experimentoch Diaz a kol. (2003), ktorá mala za následok zmenu pozitívneho účinku IP na odolnosť srdca na negatívny. Negatívny účinok IP sa prejavil väčším rozsahom bunkového edému v rámci nevratného I/R poškodenia izolovaných myocytov v porovnaní s kontrolnou skupinou v podmienkach farmakologickej inhibície adenosínových receptorov. Negatívny účinok IP na odolnosť srdca voči I/R poškodeniu v podmienkach simulovanej HG čiastočne vysvetľujú aj zmeny regulácie PI3K/Akt, jednej z kľúčových signálnych dráh IP v porovnaní so štandardnými NG *in vitro* podmienkami (Zálešák a kol., 2015).

HG alebo prítomnosť manitolu v perfúznom médiu v našich experimentoch štatisticky významne neovplyvnila rozsah infarktu v srdciach kontrolných skupín, ktoré neboli vystavené IP (Obr. 5). Napriek tomu, simulovaná hyperglykémia, podobne ako hyperosmolarita perfúzneho média navodená prítomnosťou manitolu, výrazne znížila uvoľňovanie h-FABP zo srdca počas experimentu, v porovnaní so štandardnými podmienkami (obr. 6 – 8). Výsledky naznačujú, že srdcia perfundované hyperosmolárnym živným roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy alebo prítomnosťou manitolu sú odolnejšie voči I/R poškodeniu. Priaznivý účinok nárastu osmotického tlaku prostredia na odolnosť voči I/R poškodeniu potvrdzuje aj zvýšenie expresie proteínu hsp90 a katalázy, lepšia obnova komorových funkcií a znížené uvoľňovanie kreatínkinázy z izolovaných srdcov potkanov perfundovaných KH roztokom so zvýšenou koncentráciou glukózy alebo prítomnosti manitolu v prácach Cao a kol. (2013) a Chen a kol. (2006). Znížené uvoľňovanie h-FABP môže byť taktiež dôsledkom ochrany hyperosmolárneho prostredia voči vzniku bunkového edému a zvyšovaniu priepustnosti bunkových membrán v rizikovej oblasti myokardu (Buja a Willerson, 1981), ktoré umožňuje uvoľňovanie nízkomolekulových častíc zo sarkoplazmy ako napríklad h-FABP. Ochranný účinok hyperosmózy voči vzniku bunkového edému spojený s lepšou obnovou funkčných parametrov ľavej komory po obnove koronárneho prietoku bez výrazného ovplyvnenia rozsahu infarktu potvrdzujú aj experimenty Sun a Lin (1990) a Carlson a kol. (1992). Antiinfarktový účinok hyperosmózy bol popísaný v prípade krátkotrvajúceho (5 min.) zvýšenia os-

motického tlaku perfúzneho média na izolovaných srdciach pred navodením I/R poškodenia (Falck a kol. 1999).

Fyziologický význam FABP spočíva v schopnosti viazať hydrofóbne ligandy (vyššie karboxylové kyseliny, eikozanoidy, acylglyceroly) a zabezpečiť ich transport v hydrofilnom prostredí cytoplazmy do špecifických bunkových kompartmentov. Podporujú tak obnovu membránových štruktúr po poškodení, signálnu transdukciu, energetický metabolizmus vyšších karboxylových kyselín v mitochondriách a peroxizómoch (Furuhashi a kol., 2011). Výsledky experimentov na potkanoch preukázali viac ako 50 % úbytok h-FABP v myokarde po 60-minútovej ischémií a reperfúzii, na základe ktorého možno uvažovať aj o závažnom narušení metabolizmu lipidov (Knowlton a kol., 1989). Preto zabránenie úbytku h-FABP môže viesť k lepšej obnove metabolizmu lipidov pri reperfúzii, ktorý je primárnym a najbohatším zdrojom ATP v myokarde.

ZÁVER

Výsledky našich experimentov potvrdili ochranný účinok IP pri štandardných podmienkach a samotnej simulovanej hyperglykémii voči I/R poškodeniu srdca. Napriek tomu, IP v podmienkach HG znížil odolnosť srdca voči I/R poškodeniu.

Cieľom práce bolo prispieť k rozšíreniu poznatkov týkajúcich sa vplyvu RF vzniku KVCH súvisiacich so životným štýlom na vnútrobunkové mechanizmy ochrany srdca pred I/R poškodením.

Dokázali sme, že efekt pôsobenia vybraných faktorov (IP, simulovaná HG) na odolnosť srdca voči ischémií závisí od ich vzájomnej kombinácie. Vzájomnú interakciu RF pri ovplyvňovaní závažnosti ischemického poškodenia srdca potvrdzujú aj klinické štúdie. NAP, ktorá sa považuje za klinický ekvivalent IP, je zároveň aj jedným z rizikových faktorov súvisiacich so životným štýlom, ktorý zvyšuje pravdepodobnosť vzniku AIM. Prognóza AIM u pacientov s NAP závisí od prítomnosti ďalších patologických stavov, ktoré ju spravidla zhoršujú. Aj v našich experimentoch IP v podmienkach HG zväčšoval rozsah I/R poškodenia srdca. Poznatky získané v rámci štúdia vplyvu rizikových faktorov ischemickej choroby srdca na odolnosť srdca voči ischemickému poškodeniu môžu nájsť potenciálne uplatnenie v klinickej praxi pri predikcii prognózy AIM pri komorbiditách.

Literatúra

- Albrecht S: The Pathophysiology and Treatment of Stable Angina Pectoris. *US Pharm* 38(2):43–60, 2013.
- Alhadi HA, Fox KAA: Do we need the additional markers of myocyte necrosis: the potential value of heart fatty acid binding protein. *Q J Med* 97: 187–198, 2004.
- Balakumar P, Sharma NK: Healing the diabetic heart: does myocardial preconditioning work? *Cell Signal* 24: 53–59, 2012.
- Behar S, Reicher-Reiss H, Abinader E: The prognostic significance of angina pectoris precedes the occurrence of a first acute infarction in 4166 consecutive hospitalized patients. *Am Heart J* 12: 1481–1488, 1992.
- Behr TM, Nerurkar SS, Nelson BS, et al: Hypertensive End-Organ Damage and Premature Mortality are p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent in a Rat Model of Cardiac hypertrophy and Dysfunction. *Circulation* 104: 1292–1298, 2001.
- Bolli R: Mechanism of stunning in men. *Circulation* 86: 1671–1692, 1992.
- Buza LM, Willerson JT: Abnormalities of volume regulation and membrane integrity in myocardial tissue slices after early ischemic injury in the dogs: effects of mannitol, polyethylene glycol, and propranolol. *Am J Pathol* 103(1): 79–95, 1981.
- Diaz RJ, Armstrong SC, Batthish M, Backx PH, Ganote EG, Wilson GJ: Enhanced cell volume regulation: a key protective mechanism of ischemic preconditioning in rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35: 45–58, 2003.
- Döhring HJ, Dehnert H: The isolated perfused heart according to Landendorff. *Biomesstechnik, Verlag*, 1. Ed., Germany, Biomesstechnik-Verlag March GmbH, 1998.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV: Signaling pathway in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 12: 181–188, 2007.
- Cao Y, Wang L, Chen H, Li Z: Beneficial effect of hyperosmotic perfusion in the myocardium after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 28(1): 54–60, 2013.
- Carlson RE, Aisen AM, Buda AJ: Effect of reduction of myocardial edema on myocardial blood flow and ventricular function after coronary reperfusion. *Am J Physiol* 262(3, 2): 641–648, 1992.
- Cavus U, Coskun F, Yavuz B, Cifci O, Sahiner L, Aksay H, Deniz A, Ozakin E, Aytemir K, Takgozoglu L, Kabacki G: Heart-type, fatty acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. *J Natl Med Assoc* 98(7): 1067–1070, 2006.
- Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Thunstaal-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM: SCORE project group: Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur Heart J* 24(11): 987–1003, 2003.
- Crompton M: The mitochondrial permeability transition pores and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233–249, 1999.
- Čárský J: Mitochondrial Diabetology. In *Mitochondrial medicine*. Gvozdjaková A (Ed.), Springer science & Business media B. V., ISBN 978-1-4020-6713-6, 129–147, 2008.
- Falck G, Schjott J, Jynge P: Hyperosmotic Pretreatment Reduces Infarct Size in the Rat Heart. *Physiol Res* 48, 331–340, 1999.
- Ferdinandy P: Myocardial ischemia/reperfusion injury and preconditioning: effect of hypercholesterolemia/hyperlipidemia. *Br J Pharmacol* 138(2): 283–285, 2003.
- Feuvray D, Lopashuk DG: Controversies on the sensitivity of the heart to ischemic injury is decreased. *Cardiovasc Res* 34: 113–120, 1997.
- Fröhlich ED et al: The heart in hypertension. *N Engl J Med* 327: 998–1008, 1992.
- Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Hayashi M, Nishitani T, Tanaka M, Yoshida H, Shimamoto K, Hotamisligil GS, Miura T: Serum fatty acid binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal diseases. *PLoS One* 6(11): e27356, 2011.
- Haider B, Ahmed SS, Moschon CB, Olderwurtel HA, Regan TJ: Myocardial function and coronary blood flow response to acute ischemia in chronic canine diabetes. *Circ Res* 40(6): 577–583, 1977.
- Hearse DJ: Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 9: 605–616, 1997.
- Chan CP, Sanderson JE, Glatz JF, Cheng WS, Hempel A, Reneberg R: A superior early myocardial infarction marker. *Human Heart fatty acid binding protein*. *Z Kardiol* 93(5): 388–397, 2004.
- Chen H, Azuma M, Maeda K, Kalimoto N, Higashino H: Impaired heart function and noradrenaline release after ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27(9): 664–670, 2000.
- Chen H, Shen WL, Wang XH, Chen HZ, Fu J, Ni YF, Gao PJ, Zhu DL, Higashino H: Paradoxically enhanced heart tolerance to ischemia in type 1 diabetes and role of increased osmolarity. *Clin Exp Pharm Physiol* 33: 910–916, 2006.
- Ishihara M, Inoue I, Kawaguchi T, Shimizu Y, Kurisu S, Nishioka K, Kouno Y, Umemura T, Nakamura S, Sato H: Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 38(4): 1007–1011, 2001.
- Jaffe AS, Spadaro JJ, Schechtman K, Roberts R, Geltman EM, Sobel BE: Increased congestive heart failure after myocardial infarction of modest extent in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 108(1): 31–37, 1984.
- Jia YZ, Sato E: Evaluation of coronary collateral circulation in early ischemia in rat hearts. A morphological study. *Nihon Ika Daikaku Zasshi* 64: 329–336, 1997.
- Juhasz B, Der P, Turoczy T, Bacskay I, Varga E, Tosaki A: Preconditioning in Intact and Previously Diseased myocardium. *Antioxidants & Redox signaling* 6(2):

- 352–333, 2004.
- Kaplan RC, Aviléz-Santa ML, Parrinello CM, Hanna DB, Jung M, Castañeda SF, Hankinson AL, Isasi CR, Birnbaum-Weizman O, Kim RS, Daviglius ML, Talavera GA, Schneiderman N, Cai J: Body mass index, sex, and cardiovascular disease risk factors among Hispanic/Latino adults. *J Am Heart Assoc* 3(4): e000923, 2014.
- Kaski JC, Chen L, Crook R, Cox I, Tousolius D, Chester MR: Coronary stenosis progression differs in patients with stable angina pectoris with and without a previous history of unstable angina. *Eur Heart J* 17(10): 1488 – 1494, 1996.
- Kernsten JR, Schmeling TJ, Orth KG, Pagel PS, Warltier DC: Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am J Med Heart* 275(2): 721 – 725, 1998.
- Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordevic BS, Buzina R, Donats AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N: The seven country study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 13(2): 141 – 154, 1984.
- Kloner RA, Shook T, Elliot M, a kol.: Perspective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: An ancillary study in TIMI-9B. *Circulation* 97: 1042 – 1045: 1998.
- Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, a kol.: Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI-4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 91: 37 – 45, 1995.
- Knowlton AA, Apstein CS, Saouf R, Brecher P: Leakage of heart type fatty acid binding protein with ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 21(6): 577 – 583, 1989.
- Korthuis JR, Gute DC, Cepinskas G, Kvietys PR: Cellular mechanism of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiol* 5: 35 – 48, 1998.
- Krupička J, Budešinsky T, Straka Z, Gregor P: Echo-cardiographic evaluation of the left ventricular wall motion in acutely revascularized patients. *Cardiol* 8(6): 301 – 304, 1999.
- Li JJ, Huang CX, Jiang H, Fang CH, Chen F, Tang QZ, Li GS: Ischemic preconditioning detected by treadmill exercise test in patients with stable angina. *Angiology* 54(1): 45 – 50, 2003.
- Lövel H, Döring A, Schneider A, Heier M, Thorand B, Meisinger C, MONICA/KORA Study: The MONICA Augsburg surveys-basis for prospective cohort studies. *Gesundheitswesen* 67(1): 13 – 18, 2005.
- Matejíková J, Kucharská J, Pancza D, Ravingerová T: The effect of oxidant treatment on NO-inhibition on the incidence of ischemia-induced arrhythmias in the diabetic rat hearts. *Physiol Res* 57: 55 – 60, 2008.
- Müller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN: An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J* 29: 1316 – 1326, 2008.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. *Circulation* 84, 442 – 445, 1991.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124 – 1136, 1986.
- Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M, a kol.: Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction – retrospective clinical evidence of preconditioning. *Am J Cell Cardiol* 25: 1076 – 1083, 1995.
- Ošťádal B, Kolář F: Cardiac ischemia: From injury to protection. Kluwer Academic Publishers, ISBN 0-7923-8642-6, 1999.
- Phillips JW, O'Regan: Evidence for swelling-induced adenosine and adenine nucleotide release in rat cerebellar cortex exposed to monocarboxylate-containing or hypotonic artificial cerebrospinal fluid. *Neurochem Int* 40(7): 629 – 635, 2002.
- Pringle KL, Grossmann DL, Feuvray D: Modulation by pH and Ca²⁺ of Na⁺-H⁺ exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. *Circ Res* 80: 253 – 260, 1997.
- Rajamani U, Joseph D, Roux S, Essop MF: The hexosamine biosynthetic pathway can mediate myocardial apoptosis in rat model of diet-induced insulin resistance. *Acta Physiol Oxf* 202(2): 151 – 157, 2011.
- Ravingerová T, Barančík M, Strnisková M: Mitogen-Activated Protein Kinases-Mediated Signaling in Cardiac Pathology. In: *Cardiac Drug Development Guide*. Pugsley MK (Ed), Human press Inc, 67 – 86, 2003a.
- Ravingerová T, Bernátová I, Matejíková J, Ledvényiová V, Nemčková M, Pecháňová O, Tribulová N, Slezák J: Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Exp Clin Cardiol* 16(3): 23 – 29, 2011.
- Ravingerová T, Čarnická S, Nemčková M, Ledvényiová V, Barlaka, Adameová A, Khandelwal VKM, Zálešák M, Kolář F: The impact of related risk factors on cardiac response to ischemia and possibilities to restore impaired heart tolerance. *Physiol Res* 61(2): 1 – 10, 2012.
- Ravingerová T, Neckář J, Kolář F: Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem* 249(1–2): 167 – 174, 2003b.
- Ravingerová T, Štetka R, Volkovová K, Džurba A, Ziegelhöffer A, Styk J: Acute diabetes modulates response to ischemia in isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem* 210(1, 2): 143 – 151, 2000.
- Ricci U, Joseph D, Roux S, Essop M: Proapoptotic and antiapoptotic effect of hyperglycemia: role of insulin signaling. *Can J Physiol* 86(4): 166 – 172, 2008.
- Ross R: Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115 – 126, 1999.
- Rourke BO: Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94: 420 – 432, 2004.
- Ruis-Meana M, Garcia-Dorado D: Translational cardiovascular medicine (II). *Pathophysiology of*

- ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 62(2): 199 – 209, 2009.
- O'Donnell CJ, Elousa R: Cardiovascular Risk Factors, Insight From Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol* 61(3): 299–310, 2008.
- Veerkamp JH, van Moerkerk HTB, Prinset CFM, van Kuppevelt TH: Structural and functional studies on different human FABP types. *Mol Cell Biochem* 1992: 137 – 142, 1999.
- Vladic N, Ge ZG, Leucker T, Brzezinska AK, Du JH, Shi Y, Warltier DC, Pratt PF, Kersten JR: Decreased tetrahydrobiopterin and disrupted association of Hsp90 with eNOS by hyperglycemia impair myocardial ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 301: 2130 – 2139, 2011.
- Vohout B, Rašlová K: Rizikové faktory rozvoja aterosklerózy: Lipidy a ich vzťah k ateroskleróze. *Via Pract* 6(3): 116 – 199, 2009.
- Shizukuda Y, Reyland ME, Buttrick PM: Protein kinase C δ modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 282(5): 1625 – 1634, 2002.
- Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G: Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 52: 181–198, 2001.
- Simonescu M, Sima AV: Morphology of Atherosclerosis Lesion. In: *Inflammation and Atherosclerosis*. G Wick, Grundman (eds). DOI 10.1007/978-3-7091-0338-82, 19 – 37, 2012.
- Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T: The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol* 14(1): 49 – 57, 1989.
- Strnisková M, Barančík M, Neckář J, Ravingerová T: Mitogen-Activated protein kinases in the acute diabetic myocardium. *Mol Cell Biochem* 249: 59 – 65, 2003.
- Sun JZ, Lin CZ: Changes in calcium and water content of stunned myocardium and effects of hyperosmotic mannitol in rat heart. *Sheng Li Xue Bao* 42(2): 155 – 162, 1990.
- Špírková Z, Daňová K, Pecháň, Pivovarníková H, Pulmann R: *Kardiomarkery*, Phonec Agency, Bratislava, ISBN 80-8073-252-3, 2005.
- Štrbák V: Cell Swelling-Induced Peptide Hormone Secretion. *Cell Physiol Biochem* 28: 1155 – 1168, 2011.
- Švorc P, Šefara P, Baročková I: Ischemic preconditioning – Laboratory curiosity or endogenous protection of myocardium before ischemia? *Cardiol* 12(1): 21 – 27, 2003.
- Tani M, Neely JR: Hearts from diabetic rats are more resistant to in vitro ischemia: Possible role of altered Ca²⁺ metabolism. *Circ Res* 62: 931 – 940, 1988.
- Tani M, Neely JR: Role of intracellular Na⁺ and Ca²⁺ overload and depressed ventricular function in reperfused ischemic rat hearts. *Circ Res* 65: 1045 – 1056, 1989.
- Tosaki A, Engelmann DT, Engelmann RM, Das DK: The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 31(4): 526 – 536, 1996.
- Tsuji R, Tanaka T, Sohmyia K, Hirota Y, Yoshimoto K, Kinashita K, Kusaka Y, Kawamura K, Morita H, Abe S, a kol.: Human heart-type cytoplasmatic fatty acid binding protein in serum and urine during hyperacute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 41(3): 209 – 217, 1993.
- Tyagi P, Tayal G: Ischemic preconditioning of myocardium. *Acta Pharmacol Sin* 23(10): 865 – 870, 2002.
- Yin X, Zheng Y, Zhai X, Zhao X, Cai L: Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-Mediated Myocardial Protection against Ischemia/Reperfusion Injury: *Exp Diabetes Res* 2012: ID: 19804, 2012.
- Yusuf S, Hawken S, Onpuu S, on behalf of the INTERHEART Study Investigators: Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart study): case control study. *Lancet* 364: 937 – 952, 2004.
- Zálešák M, Blažíček P, Gablovský I, Ledvényiová V, Barteková M, Ziegelhöffer A, Ravingerová T: Impaired PI3K/Akt signaling as a potential cause of failure to precondition rat heart under condition of simulated hyperglycemia. *Physiol Res*. V tlači, 2015.
- Zhao M, Xia L, Cheng GC: Protein kinase C δ in apoptosis: a brief overview. *Arch Immunol Ther Exp (Wasszaw)* 60: 361 – 372, 2012.
- Žák A, a kol.: *Ateroskleróza, Nové pohledy*. Grada Publishing, 1. Ed., ISBN 978-80-247-3052-3, s. 19, 2011.

Ovplyvnenie endotelu flavonoidmi ako možnosť prevencie kardiovaskulárnych ochorení

Štefan Lukáč

Ústav lekárskej fyziky, biofyziky, informatiky a telemedicíny LF UK v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava
stefanlukacjr@gmail.com

ABSTRAKT

Endotelové bunky už dávno nepredstavujú iba pasívnu vrstvu vystielajúcu endoluminálny povrch ciev. Podľa viacerých autorov ide o biologicky aktívny orgán, ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii cievneho tonusu. Z embryologického pohľadu pochádza endotel z mezenchýmového tkaniva. Anatomicko-histologicky tvorí dôležitú štruktúru tunica intima, kde participuje na tvorbe selektívne permeabilnej membrány. Endotelové bunky secerňujú biologicky aktívne molekuly, ako sú prostacyklín, endotelíny, ale hlavne oxid dusnatý (NO). Tieto pôsobky tvoria skupiny vazokonstrikčné a vazodilatačne pôsobiace látky, ktorých dysbalans nazývame endotelová dysfunkcia. Flavonoidy ako prírodné látky polyfenolového charakteru predstavujú zaujímavú zložku ľudskej stravy z hľadiska interakcie s endotelovými bunkami. Viaceré štúdie sa zaoberajú ovplyvnením endotelovej dysfunkcie flavonoidmi, dominante zo skupiny flavanolorov, ako možnosť redukcie rozvoja aterosklerózy a artériovej hypertenzie. In vitro boli skúmané aj antikancerogénne účinky flavonoidov. Preukazuje sa, že pôvodná hypotéza o čistom antioxidačnom efekte flavonoidov nie je celkom správna. Viaceré práce totiž potvrdili zlepšenie endotelovej funkcie či tlaku krvi bez ovplyvnenia parametrov oxidačného stresu, čo vedie k predpokladu prítomnosti aktívne pôsobiace metabolitov. Suspektným účinkom flavonoidov je ovplyvnenie NO syntázy a nikotínadenín-dinukleotidfosfát (NADPH)-oxidázy, čo v konečnom dôsledku vedie k zvýšenej biodostupnosti oxidu dusnatého. Tento efekt však nie je až taký výrazný v podmienkach plne rozvinutej hypertenzie. Rovnako je potrebné titrovať dávku užívaných flavonoidov, keďže aj použitie

flavonoidov vo vysokom množstve sa nezaobíde bez nežiadúcich efektov. Flavonoidy určite nenahradia konvenčnú farmakoterapiu hypertenzie, no ako doplnkový faktor podporujúci reštitúciu endotelu nájdú určité uplatnenie v oblasti preventívnej kardiológie.

Kľúčové slová: epikatechín, endotel, flavonoidy, endotelová dysfunkcia, oxid dusnatý.

ABSTRACT

Endothelial cells did not present just a passive layer lining the endoluminal surface of vessels. According to several authors, it is a biologically active organ which plays an important role in the regulation of vascular tone. Endothelium is derived from the mesenchymal cells and it forms an important anatomical and histological structure of the tunica intima, where it participates in the formation of selectively permeable membrane. Endothelial cells secrete biologically active molecules, such as prostacyclin, endothelins, but especially nitrogen monoxide (NO). These agent presents two groups of vasoconstrictors and vasodilators, which imbalance is called endothelial dysfunction. Flavonoids, natural substances of polyphenol structure, represent an element of the human nourishment that interacts with endothelial cells. Several studies focused on the affecting endothelial dysfunction by using of flavonoids, especially with flavanols with the aim to reduce a risk of the development of atherosclerosis and hypertension. In vitro anti-cancer effect of flavonoids have also been studied. It demonstrates that the original hypothesis about the only antioxidant effect of flavonoids is

not quite correct. Many publications confirmed the improvement of endothelial function and blood pressure without affecting the parameters of the oxidative stress, what implicates the idea of presence of metabolically active substances. Suspected effect of flavonoids could be the influence of NO synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which ultimately leads to increased bioavailability of nitric oxide. This effect is limited in conditions of clinically manifested hypertension. A dose of flavonoids should be also titrate, as well as the use of flavonoids in high doses is not without adverse effects. Flavonoids certainly could not replace conventional medical treatment of hypertension, but as an additional pull factor for endothelial restitution could find specific application in the field of preventive cardiology.

Key words: epicatechin, endothelium, flavonoids, endothelial dysfunction, nitric oxid.

ÚVOD

V priebehu posledných rokov sa objavilo mnoho významných poznatkov, ktoré zásadne ovplyvnili chápanie fyziológie a patofyziológie regulácie krvného tlaku. Kedysi nevnímaná úloha výstelky cievnej steny, endotelu, v regulačných procesoch ovplyvňovania viacerých fyziologických mechanizmov sa v súčasnosti stáva predmetom bádania mnohých vedeckých kolektívov. V nasledujúcej časti preto zhrniem aktuálne informácie o endotele, jeho stavbe, funkcii, úlohách v niektorých fyziologických procesoch a v zmysle klinického významu pri patogenéze kardiovaskulárnych ochorení. Rovnako budú poskytnuté informácie o skupine polyfenolových látok nazývaných flavonoidy, keďže ich požívanie preukazuje pozitívne vplyvy na kardiovaskulárny systém, obzvlášť na endotelovú funkciu. Nehovoriac o tom, že sú najhojnejšie zastúpenými polyfenolmi v strave, čo napomáha ich dostupnosti pre široké skupiny obyvateľstva.

ENDOTEL

Stena ciev ľudského tela je tvorená troma základnými elementmi, a to endotelom, hladkosvalovými bunkami a spojivovým tkanivom (Obr. 1). Tieto sú vo väčšine ciev anatomicky usporiadané do troch základných vrstiev: tunica intima, tunica media a tunica externa. Množstvo a zastúpenie

jednotlivých elementov podieľajúcich sa na stavbe konkrétnej cievy je podmienené jednak mechanickými faktormi, z ktorých dominantnú úlohu zohráva lokálne pôsobiaci krvný tlak, tak aj faktormi metabolickými, ktoré reflektujú požiadavky cieľových tkanív na živiny (Hammer a McPhee, 2014).

Endotel, ktorý predstavuje špecifický typ epitelialneho tkaniva, je uložený v tunica intima, kde sa podieľa na tvorbe selektívne permeabilnej bariéry medzi krvnou plazmou a intersticiálnou tekutinou subendotelialneho tkaniva, čím tvorí hranicu medzi intra a extravazálnym priestorom. Toto vysoko diferencované tkanivo je predisponované na sprostredkovanie a aktívny monitoring obojsmernej výmeny malých molekúl a reštrikciu transportu molekúl s veľkou molekulovou hmotnosťou medzi dvoma spomenutými vnútornými kompartmentmi. Celková plocha endotelovej výstelky všetkých ciev dospelého ľudského organizmu sa odhaduje až na 500 až 1000 m² s celkovou hmotnosťou asi 1,5 kilogramu (Javorka a kol., 2014).

Okrem úlohy vo výmene častíc medzi krvou a tkanivami majú endotelové bunky aj ďalšie nemenej významné funkcie. Sem môžeme zaradiť produkciu vazoaktívnych faktorov ovplyvňujúcich cievny tonus, ako je oxid dusnatý (NO), endotelíny alebo iné vazorelaxačné a vazokonstrikčné pôsobiacie látky, či dôležitú úlohu pri konverzii angiotenzínu I na angiotenzín II (Hammer a McPhee, 2014).

Významná je i prítomnosť unikátnych pozdĺžne usporiadaných vezikúl nazývaných Weibel-Paladeho telieska, ktoré obsahujú selektín a von Willebrandov faktor (vWF), dôležitú súčasť koagulačných mechanizmov. Rast a obnova ciev je jednou z ďalších úloh endotelu, ktorá okrem iného je sprostredkovaná vaskulárnym endotelialným rastovým faktorom (VEGF) zohrávajúcim nemalú úlohu vo fyziologických, ale i patologických procesoch (Hulín a kol, 2009).

Aj napriek morfolologickej podobnosti nie sú endotelové bunky homogénne vo svojej funkcionalite a spektrum ich funkčných vlastností sa líši v závislosti od ich lokalizácie.

Histologická štruktúra endotelu

Endotelové bunky sú polygonálne bunky, ktorých pozdĺžna os smeruje paralelne so smerom toku krvného prúdu. Usporiadané sú v jednej kompaktnej vrstve, ktorá je situovaná na bazálnej lamine. Cytoplazma obsahuje jadro, ktorého ulo-

ženie podmieňuje vyklenutie časti bunky do lúmenu, malý Golgiho aparát, mitochondrie, voľné ribozómy a cisterny drsného endoplazmatického retikula.

Endotelové bunky bránia kontaktu krvných elementov a medzibunkovej hmoty, čím napomáhajú udržiavať rovnováhu medzi pro- a anti-koagulačnými procesmi.

Luminálny povrch endotelia je pokrytý vrstvou glykokalyxu, ktorej hrúbka môže dosahovať až 500 nm. Táto predstavuje faktor podmieňujúci jeho nezmáčanlivosť a silný negatívny náboj, ktorý je významný pre selektívnu permeabilitu bunkovej membrány. Nemenej významnou úlohou glykokalyxu je aj mediácia naviazania a lokálneho zhlukovania rozličných molekúl, ako sú antikoagulačné alebo rastové faktory, cytokíny, chemokíny, ale aj enzýmy ovplyvňujúce intraluminálne procesy (Luelmann-Rauch, 2012).

Tak, ako bazálny povrch, i povrch buniek cievnej výstelky lokalizovaný v kontakte s intravaskulárnou tekutinou je charakterizovaný obzvlášť veľkým množstvom kaveol. Tieto predstavujú vchĺpeniny bunkovej membrány tvaru gréckeho písmena omega, v ktorých má bunková membrána špeciálnu lipidovú výbavu zahrňujúcu vysokú koncentráciu cholesterolu a sfingolipidov. Stabilizáciu týchto kaveol zabezpečuje špecifický proteín kaveolín. Funkcia kaveol nie je doposiaľ plne objasnená, no predpokladá sa, že ide o viac ako len endocytózu sprostredkujúce partikuly. V cievnom riečisku zabezpečujú napríklad transcytózu bielkovín krvnej plazmy, no taktiež pretrvávajú ako stabilné jamky na povrchu, pravdepodobne ako prednostné domény väzby medzi membránovými receptormi a intracelulárnymi signálnymi reťazcami. Takto sú napríklad lokalizované receptory pre inzulín, ras-

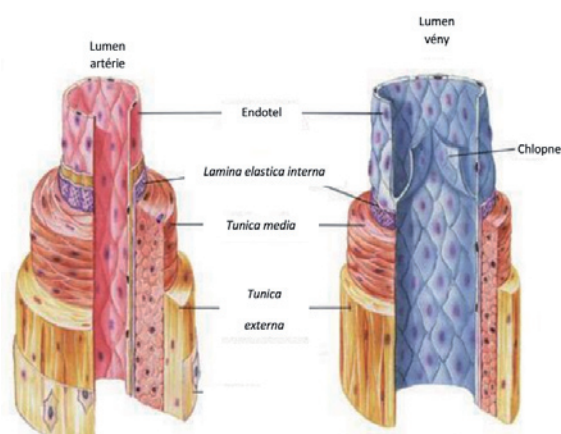
tové faktory či endotelín, ale aj endotelová NO syntáza (eNOS). Kaveoly môžu zohrávať aj úlohu pri rozvoji rôznych kardiovaskulárnych ochorení (Das a Das, 2012).

Schopnosť endotelových buniek odolávať silnému šmykovému napätiu je zabezpečená prítomnosťou takzvaných stresových vlákien, ktoré sú tvorené kontraktílnymi zväzkami aktínových filamentov. Tieto sú orientované paralelne so smerom prúdenia krvi (Luelmann-Rauch, 2012).

Fyziologické funkcie endotelu

V súčasnosti už nie je endotelové tkanivo chápané ako pasívna výstelka ciev, ale niektorí autori ho, naopak, nazývajú samostatným orgánom. Funkcie endotelu varírujú podľa konkrétneho úseku cievneho riečiska. Mnohé z nich boli objavené už dávnejšie, no mnoho jeho úloh bolo popísaných len nedávno a o veľkej skupine možných interakcií sa zatiaľ len diskutuje. Podľa aktuálne dostupných poznatkov plní endotel tieto funkcie:

- predstavuje **difúznú bariéru**: tesné spojenia tight junction bránia pasívnemu prenikaniu veľkomolekulových látok z plazmy do subendoteliálnych tkanív; týmto je možné udržiavať onkotický tlak krvnej plazmy a nedochádza k úniku tekutín do extravazálneho priestoru;
- zabraňuje **adhézii krvných buniek** na luminálnej strane endotelových buniek, čím je zachovaný kontinuálny tok krvi;
- reguluje **migráciu leukocytov**: endotel najmä v postkapilárnych venulách má schopnosť zabezpečenú prítomnosťou selektínov a iných adhézných molekúl ovplyvniť prestup bielych krviniek po predchádzajúcej stimulácii, čím sa zúčastňuje na regulácii zápalových procesov;
- podieľa sa na **procesoch zrážania krvi**, čo je umožnené expresiou rôznorodých povrchových molekúl a biologicky aktívnych látok; za normálnych okolností bráni endotel svojimi vlastnosťami tvorbe intravazálnych zrazenín produkciou prostacyklínu a NO, ktoré inhibujú agregáciu krvných doštičiek; pri poškodení ciev, a teda i endotelu, dochádza naopak k uvoľneniu vWF z Wiebel-Paladeho granúl procesom exocytózy, čím sa zároveň P-selektín prítomný v ich stene dostáva na bunkový povrch; týmito mechanizmami má endotel účasť na hemostáze;
- endotelové bunky disponujú **schopnosťou regulovať priesvit ciev**; umožnené je to jednak prítomnosťou tzv. myoendotelového kontaktu



Obr. 1. Anatomická stavba ciev (upravené podľa Fox (1993)).

medzi hladkosvalovými bunkami a endotéliom; toto spojenie má charakter gap junction a predpokladá sa, že zohráva úlohu pri sprostredkovaní vazodilatačných podnetov; zároveň sú v endoteli produkované vazodilatačne i vazokonstrikčne pôsobiace látky, ktorých úlohy sú popísané nižšie;

- **produkuje zložky extracelulárnej matrix** subendotelového väziva a konštitutívnym uvoľňovaním vWF bazálnym smerom podporuje adhéziu endotelu a subendotelového extracelulárneho matrixu (Hammer a McPhee, 2014).

Endotelom produkované vazoaktívne látky

Endotel nepredstavuje len pasívnu cievnu výstelku, ktorej dominantnou úlohou je mechanická odolnosť, ale naopak, je to vysoko aktívny orgán secernujúci mnohé biologicky účinné molekuly, ktoré sú vitálne dôležité pre reguláciu funkcií ciev (Obr. 2). Jeho bunky reagujú na zmeny prietoku, na širokú škálu cirkulujúcich substancií a zápalových mediátorov. Ako odpoveď na spomenuté stimuly uvoľňuje endotélium širokú paletu látok, ako sú rastové a vazoaktívne faktory. Rastové faktory regulujú vaskulárny vývoj a majú tak okrem iného aj významnú úlohu v reparácii poškodených ciev, ale i patogeneze rôznych ochorení. Vazoaktívne častice zohrávajú dôležité funkcie v parakrinnej komunikácii, kedy ovplyvňujú cievny tonus. Do tejto skupiny látok patria napríklad: prostaglandíny, zvlášť prostacyklín a tromboxány, oxid dusnatý a endotelíny (Javorka a kol, 2014).

Prostacyklín a tromboxány

Prostacyklín (PGI_2) a tromboxány predstavujú biologicky aktívne molekuly s dominantnou úlohou v parakrinnej komunikácii v rôznych tkanivách ľudského organizmu. Chemicky sú zaradované medzi prostaglandíny, teda metabolity vznikajúce účinkom enzýmu cyklooxygenázy z kyseliny arachidónovej. Zatiaľ čo je prostacyklín produkovaný endotéliom, tromboxán A_2 (TXA_2) produkujú trombocyty. Spomenuté látky majú aj protichodné účinky, keďže tromboxán podporuje vazokonstrikciu spolu s agregáciou trombocytov a prostacyklín ciev, naopak, dilatuje a okrem toho agregáciu trombocytov inhibuje. PGI_2 stimuluje Gs proteín, čím dochádza k aktivácii adenylátcyklázy a tvorbe cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP), ktorý inhibuje

kinázu ľahkých reťazcov myozínu, čím dochádza k vazodilatačnému efektu. Tromboxán účinkuje pomocou proteínu Gq, ktorý aktivuje dve transdukčné signálne cesty: signálnu cestu fosfolipázy C, ktorou vzniká inozitol trifosfát a signálnu cestu Rho-kinázy. Inozitol trifosfát stimuluje uvoľnenie vápnika zo sarkoplazmatického retikula svalovej bunky a aktivuje proteínkinázu C tvorbou diacylglycerolu. Rho-kináza inhibuje fosfatázu ľahkých myozínových reťazcov, čím v konečnom dôsledku dochádza ku vazokonstrikcii (Feng a kol, 1999).

Rovnováha medzi PGI_2 a TXA_2 je kľúčová v procesoch udržiavania fyziologického prietoku krvi cievou, čo môže byť narušené pri poškodení cievnej steny, kedy nastáva prokoagulačný stav a zvyšuje sa produkcia tromboxánu. Opačným prípadom je užívanie kyseliny acetylsalicylovej, prípadne nesteroidných antiflogistík, čo vedie k irreverzibilnej inhibícii enzýmu cyklooxygenázy a tým aj k redukcii tvorby tromboxánu a prostacyklínu. Zatiaľ čo v endotelových bunkách dochádza k novonasyntetizovaniu cyklooxygenázy a tým aj k produkcii prostacyklínu, trombocyty túto schopnosť nemajú, čím nastáva dominancia PGI_2 a je navodený tzv. anti-koagulačný stav. Tento mechanizmus je využívaný pri liečbe, ale hlavne prevencii veľkého množstva ochorení, ako je napríklad infarkt myokardu, cievne mozgové príhody, angína pectoris a tranzitórne ischemické ataky, kedy pacienti so zvýšeným rizikom výskytu týchto ochorení dlhodobo užívajú acetylsalicylovú kyselinu (Cibulčík, 2009).

Oxid dusnatý (NO)

Dokázanie tvorby tohto potentného vazodilatátora endotelovými bunkami bolo významným objavom pri štúdiu patogenezy cievnych ochorení. Najprv bolo pozorované, že odstránenie endotélia zo vzorky arteriálneho tkaniva spôsobilo zmenu cievnej reaktivity na acetylcholín. Kým pri zachovaní cievnej steny v normálnom anatomicko-fyziologickom stave po stimulácii acetylcholínom sa cieva dilatovala, po odstránení endotelových buniek došlo naopak k odpovedi opačnej, teda k vazokonstrikcii (Furchgott a Zawadzki, 1980). Postupnosť objavov viedla sprvu k pomenovaniu neznámej látky produkovanej vnútornou výstelkou cievnej steny ako od endotelu odvodený relaxačný faktor, ktorý bol neskôr identifikovaný ako molekula oxidu dusnatého.

Oxid dusnatý je anorganická zlúčenina, ktorej molekula obsahuje jeden atóm dusíka a jeden

atóm kyslíka spojených dvojitou väzbou. Je to reaktívna látka, ktorá má vysokú schopnosť difuzibility. Produkovaný je z aminokyseliny L-arginínu za účasti kyslíka, redukovaného NADP a ďalších kofaktorov, pričom vzniká L-citrulín, samotný NO a oxidovaná forma NADP. Celá reakcia prebieha pomocou kľúčového enzýmu katalyzujúceho proces tvorby oxidu dusnatého – NO syntázy. Nevyhnutnou súčasťou chemickej reakcie je prítomnosť kofaktorov, ktorými sú v tomto prípade tetrahydrobiopterín, flavínadenín-dinukleotid a flavín-monomonukleotid. Doposiaľ boli popísané tri formy tohto enzýmu, a to:

- NOS1 (nNOS) ktorej prítomnosť bola objavená v bunkách nervového systému, ale aj v iných typoch buniek.
- NOS2 (iNOS) nachádzajúca sa v makrofágoch a príbuzných imunokompetentných bunkách,
- NOS3 (eNOS), ktorá je produkovaná práve endotelovými bunkami.

Platí, že zatiaľ čo nNOS a iNOS sú lokalizované hlavne v cytoplazme buniek, eNOS je charakteristicky prítomná ako membránový enzým. Syntázy oxidu dusnatého lokalizované v bunkách imunitného systému a v endotelových bunkách sú aktivované mediátormi zvyšujúcimi intracelulárnu koncentráciu iónov Ca^{2+} , ako sú acetylcholín, bradykinín, ale aj už spomínané šmykové napätie. Naopak NOS2 je aktivovaná cytokínmi produkovanými pri zápalovej odpovedi.

