

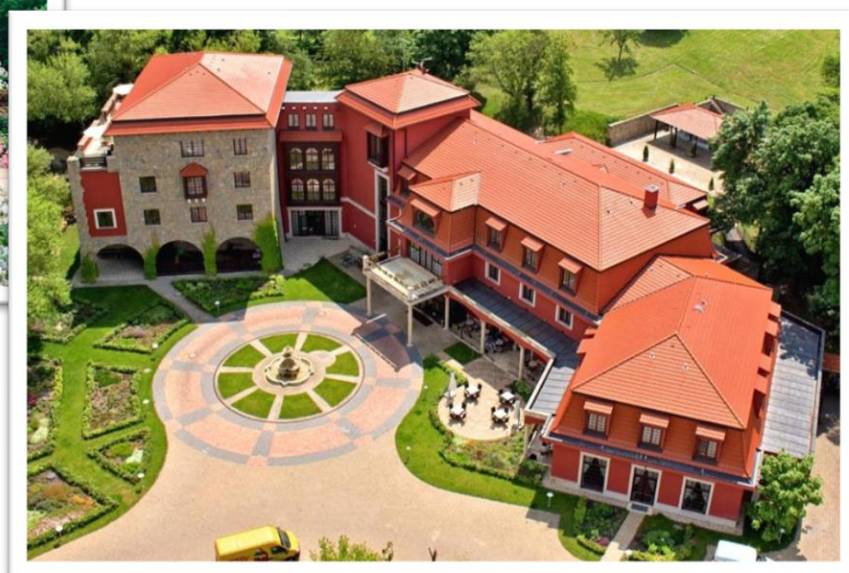


49. pracovná konferencia Komisie experimentálnej kardiológie 2022

Vápnik a kardiovaskulárny systém – pozitívne vs. negatívne účinky

Zborník abstraktov

Hotel Sv. Ľudmila, Skalica, Slovensko
12. – 14. október 2022



ISBN 978-80-972360-9-0

Organizačný výbor

MUDr. Táňa Ravingerová, DrSc.

Ing. Miroslav Ferko, PhD.

Mgr. Natália Andelová, PhD.

Mgr. Veronika Farkašová, PhD.

RNDr. Matúš Sýkora, PhD.

Miesto konania

12. – 14. október 2022

Hotel Sv. Ludmila**** Tehelňa 40, 909 01 Skalica, Slovenská republika

Web: www.hotelsvataludmila.sk

Jazyk konferencie

Slovenský, český, anglický.

Kontakt

Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny SAV, v.v.i.

Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava

Táňa Ravingerová, tel.: +421 903 419 337, e-mail: usrdravi@savba.sk

Miroslav Ferko, tel.: +421 907 065 665, e-mail: usrdmife@savba.sk

Editorial

Komisia experimentálnej kardiológie (KEK) pri Slovenskej fyziologickej spoločnosti a Českej fyziologickej spoločnosti, Slovenská fyziologická spoločnosť a Ústav pre výskum srdca, Centrum experimentálnej medicíny SAV, v.v.i. zorganizovali v poradí už 49. pracovnú konferenciu Komisie experimentálnej kardiológie 2022, tentokrát pod názvom „**Vápnik a kardiovaskulárny systém – pozitívne vs. negatívne účinky**“.

Účastníci pracovných stretnutí KEK vždy oceňovali možnosť prezentovať svoje vlastné aktuálne výsledky ako aj možnosť oboznámiť s novinkami v oblasti experimentálnej a klinickej kardiológie. Rovnako tomu bolo aj na aktuálnom 49. ročníku. Účastníci sa venovali kľúčovým témam z oblasti funkcie srdca, úlohy vápnika, elektrofyziológie srdca a arytmií, kardiovaskulárnej regulácii, ischemicko-reperfúzneho poškodenia, patologických stavov pri kardiovaskulárnych ochoreniach súvisiacich s poruchou homeostázy vápnika vrátane zlyhávania srdca, bunkových adaptačných mechanizmov v myokarde a kardioprotekcií na úrovni energetiky srdcových mitochondrií.

Aj vďaka spolupráci so Slovenskou kardiologickou spoločnosťou sa nám podarilo vytvoriť podujatie, ktoré v sebe spájalo zaujímavú fúziu klinickej a experimentálnej kardiológie.

MUDr. Táňa Ravingerová, DrSc.
Ing. Miroslav Ferko, PhD.
Mgr. Natália Andelová, PhD.
Mgr. Veronika Farkašová, PhD

Vydavateľ: Občianske združenie PREVEDA, Javornícka 21, Banská Bystrica, 97411

Autor/Spracovateľ: Centrum experimentálnej medicíny SAV, v.v.i.

