



# **Kardioprotekcia: od buniek a proteínov až po celý organizmus**

**47. pracovná konferencia  
Komisie Experimentálnej Kardiológie**

Senec, október 7-9, 2019

**Zborník abstraktov**

ISBN 978-80-972360-5-2

## **Predslov:**

Komisia experimentálnej kardiológie (KEK) je pracovnou skupinou Českej a Slovenskej fyziologickej spoločnosti a už takmer 50 rokov funguje ako neformálne združenie tvorivých vedeckých pracovníkov, ktorí sa venujú výskumu srdca a krvného obehu. Členovia KEK sú zapojení do medzinárodnej spolupráce prostredníctvom viacerých odborných spoločností (ISHR, EHS, ECS, IACS-ES a iné). Komisia experimentálnej kardiológie organizuje každoročne pracovné konferencie, ktoré sa konajú striedavo v Čechách, na Morave a na Slovensku. Program konferencií je monotematický a vždy sa snaží zachovať princíp „od molekuly až k lôžku pacienta“.

V r. 2019 sa na Slovensku uskutočnila 47. pracovná konferencia KEK ktorá bola venovaná problematike kardioprotekcie od jej vzniku na úrovni subcelulárnych bunkových štruktúr až po úroveň celého organizmu. Približne 50 účastníkov konferencie z viacerých pracovísk v Českej republike a na Slovensku sa venovali nasledujúcim témam: Regulácia a dysregulácia kardiovaskulárneho systému, Poruchy metabolizmu a stres vo vzťahu ku kardiovaskulárnemu systému, Bunkové a molekulárne mechanizmy poškodenia srdca a protekcie vrátane úlohy mitochondrií, Intervencie zamerané na ochranu buniek myokardu, ako aj Nové metodické postupy.

Zborník predstavuje výber príspevkov autorov vo všetkých spomínaných témach.

MUDr. Táňa Ravingerová, DrSc.,

Ing. Miroslav Ferko, PhD.

**Zborník abstraktov**

**47. pracovná konferencia Komisie Experimentálnej Kardiológie 2019**

**Kardioprotekcia:**

**od buniek a proteínov až po celý organizmus**

**Editoriál:**

**MUDr. Táňa Ravingerová, DrSc., FIACS**

**Ing. Miroslav Ferko, PhD.**

**© Autori jednotlivých príspevkov**

**Pre Ústav pre výskum srdca CEM SAV, vydalo Občianske združenie Preveda**

**Vydavateľstvo: Občianske združenie Preveda, Javornicka 21, Banská Bystrica, 97411**

**ISBN 978-80-972360-5-2**

## UDRŽANIE ENERGETIKY MYOKARDU: VPLYV PRECONDITIONINGU NA MITOCHONDRIÁLNE PÓRY PRECHODNEJ PERMEABILITY

**N. Andelová<sup>1</sup>, I. Waczulíková<sup>2</sup>, V. Farkašová<sup>1</sup>, T. Ravingerová<sup>1</sup>, P. Mišenko<sup>2</sup>, M. Jašová<sup>1</sup>, B. Szeiffová Bačová<sup>1</sup>, Š. Šutý<sup>2</sup>, M. Sýkora<sup>1</sup>, M. Ferko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centrum experimentálnej medicíny SAV, Ústav pre výskum srdca, Bratislava, Slovensko; <sup>2</sup> Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI UK, Bratislava, Slovensko

Neinvazívna forma preconditioningu, tzv. remote ischemický preconditioning (RIP), podobne ako metabolický preconditioning (MP), reprezentovaný modelom akútneho diabetes mellitus (DM), preukázali vo viacerých štúdiách priaznivý kardioprotektívny účinok na funkciu myokardu po ischemicko/reperfúznom poškodení. Doposiaľ však nie sú úplne objasnené procesy signalizácie a iniciácie sledovaných typov preconditioningov. Jedným z najdôležitejších elementov spoločným pre oba kardioprotektívne modely sa ukazujú byť práve mitochondriálne póry prechodnej permeability (mPTP). Cieľom tejto práce bolo štúdium remodelácie mPTP v súvislosti s ich reguláciou na úrovni proteínov a stanovenie retenčnej kapacity mitochondrií pre vápnik. Z hľadiska proteomických analýz využitím LC/MS sme sa zamerali na proteíny, ktoré sú v súčasnosti považované za štruktúrne a regulačné komponenty mPTP. Abundantnosť celého proteínového komplexu mPTP bola v skupine s akútnym DM signifikantne zvýšená, avšak expresie individuálne analyzovaných proteínov vyjadrené parametrom fold change okrem ATP5H, ATP5J a KCERS neboli signifikantne zmenené. Navyše expresie týchto 3 proteínov nie sú považované za biologicky významne zmenené. Výsledky retenčnej kapacity mitochondrií stanovené metódou fluorescenčnej spektroskopie preukázali signifikantne zvýšenú schopnosť diabetických mitochondrií pufrovať vápnik, čo poukazuje na zvýšenú rezistenciu vyšetrených diabetických srdc na preťaženie vápnikom. Vyizolované mitochondrie skupiny RIP nevykazovali zmeny na úrovni retenčnej kapacity mitochondrií, čo nasvedčuje tomu, že účinok RIP je podmienený prítomnosťou následnej patologickej záťaže. Na záver môžeme povedať, že na endogénnych ochranných mechanizmoch vedúcich k adaptácii myokardu na energetickú záťaž reprezentovanú experimentálnym DM sa významným spôsobom podieľajú aj proteíny multienzýmového komplexu mPTP.

Táto práca bola podporená grantami: APVV-15-0119, VEGA 2/0121/18, ITMS 26230120009

## ULTRAMALÉ SUPERPARAMAGNETICKÉ NANOČASTICE OXIDOV ŽELEZA MODIFIKUJÚ KARDIOVASKULÁRNE PARAMETRE V PODMIENKACH AKÚTNEHO STRESU

**Peter Bališ<sup>1</sup>, Pavol Valovič<sup>1,2</sup>, Dominika Radošinská<sup>3</sup>, Tomáš Jasenovec<sup>4</sup>, Jana Radošinská<sup>4,5</sup>, Angelika Púzserová<sup>1</sup>, Michal Kluknavský<sup>1</sup>, Silvia Líšková<sup>1</sup>, Andrea Mičurová<sup>1,3</sup>, Iveta Bernátová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Bratislava; <sup>2</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky fyziky a informatiky, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava; <sup>3</sup>Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave; <sup>4</sup>Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava; <sup>5</sup>Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Ústav pre výskum srdca, Bratislava; <sup>6</sup>Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

V súčasnosti je trendom používanie ultramalých superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého (USPIONS) v rôznych biomedicínskych postupoch ako transportné liečivo s priamym výstupom pre klinickú prax. Aj keď sa USPIONS používajú, ich účinok na kardiovaskulárne parametre, ako je krvný tlak, funkčný stav ciev, biodostupnosť oxidu dusnatého (NO) a deformabilita erytrocytov v podmienkach akútneho stresu nie je známy. Preto sme sa v našej štúdii zamerali na vplyv USPIONS vybraných kardiovaskulárnych parametrov u bdelych dospelých 12-16 týždňových normotenzných potkanov kmeňa Wistar-Kyoto (WKY).

V našom experimente sme použili komerčne dostupné Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočastice (Sigma-Aldrich, Nemecko, veľkosť jadra ≈ 30 nm; hydrodynamický priemer 51 ± 16 nm, koncentrácia 1 mg Fe/ml), ktorých obal pozostával z polyetylénglykolu (PEG). Prostredníctvom kanyly zavedenej v a. carotis sme tlakovým transducérom kontinuálne merali zmeny stredného artériového tlaku (MAP) po podaní fyziologického roztoku alebo USPIONS v podmienkach akútneho stresu, ktorý bol opakovane vyvolaný 5 sekundovým prúdom vzduchu do hornej časti hlavy – tzv. „air-jet“ stres. Nanočastice boli potkanom podávané i.v. cez v. jugularis v koncentrácii 1 mg/kg hmotnosti potkana v dĺžke desiatich minút. Kontrolnej skupine bol identickým spôsobom podávaný fyziologický roztok. Skupine vystavenej stresu bol aplikovaný air-jet stres 3-krát: prvýkrát 10 minút pred podaním látok, druhýkrát 10 min po podaní látok (USPIONS alebo fyziologický roztok) a tretíkrát po uplynutí 80 minút od druhého stresu. Artériová krv bola odobratá do heparinu (10 UI) na začiatku a na konci experimentu. Deformabilita erytrocytov bola stanovená filtračnou metódou.

NO -závislá a -nezávislá zložka od endotelu závislej relaxácie bola stanovená v a. femoralis pomocou Mulvaného drôtkového myografu za izometrických podmienok.

USPIONs a fyziologický roztok nemali výrazný vplyv na MAP. Rozdiel MAP medzi začiatočným (predaplikačným) a konečným meraním u USPIONs nebol významný (ns), avšak v stresovej skupine sme pozorovali jeho pokles ( $p < 0,05$ ). „Air jet“ po infúzii fyziologického roztoku mal za následok  $\approx 30\%$  zvýšenie MAP oproti hodnote pred stresom, zatiaľčo v USPIONs skupine zvýšil MAP o  $\approx 45\%$ . Samotný akútny air-jet stres po i.v. podaní fyziologického roztoku nemal vplyv na rozsah druhej a tretej tlakovej odpovede, ktorý bol hodnotený ako plocha pod tlakovou krivkou (AUC). U USPIONs skupiny sme pozorovali  $\approx 26\%$  zvýšenie AUC, a pri treťom strese až  $\approx 49\%$  zvýšenie oproti prvému stresu. Po podaní USPIONs sa zvýšila deformabilita erytrocytov u kontrolných potkanov, avšak u potkanov vystavených akútnemu stresu sme zmeny nepozorovali. Podobne sme nepozorovali žiadne zmeny v relaxácii závislej od endotelu vyvolanej acetylcholínom (ACh). Po podaní nešpecifického inhibítora NO-syntázy  $N^G$ -nitro-L-arginín-metylésteru (L-NAME) sme pozorovali zníženie relaxačnej odpovede vo všetkých skupinách, avšak rozdiely medzi skupinami neboli pozorované. V skupine USPIONs sme pozorovali zhoršenú ACh-indukovanú relaxačnú odpoveď po inhibícii NO-syntázy ( $p < 0,05$  vs. L-NAME kontrola).