NO vyprodukovaný endotelovou bunkou má veľmi krátky polčas rozpadu, čo je dané jeho radikálovým charakterom, teda prítomnosťou nespáreného elektrónu vo valenčnej vrstve. Veľkú afinitu k oxidu dusnatému má aj superoxidový radikál, ktorý interakciou s ním redukuje jeho biologickú dostupnosť. Po svojom uvoľnení NO difunduje k hladkosvalovým bunkám nachádzajúcich sa v hlbších vrstvách cievnej steny. V nich svojim účinkom aktivuje enzým guanylátcyklázu, ktorého aktivitou dochádza k premene guanozíntrifosfátu na cyklický guanozínmonofosfát (cGMP). Tento svojím účinkom:

- inhibuje vstup Ca^{2+} do buniek a znižuje tak jeho intracelulárnu koncentráciu;
- aktivuje K^{+} -kanály, čím dochádza k hyperpolarizácii a relaxácii;
- stimuluje cGMP dependentnú proteínkinázu, ktorá aktivuje fosfatázu ľahkých myozínových reťazcov, čo vedie v konečnom dôsledku k relaxácii hladkosvalových buniek s výslednou vazodilatáciou cievy (Klabunde, 2011). Na princípe

inhibície degradácie cGMP fungujú aj niektoré liečivá (sildenafil, tadalafil), takzvané inhibítory fosfodiesterázy, ktorých vazodiláciu podporujúci účinok sa využíva napríklad pri liečbe pľúcnej hypertenzie, ale hlavne erektilnej dysfunkcie (Marenčák, 2006).

NO okrem priamej vazodilácie má aj ďalšie účinky na cievny systém ktoré sú:

- antitrombotický efekt – inhibíciou adhézie a agregácie trombocytov;
- antiinflamačný efekt – inhibíciou adhézie leukocytov, vychytávaním superoxidu;
- antiproliferatívny efekt – inhibíciou proliferácie hladkosvalových buniek;
- nepriama vazodilácia inhibíciou sympatickej vazokonstrikcie (Klabunde, 2011).

Všeobecne rozlišujeme prietokom indukovanú a receptorom stimulovanú produkciu NO. Okrem už spomenutých acetylcholínu a bradykinínu existujú aj ďalšie vazoaktívne pôsobiace látky, výsledkom účinku ktorých je vazodilácia sprostredkovaná uvoľnením NO endotelovými bunkami. K týmto molekulám radíme napríklad vazoaktívny intestinálny polypeptid, substanciu P alebo adenozín, no existujú i mnohé ďalšie. Cestu vazodilácie podmienenú uvoľnením NO nevyužívajú in vivo iba vazodilatačne pôsobiace látky, ale aj látky s opačným efektom, ktoré týmto mechanizmom simultánne znižujú nimi indukovanú vazokonstrikciu (Klabunde, 2011).

V posledných rokoch bola objavená molekula asymetrického dimetylarginínu, ktorý je považovaný za endogénny inhibítor NO syntázy. Najnovšie výskumy ukazujú na jeho spojitost s výskytom endotelovej dysfunkcie, rizikom kardiovaskulárnej mortality a chronických obličkových ochorení (Alpoim a kol., 2015).

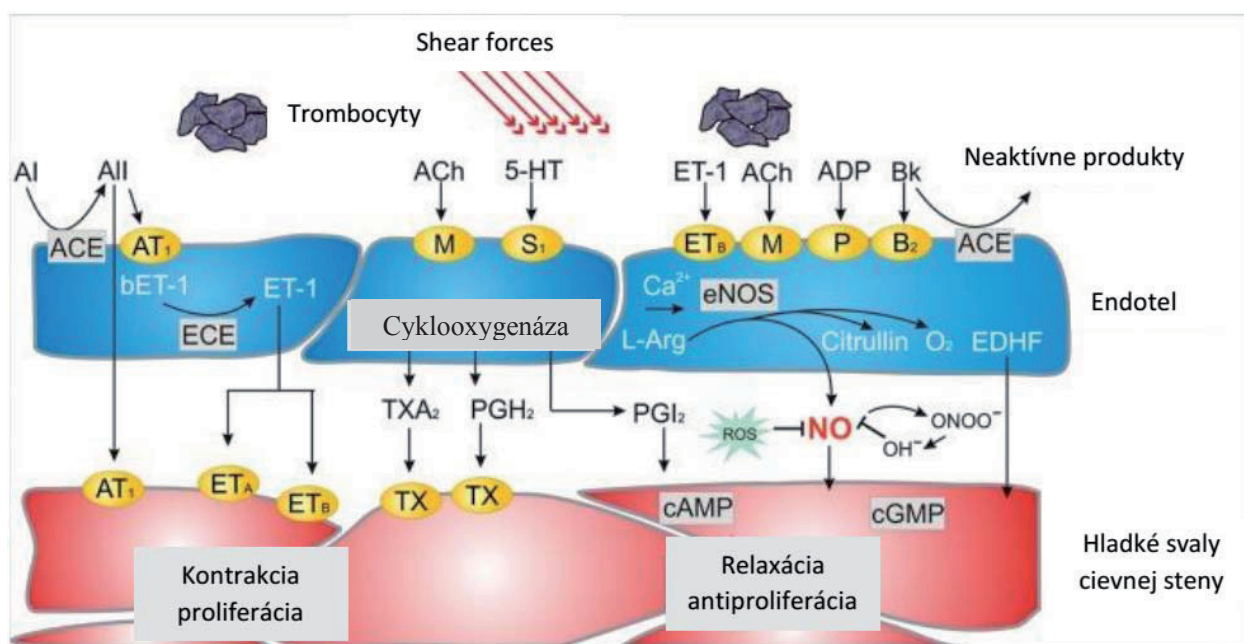
Endotelíny

Endotelové bunky, okrem vyššie spomenutých vazodilatačne pôsobiacich látok, produkujú aj látky pôsobiace vazokonstrikčne, ktoré sa nazývajú endotelíny (ET). Hoci tieto môžu mať v malých množstvách aj vazodilatačný účinok, v prípade, že pôsobia autokrinne iba na samotnú endotelovú bunku, vo väčších množstvách spôsobujú práve zúženie cievneho lúmenu. Chemicky ide o látky peptidového charakteru obsahujúce 21 aminokyselinových jednotiek spojených dvomi disulfidovými väzbami. Svojou štruktúrou sú príbuzné sarafo toxínom, polypeptidom nájdených v hadom jede

a podľa prítomnosti jednotlivých aminokyselín v ich štruktúre rozoznávame 3 izoformy endotelínov. Tvorené sú z väčších molekulových prekursorov za pomoci enzýmu konvertujúceho endotelín. Najčastejšie produkovaným typom endotelínov je ET-1, ktorý je zároveň doposiaľ najpotentnejšou vazokonstrikčne pôsobiacou objavenou látkou (Hammer a McPhee, 2014). Jeho tvorba bola preukázaná hlavne v cievnej stene, a to v endotelových bunkách a v hladkosvalových bunkách, okrem toho aj v makrofágoch, fibroblastoch, myokardiocytoch, mozgových neurónoch, pankreatických bunkách a bunkách črevného epitelu. Produkcia ostatných dvoch skupín endotelínov nie je tak rozšírená, oba sú exprimované v bunkách črevného epitelu, ET-2 je detekovateľný aj v ovariálnych bunkách a ET-3 v bunkách endotelu. Donedávna nebol celkom známy mechanizmus účinku endotelínov, no najnovšie objavy poskytli informácie o zapojení dvoch receptorov spriahnutých s G-proteínom, tzv. ET_A a ET_B receptor. Zatiaľ čo ET_A má najvyššiu afinitu k endotelínu-1, ET_B má k všetkým trom polypeptidovým izoformám afinitu rovnakú (Hammer a McPhee, 2014).

Hladkosvalové bunky cievnnej steny majú na svojom povrchu oba typy receptorov, pri ktorých aktivácií dochádza k aktivovaniu fosfolipázy C s následnou produkciou inozitoltrifosfátu a diacylglycerolu. Kaskáda týchto dejov vedie k zvýšeniu intracelulárneho obsahu Ca^{2+} mechanizmom jeho uvoľňovania z vnútrobunkových zásob a zároveň pri aktivácií špecifických vápnikových kanálov influxom z extracelulárneho prostredia. Výsledkom je napokon cieвна vazokonstrikcia. Receptor ET_B exprimujú však aj bunky endotelu, pri ktorého aktivácii dochádza k stimulácii endotelovej NOS, čo vedie k uvoľneniu NO a následnej vazodilatácii. Reaktivita žíl a tepien na endotelíny nie je rovnaká, pričom existuje predpoklad, že vény majú vyššiu citlivosť na endotelín ako artérie (Miller a kol. 1989).

Uvoľňovanie endotelínov je podporované adrenalínom, noradrenalínom, angiotenzínom II, vazopresínom, trombínom, niektorými cytokínmi, ako napríklad interleukín-1, inými látkami a faktormi, medzi ktoré môžeme zaradiť aj hypoxiu. Inhibícia je naopak výsledkom pôsobenia átriálneho nátriuretického peptidu, prostacyklínu a NO.



Obř. 2. Endotelom produkované vazoaktívne látky (upravené podľa Gutiérrez a kol., 2013) AI – angiotenzín 1, All – angiotenzín 2, AT₁ – receptor pre angiotenzín 2, ACh – acetylcholín, M – muskarínové receptor, 5-HT – 5-hydroxytryptam  n, S1 – serotoninov   receptor, ET-1 – endotelín 1, Bk – bradykinín, ECE – endotelín konvertujúci enzým, EDHF – od endotelu odvoden   hyperpolariza  n   faktor, L-Arg – L-arginín, eNOS – endotelov   synt  za oxidu dusnatého, NO – oxid dusnatý, B2 – bradykin  nov   receptor, ET_A – endotel  nov   receptor A, ET_B – endotel  nov   receptor B, PGH₂ – prostaglandín H₂, TXA₂ – tromboxán A₂, ROS – voľn   kysl  kov   radikály, TX – trombox  nov   receptor, ACE – angiotenzín konvertujúci enzým, cAMP – cyklick   adenos  nmonofosf  t, cGMP – cyklick   guanos  nmonofosf  t, ADP-adenoz  ndifosf  t, P – receptor pre adenos  ndifosf  t, PGI₂ – prostacyklín.

Existujú aj poznatky o tom, že by ET-1 mohol prispievať k remodelácii extracelulárnej matrix pri patogeneze kardiovaskulárnych ochorení, ako je pľúcna alebo systémová hypertenzia, ale aj obličkových ochorení (Meyers a Sethna, 2013). V súčasnosti sa už napríklad v terapii pľúcnej hypertenzie využíva aj neselektívny inhibítor receptora pre endotelín-1, bosentan (Šimková a Jansa, 2007).

Iné látky

Okrem vyššie spomenutých látok syntetizovaných endotelom, ktoré majú majoritnú úlohu pri regulácii cievného tonu, bola preukázaná prítomnosť i ďalších, menej často spomínaných molekúl. Ide o molekulu renínu a angiotenzín-konvertujúceho enzýmu (ACE), ktorého najvyššia koncentrácia je na povrchu lúmenu pľúcnych ciev. ACE zohráva významnú úlohu pri konverzii angiotenzínu I na vazokonstrikčne pôsobiaci angiotenzín II, ale súčasne sa podieľa na rozklade bradykinínu. Tento enzým je preto jedným z cieľov antihypertenznej terapie, kedy jeho inhibíciou nedochádza len k zníženiu tvorby angiotenzínu II, ale zároveň je znížené aj odbúravanie bradykinínu, ktorý pôsobí vazodilatačne. Tým je dosiahnuté zníženie periférneho odporu a after-loadu, čím dochádza k poklesu krvného tlaku (Willey, 2002).

Endotelová dysfunkcia

Kumulačným pôsobením nepriaznivých faktorov na endotel dochádza k jeho porušovaniu nie len z morfologického hľadiska, ale i funkčného. Tento stav je nazývaný endotelová dysfunkcia. Dysfunkcia endotelu je definovaná ako nerovnováha medzi vazodilatačne a vazokonstrikčne pôsobiacimi faktormi. Rovnako je ovplyvnená rovnováha medzi antikoagulačne a prokoagulačne pôsobiacimi činiteľmi. Všeobecne možno povedať, že ide o defekt akýchkoľvek mechanizmov homeostázy zabezpečovaných endotelom. Dochádza tak k nepriaznivým podmienkam preferujúcim rozvoj aterosklerózy, artériovej hypertenzie či srdcového zlyhania (Karetová, 2002). Výsledkom dysfunkcie je porucha vazorelaxácie závislej od endotelu, čo vedie k vyššiemu tonusu hladkosvalových buniek tunica media cievnej steny a je spôsobený aj zníženou sekréciou oxidu dusnatého (Púzserová a Bernátová, 2012). Nemenej dôležitou je znížená biodostupnosť NO kvôli jeho interakcii s voľnými kyslíkovými radikálmi a tvorbe peroxynitritu.

Endotelová dysfunkcia per se tvorí základ mnohých kardiovaskulárnych, ale i iných ochorení. Hulin pripomína prítomnosť výraznej dysfunkcie endotelu pri nasledujúcich poruchách a chorobách (Hulin a kol., 2009):

- ateroskleróza,
- hypertenzia,
- diabetes mellitus,
- pľúcna hypertenzia,
- vaskulitída,
- posttransplantačná rejekcia,
- malígny hemangioendotelióm.

Čo však vedie k dysfunkcii endotelu nie je doposiaľ celkom objasnené. Určitú úlohu iste zohráva hypercholesterolémia, ktorá je taktiež rizikovým faktorom aterosklerózy. Spolupôsobiacim činiteľom je takisto oxidačný stres, ktorý poškodzuje endotel, znižuje dostupnosť NO pri jeho interakcii so superoxidovým radikálom. Rovnako voľné radikály atakujú LDL (lipoproteíny s nízkou hustotou, low-density lipoproteins) cholesterol a následnou väzbou oxidovaného LDL na LOX-1 receptor dochádza k inhibícii endotelovej NOS. Jednými z najdôležitejších ciev, ktorých endotelová dysfunkcia zásadne negatívnym spôsobom ovplyvní stav vyživovaného orgánu, sú koronárne artérie. Gutiérrez potvrdzuje, že endotelová dysfunkcia predstavuje nezávislý prediktor symptómov a je kardiovaskulárny rizikový faktor u pacientov so stabilnou ischemickou chorobou srdca (Gutiérrez a kol., 2013). Preto má zmysel aktivita v zmysle detekcie a intervencie pri endotelovej dysfunkcii.

Možnosti detekcie endotelovej dysfunkcie

Testy na hodnotenie endotelovej dysfunkcie sú zamerané na sledovanie endotel-dependentnej vazodilatácie. Rozdeľujú sa na invazívne a neinvazívne. Pri invazívnych vyšetreniach je často sledovaná endotelová dysfunkcia koronárnych ciev. Princípom vyšetrenia je podanie endotel-dependentných dilatátorov ciev, napr. acetylcholínu, pri koronarografickom vyšetrení a sledovanie následnej cievnej reakcie. U nepoškodených ciev dochádza k vazodilatácii, opakom je vazokonstrikcia v podmienkach endotelovej dysfunkcie. Rovnako je možné sledovať reakciu intrakoronárnej dopplerovskej sonografie. Z neinvazívnych metód sa využíva hlavne ultrazvukové sledovanie dysfunkcie v artéria brachialis, keďže bol preukázaný

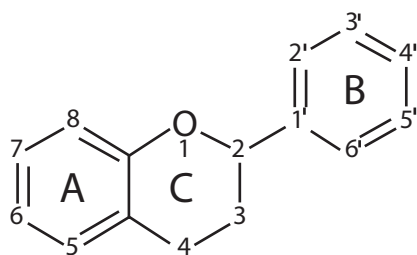
vzťah medzi dysfunkciou endotelu v koronárnom riečisku a v tejto tepne (Gokce a kol., 2002). Sleduje sa vazodilatácia navodená zvýšeným prietokom krvi (FMD, z angl. flow mediated dilatation) počas reaktívnej hyperémie, ktorá nasleduje po prechodnej kompresii brachiálnej artérie. Šmykové napätie pôsobí ako faktor zvyšujúci uvoľňovanie NO, čo sa prejaví následnou dilatáciou artérie (Škultétyová a kol., 2004).

FLAVONOIDY

Biochémia flavonoidov

Objav flavonoidov sa pripisuje dvojici maďarských vedcov Rusznyákovi a Szent-Györgyi v roku 1936 (Rusznyák a Szent-Györgyi, 1936). Ich účinky boli však ľudstvu známe už od nepamäti. Ide o sekundárne rastlinné metabolity, ktorých prirodzenou úlohou v rastlinnej ríši je podmieňovanie farby a chuti. Nemenej dôležité sú ich nutričné vlastnosti a účinky na rozličné orgánové systémy človeka. Základnou štruktúrou flavonoidov je flaván, teda 2-fenyl-benzo- γ -pyrán (Obr. 3). Rozdeľujú sa na 6 základných skupín v závislosti od nasýtenosti a oxidácie stredného kruhu C na:

- flavóny
- flavanoly
- flavanoly (katechíny)
- flavanóny
- izoflavonoidy
- antokyanidíny (Heim a kol., 2002)



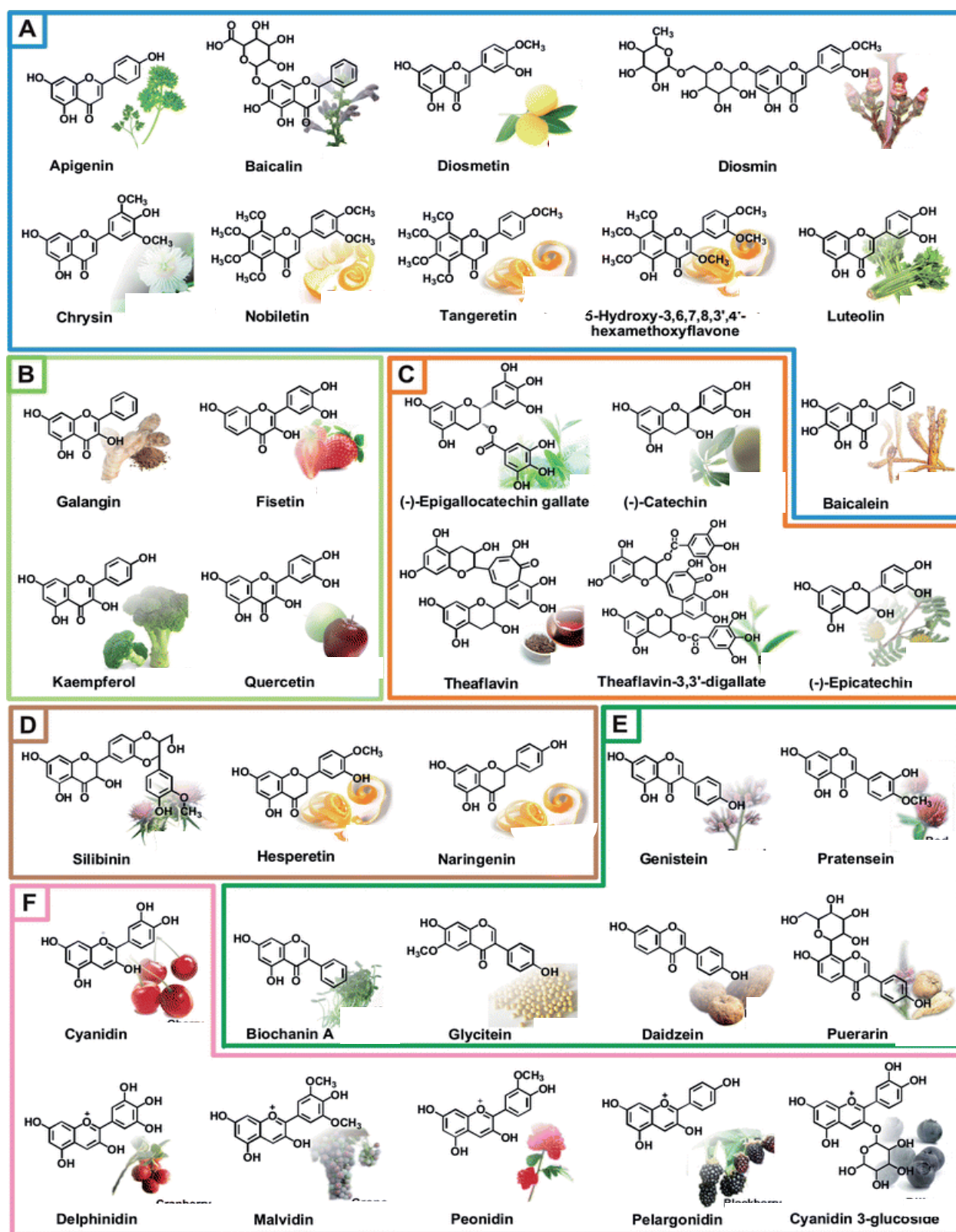
Obr. 3. Základná molekula flavonoidov, zdroj: <https://openi.nlm.nih.gov>.

Dominantný zdroj príjmu flavonoidov pre človeka tvoria hlavne ovocie a zelenina doplnené o čaj a víno (Obr. 4). Jednotlivé triedy sú zastúpené v rôznom množstve v konkrétnych plodinách.

Denný príjem flavonoidov sa rôzni na základe geografických odlišností, čo je podmienené dostupnosťou potravín a osobnými preferenciami

rôznych národností, kde isté percento môžu zohrávať špecifické stravovacie návyky. Príkladom môže byť štúdia Bekinga a Vieru zameraná na stanovenie dennej spotreby flavonoidov v populácii anglických a írskeho občanov. Je známe, že pitie čaju patrí k akejsi britskej kultúre stravovania sa. Výsledky štúdie poukázali na to, že dominantnými flavonoidmi konzumovanými touto skupinou boli antokyanidíny a flavanoly v priemernom množstve 182 mg u anglickej populácie, resp. 177 mg u írskych (Beking a Vieira, 2011). Iným príkladom je štúdia autorov analyzujúca príjem flavonoidov v španielskej populácii, kde gastronomické zvyklosti zahŕňajú spotrebu vysokého množstva ovocia a zeleniny, ktorým sa vďaka výborným klimatickým podmienkam na Pyrenejskom polostrove darí. Táto štúdia preukázala, že priemerný denný príjem flavonoidov v populácii španielov je 313,26 mg (Zamora-Ros a kol., 2010). Nedá mi nespomenúť i indiánov z kmeňa Kuna v Amazonských pralesoch, u ktorých dominantným zdrojom príjmu flavonoidov a hlavne flavanolov sú pokrmy a nápoje vyrábané z *Theobroma cacao*. Tieto požívateľiny príslušníkom tejto etnickej skupiny zabezpečovali mohutný príjem hlavne epikatechínu. Jeho kardioprotektívny a vazoprotektívny účinok inhiboval rozvoj hypertenzie a iných kardiovaskulárnych ochorení v tejto populácii (McCullough a kol., 2006).

Flavonoidy, rovnako ako iné látky, podliehajú v ľudskom organizme metabolickým zmenám a ich skonsumovaný objem neodráža skutočnú biodostupnosť. V prírode sa dominantne vyskytujú viazané s glykozidmi. V tráviacom trakte účinkom enzymatického pôsobenia glykozidáz tenkého čreva dochádza k separácii glykozidovej a flavonoidovej zložky (aglykónu). Po oddelení sacharidovej časti je zvyšná molekula schopná difúzie cez bunkové membrány enterocytov vďaka prítomnosti hydroxylových skupín, ktoré potencujú polaritu a hydrofilitu molekuly (Day a kol., 1998). Absorpcia nie je u všetkých skupín flavonoidov rovnaká. Najlepšie sú absorbované látky zo skupiny izoflavónov, naopak, najťažšie dochádza k prestupu antokyanínov (Viskupičová a kol., 2008). Istá časť prijatých flavonoidov je vstrebávaná aj v hrubom čreve a následne sú tieto látky zapojené do metabolismu, kde dochádza k ich glukuronidácii, sulfatácii a O-metylácii (Danihelová a Šturdík, 2011). Preto je potrebné pri rôznych diétnych odporúčaní uvažovať nie len o koncentrácii flavonoidov v konkrétnej potravine, ale i o možnostiach organizmu látky extrahovať a zužitkovať.



Obr. 4. Zdroje flavonoidov v potrave (prevzaté od Pan a kol., 2010). A – flavóny, B – flavonoly, C – flavanoly, D – flavanóny, E – izoflavonoidy, G – antokyanidíny.

Možnosti aplikácie flavonoidov v medicíne

Dôvodov, prečo sa flavonoidy dostali do pozornosti lekárov a rôznych výskumníkov, je hneď niekoľko. Vďaka prítomnosti početných hydroxylových skupín ich zaradujeme medzi polyfenolické látky. Antioxidačný účinok je zabezpečovaný nielen vychytávaním voľných kyslíkových radikálov, ale aj stimuláciou antioxidačných enzýmov. Avšak teória o fungovaní týchto látok v ľudskom organizme iba na základe ich antioxidačného účinku je aktuálne na ústupe, keďže narastá prítomnosť dôkazových štúdií potvrdzujúcich špecifický účinok flavonoidov na rôzne receptory a enzýmové systémy (Testai, 2015).

Z účinkov flavonoidov je nutné spomenúť ich možné aplikácie v onkológii. Je pravdepodobné, že flavonoidy obsiahnuté v potravinách môžu byť účinné ako súčasť diétnych opatrení u pacientov so závažným malígnym ochorením mozgového tkaniva glioblastoma multiforme. Ich účinok nie je len antioxidačný, kedy dochádza k protekcii gliálnych buniek pred oxidačným stresom, ale rovnako významná je aj redukcia neuroinflamačných procesov a glutamátom-indukovanej excitotoxicity. Veľká časť flavonoidov zároveň inhibuje proliferáciu buniek glioblastómu a pro-onkogénne signálne dráhy (Vidak a kol., 2015). Veľká časť týchto účinkov je zatiaľ preukázateľná len v in-vitro podmienkach respektíve na animálnych modeloch. Podobné účinky v zmysle inhibície proliferácie malígnych buniek a indukcie apoptózy doplnené o baktericídny účinok proti *Helicobacter pylori* boli preukázané pri aplikácii flavonoidu resveratrolu pri karcinómoch žalúdka (Zulueta a kol., 2015). Dominantným efektom flavonoidov je však ich účinok na kardiovaskulárny systém.

Ovplyvnenie endotelu flavonoidmi

Najčastejšie študovanou aplikáciou prírodných flavonoidov v humánnej medicíne sú možnosti ovplyvnenia patologických procesov v cievnom riečisku alebo srdcovom svale, pričom dominuje prvá spomenutá problematika. Kľúčovým sa z pohľadu ciev zdá ovplyvnenie ich vnútornej výstelky – endotelu – v štádiu endotelovej dysfunkcie, kedy dochádza k prevahe vazokonstrikčných faktorov. Zvýšená cievna rezistencia na podklade endotelovej dysfunkcie sa môže podieľať aj na rozvoji arteriálnej hypertenzie. Preto je snahou ovplyvniť

funkcie endotelu ešte pred rozvojom hypertenzie, k čomu nám môžu poslúžiť práve flavonoidy.

Ovplyvnenie parametrov oxidačného stresu

Viaceré štúdie, rovnako, ako aj náš posledný preukázali, že užívaním flavonoidov, napríklad epikatechínu, dochádza k zvýšeniu celkovej antioxidačnej kapacity krvnej plazmy (Lukáč a kol., 2015). Tento fakt potvrdzuje aj štúdia DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), ktorej cieľom bolo preukázať vplyv diéty bohatej na ovocie a zeleninu, ktoré sú hojným zdrojom flavonoidov, na krvný tlak a parametre oxidačného stresu u hypertenzných pacientov. Ovocná i zeleninová diéta znižovali krvný tlak, pričom najlepšie výsledky preukázala ich kombinácia. Okrem zníženia tlaku krvi sa taktiež u pacientov konzumujúcich takúto diétu zvýšila antioxidačná kapacita séra a znížila hladina malondialdehydu (Miller a kol., 1998).

Flavonoidy ako epikatechín dokážu v istých dávkach redukovať plazmatickú hladinu endotelínov. ET-1 aktivuje NADPH-oxidázu, ktorá je zodpovedná za produkciu vaskulárnych kyslíkových radikálov. Takto znížením hladiny ET-1 môžu nepriamo flavonoidy redukovať produkciu kyslíkových radikálov ovplyvnením enzymatických systémov (Jiménez a kol., 2007). Rovnako v podmienkach experimentálnej hypertenzie bolo preukázané ET-1 podmienené zvýšenie xantínoxidázy a mitochondriálnej produkcie kyslíkových radikálov (Callera a kol., 2006).

Preukazuje sa však, že je potrebný dlhodobý príjem flavonoidov v potrave, keďže krátkodobé požitie potravín bohatých na flavonoidy, akým je napríklad tmavá čokoláda, nemá vplyv na parametre oxidačného stresu (Vlachopoulos a kol., 2005).

Ovplyvnenie cievnej reaktivity

Od endotelu závislá vazodilatácia je sprostredkovaná aj oxidom dusnatým. Epigallokatechín 3-gallát zo skupiny flavonoidov je potentným induktorom eNOS (Potenza a kol., 2007). Týmto mechanizmom môžu flavonoidy prispievať k naprávaniu nesúlady vytvoreného v podmienkach endotelovej dysfunkcie. Zvýšená produkcia NO, ktorá je výsledkom vyššie spomenutého javu, následne spôsobí relaxáciu hladkosvalových buniek cievnej steny, a tým aj zníženie periférnej rezistencie. Rovnako Duffy a kolektív preukázali, že ako

krátkodobé, tak i dlhodobé (4 týždne) pitie čierneho čaju v množstve 900 ml denne u pacientov s ischemickou chorobou srdca malo za následok zlepšenie od endotelu závislej vazodilatácie (Duffy a kol., 2001).

Mechanizmus, akým flavonoidy sprostredkujú od endotelu nezávislú vazodilatáciu, nie je zatiaľ presne popísaný. Predpokladá sa, že dochádza k ovplyvňovaniu kináz, fosfodiesteráz a iónových kanálov, ako to preukázal Calderone. Aplikáciou flavónov a flavanónov dosiahol vazorelaxačný efekt spôsobený otvorením kalciových aktivovaných a ATP závislých káliových kanálov (Calderone a kol., 2004).

Zvyšovanie biodostupnosti NO, ktorá je nielen spojená s indukciou eNOS a jeho zvýšenou syntézou, ale do úvahy treba vziať aj antioxidačné účinky flavonoidov, ktoré bránia interakcii voľných kyslíkových radikálov s oxidom dusnatým. Tak je inhibovaná jeho degradácia mediátormi oxidačného stresu.

Ovplyvnenie aterosklerózy

Ateroskleróza ako cievne ochorenie charakterizované prítomnosťou aterosklerotických plátov je často podmienené ukladaním lipidov do cievnej steny, kde endotel ako styčná plocha hrá nemalú úlohu. Morfologické a funkčné zmeny spôsobené aterosklerózou sa následne podieľajú na rozvoji rôznych ochorení kardiovaskulárneho systému ako je ischemická choroba srdca, periférna artériová choroba končatín, hypertenzia ale i poškodenie obličiek. Na základe týchto faktov je snahou mnohých odborníkov odhaliť možnosti inhibície rozvoja aterosklerotických zmien v cievnom riečisku. Aj tu nachádzajú potenciálne uplatnenie flavonoidy. Preukázaným efektom flavanolov obsiahnutých v čokoláde je jednak už spomenutá inhibícia produkcie voľných kyslíkových radikálov, ktoré oxidujú voľné LDL, no zároveň aj redukcia celkového cholesterolu a LDL v krvnej plazme u ľudí s vyšším kardiovaskulárnym rizikom (Fernández-Murga a kol., 2011).

Bolo taktiež preukázané, že expozícia endotelálnych buniek oxidovanému LDL vedie k proteozomálnej degradácii endotelovej NOS. Tomuto javu je podľa Scheweho možné zabrániť preventívnym ovplyvnením endotelových buniek epikatechínom (Schewe a kol., 2008; Steffen a kol., 2007).

Nedávna štúdia uskutočnená v Japonsku na 131 pacientoch s hypercholesterolémiou preukáza-

la signifikantný pokles oxidovaného LDL a nárast HDL v krvnej plazme u probandov, ktorí konzumovali kakaový prášok s vysokým obsahom polyfenolov, hlavne katechínov a prokyanidínov (Baba a kol., 2007).

Ovplyvnenie tlaku krvi

V nadväznosti na spomenuté závery rôznych štúdií, z ktorých vyplýva antiaterogénny a antihypertenzný efekt flavonoidov, je nutné spomenúť zmeny tlaku krvi ako výsledok ich pôsobenia na endotel. Vychytávaním kyslíkových radikálov, inhibíciou NADPH-oxidázy, znižovaním oxidovaného LDL, zvýšenou produkciou a biodostupnosťou oxidu dusnatého dosahujú flavonoidy zníženie periférnej rezistencie a tým zlepšovaním hypertenzie v arteriálnom riečisku. Preukazujú to i klinické štúdie a metaanalýzy. Hooper uvádza, že jednorazový aj dlhodobý príjem flavonoidov v potravinách s ich vysokým obsahom, ako je čokoláda, vedie k zlepšeniu prietokom sprostredkovanej dilatácie v artériách. Okrem toho konštatuje, že príjem čokolády bohatej na flavonoidy redukuje systolický tlak krvi v priemere o 5,8 mm Hg a diastolický tlak krvi o 3,3 mm Hg. V menšej miere ako čokoláda redukuje krvný tlak extrakt sójových proteínov, avšak nie iné sójové komponenty (Hooper a kol., 2008). Rovnako sa v našej štúdii podarilo v modeli experimentálnej hypertenzie inhibovať rozvoj vysokého krvného tlaku po 2-týždňovom podávaní epikatechínu mladým samcom spontánne hypertenzných potkanov (Lukáč a kol., 2015). Táto skutočnosť podporuje dohady odborníkov, že prírodné polyfenoly majú úlohu aj v období rozvoja hypertenzie. Hoci v neskorších štádiách hypertenzie je ich účinok zatiaľ diskutabilný, epikatechín účinne redukoval vysoký tlak krvi a zabránil endotelovej dysfunkcii aj u dospelých spontánne hypertenzných potkanov (Galleano a kol., 2013).

Nežiadúce účinky flavonoidov

Okrem pozitívnych účinkov flavonoidov na kardiovaskulárny systém a pri nádorových ochoreniach je nutné spomenúť aj možné ich negatívne účinky. Riziko nežiadúcich účinkov je pravdepodobne zvýšené v podmienkach užívania iných liekov ako dôsledok liekových interakcií vedúcich k zvýšeniu biodostupnosti užívaných polyfenolov (Lambert a kol., 2007). Tieto výsledky sú však pozorované v experimentálnych modeloch a pri

dávkach vysoko prekračujúcich štandardné množstvo polyfenolov prijímaných potravou, či po ich suplementácii. Išlo hlavne o účinky spojené s gastrointestinálnym traktom pri perorálnom požívaní čierneho čaju, ako je nevoľnosť, nauzea či vracanie (Lambert a kol., 2007). Nežiaduce účinky z ovplyvnenia endotelu ako hypotenzia či hypokoagulácia zatiaľ pozorované neboli.

ZÁVER

Na záver môžeme zhrnúť, že endotel zďaleka nepredstavuje len pasívnu výstelku ciev, ale vysokošpecializovaný orgán, ktorý sa podieľa na regulácii mnohých procesov. Tieto procesy predstavujú reguláciu napätia cievnej steny, prestup molekúl z intravazálneho priestoru a mnohé ďalšie. Vekom a pôsobením rôznych negatívnych agensov dochádza k jeho poškodzovaniu a rozvoju stavu nazývaného endotelová dysfunkcia, pričom dominantnými sa stávajú vazokonstrikčne pôsobiace faktory. Endotelová dysfunkcia potencuje rozvoj rôznych ochorení ciev, akými sú ateroskleróza, ischemická choroba srdca, periférna artériová choroba alebo hypertenzia. Sekundárne tieto ochorenia potencujú ďalšie zmeny v iných orgánoch, ako je napríklad poškodenie obličiek. Ako zvykli hovoriť starí veľikáni medicíny, dôležitejšia ako terapia je prevencia. Preto má nezastupiteľnú úlohu pri prevencii už vyššie spomenutých ochorení ovplyvnenie endotelu v štádiu dysfunkcie. To môžeme dosiahnuť napríklad užívaním rastlinných polyfenolov, z ktorých sú najčastejšie zastúpené v našej strave práve flavonoidy. Z tejto mohutne zastúpenej skupiny prírodných látok sú intenzívne študované hlavne tie, ktoré sú dobre absorbované z tráviaceho traktu a dostupné väčšiemu množstvu ľudí.

Medzi tieto patria katechíny obsiahnuté v čokoláde a čaji. Ich účinok na endotel a jeho funkcie nie je daný len ich antioxidačným účinkom, ale aj aktívnym pôsobením na enzýmové systémy a metabolické dráhy, čoho výsledkom je zlepšenie produkcie a dostupnosti NO, od endotelu závislej vazodilatácie a teda zlepšenie endotelovej funkcie. Konečným výsledkom môže byť pokles krvného tlaku. Požívanie flavonoidov však nie je, tak, ako nič v medicíne, bez možných rizík, ktoré sú dané hlavne ich enormne zvýšenou plazmatickou koncentráciou. V súčasnosti sa pokračuje v skúmaní možnosti ovplyvnenia endotelu a mechanizmov účinku rôznych flavonoidov, ktoré by

nám pomohli pochopiť nielen ich mechanizmus pôsobenia, ale aj odhaliť ďalšie mechanizmy rozvoja hypertenzie.

Literatúra

- Alpoim, N. P., Sousa N. P. L., Mota L. P. A., Rios, A. R. D., Dusse, S. M. L. (2015). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular and renal disease. *Clinica Chimica Acta*, Volume 440. 36–39.
- Baba, S., Natsume, M., Yasuda, A., Nakamura, Y., Tamura, T., Osakabe, N., Kanegae, M., Kondo, K. (2007). Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *Journal of Nutrition*. 137. 1436–1441.
- Beking, K., Vieira, A. (2011). An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. In *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 62, 2011, no. 1, p. 17–19.
- Calderone, V., Chericoni, S., Martinelli, C., Testai, L., Nardi, A., Morelli, I., Breschi, M. C., Martinotti, E. (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedeberg's Archive of Pharmacology*. 370. 290–298.
- Callera, G. E., Tostes, R. C., Yogi, A., Montezano, A. C. I., Touyz, R. M. (2006). Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clinical Science*. 110 (2). 243–253. doi: 10.1042/CS20050307
- Cibulčík, F. (2009). Protidoštičková liečba cievnych mozgových príhod. *Via practica*. 6 (5). 201–204
- Danihelová, M., Šturdík, E. (2011). Flavonoid natural sources and their importance in the human diet. *Potravinárstvo*. Vol 5. N 4. 12–24. doi: 10.1016/j.foodres.2009.11.017.
- Das, M., Das, D. K. (2012). Caveolae, caveolin, and cavin: potential targets for the treatment of cardiac disease. *Annals of Medicine*. 44(6). 530–541. doi: 10.3109/07853890.2011.577445
- Day A. J., Dupont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., Williams, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. In *FEBS Letters*, 436, p. 71–75.
- Duffy, S. J., Keaney, J. F., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., Vita, J. A. (2001). Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 104. 151–156.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D. J., Nakano, T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *Journal of biological chemistry*. 274. 37385–37390.