Editorial: MUDr. Táňa Ravingerová, DrSc., Ing. Miroslav Ferko, PhD., Mgr. Natália Andelová, PhD.,
Mgr. Veronika Farkašová, PhD.

Hlavný názov: Vápnik a kardiovaskulárny systém – pozitívne vs. negatívne účinky

Podnázov: Zborník abstraktov

Jazyková mutácia: slovenská, česká, anglická

Rok vydania: 2022

ISBN: 978-80-972360-9-0

Abstrakty

Srdcový konexín-43 je zvýšený a pro-fibrotická signálna dráha TGF- β 1/SMAD2/3 potlačená v odpovedi na chladovú adaptáciu u bezsrstého kmeňa SHR

K. Andelova¹, B. Szeiffova Bacova¹, M. Sykora¹, S. Pavelka^{2,3}, H. Rauchova³, N. Tribulova¹

¹ Centrum experimentálnej medicíny, v.v.i., Slovenská akadémia vied, 84104, Bratislava; ² Ústav molekulárnej genetiky AV ČR, v. v. i., 14220, Praha 4; ³ Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., 14220, Praha 4

Predchádzajúce práce poukazujú na zvýšenú náchylnosť spontánne hypertenzných potkanov (SHR) k malígnym arytmiám. Kľúčovými faktormi v arytmogénéze sú zmeny konexínu-43 (Cx43), ktorý zabezpečuje elektrický kontakt a komunikáciu medzi kardiomyocytmi a tieto ovplyvňujú aj zmeny v extracelulárnej matrix (ECM). Je známe, že chladová adaptácia sa podieľa na ochrane srdca, avšak mechanizmy nie sú dostatočne objasnené.

Cieľom štúdie bolo zistiť, či adaptácia bezsrstých SHR na chlad ovplyvní uvedené pro-arytmické faktory. Sledovala sa tiež odozva týchto potkanov na indukovaný hypertyroidný a hypotyroidný stav.

Z výsledkov vyplýva, že nie sú významne rozdiely v biometrických parametroch medzi bezsrstým a štandardným kmeňom SHR. Analýzy však odhalili v myokarde bezsrstých SHR zvýšenie konexínu-43 ako aj jeho variantu fosforylovanú na seríne368, ktorá podporuje elektrickú stabilitu. Okrem toho, v porovnaní so štandardným kmeňom mali bezsrsté SHR pro-arytmické zmeny v topológii Cx43. Taktiež sa zistili zvýšené hladiny β -katenínu, proteínu ktorý prispieva k adhéznemu spojeniu kardiomyocytov. Pozoruhodný je fakt, že proteíny pro-fibrotickej dráhy TGF- β 1, SMAD2/3 a kolagén-1 ako aj jeho štiepny produkt, hydroxyprolín, boli u bezsrstého kmeňa znížené. Nezistili sa však rozdiely sledovaných ukazovateľov v odozve na zmeny tyroidného stavu medzi porovnávanými kmeňmi.

Výsledky naznačujú, že bezsrstý SHR kmeň by mohol profitovať z adaptácie na chlad a to vďaka zvýšeniu proteínových hladín Cx43 a supresii pro-fibrotickej signálnej dráhy. Tieto skutočnosti by sa mohli podieľať na menšej náchylnosti k malígnym arytmiám čo je potrebné ešte preveriť.

Štúdia bola finančne podporená grantami: VEGA 2/0002/20, 2/0158/19 a APVV-21-0410

Účinok remote ischemického preconditioningu na mitochondriálny proteóm srdca

N. Andelová¹, I. Waczulíková², V. Farkašová¹, T. Ravingerová¹, M. Ferko¹

¹Centrum experimentálnej medicíny SAV, v.v.i., Bratislava, Slovenská republika; ²Oddelenie jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