Naše výsledky ukazujú, že USPIONs zvyšujú stresom-indukované odpovede MAP u normotenzných potkanov bez zmeny endotelových funkcií femorálnych artérií. Intravenózne podávanie USPIONs znižuje MAP v pokoji iba u potkanov, ktorí boli vystavení akútnemu stresu. Zároveň sme ukázali, že USPIONs významne zvyšujú defomabilitu erytrocytov, pričom akútny stres tomuto zvýšeniu zabránil.

Práca vznikla za podpory grantov APVV-16-0263, VEGA 2/0160/17 a SAV-BAV-18-11.

## ÚLOHA TRPV4 KANÁLOV V MODELI DOXORUBICÍNOM-INDUKOVANÉHO SRDCOVÉHO ZLYHÁVANIA

**Linda Bartošová<sup>1</sup>, Adrián Szobi<sup>1</sup>, Peter Galis<sup>1</sup>, Dominika Kováčová<sup>3</sup>, Tatiana Ravingerová<sup>2</sup>, Adriana Duriš Adameová<sup>1</sup>, Veronika Farkašová<sup>2</sup>, Tomáš Rajtík<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav pre výskum srdca, CEM SAV, Bratislava

<sup>3</sup> Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta UK, Bratislava

Doxorubicín je účinné antineoplastikum avšak jeho kardiotoxické pôsobenie môže indukovať vznik a progresiu srdcového zlyhávania (SZ). Vanilloidné TRPV kanály prezentujú sľubný farmakologický cieľ v liečbe SZ, keďže antagonisti TRPV4 kanálov, ktoré sú mechano-, termo- a osmosenzitívne znižujú edém asociovaný so SZ. Tieto kanály sú permeabilné aj pre Ca<sup>2+</sup>, asociujú s kalmodulínom a môžu vplývať na aktivitu viacerých kaskád spojených s remodeláciou a bunkovou. Analyzovali sme aj pôsobenie antagonistu TRPV4 kanálov v modeli antracyklínovej kardiotoxicity v srdci. SZ u potkanov Wistar bolo indukované podaním kumulatívnym podaním doxorubicínu (D; i.p. 16mg/kg). Liečená skupina dostávala 2. týždne pred podaním doxorubicínu selektívneho antagonistu TRPV4 kanálov v dávke 5mg/kg/deň (DT). Analyzovali sme viaceré biometrické a biochemické markery, obsah kolagénu v ľavých komorách a expresia vybraných proteínov western blottingom. Analýza biometrických parametrov vykazovala zlepšenie pomeru medzi hmotnosťou tela a hmotnosťou ľavej komory v liečenej skupine napriek zvýšenému obsahu kolagénu. Parametre orgánového poškodenia (kreatinín, urea, LDH, AST, ALT) sa významne nelíšili alebo boli zvýšené v D skupine, avšak v DT skupine boli niektoré parametre oproti kontrolám znížené (AST, ALT). Expresia TRPV4 bola v D aj DT skupine významne znížená. Prohypertrofické faktory kaskády spojenej s kalmodulín kinázou II (CaMKII) boli nezmenené (MEF2, HDAC4), avšak fosforylácia CaMKII kinázy bola v D aj DT znížená. Pozitívne však korelovala s expresiou TRPV4 kanálov čo naznačuje ich možné funkčné prepojenie.

Výsledky naznačujú, že TRPV4 kanály zohrávajú úlohu v doxorubicínovom modeli SZ a napriek terapii boli prekvapivo downregulované. TRPV4 antagonista nepôsobil na analyzované faktory či CaMKII no zlepšoval viaceré biometrické a biochemické ukazovatele, čo naznačuje jeho potenciálne pôsobenie na bunkový metabolizmus.

Grantová podpora projektu: APVV-15-607; VEGA-2/0151/17; VEGA-1/0271/16

## MUTACE T309I ASOCIOVANÁ SE SYNDROMEM DLOUHÉHO QT TYPU 1: AKUMULACE $I_{Ks}$ JAKO MECHANISMUS OCHRANY SRDCE PROTI ARYTMII

Markéta Bébarová<sup>1</sup>, Iva Synková<sup>2</sup>, Irena Andršová<sup>3</sup>, Larisa Baiazitova<sup>4</sup>, Olga Švecová<sup>1</sup>, Jan Hošek<sup>5</sup>, Michal Pásek<sup>1,6</sup>, Pavel Vít<sup>7</sup>, Iveta Valášková<sup>2</sup>, Renata Gaillyiová<sup>2</sup>, Rostislav Navrátil<sup>8</sup>, Tomáš Novotný<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika;

<sup>2</sup>Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika; <sup>3</sup>Interní kardiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika;

<sup>4</sup>Ústav biomedicínského inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Brno, Česká republika; <sup>5</sup>Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika; <sup>6</sup>Ústav termomechaniky – pobočka Brno, Akademie věd České republiky, Brno, Česká republika; <sup>7</sup>Pediatrická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika; <sup>8</sup>Repromeda, Brno, Česká republika

Syndrom dlouhého intervalu QT typu 1 (LQTS1) vzniká na podkladě mutací v genu *KCNQ1*, který kóduje strukturu  $\alpha$ -podjednotky kanálu vedoucího pomalou složku zpožděného  $K^+$  proudu z buňky ( $I_{Ks}$ ). Tento proud se zásadním způsobem podílí na udržení adekvátní délky akčního napětí srdečních buněk při vyšších frekvencích stimulace a během  $\beta$ -adrenergní stimulace, kdy se výrazně navyšuje a chrání tak myokard před vznikem arytmií. Mutace c.926C>T (p.T309I) v genu *KCNQ1* byla identifikována u 24 pacientů s LQTS1 pocházejících z 10 údajně nepříbuzných rodin. Analýza haplotypů prokázala příbuznost rodin - mutace T309I je první mutací s efektem zakladatele asociovanou s LQTS ve střední Evropě. Funkční analýza této mutace prokázala úplnou ztrátu funkce T309I  $I_{Ks}$  kanálu v homozygotním uspořádání (díky poruše transportu mutovaného kanálu do buněčné membrány) a dominantně negativní dysfunkci v heterozygotním uspořádání, které odpovídá situaci u heterozygotních nosičů mutace. Dysfunkce se dále zvýraznila při vyšších frekvencích stimulace. Matematické simulace na modelu komorové srdeční buňky člověka ukázaly, že pozorovaná dysfunkce  $I_{Ks}$  kanálu může vést k navození proarytmogenního stavu během stimulace o vyšších frekvencích.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-30571A.

## VAZOREGULAČNÝ EFEKT ENDOGÉNNÉHO A EXOGÉNNÉHO SÍROVODÍKA U NORMOTENZNÝCH A SPONTÁNNÉ HYPERTENZNÝCH POTKANOV

**Andrea Berényiová<sup>1</sup>, Samuel Golas<sup>1</sup>, Marián Grman<sup>2</sup>, Martina Cebová<sup>1</sup>, Soňa Čačányiová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 841 04, Bratislava

Literárne údaje ukazujú, že endogénne syntetizovaný sírovodík ( $H_2S$ ) sa zapája do regulácie rôznych signálnych dráh vo fyziologických ale aj patologických podmienkach, vrátane etiopatogenézy hypertenzie. V cievach je  $H_2S$  syntetizovaný hlavne pomocou cystationín  $\gamma$ -lyázy (CSE), premenou L-cysteínu na  $H_2S$ . Cieľom tejto štúdie bolo popísať vplyv endogénne tvoreného (po inhibícii CSE) a exogénne podávaného  $H_2S$  na vazoaktívne odpovede hrudnej aorty (HA) u normotenzných (Wistar) a spontánne hypertenzných potkanov (SHR). V experimentoch sme používali dospelé (17-20 týždňov) Wistar and SHR. Vazoaktívne odpovede HA sme sledovali senzormi izometrickej tenzie. Aktivitu CSE sme blokovali predradením jeho špecifického inhibítora, DL-propargylglycínu (PPG). Expresia CSE bola stanovená pomocou Western blotu. Kým u Wistar potkanov akútna inhibícia CSE nemala efekt na endotel-závislú vazorelaxáciu, u SHR inhibovala relaxačnú odpoveď hladkých svalových buniek. Nenašli sme rozdiel v proteínovej expresii CSE u Wistar a SHR. Hoci inhibícia CSE indukovala mierne zvýšenie bazálneho tonusu u oboch kmeňov, u SHR tento efekt bol signifikantne väčší v porovnaní s Wistar. Na druhej strane, u Wistar potkanov po predradení PPG adrenergická kontrakcia na exogénny noradrenalín bola väčšia, táto zmena bola sprostredkovaná zvýšenou citlivosťou adrenergických receptorov. Potvrdili sme duálny vazoaktívny účinok donora  $H_2S$  ( $Na_2S$ ) u oboch kmeňov; u SHR sme pozorovali signifikantne zväčšenú maximálnu relaxačnú odpoveď na  $Na_2S$  ako u Wistar. Naše výsledky potvrdzujú, že endogénny  $H_2S$  systém sa podieľa na udržiavaní funkcie endotelu u SHR a pravdepodobne slúži ako adaptačný mechanizmus na kompenzáciu zvýšenej arteriálnej tenzie a krvného tlaku v hypertenzii. Navyše, exogénne aplikovaný  $H_2S$  v esenciálnej hypertenzii je efektívnou vazorelaxačnou látkou, ktorá môže mať vysoký farmaceutický potenciál.

Práca bola podporená: VEGA 2/0111/19, VEGA 2/0103/18, APVV-15-0565.