- Fernández-Murga, L., Tarín, J. J., García-Pérez, M. A., Cano, A. (2011). The impact of chocolate on cardiovascular health. *Maturitas*. 69. 312–321.
- Fox, S. I. (1993). *Human Physiology* 4th. Brown Publishers.
- Furchgott R. F., Zawadzki J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789): 373–376.
- Galleano M, Bernatova I, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Pechanova O, Fraga CG. (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB Life*. 2013; 65(8):710–715. doi: 10.1002/iub.1185.
- Gokce, N., Keaney, J. F., Hunter, L. M., Watkins, M. T., Menzoian, J. O., Vita J. A. (2002). Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 105. 1567–1572.
- Gutiérrez, E., Flammer, A. J., Lerman, L. O., Elízaga, J., Lerman, A., Fernández-Avilés, F. (2013). Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *European Heart Journal*. 34(41): 3175–3181. doi: 10.1093/eurheartj/ehs351.
- Hammer, G. D., McPhee, J. S. (2014). *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, Seventh Edition. Čína: Mc Grow-Hill, 762 s. ISBN 978-0-07-180600-8.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. In *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 10. 572–584.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., Ryder, J. J., Hall, W. L., Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80. 38–50.
- Hulín, I. et al. (2009). *Patofyziológia*, 7. doplnené a prepracované vydanie, SAP, 1228 s, ISBN 97808080950439.
- Javorka, K. et al. (2014). *Lekárska fyziológia*. Martin: Vydavateľstvo Osveta, 770 s. ISBN 978-8-0806-3407-0.
- Jiménez, R., López-Sepúlveda, R., Kadmiri, M., Romero, M., Vera, R., Sánchez, M., Vargas, F., O'Valle, F., Zarzuelo, A., Duenas, M., Santos-Buelga, C., Duarte, J. (2007). Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH-oxidase. *Free Radical Biology & Medicine*. 43. 462–473.
- Karetová, D. (2002). Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína* 2002/3. 119–122.
- Klabunde, E. R. (2011). *Cardiovascular Physiology Concepts*. Čína: Lippincott Williams & Wilkins, 243 s. ISBN: 978-1451113846.
- Lambert, J. D., Sang, S., Yang, Ch. S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. (2007). *Chemical Research in Toxicology*. 20. 583–585.
- Luelmann-Rauch, R. (2012). *Histologie*, 3. vydání. Praha: Grada, 576 s, ISBN: 978-8-0247-3729-4.
- Lukáč, Š., Púzszerová, A., Muchová, J., Bališ, P., Horváthová, M., Deáková, Z., Dvořáková, M., Bernátová, I. (2015). Inhibícia rozvoja spontánnej hypertenzie prírodným polyfenolom - experimentálna štúdia. *Cardiology Letters*. 24 suppl. 1. 23–24.
- Marenčák, J. (2006). Erektlná dysfunkcia – prevencia, diagnostika, liečba. *Via Practica*. roč. 3 (4). 185–189.
- McCullough, M. L., Chevaux, K., Jackson, L., Preston, M., Martinez, G., Schmitz, H.H., Coletti, C., Campos, H., Hollenberg, N.K. (2006). Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 47 Suppl 2. 103–109.
- Meyers, K. E., Sethna, C. (2013). Endothelin antagonists in hypertension and kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 28 (5). 711–720.
- Miller, E. R., Appel, L. J., Risby, T. H. (1998). Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: Results from randomized clinical trial. *Circulation*. 98. 2390–2395.
- Miller, V. M., Komori, K., Burnett, J. C. Jr, Vanhoutte, P. M. (1989). Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *American Journal of Physiology*. 257. 1127–1131.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Ho, C. T. (2010). Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*. 1. 15–31. DOI: 10.1039/C0FO00103A
- Potenza, M. A., Marasciulo, F. L., Tarquinio, M., Tiravanti, E., Colantuono, G., Federici, A., Kim, J. A., Quon, M. J., Montagnani, M. (2007). EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 292. 1378–1387.
- Púzszerová, A., Bernátová, I. (2012). Endotelová funkcia v experimentálnej hypertenzii. *Vaskulárna medicína*. 4(1-2). 28–31.
- Rusznýk, S., Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*. 138. 27.
- Schewe, T., Steffen, Y., Sies, H. (2008). How dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 476. 102–106.
- Steffen, Y., Jung, T., Klotz, L. O., Schewe, T., Grune, T., Sies, H. (2007). Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radical Biology and Medicine*. 42(7). 955–970.
- Šimková, I., Jansa, P. (2007). Nové terapeutické možnosti pľúcnej artériovej hypertenzie.
- Klinická Farmakologie a Farmácie. 2. 32–35
- Škultétyová, D., Riečanský, I., Filipová, S., Škultéty, J. (2004). Prognostický význam hodnotenia endotelovej dysfunkcie. *Kardiológia*. 13(4). 216–219.

- Testai, L. (2015). Flavonoids and mitochondria pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sciences* 135. 68–76. doi: 10.1016/j.lfs.2015.04.017.
- Vidak, M., Rozman, D., Komel, R. (2015). Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. *Molecules* 20(10): 19406–19432. doi: 10.3390/molecules201019406.
- Viskupičová, J., Ondrejovič, M., Šturdík, E. (2008). Bioavailability and metabolism of flavonoids. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 47, 2008, no. 4, p. 151–162.
- Vlachopoulos, Ch., Aznaouridis, K., Alexopoulos, N., Economou, E., Andreadou, I., Stefanidis, Ch. (2005). Effect of Dark Chocolate on Arterial Function in Healthy Individuals. *American Journal of Hypertension*. 18. 785–791. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.12.008.
- Willey, V. (2002). The Role of ACE Inhibitors in Maintaining Proper Blood Pressure. *Pharmacy Times*. Získané 9. 12. 2015 z <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2002/2002-02/2002-02-6830>
- Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Barricarte, A., Ardanaz, E., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larrañaga, N., Martínez, C., Sánchez, M. J., Navarro, C., Chirlaque, M. D., Tormo, M. J., Quirós, J. R., González, C. A. (2010). Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain). *Journal of American Dietetic Association*. 110(3). 390–398. doi: 10.1016/j.jada.2009.11.024.
- Zulueta, A., Caretti, A., Signorelli, P., Ghidoni, R. (2015). Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 21(37). 10636–10643. doi: 10.3748/wjg.v21.i37.10636.

Účinnosť aktivácie vlastných kardioprotektívnych mechanizmov v závislosti od pohlavia a veku

Veronika Ledvényiová-Farkašová, Tatiana Ravingerová

Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
usrdvele@savba.sk

ABSTRAKT

Vek a pohlavie zohrávajú významnú úlohu pri posudzovaní rizika vzniku kardiovaskulárnych ochorení. U mužov je pritom riziko úmrtia na srdcovocievne ochorenia dvakrát vyššie ako u žien rovnakého veku pred menopauzou. Neustále rastie počet klinických a modelových experimentálnych štúdií potvrdzujúcich pohlavné rozdiely v odolnosti srdca voči ischemii nie len v experimentálnych modeloch, ale aj klinických prácach. Jednou z najvýznamnejších signálnych dráh podieľajúcich sa na pohlavných rozdieloch v odolnosti myokardu je kaskáda fosfatidylinozitol 3-kinázy/proteínkinázy B (PI3K/Akt), ktorá zahŕňa množstvo ďalších efektorových molekúl a podieľa sa tak na regulácii mnohých procesov vrátane inhibície apoptózy, regulácie bunkovej proliferácie, metabolismu a hypertrofie. Okrem toho je PI3K/Akt dráha súčasťou signálnych kaskád ischemického preconditioningu (PC), fenoménu, pri ktorom dochádza k aktivácii vlastných vnútrobunkových kardioprotektívnych mechanizmov. Aj napriek intenzívnemu štúdiu PC a jeho využitia ako aktivátora endogénnej kardioprotekcie nie je doposiaľ známe, či existujú pohlavné rozdiely v účinnosti PC. Cieľom práce bolo skúmať vplyv pohlavia na účinnosť endogénnych ochranných mechanizmov v srdci potkana laboratórneho kmeňa Wistar a objasniť úlohu PI3K/Akt kaskády v týchto procesoch. Výsledky práce ukázali zvýšenú odolnosť myokardu samíc voči ischemicko-reperfúznemu (I/R) poškodeniu. Starnutie znížilo toleranciu srdca voči arytmiám, ale neovplyvnilo rozsah letálneho poškodenia nezávisle od pohlavia. Aplikovaný PC poskytoval dostatočný antiinfarktový účinok v srdci oboch pohlaví (výraznejší u samcov), ktorý nebol ovplyvnený vekom. Inhibícia PI3K/Akt dráhy

blokovala antiinfarktový účinok PC v srdci samcov nezávisle na veku. Rovnaký účinok PC sme pozorovali aj v srdci mladších, ale nie starších dospelých samíc. U samcov došlo vplyvom PC k významnému zvýšeniu aktivácie Akt, ktoré nebolo pozorované u samíc. Predpokladáme, že srdce samíc je efektívnejšie chránené už za bazálnych podmienok, pravdepodobne kvôli vyššej aktivácii Akt v porovnaní so samcami. Výsledky našej práce teda potvrdzujú, že PI3K je aktivovaná v srdciach vystavených PC a jej inhibícia blokuje „downstreamovú“ signalizáciu, ako je aktivácia Akt a podporujú významnú úlohu PI3K/Akt signalizácie v kardioprotektívnych mechanizmoch PC, ktorá je ovplyvnená pohlavím.

Kľúčové slová: pohlavie, vek, PI3K, ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu.

ABSTRACT

Age and sex play a significant role in determining the risk of coronary heart disease. In humans, men are twice as likely to die from coronary heart disease as women and premenopausal females have a lower risk of cardiovascular attack than age-matched males. There is growing evidence that there is a sex-specific difference in the susceptibility of the myocardium to ischemia in various experimental models and clinical situations as well. One of the most important signaling pathways involved in sex differences in myocardial resistance to ischemia is phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) cascade with multiple effector molecules that contribute to the regulation of many processes including inhibition of apoptosis, regulation of cell proliferation, metabolism and hypertrophy. Furthermore, PI3K/Akt is a part of signaling

cascades involved in activation of intracellular cardioprotective mechanisms such as phenomenon known as ischemic preconditioning (PC). Despite intensive studies of its role as an activator of endogenous cardioprotection, it is not yet known whether there are sex differences in the efficiency of the PC. The study aimed to examine effect of gender on the efficiency of endogenous protective mechanisms in heart and to clarify an involvement of PI3K/Akt in these processes. Our results showed enhanced tolerance of female hearts to ischemia-reperfusion I/R injury. Aging reduced tolerance to arrhythmias, but did not affect the extent of myocardial infarction. Applied PC provided sufficient anti-infarct protection in the hearts of both sexes (more pronounced in males), which was not affected by age. PI3K/Akt inhibition suppressed anti-infarct effect of PC in the male hearts regardless of age and also in the hearts of younger, but not older adult females. Moreover, similar levels of Akt phosphorylation were found in preconditioned and control female myocardium. Therefore, we assume that female heart is protected more effectively even at the basal conditions, possibly due to higher levels of activated Akt compared to males. The results of our work suggest that PI3K is activated in hearts subjected to PC and its inhibition blocks "downstream" signaling, such as Akt activation and support the important role of PI3K/Akt cascade in cardioprotective mechanisms of PC, which is influenced by sex.

Key words: sex, age, PI3K, myocardial ischemia-reperfusion injury.

ÚVOD

Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) predstavujú jeden z najzávažnejších medicínskych problémov, ktorým ľudstvo v dnešnej dobe čelí. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie práve ochorenia srdcovo-cievneho systému zapríčiňujú celosvetovo najviac úmrtí ročne. Medzi najfrekvencovanejšie patrí ateroskleróza, hypertenzia a s nimi súvisiaca ischemická choroba srdca a infarkt myokardu.

Ženy pred menopauzou majú vo všeobecnosti nižšie riziko vzniku kardiovaskulárnych chorôb. Veľký význam sa v tomto smere prisudzuje najmä pohlavným hormónom. Vplyv pohlavia je badaateľný v mnohých oblastiach ľudského života. Muži a ženy myslia, cítia, vnímajú a vyjadrujú sa odlišne. Výchova hrá síce významnú rolu, ale tieto odliš-

nosti sú ovplyvnené geneticky a hlavne fyziologicky. Muži a ženy sa odlišujú v mnohých aspektoch fyziológie a patofyziológie kardiovaskulárneho systému (KVS). Tento fakt sa premieta v rozdielnej odolnosti srdca na poškodenie, vyvolané rozličnými patofyziologickými procesmi.

Mechanizmy podieľajúce sa na pohlavných rozdieloch z hľadiska odolnosti srdca voči KVO sú však zatiaľ nedostatočne objasnené, a preto sa od vedeckej verejnosti očakáva intenzívny výskum v tejto oblasti. Faktom je, že pohlavie predstavuje významný faktor, ktorý by mal byť zohľadňovaný pri určovaní i posudzovaní mnohých diagnostických a terapeutických postupov v rôznych oblastiach humánnej medicíny, vrátane kardiológie.

Aktiváciou vlastných adaptačných mechanizmov prostredníctvom krátkych stresových stimulov, napr. epizód ischémie a reperfúzie, sa srdce stáva odolnejšie voči následnej dlhšie trvajúcej ischémii. Ide o vysoko účinnú metódu, ktorej presný mechanizmus však nie je úplne jasný. Významnou súčasťou signálnych kaskád preconditioningu sú okrem iného aj reaktívne formy kyslíka (ROS), aktivácia fosfatidylinozitol 3-kinázy (PI3K), ako aj aktivácia „downstream“ efektoru proteínkinázy B (Akt). V dnešnej dobe nie je objasnená ani existencia možných pohlavných rozdielov v aktivácii vlastných adaptačných mechanizmov.

Vplyv pohlavia na kardiovaskulárny systém

Väčšina experimentálnych štúdií zameraných na výskum ischemicko-reperfúzneho (I/R) poškodenia bola v minulosti vykonávaná len na zvieratách samčieho pohlavia bez ohľadu na študovaný druh (Black a Rodger, 1996). Podobný fenomén bolo možné v minulosti vidieť aj pri klinických štúdiách. Zastúpenie žien v randomizovaných klinických štúdiách sa v priebehu času zvýšilo, ale zostáva nízke vo vzťahu k ich celkovému zastúpeniu v populáciách s KVO (Melloni a kol., 2010). Aj napriek tomu, vo viacerých experimentálnych (Douglas a kol., 1998; Jain a kol., 2002) i klinických štúdiách (Carroll a kol., 1992; Hayward a kol., 2000) bol preukázaný významný vplyv pohlavia na patologické zmeny v KVS (Ošťádal a Kolář, 1999). V porovnaní s mužmi rovnakého veku je u žien pred menopauzou nižší výskyt hypertrofie ľavej komory, ochorení koronárnych artérií (Hayward a kol., 2000) i remodelácie srdcového tkaniva po infarkte myokardu (Crabbe a kol., 2003).

Na druhej strane, keď sa ochorenie už rozvinie, ženská populácia vykazuje vyššiu úmrtnosť ako mužská. Tento fakt môže čiastočne súvisieť aj s neskorším začiatkom liečby v neprospech žien, ktoré vnímajú bolesť inak ako muži a podceňujú prvé symptómy (Marrugat, 1998). V posledných rokoch stúpa povedomie o význame pohlavných rozdielov pri štúdiu porúch KVS, a narastá tak aj počet prác zaoberajúcich sa touto problematikou.

Ako už bolo spomenuté, ženy pred menopauzou majú relatívne nízke riziko výskytu KVO (Gordon a kol., 1978). Po menopauze toto riziko narastá takmer dvojnásobne a KVO stávajú najčastejšou príčinou úmrtia žien staršieho veku. Takéto výsledky naznačujú, že znížené hladiny estrogénov v dôsledku menopauzy, sú zodpovedné za zvýšený výskyt KVO, a estrogény preto zohrávajú pozitívnu úlohu v prevencii KVO. Najväčší význam v ochrane KVS žien je spojený s pozitívnym účinkom endogénneho estrogénu na lipidové zloženie a endotelovú funkciu (Murphy a Steenbergen, 2007).

Napriek pozitívnym účinkom podávania exogénnych estrogénov na odolnosť KVS voči patologickým zmenám, ktoré boli ukázané vo viacerých experimentálnych štúdiách (Kim a kol., 1996; Booth a kol., 2003) a v klinických štúdiách (Women's Health Initiative-WHI; Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study-HERS) (Hulley a kol., 1998; Rossouw a kol., 2002) sa nepodarilo preukázať prospešnosť náhradnej hormonálnej terapie v prevencii rozvoja primárnych a sekundárnych ochorení koronárnych artérií u pacientok po menopauze. Na druhej strane výsledky starších klinických štúdií ukazovali, že hormonálna terapia nasadená pred 60 rokmi života môže redukovať riziko akútneho infarktu myokardu u žien (Falkeborn a kol., 1992; Grodstein a kol., 2000).

Pohlavné rozdiely z hľadiska zlyhania srdca

Zlyhanie srdca, hlavná príčina úmrtí pacientov s KVO najmä v staršiej populácii, predstavuje komplexný klinický syndróm, ktorý môže byť dôsledkom akejkoľvek poruchy srdcovej funkcie. Zlyhanie srdca postihuje obe pohlavia s mierne väčšou proporciou u mužov (Mehta a Cowie, 2006). Zlyhanie srdca charakteristické redukovanou ejekčnou frakciou sa vyskytuje častejšie u mužov a je primárne spojené s ochoreniami koronárnych ciev, zatiaľ čo zlyhanie srdca so zachovanou

ejekčnou frakciou sa častejšie vyskytuje u žien a je menej bežne spojené s ischémiou (Lee a kol., 2009; Scantlebury a Borlaug, 2011). V prípade mužov však dochádza k rozvoju srdcového zlyhania v skoršom veku ako u žien (Mayer a kol., 2014). Z rizikových faktorov srdcového zlyhania je v niektorých populáciách u žien zvýšený výskyt hypertenzie, obezity, chronických ochorení obličiek a komorových fibrilácií, zatiaľ čo v prípade mužov je to infarkt myokardu, chronická obštrukčná choroba pľúc a periférna arteriopatia (Conde-Martel a kol., 2015). Spomedzi všetkých rizikových faktorov len komorové fibrilácie špecificky zvyšujú riziko zlyhania srdca u žien a ženské pohlavie je teda významný nezávislý prediktor (Mayer a kol., 2014). Riziko zlyhania srdca je pritom porovnateľné bez ohľadu na pohlavie do veku 55 rokov. Medzi 55 až 64 rokom sú muži až dvojnásobne náchylnejší na zlyhanie srdca v porovnaní so ženami. V populácii nad 65 rokov je riziko zlyhania srdca medzi mužmi a ženami opäť porovnateľné (Sussman, 2003).

Vplyv pohlavia na vznik arytmií

Jednoznačný vplyv pohlavia bol preukázaný pri vyšetrení rôznych elektrofyziológických parametrov srdca. Pohlavné rozdiely existujú napr. v dĺžke trvania QT intervalu a akčného potenciálu (Burke a kol., 1997; Saba a kol., 2002). Podobné rozdiely boli pozorované aj vo výskyte rôznych závažných foriem ischemických arytmií, ako sú extrasystoly (PVC), komorové tachykardie (VT) a komorové fibrilácie (VF) (Philp a kol., 2006). Medzi mechanizmy zodpovedné za pohlavné rozdiely z hľadiska elektrofyziológických parametrov, ovplyvňujúce i predispozíciu k vzniku arytmií, môžeme zaradiť rozdiely v expresii a funkcii iónových kanálov (Katsube a kol., 1998), ako aj odlišnosti v aktivácii autonómneho nervového systému (Burke a kol., 1997; Airaksinen a kol., 1998).

Taktiež aj v experimentálnych štúdiách bola preukázaná regulácia otvárania iónových kanálov samičími pohlavnými hormónmi, čo výrazne prispieva k pohlavným rozdielom z hľadiska rizika vzniku srdcových arytmií. Estrogény, môžu redukovať výskyt arytmií priamo, a to prostredníctvom účinku 17β estradiolu (E_2) ako blokátora Ca^{2+} kanálov L-typu (Jiang a kol., 1992). Estrogény taktiež ovplyvňujú dĺžku trvania repolarizácie membrány kardiomyocytov srdcových komôr a vznik ischemických arytmií nielen prostredníctvom zmeny exprese, ale aj ovplyvnením otvárania napätovo

závislých pomaly aktivovaných K^+ kanálov Kv1.5 (Trepanier-Boulay, 2001). Progesterón a E2 skrátujú čas repolarizácie kardiomyocytov vďaka regulácii otvárania Ca^{2+} kanálov L-typu a pomaly aktivovaných K^+ kanálov Kv1.5. Táto regulácia prebieha negenómovou dráhou zahŕňajúcou postupnú aktiváciu c-Src, PI3K, Akt a endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Oxid dusnatý (NO) ako výsledný produkt inhibuje Ca^{2+} kanály L-typu a prostredníctvom S-nitrozilácie proteínov kanála podporuje otváranie K^+ kanálov (Furukawa a Kurokawa, 2008). Ovariálne hormóny zohrávajú významnú úlohu aj v regulácii vstupu Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula (SR) kardiomyocytov. Zníženie množstva Ca^{2+} v SR tak vedie k obmedzeniu I/R poškodenia (Mitchell a kol., 1993; Zucchi a kol., 2001). Okrem toho akútne podávanie E2 znižuje výskyt PVC, komorových tachykardií a fibrilácií u potkanov (Philp, 2006) i psov (Node a kol., 1997). Tento antiarytmický efekt E2 je závislý na dávke, pričom u samíc je potrebná desaťnásobne menšia koncentrácia E2 na dosiahnutie rovnakého účinku ako u samcov potkana. Tento efekt je spojený s blokádou Ca^{2+} kanálov (Philp, 2006) a môže byť sprostredkovaný i otváraním K^+ kanálov (Node a kol., 1997).

VÝZNAM ESTROGÉNOV V KARDIOPROTEKЦИИ

Estrogény ovplyvňujú KVS priamymi účinkami na bunky cievneho systému alebo prostredníctvom nepriamych systémových účinkov. Vplyvom estrogénov môže dôjsť k zmene v syntéze proteínov alebo aktivite viacerých iónových kanálov, kontraktilných proteínov a v produkcii ROS. Spomenuté účinky estrogénov zohrávajú úlohu aj pri niektorých chorobných stavov KVS. Reguláciou početnosti a aktivity niektorých iónových kanálov a transportérov sa estrogény podieľajú aj na modulácii srdcovej repolarizácie, kontraktility a citlivosti voči arytmiám (Saito a kol., 2009). Boli zaznamenané aj pohlavné rozdiely v počte Ca^{2+} a Na^+ kanálov, ktoré sú aspoň čiastočne pripisované estrogénom, keďže ich vplyvom dochádza k „upregulácii“ $Na^+ - Ca^{2+}$ výmenníka (Chen a kol., 2011) a „downregulácii“ L-typu Ca^{2+} kanálov (Johnson a kol., 1997). Známe sú aj pozitívne účinky estrogénov na funkciu cievneho systému, redukciu aterosklerózy, ako aj dôležitá úloha estrogénov v udržiavaní zdravého ako aj v reparácii poškodeného endotelu ciev (Adams a kol., 1990). Tento proces zahŕňa estrogénom sprostredkované zvýšenie aktivity eNOS

a enzýmu cyklooxygenázy (Mendelsohn a Karas, 2005), čo prispieva k zlepšeniu cievnej relaxácie. Estrogén tiež inhibuje I/R-indukovanú apoptózu kardiomyocytov vytváraním bazálneho antiapoptického profilu, čo je spojené s expresiou „caspase recruitment domain“ (ARC) (Bouma a kol., 2010). Dokázané boli i pozitívne účinky estrogénov pri spomaľovaní procesu hypertrofie srdca inhibíciou fosforylácie mitogénmi aktivovanej proteínkinázy (MAPK) p38 (van Eickels a kol., 2001). Okrem toho estrogén „downreguluje“ aktivitu renin-angiotenzínového systému v cievach normotenzných i hypertenzných potkanov (Nickenig a kol., 1998) a taktiež môže zvýšiť expresiu atriálneho natriuretického peptidu (Potvin a Varma, 1991). Aj prostredníctvom týchto účinkov môže estrogén potláčať hypertrofiu myokardu.

Estrogénové receptory

Estrogény uplatňujú svoj komplexný biologický efekt najmä prostredníctvom jadrových estrogénových receptorov (ER): ER- α a ER- β (Kuiper a kol., 1997; Nilsson a Gustafsson, 2002), ktoré sa odlišujú svojou distribúciou v tkanivách a tiež rozdielnou špecifitou, s akou viažu ligand (Kuiper a kol., 1997). Oba typy ER sú exprimované v endoteli ciev i v myokarde človeka (Karas a kol., 1994; Grohe, 1997), čo indikuje priamy vplyv estrogénov na srdce. Estrogénové receptory- β sú predominantnými receptormi v myokarde a teda hrajú dôležitú úlohu pri sprostredkovaní účinku estrogénov v tomto orgáne. Schopnosť ER- β reagovať zvýšenou expresiou na 17β -estradiol (E2) je totiž v porovnaní s ER- α v kardiomyocytoch výrazne vyššia (Nuedling a kol., 1999).

V srdci pôsobí aktivácia ER- β kardioprotektívne, čo sa prejavuje lepšou funkčnou obnovou myokardu po I/R (Nikolic a kol., 2007) a zmenšením veľkosti infarktového ložiska (Lin a kol., 2009) v porovnaní s neliečenou skupinou. Na druhej strane ER- α zohrávajú rozhodujúcu úlohu v endotelových bunkách ciev, kde sprostredkujú E2 indukovanú prevenciu endotelovej dysfunkcie po I/R poškodení (Favre a kol., 2010). Okrem väzby na ER- α a ER- β sa estrogén podieľa aj na steroidnej signalizácii iniciovanej na plazmatickej membráne prostredníctvom estrogénových receptorov spojených s G proteínom (GPER/GPR30) (Filardo a Thomas, 2005). Aktiváciou GPER dochádza k mobilizácii intracelulárneho Ca^{2+} (Revankar, 2005), k transaktivácii receptora pre epidermálny rastový faktor

(Filardo a Thomas, 2005), ako aj k inhibícii otvárania mitochondriálneho póru prechodne zvyšujúceho permeabilitu (mPTP) (Bopassa a kol., 2010). Estrogény sa môžu viazať aj na iné vnútrobunkové signálne molekuly a indukovať tak rýchly účinok aktiváciou signálnej kaskády, ktorá zahŕňa PI3K, Akt, extracelulárnym signálom regulované kinázy (ERK) 1/2, c-Jun N-terminálne kinázy (JNK) a p38 MAPK (Simonici a kol., 2000; Wang a kol., 2009).

MOLEKULÁRNE MECHANIZMY POHLAVNÝCH ROZDIELOV V ODOLNOSTI KARDIOVASKULÁRNEHO SYSTÉMU

Úloha fosfatidylinositol 3-kinázy a jej cieľových molekúl v kardioprotekcii

Fosfatidylinositol 3-kinázy predstavujú rodinu evolučne konzervovaných lipidových kináz, ktoré sprostredkujú množstvo bunkových reakcií rovnako vo fyziologických, ako aj v patofyziologických podmienkach. Fosfatidylinositol 3-kináza môže byť aktivovaná receptormi s tyrozínovou/cytokínovou aktivitou (trieda I_A) (Foster a kol., 2003), alebo receptormi spojenými s G proteínmi (trieda I_B) (Oudit a kol., 2003; Brock a kol., 2003).

Fosfatidylinositol 3-kináza je exprimovaná v kardiomyocytoch, fibroblastoch, endotelových bunkách a hladkých svalových bunkách ciev, kde ovplyvňuje bunkové prežitie/apoptózu, hypertrofiu, kontraktilitu a metabolizmus. Signálne dráhy zahŕňajúce PI3K sú obsiahnuté v patogenéze mnohých ochorení KVS vrátane hypertrofie srdca, srdcového zlyhania a hypertenzie, významné sú však aj v procesoch aktivácie endogénnej kardioprotekcie ako je preconditioning (Oudit a kol., 2004).

Aktivovaná PI3K produkuje fosfatidylinositolové zvyšky a následne dochádza k aktivácii fosfoinositol-závislej kinázy-1 (PDK1), Akt (Dimmeler a kol., 1999) a mnohých izoforiem proteínkinázy C (PKC) (Tong a kol., 2000), ktoré môžu aktivovať viacero „downstreamových“ cieľových molekúl vrátane NOS (Dimmeler a kol., 1999) a mnohých antiapoptotických mechanizmov (Datta a kol., 1999).

Proteínkináza B, ako jeden z najvýznamnejších efektorov PI3K, je exprimovaná v srdci (Crackower a kol., 2002), hladkých svalových bunkách ciev (Huang a Kontos, 2002) a v endotelových bunkách (Kim a kol., 2000). Dráha PI3K/Akt sa podieľa na

regulácii mnohých procesov v cicavčích bunkách prostredníctvom fosforylácie rozličných substrátov vrátane kinázy glykogén syntázy-3 (GSK-3) (metabolizmus glykogénu a proteínov), apoptotických proteínov (BAX, BAD, BIM, p53 a kaspáz), vezikul glukózového transportéra GLUT4 (metabolizmus glukózy), transkripčných faktorov, p70S6K, eNOS a PKC (Cross a kol., 2000). Bolo taktiež preukázané, že rastový faktor podobný inzulínu-1 (IGF-1) sprostredkuje kardioprotekciu v závislosti od aktívacie PI3K/Akt kaskády (Fujio a kol., 2000).

Pohlavné rozdiely v aktivite vybraných molekúl regulovaných fosfatidylinositol 3-kinázou

Mladé ženy majú v myokardiálnych bunkách vyššie hladiny aktivovanej (fosforylovanej) Akt (p-Akt) ako muži porovnateľného veku a ženy pomenopauze (Camper-Kirby a kol., 2001). Podobne aj kardiomyocyty sexuálne dospelých samíc myší vykazujú vyššie hladiny p-Akt (Camper-Kirby a kol., 2001; Bae a Zhang, 2005), ako aj aktivovanej (fosforylovanej) PKC (p-PKC) (Bae a Zhang, 2005). Pritom neboli zaznamenané žiadne pohlavné rozdiely v celkových hladinách Akt a PKC. Inhibícia PI3K/Akt dráhy vedie v myokarde samíc k zhoršeniu I/R poškodenia. V srdci samcov tento efekt nebol pozorovaný, čo poukazuje na významnejšiu úlohu PI3K/Akt dráhy v kardioprotekcii u samíc. Pohlavné rozdiely v aktivite Akt môžu byť čiastočne vysvetlené vplyvom estrogénov, keďže v kardiomyocytoch samíc s odstránenými ováriami sú hladiny p-Akt (Ren a kol., 2003) a celkovej PKCepsilon (PKCε) (Novotny a kol., 2009) znížené.

Endotelová NOS predstavuje jednu z cieľových molekúl Akt (Dimmeler a kol., 1999). Farmakologickou inhibíciou PI3K bolo dokázané, že estradiol (ER-α) aktivuje eNOS prostredníctvom PI3K/Akt dráhy, čo vedie k zvýšeniu produkcie NO v endotelových bunkách (Haynes a kol., 2000). NO produkováný eNOS v endotelových bunkách cievneho systému indukuje vazodilatáciu hladkých svalových buniek ciev (Furchgott a Zawadzki, 1980), okrem toho reguluje interakcie medzi leukocyty a endotelovými bunkami (Kubes a kol., 1991), inhibuje adhéziu a agregáciu trombocytov (Mellion a kol., 1981) a tlmí proliferáciu hladkých svalových buniek (Ignarro a kol., 2001). Spomenuté účinky NO majú pozitívny vplyv na KVS ako celok a podieľajú sa tak aj na kardioprotekcii. ER-α taktiež priamo interagujú s p85 regulačnou podjednotkou PI3K,

a preto môžu priamo ovplyvňovať túto signálnu dráhu (Simonici a kol., 2000).

Podobne, ako v prípade Akt, aj neselektívna inhibícia PKC zapríčiňuje zhoršenie postischemickej obnovy funkcie ľavej komory (LV) a zväčšenie infarktu myokardu u samíc, ale nie samcov potkana v porovnaní s kontrolnými zvieratami (Bae a Zhang, 2005). V porovnaní s neselektívnou inhibíciou PKC, dochádza pri selektívnej inhibícii PKC ϵ k výraznému zhoršeniu I/R poškodenia v srdci samcov, čo naznačuje, že kardioprotektívny efekt sprostredkovaný PKC je pravdepodobne izoenzymovo závislý a neselektívna inhibícia vedie k potlačeniu rôznych izoform PKC s protichodným účinkom v kardioprotekcii. Navyše, zvýšená aktivita PKC ϵ zohráva dôležitú úlohu v pohlavných rozdieloch v kardioprotekcii, keďže v srdci samíc sú prítomné vyššie hladiny p-PKC ϵ ako u samcov (Bae a Zhang, 2005).

ENDOGENNÉ OCHRANNÉ MECHANIZMY V SRDCI

Ischemický preconditioning

Vystavenie krátkym epizodám ischemie poskytuje srdcu ochranu voči nasledujúcej predĺženej perióde ischemie. Tento jav, známy ako ischemický preconditioning (PC), redukuje poškodenie vyvolané pretrvávajúcou ischemiou, čo sa prejavuje zmiernením rozsahu nekrotických zmien (Murry a kol., 1986), zlepšením funkčnej obnovy srdca po ischemii (Cave a Hearse, 1992; Abete a kol. 2002), zníženým výskytom ischemických (Végh a kol., 1992) a reperfúzných (Shiki a Hearse, 1987) arytmií a zníženou expresiou prozápalových cytokínov (Wang a kol., 2005). Dôkazom protektívneho účinku aplikácie PC je aj znížené uvoľňovanie kreatínkinázy a laktátdehydrogenázy do koronárneho efluentu (čo naznačuje menšie poškodenie buniek) (Parratt a Vegh, 1994).

Molekulárne mechanizmy ischemického preconditioningu

Kardioprotekcia indukovaná PC je receptorovo závislý proces. Vo včasnej fáze PC hrá dôležitú úlohu stimulácia receptorov spriahnutých s Gi/q proteínmi (adenozínové A1/A3, bradykinínové B2, opioidné, α 1-adrenergické a muskarínové M1 receptory) pomocou príslušných agonistov alebo aktivácia receptorov s tyrozínkinázovou aktivitou prostredníctvom ich ligandov, vrátane rastových faktorov a hormónov (inzulín). Úlohu v PC zohráva

aj zvýšená produkcia voľných radikálov, zvýšená aktivita eNOS a biologická aktivita NO (Ravingerová a kol., 1999).

Úvodným spúšťačom pôsobiacim počas krátkych epizód ischemie a reperfúzie môže byť adenosín, najmä prostredníctvom interakcie s A1 receptormi (Liu a kol., 1991). Ich aktivácia vykazuje antidysrhythmický účinok (Wainwright a Parratt, 1993), ktorý je však pravdepodobne druhovo špecifický. Ďalším spúšťačom je bradykinín s výrazným antiarytmickým účinkom (Coker a McGrath, 1985), ďalej medzi spúšťače patria aj mierny nárast Ca²⁺ v cytosóle, noradrenalin, NO, voľné radikály, stresové proteíny a endotelín (Ošťádal a Kolář, 1999).

Aktivácia vnútrobunkových kinázových kaskád je považovaná za hlavný proces v mechanizmoch prenosu signálu, ktoré sprostredkujú protektívny efekt PC (Yellon a Downey, 2003). V procese PC (počas reperfúzie) dochádza k aktivácii PI3K/Akt a ERK1/2 signálnych dráh (Hausenloy a kol., 2004). Medzi enzymové mediátory kaskády PC vyúsťujúcej do kardioprotekcie patria PKC, tyrozínkináza a MAPK (Maulik a kol., 1996). Proteínkináza C sprostredkuje protektívny účinok PC aktiváciou mitochondriálnych K_{ATP} kanálov (Speechly-Dick a kol., 1994). Okrem toho, Nishikawa a kol. (2002) vo svojej štúdii dokázali, že aj superoxidové ióny mitochondriálneho pôvodu môžu byť dôležitým aktivátorom PKC. Úloha tzv. „stresových“ kináz p38-MAPK a JNK (subfamília MAPK) v odpovedi myokardu na ischemiu je stále považovaná za kontroverznú. Aj napriek tomu mnohé práce poukazujú na ich možný priaznivý efekt v kardioprotekcii vyvolanej PC (Maulik a kol., 1996; Mocanu a kol., 2000).

Významným enzymovým signálnym systémom, ktorý je zapojený do normálnych fyziologických procesov rastu a prežitia bunky, metabolickej kontroly, ale aj protekcie vyvolanej preconditioningom, je PI3K a jej „downstreamový“ efektor Akt (Krieg a kol., 2004). Aktivovaná PI3K/Akt aktivuje PKC a zohráva dôležitú úlohu v sprostredkovaní antiapoptotického efektu PC. Nasledujúca fosforylácia proteínov vedie buď k inhibícii proapoptickej dráhy, alebo k aktivácii viacerých antiapoptotických signálnych mechanizmov (Murphy, 2004).

Mechanizmy kardioprotektívneho účinku ischemického preconditioningu v srdci samíc

V prípade samíc sú to práve pohlavné hormóny, najmä estrogény, ktoré zohrávajú významnú

úlohu v citlivosti a odolnosti srdca voči ischémii. Podobne aj v prípade kardioprotektívneho účinku PC u samíc nemožno opomenúť prítomnosť a nezanedbateľný vplyv estrogénov. Medzi mechanizmy zodpovedné za kardioprotektívne účinky PC v srdci samíc môžeme zahrnúť aktivitu PI3K/Akt, eNOS (Wang a kol., 2006) a rôznych izoform PKC (Sovershaev a kol., 2006).

Existuje len málo štúdií pojednávajúcich o úlohe estrogénov v sprostredkovaní efektu PC (Song a kol., 2003; Peng a kol., 2004; Shinmura a kol., 2008). Chronický deficit estrogénov má negatívny vplyv na ochranný účinok PC v srdci samíc. U samíc s odstránenými ováriami dochádza k oslabeniu pozitívneho vplyvu PC na obnovu postischemickej funkcie LV (Peng a kol., 2004) a na rozsah letálneho poškodenia (Song a kol., 2003). V podmienkach chronického nedostatku estrogénov môže dochádzať k narušeniu kardioprotektívneho účinku PC v dôsledku zlyhania mechanizmu translokácie PKC ϵ z cytosólovej do membránovej frakcie a oslabenia jej fosforylácie (Shinmura a kol., 2008). Nedostatok estrogénov môže taktiež zapríčiniť dysfunkciu PKC ϵ aj v dôsledku zníženia aktivity PI3K/PDK1/Akt signálnej dráhy. Okrem klasického PC môže signálna dráha PI3K/Akt fungovať aj ako mediátor alebo spúšťač kardioprotekcie sprostredkovanej farmakologickým preconditioningom (podávaním sírovodíka) (Hu a kol., 2008). Podobne aj preconditioning vyvolaný podávaním E2 indukuje fosforyláciu Akt, PKC α a PKC ϵ a membránovú translokáciu PKC ϵ a PKC δ (Sovershaev a kol., 2006).

Ako už bolo spomenuté, viaceré štúdie potvrdili zvýšenú odolnosť srdca samíc voči I/R poškodeniu. Napriek tomuto významnému poznatku nie je zatiaľ jednoznačne dokázané, či existujú pohlavné rozdiely aj z hľadiska odolnosti srdca voči I/R poškodeniu myokardu vystavenému PC. Okrem toho, efekt PC môže byť ovplyvnený nielen pohlavím, ale aj vekom (Turcato a kol., 2006). Z malého počtu štúdií zaoberajúcich sa vplyvom pohlavia na účinky PC len niektoré poukazujú na protektívny efekt PC voči I/R poškodeniu v srdci samíc. Vzostup rezistencie myokardu samíc zahŕňa vyššie spomenutý znížený výskyt arytmií (Humphreys a kol., 1999), vylepšenie funkčnej obnovy srdca a redukciu nekrózy (Turcato a kol., 2006).

Na druhej strane, výsledky autorov Song a kol. (2003) a Wang a kol. (2006) poukazujú na neutrálny účinok preconditioningu v srdci samíc. Tieto výsledky potvrdili existenciu pohlavných rozdielov z hľadiska účinnosti preconditioningu, keďže

kardioprotektívny efekt PC dokázali iba v prípade samcov.

Okrem toho je pravdepodobné, že účinok PC nie je závislý len od pohlavia, ale aj od veku, keďže protokol PC s 3-minútovou úvodnou ischémiou nevyvolal zlepšenie postischemickej funkčnej obnovy myokardu ani zmenšenie infarktu u 10-týždňových samíc (Song kol., 2003; Turcato a kol., 2006), ale výrazne zlepšil funkčnú obnovu a zmenšil infarkt myokardu u starších (18-týždňových) samíc. Na druhej strane, v prípade samcov PC zlepšil postischemickú obnovu myokardu oboch vekových skupín (Turcato a kol., 2006).

Druhé okno kardioprotekcie

Okno protekcie poskytnuté PC je krátke. Ochrana sa stráca do 2 hodín u väčšiny experimentálnych modelov. Známe je aj tzv. druhé okno protekcie (oneskorený PC), ktoré sa objavuje 24 hodín po iniciálnej ischémii a môže pretrvať 2 až 3 dni (Baxter a kol., 1995).