## KARDIOVASKULÁRNE ZMENY POČAS AKÚTNEHO STRESU U ŽIEN S PREDISPOZÍCIOU PRE ROZVOJ SCHIZOFRÉNIE

**Buzgoova K.<sup>1,3</sup>, Chomanic P.<sup>1,3</sup>, Marko M.<sup>2</sup>, Riečanský I.<sup>2</sup>, Jezova D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava

<sup>2</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny, SAV, Bratislava

<sup>3</sup>Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Kardiovaskulárna aktivácia je dôležitou zložkou stresovej odpovede organizmu. Je známe, že schopnosť vysporiadať sa s každodennou stresovou záťažou je u každého človeka individuálna. Obzvlášť zraniteľní voči dôsledkom nadmerného stresu môžu byť ľudia s predispozíciou pre rozvoj psychických porúch. V našej štúdiu sa zameriavame na stresovú odpoveď organizmu u ľudí s prítomnými schizotypovými osobnostnými črtami, ktoré predstavujú rizikový faktor pre rozvoj schizofrénie a iných psychotických porúch. Ženy vo veku 18–40 rokov (n = 19) boli vyšetrené počas folikulárnej fázy menštruačného cyklu v popoludňajších hodinách. Dobrovoľníčky boli vystavené akútnemu stresovému podnetu, ktorému predchádzala anticipačná fáza. Ako stresor bol použitý verejný prejav pred komisiou, po ktorom nasledovali kognitívne úlohy. Počas testu bol probandkám oscilometricky meraný systolický a diastolický krvný tlak a srdcová frekvencia s použitím tlakomeru Omron HEM-907. Zároveň im boli odoberané vzorky slín v špecifických časových intervaloch. Na základe schizotypového osobnostného dotazníka bol súbor rozdelený na skupinu žien s prítomnými schizotypovými osobnostnými črtami a na kontrolnú skupinu. Vystavenie dobrovoľníčok verejnému prejavu pred komisiou vyvolalo vzostup systolického aj diastolického krvného tlaku v čase, bez ohľadu na skupinu. Srdcová frekvencia taktiež stúpila v čase v oboch skupinách, avšak u schizotypových žien sme zaznamenali signifikantne nižší vzostup srdcovej frekvencie v porovnaní so ženami v kontrolnej skupine. Posúdenie pracovnej záťaže myokardu pomocou dvojitého produktu (systolický tlak x pulz) ukázalo štatisticky významný rozdiel v hodnotách pred testom a po teste u schizotypových žien. Znížená odpoveď srdcovej frekvencie a rozdiely v dvojitom produkte môžu poukazovať na zmenenú reaktivitu počas stresu u žien s predispozíciou pre rozvoj psychických porúch.

Podakovanie: Štúdia bola podporená grantom VEGA 2/0022/19 a projektom APVV 14-0840.

**ÚLOHA PERIVASKULÁRNEHO TUKOVÉHO TKANIVA  
A ENDOGÉNNEHO SÍROVODÍKA V  
REGULÁCII CIEVNEHO TONUSU HYPERTRIGLYCERIDEMICKÝCH POTKANOV**

**Soňa Čáčányiová<sup>1</sup>, Samuel Golas<sup>1</sup>, Miroslava Majzúnová<sup>1,2</sup>, Martina Cebová<sup>1</sup>,  
Andrea Berényiová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV,  
Dúbravská cesta 9, 841 04, Bratislava

<sup>2</sup>Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita  
Komenského, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava

Perivaskulárne tukové tkanivo (PVAT) produkuje vazoaktívne faktory, ktoré sa podieľajú na regulácii cievnej reaktivity, okrem iných aj sírovodík (H<sub>2</sub>S). Zmeny v aktivite ako PVAT tak aj H<sub>2</sub>S sú spojené s rozvojom metabolického syndrómu, avšak ich vzájomný vzťah je nedostatočne preskúmaný. Cieľom práce bolo objasnenie účasti PVAT a endogénneho H<sub>2</sub>S v regulácii cievneho tonusu hypertriglyceridemických (HTG) potkanov ako experimentálneho modelu metabolického syndrómu. Použili dospelých HTG a Wistar potkanov, ktorým bol pletyzmografom zmeraný systolický tlak krvi. Následne sme sledovali zmeny izometrickej tenzie izolovaných artérií po použití exogénnych agonistov (hrudná aorta) alebo transmúrálnej nervovej stimulácii (TNS, mezenterická artéria). Aktivitu endogénnej produkcie H<sub>2</sub>S sme blokovali predradením DL-propargylglycínu (PPG), inhibítora cystationín  $\gamma$ -lyázy (CSE). Expresia CSE bola stanovená pomocou Western blotu, aktivita NO-syntázy pomocou značeného L-arginínu. HTG potkany mali zvýšený tlak krvi a objem viscerálneho tuku, čo bolo spojené s poruchou cievnej funkcie - zväčšená kontraktilita, endotelová dysfunkcia, znížená aktivita NO-syntázy. U HTG potkanov viedla stimulácia sympatikových nervov v PVAT k zväčšeniu neurogénnej vazokonstrikcie. Na druhej strane, prítomnosť PVAT tlmila vazokonstriktorickú odpoveď na exogénny noradrenalín a približovala ju kontrolnej odpovedi Wistar potkanov. Endogénny H<sub>2</sub>S produkovaný cievnu stenou, nie PVAT, pôsobil antikonaltilne u Wistar potkanov. Na druhej strane, schopnosť endogénneho H<sub>2</sub>S tmiť vazokonstriktorickú odpoveď HTG potkanov bola viazaná na prítomnosť PVAT, v ktorom sa potvrdila najvyššia expresia (CSE). Pri metabolickom syndróme má pôsobenie PVAT duálny charakter. Počas nervovej stimulácie pôsobí prokontraktilne, čím prispieva k zvyšovaniu cievneho tonusu. Na druhej strane sa v PVAT mobilizujú kompenzačné mechanizmy - jeho antikonaltilný účinok, do ktorého je zapojená endogénna produkcia H<sub>2</sub>S.

**Pod'akovanie:** Podporené: VEGA 2/0111/19, VEGA 2/0103/18, APVV-15-0565

## INTERAKČNÉ MAPY mPTP PROTEÍNOV: PROTEKTÍVNA REGULÁCIA MITOCHONDRIÁLNEJ ENERGETIKY SRDCA

Miroslav Ferko<sup>1</sup>, Natália Andelová<sup>1</sup>, Barbara Szeiffová Bačová<sup>1</sup>, Iveta Waczulíková<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav pre výskum srdca, CEM SAV, Bratislava

<sup>2</sup> Fakulta matematiky, fyziky a informatiky, Katedra biofyziky a jadrovej fyziky, Univerzita Komenského, Bratislava

Mitochondriálne póry prechodnej permeability (mPTP) sa stali dôležitým cieľom pri skúmaní iniciačných a signálnych dráh zapojených do kardioprotekcie. Akútna fáza diabetes mellitus (D) ako experimentálny kardioprotektívny model, preukázal dostatočnú ochranu na kompenzáciu mitochondriálnej energie srdca v patologických podmienkach. Vhodným spôsobom na objasnenie molekulárnej štruktúry a regulačných zložiek multienzýmového komplexu proteínov mPTP predstavuje proteomická analýza. Cieľom tejto štúdie bolo prispieť k objasneniu kardioprotektívnej funkcie srdcových mitochondrií na úrovni mPTP vo vzťahu k experimentálnemu D. Na proteomické analýzy boli použité izolované mitochondrie srdca potkana kmena Wistar z modelu reprezentovaného akútnym 8-dňovým streptozotocínom indukovaným D (65 kg / mg ip) oproti zdravej kontrolnej skupine. Na úrovni proteomickej analýzy pomocou LC/MS sme sa zamerali na proteíny, ktoré sa v súčasnosti považujú za štrukturálne a regulačné zložky mPTP. Abundancia celého proteínového komplexu mPTP bola významne zvýšená v skupine D v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou ( $P = 0,0106$ ), avšak expresie individuálne analyzovaných proteínov exprimovaných parametrom násobnej zmeny s výnimkou ATP5H, ATP5J a KCRS sa významne nezmenili. Proteíny mPTP s najvyšším priemerným výskytom boli ADT1, ATP5H, ATPA a ATPB. Boli vyšetrené vzájomné prepojenie identifikovaných proteínov mPTP korelačnou analýzou prezentovanou tzv. tepelnými mapami. Výsledky preukázali, že proteíny skupiny D vykazujú odlišné vzájomné interakcie ako proteíny v kontrolnej skupine. Výsledky proteomickej analýzy mPTP naznačujú pozitívny účinok mechanizmov regulovaných mPTP ako súčasť endogénnych ochranných procesov vedúcich k adaptácii myokardu na energetickú záťaž predstavovanú akútnym D.

Podakovanie: APVV 15-0119, VEGA 2/0121/18, ITMS 26230120009, EU-CARDIOPROTECTION COST CA-16225

## STRESOM VYVOLANÉ SRDCOVÉ ARYTMIE V KONTEXTE LUMINÁLNEJ REGULÁCIE RYANODÍNOVÉHO RECEPTORA

Marta Gaburjaková<sup>1</sup>, Jana Gaburjaková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum biovied SAV, Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, Bratislava

Priamym spúšťačom kontrakcie srdcovej svalovej bunky je prechodné zvýšenie koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazme. Dôležitú úlohu v masívnom uvoľnení  $\text{Ca}^{2+}$  z vnútrobunkových zásobníkov hrajú ryanodínové receptory (RYR2), ktoré fungujú ako výkonné  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Regulácia RYR2 kanála je majoritne determinovaná jeho objemnou cytozolickou doménou, na ktorú sa priamo viaže  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP alebo kofeín. Menej charakterizovaná a pochopená je regulácia z luminálnej strany RYR2 kanála, napriek tomu, že jej narušenie bolo spojené s generovaním závažných srdcových arytmií počas fyzického alebo emočného stresu. Vzhľadom na to, že bolo identifikovaných viac ako 160 bodových mutácií na RYR2 kanáli, ktoré sú zodpovedné za geneticky podmienenú luminálnu dysfunkciu, RYR2 kanál sa stal novým atraktívnym targetom pre farmakologické intervencie v rámci personalizovanej medicíny.

Hlavným luminálnym aktivátorom RYR2 kanála je  $\text{Ca}^{2+}$  uskladnený vo vnútrobunkových zásobníkoch. O molekulárnom mechanizme zdanlivo jednoduchej luminálnej regulácie sa stále debatuje, pričom existencia  $\text{Ca}^{2+}$  väzbových miest na luminálnej strane RYR2 kanála stále nie je preukázaná. Metódou rekonštitúcie RYR2 kanálov v umelých lipidových membránach v kombinácii s bioinformatickými metódami sme zistili, že luminálne  $\text{Ca}^{2+}$  miesto existuje. Pridaním trypsínu alebo trivalentného katiónu na luminálnu stranu sme dokázali výrazne modifikovať citlivosť RYR2 kanála na luminálny  $\text{Ca}^{2+}$ . Trypsín chemicky narušil luminálnu stranu a trivaletný katión kompetitívne vytesnil luminálny  $\text{Ca}^{2+}$  z väzbového miesta. Na základe relatívnej selektivity luminálneho  $\text{Ca}^{2+}$  miesta pre dvojmocné katióny kovov vzácnych alkalických zemín ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) sme usúdili, že sa pravdepodobne jedná o známu EF-hand štruktúru. Lokalizovali sme ju na luminálnu slučku, ktorá spája prvý a druhý transmembránový segment membránovej domény RYR2 kanála.

PodĎakovanie: podporené grantmi VEGA 2/0011/18 a 2/0086/17

## VZŤAH AUTOFÁGIE K NEKROPTÓZE PRI FUNKČNOM POŠKODENÍ MYOKARDU V POST-ISCHEMICKOM SRDCOVOM ZLYHÁVANÍ

**Peter Galis<sup>1</sup>, Martin Lichý<sup>1</sup>, Adrián Szobi<sup>1</sup>, Jaroslav Hrdlička<sup>2</sup>, Jan Neckář<sup>2</sup>,  
František Kolář<sup>2</sup>, Adriana Duriš Adameová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Bratislava, Slovensko; <sup>2</sup>Ústav fyziológie Českej akadémie vied, Praha, ČR

Napriek tomu, že sa ukazuje, že existuje priame previazanie medzi procesmi nekroptózy a autofágie, boli v závislosti od použitého modelu popísané úplne kontradiktívne pozorovania o presnej podstate ich interakcie. Navyše, aj keď v post-ischemickom srdcovom zlyhávaní (HF) bola zaznamenaná aktivácia nekroptózy, jej vzťah k autofágii nebol doposiaľ popísaný. Z tohto dôvodu sme sa zamerali na sledovanie zmien v autofagickej signalizácii v post-ischemickom HF u potkanov, ktoré bolo navodené oklúziou LAD s následnou 42-dňovou reperfúziou. 3 dni pred a 42 dní po zákroku bola echokardiograficky skúmaná systolická funkcia. Stanovenie relatívnej expresie vybraných proteínov cez imunobloting bolo vykonané v neinfarktovanom tkanive ľavých komôr. Echokardiografia potvrdila systolické zlyhávanie u HF v porovnaní s kontrolnými (SHAM) potkanmi a taktiež bola potvrdená prítomnosť nekroptózy. Expresia mTOR bola v HF signifikantne znížená, v jeho fosforylácii na Ser2448 nebol v dôsledku HF zaznamenaný rozdiel. Zároveň bola pozorovaná aj jeho znížená inhibičná fosforylácia na Ser757-ULK1. Aktivačná fosforylácia ULK1 na Ser555 bola taktiež potlačená, avšak v menšej miere ako pri Ser757. Naopak expresia Beclin-1, štiepenej formy LC3 (LC3-I), a ani jej aktívnej lipidovanej formy LC3-II, neboli signifikantne rozdielne v dôsledku HF. Dá sa teda konštatovať, že aj keď sme na úrovni ULK1 pozorovali možnú aktiváciu autofágie, downstream autofagickej signalizácie Beclin-1 a LC3-II nepodporujú zmenu v miere autofágie u HF oproti SHAM. Zmeny v miere autofágie v potkaních srdciach v post-ischemickom HF teda pravdepodobne neovplyvňujú na pozorovanú mieru nekroptózy.

PodĎakovanie: Podporené grantami UK/347/2019, APVV-2015-0607, VEGA-1/0271/16

## ÚLOHA PERIVASKULÁRNEHO TUKOVÉHO TKANIVA A H<sub>2</sub>S V MODULÁCIÍ VAZOAKTÍVNYCH ODPOVEDÍ MEZENTERICKÝCH ARTÉRIÍ U SPONTÁNNE HYPERTENZNÝCH POTKANOV

**S. Golas, S. Čačányiová, A. Berényiová**

Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Centrum experimentálnej medicíny SAV, Bratislava, Slovenská republika

Perivaskulárne tukové tkanivo (PVAT) môže zohrávať významnú úlohu v patofyziológii kardiovaskulárnych ochorení. Jednou z vazoaktívnych látok produkovaných z PVAT ale aj cievnou stenou môže byť sírovodík (H<sub>2</sub>S). Cieľom práce bolo porovnať vplyv PVAT a endogénneho H<sub>2</sub>S na kontraktilné odpovede mezenterickej artérie vyvolanej vazoaktívnymi látkami za fyziologických ale aj patofyziologických podmienok u dospelých normotenzných Wistar a spontánne hypertenzných SHR potkanov. Zmeny izometrickej tenzie sme registrovali prostredníctvom elektromechanického snímača zmien tenzie u izolovaných ciev bez PVAT a s intaktným PVAT po aplikovaní exogénneho noradrenalínu (NA). Na inhibíciu endogénnej produkcie H<sub>2</sub>S sa použil inhibítor cystationín-gama-lyázy, propargylglycín. U SHR sa v porovnaní s Wistar potkanmi prekvapujúco PVAT podieľalo výraznejším antikotraktilným účinkom na vazokonstriktorickej odpovedi vyvolanej exogénne aplikovaným NA.

U Wistar potkanov sa podieľal H<sub>2</sub>S produkovaný cievnou stenou aj PVAT antikotraktilným účinkom na vazokonstriktorickej odpovedi vyvolanej exogénnym NA. Na druhej strane, u SHR sa H<sub>2</sub>S produkovaný cievnou stenou podieľal prokontraktilným účinkom, a to najmä na úkor zvýšenej citlivosti na NA. Hoci u SHR prejavilo PVAT antikotraktilné účinky, H<sub>2</sub>S sa na tomto účinku nepodieľal.

Výsledky indikujú, že u SHR potkanov sa PVAT podieľa antikotraktilným účinkom po exogénnej stimulácii adrenergých receptorov. Účinok endogénne produkovaného H<sub>2</sub>S závisel od miesta jeho produkcie. H<sub>2</sub>S produkovaný cievnou stenou prejavil prokontraktilný účinok a tým mohol prispievať k patologickým zmenám esenciálnej hypertenzie. Na druhej strane, aj keď PVAT SHR vykazovalo antikotraktilné účinky a pravdepodobne by mohlo byť súčasťou kompenzačných cievnych mechanizmov spúšťaných pri SHR, H<sub>2</sub>S na tomto účinku neparticipoval.

Podporené: VEGA 2/0103/18, APVV-15-565.

## VLIV RŮZNÉHO POMĚRU n-3 A n-6 PUFA NA HOJENÍ RÁNY V EXPERIMENTU

**Daniela Charwátová<sup>1</sup>, Alica Hokynková<sup>1,2</sup>, Petr Babula<sup>1</sup>, Tibor Stračina<sup>1</sup>, Hana Paulová<sup>3</sup>, Miroslava Hlaváčová<sup>3</sup>, Miroslava Sedláčková<sup>4</sup>, Marie Nováková<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Fyziologický ústav LF MU, Brno

<sup>2</sup>Klinika popálenin a plastické chirurgie, LF MU a FN Brno

<sup>3</sup>Biochemický ústav LF MU, Brno

<sup>4</sup>Ústav histologie a embryologie, LF MU, Brno

Hojení ran je složitý proces, ovlivněný mnohými faktory, mezi jinými také nutričním stavem pacienta. Přestože účinky některých složek nutriční stravy na hojení ran byly již studovány, případný vliv nenasycených mastných kyselin nebyl doposud objasněn.

Cílem práce bylo studovat vliv krátkodobého systémového podání různého poměru nenasycených n-3 a n-6 mastných kyselin (PUFA) z rostlinných zdrojů na hojení akutní kožní rány u potkana.

Mladým samcům kmene Wistar bylo orogastrickou sondou podáváno buď přesně definované množství 20 % tukových emulzí (experimentální skupiny E a F s různým poměrem n-3: n-6 PUFA) nebo vody (skupina C, kontrolní). Po týdnu aplikace byla zvířatům na hřbetu vytvořena kožní rána a týden bylo pokračováno s aplikací. Na konci pokusu byla odebrána krev a vzorky rány. Sledovány byly změny v růstu, hematologických parametrech, plazmatických hladinách mastných kyselin, 4- hydroxy-2- nonenalu a míra oxidačního stresu jak v plazmě, tak v ráně fluorescenčními sondami a mikroskopicky. Rychlost a kvalita hojení byly posouzeny pomocí digitální planimetrie a histologicky pomocí elektronové mikroskopie.

Celkové množství n-3 a n-6 PUFA nebylo signifikantně změněno, ale byly nalezeny signifikantní změny uvnitř obou skupin, v obou frakcích. V plazmě i ve tkáni bylo nalezeno signifikantní snížení hladiny peroxidu vodíku a poměru nitritů(dusitanů)/nitrátů(dusičnanů) ve skupinách E a F, což vypovídá o vyšší schopnosti vyrovnat se s oxidačním stresem. Vzorky tkáně obsahovaly kolagenní vlákna ve formě mikrofibril s různým stupněm organizace, a to více ve skupinách E a F, což by mohlo odrážet intenzivnější produkci kolagenu.

Bylo zjištěno, že i krátkodobé podání určitého poměru n-3 a n-6 nenasycených mastných kyselin vede k ovlivnění hojení ran, nicméně jejich působení závisí na jejich poměru, fázi hojení a velikosti a typu rány.

**Poděkování:** Tato studie vznikla za podpory projektu MUNI/A/1255/2018 specifického vysokoškolského výzkumu, kterou poskytlo MŠMT pro rok 2019.

## KARDIOVASKULÁRNA ODPOVEĎ V AKÚTNOM STRESE VO VZŤAHU K TELESNEJ HMOTNOSTI

**Jezova D.<sup>1</sup>, Kapsdorfer D.<sup>1</sup>, Prokopova B.<sup>1</sup>, Hlavacova N.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratórium farmakologickej neuroendokrinológie, Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum, SAV, Bratislava

Stres a obezita sú dobre známe rizikové faktory kardiovaskulárnych ochorení. Včasné rozpoznanie kardiovaskulárneho rizika počas rozvoja obezity je preto veľmi potrebné. Testovali sme hypotézu, že za stresových podmienok majú ľudia v iničiálnych štádiách obezity odlišnú kardiovaskulárnu a neuroendokrinnú odpoveď než ľudia s normálnou telesnou hmotnosťou. Do štúdie sme zaradili zdravých dobrovoľníkov s telesnou hmotnosťou nad (BMI viac ako 26, n=17) a pod (BMI menej ako 21, n=17) hranicu fyziologického rozmedzia. Jedinci s normálnym BMI (BMI 21-26) neboli do štúdie zaradení. Dobrovoľníci boli vystavení kombinovanému stresovému podnetu, ktorý pozostával z psychickej (Stroop test) a fyzickej (chladový test) zložky. Zmeny systolického a diastolického krvného tlaku sme merali pred, počas a po vystavení stresovým podmienkam. Odoberali sme vzorky slín na meranie koncentrácie stresových hormónov a aktivity alfa-amylázy, ktorá do určitej miery odráža aktivitu sympatikového systému. Rovnaké parametre boli analyzované v slinách, ktoré si dobrovoľníci odobrali v pokojový deň doma pre monitorovanie denných rytmov. Aktivita alfa-amylázy bola zvýšená počas stresových testov u oboch skupín. Toto zvýšenie ako aj odpoveď krvného tlaku boli vyššie u dobrovoľníkov s vyšším BMI v porovnaní s dobrovoľníkmi s nízkym BMI. U dobrovoľníkov s nadváhou sme zaznamenali nižšiu mieru úzkosti ako u štíhlych jedincov. Za nestresových podmienok mali dobrovoľníci s vyšším BMI zvýšenú aktivitu alfa-amylázy a znížené koncentrácie kortizolu v priebehu dňa. U oboch skupín bol prítomný anticipačný stres, ktorý sa prejavil zvýšenou mierou úzkosti. Výsledky hodnotenia stresovej odpovede probandov v iničiálnych štádiách obezity poukazujú na možnú dysfunkciu vegetatívneho nervového systému.