Ako už bolo spomenuté, počas krátkej ischémie uvoľňuje srdce množstvo látok ako sú adenosín, katecholamíny, angiotenzín II, NO, bradykinín a endotelín. Všetky tieto látky sa môžu viazať na receptory kardiomyocytov a tým naštartovať signálne dráhy, ktoré vyvrcholia fosforyláciou efektorových proteínov, ktoré napokon poskytnú kardiomyocytom ochranu voči neskoršej predĺženej ischémii (Przyklenk a Kloner, 1998). Na rozdiel od akútnej kardioprotekcie, ochranný účinok PC, ktorý sa objavuje neskôr, je vo väčšej miere závislý na aktivite NO, NOS, „heat-shock“ proteínov, superoxiddismutázy a indukcie cytokínov. Bolli a kol. (1998) ukázali, že NO dokonca zohráva dve rozličné úlohy v oneskorenom PC. V iniciálnej fáze dochádza k stimulácii eNOS-závislej tvorby NO, ktorý slúži ako spúšťač molekulárnej kaskády (PKC ϵ , nukleárny faktor kappaB a iné) zavŕšenej aktiváciou iNOS a produkciou NO v neskoršej fáze, ktorý sprostredkuje ochranu voči ischémii.

VÝSKUMNÉ CIELE

Výskum vplyvu pohlavia na účinnosť endogénnych ochranných mechanizmov v srdci

Naším zámerom bolo porovnať účinnosť ischemického preconditioningu v myokarde v závislosti od pohlavia v dvoch vekových skupinách. Cieľom

bolo taktiež zistiť, či aktivácia PI3K kaskády hrá rovnako dôležitú úlohu v ochrane indukovanej PC v srdci mladších a starších dospelých samcov a samíc potkana.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá

V práci sme použili samce a samice potkana laboratórneho kmeňa *Wistar* vo veku 12 (mladé dospelé) a 18 (staršie dospelé) týždňov. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach s konštantným svetelným režimom 12L : 12D (zapnutie svetla o 06:00) a teplotou (22 ± 2) °C s prístupom k potrave a vode *ad libitum*. Vekové skupiny 12- a 18-týždňových zvierat sme vybrali na základe štúdie autorov Turcato a kol. (2006), v ktorej bola preukázaná výrazne lepšia obnova ľavokomorového vyvinutého tlaku (LVDP) v srdci 10-, ako aj 18-týždňových samíc v porovnaní so samcami. Autori taktiež poukázali na závislosť kardioprotekcie navodenej PC od pohlavia a veku zvierat. Naším cieľom bolo objasniť, či tak malý vekový rozdiel môže mať vplyv na citlivosť srdca potkana voči ischemicko-reperfúznemu poškodeniu. Všetky procedúry boli schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (Ochrana zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely).

Perfúzna technika

Použitá perfúzna technika bola popísaná v predchádzajúcej práci (Ravingerová a kol. 2009). V krátkosti, potkany boli anestetizované intra-peritoneálne podanou injekciou pentobarbitalu (60 mg/kg hmotnosti) spolu s heparínom (500 IU). Srdcia boli následne vypreparované, kanylované cez aortu a perfundované podľa Langendorffa pri konštantnom perfúznom tlaku 73 mm Hg (1 mm Hg = 133,322 Pa) a teplote 37 °C. Ako perfúzne médium bol použitý modifikovaný Krebs-Henseleitov roztok nasycovaný zmesou 95 % O₂ and 5 % CO₂ (pH 7,4), ktorý obsahoval: (v mM): NaCl, 118,0; KCl, 3,2; MgSO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; KH₂PO₄, 1,18; CaCl₂, 2,5; glukóza, 7,0. Epikardiálny elektrogram bol zaznamenávaný pomocou dvoch elektród pripojených na apex srdca a aortálnu kanylu. Ľavokomorový tlak (LV) bol zaznamenávaný prostredníctvom neelastického balónika plneného vodou umiestneného do dutiny LV (balónik bol

nafukovaný pre dosiahnutie koncového diastolického tlaku 5 – 7 mm Hg) a napojeného na tlakový snímač (MLP844, ADInstruments, Nemecko). LV systolický (LVSP), koncový diastolický (LVDiP) a vyvinutý tlak (LVDP; systolický mínus diastolický tlak), srdcová frekvencia (HR) a koronárny prietok boli monitorované počas celej doby trvania experimentu. Srdcia boli stabilizované po dobu 15 až 20 min. pred ďalšími zásahmi.

Experimentálne protokoly

V kontrolnej skupine (C), po úvodnej stabilizácii a ďalšej 15 min. perfúzii boli srdcia vystavené 30 min. trvajúcej regionálnej ischemii (RI) indukovanej oklúziou ľavej prednej zostupnej vetvy (LAD) koronárnej artérie (pre hodnotenie ischemiou-indukovaných komorových arytmií), po ktorej nasledovala 2 h reperfúzia pre stanovenie veľkosti infarktového ložiska (IS). V skupinách s PC boli srdcia po stabilizácii vystavené 5 min. RI a 5 min. reperfúzii a následnej 30 min. RI a 2 h reperfúzii. V skupinách ovplyvnených wortmanninom (Sigma) (W; W+PC) boli srdcia s PC aj bez PC po stabilizácii perfundované roztokom wortmanninu (100 nM) rozpustenom v DMSO (Sigma; < 0,01 %) 15 min pred ischemiou. Ďalej nasledoval rovnaký protokol spomenutý vyššie. Dávkovanie wortmanninu bolo stanovené na základe predchádzajúcich štúdií, kde daná koncentrácia nielen potlačila antiinfarktový účinok PC (Matejčíková a kol. 2009; Ravingerová a kol. 2009), ale tiež blokovala PC-indukovanú aktiváciu (fosforyláciu) Akt pred dlhotrvajúcou ischemiou (Mocanu a kol. 2002).

Hodnotenie veľkosti infarktového ložiska

Veľkosť rizikovej oblasti (AR), oblasti infarktového tkaniva (IS) a oblasti prežívajúceho tkaniva (LT) bola vizualizovaná dvojistou metódou farbenia s 5 % manganistanom draselným rozpusteným vo vode a 1 % roztokom 2,3,5-trifenyltetrazólium chloridu (TTC) rozpusteným v 0,1 M fosfátovom pufrí (pH 7,4). Následne boli srdcia cez noc fixované v 10 % formaldehyde a potom nakrájané na 1 mm hrubé priečne rezy, z ktorých bola oddelená pravá komora a veľkosti jednotlivých oblastí LV (AR, IS, LT) boli stanovené pomocou počítačovej planimetrie. Veľkosť IS je vyjadrená ako percento z AR a AR je vyjadrená ako percento z celkového objemu LV.

Kvantifikácia arytmií

Komorové arytmie sme zaznamenávali kontinuálne počas ischémie a analyzované podľa Lambethskej konvencie (Walker et al. 1988). Zamerali sme sa na ektopickú aktivitu, vyjadrenú ako celkový počet extrasystol (PVC) počas 30 min RI a výskyt komorových tachykardií (VT – definovanej ako štyri a viac za sebou nasledujúce ektopické úder), charakterizovaný ako celkový počet epizód VT (VTE) a trvanie VT (VTD).

Odoberanie a homogenizácia vzoriek

Vzorky tkaniva použité na Western blot analýzu boli odobrané z LV všetkých použitých experimentálnych skupín. Tkanivo bolo rozotreté v tekutom dusíku, rozsuspendované v ľadovom roztoku A (mM: 20 Tris-HCl, 250 sacharóza, 1,0 EGTA, 1,0 DTT, 1,0 PMSF a 0,5 ortovanád sodný, pH 7.4) a zhomogenizované. Homogenáty boli následne zcentrifugované 5 min pri 4 °C a 800 g. Supernatant bol opätovne zcentrifugovaný 30 min pri 4 °C a 16 100 g. Supernatanty po druhej centrifugácii (solubilná frakcia) boli použité na ďalšiu analýzu.

Elektroforéza a Western blot analýza

Vzorky proteínových frakcií obsahujúce ekvivalentné množstvo proteínov (80 µg na dráhu) boli elektroforeticky (SDS-PAGE) rozdelené na základe svojej molekulovej hmotnosti. Špecifické protilátky anti-Akt kináza (Santa Cruz Biotechnology) a anti-phospho-Akt kináza (Cell Signaling Technology) boli použité na primárnu imunodetekciu. Peroxidázou značený anti-rabbit imunoglobulín (Cell Signaling Technology) bol použitý ako sekundárna protilátka. Naviazané protilátky boli detegované ECL metódou a optická denzita jednotlivých

bandov bola analyzovaná softvérom PCBAS 2,08e a normalizovaná na GAPDH (anti-GAPDH protilátka ako interná kontrola). Výsledky boli vyjadrené v arbitrárnych jednotkách (a.u.).

Štatistická analýza

Výsledky sú prezentované ako priemerné hodnoty $\pm$ stredná chyba priemeru (SEM). Štatistické vyhodnotenie bolo vkonané pomocou softwaru GrafPad Prism 6. Na zistenie rozdielu medzi jednotlivými skupinami sme použili metódy analýzy variancie (two-way ANOVA) a následne testy viacnásobných porovnaní. Testovali sme na hladine významnosti $\alpha=0,05$.

VÝSLEDKY

Charakteristika izolovaných srdc

Bazálne predischemické hodnoty hemodynamických parametrov 12- a 18-týždňových samcov a samíc všetkých experimentálnych skupín sú uvedené v tabuľke 1. V pozorovaných skupinách sa funkčné parametre srdc pred ischémiou nelíšili. Podávanie wortmanninu 15 minút pred ischémiou nemalo na tieto parametre významný vplyv.

Vplyv pohlavia a veku na citlivosť srdca voči I/R poškodeniu

Srdcia 12-, ako aj 18-týždňových neovplyvnených (kontrolných) samíc vykazovali zvýšenú odolnosť voči letálnemu I/R poškodeniu v porovnaní so samcami, čo sa prejavilo menším rozsahom infarktu (IS/AR) v prípade samíc. Vek neovplyvnil veľkosť nekrotickej oblasti ani v prípade samcov ani samíc (Obr. 1).

Tabuľka 1. Bazálne predischemické funkčné parametre izolovaných srdc 12- a 18-týždňových samcov a samíc potkana

Parameter/Skupina	Samice 12w	Samce 12w	Samice 18w	Samce 18w
CF, mL/min	6,4 $\pm$ 0,5	6,6 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,4
LVSP, mm Hg	86 $\pm$ 5	73 $\pm$ 6	80 $\pm$ 3	82 $\pm$ 2
LVDiP, mm Hg	4,3 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,4
LVDP, mm Hg	82 $\pm$ 6	79 $\pm$ 3	74 $\pm$ 4	77 $\pm$ 2
HR, úder/min	278 $\pm$ 12	293 $\pm$ 6	271 $\pm$ 8	240 $\pm$ 13

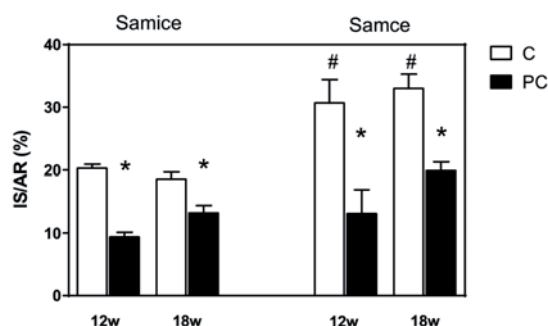
CF, koronárny prietok; LVSP, systolický tlak v ľavej komore; LVDiP, diastolický tlak; LVDP, tlak vyvinutý ľavou komorou (LVSP mínus LVDiP); HR, srdcová frekvencia. Hodnoty sú udávané ako priemery z nameraných hodnôt $\pm$ SEM z 21 až 28 srdc.

Podobne, srdcia samíc oboch vekových skupín v porovnaní so samcami vykazovali zvýšenú odolnosť aj voči ischemickým arytmiám. Počet extrasystol, ako aj počet epizód VT počas ischemie, bol signifikantne nižší v srdci 12- i 18-týždňových samíc v porovnaní so samcami. Okrem toho, vplyvom veku došlo k významnému nárastu počtu ischemických komorových tachyarytmií rovnako v skupine samcov, ako i samíc (Tab. 2).

Vplyv ischemického preconditioningu na ischemicko/reperfúzne poškodenie v myokarde samcov a samíc

Ischemický preconditioning neovplyvnil arytmogenezu v srdciach 12-týždňových samíc v porovnaní s kontrolnou skupinou (Tab. 2). Na druhej strane, v srdciach 12-týždňových samcov, ako aj 18-týždňových samcov a samíc, sa naplno prejavil antiarytmický účinok PC, keďže v týchto skupinách došlo k signifikantnému poklesu počtu extrasystol, počtu epizód VT, ako aj celkového trvania VT (Tab. 2).

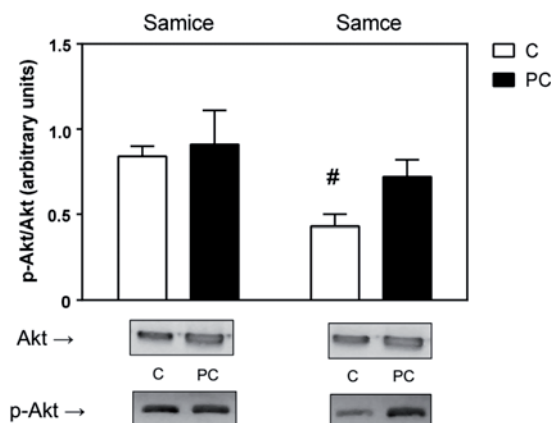
Ischemický preconditioning taktiež efektívne redukoval veľkosť infarktu myokardu samcov i samíc oboch vekových skupín. Zaznamenali sme aj pohlavné rozdiely v účinnosti PC, keďže v prípade 12 a 18-týždňových samcov došlo vplyvom PC k výraznejšiemu zmenšeniu veľkosti infarktu, ako v prípade samíc (12w samice – o 53 %; 18w samice – o 29 %; 12w samce – o 57 %; 18w samce – o 39 %) (obr. 1).



Obr. 1. Vplyv ischemického preconditioningu (PC) na veľkosť infarktového ložiska po 30-minútovej regionálnej ischemii a 2-hodinovej reperfúzii v srdci 12- a 18-týždňových (12w a 18w) samcov a samíc. C: skupiny bez PC; PC: skupiny s PC. Hodnoty sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM zo 7 – 9 srdc v skupine. # samce vs. samice rovnakého veku; * PC vs. C rovnakého pohlavia a veku; $p < 0,05$.

Úloha PI3K/Akt dráhy v mechanizme ischemického preconditioningu

Výsledky Western blot analýzy ukázali o takmer 50 % vyšší pomer p-Akt/Akt v srdci kontrolných samíc v porovnaní so samcami (Obr. 2). Pomer p-Akt/Akt v srdci kontrolných samíc dosahovali podobnú úroveň ako v srdci samíc vystavených PC (Obr. 2), čo ukazuje, že PC nemal v srdci samíc vplyv na aktiváciu (fosforyláciu) Akt. Na druhej strane, pomer p-Akt/Akt v srdci samcov vykazoval vplyvom PC stúpajúcu tendenciu (Obr. 2) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Nezaznamenali sme rozdiely v hladinách Akt medzi jednotlivými skupinami (Samice: kontrola – $(1,03 \pm 0,04)$ a.u. a PC – $(0,85 \pm 0,10)$ a.u., Samce: kontrola – $(1,23 \pm 0,02)$ a.u. a PC – $(1,35 \pm 0,29)$ a.u.).



Obr. 2. Vplyv ischemického preconditioningu (PC) na pomer hladín fosforylovanej/celkovej proteínkinázy B (pAkt/Akt) v srdci 12-týždňových samcov a samíc pred ischemiou. C: skupiny bez PC; PC: skupiny s PC (Hore). Reprezentatívne obrázky bandov Akt a p-Akt jednotlivých skupín (Dole). Hodnoty sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM zo 4 srdc v skupine. # samce vs. samice rovnakej skupiny; $p < 0,05$.

Vplyv inhibície PI3K/Akt dráhy na odolnosť srdca samcov a samíc voči ischemicko/reperfúznemu poškodeniu

Wortmannin, ako inhibítor PI3K/Akt dráhy, neovplyvnil arytmogenezu v srdci samíc ani samcov oboch vekových skupín ($p > 0,05$ vs. kontroly rovnakého veku; Tab. 2).

Zaznamenali sme prítomnosť pohlavných rozdielov v rozsahu letálneho poškodenia myokardu vplyvom aplikácie wortmanninu. Obr. 3. ukazuje signifikantné zväčšenie infarktu myokardu vplyvom inhibície PI3K/Akt dráhy v izolovanom srdci

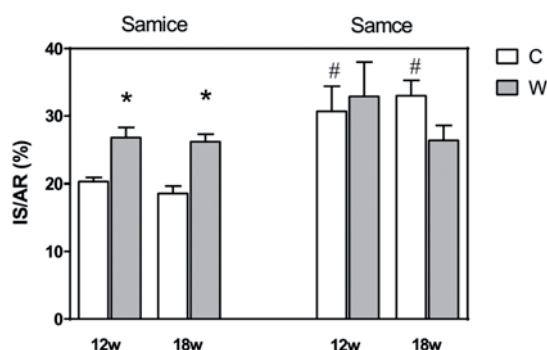
Tabuľka 2. Vplyv PI3K/Akt dráhy na arytmogenézu v izolovanom srdci 12- a 18-týždňových (12w/18w) samcov a samíc kontrolných a vystavených ischemickému preconditioningu

Neovplyvnené	Kontrola				Ischemický preconditioning			
	Samice 12w	Samce 12w	Samice 18w	Samce 18w	Samice 12w	Samce 12w	Samice 18w	Samce 18w
PVC	78 ± 11	563 ± 67*	313 ± 79#	929 ± 220#*	161 ± 46	169 ± 34 ^{&}	163 ± 47 ^{&}	294 ± 71* ^{&}
VTE	1,3 ± 0,5	10,4 ± 2,0*	27 ± 14,8#	82 ± 30#*	2,1 ± 0,8	0,6 ± 0,2 ^{&}	0,4 ± 0,4 ^{&}	6,0 ± 1,6* ^{&}
VTD	2,3 ± 1,1	38,0 ± 8,2*	46 ± 24,3#	175 ± 68#*	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,4 ^{&}	0,5 ± 0,5 ^{&}	13,0 ± 5,6* ^{&}

Wortmannin	Kontrola				Ischemický preconditioning			
	Samice 12w	Samce 12w	Samice 18w	Samce 18w	Samice 12w	Samce 12w	Samice 18w	Samce 18w
PVC	54 ± 13	480 ± 50*	385 ± 112#	599 ± 279	129 ± 46	92 ± 25	126 ± 45	155 ± 56
VTE	0,9 ± 0,6	11 ± 2*	30 ± 13#	57 ± 21#*	2,0 ± 0,8	1,1 ± 0,6	2,0 ± 0,7	3,0 ± 1,2
VTD	1,3 ± 1,1	43 ± 6*	50 ± 12#	129 ± 38#*	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	8,1 ± 3,8#*

PVC: celkový počet extrasystol; VTE: počet epizód komorových tachykardií; VTD: celkové trvanie komorových tachykardií (s). Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SEM zo 5–9 srdc v skupine. * samce vs. samice rovnakého veku; # 18w vs. 12w rovnakého pohlavia; [&] 12 a 18-týždňové zvieratá s ischemickým preconditioningom vs. kontrolly rovnakého veku a pohlavia; $p < 0,05$.

samíc oboch vekových skupín. Odlišnú odpoveď na aplikáciu wortmanninu sme zaznamenali v srdci samcov, ktorí nevykazovali signifikantné zmeny rozsahu letálneho poškodenia po aplikácii wortmanninu ani v 12 ani 18-týždňovej experimentálnej skupine (Obr. 3).

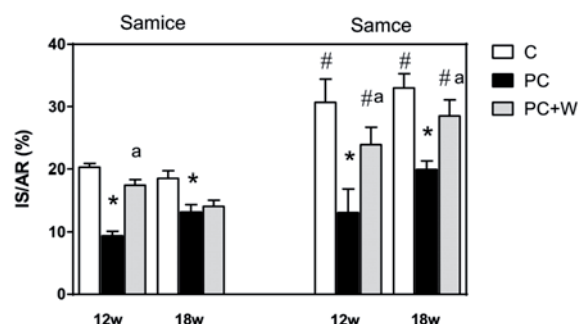


Obr. 3. Vplyv aplikácie wortmanninu (W) na veľkosť infarktového ložiska po 30-minútovej regionálnej ischemii a 2-hodinovej reperfúzií v srdci 12- a 18-týždňových (12w a 18w) samcov a samíc. C: skupiny bez wortmanninu; W: skupiny s wortmanninom. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SEM zo 7 – 9 srdc v skupine. # samce vs. samice rovnakého veku; * W vs. C rovnakého pohlavia a veku; $p < 0,05$.

Vplyv inhibície PI3K/Akt dráhy na ochranný účinok ischemického preconditioningu v srdci samcov a samíc

Antiarytmický účinok PC nebol ovplyvnený inhibíciou PI3K/Akt dráhy počas PC v srdci 12- ani

18-týždňových samíc ani samcov ($p > 0,05$ vs. neovplyvnené samice/samce s PC rovnakého veku; Tab. 2). Na druhej strane wortmannin aplikovaný počas PC potlačil antiinfarktový účinok PC v srdci 12-týždňových samcov i samíc (Obr. 4). V srdci 18-týždňových zvierat potlačil wortmannin antiinfarktový účinok PC len v prípade samcov a nemal vplyv na veľkosť infarktu u samíc (Obr. 4).



Obr. 4. Vplyv aplikácie wortmanninu počas ischemického preconditioningu (PC) na veľkosť infarktového ložiska po 30-minútovej regionálnej ischemii a 2-hodinovej reperfúzií v srdci 12- a 18-týždňových (12w a 18w) samcov a samíc. C: kontrolné skupiny; W: skupiny s wortmanninom; PC+W: skupiny s wortmanninom a PC. Hodnoty sú prezentované ako priemer ± SEM zo 7 až 9 srdc v skupine. * PC vs. C rovnakého pohlavia a veku; # samce vs. samice rovnakého veku a skupiny; ^a PC+W vs. PC rovnakého pohlavia a veku; $p < 0,05$.

DISKUSIA

Vplyv pohlavia a veku na ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca potkana a úloha PI3K/Akt dráhy

V prezentovanej štúdii sme demonštrovali zvýšenú odolnosť myokardu 12-týždňových samíc voči I/R poškodeniu v porovnaní s 12-týždňovými samcami. Samice vykazovali zvýšenú odolnosť nielen voči letálnemu poškodeniu, ale aj voči ischemiou indukovaným arytmiám v porovnaní so samcami. Tieto výsledky sú v súlade so zisteniami štúdií, ktoré potvrdili vyššiu toleranciu myokardu samíc voči I/R poškodeniu (Humphreys a kol. 1999; Cavašin a kol. 2004; Wang a kol. 2005; Bae a Zhang 2005).

Dospievanie čiastočne ovplyvnilo toleranciu srdca voči ischemii a reperfúzii aj v závislosti od pohlavia. V prípade 18-týždňových samcov i samíc došlo k nárastu ektoptickej elektrickej aktivity – PVC, ako aj k významnému zvýšeniu VTE v porovnaní s 12-týždňovými zvieratami. Zaujímavé je, že v prípade samcov bol vplyv veku na arytmiogenézu výraznejší ako v prípade samíc. Na druhej strane, veľkosť infarktu myokardu nebola ovplyvnená vekom ani v prípade samcov ani samíc. Okrem toho sme pozorovali aj zachovanie pohlavných rozdielov v odolnosti srdca voči I/R poškodeniu, keďže podobne, ako u 12-týždňových zvierat, 18-týždňové samice vykazovali vyššiu odolnosť voči letálnemu poškodeniu v porovnaní s 18-týždňovými samcami. Je tiež známe, že E2 aktivuje PI3K/Akt dráhu, ktorá zohráva významnú úlohu v regulácii bunkového prežitia a kontrole metabolizmu. Aktivácia PI3K/Akt dráhy môže viesť k aktivácii eNOS, antiapoptotických efektorov ako aj k inhibícii proapoptotických proteínov skupiny Bcl-2, BAD (Aikawa a kol. 2000) a efektorovej kaspázy-9 (Cardone a kol. 1998). Bolo dokázané, že v kardiomyocytoch mladých žien pred menopauzou sú prítomné vyššie hladiny p-Akt ako u mužov porovnateľného veku a žien po menopauze. Takto zvýšené hladiny p-Akt u žien sú spojené s významne nižším rizikom kardiovaskulárnych ochorení v porovnaní s mužmi (Camper-Kirby a kol., 2001). Podobne aj kardiomyocyty dospelých samíc myši vykazujú vyššie hladiny p-Akt ako kardiomyocyty samcov (Camper-Kirby a kol., 2001; Bae a Zhang 2005), čo je spojené so zvýšenou toleranciou voči I/R poškodeniu a môže byť príčinou pohlavných rozdielov v odolnosti srdca voči ischemii a reper-

fúzií. Tieto dáta korešpondujú s našimi výsledkami, v ktorých sme zaznamenali signifikantne zvýšené hladiny p-Akt, ako aj pomer p-Akt/Akt v srdci 12-týždňových samíc v porovnaní so samcami rovnakého veku, čo spolu so zvýšenou odolnosťou myokardu samíc voči ischemii a reperfúzii poukazuje na významnejšiu úlohu aktivácie Akt v ochrane srdca samíc voči letálnemu poškodeniu. Zároveň sme zistili, že inhibítor PI3K/Akt dráhy – wortmannin významne zhoršuje toleranciu srdca samíc voči infarktu myokardu nezávisle na veku. Aj napriek tomu, že inhibícia PI3K/Akt dráhy zapríčinila zväčšenie rozsahu letálneho poškodenia srdca, nemala inhibícia PI3K/Akt dráhy vplyv na rozvoj arytmiogenézy ani v prípade 12- ani 18-týždňových samíc. Srdcia samcov oboch vekových skupín nevykazovali zmeny v tolerancii voči ischemii a reperfúzii po podaní wortmanninu. Naša práca je v zhode s výsledkami štúdie autorov Bae a Zhang (2005), v ktorej zistili, že zvýšená odolnosť srdca samíc voči ischemickému poškodeniu je potlačená inhibíciou PI3K/Akt dráhy wortmanninom.

Vplyv pohlavia a veku na účinnosť ischemického preconditioningu

Doposiaľ len dve predchádzajúce štúdie sledovali vplyv PC na citlivosť srdca voči I/R poškodeniu v srdci samcov a samíc rôzneho veku. V štúdii využívajúcej 10- a 18-týždňové myši oboch pohlaví Turcato a kol. (2006) zistili, že PC neovplyvňoval postischemickú obnovu funkcie srdca 10-týždňových samíc, avšak výrazne zlepšoval funkčnú obnovu srdca starších 18-týždňových samíc. Odlišné výsledky boli zaznamenané v prípade samcov, u ktorých PC vylepšoval poischemické funkčné parametre v oboch vekových skupinách. Prezentovaná štúdia čiastočne potvrdzuje zistenia autorov Turcato a kol. (2006) o odlišnej účinnosti PC v srdci mladších a starších jedincov aj v závislosti od pohlavia. Zaznamenali sme rozdielnú odpoveď na PC stimulus v srdci 12- a 18-týždňových samíc. Aj napriek tomu, že v našej práci PC efektívne redukoval rozsah infarktu myokardu 12-, ako aj 18-týždňových samíc, len v srdciach starších dospelých samíc sa prejavil aj antiarytmický účinok PC. Na druhej strane, v prípade samcov sa antiarytmický ako aj antiinfarktový účinok PC naplno prejavil v oboch vekových skupinách. Naše výsledky tak naznačujú, že dospievanie čiastočne mení odpoveď srdca na ischemiu a ovplyvňuje aj potenciál pre aktiváciu endogénnej kardioprotekcie. Podobne aj

v práci Song a kol. (2003) autori zistili, že PC stimulus nebol efektívny pre navodenie kardioprotekcie v srdci 10-týždňových samíc myší, ktoré už za kontrolných podmienok vykazovali vylepšenú funkčnú obnovu ako aj menšie letálne poškodenie v porovnaní so samcami. Avšak v prípade samcov sa kardioprotektívny účinok PC prejavil v plnej miere; redukoval veľkosť infarktu a zároveň zlepšoval postischemickú funkčnú obnovu srdca, čo je v súlade s našimi zisteniami.

Úloha PI3K/Akt dráhy v procese ischemického preconditioningu v závislosti od pohlavia a veku

Zistili sme, že inhibícia PI3K/Akt dráhy wortmanninom blokuje antiinfarktový účinok PC v srdci 12-týždňových samíc, ale nie v srdci 18-týždňových samíc. Na druhej strane, aplikácia wortmanninu neovplyvnila účinok PC na arytmogenézu u 12-, ani 18-týždňových samíc. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že dochádza k vekovo špecifickej aktivácii PI3K/Akt dráhy, ktorá pravdepodobne zohráva významnejšiu úlohu v myokarde 12-týždňových samíc v porovnaní s 18-týždňovými.

V srdci 12-týždňových samíc vystavených PC sme zaznamenali podobné hladiny p-Akt/Akt ako v srdci 12-týždňových kontrolných samíc. Na druhej strane, v srdci samcov sme pozorovali narastanie pomeru p-Akt/Akt v srdci samcov. Vzhľadom na tieto dáta v spojení so vyššou odolnosťou myokardu samíc voči I/R poškodeniu v porovnaní s myokardom samcov, ktorú sme demonštrovali v tejto práci, predpokladáme, že srdce samíc je efektívnejšie chránené už za bazálnych (kontrolných) podmienok, pravdepodobne kvôli vyššej aktivácii Akt v porovnaní so samcami.

Mechanizmy zapojené do kardioprotektívneho účinku PC zahŕňajú aktiváciu PI3K/Akt dráhy, eNOS (Wang a kol., 2006) a niektoré izoformy PKC (Soversheav a kol., 2006). V myokarde samíc sú to predovšetkým pohlavné hormóny, konkrétne estrogény, ktoré významne ovplyvňujú citlivosť srdca voči ischémii. Zvýšená kardioprotekcia u samíc môže byť vysvetlená nielen vyššie spomenutými genómovými účinkami estrogénu (zvýšenie expresie GLUT4 na plazmatickej membráne, alebo zvýšenie expresie NOS), ale aj negenómovou aktiváciou kardioprotektívnych signálnych dráh, ktoré aktivujú kaskády prežitia, ako je PI3K/Akt (Murphy a Steenbergen, 2007). Deficit estrogénu má negatívny dopad na protektívny účinok PC

v srdci samíc. Ovariectomia samíc blokuje kardioprotektívne účinky PC ako napr. poischemické zlepšenie kontraktilnej funkcie (Peng a kol., 2004) a antiinfarktový efekt (Song a kol., 2003). V podmienkach chronickej deficiencie estrogénu môže byť zvrátenie ochranného účinku PC vysvetlené zlyhaním translokácie PKC ϵ do membránovej frakcie a redukciou PC-indukovanej fosforylácie PKC ϵ (Shinmura a kol., 2008) a Akt (Tong a kol., 2000).

Čo sa týka zmenšenia letálneho poškodenia vplyvom PC, toto bolo v našej štúdii potlačené wortmanninom v srdciach 12-týždňových samcov i samíc. Podobne aj v srdci 18-týždňových samcov i samíc PC zmenšil rozsah infarktu myokardu. Okrem toho hladiny p-Akt/Akt po ischémii a reperfúzii boli v skupine samcov s PC signifikantne zvýšené v porovnaní s kontrolnými samcami. Tieto zistenia podporujú aj výsledky o negatívnom dopade inhibície PI3K/Akt na antiinfarktový účinok PC v srdci 12-týždňových samcov. Wortmannin pritom neovplyvnil antiarytmický efekt PC v srdci samcov oboch vekových skupín, čo potvrdzujú aj predošlé štúdie, v ktorých bolo zistené, že PI3K/Akt dráha nie je zapojená do antiarytmického účinku PC v srdci samcov na rozdiel od jej významnej ulohy v antiinfarktovom účinku PC (Ravingerová a kol., 2009).

ZÁVERY

Výsledky našej práce potvrdzujú úlohu aktivácie PI3K v srdciach vystavených PC pričom jej inhibícia blokuje "downstreamovú" signalizáciu, ako je aktivácia Akt, a podporujú význam PI3K/Akt signalizácie v kardioprotektívnych mechanizmoch PC. Ischemický preconditioning aplikovaný v tejto štúdii poskytuje dostatočný antiinfarktový účinok v srdci oboch pohlaví (výraznejší u samcov), ktorý nie je ovplyvnený vekom. Na druhej strane, antiarytmická ochrana nie je potenciovaná PC v srdci 12-týždňových samíc. Tieto zistenia poukazujú na pohlavne, ako aj vekovo závislý účinok PC v procese navodenia kardioprotekcie. Popísané rozdiely môžu byť zapríčinené odlišnou úlohou PI3K/Akt v antiinfarktovej a antiarytmickej ochrane myokardu. Aktivácia PI3K/Akt dráhy počas PC zohráva kritickú úlohu v ochrane srdca voči I/R poškodeniu navodenej PC v srdci mladších samíc ako aj mladších a starších samcov potkana, zatiaľ čo kardioprotekcia v srdci starších samíc sa javí čiastočne nezávislá na aktivácii PI3K/Akt signalizácie.

POĎAKOVANIE

Podakovanie patrí predovšetkým kolegom Slávke Čarnickej, Lucii Griecsovej za ich profesionálny a odborný prístup a Ivete Formánkovej a Deziderovi Panczovi za technické zabezpečenie experimentov. Práca bola podporená grantmi: VEGA-SR 2/0054/11, VEGA SR 2/0201/15, APVV-0523-10, APVV-0102-11, APVV-SK-CZ-2013-0075, CENOREG.

Literatúra

- ABETE, P. a kol. 2002. Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, vol. 282, no. 6, p. 1978–1987. doi: 10.1152/ajpheart.00929.2001.
- ADAMS, M. R. a kol. 1990. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. In *Arteriosclerosis*. ISSN 0276-5047, vol. 10, p. 1051–1057. doi: 10.1161/01.atv.10.6.1051.
- AIKAWA, R. – NAWANO, M. – GU, Y. – KATAGIRI, H. – ASANO, T. – ZHU, W. – NAGAI, R. – KOMURO, I. 2000. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, 2000, vol. 102, no. 23, p. 2873–2879. doi: 10.1161/01.cir.102.23.2873.
- AIRAKSINEN, K. a kol. 1998. Gender difference in autonomic and hemodynamic reactions to abrupt coronary occlusion. In *Journal of the American College of Cardiology*. ISSN 0735-1097, vol. 31, no. 2, p. 301–306. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00489-0.
- BAE, S., ZHANG, L. 2005. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. ISSN 0022-3565, vol. 315, no. 3, p. 1125–1135. doi: 10.1124/jpet.105.090803.
- BAXTER, G. F. a kol. 1995. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. In *British Journal of Pharmacology*. ISSN 0007-1188, vol. 115, no. 2, p. 222–224. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15866.x.
- BLACK, S. C. – RODGER, I. W. 1996. Methods for studying experimental myocardial ischemic and reperfusion injury. In *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. ISSN 1056-8719, vol. 35, no. 4, p. 179–190. doi: 10.1016/1056-8719(96)00051-2.
- BOLLI, R. a kol. 1998. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. In *Basic Research in Cardiology*. ISSN 0300-8428, vol. 93, no. 5, p. 325–338. doi: 10.1007/s003950050101.
- BOOTH, E. A. a kol. 2003. 17 β -estradiol as a receptor-mediated cardioprotective agent. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. ISSN 0022-3565, vol. 307, no. 1, p. 395–401. doi: 10.1124/jpet.103.054205.
- BOPASSA, J. C. a kol. 2010. A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. In *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. ISSN 0363-6135, vol. 298, no. 1, p. H16–23. doi: 10.1152/ajpheart.00588.2009.
- BOUMA, W. a kol. 2010. Sex-related resistance to myocardial ischemia reperfusion injury is associated with high constitutive ARC expression. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, vol. 298, no. 5, p. H1510–1517. doi: 10.1152/ajpheart.01021.2009.
- BROCK, C. a kol. 2003. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *The Journal of Cell Biology*. ISSN 0021-9525, vol. 160, no. 1, p. 89–99. doi: 10.1083/jcb.200210115.
- BURKE, J. H. a kol. 1997. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. In *American Journal of Cardiology*. ISSN 0002-9149, vol. 79, no. 2, p. 178–181. doi: 10.1016/s0002-9149(96)00707-2.
- CAMPER-KIRBY, D. a kol. 2001. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 88, no. 10, p. 1020–1027. doi: 10.1161/hh1001.090858.
- CARDONE, M. H. – ROY, N. – STENNICKE H. R. – SALVESEN, G. S. – FRANKE, T. F. – STANBRIDGE, E. – FRISCH, S. – REED, J. C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. In *Science*, ISSN 1095-9203, 1998, vol. 282, no. 5392, p. 1318–1321. doi: 10.1126/science.282.5392.1318.
- CARROLL, J. D. a kol. 1992. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 86, no. 4, p. 1099–1107. doi: 10.1161/01.cir.86.4.1099.
- CAVASIN, M. A. – TAO, Z. Y. – YU, A. L. – YANG, X. P. 2006. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, 2006, vol. 290, no. 5, p. H2043–H2050. doi: 10.1152/ajpheart.01121.2005.
- CAVE, A. C. – HEARSE, D. J. 1992. Ischaemic preconditioning and contractile function: studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ISSN 0022-2828, vol. 24, no. 10, p. 1113–1123. doi: 10.1016/0022-2828(92)93176-k.
- CHEN, G. a kol. 2011. Regional genomic regulation of cardiac sodium-calcium exchanger by oestrogen. In *The Journal of physiology*. ISSN 0022-

3751. vol. 589, no. 5, p. 1061-1080. doi: 10.1113/jphysiol.2010.203398.
- COKER, S. J. – MCGRATH, M. T. 1985. Can captopril modify experimentally induced cardiac arrhythmias? In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ISSN 0022-2828, vol. 17, p. 42 (abstract).
- COKER, S. J. – PARRATT, J. R. 1983. Nifedipine reduces arrhythmias but does not alter prostanoid release during coronary artery occlusion and reperfusion in anaesthetised greyhounds. In *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. ISSN 0160-2446, vol. 5, no. 3, p. 406-417.
- CONDE-MARTEL, A. a kol. 2015. Gender related differences in clinical profile and outcome of patients with heart failure. Results of the RICA Registry. In *Revista Clínica Española*. ISSN 0014-2565, vol. 215, no. 7, p. 363-370. doi: 10.1016/j.rce.2015.02.010.
- CRABBE, D. L. a kol. 2003. Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. In *Journal of the American College of Cardiology*. ISSN 0735-1097, vol. 41, no. 2, p. 300-306. doi: 10.1016/s0735-1097(02)02710-9.
- CRACKOWER, M. A. a kol. 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. In *Cell*. ISSN 0092-8674, vol. 110, no. 6, p. 737-749. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00969-8.
- CROSS, T. G. a kol. 2000. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. In *Experimental Cell Research*. ISSN 0014-4827, vol. 256, no. 1, p. 34-41. doi: 10.1006/excr.2000.4836.
- DATTA, S. R. a kol. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. In *Genes and Development*. ISSN 0890-9369, vol. 13, no. 22, p. 2905-2927.
- DIMMELER, S. a kol. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. In *Nature*. ISSN 0028-0836, vol. 399, no. 6736, p. 601-605.
- DOUGLAS, P. S. a kol. 1998. Hypertrophic Remodeling: Gender Differences in the Early Response to Left Ventricular Pressure Overload. In *Journal of the American College of Cardiology*. ISSN 0735-1097, vol. 32, no. 4, p. 1118-1125. doi: 10.1016/s0735-1097(98)00347-7.
- FALKEBORN, M. a kol. 1992. The risk of acute myocardial infarction after oestrogen and oestrogen-progestogen replacement. In *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. ISSN 0306-5456, vol. 99, no. 10, p. 821-828. doi: 10.1111/j.1471-0528.1992.tb14414.x.
- FAVRE, J. a kol. 2010. Endothelial estrogen receptor {alpha} plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. ISSN 1079-5642, vol. 30, no. 12, p. 2562-2567. doi: 10.1161/atvbaha.110.213637.
- FILARDO, E. J. – THOMAS, P. 2005. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. ISSN 1043-2760, vol. 16, no. 8, p. 362-367. doi: 10.1016/j.tem.2005.08.005.
- FOSTER, F. M. a kol. 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. In *Journal of Cell Science*. ISSN 0021-9533, vol. 116, no. 15, p. 3037-3040. doi: 10.1242/jcs.00609.
- FUJIO, Y. a kol. 2000. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia reperfusion injury in mouse heart. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 101, p. 660-667. doi: 10.1161/01.cir.101.6.660.
- FURCHGOTT, R. F. – ZAWADZKI, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In *Nature*. ISSN 0028-0836, vol. 288, no. 5789, p. 373-376. doi: 10.1038/288373a0.
- FURUKAWA, T. – KUROKAWA, J. 2008. Non-genomic regulation of cardiac ion channels by sex hormones. In *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets*. ISSN 1871-529X, vol. 8, no. 4, p. 245-251. doi: 10.2174/187152908786786160.
- GORDON, T. a kol. 1978. Menopause and coronary heart disease. The Framingham study. In *Annals of Internal Medicine*. ISSN 0003-4819, vol. 89, no. 2, p. 157-161. doi: 10.7326/0003-4819-89-2-157.
- Grodstein, F. a kol. 2000. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. In *Annals of Internal Medicine*. ISSN 0003-4819, vol. 133, no. 12, p. 933-41. doi: 10.7326/0003-4819-133-12-200012190-00008.
- GROHE, C. a kol. 1997. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. In *FEBS Letters*. ISSN 0014-5793, vol. 416, no. 1, p. 107-112. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01179-4.
- HAUSENLOY, D. J. a kol. 2004. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 63, no. 2, p. 305-312. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.04.011.
- HAYNES, M. P. a kol. 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 87, no. 8, p. 677-682. doi: 10.1161/01.res.87.8.677.
- HAYWARD, C. S. a kol. 2000. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 46, no. 1, p. 28-49. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00005-5.
- HU, Y. a kol. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. In *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. ISSN 0031-6768, vol. 455, no. 4, p. 607-616. doi: 10.1007/s00424-007-0321-4.