Podakovanie: Podporené grantom VEGA 2/0022/19 a projektom APVV-17-0451.



## SRDEČNÍ INWARD RECTIFIER DRASLÍKOVÉ PROUDY: JEJICH PROTEKTIVNÍ ÚLOHA A METODY ANALÝZY

Roman Kula<sup>1</sup>, Markéta Bébarová<sup>1</sup>, Peter Matejovič<sup>1</sup>, Jiří Šimurda<sup>1</sup>, Michal Pásek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

<sup>2</sup>Institut termomechaniky, Akademie věd České Republiky, Brno

Srdeční *inward rectifier* draslíkové (Kir) proudy se významně podílí na stabilizaci klidového membránového napětí i na udržování adekvátního trvání akčního napětí. Faktory, které modulují jejich vlastnosti a mohou tak významným způsobem narušit jejich protektivní vliv proti vzniku arytmií, jsou proto často studovány. Obecně panuje předpoklad, že velikost měřeného iontového proudu ( $I$ ) je přímo úměrná ploše buněčné membrány odhadované na základě její kapacity ( $C$ ). Za účelem snížení variability  $I$  se proto rutinně provádí výpočet hustoty proudu ( $J$ ) definovaný jako poměr  $I/C$ . Cílem této práce bylo ověřit přítomnost korelace mezi  $I$  a  $C$  a následně zhodnotit, jak efektivně  $J$  redukuje variabilitu  $I$  při dané  $I$ - $C$  korelaci. Měření byla provedena na enzymaticky izolovaných síňových buňkách potkana metodou *whole cell patch clamp*. Efektivita  $J$  redukovat variabilitu  $I$  byla definována jako navýšení síly testu pro detekci rozdílu mezi dvěma nezávislými vzorky, které nastalo po převodu  $I$  na  $J$ . Vzorky byly náhodně vybrány ze dvou populací s existujícím rozdílem.  $I$ - $C$  korelace byla hodnocena podle Pearsonova koeficientu ( $r$ ) a stanovení efektivity pomocí Monte Carlo simulace pro měnící se hodnoty  $I$ - $C$  korelace. Testovány byly *inward rectifier* draslíkové proudy,  $I_{K1}$  (proud citlivý k  $100 \mu\text{M Ba}^{2+}$ ) a obě složky na acetylcholin senzitivního proudu (složka indukovaná  $3 \mu\text{M}$  acetylcholinem  $I_{K(\text{ACH}),\text{ACH}}$  a složka konstitutivní  $I_{K(\text{ACH}),\text{CONST}}$ , tj. proud citlivý k terciapinu-Q v koncentraci  $300 \text{ nM}$ ). Signifikantní a pozitivní korelace mezi  $I$  a  $C$  byla prokázána u všech proudů ( $r = 0,84; 0,61$  a  $0,42$  pro  $I_{K1}$ ,  $I_{K(\text{ACH}),\text{ACH}}$ , respektive  $I_{K(\text{ACH}),\text{CONST}}$ ). V simulaci vyšla síla testu při použití  $I/0,94$ . Po převodu  $I$  na  $J$  se ukázalo, že k signifikantnímu navýšení síly testu došlo u  $I$ - $C$  korelací od  $I_{K1}$  a  $I_{K(\text{ACH}),\text{ACH}}$  ( $0,99$ , respektive  $0,96$ ). U  $I_{K(\text{ACH}),\text{CONST}}$  se síla testu převodem významně snížila ( $0,88$ ). Důvodem tohoto snížení je existence slabé  $I$ - $C$  korelace u  $I_{K(\text{ACH}),\text{CONST}}$ . Navzdory přítomnosti signifikantní pozitivní korelace mezi  $I$  a  $C$  u všech testovaných proudů se ukázalo, že  $J$  efektivně redukuje variabilitu  $I$  ve většině případů pouze u proudů se silnou  $I$ - $C$  korelací, tj. s  $r \geq 0,60$  ( $I_{K1}$  a  $I_{K(\text{ACH}),\text{ACH}}$ ).

Podpořeno z projektu Ministerstva zdravotnictví České republiky s reg. č. 16-30571A.

## MOLEKULÁRNY VODÍK – ÚČINNÁ LÁTKA PROTI OXIDAČNÉMU STRESU PRI POŠKODENÍ SRDCA

**Branislav Kura, Ján Slezák**

Centrum Experimentálnej Medicíny SAV, Ústav pre výskum srdca, Bratislava,  
Slovenská republika

Vodík ako taký je prvým prvkom v periodickej sústave prvkov. Je to najmenšia a najľahšia molekula plynu, ktorý je bezfarebný, bez chuti a zápachu, ale tiež horľavý a pri určitej koncentrácii výbušný. Ako prvý poukázal na jeho potenciálne antioxidantné účinky Ohsawa a jeho spolupracovníci v roku 2007, ktorí tento účinok pozorovali pri experimentoch s ischemicko-reperfúznym poškodením mozgu. V súčasnosti sa však predpokladá aj iný mechanizmus jeho účinku, ktorý však doteraz nie je presne objasnený. Molekulárny vodík sa doteraz v experimentálnych podmienkach použil na množstvo druhov ochorení rôznych tkanív a orgánov. Medzi najčastejšie typy ochorenia, kde vodík vykazoval pozitívne účinky, patria ochorenia mozgu alebo pečene, ale tiež srdca, obličiek alebo pľúc.

Cieľom tejto práce bolo poukázať na možný antioxidantný účinok molekulárneho vodíka na organizmus. V experimentoch sme používali vodíkom obohatenú vodu, ktorú sme pripravili v hliníkovej fľaši pod tlakom 40 atmosfér s celkovou koncentráciou min. 1,4 ppm. V prvom experimente sme dokazovali, či vodík naozaj reaguje antioxidantne. V *ex vivo* experimente sme aplikovali vodík do systému produkujúceho voľné radikály pomocou reakcie askorbátu a mednatých iónov. Do systému bol pridaný polymér hyaluronan, ktorý je degradovaný týmito radikálmi. Po pridaní vody obohatenej o vodík bola degradácia polyméru výrazne nižšia v porovnaní s experimentom bez vodíka, čo dokazuje jeho antioxidantné vlastnosti.

V ďalšom experimente sme chceli dokázať bezpečnosť vodíka v organizme, a preto sme 3-mesačným potkanom kmeňa Wistar podávali gavážovaním vodík 3x denne po 3 ml po dobu 2, 9, 14 a 45 dní. Po tomto období sme následne sledovali hodnotu malondialdehydu z krvnej plazmy, čo je marker peroxidácie lipidov a teda aj oxidačného stresu. V tomto prípade sme nepozorovali žiadny negatívny účinok vodíka, keď v žiadnom časovom období vodík nezvyšoval hladinu malondialdehydu.

V ďalšom experimente sme potkany ožiarili jednorazovou dávkou žiarenia 10 Gy v oblasti mediastína, čím sme vyvolali produkciu voľných radikálov. Potom sme gavážovaním podávali vodík opäť v rovnakom množstve, čiže 3 ml 3x denne, po rovnaký čas, teda 2 dni, 9 dní a 45 dní. Aj v tomto prípade sme merali hladinu malondialdehydu z krvnej plazmy ako marker oxidačného stresu, pričom sme pozorovali zvýšenie jeho hladiny najmä po 2 dňoch od ožiarenia, ale tiež jeho významné zníženie u skupín, ktorým bol podávaný vodík, a to vo všetkých experimentálnych skupinách.

Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že, molekulárny vodík pôsobí ako antioxidant, nemá žiadne negatívne vlastnosti na organizmus a tiež pôsobí proti oxidačnému stresu, čo potvrdzuje našu hypotézu, že vodík predstavuje potenciálne účinnú látku pri ochoreniach spôsobených nadmernou produkciou ROS.

Táto práca bola financovaná z projektov APVV-15-0376 a VEGA 2/0063/18.

## POTENCIÁLNY VÝZNAM FYZICKEJ AKTIVITY AKO FORMY PRECONDITIONINGU MYOKARDU PRED ISCHÉMIOU

**Ľubomír Lonek<sup>1</sup>, Lucia Kindernay<sup>1</sup>, Dominika Kováčová<sup>2</sup>, Alexandra  
Záhradníková Jr<sup>3</sup>, Jaroslav Hrdlička<sup>4</sup>, Miroslav Ferko<sup>1</sup>, Daniela Jezova<sup>3</sup>, Táňa  
Ravingerová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav pre výskum srdca, CEM SAV, Bratislava, <sup>2</sup>Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, <sup>3</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava, <sup>4</sup>Fyziologický ústav AV ČR, Praha, ČR

Prítomnosť rizikových faktorov spojených s moderným životným štýlom (stres, hyperglykémia, hyperlipidémia, hypertenzia) má nielen negatívny vplyv na myokard ale zhoršuje aj účinnosť vlastných ochranných mechanizmov v srdci. Fyzická aktivita má všeobecne pozitívny účinok na kardiovaskulárny systém a metabolizmus. V súčasnosti sa viac uvažuje aj o adaptačných účinkoch cvičenia na myokard podobných vplyvu ischemického preconditioningu (IPC).

Cieľom práce bolo študovať možnosti zvýšenia odolnosti srdca voči ischemicko/reperfúznemu poškodeniu (I/R) pri použití cvičenia (voľný beh v kolese) ako formy IPC na diaľku u potkanov kmeňov Wistar a Sprague Dawley (SD) a odhaliť molekulárne mechanizmy kardioprotekcie. Keďže je známe, že bunková signálna kaskáda RISK je zapojená do ochranného mechanizmu viacerých foriem „conditioningu“, zamerali sme sa na zmeny v hladinách a aktivite proteínov tejto kaskády (Western blotting).

Po 22 dňoch behu sme v tkanive myokardu SD potkanov zaznamenali výrazné zmeny v hladinách a aktivite vybraných proteínov kaskády RISK ako aj anti-oxidačný a anti-apoptotický účinok. Tento účinok sa potvrdil aj po kratšej dobe cvičenia (15 dní) u potkanov kmeňa Wistar u ktorých sme ďalej testovali účinnosť cvičenia počas I/R (30 min. ischemia/2 hod. reperfúzia) srdc perfundovaných *ex vivo* v podmienkach normo- a hyperglykémie, s osobitným zameraním na zmeny funkcie, arytmogenézy a rozsahu letálneho poškodenia (veľkosť IM). Tento zásah rovnako účinne znižoval veľkosť IM, výskyt a závažnosť komorových tachyarytmií a post-ischemickú kontraktílnu dysfunkciu za normálnych ako aj za patologických podmienok (hyperglykémia).

Výsledky naznačujú že cvičením indukovaný PC môže byť vhodnou formou ochrany ischemického myokardu u pacientov s ďalšími komorbiditami.

PodĎakovanie: Granty VEGA 2/0141/18, 2/0151/17, APVV-15-0607, APVV-15-0119, MAD SAV-18-27, ITMS 26230120009 a EU Cardioprotection COST Action CA16225.

## MOČOVÉ miRNA K DETEKCI REJEKCE ŠTĚPU PO SRDEČNÍ TRANSPLATACI

Novák, J.<sup>1,2</sup>, Macháčková, T.<sup>1</sup>, Nováková, T.<sup>3</sup>, Mlejnek, D.<sup>3</sup>, Godava, J.<sup>3</sup>, Hude, P.<sup>3</sup>, Žampachová, V.<sup>4</sup>, Oppelt, J.<sup>1</sup>, Němec, P.<sup>5</sup>, Bedáňová, H.<sup>5</sup>, Slabý, O.<sup>1</sup>, Bienertová-Vašků, J.<sup>2</sup>, Špinarová, L.<sup>3</sup>, Krejčí, J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Středoevropský technologický institut (CEITEC) MU, Brno, Česká republika

<sup>2</sup> Fyziologický ústav a Ústav patologické fyziologie LF MU, Brno, Česká republika

<sup>3</sup> I. Interní kardiologická klinika LF MU a FNUSA, Brno, Česká republika

<sup>4</sup> Patologický ústav LF MU a FNUSA, Brno, Česká republika

<sup>5</sup> Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno, Česká republika

**Úvod:** Akutní celulární rejekce (ACR) štěpu po ortotopické srdeční transplantaci představuje jednu z nejzávažnějších komplikací vlastní transplantace, zejména v prvních měsících po transplantaci. V současné době je možné ji monitorovat pouze pravidelným prováděním endomyokardiálních biopsií (EMB). Cílem studie je zjistit, zda by k monitoraci rejekce nebylo možné využít močové mikroRNA (miRNA, miR).

**Metodika:** Prospektivní monocentrická studie. Bylo zařazeno 52 pacientů po srdeční transplantaci s ukončeným jednoročním sledováním. Pacienti podstupovali pravidelné kontroly (6., 8., 10., 12., 16., 20., 28., 36. a 52. týden) během nichž byla provedena EMB a odběr vzorků moči. Během prvního roku byla ACR stupně IB a vyšší detekována u 17 pacientů. Vzorky moči před ACR, během ACR a po ACR od 8 náhodných jedinců byly zvoleny k izolaci RNA a následně k profilování malých RNA pomocí sekvenování nové generace.

**Výsledky:** Ve vzorcích plazmy bylo identifikováno celkem 737 různých miRNA. Ve srovnání jejich exprese před, během a po ACR, bylo identifikováno 9 miRNA, které byly statisticky signifikantně dysregulovány – 8 z nich bylo sníženo (hsa-miR-582-3p, -7a-3p, -139-5p, -3065-5p, -676-3p, -6764-5p, -199b-5p, -504-5p and -7706) a hladiny jedné z nich (hsa-miR-6764-5p) zvýšeny.

**Závěr:** Identifikovali jsme 9 močových miRNA, jejichž hladiny jsou dysregulovány u pacientů po srdeční transplantaci během probíhající ACR. Monitorace ACR z moči by umožnila zcela neinvazivní monitorování pacientů po OTS a omezila by provádění EMB, což by významně zvýšilo bezpečnost transplantovaných pacientů.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem Agentury pro Zdravotnický Výzkum (AZV) Ministerstva Zdravotnictví České republiky s evid. číslem 16-30537A. Všechna práva vyhrazena.

## KOMPLIKOVANÁ TITRACE ANTIHYPERTENZNÍ MEDIKACE U PACIENTKY NA PERITONEÁLNÍ DIALÝZE PRO CHYLOASCITES – KAZUISTIKA

Nikola Nováková<sup>1,2</sup>, Eliška Boženková<sup>1</sup>, Jan Novák<sup>1,2</sup>, Marta Nedbálková<sup>1</sup>,  
Miroslav Souček<sup>1</sup>

<sup>1</sup> II. interní klinika LF MU a FNUSA, Brno, Česká republika

<sup>2</sup> Fyziologický ústav LF MU, Brno, Česká republika

**Úvod:** U pacientů na peritoneální dialýze se často setkáváme s rezistentní hypertenzí a je u nich nezbytné užívat supramaximální dávky i méně obvyklých skupin antihypertenziv. Korekce hypertenze u těchto pacientů je však zásadní, neboť se zhoršující se funkcí ledvin stoupá krevní tlak a se zvyšujícím se krevním tlakem progreduje ledvinné onemocnění.

**Klinický případ:** V rámci této kazuistiky prezentujeme případ 65leté ženy s chronickým renálním selháním a s nefrogenní hypertenzí, zařazené do programu peritoneální dialýzy na naší klinice. Pacientka byla na heptakombinaci antihypertenziv, avšak pro polymorfní alergické stesky, které pacientka vztahovala k užívání amlodipinu, jí byl tento ambulantně vyměněn za lercanidipin. Do dvou dnů se pak objevilo mléčné zkalení peritoneálního dialyzátu a pacientka byla hospitalizována pro podezření na počínající akutní peritonitidu. Tato však nebyla žádným laboratorním ani mikrobiologickým vyšetřením potvrzena. Při hledání etiologie bylo vysloveno podezření, že by mohlo jít o nežádoucí účinek lercanidipinu, který byl proto vysazen a do 24 hodin došlo k vymizení zakalení. Pacientka byla dimitována, avšak v následujících dnech došlo k výrazné akceleraci hypertenze a bylo nutné jí rehospitalizovat k nastavení terapie. Pro nulový efekt centrálních antihypertenziv byla opět snaha vrátit se k terapii blokátory kalciových kanálů a do medikace byl přidán nitrendipin, avšak mléčný zákal dialyzátu se objevil znovu a rovněž vymizel do 24 hodin po vysazení. Proto byly provedeny alergologické testy pro amlodipin, a protože alergie nebyla prokázána, byl tento následně navrácen do medikace, a nejen, že nezpůsobil žádnou alergickou reakci ani zkalení dialyzátu, navíc jeho podání vedlo k úspěšné korekci krevního tlaku.

**Závěr:** Zkalení peritoneálního dialyzátu při terapii blokátory kalciových kanálů je raritní komplikací s nejasným klinickým významem a nejasnou etiopatogenezí. Obecně je však doporučováno antihypertenzní terapii upravit, aby ke zkalení nedocházelo, protože by mohlo mj. zamaskovat počínající peritonitidu.

Poděkování: Podpořeno specifickým výzkumem MUNI/A/1475/2018.

## DEGRADATION OF MITOCHONDRIA IN CARDIOMYOCYTES OF PATIENTS AFTER ISCHEMIC CRISIS

**Marta Novotová<sup>1</sup>, Alexandra Zahradníková Jr<sup>1</sup>, Ivan Mihanovic<sup>2</sup>, Marko Ljubkovic<sup>2</sup>, Cristijan Bulat<sup>3</sup>, Jasna Marinovic<sup>2</sup>, Ivan Zahradník<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Experimental Endocrinology BMC SAS, Department of Cellular Cardiology, Bratislava, Slovak Republic

<sup>2</sup>Department of Physiology, University of Split School of Medicine, Croatia

<sup>3</sup>Department of Cardiac Surgery, University Hospital Split, Croatia

Diseased myocardium displays compromised energetics and mitochondrial dysfunction. In this morphological study, we focused on damage and degradation of mitochondria in ventricular muscles of 3 male patients (66 - 73 y) with ischemic crisis. Samples of myocardial tissue, obtained by needle biopsies during surgical intervention, were processed for observation by transmission electron microscopy and immunofluorescence confocal microscopy. The myocytes of ischemic myocardia showed substantially higher proportion of structurally damaged mitochondria and less autophagy of mitochondria in comparison to myocytes of healthy transplanted hearts. Mitochondria with damaged outer membrane were numerous in widened space between myofibrils and near membranes of Golgi apparatus and of vesicular bodies. Degradation of damaged mitochondria was accompanied by increased formation of ceroids, by internalization of damaged mitochondria by ceroids, and by formation of large ceroidal inclusions. Accumulations of damaged mitochondria under sarcolemma were degraded also under assistance of Golgi system but followed by formation of secretory vesicles and exocytosis. Secretion of mitochondrial content was confirmed by localization of anti Cytochrom C immunofluorescent signal in the extracellular space of the myocardial tissue. Our findings indicate dominant extralysosomal degradation of mitochondria in ischemic myocytes.

Acknowledgment:

This work was supported by the Slovak Scientific Grant Agency VEGA 2/0091/19

## NON-INVASIVE MODALITIES OF INNATE CARDIOPROTECTION AND THEIR MECHANISMS

**Táňa Ravingerová<sup>1</sup>, Lucia Kindernay<sup>1</sup>, Jaroslav Hrdlička<sup>2</sup>, Ľubomír Lonek<sup>1</sup>, Miroslav Ferko<sup>1</sup>, Jan Neckář<sup>2</sup>, Vladislava Zohdi<sup>3</sup>, Adriana Duriš Adameová<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Institute for Heart Research, Centre of Experimental Medicine, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, <sup>2</sup>Institute of Physiology, AS of the CR, Prague, CR, <sup>3</sup>Institute of Anatomy, Faculty of Medicine, <sup>4</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia

Although ischemic preconditioning (IPC) is the most robust adaptive intervention protecting the heart of all animal species against ischemia/reperfusion (I/R) injury, its application in humans is limited to planned operations due to technical requirements, such as chest opening, short-term duration and unpredictable occurrence of AMI. However, other forms of “conditioning” do not require an invasive intervention. Among those, pharmacological PC, hypoxia, remote PC, or exercise confer strong protection.