- HUANG, Y. a kol. 2014. Cardiac-specific Traf2 overexpression enhances cardiac hypertrophy through activating AKT/GSK3 β signaling. In *Gen.* ISSN 0378-1119, vol. 536, no. 2, p. 225–231. doi: 10.1016/j.gene.2013.12.052.
- HUANG, J. a KONTOS, C. D. 2002. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and survival by the tumor suppressor protein PTEN. In *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* ISSN 1079-5642, vol. 22, no. 5, p. 745-751. doi: 10.1161/01.ATV.0000016358.05294.8D.
- HULLEY, S. a kol. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. In *Journal of the American Medical Association.* ISSN 0098-7484, vol. 280, no. 7, p. 605–613. doi: 10.1001/jama.280.7.605.
- HUMPHREYS, R. A. – KANE, K. A. – PARRPATT, J. R. 1999. The influence of maturation and gender on the anti-arrhythmic effect of ischaemic preconditioning in rats. In *Basic Research in Cardiology.* ISSN 0300-8482, 1999, vol. 94, no. 1, p. 1–8. doi: 10.1007/s003950050120.
- IGNARRO, L. J. a kol. 2001. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* ISSN 0027-8424, vol. 98, no. 7, p. 4202–4208. doi: 10.1073/pnas.071054698.
- JAIN, M. a kol. 2002. Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* ISSN 0363-6135, vol. 283, no. 6, p. 2544–2550. doi: 10.1152/ajpheart.00338.2002.
- JIANG, C. a kol. 1992. Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes. In *British Journal of Pharmacology.* ISSN 0007-1188, vol. 106, no. 3, p. 739–745. doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14403.x.
- JOHNSON, B. D. a kol. 1997. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. In *Journal of General Physiology.* ISSN 0022-1295, vol. 110, no. 2, p. 135–140. doi: 10.1085/jgp.110.2.135.
- KARAS, R. H. a kol. 1994. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. In *Circulation.* ISSN 0009-7322, vol. 89, no. 5, p. 1943–1950. doi: 10.1161/01.cir.89.5.1943.
- KATSUBE, Y. a kol. 1998. L-type Ca²⁺ currents in ventricular myocytes from neonatal and adult rats. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* ISSN 0008-4212, vol. 76, no. 9, p. 873–881. di: 10.1139/y98-076.
- KIM, Y. D. a kol. 1996. 17 β -Estradiol Prevents Dysfunction of Canine Coronary Endothelium and Myocardium and Reperfusion Arrhythmias After Brief Ischemia/Reperfusion. In *Circulation.* ISSN 0009-7322, vol. 94, no. 11, p. 2901–2908. doi: 10.1161/01.cir.94.11.2901.
- KIM, I. – a kol. 2000. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. In *Circulation Research.* ISSN 0009-7330, vol. 86, no. 1, p. 24–29. doi: 10.1161/01.res.86.1.24.
- KRIEG, T. a kol. 2004. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* ISSN 0363-6135, vol. 287, no. 6, p. 2606–2611. doi: 10.1152/ajpheart.00600.2004.
- KUBES, P. a kol. 1991. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* ISSN 0027-8424, vol. 88, no. 11, p. 4651–4655. doi: 10.1073/pnas.88.11.4651.
- KUIPER, G. G. a kol. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. In *Endocrinology.* ISSN 0013-7227, vol. 138, no. 3, p. 863–870. doi: 10.1210/en.138.3.863.
- LEE, D.S. a kol. 2009. Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the Framingham Heart Study of the National Heart, Lung, and Blood Institute. In *Circulation.* ISSN 0009-7322, vol. 119, no. 24, p 3070–3077. doi: 10.1161/circulationaha.108.815944.
- LIN, J. a kol. 2009. Estrogen receptor- β activation results in S-nitrosylation of proteins involved in cardioprotection. In *Circulation.* ISSN 0009-7322, vol. 120, no. 3, p. 245–254. doi: 10.1161/circulationaha.109.868729.
- LIU, G. S. a kol. 1991. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. In *Circulation.* ISSN 0009-7322, vol. 84, no. 1, p. 350–356. doi: 10.1161/01.cir.84.1.350.
- MARRUGAT, J. – SALA, J. – MASIA, R. – PAVESI, M. – SANZ, G. – VALLE, V. – MOLINA, L. – SERES, L. – ELOSUA, R. 1998. Mortality differences between men and women following first myocardial infarction. RESCATE Investigators. Recursos Empleados en el Síndrome Coronario Agudo y Tiempo de Espera. In *Journal of the American Medical Association.* ISSN 0098-7484, 1998, vol. 280, no. 16, p. 1405–1409.
- MATEJÍKOVÁ, J. a kol. 2009. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K(ATP) channels and reactive oxygen species. In *Physiological research.* ISSN 0862-8408, vol. 58, no. 1, p. 9-19. PMID: 20029542.
- MAULIK, N. a kol. 1996. Ischemic preconditioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAP kinase 2 in rat hearts. In *FEBS Letters.* ISSN 0014-5793, vol. 396, no. 2–3, p. 233–237. doi: 10.1016/0014-5793(96)01109-x.

- MEYER, S. a kol. 2014. Sex differences in new-onset heart failure. In *Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society*. ISSN 1861-0684, vol. 104, no. 4, p. 342-350. doi: 10.1007/s00392-014-0788-x.
- MEHTA, P. A. – COWIE, M. R. 2006. Gender and heart failure: a population perspective. In *Heart*. ISSN 1355-6037, vol. 92, Suppl. 3, p. 14–18. doi: 10.1136/hrt.2005.070342.
- MELLION, B. T. a kol. 1981. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. In *Blood*. ISSN 0006-4971, vol. 57, no. 5, p. 946–955.
- MELLONI, C. a kol. 2010. Representation of women in randomized clinical trials of cardiovascular disease prevention. In *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes*. ISSN 1941-7713, vol. 3, no. 2, p. 135-142. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.110.868307.
- MENDELSON, M. E. – KARAS, R. H. 2005. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. In *Science*. ISSN 0036-8075, vol. 30, no. 5728, p. 1583-1587. doi: 10.1126/science.1112062.
- MITCHELL, M. B. a kol. 1993. Inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium release reduces myocardial stunning. In *Journal of Surgical Research*. ISSN 0022-4804, vol. 54, no. 5, p. 411–417. doi: 10.1006/jsre.1993.1065.
- MOCANU, M. M. a kol. 2000. The p38MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. In *Basic Research in Cardiology*. ISSN 0300-8428, vol. 95, no. 6, p. 472–478. doi: 10.1007/s003950070023.
- MOCANU, M. M. a kol. 2002. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ISSN 0022-2828, vol. 34, no. 6, p. 661-668. doi: 10.1006/jmcc.2002.2006.
- MURPHY, E. 2004. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 94, no. 1, p. 7–16. doi: 10.1161/01.res.0000108082.76667.f4.
- MURPHY, E. – STEENBERGEN, C. 2007. Cardioprotection in females: A role of nitric oxide and altered gene expression. In *Heart Failure Reviews*. ISSN 1382-4147, vol. 12, no. 3–4, p. 293–300. doi: 10.1007/s10741-007-9035-0.
- MURRY, C. E. a kol. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 74, no. 5, p. 1124–1136. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124.
- NICKENIG, G. a kol. 1998. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. In *Circulation*. ISSN 1524-4539, vol. 97, no. 22, p. 2197–2201. doi: 10.1161/01.cir.97.22.2197.
- NIKOLIC, I. a kol. 2007. Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ISSN 0022-2828, vol. 42, no. 4, p. 769–780. doi: 10.1016/j.jmcc.2007.01.014.
- NILSSON, S. – GUSTAFSSON, J. A. 2002. Estrogen receptor action. In *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. ISSN 1045-4403, vol. 12, no. 4, p. 237–257. doi: 10.1615/critrevueukaryotgeneexpr.v12.i4.10.
- NISHIKAWA, T. – EDELSTEIN, D. – DU, X. L. – YAMAGISHI, S. – MATSUMURA, T. –
- KANEDA, Y. – YOREK, M. A. – BEEBE, D. – OATES, P. J. – HAMMES, H. P. – GIARDINO, I. – BRWNLEE, M. 2002. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathway of hyperglycaemic damage. In *Nature*. ISSN 0028-0836, 2002, vol. 104, no. 6779, p. 787–790. doi:10.1038/35008121.
- NODE, K. a kol. 1997. Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17 β -estradiol role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 96, no. 6, p. 1953–1963. doi: 10.1161/01.cir.96.6.1953.
- NOVOTNY, J. L. a kol. 2009. Rapid estrogen receptor- α activation improves ischemic tolerance in aged female rats through a novel protein kinase c epsilon-dependent mechanism. In *Endocrinology*. ISSN 0013-7227, vol. 150, no. 2, p. 889–896. doi: 10.1210/en.2008-0708.
- NUEDLING, S. a kol. 1999. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 43, no. 3, p. 666–674. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00093-0.
- OŠTÁDAL, B. – KOLÁŘ, F. 1999. Cardiac ischemia: From injury to protection. 1st ed. Praha : Kluwer Academic publisher, p. 173, ISBN 0-7923-8642-6.
- ODUIT, G. Y. a kol. 2003. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 108, no. 17, p. 2147–2152. doi: 10.1161/01.cir.0000091403.62293.2b.
- ODUIT, G. Y. a kol. 2004. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ISSN 0022-2828, vol. 37, no. 2, p. 449–471. doi: 10.1016/j.jmcc.2004.05.015.
- PARRATT, J. – VEGH, A. 1994. Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. In *Cardioscience*. ISSN 1050-5007, vol. 5, no. 1, p. 9–18.
- PENG, W. J. a kol. 2004. Effect of estrogen replacement treatment on ischemic preconditioning in isolated rat hearts. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. ISSN 0008-4212, vol. 82, no. 5, p. 339–344. doi: 10.1139/y04-024.
- PHILIP, K. L. a kol. 2006. Greater antiarrhythmic activity of acute 17 β -estradiol in female than male anaesthetized rats: correlation with Ca²⁺ channel blockade. In *British Journal of Pharmacology*. ISSN 0007-1188, vol. 149, no. 3, p. 233–242. doi: 10.1038/sj.bjp.0706850.

- POTVIN, W. – VARMA, D. R. 1991. Down-regulation of myometrial atrial natriuretic factor receptors by progesterone and pregnancy and up-regulation by oestrogen in rats. In *Journal of Endocrinology*. ISSN 0022-0795, vol. 131, no. 2, p. 259–266. doi: 10.1677/joe.0.1310259
- PRZYKLENK, K. – KLONER, R. A. 1998. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. In *Progress in Cardiovascular Diseases*. ISSN 0033-0620, vol. 40, no. 6, p. 517–547. doi: 10.1016/s0033-0620(98)80002-9.
- RAVINGEROVÁ, T. a kol. 1999. Reactive oxygen species contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. In *Life Sciences*, ISSN 0024-3205, vol. 65, no. 18–19, p. 1927–1931. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00449-x.
- RAVINGEROVÁ, T. a kol. 2009. Subcellular mechanisms of adaptation in the diabetic myocardium: Relevance to ischemic preconditioning in the nondiseased heart. In *Experimental and Clinical Cardiology*, vol. 15, no. 4, p. 68–76. PMID:21264077.
- REN, J. – HINTZ, K. K. – ROUGHEAD, Z. K. F. – DUAN, J. – COLLIGAN, P. B. – REN, B. H. – LEE, K. J. – ZENG, H. 2003. Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, 2003, vol. 284, no. 5, p. 1800–1807.
- REVANKAR, C. M. a kol. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. In *Science*. ISSN 0193-4511, vol. 307, no. 5715, p. 1625–1630. doi: 10.1126/science.1106943.
- ROSSOUW, J. E. a kol. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. In *Journal of the American Medical Association*. ISSN 0098-7484, vol. 288, no. 3, p. 321–333. doi: 10.1016/s1062-1458(02)00919-4.
- SABA, S. a kol. 2002. Effects of estrogen on cardiac electrophysiology in female mice. In *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. ISSN 1045-3873, vol. 13, no. 3, p. 276–280. doi: 10.1046/j.1540-8167.2002.00276.x.
- SAITO, T. a kol. 2009. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 105, no. 102, p. 343–352. doi: 10.1161/circresaha.108.190041.
- SCANTLEBURY, D. C. – BORLAUG, B. A. 2011. Why are women more likely than men to develop heart failure with preserved ejection fraction? In *Current Opinion in Cardiology*, ISSN 0268-4705, vol. 26, no. 6, p. 562–568. doi: 10.1097/hco.0b013e32834b7faf.
- SHIKI, K. a HEARSE, D. J. 1987. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. In *The American journal of physiology*. ISSN 0002-9513, vol. 253, no. 6, p. H1470–H1476.
- SHINMURA, K. a kol. 2008. Loss of ischaemic preconditioning in ovariectomized rat hearts: possible involvement of impaired protein kinase C ϵ phosphorylation. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 79, no. 3, p. 387–394. doi: 10.1093/cvr/cvn086.
- SIMONICI, T. a kol. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. In *Nature*. ISSN 0028-0836, vol. 407, no. 6803, p. 538–541. doi: 10.1038/35035131.
- SONG, X. – a kol. 2003. Effects of sex, gonadectomy, and oestrogen substitution on ischaemic preconditioning and ischaemia-reperfusion injury in mice. In *Acta Physiologica Scandinavica*. ISSN 0001-6772, vol. 177, no. 4, p. 459–466. doi: 10.1046/j.1365-201x.2003.01068.x.
- SOVERSHAEV, M. A. a kol. 2006. Preconditioning by 17 β -estradiol in isolated rat heart depends on PI3-K/PKB pathway, PKC, and ROS. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, vol. 291, no. 4, p. 1554–1562. doi: 10.1152/ajpheart.01171.2005.
- SPEECHLY-DICK, M. E. a kol. 1994. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 75, no. 3, p. 586–590. doi: 10.1161/01.res.75.3.586.
- SUSSMAN, M. A. 2003. Gender differences in heart failure. In PUGSLEY, M. K. *Cardiac drug development guide*. 1st ed. Totowa : Humana Press Inc. 2003. p. 356, ISBN 1-58829-097-2.
- TONG, H. a kol. 2000. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 87, no. 4, p. 309–315. doi: 10.1161/01.res.87.4.309.
- TREPANIER-BOULAY, V. a kol. 2001. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. In *Circulation Research*. ISSN 0009-7330, vol. 89, no. 5, p. 437–444. doi: 10.1161/hh1701.095644.
- TURCATO, S. – TURNBULL, L. – WANG, G. Y. – HONBO, N. – SIMPSON, P. C. – KARLINER, J. S. – BAKER, A. J. 2006. Ischemic preconditioning depends on age and gender. In *Basic Research in Cardiology*. ISSN 0300-8428, 2006, vol. 101, no. 3, p. 235–243. doi: 10.1007/s00395-006-0585-4.
- VAN EICKELS, M. a kol. 2001. 17 β -estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. In *Circulation*. ISSN 0009-7322, vol. 104, no. 12, p. 1419–1423. doi: 10.1161/hc3601.095577.
- VÉGH, A. a kol. 1992. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anesthetized dogs and rats. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 26, no. 5, p. 487–495. doi: 10.1093/cvr/26.5.487.
- WAINWRIGHT, C. L. a PARRATT, J. R. 1993. Effects of R-PIA, a selective A1 adenosine agonist, on haemodynamics and ischaemic arrhythmias in pigs. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, vol. 23, no. 1, p. 84–89. doi: 10.1093/cvr/27.1.84.
- WALKER, M. J. – CURTIS, M. J. – HEARSE, D. J. – CAMPBELL, R. W. – JANSE, M. J. – YELLON, D. M. – COBBE, S. M. –

- COKER, S. J. - HARNES, J. B. - HARRON, D. W. - HIGGINS, A. J. - JULIAN, D. J. - LAB, M. J. - MANNING, A. S. - NOETHOVER, B. J. - PARRATT, J. R. - REIMERSMA, R. A. - RIVA, E. - RUSSEL, D. C. - SHIERIDAN, D. J. - WINSLOW, E. - WOODWARD, B. 1988. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. In *Cardiovascular Research*. ISSN 0008-6363, 1988, vol. 22, no. 7, p. 447-455. doi: 10.1093/cvr/22.7.447.
- WANG, M. a kol. 2005. Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury. In *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. ISSN 0193-1849, vol. 288, no. 2, p. 321-326. doi: 10.1152/ajpendo.00278.2004.
- WANG, M. a kol. 2006. Estrogen receptor- α mediates acute myocardial protection in females. In *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. ISSN 0363-6135, vol. 290, no. 6, p. 2204-2209. doi: 10.1152/ajpheart.01219.2005.
- WANG, M. a kol. 2009. Estrogen receptor beta mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia. In *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. ISSN 0363-6119, vol. 296, no. 4, p. 972-978. doi: 10.1152/ajpregu.00045.2009.
- YELLON, D. M. a DOWNEY, J. M. 2003. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. In *Physiological Reviews*. ISSN 0031-9333, vol. 83, no. 4, p. 1113-1151. doi: 10.1152/physrev.00009.2003.
- ZUCCHI, R. a kol. 2001. Modulation of sarcoplasmic reticulum function: a new strategy in cardioprotection? In *Pharmacology & Therapeutics*. ISSN 0163-7258, vol. 89, no. 1, p. 47-65. doi: 10.1016/s0163-7258(00)00103-0.

Vplyv dospievania na odpoveď myokardu na ischémiu a na adaptačné procesy v srdci potkana: štúdium molekulárnych mechanizmov

Lucia Griecsová

Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
lucia.griecsova@savba.sk

ABSTRAKT

Úvod: Znížená odolnosť srdca voči ischemicko-reperfúznemu (I/R) poškodeniu bola preukázaná v mnohých štúdiách na človeku aj na animálnych modeloch. Presné bunkové mechanizmy tohto nepriaznivého fenotypu však nie sú dodnes plne objasnené. Starnutie môže interferovať aj s mechanizmami prirodzenej ochrany myokardu (preconditioning, PC) a spôsobovať zmeny v protektívnych signalizačných kaskádach. **Metodika:** V našej štúdii sme skúmali účinky dospievania na funkciu srdca, jeho odpoveď na ischémiu a na vybrané proteíny zahrnuté v kaskáde „prežitia“ u juvenilných (1,5 mes.), mladších dospelých (3 mes.) a starších dospelých (6 mes.) samcov potkana Wistar. Srdcia boli perfundované na Langendorffovej aparátúre, vystavené 30-min. I/120-min. R s PC indukovaným jedným cyklom 5-min. I/5-min. R alebo bez neho. Merali sme veľkosť infarktovej zóny (IS), citlivosť na ventrikulárne arytmie a kontraktilnú funkciu srdca (LVDP). V paralelných skupinách boli odoberaté vzorky tkaniva za bazálnych podmienok a po I/R pre detekciu hladín proteínov: proteínkináza B (Akt), fosforylovaná (aktivovaná) Akt (p-Akt) a endotelová NO syntáza (eNOS). **Výsledky:** Dospievanie zhoršilo odpoveď srdca voči letálnemu I/R poškodeniu (zväčšená veľkosť infarktu), zvýšilo arytmogénzu a tieto zmeny boli viac viditeľné u mladších skupín zvierat. Funkčná obnova (LVDP) vekom ovplyvnená nebola. PC potlačil výskyt malígnych arytmií, zmenšil veľkosť infarktu a zlepšil obnovu LVDP u mladších skupín, zatiaľ čo jeho účink bol u staršej skupiny potlačený. Strata kardioprotektívneho účinku PC bola spojená so zníženou bazálnou aj post-IR hladinou Akt, pAkt a eNOS u staršej skupiny zvierat. Taktiež došlo k poklesu

v PC-indukovanej upregulácii týchto proteínov u staršej (6 mes.) skupiny v porovnaní s mladšou (3 mes.). **Záver:** S vekom spojené zmeny v odpovedi srdca na ischémiu môžu byť spôsobené potlačením prirodzených mechanizmov kardioprotekcie v dôsledku disfunkcie proteínov zahrnutých v protektívnej bunkovej signalizácii, ktorá môže nastať už počas procesu dospievania.

Kľúčové slová: ischémia, vek, odolnosť, preconditioning, signalizačné kaskády.

ABSTRACT

Background: Reduced tolerance to ischemia/reperfusion (I/R) injury has been shown in elder human and animal hearts, however, the onset of this unfavorable phenotype and cellular mechanisms behind remain unknown. Moreover, aging may interfere with the mechanisms of innate myocardial protection (preconditioning, PC) and cause defects in protective cell signaling. **Methods:** We studied the changes in myocardial function, response to ischemia and selected proteins involved in “pro-survival” pathways in the hearts from juvenile (1.5 months), younger adult (3 months) and mature adult (6 months) male Wistar rats. In Langendorff-perfused hearts exposed to 30-min I/120-min R without or with prior PC (one cycle of 5-min I/5-min R), we measured infarct size (IS, TTC staining), susceptibility to reperfusion arrhythmias and recovery of contractile function (left ventricular developed pressure, LVDP). In parallel groups, LV tissue was sampled for the detection of protein levels (WB) of Akt kinase, phosphorylated (activated) Akt (p-Akt) and endothelial NO synthase (eNOS). **Results:** Maturation impaired cardiac

response to lethal I/R injury (increased IS) and promoted arrhythmogenesis and these changes were more markedly evident in the younger groups of animals. Functional recovery (LVDP) was not affected by aging. PC reduced occurrence of malignant arrhythmias, IS and improved LVDP recovery in younger animals, while its efficacy was attenuated in the mature adults. Loss of PC protection was associated with age-dependent reduced Akt phosphorylation and levels of eNOS in the hearts of mature animals compared with the younger ones, as well as with a failure of PC to upregulate these proteins in the elder (6 months) group. Conclusion: Aging-related alterations in myocardial response to ischemia may be caused by dysfunction of proteins involved in protective cell signaling that may occur already during the process of maturation.

Key words: ischemia, aging, tolerance, preconditioning, signaling pathways.

ÚVOD

V rebríčku tých najzávažnejších a najrozšírenejších ochorení dnešnej doby zastávajú kardiovaskulárne ochorenia (KVO) popredné miesta. Ich výskyt a úmrtnosť na ne sú najvyššie v rozvinutých krajinách sveta. Ischemická choroba srdca, ako jedno z KVO, sa podieľa na týchto úmrtiach asi 50 percentami, čo činí vyše 7 miliónov úmrtí ročne. Jej najčastejšou príčinou býva aterosklerotické poškodenie koronárnych tepien. Okrem toho, rozvoj ischemickej choroby priamo ovplyvňujú aj viaceré rizikové faktory a ochorenia, akými sú hypertenzia, diabetes mellitus alebo vek. Práve vek ešte viac podnecuje nárast hypertenzie alebo diabetu. Vek vplýva na kardiovaskulárny systém (KVS) ako nezávislý rizikový faktor. Starnutie ovplyvňuje KVS od tej najnižšej úrovne DNA cez mitochondrie, kardiomyocyty až po celé tkanivo srdca. Mnohé štúdie sa už dlhé roky intenzívne zaoberali vplyvom veku na ischemiu. Výskum sa však za niekoľko posledných rokov posunul ďalej a štúdie sa dnes už zaoberajú aj vplyvom veku na adaptáciu srdca (ischemický preconditioning, PC). Vedecké tímy sa v súčasnej dobe výrazne venujú hlavne objasneniu molekulárnej podstaty PC, jej jednotlivých kaskád a skúmajú aj vplyv viacerých rizikových faktorov vrátane veku. Napriek tomu, vplyv veku na odolnosť srdca nie je plne objasnený a výsledky viacerých štúdií na rôznych animálnych mode-

loch sa líšia a bývajú neraz protichodné. Je preto potrebné venovať sa tejto problematike naďalej a hlbšie študovať aj molekulárnu podstatu tohto fenoménu, aby sme sa mohli v budúcnosti dopracovať k jeho vhodnejšiemu klinickému využitiu.

ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDCA

Slovo ischemia bolo pôvodne odvodené z dvoch gréckych slov „ischein“ (zabrániť/ obmedziť) a „haima“ (krv). Aj napriek tomu, že za posledné roky bola ischemia srdca jednou z najvýznamnejších študovaných tém v kardiovaskulárnom výskume, o jej správnej definícii sa dlho diskutovalo (Hearse, 1994). Mnoho vedcov preferuje definovať ischemiu ako nerovnováhu medzi dodávkou kyslíka a substrátov do srdca a ich spotrebou v samotnom srdci, ktorá vedie k anaeróbnemu metabolizmu a redukcii kontraktilnej funkcie (Verdouw a kol., 1998). Jednou z najnovších definícií ischemie je definícia ischemickej choroby srdca od Špinara: Ischemická choroba srdca (ICHs) je ochorenie srdcového svalu, spôsobené akútnym alebo chronickým obmedzením, alebo až zastavením prítoku krvi vplyvom zmien na koronárnych tepnách do určitej oblasti myokardu, kde vzniká ischemia alebo nekróza. Najčastejšia príčina vzniku ischemie je aterosklerotické poškodenie koronárnych tepien (Špinar, 2003).

Adaptácia srdca a jej formy

Myšlienka vlastnej ochrany srdca pred ischemiou je založená na dôkazoch, že srdce samo je schopné sa chrániť voči škodlivým následkom ischemie, a to cestou adaptácie na rôzne formy mierneho stresu. Tie zahŕňajú prechodnú ischemiu (ischemický preconditioning, PC), hypoxiu, hyperglykémiu, ako aj farmakologický preconditioning, a všetky sa vyznačujú schopnosťou zvýšiť odolnosť srdca pred nasledujúcou trvalou ischemiou (Ravingerová, 2007). Ischemický preconditioning bol po prvýkrát popísaný Murrym a kol. (1986) a definovaný ako zvýšená odolnosť srdca voči dlhšie trvajúcej ischemii spôsobená krátkymi periódami predchádzajúcej ischemie.

Molekulárna podstata preconditioningu

Aj keď molekulárne mechanizmy ischemického preconditioningu nie sú dodnes plne objasnené, roky rozsiahlych štúdií na animálnych mode-

loch už charakterizovali rôzne bunkové signály zodpovedné za zníženie I/R poškodenia (Murphy a Steenbergen, 2008). Cyklus PC pozostávajúci z krátkej ischémie a krátkej reperfúzie spôsobuje uvoľnenie substancií (adenozín, bradykinín, opioidy) z ischemického myokardu, ktoré pôsobia cez receptory spriahnuté s G-proteínmi a spúšťajú viaceré signalizačné kaskády. Ochrana, ktorú môže poskytovať každý z týchto agonistov, môže byť blokovaná inhibíciou proteínkinázy C (PKC), čo svedčí o jej centrálnom význame ako spoločného menovateľa v tejto kaskáde. Bradykinín a opioidy stimulujú PKC ϵ cestou kaskády fosfatidylinozitol 3-kinázy (PI3K), ktorá zahŕňa aktiváciu Akt kinázy, endoteliálnej NO syntázy (eNOS), guanylátcyklázy (GC), proteínkinázy G (PKG) a otvorenie mitochondriálnych draslíkových ATP kanálov (mKATP) (Korzick a Lancaster, 2013). Okrem toho, PKC môže byť aktivovaná prostredníctvom adenosínu alebo guanylátcyklázy prostredníctvom natriuretického peptidového receptora (Juhaszova a kol., 2005; Heusch a kol., 2008). Následný prísun draslíka do mitochondrií, vyvolaný otvorením mKATP kanálov, vedie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Tie pôsobia ako druhý posol pre aktiváciu PKC ϵ . Hoci je PKC ϵ kriticky dôležitá v kaskáde PC, nepôsobí ako efektor kardioprotekcie, ale skôr ako rozhodujúci medziprodukt pri prenose ochrannej signalizácie do mitochondrií a pri zahájení bunkovej ochrany počas reperfúzie. PKC ϵ aktivuje počas reperfúzie obidve kinázové kaskády dôležité pre prežitie bunky, PI3K/Akt a MEK1/2–ERK1/2 (kináza regulujúca MAP kinázu ERK1/2). Obe kaskády fosforylujú a inaktivujú mitochondriálnu kinázu glykogénsyntázy-3 β (GSK-3 β). To má za následok inhibíciu mitochondriálnych pórov prechodnej (tranzientnej) permeability (MPTP), ktoré sú pokladané za konečný efektor PC. Indukcia MPTP póru spôsobuje stratu mitochondriálneho membránového potenciálu, čo ohrozuje schopnosť bunky tvoriť ATP. Tým dochádza k bunkovému edému, lýze mitochondriálnej membrány buniek až nekróze, čo má za následok uvoľnenie cytochrómu c a iniciáciu apoptózy. PKC ϵ zabráňuje otvoreniu MPTP počas reperfúzie nielen aktiváciou Akt a ERK1/2, ale aj priamou fosforyláciou a inhibíciou GSK-3 β , aktiváciou mKATP kanálov, fosforyláciou možných MPTP regulačných proteínov, ako sú napätovo-závislý iónový kanál (VDAC) a adenínový jadrový transportér (ANT). Boli preukázané aj ďalšie úlohy PKC ϵ počas PC, a to v regulácii bunkového redoxného stavu prostredníctvom prepojenia

s eNOS (Korzick a Lancaster, 2013). Schopnosť PC inhibovať otváranie MPTP kanálov počas I/R poškodenia sa teda javí ako kľúčový bod z hľadiska bunkového prežívania (Heusch a kol., 2008). Hoci PC je dnes označovaný ako „zlatý štandard“ ochrany srdca, veľký počet vedcov v súčasnosti zastáva názor, že ochranný potenciál PC je iba prechodný (Ferdinandy a kol., 2007).

Adaptačné mechanizmy a zmeny v signálnej kaskáde ischemického preconditioningu v súvislosti s vekom

Vplyv starnutia na schopnosť preconditioningu chrániť myokard pred I/R poškodením bol intenzívne študovaný. Vo väčšine štúdií sa s narastajúcim vekom preukázala strata kardioprotekcie vyvolanej pomocou PC (Schulman a kol., 2001; Boengler a kol., 2007). V ďalších pokusoch však bola kardioprotekcia dosiahnutá pomocou PC aj u stredne starých potkanov, ale iba v prípade zvýšenia počtu stimulov PC, k čomu však nedošlo v prípade starších potkanov (Schulman a kol., 2001).

Rovnako aj mnohé klinické štúdie dokázali zníženú schopnosť kardioprotekcie vyvolanej tranzientnou anginou pectoris (analog PC) u ľudí v staršom veku (Lee a kol., 2002; Bartling a kol., 2003). Bolo zistené, že prítomnosť tzv. predinfarktovej angíny 48 hodín pred akútnym infarktom myokardu poskytovala ochranu starším pacientom vo veku do 65 rokov. U pacientov vo veku nad 65 rokov však tento efekt nebol až tak preukázateľný (Abete a kol., 1997).

Pokles ischemickej tolerancie s narastajúcim vekom koreluje so zmenami v bunkovej expresii proteínov zapojených do kardioprotektívnej signalizácie. Dôvodom je fakt, že v starnúcom srdci je viacero génov odlišne exprimovaných a medzi tieto gény patria aj tie, ktoré kódujú proteíny zapojené do signálnej transdukcie PC (Taylor a Starnes, 2003).

Znížená odpoveď starnúceho srdca na kardioprotektívny stimul môže mať však v prvom rade pôvod v zníženej hladine extracelulárnych ligandov. Konkrétne bolo preukázané zníženie hladiny IGF-1 v srdci starých potkanov (26 mesiacov). Ďalší faktor, ktorý môže ovplyvňovať odpovede srdca na kardioprotektívny stimul v súvislosti s vekom, je úroveň expresie sarkolemálnych receptorov. Nielen hladina ligandu, ale aj expresia IGF-1 receptora bola u potkaních srdiec s vekom preukázateľne znížená (Leri a kol., 2000). V srdciach starých potkanov

bola dokázaná aj znížená expresia bradykinínového receptora 2, ktorého úlohou je sprostredkovanie kardioprotekcie pomocou PC (Kintsurashvili a kol., 2005). Avšak pri kardioprotekcii indukovanej adenosínom nebola jej strata v staršom srdci spojená so znížením expresie receptora, ale dôvodom bolo skôr zníženie hladiny signálnych prvkov (Willems a kol., 2005).

Jednou z kináz zapojených do PC, ktorá sa tiež s vekom mení, je aj PKC. PC je spojený s translokáciou PKC z cytozolu do membránovej frakcie a následnou aktiváciou mKATP kanálov. Translokácia PKC je v staršom srdci porušená a tým sa pravdepodobne podieľa na znížení kardioprotekcie. Okrem toho, jednotlivé izoformy PKC môžu mať rôzne účinky na PC (Boengler a kol., 2009). Porucha ischemickej tolerancie s narastajúcim vekom bola u potkaních samcov spojená so zvýšenou bazálnou expresiou PKC δ a tiež mohla byť zlepšená inhibíciou PKC δ (Kostyak a kol., 2006). Taktiež bolo dokázané aj zníženie expresie PKC ϵ a zvýšenie expresie GSK-3 β v mitochondriách počas ischemie. Zvýšenie expresie PKC ϵ jej akútnou aktiváciou odstránilo tento negatívny účinok (Korzick a kol., 2007). Aj klinické štúdie na starších pacientoch, ktorí podstúpili koronárnu angiografiu, preukázali zhoršenú reakciu na PC a slabšiu aktiváciu KATP kanálov. K obnoveniu kardioprotekcie indukovanej pomocou PC následne dopomohlo podanie nicorandilu, agonistu KATP kanálov (Lee a kol., 2002).

Ďalším z proteínov, ktorého expresia sa s vekom mení, je aj eNOS a jeho fosforylovaná forma (p-eNOS). V staršom veku bola dokázaná práve znížená expresia eNOS a pomeru p-eNOS/eNOS (Iemitsu a kol., 2006).

Kardioprotekcia indukovaná pomocou PC sa vyznačuje zvýšenou fosforyláciou proteínkináz, ako sú: Akt, GSK-3 β , ako aj ERK1/2 a p38 MAPK (mitogénmi aktivované proteínkinázy), a v staršom srdci dochádza k zmenám v ich expresii a aktivácii (Boengler a kol., 2009). Expresia Akt s vekom sa v rôznych štúdiách líši. V štúdiu podľa Hunter a kol. (2007) bola preukázateľne zvýšená u potkanov vo veku 23 mesiacov. V štúdiu podľa Iemitsu a kol. (2006) však preukázali zníženie hladín fosforylovanej Akt (p-Akt) a aj pomeru p-Akt/Akt v staršom veku.

CIELE

1. Skúmať vplyv dospievania na funkciu a odolnosť srdca potkana voči ischemii,

2. objasniť, v akom vekovom štádiu začína dochádzať k zmenám v účinnosti ochranných adaptačných mechanizmov (preconditioning),
3. preskúmať signálne dráhy kardioprotekcie v závislosti od veku (porovnať zmeny v hladinách vybraných proteínov).

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá

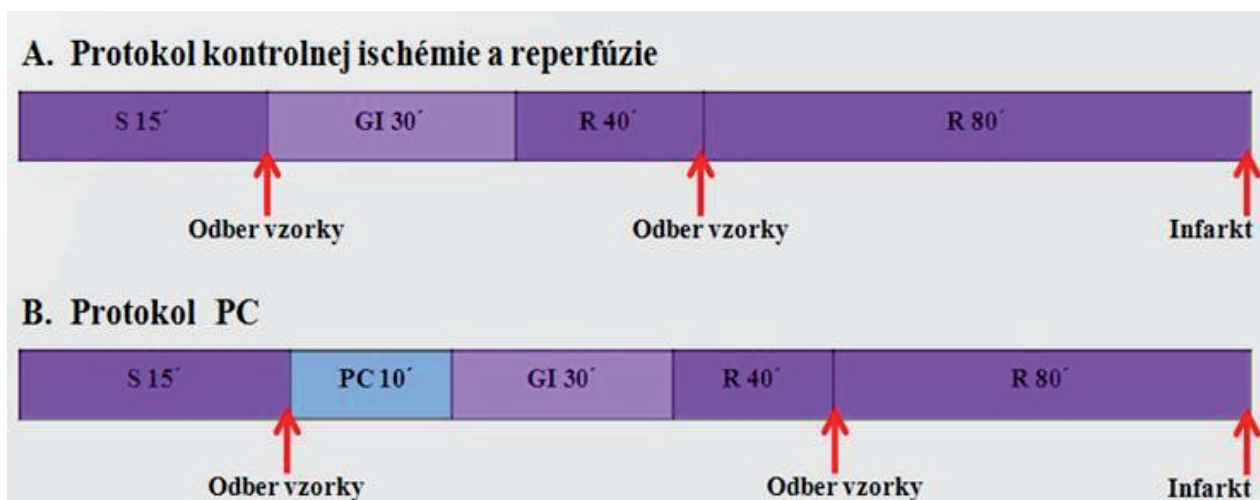
V experimentoch sme použili samce potkana laboratórneho, kmeňa Wistar vo veku 1,5 mesiaca, 3 mesiace a 6 mesiacov o hmotnosti 220 – 440 gramov. Zvieratá boli chované v klietkach po 3 – 4 jedincoch, v štandardných podmienkach chovných noriem, kŕmené štandardnou peletovou zmesou a s prístupom k potrave a vode *ad libitum*. Vo zverinci bola udržiavaná stála teplota 20 – 22 °C a prirodzený svetelný režim (12 hod. svetlo a 12 hod. tma). Všetky postupy boli vykonávané v súlade s „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (NIH, 1996) a schválené etickou komisiou Ústavu pre výskum srdca SAV a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR.

Perfúzia izolovaného srdca potkana

Zvieratá boli anestetizované intraperitoneálnym podaním pentobarbitalu (50 – 60 mg/kg) v kombinácii s heparínom (500 IU). Po anestéze boli srdcia vyoperované, izolované v ľadovom fyziologickom roztoku a prenesené na perfúziu aparáturu (ADInstruments, Nemecko), kde boli kanylované cez aortu a perfundované Krebsovým-Henseleitovým purom podľa metódy Langendorffa. Tlmiivý Krebs-Henseleitov pufr (K-H) bol saturovaný zmesou plynov O₂ a CO₂ v objemovom pomere 95 : 5 (pH 7,4) a obsahoval nasledujúce chemikálie (v mM): glukóza 5,5; NaCl 118,0; CaCl₂ 1,6; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,18; KH₂PO₄ 1,28; KCl 3,0. Perfúzia prebiehala pri teplote 37 °C a konštantnom perfúznom tlaku 73 mmHg.

Navodenie globálnej ischemie a reperfúzie

Po zahájení perfúzie boli srdcia vo všetkých skupinách 20 minút stabilizované. Následne boli vystavené 30-minútovej globálnej ischemii, ktorá bola navodená zastavením prítoku perfúzneho roztoku. Po ischemii bol koronárny prietok



Obr. 1. Priebeh jednotlivých experimentálnych protokolov: S – stabilizácia; GI – globálna ischémia; R – reperfúzia; PC – ischemický preconditioning.

obnovený a srdcia boli vystavené 120-minútovej reperfúzii.