We explored whether preventive interventions applied *in vivo* increase cardiac resistance to I/R prior to AMI *ex vivo* using non-invasive approaches in the adult male Wistar rats: voluntary exercise (EPC, 2 weeks) and remote PC (RPC). For EPC, animals were placed in the cages equipped with wheels for free running, while control sedentary animals stayed in the cages without wheels. RPC was induced by 3 cycles of 5min inflation/5min deflation of pressure cuff on the hind limb. Echocardiography revealed that “runners” exhibited significantly lower BW and LV mass, PW width and HR, without changes in ejection fraction and in LV/BW index. No changes after RPC were shown. Efficacy of EPC was tested in the Langendorff-perfused hearts exposed to 30 min ischemia/2 hrs reperfusion, focused on changes in post-I/R recovery of function, arrhythmias and extent of lethal injury (infarct size, IS/AR) and compared with changes induced by second phase of RPC (2-RPC). In parallel groups, heart tissue samples were obtained for the investigation of the levels and activity of several proteins involved in “pro-survival” RISK cascade. Both EPC and 2-RPC significantly reduced contractile dysfunction, IS/AR and incidence and severity of reperfusion arrhythmias. Protective effects were associated with a significant up-regulation of selected RISK proteins (PKC, PKB) and higher SOD levels. Beneficial effects of sub-chronic free running and RPC suggest their potential in the management of ischemic heart disease. Supported by grants VEGA 2/0141/18, 2/0151/17, APVV-15-0607, APVV-15-0119, MAD SAV-18-27, ITMS 26230120009 and EU Cardioprotection COST Action CA16225.

## **RADIATION-INDUCED HEART DISEASE. PATHOPHYSIOLOGY – MECHANISM OF INJURY, PREVENTION & TREATMENT**

**J. Slezák, B. Kura, T. Ravingerová, Ľ. Okruhlicová, N. Tribulová**

Center of Experimental Medicine, Institute for Heart Research, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Introduction and purpose of study: Chronic ischemic injury of the myocardium including failure of the heart is increasingly recognized as an undesired side effect of cardiovascular system irradiation after mediastinal radiation therapy for malignancies. Irradiation of normal tissues leads to acute increase in reactive oxygen/nitrogen species that serve as intra and intercellular signaling to alter cell and tissue function. In the case of chest irradiation it can affect the heart, blood vessels and lungs, with consequent tissue remodeling and adverse side effects and symptoms. This complex process is orchestrated by a large number of interacting molecular signals, including cytokines, chemokines and growth factors. Inflammation, endothelial cell dysfunction, thrombogenesis, organ dysfunction and ultimate failing of the heart occur as a pathological entity - "radiation-induced heart disease"(RIHD) that is major source of morbidity and mortality. The purpose of this work is to bring insights into the basic mechanisms of RIHD that may lead to the identification of targets for intervention in the radiotherapy side effect and provide knowledge how to select targeted drugs or biological molecules to modify the progression of radiation damage in the heart.

Methods: Wistar rats were exposed to local heart and lung irradiation with a single dose of 10 Gy and were examined after 6 weeks. Examinations included in vivo and ex vivo cardiac function, histopathology, gene and protein expression measurements, (mitochondrial Mg<sup>2+</sup> ATP assays, cardiac Na,K-ATPase, Cx43 assays, determination of MMPs levels and expression of vWF). Selected drugs interfering with mechanism of RIHD like acetylsalicylic acid, atorvastatin, sildenafil citrate, tadalafil, anti TNF –Enbrel and molecular hydrogen were used.

Results: Treatment of rats with Aspirin caused a significant increase in IL-10 in LV and irradiation blunted this increase significantly. Enbrel caused a significant decrease in the TNF- $\alpha$  level in the LV. Hydrogen downregulated proinflammatory cytokines including TNF-  $\alpha$ .

All drugs showed some protection against the negative impact of radiation on healthy tissue as demonstrated by changes in miRNA, IL-10 and TNF-  $\alpha$  values. Our studies have also shown that hydrogen has antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic protective effects on cardiovascular system.

Irradiation led to general retardation and alteration of animals. Gene expression of PPAR $\alpha$  was significantly lower in left ventricular tissue of irradiated rats, while expression of microRNA-21 in these hearts was increased nearly 10-fold. Mg<sup>2+</sup>-ATPase of mitochondria isolated from left ventricles of irradiated hearts exhibited a decrease in its activity. Myocardial Cx43 was upregulated via reduced miRNA-1. miRNA-15b was down regulated almost 42% and Bax protein decreased, indicating triggered adaptive mechanism. Activities of circulating 72kDa MMP-2 significantly increased. In isolated Langendorff-perfused hearts, the effect of irradiation on heart function was manifested by mild bradycardia and enhanced coronary flow. Investigation of functional properties of the cardiac Na,K-ATPase showed deteriorated efflux of the excessive Na<sup>+</sup> from the intracellular space of irradiated hearts.



Morphologically, increased capillary density as well as ultrastructural endothelial cell degeneration were found. Ultrastructural studies showed that the changes might be associated with endothelial cell activation, proliferation and angiogenesis. Treatment with antiinflammatory and fibrinolytic drugs, ASA, statins, NO donors, compounds with antioxidant properties, PPAR ligands, manipulation with miRNA, anti-TNF, inhibitors of NFkB, Phosphodiesterase type 5 inhibitors reveal beneficial effects against RIHD. Protection of normal tissue against radiation-induced damage may increase the therapeutic benefit of radiotherapy

**Conclusion** Despite progressive deterioration of the animals and endothelial cell damage, adaptive/compensatory mechanisms were activated to maintain cardiac function. The effective prevention appears to be antiinflammatory drugs, NF-kB inhibitors, anti TNF, statins, matrix metalloproteinases inhibitors, free-radical scavengers, and inhibitors of mast cell degranulation. It is documented that H<sub>2</sub> may represent an effective antioxidant for the prevention of oxidative stress-related diseases. Hydrogen is an important physiological regulatory factor with antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and signal modulatory protective effects on cells and organs.

For the first time we demonstrate that characteristic changes in cytokines as well as miRNAs expression may be reflected in limiting the size of injury associated with the upregulation of proteins that are implicated in the protection of the heart.

Supported by grants APVV-15-0376, VEGA 2/0063/18 and VEGA 2/0021/15.

## REMODELAČNÉ ODPOVEDE SRDCA NA ZMENY HORMÓNOV ŠTÍTNEJ ŽĽAZY, HYPERTENZIU A MOŽNOSŤ KARDIOPROTEKCIE

Sýkora, M.<sup>1</sup>, Szeiffová Bačová, B.<sup>1</sup>, Soukup, T.<sup>2</sup>, Barančík, M.<sup>1</sup>, Tribulová, N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

<sup>2</sup> Fyziologický ústav, Akadémia vied Českej republiky, Praha, Česká republika

**Úvod.** Extracelulárna matrix (ECM) a medzibunková komunikácia v srdci je ovplyvňovaná rôznymi patofyziologickými stavmi. Matrix metaloproteinázy (MMP) sú zodpovedné za remodeláciu ECM, ktorá je asociovaná so zmenami a poruchami medzibunkovej komunikácie, sprostredkovanej konexínom-43 (Cx43). Cx43 medzibunkové kanáli sú zodpovedné za prenos elektrických impulzov a synchronizáciu kontrakcie v srdci. Zmeny Cx43 spôsobujú desynchronizáciu rytmu v srdci a tým vznik malígnych arytmií. V súčasnosti už existujú kardioprotektívne látky, farmakologickej a nefarmakologickej povahy, ovplyvňujúce srdcovú remodeláciu a čiastočne aj ich molekulárne dráhy, cez ktoré dané látky pôsobia. V tejto práci sme sa preto zamerali na sledovanie proteínovej expresie MMP-2, Cx43 a aktivity MMP-2 v srdci potkanov ovplyvnených hypertenziou, hypotyreózou, hypertyreózou ako aj kardioprotektívnym účinkom omega-3 polynenasýtených mastných kyselín (PUFA). **Metodika.** V tkanive ľavej komory srdca sme detekovali proteínovú expresiu MMP-2, Cx43, PKC $\epsilon$  pomocou WB metódy a aktivitu MMP2 pomocou zymografie. Farbením podľa Weigert van Giesona sme sledovali kolagén ECM.

**Výsledky.** Spolu so zníženou hladinou hormónov štítnej žľazy u hypotyroidných (HY) potkanov, sme pozorovali zníženú expresiu a aktivitu MMP-2 a zvýšenie aktivity MMP-2 u SHR HY. Hypertyreóza (TH) bola asociovaná so zvýšenou hmotnosťou srdca, no žiadnymi zmenami v expresii a aktivite MMP-2. Expresia Cx43 ako aj PKC $\epsilon$ , ktorá priamo fosforyluje Cx43, bola znížená u TH potkanov a zvýšená u HY potkanov. Hypertenzia zvýšila expresiu MMP-2 a znížila expresiu Cx43. Histochemické farbenie rezov ľavej komory ukázalo zvýšenie kolagénu SHR TH. PUFA mierne zvýšila expresiu a aktivitu MMP-2 u HY potkanov a znížila aktivitu MMP-2 v TH skupine. Expresia Cx43 sa normalizovala vďaka PUFA u potkanov HY a TH.

**Záver.** Naše výsledky ukazujú, že zmeny MMP-2 a Cx43 vplyvom hypertenzie a zmenou tyroidného stavu sú asociované so srdcovou remodeláciou a vznikom arytmií. Krátky čas suplementácie PUFA nemala významný vplyv, a preto by bolo potrebné predĺžiť čas podávania PUFA.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0167/15, 2/0076/16 a APVV 15-0119.