Experimentálne protokoly

V práci boli použité dva experimentálne protokoly:

- Protokol kontrolnej ischémie a reperfúzie pozostával z 20-minútovej stabilizácie, po ktorej nasledovala 30-minútová globálna ischémia a 120-minútová reperfúzia.
- Protokol ischemického preconditioningu (PC) sa v porovnaní s protokolom A odlišoval iba v tom, že po 20-minútovej stabilizácii bol vyvolaný PC: 5 minút ischémie a 5 minút reperfúzie. Ďalej protokol pokračoval rovnako, ako v protokole A (Obr. 1).

Meranie a zaznamenávanie funkčných parametrov myokardu

Funkčné parametre myokardu boli merané a vyhodnocované kontinuálne za pomoci počítačového programu PowerLab/8SP Chart 7. Ľavokomorový (LV) tlak bol meraný za pomoci neelastického kvapalinou naplneného balónika, ktorý bol vložený do ľavej komory a napojený na tlakový snímač (MLP, ADInstruments, Nemecko). Elektrogram bol zaznamenávaný pomocou elektród umiestnených na kanyle a epikarde. Parametrami monitorovanými počas experimentálneho protokolu boli: koronárny prietok (CF), frekvencia srdca (HR), hodnoty ľavokomorového systolického tlaku (LVSP), ľavokomorového koncov-diastolického tlaku (LVEDP), ľavokomorového vyvinutého tlaku

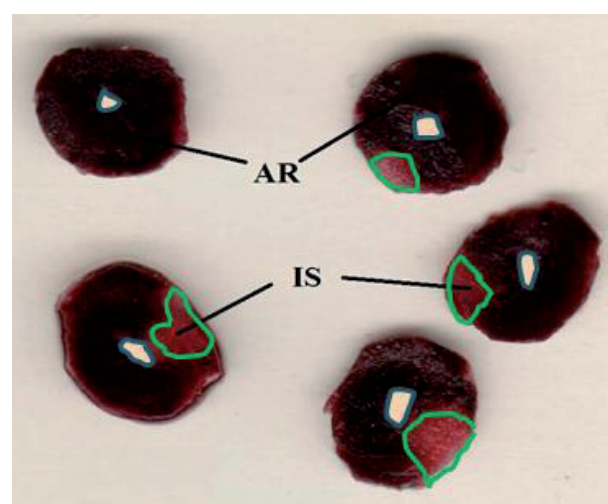
(LVDP) a maximálnej rýchlosti vzostupu a poklesu LV tlaku ($+(dP/dt)_{\max}$, $-(dP/dt)_{\max}$).

Vyhodnotenie počtu arytmií

Reperfúzne arytmie sme analyzovali zo záznamu elektrogramu počas prvých 10 minút reperfúzie a hodnotili na základe Lambethskej konvencie (Walker a kol., 1988). Zamerali sme sa na hodnotenie trvania komorových tachykardií (VT).

Stanovenie veľkosti infarktovej zóny

Veľkosť infarktovej zóny bola stanovená farbením srdca pomocou 2,3,5-trifenyltetrazólium chloridu (TTC). Po farbení boli srdcia nakrájané (kolmo na dlhú os srdca) na cca. 1 mm tenké rezy, ktoré



Obr. 2. Stanovenie veľkosti infarktu na rezoch z ľavej komory myokardu potkana. IS – infarktová oblasť, AR – riziková oblasť.

boli následne vyhodnotené pomocou metódy počítačovej planimetrie. Riziková oblasť (AR) predstavuje celú plochu ľavej komory. Veľkosť infarktovej oblasti (IS) je vyjadrená ako pomer infarktovej plochy k rizikovej oblasti v percentách (IS/AR).

Stanovenie expresie proteínov analýzou Western blot

Tkanivové vzorky sme odoberali z ľavej srdcovej komory a to v 20 minúte stabilizácie (kontrolné vzorky), v 40 minúte reperfúzie (I/R vzorky) a v 40 minúte reperfúzie s predchádzajúcim preconditioningom (PC vzorky). Tkanivá sme zmrazili v tekutom dusíku a resuspendovali v ľadovom homogenizačnom roztoku. Následne sme vzorky homogenizovali teflónovým homogenizátorom. Pripravené homogenáty sme odstreďovali 5 minút pri $800 \times g$. Po centrifugácii sme z homogenátov odstránili pelet a zostávajúci supernatant sme opäť odstredili pri $16100 \times g$ po dobu 30 minút. Takto pripravené postmitochondriálne supernatanty po druhom odstredení (označované aj ako solubilná frakcia) sme použili pre ďalšiu analýzu. Koncentráciu proteínov sme stanovili Bradfordovou metódou.

Vzorky proteínových frakcií obsahovali rovnaké množstvo proteínov na jednu jamku. Pripravené vzorky sme následne zmiešali so vzorkovým roztokom a naniesli na polyakrylamidový gél (10 %), kde sa proteíny prítomné vo vzorke pomocou SDS-PAGE elektroforézy (dodecyl sulfát sodný – SDS, elektroforéza na polyakrylamidovom géle – PAGE) rozdelili podľa ich veľkosti. Po elektroforetickej separácii sme pomocou Western blotovej aparatury preniesli proteíny z gélu na nitrocelulóзовú membránu. Ako primárne protilátky sme použili: anti-Akt, anti-p-Akt, anti-eNOS a ako sekundárnu protilátku anti-rabbit polyclonal HRP. Proteíny sme potom vizualizovali chemiluminiscenčnou metódou (ECL). Výsledky sme analyzovali za pomoci softvéru CARESTREAM, Kodak In-Vivo Multispectral Imagin System a boli vztiahnuté na hodnoty GAPDH (anti – GAPDH protilátky) pre zabezpečenie vnútornej kontroly.

Analýza a štatistické spracovanie dát

Výsledky sú prezentované ako priemerné hodnoty $\pm$ stredná chyba priemeru (SEM). Na zistenie rozdielov medzi jednotlivými skupinami boli použité testy: test variančnej analýzy (one-way ANO-

VA) a post-hoc (multiple comparisons) testy – Bonferroni a Šidakov test. Na hodnotenie arytmií bol použitý Mann-Whitney test. Za štatisticky významné boli považované rozdiely s $P < 0.05$.

VÝSLEDKY

Vplyv veku na biometrické parametre zvierat

Vek výrazne ovplyvnil biometrické parametre potkana. Oba parametre, aj hmotnosť tela, aj srdca potkana, sa so stúpajúcim vekom signifikantne zvyšovali. Najväčší nárast celkovej hmotnosti tela sme zaznamenali medzi 3. a 6. mesiacom života zvierat, pokiaľ hmotnosť srdca narastala postupne od 1,5 do 6 mesiacov.

Vplyv veku na základné hemodynamické parametre srdca potkana

Pri pozorovaní vplyvu veku na základné hemodynamické parametre srdca potkana neboli u pozorovaných parametroch (HR, LVSP, LVEDP, LVDP, $+(dP/dt)_{\max}$, $-(dP/dt)_{\max}$ a CF) preukázané žiadne signifikantné zmeny v závislosti od veku zvierat.

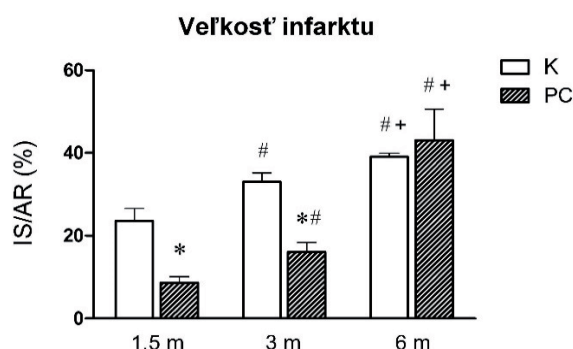
Vplyv veku a preconditioningu na ischemicko – reperfúzne poškodenie myokardu

Vplyv veku a preconditioningu na veľkosť infarktovej zóny

Stúpajúci vek výrazne ovplyvnil rozsah letálneho poškodenia (veľkosť infarktovej zóny) po I/R poškodení u kontrolných skupín zvierat. Vo veku 3 mesiacov došlo k signifikantnému zväčšeniu veľkosti infarktu v porovnaní s 1,5-mesačnou skupinou (3 mes.: $(33,0 \pm 2,2) =$ vs. $(23,6 \pm 3,0) \%$; # – $P < 0,05$). Taktiež bolo preukázané, že aj vo veku 6 mesiacov došlo k signifikantnému zvýšeniu veľkosti IS v porovnaní s 3 mesačnou skupinou (6 mes.: $(39,0 \pm 0,9) \%$ vs. $(33,0 \pm 2,2) \%$; # – $P < 0,05$; Obr. 3).

U skupín zvierat adaptovaných na PC, pri porovnávaní skupín v rámci veku, dochádza taktiež k postupnému zväčšovaniu veľkosti infarktu rovnako ako pri neadaptovaných skupinách. Pri porovnávaní PC skupiny s kontrolnou skupinou u 1,5-mesačných ($(8,6 \pm 1,5) \%$ vs. $(23,6 \pm 3,0) \%$, * – $P < 0,05$ PC vs. K) aj u 3-mesačných zvierat ($(16,0 \pm 2,4) \%$ vs. $(33,0 \pm 2,2) \%$, * – $P < 0,05$ PC vs. K) môžeme

pozorovať zmenšenie veľkosti infarktu, a to z dôvodu pozitívneho efektu preconditioningu. Avšak u 6-mesačných zvierat neboli pozorované žiadne signifikantné zmeny medzi PC a kontrolnou skupinou. Preto sa nazdávame, že tieto zistenia zaznačujú zníženú účinnosť PC v staršej skupine zvierat.



Obr. 3. Vplyv veku na veľkosť infarktovej zóny u adaptovaných a neadaptovaných srdc potkana. K – kontrolná (neadaptovaná) skupina, PC – preconditioning (adaptovaná skupina), IS/AR (%) – veľkosť infarktovej zóny v percentách z rizikovej oblasti. Hodnoty sú uvedené ako priemery $\pm$ S.E.M. z 8 – 12 srdc v skupine. * – $P < 0,05$ PC vs. K; #, + – $P < 0,05$ – $0,01$ vs. 1,5 a 3 mes.

Vplyv veku a preconditioningu na obnovenie ľavokomorového vyvinutého tlaku po ischemii a reperfúzii

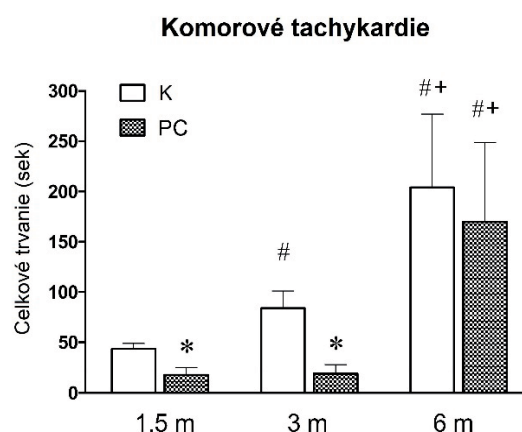
S narastajúcim vekom sme nezaznamenali žiadne signifikantné zmeny v hodnotách obnovenia ľavokomorového vyvinutého tlaku po ischemii reperfúzii pri ich porovnaní s východiskovými hodnotami (1,5 mes.: $68,9 \pm 6,7$; 3 mes.: $61,8 \pm 7,5$; 6 mes.: $74,3 \pm 3,8$; v % z východiskových hodnôt). Vplyv preconditioningu na obnovu LVDP sa však preukázal, a to u mladších skupín zvierat. Vo veku 1,5 aj 3 mesiace došlo k signifikantnému nárastu obnovy LVDP v PC skupine v porovnaní s kontrolnou skupinou (1,5 mes.: $80,8 \pm 4,2$ vs. $68,9 \pm 6,7$; 3 mes.: $77,1 \pm 5,8$ vs. $61,8 \pm 7,5$; * – $P < 0,05$ PC vs. K). Vo veku 6 mesiacov však neboli preukázané žiadne signifikantné zmeny v obnove LVDP v PC skupine v porovnaní s kontrolou, čo opäť potvrdzuje pokles účinnosti PC vo veku 6 mesiacov.

Vplyv veku a preconditioningu na výskyt reperfúzných arytmií

V práci sme sa zamerali na vplyv veku a preconditioningu na celkové trvanie komorových tachykardií. Opäť sa nám preukázal negatívny vplyv

veku. V experimentálnej skupine 3-mesačných zvierat sme zaznamenali výrazný nárast celkového trvania komorových tachykardií v porovnaní s 1,5-mesačnou experimentálnou skupinou ($84,0 \pm 17,0$ vs. $43,6 \pm 5,1$; v sekundách; # – $P < 0,05$). V skupine 6-mesačných zvierat došlo k ešte väčšiemu nárastu trvania komorových tachykardií a tento nárast bol signifikantný aj v porovnaní s 3-mesačnou skupinou ($204,0 \pm 73,0$ vs. $84,0 \pm 17,0$; + – $P < 0,05$). Rovnaký trend v náraste arytmogénity so stúpajúcim vekom pozorujeme aj v PC skupinách pri porovnávaní skupín v rámci veku.

Vplyv PC sme pozorovali na signifikantnom poklese celkového trvania komorových tachykardií pri porovnávaní PC skupín s kontrolou u 1,5 ($18,0 \pm 7,0$ vs. $43,6 \pm 5,1$; * – $P < 0,05$ PC vs. K) aj 3-mesačných zvierat ($19,0 \pm 9,0$ vs. $84,0 \pm 17,0$; * – $P < 0,05$ PC vs. K). U 6-mesačných potkanov však nedošlo k žiadnemu signifikantnému rozdielu v celkovom trvaní komorových tachykardií medzi PC a kontrolnou skupinou (Obr. 4).



Obr. 4. Vplyv veku na celkové trvanie komorových tachykardií u adaptovaných a neadaptovaných srdc potkana. K – kontrolná (neadaptovaná) skupina, PC – preconditioning (adaptovaná skupina). Hodnoty sú uvedené ako priemery $\pm$ S.E.M. z 8 – 12 srdc v skupine* – $P < 0,05$ PC vs. K; # – $P < 0,05$ vs. 1,5 mes., + – $P < 0,05$ vs. 3 mes.

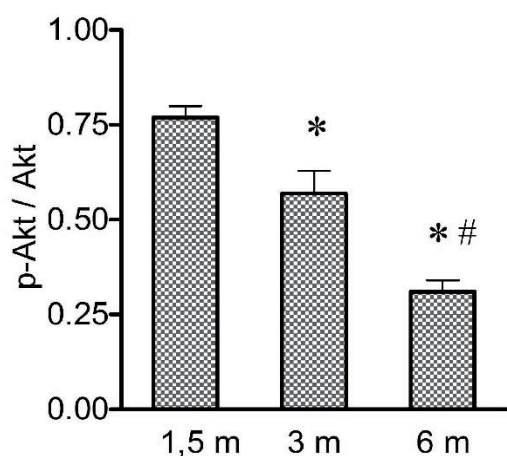
Vplyv veku na adaptačné mechanizmy a zmeny v signálnej kaskáde ischemického preconditioningu

Vplyv veku na fosforyláciu proteínu Akt a na hladiny proteínu eNOS v myokarde potkana za bazálnych podmienok

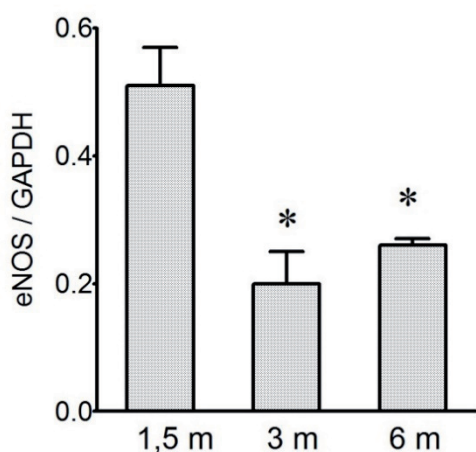
Pozorovali sme vplyv veku na aktiváciu (fosforyláciu) proteínu Akt, ktorá bola vyjadrená ako pomer

hladín fosforylovanej Akt (p-Akt) a celkovej Akt. S narastajúcim vekom sme zaznamenali postupné znižovanie pomeru p-Akt/Akt. Signifikantné zmeny boli pozorované už vo veku 3 mesiacov života potkana (pokles pomeru o 26 % v porovnaní s 1,5-mesačnou skupinou), ale aj neskôr vo veku 6 mesiacov života, a to v porovnaní aj s 1,5-mesačnou (pokles o 60 %) aj 3-mesačnou skupinou zvierat (pokles o 46 %) (Obr.5A). V hladinách proteínu eNOS sme so vzrastajúcim vekom zaznamenali ich výrazný pokles. Hladiny proteínu eNOS sa signifikantne znížili už vo veku 3 mesiacov (o 60 % voči 1,5 mes.), ale taktiež aj neskôr vo veku 6 mesiacov (o 49 % voči 1,5 mes.) v porovnaní s 1,5-mesačnou skupinou zvierat (Obr. 5B).

A



B



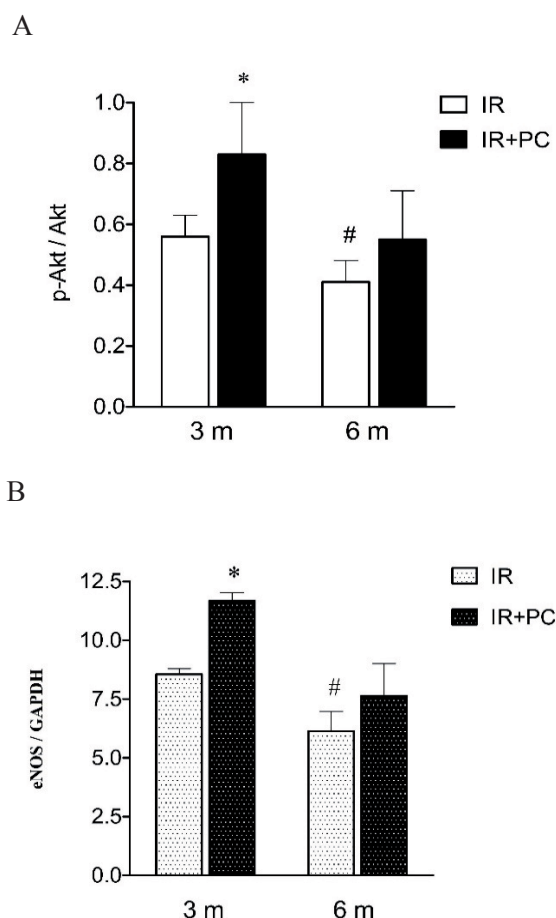
Obr. 5. Vplyv veku na hladiny vybraných proteínov v myokarde potkana za bazálnych podmienok. A. Vplyv veku na fosforyláciu (aktiváciu) proteínu Akt. B. Vplyv veku na hladiny proteínu eNOS. p-Akt/Akt – pomer fosforylovanej a celkovej Akt, obe vztiahnuté ku GAPDH. eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého, vyjadrená

v arbitrárnych jednotkách (a.u., vztiahnuté ku GAPDH). Hodnoty sú uvedené ako priemery $\pm$ S.E.M. zo 4 srdc v skupine. * – $P < 0,05$ vs. 1,5, # – $P < 0,05$ vs. 3 mes.

Vplyv veku a preconditioningu na fosforyláciu proteínu Akt a na hladiny proteínu eNOS v myokarde potkana po ischémií a reperfúzii

Pri pozorovaní vplyvu veku a preconditioningu na aktiváciu (fosforyláciu) proteínu Akt (vyjadrená ako pomer p-Akt/Akt) sme sa zamerali už len na dve hlavné vekové kategórie: 3 a 6 mesiacov. Dôvodom bolo, že v predchádzajúcich experimentoch dochádzalo k najväčším zmenám práve v týchto vekových skupinách. Vplyv veku bol výrazne znateľný pri signifikantnom znížení pomeru p-Akt/Akt o 24 % u 6-mesačnej kontrolnej skupiny zvierat v porovnaní s 3-mesačnou kontrolnou skupinou. V PC skupinách sme pri porovnávaní veku nepozorovali žiadne signifikantné zmeny. Pri porovnávaní PC skupín s kontrolnými vo veku 3 mesiacov sme však zaznamenali signifikantné zvýšenie pomeru p-Akt/Akt v PC skupine o 48 % oproti kontrolnej skupine zvierat, čo svedčí o funkčnosti PC vo veku 3 mesiacov života potkana. Vo veku 6 mesiacov sme však nezaznamenali žiadne zmeny v pomere hladín pAkt/Akt v PC skupine oproti kontrolnej skupine (Obr. 6A).

V hladinách proteínu eNOS sme pozorovali aj vplyv veku aj preconditioningu podobne ako pri aktivácii proteínu Akt. Vplyv veku bol výrazne znateľný pri signifikantnom znížení hladiny eNOS o 28 % u 6-mesačnej kontrolnej skupiny zvierat v porovnaní s 3-mesačnou kontrolnou skupinou. V PC skupinách sme pri porovnávaní veku nepozorovali žiadne signifikantné zmeny. Pri porovnávaní PC skupín s kontrolnými vo veku 3 mesiacov sme zaznamenali signifikantné zvýšenie hladiny proteínu eNOS v PC skupine o 36 % oproti kontrolnej skupine zvierat, čo svedčí o funkčnosti preconditioningu vo veku 3 mesiacov. Vo veku 6 mesiacov sme však nezaznamenali žiadne zmeny hladiny eNOS v PC skupine oproti kontrolnej skupine, a teda sa nazdávame, že preconditioning už nie je plne účinný vo veku 6 mesiacov (Obr. 6B).



Obr. 6. Vplyv veku a preconditioningu na hladiny vybraných proteínov v myokarde potkana po ischemii a reperfúzii. A. Vplyv veku a preconditioningu na fosforyláciu proteínu Akt. B. Vplyv veku a preconditioningu na hladiny proteínu eNOS. p-Akt/Akt – pomer fosforylovanej a celkovej Akt, obe vzťahované ku GAPDH. eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého, vyjadrená v arbitrárných jednotkách (a.u., vzťahované ku GAPDH). IR – ischemicko-reperfúzna (kontrolná) skupina, IR+PC – ischemicko-reperfúzna skupina s preconditioningom. Hodnoty sú uvedené ako priemery $\pm$ S.E.M. zo 4 srdc v skupine. * – $P < 0,05$ PC vs. IR; # – $P < 0,05$ vs. 3 mes.

DISKUSIA

V tejto štúdii sme poprvýkrát preukázali, že už počas fázy dospievania dochádza k významným zmenám v odolnosti srdca potkana k I/R poškodeniu, v účinnosti adaptačných mechanizmov a tak tiež v hladinách kardioprotektívnych proteínov.

Dospievanie výrazne ovplyvnilo biometrické parametre srdca. S narastajúcim vekom dochádzalo aj k postupnému nárastu pomeru hmotnosti srdca ku hmotnosti tela zvierat, čo je v súlade aj s predchádzajúcimi štúdiami (Kostyak a kol., 2006, 2007). V prípade hemodynamických parametrov neboli preukáza-

né žiadne zmeny v súvislosti s narastajúcim vekom. To je opäť v súlade s viacerými predchádzajúcimi štúdiami (Delp a kol., 1998; Pacher a kol., 2004).

Hlavným cieľom našej práce bolo skúmať vplyv dospievania na odolnosť srdca potkana voči ischemii a na účinnosť ischemického preconditioningu. Zamerali sme sa na hodnotenie veľkosti letálneho poškodenia (infarktovej zóny), arytmií a funkčnej obnovy izolovaného srdca potkana vystaveného I/R.

Preukázali sme, že s narastajúcim vekom dochádzalo k postupnému zväčšovaniu infarktovej zóny srdca (Obr. 3), čo je tiež v súlade s výsledkami viacerých štúdií (Schulman a kol., 2001; Kostyak a kol., 2006). Dospievanie výrazne ovplyvnilo aj výskyt arytmií, čo sme pozorovali hlavne na náraste celkového trvania komorových tachykardií s vekom (Obr. 4). Tieto výsledky sú v zhode aj so štúdiou podľa Ledvényiová a kol. (2013), v ktorej už 3-mesačný vekový rozdiel viedol k významnému nárastu epizód komorových tachykardií pri porovnaní s mladšou skupinou. V súvislosti s dospievaním sme však nezaznamenali žiadne významné zmeny v obnove ľavokomorového vyvinutého tlaku po ischemii a reperfúzii. Toto zistenie však nie je v súlade s viacerými štúdiami, ktoré dokazujú horšie obnovenie LVDP po ischemii a reperfúzii v staršom veku (Kostyak a kol., 2006; Korzick a kol., 2007). Nazdávame sa však, že tieto výsledky môžu byť v zhode so štúdiou podľa Babušíková a kol. (2012), v ktorej sa vo veku 6 mesiacov v porovnaní s mladšou skupinou nepreukázali zmeny v hladinách proteínov SERCA 2a a fosfolambánu. Práve to môže byť jedným z dôvodov nezmenenej kontraktilnej obnovy srdca v súvislosti s dospievaním. Taktiež sa však nazdávame, že aj viacero iných faktorov (napr. oxidačný stav myokardu) môže ovplyvňovať toto zachovanie postischemickej kontraktilnej funkcie srdca s vekom (Matejčíková a kol., 2009).

V rámci našej štúdie sme taktiež dokázali, že PC zmenšil veľkosť infarktu (Obr. 3) a skrátil trvanie komorových tachykardií (Obr. 4) u mladších skupín zvierat (1,5 a 3 mesiace) v porovnaní s kontrolnými skupinami. Aj v mnohých ďalších štúdiách bol dokázaný nižší výskyt reperfúzných arytmií u mladších zvierat vystavených PC (Takeshima a kol., 1997; Ledvényiová a kol., 2013). Okrem toho sme zaznamenali významné zvýšenie obnovy LVDP u mladších skupín zvierat (1,5 a 3 mesiace) s PC v porovnaní s kontrolnými skupinami. Tieto zistenia sú opäť v zhode aj s inými štúdiami dokazujúcimi lepšie obnovenie LVDP po I/R u PC skupín iba v mladom veku (3 mesiace) (Tani a kol., 1997; Matejčíková a kol., 2009).

Na druhej strane, vo veku 6 mesiacov života potkana sa nám ani u jedného z pozorovaných prejavov poškodenia (IS, arytmie, obnova LVDP) nepreukázali žiadne zmeny medzi kontrolnými a PC skupinami, čo naznačuje že použitý protokol PC už v tomto veku nie je účinný (Obr. 3, 4). Aj výsledky ďalších štúdií preukazujú účinok PC na zmenšenie infarktovej zóny len u mladších zvierat (3 mesiace) (Schulman a kol., 2001; Boengler a kol., 2007). V štúdiu podľa Ledvényiová a kol. (2013) bola taktiež prezentovaná znížená antiarytmická účinnosť PC v staršej 18-týždňovej skupine v porovnaní s mladšou 12-týždňovou skupinou potkanov. Okrem iného, naše výsledky sú v súlade aj s ďalšou štúdiou dokazujúcou oslabenie ochrany srdca (PC) pred postischemickou kontraktilnou disfunkciou u starších myší v porovnaní s mladšími (Turcato a kol., 2006).

Na základe týchto zistení sa nazdávame, že aspoň v prípade protokolu ischemického preconditioningu použitého v našej štúdií, PC začína strácať svoj účinok už v štádiu dospelosti. Napriek tomu veríme, že účinnosť PC by mohla byť zachovaná aj vo veku 6 mesiacov. A to napr. použitím intenzívnejšieho protokolu PC, teda s viacerými epizódami I/R, ako to môžeme vidieť v štúdiu podľa Schulman a kol. (2001), v ktorej zvýšený počet PC stimulov dopomohol účinnosti kardioprotekcie aj u 12-mesačných potkanov.

Posledným cieľom našej štúdie bolo skúmať signálne dráhy kardioprotekcie v súvislosti s vekom a odhaliť zmeny v rámci vybraných „kaskád prežitia“ so zameraním sa na špecifické proteíny: Akt, p-Akt a eNOS.

Vplyv veku sa prejavil na zmenách v pomere hladín fosforylovanej a celkovej Akt za bazálnych podmienok. S narastajúcim vekom dochádzalo k postupnému poklesu pomeru hladín týchto proteínov (Obr. 5A). Hladiny proteínu eNOS preukazovali rovnaké s vekom spojené zmeny, a teda dochádzalo k ich postupnému poklesu v rámci veku (Obr. 5B). Pokles hladín tohto proteínu sme pozorovali v srdciach potkana už od veku 3 mesiacov. Naše výsledky teda podporujú význam eNOS v myokarde (Ping a kol., 1999), ako aj fakt, že jej pokles môže mať nepriaznivé účinky u neadaptovaných zvierat vo veku 6 mesiacov života vystavených ischemickej záťaži. Okrem toho sú naše zistenia aj v súlade so štúdiou podľa lemitsu a kol. (2006), v ktorej autori preukázali signifikantný pokles pomeru hladín p-Akt/Akt a p-eNOS/eNOS v súvislosti s narastajúcim vekom zvierat.

Pri pozorovaní vplyvu PC na hladiny kardioprotektívnych proteínov sme sa zamerali len na tie ve-

kové kategórie zvierat (3 a 6 mesiacov), u ktorých sa nám preukázali najväčšie rozdiely v odolnosti srdca voči ischemickému poškodeniu a v kardioprotektívnom účinku PC.

Keďže sme v našej štúdií preukázali signifikantný nárast pomeru hladín p-Akt/Akt v PC skupine v porovnaní s kontrolnou u 3-mesačných zvierat (Obr. 6A), nazdávame sa, že proteíny Akt a p-Akt sú priamo zahrnuté v kardioprotektívnom účinku PC v tomto veku. Tieto zistenia sú v zhode so štúdiou podľa Hausenloy a kol. (2005), v ktorej autori dokázali, že PC viedol k väčšej fosforylácii Akt v izolovanom srdci po I/R, čo potvrdilo esenciálnu úlohu tejto kinázy v PC-indukovanej ochrane srdca u mladých zvierat. V staršom veku (6 mesiacov) sme však nepozorovali žiadne zmeny v pomere hladín pAkt/Akt v PC skupine v porovnaní s kontrolnou (Obr. 4A). Podobne, ako u pomeru hladín p-Akt/Akt, sme aj u hladín proteínu eNOS pozorovali jeho nárast u PC skupiny v porovnaní s kontrolnou len u mladšej skupiny zvierat (Obr. 6B). Vo veku 6 mesiacov opäť nedošlo k žiadnym zmenám v hladinách tohto proteínu pri porovnaní PC skupiny s kontrolnou. Preto sa domnievame, že práve neschopnosť PC aktivovať signálnu dráhu Akt/eNOS môže byť zodpovedná za oslabenie kardioprotekcie vo veku 6 mesiacov. Nazdávame sa, že výsledky v hladinách proteínu eNOS kopírujú výsledky v hladinách p-Akt z dôvodu priameho prepojenia týchto proteínov v PC kaskáde (Zhang a kol., 2005).

ZÁVERY

Na záver môžeme povedať, že dospievanie zhoršilo odpoveď srdca voči letálnemu I/R poškodeniu (zväčšená veľkosť infarktu), zvýšilo arytmogenézu, zatiaľ čo funkčná obnova vekom ovplyvnená nebola. PC potlačil výskyt malígnych arytmií, zmenšil veľkosť infarktu a zlepšil obnovu LVDP u mladších skupín, zatiaľ čo jeho účinok bol u staršej skupiny potlačený. Strata kardioprotektívneho účinku PC bola spojená so zníženou bazálnou aj post-IR hladinou proteínov Akt, p-Akt aj eNOS u staršej skupiny zvierat. Taktiež došlo k poklesu v PC--indukovanej upregulácii týchto proteínov u dospelšej skupiny v porovnaní s mladšími. S vekom spojené zmeny v odpovedi srdca na ischemiu môžu byť spôsobené potlačením prirodzených mechanizmov kardioprotekcie v dôsledku disfunkcie proteínov zahrnutých v protektívnej bunkovej signalizácii.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantmi: VEGASR2/0201/15, APVV-0102-11, APVV-0523-10, CE NOREG.

Literatúra

- ABETE P, FERRARA N, CACCIATORE F, MADRID A, BIANCO S, CALABRESE C, NAPOLI C, SCOGNAMIGLIO P, BOLLELLA O, CIOPPA A, LONGOBARDI G, RENGO F: Angina-Induced Protection Against Myocardial Infarction in Adult and Elderly Patients: A Loss of Preconditioning Mechanism in the Aging Heart? *J Am Coll Cardiol* **30**: 947–954, 1997.
- BABUŠÍKOVÁ E, LEHOTSKÝ J, DOBROTA D, RAČAY P, KAPLÁN P: Age-associated changes in Ca(2+)-ATPase and oxidative damage in sarcoplasmic reticulum of rat heart. *Physiol Res* **61**: 453–60, 2012.
- BARTLING B, HILGEFORT C, FRIEDRICH I, SLIBER RE, SIMM A: Cardio-protective determinants are conserved in aged human myocardium after ischemic preconditioning. *FEBS Lett* **555**: 539–544, 2003.
- BOENGLER K, KONIETZKA I, BUECHERT A, HEINEN Y, GARCIA-DORADO D, HEUSCH G, SCHULZ R: Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: 1764–1769, 2007.
- BOENGLER K, SCHULZ R, HEUSCH G: Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovascular Research* **83**: 247–261, 2009.
- DELP MD, EVANS MV, DUAN C: Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats. *J Appl Physiol* **85**: 1813–1822, 1998.
- FANG CX, DOSER TA, YANG X, SREEJAYAN N, REN J: Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt. *Aging Cell* **5**: 177–185, 2006.
- FERDINANDY P, SCHULTZ R, BAXTER GF: Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* **59**: 418–458, 2007.
- HAUSENLOY DJ, TSANG A, MOCANU MM, YELLON DM: Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H971–H976, 2005.
- HEARSE DJ: Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? *Cardiovascular Research* **28**: 1737–1744, 1994.
- HEUSCH G, BOENGLER K, SCHULZ R: Cardioprotection: Nitric Oxide, Protein Kinases, and Mitochondria. *Circulation* **118**: 1915–1919, 2008.
- HUNTER JC, KOSTYAK JC, NOVOTNY JL, SIMPSON AM, KORZICK DH: Estrogen deficiency decreases ischemic tolerance in the aged rat heart: roles of PKC δ , PKC ϵ , Akt, and GSK3 β . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**: 800–809, 2007.
- IEMITSU M, MAEDA S, JESMIN S, OTSUKI T, MIYAUCHI T: Exercise training improves aging - induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1290–H1298, 2006.
- JUHASZOVA M, RABUEL CH, ZOROV DB, LAKATTA EG, SOLLOTT SJ: Protection in the aged heart: preventing the heart-break of old age? *Cardiovascular Research* **66**: 233–244, 2005.
- KINTSURASHVILI E, DUKA A, IGNJACEV I, PATTAKOS G, GAVRAS I, GAVRAS H: Age-related changes of bradykinin B1 and B2 receptors in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: 202–205, 2005.
- KORZICK DH, KOSTYAK JC, HUNTER JC, SAUPE KW: Local delivery of PKC ϵ -activating peptide mimics ischemic preconditioning in aged hearts through GSK-3 β but not F1-ATPase inactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: 2056–2063, 2007.
- KORZICK DH, LANCASTER TS: Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. *Eur J Physiol* **465**: 669–685, 2013.
- KOSTYAK JC, HUNTER JC, KORZICK DH: Acute PKC δ inhibition limits ischemia-reperfusion injury in the aged rat heart: role of GSK-3 β . *Cardiovasc Res* **70**: 325–334, 2006.
- LEDVÉNYIOVÁ V, PANCZA D, MATEJIKOVÁ J, FERKO M, BERNATOVA I, RAVINGEROVA T: Impact of age and sex on response to ischemic preconditioning in the rat heart: differential role of the PI3K-AKT pathway. *Can J Physiol Pharmacol* **91**: 640–647, 2013.
- LEE TM, SU SF, CHOU TF, LEE YT, TSAI CH: Loss of Preconditioning by Attenuated Activation of Myocardial ATP-Sensitive Potassium Channels in Elderly Patients Undergoing Coronary Angioplasty. *Circulation* **105**: 334–340, 2002.
- LERI A, KAJSTURA J, LI B, SONNENBLICK EH, BELTRAMI CA, ANVERSA P, FRISHMAN WH: Cardiomyocyte aging is gender-dependent: the local IGF-1-IGF-1R system. *Heart Dis* **2(2)**: 108–115, 2000.
- MATEJÍKOVÁ J, KUCHARSKÁ J, PINTÉROVÁ M, PANCZA D, RAVINGEROVÁ T: Protection Against Ischemia-Induced Ventricular Arrhythmias and Myocardial Dysfunction Conferred by Preconditioning in the Rat Heart: Involvement of Mitochondrial K-ATP Channels and Reactive Oxygen Species. *Physiol Res* **58**: 9–19, 2009.
- MURPHY E, STEENBERGEN CH: Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev* **88**: 581–609, 2008.
- MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124–1136, 1986.
- PACHER P, MABLEY JG, LIAUDET L, EVGENOV OV, MARTON A, HASKÓ G, KOLLAI M, SZABÓ C: Left ventricular pressure-volume relationship in a rat

- model of advanced aging-associated heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H2132–H2137, 2004.
- PAIN T, YANG XM, CRITZ SD, YUE Y, NAKANO A, LIU GS, HEUSCH G, COHEN MV, DOWNEY JM: Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circulation Research* **87**: 460–466, 2000.
- PING P, TAKANO H, ZHANG J, TANG XL, QIU Y, LI RC, BANERJEE S, DAWN B, BALAFONOVA Z, BOLLI R: Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res* **84**: 587–604, 1999.
- RASK-MADSEN CH, KING G: Differential regulation of VEGF signaling by PKC-alpha and PKC-epsilon in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 919–24, 2008.
- RAVINGEROVÁ T: Intrinsic defensive mechanisms in the heart: a potential novel approach to cardiac protection against ischemic injury. *Gen Physiol Biophys* **26**: 3–13, 2007.
- SCHULMAN D, LATCHMAN DS, YELLON DM: Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: 1630–1636, 2001.
- ŠPINAR J: Ischemická choroba srdeční – definice a dělení. In: Špinar J., Vítovec J.: Ischemická choroba srdeční. *Grada Publishing, Praha*, pp. 46–48, 2003. ISBN 80-247-0500-1.
- TAKESHIMA S, VAAGE J, VALEN G: Preconditioning the globally ischaemic, isolated rat heart: the impact of the preconditioning model on post-ischaemic systolic and diastolic function. *Scand J Clin Lab Invest* **57**: 637–646, 1997.
- TANI M, SUGANUMA Y, HASEGAWA H, SHINMURA K, HAYASHI Y, GUO X, NAKAMURA Y: Changes in ischemic tolerance and effects of ischemic preconditioning in middle-aged rat hearts. *Circulation* **95**: 2559–2566, 1997.
- TAYLOR RP, STARNES JW: Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta Physiol Scand* **178**: 107–116, 2003.
- TURCATO S, TURNBULL L, WANG GY, HONBON, SIMPSON PC, KARLINER JS, BAKER AJ: Ischemic preconditioning depends on age and gender. *Basic Res. Cardiol* **101**: 235–243, 2006.
- VERDOUW PD, VAN DEN DOEL MA, ZEENW S, DUNCKER DJ: Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovascular Research* **39**: 121–135, 1998.
- WALKER MJ, CURTIS MJ, HEARSE DJ, CAMPBELL RW, JANSE MJ, YELLON DM, COBBE SM, COKER SJ, HARNESS JB, HARRON DW: The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovascular Research* **22(7)**: 447–455, 1988.
- WILLEMS L, ASHTON KJ, HEADRICK JP: Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovascular Research* **66**: 245–255, 2005.
- ZHANG J, BAINES CP, ZONG C, CARDWELL EM, WANG G, VONDRISKA TM, PING P: Functional proteomic analysis of a three-tier PKCepsilon-Akt-eNOS signaling module in cardiac protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H954–H961, 2005.