## **BUNKOVÉ PREŽÍVANIE A SMRŤ KARDIOMYOCYTOV PÔSOBENÍM PATOFYZIOLOGICKY RELEVANTNÝCH HLADÍN TNF**

**Adrián Szobi<sup>1</sup>, Veronika Kormanová<sup>1</sup>, Markéta Hlaváčková<sup>2</sup>, Martin Lichý<sup>1</sup>,  
František Kolář<sup>2</sup>, Adriana Duriš Adameová<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, Bratislava

<sup>2</sup> Fyziologický ústav Akadémie vied Českej republiky, Praha

Bolo navrhnuté, že zvýšené hladiny TNF v myokarde by mohli vyvolať prostredníctvom TNFR1 stratu a dysfunkciu kardiomyocytov v srdcovom zlyhávaní. Na druhej strane, TNF môže byť tiež kardioprotektívny aktiváciou cytoprotektívnych dráh cez TNFR2. Na objasnenie účinkov TNF na myokard sme preto skúmali reakciu h9c2 kardiomyoblastov a primárnych dospelých ľavých ventrikulárnych kardiomyocytov (ARVCMs) potkana na patofyziologické koncentrácie TNF počas 48 hodín. H9c2 bunky a ARVCMs boli vystavené zvyšujúcim sa koncentráciám TNF (0-1 ng/ml) s alebo bez AZD5582 (Smac mimetikum, promótor bunkovej smrti sprostredkovanej TNFR1) a zVAD-fmk (inhibítor kaspáz) počas 48 hodín. U oboch bunkových typov bola monitorovaná celková viabilita aj miera nekrózy. Expresia downstream signálnych kaskád bola monitorovaná imunoblotingom.

U h9c2 samotné TNF nevykazovalo toxický efekt na prežívanie, avšak viabilita klesla u skupín s prídavkom AZD s alebo bez zVAD. Imunoblotingová analýza ukázala, že TNF indukovalo apoptózu resp. regulovanú nekrózu. Naproti tomu, TNF v žiadnej koncentrácii nepreukázalo účinok na prežitie ARVCMs. V tomto bunkovom type TNF nedokázalo aktivovať apoptózu (csp3, štiepenie PARP1), nekroptózu (pSer166-RIP1, pSer229-RIP3) alebo indukovať prozápalovú signalizáciu (pSer536-NFkB, pSer32/36-IkB $\alpha$ ). Súhlasne tiež nenastali zmeny v dráhach prežívania (pSer473-Akt, pTyr202/204-Erk1/2). Súčasná liečba s AZD5582 a zVAD-fmk neodkryla účinky závislé od koncentrácie.

ARVCMs vykazujú nízku citlivosť na patofyziologické hladiny TNF aspoň v krátkodobom horizonte, preto nie je pravdepodobné, že by TNF samo o sebe významne ovplyvnilo ich prežitie. Na zmenu osudu kardiomyocytov v patológiách so zvýšenými hladinami TNF môžu byť potrebné ďalšie faktory. Výsledky získané na h9c2 kultúre musia byť brané s rezervou pri predpokladaní správania ARVCMs.

Podakovanie: Podporené grantami APVV-2015-0607, VEGA 1/0271/16, e-COST 16225 a FaF UK/17/2019.

## VPLYV TLMENÉHO OSVETLENIA POČAS NOCI NA CIRKADIÁNNU REGULÁCIU TLAKU KRVI POTKANA

**Hana Šutovská, Ľuboš Molčan, Michal Zeman**

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Bratislava, Slovenská republika

Tlak krvi (TK) je fyziologický parameter, pre ktorý je typický 24-hodinový rytmus s prognostickým významom [1]. Generovanie 24-hodinového rytmu môže byť narušené rôznymi environmentálnymi faktormi, vrátane svetla počas noci [2,3]. V dobe rozvíjajúcich sa technológií je stále viac významné svietenie v noci, avšak fyziologické dôsledky aj nízkej intenzity svetla v noci sú pomerne málo známe.

Cieľom našej práce bolo analyzovať vplyv tlmeného osvetlenia (1-2 lux; 2 týždne) počas noci na cirkadiánnu rytmus TK a na vybrané molekulárne parametre u Wistar potkanov. Zmenu v 24-hodinovom rytme TK sme merali pomocou telemetrie a analyzovali v softvéri Chronos-Fit. V odobratých vzorkách hrudnej aorty sme pomocou western blotu merali expresiu eNOS, SERCA2 a AT<sub>1</sub> receptora.

Vystavenie tlmenému osvetleniu počas noci spôsobilo stratu 24-hodinového rytmu TK u 4 potkanov zo 6. V prípade expresie eNOS a AT<sub>1</sub> receptora sme zaznamenali zníženú expresiu počas tmavej fázy dňa, kedy boli zvieratá vystavené tlmenému osvetleniu. V dôsledku vystavenia tlmenému osvetleniu počas noci sme nezaznamenali žiadnu zmenu expresie SERCA2.

Vystavenie tlmenému osvetleniu počas noci u potkanov významne potláča cirkadiánnu rytmus TK a ovplyvňuje kardiovaskulárny systém od celkovej až po molekulárnu úroveň.

Podakovanie: APVV-17-0178; UK/176/2019

Literatúra:

- [1] Khaper N., Bailey C.D.C., Ghugre N.R., Reitz C., Awosanmi Z., Waines R., Martino T.A.: Implications of disturbances in circadian rhythms for cardiovascular health: a new frontier in free radical biology, *Free Radic. Biol. Med.* 119 (2018) 85–92
- [2] West A.C., Smith L., Ray D.W., Loudon A.S., Brown T.M., Bechtold D.A.: Misalignment with the external light environment drives metabolic and cardiac dysfunction, *Nat. Commun.* 8 (2017) 417
- [3] Molčan L., Šutovská H., Okuliarová M., Senko T., Krsková L., Zeman M.: Dim light at night attenuates circadian rhythms in the cardiovascular system and suppresses melatonin in rats, *Life Sci.* 231 (2019) 116568

## VÝZNAM TUBULÁRNÍHO SYSTÉMU PRO FUNKCI SRDEČNÍCH BUNĚK: METODY STANOVENÍ KAPACITY TUBULÁRNÍ MEMBRÁNY

**Olga Švecová, Markéta Bébarová, Milena Šimurdová, Jiří Šimurda**

Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita,  
Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

Transverzálně-axiální tubulární systém srdečních buněk hraje významnou roli v mechanismu spřažení excitace a kontrakce. Srdeční selhání bývá doprovázeno degradací tubulů. Z tohoto hlediska je významné stanovit, jakou část celkové plochy membrány zaujímá plocha tubulárního systému. Plocha membrány se běžně charakterizuje snáze měřitelnou úměrnou veličinou, membránovou kapacitou. Stanovení kapacity samotné tubulární membrány je problematické, neboť není snadné měření kapacit obou membránových systémů oddělit. Doposud byla měření kapacity tubulárního systému prováděna tzv. detubulační technikou, kdy je srovnávána kapacita buněčné membrány před a po detubulaci, tj. po ireverzibilním mechanickém odtržení tubulů od povrchové membrány během osmotického šoku. Naše nedávno zavedená metoda umožňuje opakovaně stanovovat kapacitu tubulární membrány u intaktní srdeční buňky. Metodu jsme dříve testovali na komorových srdečních buňkách potkana a v současné době ji ověřujeme u síňových srdečních buněk technikou *whole cell patch clamp* na enzymaticky izolovaných buňkách z pravé srdeční síně potkana. Kapacitní proud je zaznamenáván během stimulace buňky podprahovými napěťovými impulsy (z -80 na -75 mV) v ustáleném stavu před i po aplikaci izotonického roztoku sacharózy. Naměřená data byla vyhodnocena podle kritérií navržených a otestovaných u komorových srdečních buněk. Ukázalo se, že u některých síňových buněk vychází frakce tubulární membrány nad očekávání vysoká. U těchto buněk jsme později zjistili, že kapacitní proud se již v kontrolních podmínkách nápadně odchyluje od monoexponenciálního průběhu. Po vyloučení těchto buněk z hodnoceného souboru na základě doplňujícího kritéria (monoexponenciální průběh v kontrole) vychází, že kapacita tubulární membrány představuje u síňových srdečních buněk v průměru 15% celkové kapacity buněčné membrány, což odpovídá údajům uváděným v literatuře.

*Práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-30571A.*

## VÝSKUM METABOLICKÉHO PRECONDITIONINGU NA ÚROVNI PROTEÍNOV SRDCOVÝCH MITOCHONDRIÍ - ANALYTICKÉ PRÍSTUPY K VYHODNOTENIU DÁT Z HMOTNOSTNEJ SPEKTROMETRIE

**Iveta Waczulíková<sup>1</sup>, Pavol Mišenko<sup>1</sup>, Natália Andelová<sup>2</sup>, Šimon Šutý<sup>1</sup> a Miroslav Ferko<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Katedra jadrovej fyziky a biofyziky, FMFI Univerzity Komenského v Bratislave

<sup>2</sup>Centrum experimentálnej medicíny SAV, Ústav pre výskum srdca, Bratislava, SK

Základný výskum kardioprotektívnych efektov rôznych typov preconditioningu má výrazný multidisciplinárny charakter. Náš tím zvolil experimentálny model akútneho diabetu, ktorý je považovaný za typ metabolického preconditioningu (MP). Zamerali sme sa na identifikáciu mechanizmov na úrovni proteínov mitochondrií srdca, ktoré súvisia s patologickými, ale aj kompenzačnými procesmi vyvolanými MP. S využitím hmotnostnej spektrometrie (MS) a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (LC) sme vykonali komplexnú analýzu abundancie proteínov, čo je nutnou podmienkou pre vysvetlenie ich úlohy v procesoch, ktoré prebiehajú v patologicky zaťaženom myokarde. MS štandardne produkuje veľký objem dát, ktorých spracovanie a interpretácia je esenciálne závislá na biomatematických a bioinformatických metódach spracovania LC/MS a MS/MS dát. V prednáške predstavíme základné dizajny MS experimentov a výsledky analýz nad MP a kontrolnými dátami vyjadrenými po príslušnom postprocesingu vo forme exponenciálne modifikovaného „protein abundance“ indexu emPAI využívaného v kvantifikácii proteínov bez štandardov značených izotopmi (label-free). Zmienime sa o špeciálnych prístupoch v testovaní medziskupinových rozdielov, o metódach pre identifikáciu a kvantifikáciu vzájomných vzťahov medzi proteínmi, a o metódach klasifikácie objektov do tried ako napr. logistická diskriminácia a analýza zhukov.

PodĎakovanie:

Podporené grantmi APVV 15-0119, VEGA 2/0121/18, OP Výskum a vývoj ITMS 26230120009 a EU-CARDIOPROTECTION COST CA-16225.

Literatúra:

Oberg AL, Vitek O. Statistical Design of Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomic Experiments. J Proteome Res. 2009 8(5):2144-

## Partneri podujatia

**ANIMA LAB**  
vybavení laboratoří a zvířetníků • výzkumné modely

**labo sk**

  
scintila



ISBN: 978-80-972360-5-2