Mitochondrie ako hlavné efekторы mechanizmov endogénnej ochrany myokardu

Ivana Kancirová, Magdaléna Jašová

Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava
usrdivka@savba.sk, jasovam@gmail.com

ABSTRAKT

Ischemická choroba srdca patrí k jedným z najčastejších sa vyskytujúcich príčin závažného poškodenia myokardu vo vyspelých krajinách. Z toho dôvodu sa stále väčšia pozornosť sústreďuje na nové možnosti využitia kardioprotekcie v snahe predísť letálnemu poškodeniu myokardu a zlepšiť jeho funkčné parametre. Rôzne formy preconditioningu, ktorých úlohou je predpríprava myokardu na zvýšenú nadchádzajúcu záťaž, vyvolávajú protektívne funkčné a štrukturálne zmeny v myokarde, ktoré sú súčasťou procesu endogénnej ochrany myokardu. Cieľom našej práce bolo objasniť úlohu srdcových mitochondrií, ako konečného efektora remote ischemického preconditioningu, aplikovanej na vzdialenom mieste od srdca. Remote ischemický preconditioning pozostával z troch cylov 5-minútovej ischemie a následnej 5-minútovej reperfúzie (200 mmHg) pravej zadnej končatiny použitím tlakovej manžety. Z excidovaných srdiec podrobených ischemicko-reperfúznemu testu podľa Langendorffa (15-minútová stabilizácia, 30-minútová globálna ischemia, 40-minútová reperfúzia) boli pomocou diferenciálnej centrifugácie za použitia proteázy (P 6141) izolované mitochondrie. V izolovaných mitochondriách boli stanovené nasledovné parametre: respiračná aktivita mitochondrií pomocou respirometra Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Rakúsko), aktivita mitochondriovej ATP syntázy stanovená ako množstvo anorganického fosfátu uvoľneného počas štiepenia ATP za jednotku času, fluidita mitochondriových membrán spektrofotometricky využitím fluorescenčnej sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatriénu a obsah oxidovaných izoformiem koenzýmu Q (CoQ_{9ox}) metódou HPLC. Vystavenie izolovaných srdiec ischemicko-reperfúznemu poškodeniu malo za následok zníženie aktivity mitochondriovej ATP syntázy, ako aj

pokles ADP-stimulovanej respirácie bez vplyvu na bazálnu respiráciu mitochondrií. Zvýšený obsah oxidovanej izoformy koenzýmu CoQ_{9ox} odrážajúci poškodenie dýchacieho reťazca počas globálnej ischemie a reperfúzie myokardu sprevádzalo zníženie fluidity mitochondriových membrán. Remote ischemický preconditioning čiastočne zabránil poklesu aktivity mitochondriovej ATP syntázy, ako aj poklesu ADP-stimulovanej respirácie v dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia a zároveň zvýšil obsah koenzýmu CoQ_{9ox} po 15 minútovej stabilizácii ischemicko-reperfúzneho testu. Fluidita mitochondriovej membrány bola vo všetkých fázach ischemicko-reperfúzneho testu zvýšená. Napriek zvýšenej tvorbe voľných kyslíkových radikálov počas stabilizačnej fázy nedošlo ku rigidizácii mitochondriových membrán, čo svedčí o ich signálnej úlohe. Výsledky potvrdzujú poškodzujúci dôsledok ischemicko-reperfúzneho testu na funkčné a štrukturálne vlastnosti srdcových mitochondrií. Remote ischemický preconditioning pravdepodobne prostredníctvom tvorby voľných kyslíkových radikálov respiračným reťazcom mitochondrií indukuje mechanizmy endogénnej ochrany myokardu, vďaka ktorým dochádza k zmierneniu letálneho poškodenia vyvolaného ischemicko-reperfúznym poškodením.

Kľúčové slová: remote ischemický preconditioning, ischemicko-reperfúzne poškodenie, srdcové mitochondrie, dýchací reťazec, voľné kyslíkové radikály, fluidita mitochondriových membrán.

ABSTRACT

Ischemic heart disease is one of the most frequent causes of severe myocardial injury occurring in the developed countries. Therefore, the emphasis is focused on the new possibilities of the cardioprotection usage in order to avoid the lethal

heart injury and to improve its functional parameters. Different types of preconditioning preparing heart on the increased load induce protective functional and structural changes participating in processes of endogenous protection. The aim of our study was to elucidate the role of heart mitochondria as the final effector of noninvasive form of remote ischemic preconditioning applied at the distance location from the heart. Remote ischemic preconditioning consisted of three cycles of 5-minutes ischemia and 5-minutes reperfusion (200 mmHg) of the right hind limb using a pressure cuff. Mitochondria were isolated by differential centrifugation using the protease (P 6141) from the excised hearts subjected to ischemia-reperfusion Langendorff test (15 minutes of stabilization, 30 minutes of global ischemia, 40 minutes of reperfusion). Following parameters were determined in the isolated heart mitochondria: the activity of mitochondrial respiration using respirometer Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Austria), the mitochondrial ATP synthase activity determined as the amount of inorganic phosphate released by ATP splitting per unit of time, the mitochondrial membrane fluidity by spectrofluorometry using the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien and the content of oxidised isoforms coenzyme Q ($\text{CoQ}_{9\text{ox}}$) by HPLC method. Isolated heart exposed to ischemic-reperfusion injury resulted in a reduction of the mitochondrial ATP synthase activity as well as decrease in the ADP-stimulated respiration without affecting the basal mitochondrial respiration. Increase the content of coenzyme $\text{CoQ}_{9\text{ox}}$ oxidised isoforms reflecting respiratory chain damage during heart global ischemia and reperfusion accompanied by the mitochondrial membrane fluidity decrease. Remote ischemic preconditioning partly prevented the decrease of mitochondrial ATP synthase activity as well as decrease of ADP-stimulated respiration due to ischemia-reperfusion injury whereas the content of coenzyme $\text{CoQ}_{9\text{ox}}$ oxidised isoforms was increased after 15 minutes stabilization of ischemia-reperfusion test. Mitochondrial membrane fluidity was increased in all phases of ischemia-reperfusion test. Despite of increase generation of free oxygen radicals during stabilization phase, rigidization of the mitochondrial membrane was not observed. This finding suggest signalling role of free oxygen radicals. Our results confirm damaging consequence of ischemia-reperfusion test on the functional and structural properties of the heart mitochondria. Remote ischemic preconditioning

tought the generation of free oxygen radicals by the mitochondrial respiratory chain probably indicates the mechanisms of heart endogenous protection that lead to the alleviation of the lethal damage induced by ischemic-reperfusion injury.

Keywords: remote ischemic preconditioning, ischemia-reperfusion injury, heart mitochondria, respiratory chain, free oxygen species, mitochondrial membrane fluidity.

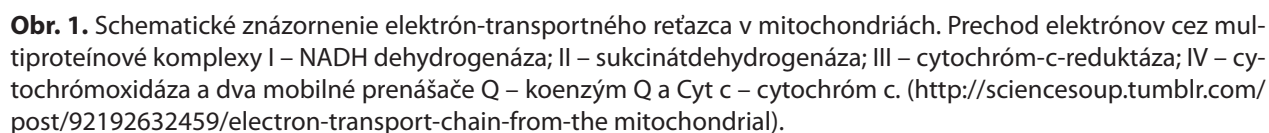
ÚVOD

Mitochondrie predstavujú dôležité vnútrobunkové organely, ktoré majú v myokarde ako aj v iných orgánoch nezastupiteľnú úlohu. Okrem kontrolovania bunkových funkcií sú známe predovšetkým z hľadiska plnenia energetických požiadaviek vo forme ATP procesom zvaným oxidatívna fosforylácia (Kadenbach, 2012). Nemenej významné sú tiež ich úlohy v ďalších fyziologických procesoch. Mitochondrie sa podieľajú na vápnikovej signalizácii, sú jednými z producentov voľných kyslíkových radikálov a podieľajú sa tiež na regulácii iónovej homeostázy (Griffiths a kol., 2000; Ziegelhoffer a kol., 1999). Rovnako sú centrom zachovania jemnej, prísne regulovanej rovnováhy medzi životom a smrťou. Táto regulácia sa prejavuje buď cez dlho trvajúce odpovede na úrovni expresie, transkripcie a translácie a cez krátko trvajúce posttranskripčné odpovede (Acin-Perez a Enriquez, 2014; McCarron a kol., 2013). Reakciou na najrôznejšie stresové signály, vrátane straty rastových faktorov, hypoxie či poškodenia DNA, môžu indukovať apoptózu bunky (Gustafsson a Gottlieb, 2008). Mitochondrie tiež disponujú schopnosťou adaptovať bunku na nové podmienky prostredníctvom signálnych dráh a remodelovať ich štruktúru a dynamiku. Tým sa významnou mierou podieľajú na kardioprotektívnom procese zvanom mechanizmy endogénnej ochrany myokardu (Ferko a kol., 2008).

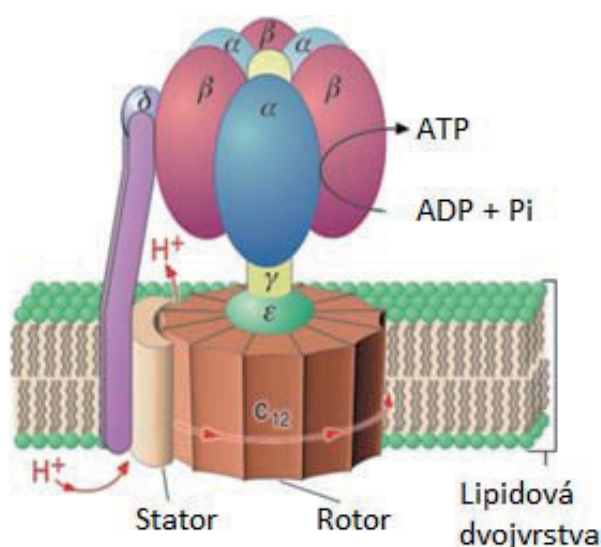
ŠTRUKTÚRA MITOCHONDRÍ

Mitochondrie ako membránové štruktúry pozostávajú z vonkajšej a vnútornej membrány, ktoré ich oddeľujú od cytoplazmy a iných organel v bunke a tiež vytvárajú vnútorný priestor mitochondrie, ktorý je vyplnený tekutinou, nazývanou matrix. Vonkajšia membrána obsahuje veľké množstvo pórov, ktoré umožňujú voľnú difúziu do priestoru

ATP syntáza predstavuje proteín pozostávajúci z dvoch funkčných častí viazaných predĺženým ramenom. Podjednotka F_1 je zložená zo 6 častí



uložených do kruhu a umiestnená v matrixe mitochondrií. Podjednotka F_0 , nazývaná tiež rotor, je zložená zo 10–14 identických transmembránových proteínových podjednotiek umiestnených vo vnútornej membráne mitochondrií (Witting a kol., 2008). Tieto podjednotky pracujú na základe princípov rotačnej katalýzy. To znamená, že protonový gradient ustanovuje silu, ktorá spôsobuje rotáciu rotora. Mechanická energia otáčania je potom transformovaná na chemickú energiu – energiu väzby ADP a anorganického fosfátu a na energiu tvorby ATP (Alberts a kol., 2008) (Obr. 2).



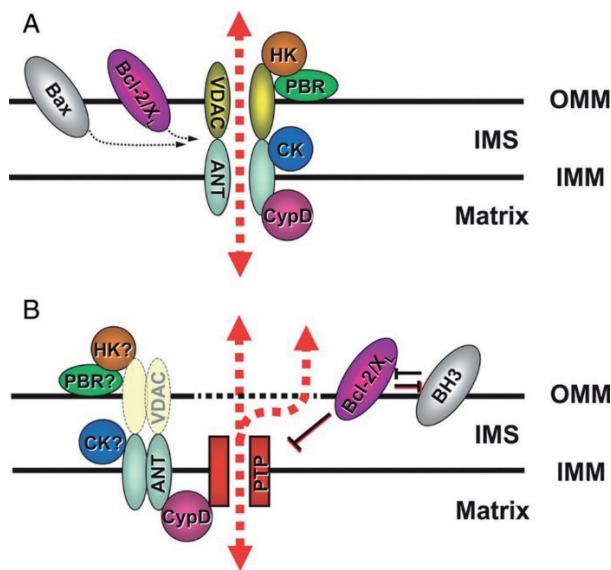
Obr. 2. Znáznornenie ATP syntázy uloženej vo vnútornej mitochondriovej membráne. Pozostáva z troch hlavných častí: rotujúca podjednotka F_0 uložená v membráne pozostávajúca z 10 – 14 kópií peptidu vytvárajúceho kanál pre transmembránový prechod H^+ ; stopka zložená z podjednotiek α , δ , ϵ ; podjednotka F_1 uložená v matrixe mitochondrie zložená z podjednotiek α , β , γ , na ktorú je viazaná tvorba ATP z ADP a anorganického fosfátu (P). (<http://biochemikon.com/metabolism-at-a-glance/mitochondrial-metabolism/oxphos-cascade/>)

Mitochondriová membrána ako súčasť kardioprotekcie

Membrána mitochondrií kardiomyocytov nepredstavuje len biomembránu vytvárajúcu funkčne oddelené, na sebe závislé priestory – kompartmenty. Ukazuje sa byť aj štruktúrou, ktorá je zapojená do ešte nie celkom objasneného procesu endogénnej ochrany myokardu. Napríklad je dokázané, že pri zvýšení energetických požiadaviek metabolizmu organizmu dochádza na membráne mitochondrií k tvorbe tzv. mitochondriových ener-

getických transportných pórov (mPTP) zabezpečujúcich urýchlené a kapacitné zvýšenie transportu molekúl ATP vytvorených v matrixe mitochondrie do cytoplazmy bunky (Bakker a kol., 1995). Štruktúra mPTP nie je dodnes celkom známa. V elektrónovom mikroskope sa táto štruktúra javí ako fúzia vonkajšej a vnútornej membrány mitochondrie do nedvojvrstvovej, tzv. „nonbilayer“ konformácie (Biermans a kol., 1990). V súčasnosti sú známe tri kľúčové zložky mPTP: vo vnútornej membráne adenín-nukleotid translokáza (ATP/ADP translokáza), v matrixe cyklofilín D a vo vonkajšej membráne nachádzajúci sa napäťovo-závislý aniónový kanál (VDAC) (Obr. 3) (Halestrap a kol., 1998; Crompton, 1999; Zoratti a kol., 2005). Signál pre tvorbu mPTP v kardiomyocytoch medzi vnútornou a vonkajšou membránou mitochondrie je propagovaný vstupom iónov extracelulárneho Ca^{2+} cez napäťovo závislý vápnikový kanál sarkolémy do bunky. Dochádza tak k následnému uvoľneniu vápnika zo sarkoplazmatického retikula tzv. vápnikom indukované uvoľňovanie vápnika, vedúce k prechodnému zvýšeniu koncentrácie iónov Ca^{2+} v sarkoplazme, tzv. vápnikovému tranzientu a následne aj k zvýšenému vstupu iónov Ca^{2+} do mitochondrií (Ziegelhöffner a kol., 2009).

Ukazuje sa, že tvorba mPTP pravdepodobne následne iniciuje ďalšie procesy, pozorované boli hlavne zmeny v biofyzikálnych vlastnostiach mitochondriovej membrány. Jednu z dôležitých vlastností mitochondrií predstavuje membránová fluidita, definovaná ako druh anizotropických pohybov, ktoré prispievajú k mobilite zložiek v biologickej membráne. V tomto prípade sledovaný biofyzikálny parameter – fluidita opisuje tesnosť, akými sú acylové časti membránových fosfolipidov vedľa seba uložené. Z tejto stránky môže spomínaný parameter značne ovplyvňovať mobilitu molekúl, a tak aj senzitivitu a reaktivitu transportérov, receptorov a enzýmových komplexov viazaných na membránu (Ziegelhöffner a kol., 2012). Práca Ziegelhöffera a jeho kolektívu dokázala, že zvýšená tvorba mPTP spôsobuje zvýšenie fluidity mitochondriovej membrány, čím kompenzuje zníženú funkciu elektróntransportného reťazca v dôsledku poškodenia komplexov I a II umožňujúc lepšie zachovanie produkcie energie a zvýšenie jej transportu do cytoplazmy kardiomyocytu (Ziegelhöffner a kol., 2009, Waczulíková a kol., 2007).



Obr. 3. Hypotézy o štruktúre mitochondriových transportných pórov (mPTP): (A) Klasický pohľad – štruktúra mPTP je tvorená komplexom VDAC-ANT-CypD nachádzajúceho sa v „kontaktných miestach“ mitochondriových membrán. (B) Nový pohľad – základné prvky tvoriace mPTP sú v súčasnej dobe neidentifikované, ale sú pravdepodobne regulované susednými molekulami. Vysvetlivky: Hexokináza II (HKII), keratín kináza (CK), cyklofilín D (CypD), periférny benzodiazepínový receptor (PBR), adenín-nukleotid translokáza (ANT), napäťovo-závislý aniónový kanál (VDAC), OMM – vonkajšia mitochondriová membrána, IMM – vnútorná mitochondriová membrána, IMS – medzimembránový priestor (Zorov a kol., 2009).

Zvýšená tvorba mPTP bola pozorovaná pri experimentálnom modeli streptozotocínom-indukovaného *diabetes mellitus* v akútnom štádiu ochorenia (Ziegelhoffer-Mihalovičová a kol. 1997). Pre toto štádium ochorenia vyvolané jednorazovým intra-peritoneálnym podaním streptozotocínu v dávke 65 mg kg^{-1} je príznačná inhibícia sekrécie inzulínu a znížená signalizácia inzulínového receptora v cieľových bunkách so známami zmien spôsobených diabetom, avšak ešte bez sprievodných komplikácií (Ziegelhoffer a kol., 1996). Akútne štádium streptozotocínom-indukovaného *diabetes mellitus* I. typu je často využívaný ako experimentálny model na sledovanie endogénnych ochranných mechanizmov, ktoré nastupujú v relatívne krátkom čase, od 8 dní do 3 týždňov. Počas tejto doby dochádza v mitochondriách diabetického myokardu k poškodeniu dýchacieho reťazca, tok elektrónov sa spomalí, čo sa prejaví v neschopnosti mitochondrií spotrebovať kyslík, avšak bez odpojenia oxidá-

cie od fosforylácie. Diabetický myokard sa teda nachádza v stave tzv. pseudohypoxie, kedy napriek dostatočnému prísunu kyslíka ho myokard nedokáže plne využiť (Ziegelhoffer a kol., 2009).

Myokard sa snaží prostredníctvom viacerých kompenzačných mechanizmov adaptovať na tieto nové podmienky. Akútne štádium ochorenia umožňuje sledovanie adaptačných zmien myokardu, ktoré ešte nie sú sprevádzané nezvratnými patologickými komplikáciami.

V experimentálnom modeli streptozotocínového diabetu bolo pozorovaných ešte niekoľko ďalších zmien pravdepodobne súvisiacich s endogénnymi ochrannými mechanizmami. Potvrdená bola prítomnosť procesu neenzymatickej glykácie proteínov alebo priamej väzby glukózy na proteíny prostredníctvom vytvorenia Amadoriho produktov, ktoré sú následne zdrojom tvorby tzv. konečných produktov pokročilej glykácie (advanced glycation end products, AGEs) a pokročilých tzv. Maillardových produktov. Týmto procesom dochádza ku vzniku proteínových sietí (crosslink), čo zvyšuje tuhosť membránových štruktúr sarkolémy kardiomyocytov (Ziegelhoffer-Mihalovičová a kol., 2003). Dochádza tak ku zníženiu permeability sarkolemálnej membrány pre vápnik, čo pre myokard v konečnom dôsledku predstavuje protektívny účinok chrániaci kardiomyocyty pred vápnikovým preťažením (Ziegelhoffer a kol., 1999). Vyššie popísané kardioprotektívne zmeny endogénnej ochrany myokardu majú dopad aj na fyziologické parametre myokardu, kedy bola popísaná znížená senzitivita diabetických srdiec na ischemiu (Tani a Neely, 1988; Ravingerová a kol., 2000), reperfúzne poškodenie (Vogel a Apstein, 1988; Ravingerová a kol., 2003), ako aj na vápnikové preťaženie (Gotzsche, 1991; Ziegelhoffer a kol., 1996).

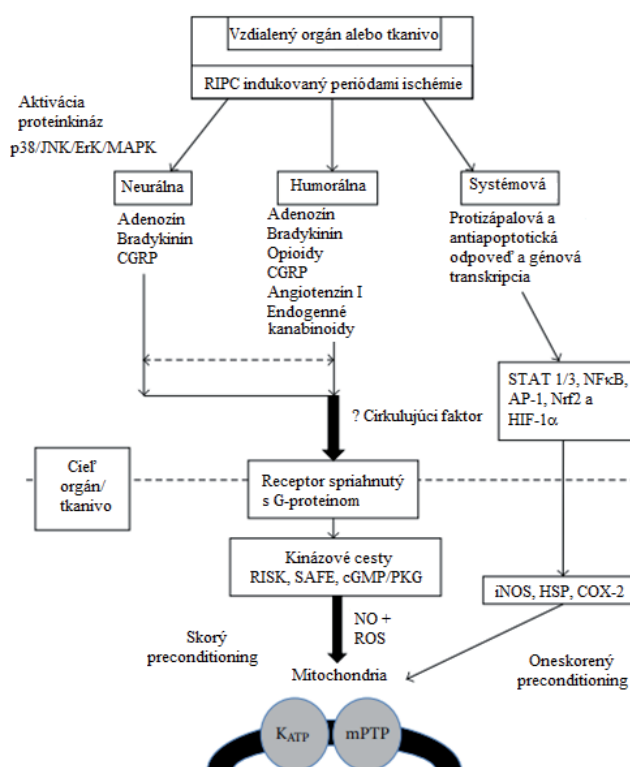
Endogénne ochranné mechanizmy rovnako sprevádzajú fenomén, nazývaný ischemický preconditioning. Jeho kardioprotektívny mechanizmus popísaný v roku 1986 Murrym a jeho kolektívom spočíva v navodení krátkych periód ischemie myokardu, striedaných s krátkymi periódami reperfúzie, ktoré paradoxne poskytujú zvýšenú ischemickú toleranciu myokardu (Murry a kol., 1986). Nové možnosti v oblasti kardioprotekcie poskytla relatívne nová forma preconditioningu – remote ischemický preconditioning, kedy k periódam ischemie nedochádza priamo v myokarde, ale jeho protekcia je navodená krátkymi periódami ischemie a reperfúzie vzdialených orgánov (Przyklenk a kol., 1993). V experimentálnej či v klinickej praxi

tento kardioprotektívny mechanizmus možno navodiť zasvorkovaním nutričných artérií renálneho, mesenterického či ilického riečišťa, ale aj končatinovou ischémiou navodenou napríklad infláciou manžety alebo turniketom. Táto metóda sa ukázala ako veľmi jednoduchá, neinvazívna a ľahko aplikovateľná v klinickej praxi (Schmidt a kol., 2012; Kharbanda a kol., 2009).

Vlastný mechanizmus, prostredníctvom ktorého epizóda krátkej ischémie a reperfúzie vo vzdialenom orgáne vykazuje kardioprotekciu voči následnému ischemicko-reperfúznemu poškodeniu je v súčasnej dobe nejasný. Štúdie naznačujú, že existujú viaceré cesty prenosu signálu remote ischemického preconditioningu. Pri neurónovej signálnej dráhe sa predpokladá, že kardioprotekcia je sprostredkovaná tvorbou endogénnych látok, akými sú adenozín, bradykinín alebo kalcitonín gene-related peptid (CGRP) aktivujúcich lokálne aferentné nervové dráhy stimuláciou eferentných nervových dráh (Lim a kol., 2010). Je rovnako pravdepodobné, že tieto endogénne látky sú zo vzdialeného orgánu transportované tzv. humorálnou signálnou dráhou (Shimizu a kol., 2009; Dickson a kol., 1999). Touto cestou sú endogénne látky vzdialeného orgánu vyplavované do krvného obehu, ktorým sa dostávajú do myokardu, kde naviazaním na príslušný receptor aktivujú intracelulárne signálne dráhy. Tretia hypotéza sa zameriava na systémovú ochrannú odpoveď potláčajúcu zápal a apoptózu počas krátkych sérií ischémie a následnej reperfúzie vzdialeného orgánu (Hausenloy a Yellon, 2008).

Aktuálne sa uvažuje aj o zapojení voľných kyslíkových radikálov ako signálu, ktorý iniciuje odpoveď myokardu na ischemický impulz zo vzdialeného orgánu od srdca. Táto teória vychádza z poznatkov ischemického preconditioningu, v ktorom bola úloha voľných kyslíkových radikálov už objasnená. Ischemický preconditioning iniciuje tvorbu voľných kyslíkových radikálov $O_2^{\cdot-}$, $H_2O_2^{\cdot}$ ako aj $OH^{\cdot}$, ktorých zdrojom je práve dýchací reťazec mitochondrií. Vytvorené kyslíkové radikály reagujú predovšetkým s nelipidickými zložkami dýchacieho reťazca a len v malej miere s membránovými lipidmi, čoho dôkazom je nezmenená fluidita mitochondriových membrán. Časť vytvorených voľných radikálov stihne zreagovať so zložkami dýchacieho reťazca, no veľké množstvo je ihneď po vytvorení vypudené cez chloridový kanál priamo do cytoplazmy kardiomyocytu. Tu už interagujú s ďalšími lipidickými komponentami,

vytvárajú konjugované diény, čoho výsledkom je zníženie fluidity sarkolémy s dopadom na zníženú kontrakčnú funkciu myokardu, ale aj na znížený vstup Ca^{2+} do kardiomyocytu. Tento mechanizmus napomáha k zabráneniu vápnikového preťaženia kardiomyocytov (Málek a kol., 2007). Dôkazom o signálnej úlohe vytvorených voľných kyslíkových radikálov vplyvom ischemického preconditioningu je aj fakt, že ich exogénne podanie ($O_2^{\cdot-}$, $H_2O_2^{\cdot}$) dokáže napodobniť kardioprotektívny efekt vyvolaný ischemickým preconditioningom (Maslov a kol., 2015).



Obr. 4. Navrhované mechanizmy pôsobenia remote ischemického preconditioningu, JNK – Janusová kináza, Erk – kináza regulujúca extracelulárny signál, MAPK – mitogen-aktivujúca proteín kináza, CGRP – peptid uvoľnený z kalcitonínu, STAT 1/3 – aktivátor transkripčných proteínov, NFκB – nukleárny faktor kappa B, AP-1 – aktivátor-proteínu-1, Nrf2 – nukleárny faktor 2, HIF-1α – hypoxiou indukovateľný faktor 1α, RISK – kináza zabráňujúca poškodeniu spôsobenému reperfúziou, SAFE – faktor aktivujúci zlepšenie prežitia, cGMP/PKG – cyklická guanozín monofosfát závislá proteínkináza, iNOS – indukovaná syntáza oxidu dusnatého, HSP – proteíny teplotného šoku, COX-2 – cyklooxygenáza-2, NO – oxid dusnatý, ROS – reaktívne formy kyslíka, K_{ATP} – draslíkový kanál závislý od ATP, mPTP – mitochondriový pór prechodnej permeability (Veighey a Macallister, 2012).

Intracelulárny mechanizmus ischemického, ako aj remote ischemického preconditioningu, je v súčasnosti intenzívne študovaný a je pravdepodobné, že spočíva v zapojení viacerých signálnych dráh vrátane PKC- ϵ a skratka GSK-3 β . Aj keď signálne dráhy preconditioningu sú pravdepodobne viaceré, v konečnom dôsledku všetky smerujú všetky k obnove bazálnych funkcií mitochondrií po ischemicko-reperfúznom poškodení, konkrétne vedú k zamedzeniu otvorenia mitochondriových mPTP (Crompton a kol, 1987). Otvorenie mPTP má za následok okamžitú depolarizáciu mitochondriovej membrány a hydrolýzu ATP na ADP pomocou ATP syntázy v snahe udržať membránový potenciál. Navyše, dlhšie otvorenie mPTP môže viesť k nadmernému vstupu vody do matrix mitochondrií, k napučaniu mitochondrií vedúc k ruptúre vonkajšej mitochondriovej membrány. V neposlednom rade uvoľnenie proapoptotických molekúl z intermembránového priestoru (cytochróm c, Smac / Diablo, a Apaf-1) vedie k bunkovej smrti kardiomyocytov (Patterson a kol., 2000).

Preto možno povedať, že ďalšia existencia bunky je vlastne determinovaná rozsahom otvorenia mPTP. Popísané boli dva režimy otvorenia mPTP: s nízkou vodivosťou a vysokou vodivosťou. Trochu kontroverzná je existencia režimu otvorenia mPTP s nízkou vodivosťou, ktorá umožňuje prienik malých rozpustených látok. Toto otvorenie môže bunka prežiť a dokonca rozsah tohto otvorenia môže byť za niektorých okolností pre bunku dokonca protektívny, ako v prípade už vyššie spomínaného mechanizmu endogénnej ochrany pri akútnom streptozotocínom-indukovanom *diabetes mellitus*. Pri režime s vysokou vodivosťou, mitochondriovou membránou prechádzajú molekuly väčšie ako 1,5 kDa spôsobujúce pučanie bunky. Vtedy môže taktiež dochádzať ku programovanej bunkovej smrti, aj napriek tomu, že výroba energie je primeraná. Pri veľkom rozsahu otvorenia mPTP, bunka umiera procesom nekrózy v dôsledku nedostatočnej produkcie energie (Weiss a kol., 2003).

CIELE

Už štúdia Čarnickej a kolektívu naznačila, že v súčasnosti sa kladie veľký dôraz najmä na identifikáciu aferentných signálov vysielaných zo vzdialenej ischemizovanej oblasti (Čarnická et al., 2013). Avšak málo štúdií sa zameriava na možnú súvislosť medzi týmito signálmi a príslušnou odpoveďou srdcových mitochondrií pozorovanou po aplikácii

remote ischemického preconditioningu. Preto je zaujímavé, že ešte stále neexistujú štúdie, ktorých snahou by bolo určiť úlohu bioenergetiky mitochondrií v slede reakcií indukovaných v srdci procesom endogénnej ochrany remote ischemického preconditioningu.

Naším cieľom bolo objasniť, akým spôsobom remote ischemický preconditioning propagujúci kardioprotektívny účinok na úrovni mitochondriových membrán ovplyvňuje nasledovné funkčné parametre mitochondrií v patologicky zaťaženom myokarde:

a) fluidita/tekutosť mitochondriovej membrány, ktorá bola určená pomocou fluorescenčnej spektrofotometrie parametrom fluorescenčnej anizotropie sondy 1,6-difeny-1,3,5-hexatriénu (DPH). Použitá sonda sa zabudováva do membrány mitochondrií, kde jej orientácia a pohyb súvisí s usporiadaním fosfolipidových molekúl membrány. Fluorescenčná anizotropia DPH sa potom nepriamo mení s tekutosťou mitochondriovej membrány;

b) aktivita respiračného reťazca mitochondrií s ohľadom na bazálnu respiráciu, ADP-stimulovanú respiráciu a aktivitu piateho komplexu dýchacieho reťazca (ATP syntázy). Pre tento účel bola použitá veľmi citlivá oxygrafická metóda (oxygraf Oroboros, Innsbruck, Rakúsko), ktorá umožňuje meranie spotreby kyslíka izolovaných mitochondrií za pokojových podmienok (bazálna respirácia, stav S2) s použitím substrátov komplexu I a II (glutamát+malát, malát+oktanoyl karnitín), ako aj aktívnu respiráciu (ADP-stimulovaná respirácia, stav S3) spojenú s oxidačnou fosforyláciou. Aktivitu ATP syntázy sme merali spektrofotometricky ako množstvo anorganického fosfátu vytvoreného štiepením ATP v prítomnosti štandardnej mitochondriovej frakcie za jednotku času;

c) produkcia kyslíkových radikálov mitochondriami, ktorá bola stanovená nepriamo, meraním obsahu oxidovaných izoforiem koenzýmu CoQ_{9ox} v izolovaných mitochondriách využitím metódy vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie.

MATERIÁL A METÓDY

Experimentálne zvieratá

Pre experimenty boli použité samce potkana kmeňa Wistar vo veku 10 – 12 týždňov, s hmotnosťou (280 $\pm$ 20) g zakúpené z chovnej stanice Dobrá voda, Slovenská republika. Zvieratá

chované v štandardných podmienkach (12-hodinový svetelný režim deň/noc, teplota (22 ± 2) °C, štandardná peletová potrava a voda s prístupom *ad libitum*) boli rozdelené do dvoch skupín: zdravá kontrolná skupina (C; $n = 21$) a skupina s remote ischemickým preconditioningom (RPC, $n = 21$). Všetky pokusy boli vykonané s požiadavkami kontrolovanými Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky.

Anestézia

Experimentálne zvieratá boli anestetizované intraperitoneálnym podaním tiopentalu (50 až 60 mg kg⁻¹) aplikovaným spolu s heparínom (500 IU).

Remote ischemický preconditioning

Remote ischemický preconditioning bol vyvolaný 3 sériami krátkych 5-min. oklúzií femorálnej artérie pravej dolnej končatiny striedaných s 5-min. perfúznymi fázami s použitím tlakovej manžety.

Metóda izolovaného perfundovaného srdca

Izolované srdcia kontrolnej, ako aj remote ischemickým preconditioningom ovplyvnenej skupiny boli následne vystavené perfúzii s Krebsov–Henseleitovým roztokom podľa Langendorffa. Pre ischemicko-reperfúzny test bol použitý nasledovný protokol: 15-minútová stabilizačná perfúzia, 30-minútová globálna ischemia a 40-minútová post-ischemická reperfúzia.

Metóda izolácie mitochondrií

Mitochondrie boli izolované zo srdiec oboch skupín po každej fáze ischemicko-reperfúzneho testu podľa Langendorffa. Na ich izoláciu bola použitá metóda diferenciálnej centrifugácie s použitím proteázy vykonávaná pri teplote 4 °C. Postup izolácie bol nasledovný. Srdcia rozstrihané na jemné fragmenty (kašovitú hmotu) boli zaliate izolačným roztokom (180 mmol L⁻¹ KCl, 4 mmol L⁻¹ EDTA a 1 % sérový albumín, pH 7,4) s pridanou proteázou (Sigma P 6141, 2,5 mg g⁻¹ tkaniva) a inkubované pri izbovej teplote po dobu 20 minút. Po inkubácii bolo tkanivo po dobu 2 – 3 minút homogenizované v homogenizačnej súprave teflón-sklo

a centrifugované 10 minút pri 1000g. Výsledný supernatant obsahujúci mitochondrie bol znovu centrifugovaný 10 minút pri 6200g. Získaný pelet bol napokon resuspendovaný v 20 mL izolačného roztoku bez albumínu a centrifugovaný 10 minút pri 6200g. Výsledný sediment predstavoval výslednú mitochondriovú frakciu a bol použitý pre ďalšie biochemické stanovenie bielkovín podľa Lowryho (Lowry, 1951). Vzorky boli zriedené tak, aby výsledná koncentrácia mitochondriového proteínu bola 1 µg.µL⁻¹.

Stanovenie mitochondriovej respirácie

K meraniu parametrov oxidačnej fosforylácie izolovaných mitochondrií bol použitý respirometer Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Rakúsko) s doplneným softwérom Darlab (Oroboros Instruments) simultánne merajúci mitochondriálnu koncentráciu kyslíka a jeho spotrebu. Meranie bolo vykonávané pri 37°C s respiračným médiom MiRO6 (Fasching a kol., 2014). Pre stanovenie bazálnej (stav 2) a ADP-stimulovanej respirácie (stav 3) boli zvolené 2 kombinácie respiračných substrátov. Kombinácia substrátov glutamát (10 mmol L⁻¹) a malát (0,2 mmol L⁻¹) bola určená pre stanovenie respirácie viazanej na komplex I, kombinácia substrátov malát (0,2 mmol L⁻¹) a oktanoylkarnitín (0,2 mmol L⁻¹) boli použité pre stanovenie oxidácie mastných kyselín. Bazálna respirácia bola meraná po pridaní kombinácie vyššie uvedených substrátov do meracej komôrky oxygrafu. ADP-stimulovaná respirácia bola vyvolaná následným pridaním ADP s koncentráciou nasýteného roztoku (2 mmol L⁻¹). Spotreba kyslíka je vyjadrená v pmol s⁻¹mg⁻¹ bola normalizovaná na aktivitu citrát syntázy stanovenej spektrofotometricky podľa Eigentler et al. (2012).

Stanovenie aktivity mitochondriovej ATP syntázy

Aktivita ATP syntázy, meraná v prítomnosti iónov Mg²⁺ a odpojovača oxidačnej fosforylácie 2,4-dinitrofenolu (DNP) v reakcii v smere hydrolýzy ATP (DNP-stimulovaná Mg²⁺-ATPázová aktivita), bola stanovená spektrofotometricky ako množstvo anorganického fosfátu (P_i) uvoľneného štiepením ATP pri teplote 37 °C za jednotku času. Aktivita ATP syntázy bola analyzovaná inkubáciou 50 µL mitochondriovej frakcie v 1 mL inkubačného média obsahujúceho (mmol L⁻¹): 250 imidazolového

tlmivého roztoku, pH 7,4; 40 MgCl_2 a 0,1 DNP. Reakcia bola spustená po 10 minútach predinkubácie pri 37 °C pridaním 40 mmol l^{-1} ATP-Tris a ukončená po 20 minútach pridaním 1 mL ľadovej 12 % kyseliny trichlóroctovej a 1 mL zmesi 1 % roztoku molybdénanu amónneho v 10 M H_2SO_4 a 5 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Koncentrácia anorganického fosfátu v inkubačnom médiu bola určená spektrofotometricky pri 700 nm metódou podľa Taussky a Shorr (Taussky a Shorr, 1953).

Stanovenie membránovej fluidity mitochondrií

Pre stanovenie membránovej fluidity mitochondrií bol použitý parameter (steady state) fluorescenčnej anizotropie lipofilnej fluorescenčnej sondy 1,6-difeny-1,3,5-hexatriénu (DPH). V dôsledku jej vysokej afinity k hydrofóbnym častiam lipidov sa sonda zabudováva do mitochondriovej membrány, orientuje sa paralelne s acylovými reťazcami fosfolipidov a kmitá v obmedzenom uhle spolu s membránovými fosfolipidmi. So zmenou polohy fluorescenčnej sondy dochádza ku zmene aj anizotropie jej fluorescencie. Mitochondrie boli resuspendované na finálnu koncentráciu mitochondriového proteínu 0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ v izotonickom roztoku obsahujúcom 180 mmol l^{-1} NaCl, 4 mmol l^{-1} EDTA (pH 7,4) a boli ofarbené s 0,25 mmol l^{-1} DPH. Vzorky boli inkubované pri teplote (22 ± 1) °C na čas 20 minút potrebný na to, aby sa fluorescenčná sonda mohla kompletne inkorporovať do mitochondriovej membrány. Fluorescenčná anizotropia bola stanovená použitím PerkinElmer LS45 luminiscenčného spektrofotometra s nastavením excitačnej vlnovej dĺžky 360 nm a emisnej vlnovej dĺžky 425 nm. Stupeň fluorescenčnej anizotropie stanoveného pomocou metódy podľa Shinitzky (Shinitzky, 1984) je v negatívnom vzťahu k fluidite membrány a v pozitívnom vzťahu k rigide membrány.

Stanovenie obsahu oxidovaných izoforiem CoQ_9 v mitochondriách

Obsah oxidovaných izoforiem koenzýmu Q ($\text{CoQ}_{9\text{ox}}$) v izolovaných mitochondriách bol stanovený metódou HPLC (Beckmann Gold, USA) s použitím kolóny Sepharon SGX C18 (250 mm $\times$ 4 mm i.d., 7 μm , Tessek, Česká republika). Mobilná fáza pozostávala zo zmesi metanol : acetonitril : etanol v obj. pomere 6 : 2 : 2. Meranie prebiehalo pri

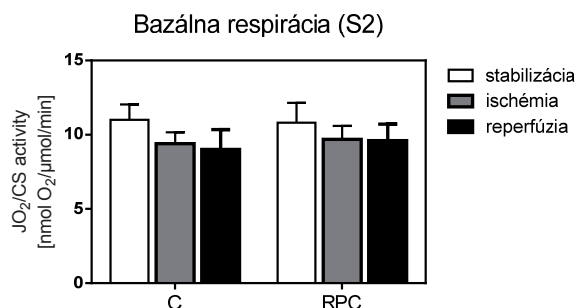
prietoku 1 mL min^{-1} s nástrekom vzorky o objeme 20 μL . Koncentrácia koenzýmových izoforiem bola detegovaná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 275 nm. Všetky merania boli vykonané pri izbovej teplote.

Štatistická analýza dát

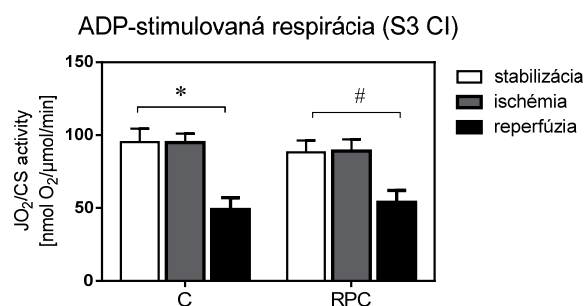
Štatistická analýza dát bola vykonaná pomocou programu StastDirect verzie 2.7.8 (StatsDirect, UK). Výsledky sú prezentované ako priemerné hodnoty $\pm$ stredná chyba priemeru (SEM). Normalita dát bola overená použitím Shapiro–Wilkovho W-testu. Medziskupinové rozdiely boli testované one-way analýzou variancie s nasledujúcim Dunnettovým testom pre porovnanie s kontrolou alebo Tukey–Kramerovým testom pre všetky párové porovnania. V prípade nenormálne rozdelených dát bola použitá alternatíva neparametrických testov (Kruskal-Wallisov test a Connover-Inmanov test).

VÝSLEDKY

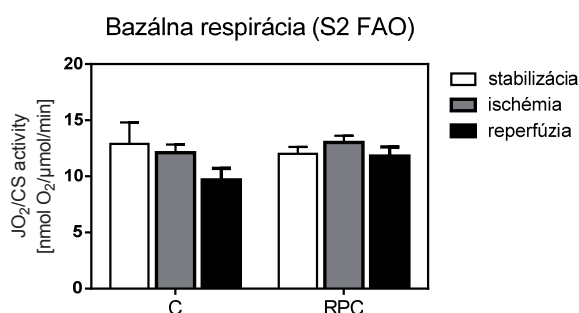
V tejto štúdii sme sledovali vplyv remote ischemického preconditioningu na izolované srdcové mitochondrie s účelom objasnenia možných alterácií vo funkčnosti mitochondrií, ktoré by mohli byť protektívne po ischemicko-reperfúznom poškodení. Obrázky 5 – 8 znázorňujú merania bazálnej respirácie, ako aj respirácie mitochondrií po pridaní exogénneho ADP, t. j. ADP-stimulovanej respirácie mitochondrií, s použitím viacerých kombinácií respiračných substrátov. Zistili sme, že pri použití kombinácie substrátov glutamát+malát, ischemicko-reperfúzne poškodenie spôsobilo signifikantný pokles v ADP-stimulovanej respirácii o 48,52 % u kontrolnej skupiny. Remote ischemický preconditioning však pokles v dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia štatisticky významne neovplyvnil, aj keď pokles predstavoval 38,9 %. Pri použití substrátov malát+oktanoylkarnitín odraňajúcich proces oxidácie mastných kyselín sme pozorovali obdobný pokles v dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia (24,5 % u kontrolnej skupiny a 19,8 % u skupiny s RPC). Bazálna respirácia nebola ischemicko-reperfúznym poškodením, ani remote ischemickým preconditioningom ovplyvnená.



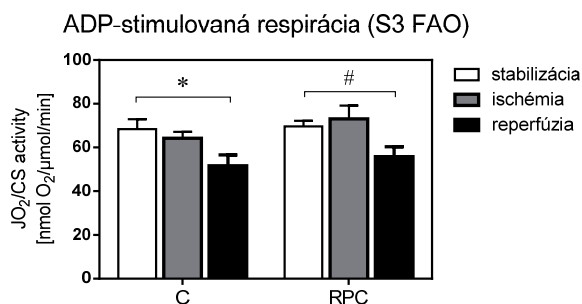
Obr. 5. Efekt remote ischemického preconditioningu (RPC) na bazálnu respiráciu (stav S2) mitochondrií izolovaných zo srdca po jednotlivých fázach ischemicko-reperfúzneho testu. Ako substráty boli použité glutamát+malát. Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$.



Obr. 6. Efekt remote ischemického preconditioningu (RPC) na ADP-stimulovanú respiráciu (stav S3) mitochondrií izolovaných zo srdca po jednotlivých fázach ischemicko-reperfúzneho testu. Ako substráty boli použité glutamát+malát. Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$. * $p < 0,05$ vs. C po stabilizácii vs. C po reperfúzii, # $p < 0,05$ RPC po stabilizácii vs. RPC po reperfúzii.

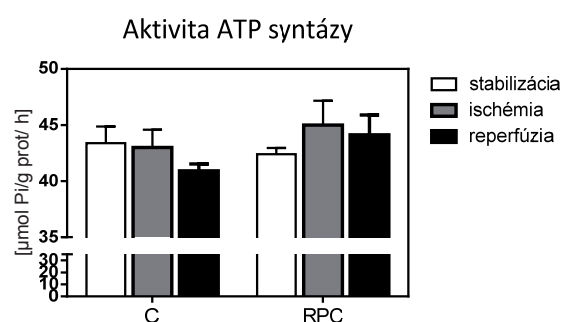


Obr. 7. Efekt remote ischemického preconditioningu (RPC) na bazálnu respiráciu (stav S2) mitochondrií izolovaných zo srdca po jednotlivých fázach ischemicko-reperfúzneho testu. Ako substráty boli použité malát+oktanoylkarnitín pre objasnenie zapojenia procesu oxidácie mastných kyselín (FAO). Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$.



Obr. 8. Efekt remote ischemického preconditioningu (RPC) na ADP-stimulovanú respiráciu (stav S3) mitochondrií izolovaných zo srdca po jednotlivých fázach ischemicko-reperfúzneho testu. Ako substráty boli použité malát+oktanoylkarnitín pre objasnenie zapojenia procesu oxidácie mastných kyselín (FAO). Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$. * $p < 0,05$ vs. C po stabilizácii vs. C po reperfúzii, # $p < 0,05$ RPC po stabilizácii vs. RPC po reperfúzii.

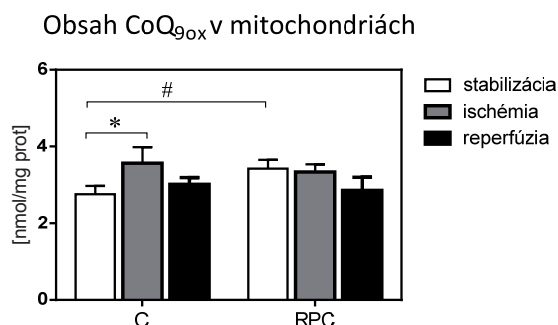
Meranie biochemického parametra aktivity ATP syntázy (komplex V) nám umožnilo sledovať funkčnosť mitochondrií z hľadiska ich schopnosti produkovať ATP. Vplyvom ischemicko-reperfúzneho poškodenia dochádza k poškodeniu dýchacieho reťazca a síce ku poškodeniu oxidačnej fosforylácie, o čom svedčí znížená aktivita ATP syntázy. Remote ischemický preconditioning spôsobil štatisticky nevýznamný 7,8 % nárast aktivity ATP syntázy srdcových mitochondrií v porovnaní s kontrolnou skupinou vystavenou ischemicko-reperfúznemu poškodeniu (Obr. 9).



Obr. 9. Aktivita ATP syntázy mitochondrií izolovaných zo srdca po každej fáze ischemicko-reperfúzneho testu z kontrolnej (C) a remote ischemickým preconditiongom ovplyvnenej skupiny (RPC). Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$.

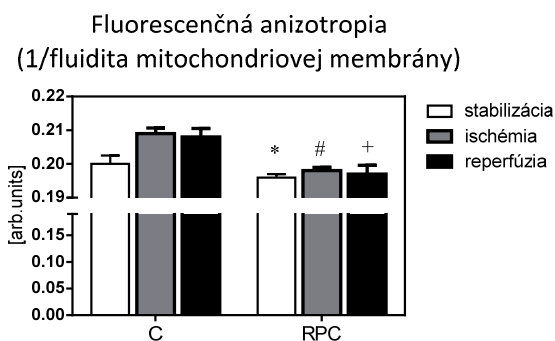
Zmeny v obsahu oxidovaných izoforiem koenzýmu CoQ_{9ox} počas účinku ischemicko-reperfúzneho poškodenia tak na kontrolnú skupinu, ako i na skupinu podrobenú účinku remote ischemického preconditioningu sú znázornené na Obr. 10.

Pozorovali sme signifikantné 29,3 % zvýšenie oxidovanej izoformy $\text{CoQ}_{9\text{ox}}$ po 30 minútovej ischémii u kontrolnej skupiny čo nepriamo podporuje pravdepodobnosť poškodenia dýchacieho reťazca v dôsledku ischémie. U skupiny ovplyvnenej remote ischemickým preconditioningom sme zistili signifikantné zvýšenie obsahu koenzýmu $\text{CoQ}_{9\text{ox}}$ v mitochondriách po stabilizačnej fáze ischemicko-reperfúzneho testu.



Obr. 10. Koncentrácia oxidovaných izoform koenzýmu $\text{CoQ}_{9\text{ox}}$ v srdcových mitochondriách u kontrolnej (C) a remote ischemickým preconditioningom ovplyvnenej skupiny (RPC) po jednotlivých fázach ischemicko-reperfúzneho testu. Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$. * $p < 0,05$ C po stabilizácii vs. C po ischémii, # $p < 0,05$ RPC vs. C po stabilizácii.

Efekt remote ischemického preconditioningu na fluiditu membrán srdcových mitochondrií je znázornený na Obr. 11. Srdcia kontrolnej, ako aj remote ischemickým preconditioningom ovplyvnenej skupiny vystavené ischémii a reperfúzii vykazovali



Obr. 11. Remote ischemickým preconditioningom (RPC) indukované zmeny fluorescenčnej anizotropie membrány mitochondrií izolovaných zo srdca po každej fáze ischemicko-reperfúzneho testu. Fluorescenčná anizotropia predstavuje recipročnú hodnotu fluidity mitochondriovej membrány. Dáta sú prezentované ako aritmetický priemer $\pm$ SEM, $n = 7$. * $p < 0,05$ vs. C po stabilizácii, # $p < 0,05$ vs. C po ischémii, + $p < 0,05$ vs. C po reperfúzii.

signifikantne zvýšenú fluorescenčnú anizotropiu, čo odráža zvýšenú rigiditu mitochondriovej membrány v dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia. Ďalej sme vo všetkých fázach ischemicko-reperfúzneho testu zaznamenali signifikantné zvýšenie fluidity mitochondriovej membrány vplyvom remote ischemického preconditioningu.

DISKUSIA

Ochorenia postihujúce kardiovaskulárny systém patria v súčasnosti k najčastejšie sa vyskytujúcim ochoreniam modernej spoločnosti a predstavujú jeden z najzávažnejších zdravotných rizík (Lozano a kol., 2010; Roger a kol., 2010). Z nich práve ischemická choroba srdca sa stáva hlavnou príčinou letálneho poškodenia myokardu a i napriek nedávnym značným pokrokom v prevencii a liečby je stále významnou príčinou úmrtnosti vo väčšine vyspelých štátov (Nichols a kol., 2014).

V súčasnej dobe patogenitický mechanizmus zodpovedný za ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu je relatívne dobre známy (Turer a Hill, 2010). V dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia boli popísané nezvratné zmeny nielen vo fyziologickej funkcii myokardu, ale aj zmeny na úrovni kardiomyocytov, ako aj subcelulárnych organel. Mitochondrie sa významne podieľajú na ischemicko-reperfúznom poškodení myokardu práve stratou ich funkcie a zvýšenou produkciou reaktívnych kyslíkových radikálov (Zweier a kol., 1987). Mitochondriálna dysfunkcia, ako kľúčový faktor poškodenia funkčnosti myokardu, zahŕňa viaceré (patologické) procesy pozostávajúce zo zhoršenej aktivity multiproteínových komplexov elektrón-transportného reťazca (Chen a kol., 2007), poruchy iónovej homeostázy, zvýšenej tvorby reaktívnych kyslíkových radikálov (Ambrosio a kol., 1993), vápnikového preťaženia, zvýšenej tvorby a otvárania mPTP (Li a kol., 2015). Ischemicko-reperfúzne poškodenie iniciuje sériu zmien v štrukturálnych a funkčných vlastnostiach mitochondrií, akými sú zvýšená permeabilita mitochondriovej membrány, uvoľňovanie proapoptotických proteínov, ako aj odpojenie oxidačnej fosforylácie, čo v konečnom dôsledku vedie k apoptóze kardiomyocytov (Li a kol., 2010).

V súlade s literatúrou, aj naše výsledky potvrdili, že v dôsledku ischemicko-reperfúzneho poškodenia myokardu dochádza ku zhoršeniu funkcie mitochondrií. Pre sledovanie respiračnej aktivity mitochondrií sme využili metódu vysoko-

účinnnej oxygrafii s použitím vhodnej kombinácie viacerých substrátov. Výsledky štúdie po 30-minútovej ischémii a 40-minútovej reperfúzii potvrdili znížený stav S3 mitochondrií, teda zníženú spotrebu kyslíka pri oxidačnej fosforylácii, určenú pridaním ADP a substrátov pre komplex I (glutamát a malát, ako aj malát a oktanoylkarnitín). Rovnako aktivita komplexu V, zodpovedného za produkciu energie vo forme ATP, bola po ischémii a reperfúzii znížená. Pozorovanú zníženú funkciu mitochondrií pripisujeme hlavne škodlivému účinku reaktívnych foriem kyslíka. Mitochondrie sú považované za jeden z permanentných producentov reaktívnych foriem kyslíka, kde dochádza k úniku elektrónov pri záverečnej redukcii kyslíka na vodu, ale aj v elektrón-transportnom reťazci mitochondrií (Murphy, 2009). U postischemicko-reperfúzných vzoriek srdcových mitochondrií sme pozorovali vyšší obsah oxidovaných izoformiem CoQ_{9ox} nepriamo odzrkadľujúcich vyššiu produkciu voľných kyslíkových radikálov. Keďže voľné kyslíkové radikály vo zvýšenej miere prispievajú k lipoperoxidácii sledovali sme aj ďalší biofyzikálny parameter – fluiditu mitochondriovej membrány (Cano-Ramírez a kol., 2012). Pre toto meranie sme využili fluorescečnú sondu difenylhexatrién. Je to hydrofóbná molekula, ktorá sa do 20 minút spontánne inkorporuje do mitochondriovej membrány a jej orientácia a pohyb v membráne súvisí s usporiadaním fosfolipidových molekúl. Potom hodnoty meranej fluorescenčnej anizotropie poskytujú informácie o rigidite lipidovej dvojvrstvy mitochondriovej membrány a je recipročnou hodnotou membránovej fluidity. Ischémia a reperfúzia myokardu spôsobila zvýšenie fluorescenčnej anizotropie sondy DPH, vypovedajúcej o zníženej fluidite mitochondriovej membrány (Shinitzky a kol., 1984). To podporuje skutočnosť, že v dôsledku zvýšenej tvorby voľných kyslíkových radikálov, dochádza ku ich interakcii s membránou mitochondrií a ich membránovými komplexami a priamo ako aj nepriamo, prostredníctvom zníženia fluidity mitochondriovej membrány, dochádza ku zmene štruktúry a funkcie komponentov elektrón-transportného reťazca v mitochondriách, čo vyúsťuje v zníženie ich aktivity ako aj oxidačnej fosforylácie mitochondrií (Paradies a kol., 2009). Znížená membránová fluidita mitochondrií, ako aj znížená aktivita mitochondriovej ATP syntázy bola pozorovaná Fan a jeho kolektívom (Fan et al., 2005). Ďalej bola dokázaná znížená aktivita mitochondriovej Ca^{2+} -ATPázy, ako aj aktivita sarkolemálnej $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -

ATPázy. Zaznamenaný pokles v respiračnej funkcii mitochondrií a odpojenie oxidačnej fosforylácie kolektív Hana a Chena pripisuje, ako príčinu zníženej produkcie ATP (Han a Chen, 2002).

V poslednom dvadsaťročí sa spolu s prehlbujúcimi znalosťami patogenetických mechanizmov zodpovedných za vznik ischemicko-reperfúzneho poškodenia opakovane objavujú snahy o protektívne ovplyvnenie reperfundovaného myokardu s cieľom predísť tomuto poškodeniu. Jedným z účinných kardioprotektívnych intervencií zvyšujúcich ischemickú toleranciu srdca sa ukázal byť ischemický preconditioning (Murry a kol., 1986), ako aj remote ischemický preconditioning popísaný v roku 1993 kolektívom Przyklenkovej (Przyklenk a kol., 1993). Zmeny, ktoré sú indukované krátkymi ischemickými impulzami preconditioningu spúšťajú mechanizmy endogénnej ochrany myokardu. Aj napriek viacerým štúdiám poukazujúcim na kardioprotektívny účinok preconditioningu v pokusoch na zvieratách, sa ukazuje byť štúdium na ľuďoch stále potrebné. Pre efektívne klinické využitie tohto kardioprotektívneho fenoménu sú nevyhnutné podrobné znalosti a sledovanie bunkových a molekulárnych mechanizmov nielen na úrovni upregulácie kardioprotektívnych génov (Guo et al. 1998, Bolli 2007).

Popísané boli viaceré pravdepodobné signálne dráhy, ktoré sú zahrnuté v mechanizme účinku remote ischemického preconditioningu (Przyklenk and Whittaker, 2011, Čarnická a kol., 2013). Avšak doteraz previazanosť a mechanizmus jeho protektívneho pôsobenia na myokard počas ischémie a reperfúzie nie sú zatiaľ úplne popísané a pochopené. V súčasnosti absentujú najmä informácie o kardioprotekcii remote ischemického preconditioningu na úrovni energetiky myokardu. Na základe poznatkov Caoa o zapojení vápnikom aktivovaných K^{+} kanálov do mechanizmu kardioprotekcie predpokladáme, že do zmien indukovaných remote ischemickým preconditioningom spôsobujúcich zvýšenú odolnosť myokardu voči ischémii môžu byť zahrnuté zmeny na úrovni dýchacích funkcií mitochondrií a ich membránových vlastností. Rovnako poznatky o senzitivite funkcie myokardu na metabolické faktory zahŕňajúc predovšetkým intracelulárne pH (Orchard a Kentish, 1990) napovedá o pravdepodobnom zapojení bioenergetiky mitochondrií do sledu reakcií indukovaných remote ischemickým preconditioningom.

V predchádzajúcich štúdiách bola popísaná zhoršená mitochondriová respirácia v priebehu

reperfúznej fázy myokardu, hlavne cez komplex I (Paradies a kol., 2004; Tompkins a kol., 2006), a jej zlepšenie indukované vplyvom ischemického preconditioningu (Lim a kol., 2002). Avšak v našom experimente sme obdobné zlepšenie mitochondriovej respiračnej aktivity vplyvom remote ischemického preconditioningu nepozorovali. Remote ischemický preconditioning nezlepšil funkciu elektrón-transportného reťazca mitochondrií. Za prítomnosti respiračných substrátov glutamát+malát, či malát+oktanoylkarnitín (stav S2, bazálna respirácia), ako aj pri stimulácii respirácie pridaním ADP (stav S3, ADP-stimulovaná respirácia) sme nepozorovali štatisticky významné zmeny v spotrebe kyslíka mitochondrií izolovaných zo srdca ovplyvnených remote ischemickým preconditioningom. Meranie aktivity komplexu V v mitochondriovej frakcii v obrátenej reakcii v prítomnosti iónov Mg^{2+} a rozpojovača 2,4-dinitrofenolu, odzrkadľuje proces tvorby energie pre myokard. Zvýšenie aktivity tohto komplexu by pravdepodobne zabezpečilo udržanie spojenia oxidácie s fosforyláciou (tvorba ATP), ktoré je počas ischémie a hypoxie v myokarde zhoršené. U preconditioningovaných vzoriek srdcových mitochondrií nebolo preukázané štatisticky významné zlepšenie aktivity komplexu V, ATP syntázy: skupina ovplyvnená remote ischemickým preconditioningom po 40-minútovej reperfúzii vykazovala len 7,85%-tné zlepšenie ATP syntázovej aktivity oproti kontrolnej skupine.

V súčasnej dobe sa dostáva do popredia názor, že reaktívne formy kyslíka, generované elektrón-transportujúcimi komplexami respiračného reťazca mitochondrií, môžu participovať na iniciácii procesu kardioprotekcie sprostredkovanej ischemickým preconditioningom (Otani, 2004; Saini a kol., 2004; Das a kol., 1999). Stanovenie obsahu oxidovaných izoformiem koenzýmu CoQ_{9ox} v mitochondriách nám poskytlo informáciu o tvorbe a nepriamom účinku voľných radikálov na funkciu dýchacieho reťazca mitochondrií. Zaujímavým nálezom je, že remote ischemický preconditioning spôsobil štatisticky významný nárast oxidovaných izoformiem koenzýmu CoQ_{9ox} počas 15 minútovej stabilizácie v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tento nález rovnako nasvedčuje tvrdeniu, že vzniknuté voľné radikály v mitochondriách majú skôr signálny ako poškodzujúci charakter.

V posledných 15 – 20 rokoch sa do popredia dostáva práve úloha membránovej fluidity v súvislosti so samotným membránovým systémom myokardu. Rýchlo stúpajúci počet štúdií potvrdil

regulačnú úlohu membránovej fluidity pre funkciu subcelulárnych membránových systémov myokardu vo fyziologických aj patologických podmienkach (Ziegelhoffer-Mihalovicová a kol., 2003; Ziegelhoffer a kol., 1997). Ukázalo sa, že zmenami membránovej fluidity srdcových mitochondrií sa môže uplatniť regulačný vplyv na mobilitu systémov, ktoré sú viazané na membránu a tým kontrolovať ich funkciu (Ziegelhoffer a kol., 2012). Teóriu o signálnej úlohe voľných kyslíkových radikálov potvrdzujú i výsledky membránovej fluidity. Ako bolo už prezentované pri obr. 11, u všetkých skupín ischemicko-reperfúzneho testu ovplyvnených remote ischemickým preconditioningom sme zaznamenali signifikantný ($p < 0,05$) pokles anizotropie (odpovedajúci nárastu membránovej fluidity). Predpokladáme úzky súvis medzi pozorovaným nárastom fluidity mitochondriových membrán s miernym nárastom aktivity ATP syntázy, ktorá je viazaná na membránu. Mitochondriová ATP syntáza je lokalizovaná na vnútornej membráne mitochondrií a prechádza cez lipidovú dvojvrstvu. Pre udržanie dostatočnej rotácie ATP syntázy potrebnej pre jej prácu je nevyhnutná dostatočná fluidita mitochondriových membrán. Z tohto dôvodu sa paralelne so stanovením aktivity ATP syntázy vyhodnocuje aj fluidita mitochondriových membrán a obsah konjugovaných diénov v mitochondriovej membráne. Oba parametre určujú stav mitochondriových membrán, fluidita odzrkadľuje tekutosť membrány, konjugované diény nepriamo určujú stupeň poškodenia lipidickej dvojvrstvy mitochondriových membrán (Shinitzky a kol., 1984).

Je pravdepodobné, že zvýšená membránová fluidita mitochondrií spolu so stimuláciou mitochondriovej ATP syntázy by mohli zlepšiť energetické požiadavky myokardu počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia. Nárast membránovej fluidity srdcových mitochondrií u skupiny ovplyvnenej remote ischemickým preconditioningom naznačil zvýšenú odolnosť myokardu voči ischémii a následne i zlepšenú obnovu myokardu po reperfúzii. Z našich výsledkov preto usudzujeme, že remote ischemický preconditioning prostredníctvom procesu udržania zvýšenej membránovej fluidity mitochondrií čiastočne eliminuje ischemicko-reperfúzne poškodenie. Tento proces zaraďujeme medzi endogénne ochranné mechanizmy, ktoré účinnou remodeláciou mitochondriových membrán vyvíjajú dostatočný protektívny účinok, čo v konečnom dôsledku napomáha k udržaniu

myokardu voči energetickej deficiencii počas patologickej záťaže (Ferko a kol, 2015). Zároveň pozorovaný pokles obsahu oxidovaných izoforém koenzýmu CoQ_{9ox}, ako i pozitívny fluidizačný efekt mitochondriových membrán potvrdzujú udržateľnosť systému bez masívneho rozvoja tvorby voľných radikálov počas patologickej záťaže vplyvom účinku protektívnych mechanizmov remote ischemického preconditioningu.

V našej štúdii sme použili protokol remote ischemického preconditioningu využívajúceho na propagáciu svojho účinku tri 5-minútové ischemicko-reperfúzne cykly aplikované oklúziou descendantnej vetvy stehennej tepny na pravej zadnej končatine potkana. Výsledky doterajších klinických štúdií ukazujú, že optimálny protokol pre indukovanie remote ischemického preconditioningu nebol doteraz stanovený (Vasdekis a kol., 2013). Avšak protokol s tromi sériami 5-minútových ischemicko-reperfúzných cyklov sa v klinických štúdiách zdá byť efektívny (Hoole a kol., 2009; Xie a kol., 2012; Ahmed a kol., 2013; Slagsvold a kol., 2014). Štúdia Ahmeda a jeho kolektívu ukázala, že s ohľadom na elektrofyziologické, biochemické a histologické zmeny, lokálny ischemický preconditioning poskytuje účinnejší kardioprotektívny efekt ako remote ischemický preconditioning (Ahmed a kol., 2012). Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že použitie protokolu s vyšším počtom ischemických cyklov by mohlo významne ovplyvniť naše výsledky. Vyšší počet ischemicko-reperfúzných cyklov môže reprezentovať silnejší protektívny stimul podobnému ako v prípade ischemického preconditioningu, ktorý by sa mohol prejaviť aj na funkčných vlastnostiach srdcových mitochondrií.

ZÁVER

Remote ischemický preconditioning prostredníctvom mechanizmov endogénnej protekcie myokardu indukuje rozsiahle zmeny vo funkčných parametroch srdcových mitochondrií s ohľadom na biofyzikálny stav ich membrán. Výsledky našej práce ukázali, že remote ischemický preconditioning spôsobuje zvýšenie fluidity mitochondriovej membrány po všetkých fázach ischemicko-reperfúzneho testu a indukuje tvorbu voľných radikálov počas stabilizačnej fázy. Keďže zvýšenú tvorbu voľných kyslíkových radikálov nesprievádzal proces rigidizácie membrány, voľným kyslíkovým radikálom pripisujeme prevažne signálny charak-

ter smerovaný ku iniciácii kardioprotektívnych endogénnych mechanizmov. Remote ischemický preconditioning neposkytol štatisticky významné zlepšenie respiračnej aktivity mitochondrií, ADP-stimulovanej respirácie, ako ani aktivity ATP syntázy po ischemicko-reperfúznom poškodení myokardu. Avšak predpokladáme, že použitie protokolu s vyšším počtom ischemických cyklov predstavujúcich silnejší protektívny stimul podobný ischemickému preconditioningu by mohlo štatisticky významne ovplyvniť doterajšie výsledky.

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by sme sa chceli úprimne poďakovať Ing. Miroslavovi Ferkovi za odborné vedenie, ako aj RNDr. Zuzane Sumbalovej, PhD., RNDr. Olge Uličnej, CSc., Ing. Olge Vančovej a PharmDr. Jarmile Kucharskej, CSc. za ich cenné rady a pomoc pri realizácii experimentov. Práca bola podporená grantami: VEGA 2/0133/15, 2/0201/15, APVV 0102-11.

Literatúra

- Acin-Perez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr;1837(4):444–50.
- Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM. Comparative study of the cardioprotective effects of local and remote preconditioning in ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. 2012 Feb 13;90(7-8):249–56.
- Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM. Comparative study of the cardioprotective effects of local and remote preconditioning in ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. 2012 Feb 13;90(7-8):249–56.
- Ahmed RM, Mohamed el-HA, Ashraf M, Maithili S, Nabil F, Rami R, Mohamed TI. Effect of remote ischemic preconditioning on serum troponin T level following elective percutaneous coronary intervention. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013 Nov 1;82(5):E647–53.
- Alberts, B. Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Praha: Espero Publishing, 1998. 630s. ISBN 80-902906-2-0.
- Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M, et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem*. 1993 Sep 5;268(25):18532–41. PubMed PMID: 8395507.
- Bakker A, Thone F, Borgers M, Jacob W. Contact sites between the inner and outer mitochondrial membranes in stunned versus hibernating myocardium. *Cardiovasc Pathol*. 1995 Jul-Sep; 4(3): 195–202.

- Biermans W, Bakker A, Jacob W. Contact site between inner and outer mitochondrial membrane: a dynamic microcompartment for creatine kinase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Jul 25;1018(2-3):225–8.
- Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H19–27.
- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 87(11):972–83, 2000.
- Cano-Ramírez D, Torres-Vargas CE, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M. Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol*. 2012 May;26(5):206–11.
- Cao Y, Zhang S, Zhao S, Bruce IC. The mitochondrial Ca^{2+} -activated K^{+} channel contributes to cardioprotection by limb remote ischemic preconditioning in rat. *Life Sciences*, 2011, Jun, 88 (23–24): 1026–1030.
- Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*. 1987 Aug 1;245(3):915–8.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233–49.
- Čarnická S, Ferko M., Ledvényiová V., Khandelwal V., Barteková M., Ravingerová T. Remote ischemic preconditioning: A promising strategy to protect the heart. In *Experimental and Clinical Cardiology : the journal of the International Academy of Cardiovascular Sciences*, 2013, vol. 18, suppl. A, p. 11A–16A.
- Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem*. 1999 Jun;196(1-2):59–67.
- Daum G. Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Jun 12;822(1):1–42.
- Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, Przyklenk K. Rabbit heart can be “preconditioned” via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol*. 1999;277:H2451–H2457.
- Eigentler A, Draxl A, Weithüchter A, Kuznetsov Av, Lassnig B, Gnaiger E: Laboratory protocol: Citrate synthase. Mitochondrial marker enzyme. *Mitochondr Physiol Network* 17.04: 1–11, 2012.
- Fan LL, Li H, Fan MJ, Zhang RD. [Protection of oxyphenamone against cardiac arrest-reperfusion injury of isolated rat hearts]. *Yao Xue Xue Bao*. 2005 Aug;40(8):705–10. Chinese. PubMed PMID: 16268504.
- Fasching M, Fontana-Ayoub M, Gnaiger E: Mitochondrial Respiration Medium – MiRO6. *Mitochondr Physiol Network* 14.13: 1–4, 2014.
- Ferenčík M, Škárka B, Novák K, Turecký L. (eds) *Biochémiá*. Slovak Academic Press, Bratislava, pp: 85–99, 2000.
- Ferko M, Habodászová D, Waczulíková I, Mujkosová J, Kucharská J, Sikurová L, Ziegelhoffer B, Styk J, Ziegelhoffer A. Endogenous protective mechanisms in remodeling of rat heart mitochondrial membranes in the acute phase of streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 2:S67–73.
- Ferko M, Kancirová I, Jašová M, Čarnická S, Muráriková M, Waczulíková I, Sumbalová Z, Kucharská J, Uličná O, Ravingerová T, Ziegelhoffer A. Remote ischemic preconditioning of the heart: protective responses in functional and biophysical properties of cardiac mitochondria. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 4:S469–78.
- Gøtzsche O. Abnormal myocardial calcium uptake in streptozotocin-diabetic rats. Evidence for a direct insulin effect on catecholamine sensitivity. *Diabetes*. 1985 Mar;34(3):287–90.
- Griffiths EJ. Mitochondria--potential role in cell life and death. *Cardiovasc Res*. 2000 Apr;46(1):24–7. PubMed PMID: 10727650.
- Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1375–87.
- Gustafsson AB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death *Cardiovascular Research* Jan 2008, 77 (2) 334–343.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):79–94.
- Han L, Chen KJ. [Biomembrane damages induced by in vivo and in vitro myocardial ischemia and reperfusion in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2002 Feb;18(1):59–62. Chinese. PubMed PMID: 21179845.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008 Aug 1;79(3):377–86.
- Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, Clarke SC, Shapiro LM, Schofield PM, O'Sullivan M, Dutka DP. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):820–7.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Feb;294(2):C460–6. Epub 2007 Dec 12. PubMed PMID: 18077608.
- Kadenbach B. Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:1–11.
- Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1557–65.
- Li H, Wang Y, Wei C, Bai S, Zhao Y, Li H, Wu B, Wang R, Wu L, Xu C. Mediation of exogenous hydrogen sulfide

- in recovery of ischemic post-conditioning-induced cardioprotection via down-regulating oxidative stress and up-regulating PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in isolated aging rat hearts. *Cell Biosci.* 2015 Mar 15;5:11
- Li T, Zhang P, Liu J, Zhou R, Li Q, You Z, Dian K. Protective effects of hemoglobin-based oxygen carrier given to isolated heart during ischemia via attenuation of mitochondrial oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 2010 Apr 15;48(8):1079–89
- Lim KH, Javadov SA, Das M, Clarke SJ, Suleiman MS, Halestrap AP. The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J Physiol.* 2002 Dec 15;545(Pt 3):961–74.
- Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:651–655
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA III, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–2128.
- Malekova L, Kominkova V, Ferko M, Stefanik P, Krizanova O, Ziegelhöffer A, Szewczyk A, Ondrias K. Bongkrekic acid and atractyloside inhibits chloride channels from mitochondrial membranes of rat heart. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1767(1):31–44. Epub 2006 Oct 14.
- Maslov LN, Naryzhnaia NV, Podoksenov IuK, Prokudina ES, Gorbunov AS, Zhang I, Pei ZhM. [Reactive oxygen species are triggers and mediators of an increase in cardiac tolerance to impact of ischemia-reperfusion]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2015 Jan;101(1):3–24.
- McCarron JG, Wilson C, Sandison ME, Olson ML, Girkin JM, Saunter C, Chalmers S. From structure to function: mitochondrial morphology, motion and shaping in vascular smooth muscle. *J Vasc Res.* 2013;50(5):357–71.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):1–13
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986 Nov;74(5):1124–36.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European Heart Journal* Nov 2014, 35 (42) 2950–2959
- Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1990 Jun;258(6 Pt 1):C967–81.
- Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Apr;6(2):449–69.
- Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, April 2014, 1837(4): 408–417.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium.* 2009 Jun;45(6):643–50.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res.* 2004 Jan 9;94(1):53–9.
- Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou

- T, Koehler C, Kroemer G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.* 2000 Feb;7(2):137–44.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993 Mar;87(3):893–9.
- Ravingerová T, Neckár J, Kolár F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2003 Jul;249(1-2):167–74.
- Ravingerová T, Stetka R, Volkovová K, Pancza D, Dzurba A, Ziegelhöffer A, Styk J. Acute diabetes modulates response to ischemia in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2000 Jul;210(1-2):143–51.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J. on behalf of the American Heart Association Statistics Committee Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2011 update: A report from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;123(4):e18–e209.
- Saini HK, Machackova J, Dhalla NS. Role of reactive oxygen species in ischemic preconditioning of subcellular organelles in the heart. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Apr;6(2):393–404.
- Sherratt HS. Mitochondria: structure and function. *Rev Neurol (Paris).* 1991;147(6-7):417–30.
- Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond).* 2009;117:191–200.
- Shinitsky, M. 1984. Membrane fluidity and cellular functions. *Physiology of membrane fluidity.* Edited by M. Shinitsky. CRC Press, Boca Raton. pp. 1–184.
- Schmidt MR, Sloth AD, Johnsen J, Bøtker HE. Remote ischemic conditioning: the cardiologist's perspective. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2012 Nov;13(11):667–74.
- Slagsvold KH, Rognmo O, Høydal M, Wisløff U, Wahba A. Remote ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and influences myocardial microRNA expression in atrial myocardium during coronary bypass surgery. *Circ Res.* 2014 Feb 28;114(5):851–9.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):1093–129. Review. PubMed PMID: 15987803.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol.* 1999 Jan;45(1):25–32. PubMed PMID: 9894873.
- Tani M, Neely JR. Hearts from diabetic rats are more resistant to in vitro ischemia: possible role of altered Ca²⁺ metabolism. *Circ Res.* 1988 May;62(5):931–40.
- Taussky Hh, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem.* 1953 Jun;202(2):675–85.
- Tompkins AJ, Burwell LS, Digerness SB, Zaragoza C, Holman WL, Brookes PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Feb;1762(2):223–31.
- Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *The American journal of cardiology.* 2010;106(3):360–368.
- Vasdekis SN, Athanasiadis D, Lazaris A, Martikos G, Katsanos AH, Tsivgoulis G, Machairas A, Liakakos T. The role of remote ischemic preconditioning in the treatment of atherosclerotic diseases. *Brain Behav.* 2013 Nov;3(6):606–16.
- Veighey K, Macallister RJ. Clinical applications of remote ischemic preconditioning. *Cardiol Res Pract.* 2012;2012:620681.
- Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A, Sikurova L, Ziegelhöffer A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Mar-Apr;85(3-4):372–81.
- Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003 Aug 22;93(4):292–301.
- Wittig I, Schägger H. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul-Aug;1777(7-8):592–8.
- Xie JJ, Liao XL, Chen WG, Huang DD, Chang FJ, Chen W, Luo ZL, Wang ZP, Ou JS. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing heart valve surgery: randomised controlled trial. *Heart.* 2012 Mar;98(5):384–8.
- Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, Sebková J, Waczuliková I, Breier A, Dzurba A, Volkovová K, Cárský J, Turecký L. Mechanisms that may be involved in calcium tolerance of the diabetic heart. *Mol Cell Biochem.* 1997 Nov;176(1-2):191–8.
- Ziegelhöffer A, Ravingerová T, Styk J, Tribulová N, Volkovová K, Sebková J, Breier A. Diabetic cardiomyopathy in rats: biochemical mechanisms of increased tolerance to calcium overload. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996 Jul;31 Suppl:S93–103.

- Ziegelhoffer A, Styk J, Ravingerová T, Seboková J, Volkovová K, Waczulíková I, Cársky J, Dzurba A, Docolomanský P. Prevention of processes coupled with free radical formation prevents also the development of calcium-resistance in the diabetic heart. *Life Sci.* 1999;65(18-19):1999–2001.
- Ziegelhoffer A, Waczulíková I, Ferko M, Kincelová D, Ziegelhoffer B, Ravingerová T, Cagalinec M, Schönburg M, Ziegelhoeffer T, Sikurová L, Ulicná O, Mujkosová J. Calcium signaling-mediated endogenous protection of cell energetics in the acutely diabetic myocardium. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;87(12):1083–94.
- Ziegelhoffer A, Waczulíková I, Ferko M, Šikurová L, Mujkošová J, Ravingerová T. Involvement of membrane fluidity in endogenous protective processes running on subcellular membrane systems of the rat heart. *Physiol Res.* 2012;61 Suppl 2:S11–21.
- Ziegelhoffer-Mihalovicová B, Okruhlicová L, Tribulová N, Ravingerová T, Volkovová K, Seboková J, Ziegelhoffer A. Mitochondrial contact sites detected by creatine phosphokinase activity in the hearts of normal and diabetic rats: is mitochondrial contact sites formation a calcium-dependent process? *Gen Physiol Biophys.* 1997 Dec;16(4):329–38.
- Zoratti M, Szabò I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 7;1706(1-2):40–52.
- Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 83(2):213–25, 2009.
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 1404–1407.

NOVÉ STRATEGICKÉ PRÍSTUPY V EXPERIMENTÁLNEJ KARDIOPROTEKCII

Editori

Ing. Miroslav Ferko, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Ing. Pavol Farkaš, PhD., Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava

Autori

MUDr. Marek Zálešák, PhD., Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Štefan Lukáč, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

Mgr. Veronika Ledvényiová-Farkašová, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

MUDr., Tatiana Ravingerová DrSc., Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

Mgr. Lucia Griecsová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Mgr. Ivana Kancirová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Mgr. Magdaléna Jašová, Ústav pre výskum srdca Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Recenzenti

Doc. PharmDr. Adriana Adameová, PhD., Farmaceutická fakulta UK, Katedra farmakológie a toxikológie, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava

MUDr. Ján Styk, CSc., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

MUDr. RNDr. Angelika Púzserová, PhD., Ústav normálnej a patologickej fyziológie Sienki-ewiczova 1, 813 71 Bratislava

RNDr. Barbara Szeiffová-Báčová, PhD., Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, P.O.Box. 104, 840 05, Bratislava

Doc. RNDr. Iveta Waczulíková, PhD., Oddelenie biomedicínskej fyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava

PharmDr. Tomáš Rajtík, PhD., Farmaceutická fakulta UK, Katedra farmakológie a toxikológie, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava

RNDr. Oľga Uličná, CSc., Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

Jazyková úprava: Mgr. Igor Lalík

Grafická úprava: Iveta Adamcová, DALI-BB, s. r. o. Banská Bystrica, www.daliprint.eu

Vydal: Občianske združenie Preveda, Javornícka 21, 974 11, Banská Bystrica

Počet strán: 92

© 2016 Občianske združenie Preveda

ISBN 978-80-970712-9-5

2016