Remote ischemický preconditioning (RPC) preukázal zvýšenú toleranciu myokardu voči záťaži a jeho pozitívny účinok bol potvrdený zlepšením viacerých fyziologických parametrov po ischemicko/reperfúznom (I/R) poškodení. Do kardioprotektívnych dráh RPC je významným spôsobom zapojená práve mitochondriálna modulácia. Naším cieľom bolo prispieť k objasneniu možných iniciátorov kardioprotektívnej signalizácie navodenej skorou fázou RPC z pohľadu proteínov identifikovaných kvantitatívnou label-free LC-MS/MS proteomickou analýzou izolovaných srdcových mitochondrií. Samce potkanov kmeňa Wistar boli vystavené RPC pozostávajúceho z 3 cyklov 5-minútovej ischémie a reperfúzie pravej zadnej končatiny femorálnej artérie nafúknutím tlakovej manžety na 200 mmHg. Extrahované srdcia boli následne perfundované metódou podľa Langendorffa (30 minút globálnej ischémie a 40 minút reperfúzie). Sledovaním vplyvu RPC na mitochondriálny proteóm sme pozorovali stimuláciu proteínov zapojených do β -oxidačnej dráhy mastných kyselín, Krebsovho cyklu a proteínov s antioxidantnou aktivitou (PRDX3, PRDX5, SODM). Jedným z najvýraznejšie ovplyvnených proteínov RPC bol peroxiredoxín-5 (PRDX5), proteín s cytoprotektívnou funkciou. Expresia PRDX5 bola znížená v dôsledku I/R poškodenia, ale účinkom RPC bola významne zvýšená ($p = 0,0002$). PRDX5 teda môžeme považovať za potenciálny marker podieľajúci sa na zabezpečení kardioprotektívnej signalizácie indukovanej RPC. Proteomická analýza odhalila kardioprotektívny účinok RPC prostredníctvom regulácie mitochondriálnych proteínov s funkciou zameranou na udržateľnosť energie myokardu.

Táto štúdia bola podporená: APVV 15-0119, APVV 19-0540, APVV 21-0410, APVV 20-0242, VEGA 1/0775/21, VEGA 1/0016/20.

The vasoactive effect of hydrogen sulfide on the mesenteric artery in metabolic syndrome

B. G. Aydemir, A. Berenyiova, S. Goals, S. Cacanyiova

Institute of Normal and Pathological Physiology, Center of Experimental Medicine Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Hydrogen sulfide (H₂S) is an important gaseous transmitter that could interfere with the etiopathogenesis of different cardiovascular and metabolic diseases. However, H₂S in interaction with nitric oxide (NO) may also trigger compensatory vasoactive effects to counterbalance pathologically increased vascular tone in both arterial hypertension and metabolic syndrome.

12 weeks-old SHR were divided into three groups: control rats, rats treated with 10% fructose in drinking water for 8 weeks, and rats treated with fructose and during the last three weeks with H₂S donor, GYY-4137 (266 µg/kg/day, i.p.). Vasoactivity of the isolated mesenteric artery (MA) was recorded as changes in isometric tension. H₂S inhibition was performed by acute incubation with DL-propargylglycine (PPG, 10 mmol/l). Acute incubation with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁵ mol/l) was used for inhibition of NO production.

The chronic fructose intake significantly increased the plasma level of triacylglycerols (TAG) and this effect was partially attenuated by treatment with an H₂S donor. The systolic blood pressure (SBP) was increased in fructose-fed rats, however 3-week-long treatment with GYY-4137 decreased the SBP. We observed that fructose intake enhanced endothelium-dependent vasorelaxation and decreased adrenergic contraction of MA, along with the sensitivity to noradrenaline remained unchanged. While GYY-4137 administration did not significantly affect vasorelaxant responses, it partially restored reduced contractility in fructose-fed rats. There was no difference in the participation of endogenous H₂S in vasoactive responses among groups. While a significantly decreased participation of NO in contractile response was demonstrated in GYY4137 only, the acute pretreatment with L-NAME, inhibited the vasorelaxant response significantly more in fructose and GYY-4137 treated rats.

Our results suggest that fructose intake triggered compensatory vasoactive responses of the MA which included the action of the NO signal pathway. Moreover, a slow H₂S-releasing donor could partially amend metabolic-related changes and ameliorate impaired mesenteric contractility.

Acknowledgment: This study was supported: VEGA 2/0147/22; VEGA 2/0111/19.

Genetické varianty asociované s idiopatickou fibrilací komor: role dysfunkce RYR2 kanálu

M. Bébarová^{1,2}, S. Lietava², I. Synková³, J. Zídková³, T. Novotný²

¹ Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika; ² Interní kardiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika; ³ Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Populační studie potvrdily významný podíl genetické predispozice na vzniku náhlé srdeční smrti. Zdá se, že to platí i u tzv. idiopatické fibrilace komor (FK), která tak může sloužit jako vhodný model studia patogeneze náhlé srdeční smrti. Idiopatická FK je charakterizována výskytem FK u pacienta bez známek jeho strukturálního poškození a také bez klinických známek některého z hereditárních arytmiích syndromů. U některých z těchto pacientů lze nalézt vzácné varianty v genech kódujících srdeční iontové kanály, podobně jako tomu je u dědičných arytmogenních syndromů, i když tato diagnóza byla u těchto pacientů vyloučena. V naší pilotní studii prvních 22 pacientů s idiopatickou FK z registru FN Brno jsme našli vzácné, potenciálně patogenní varianty v genech kódující srdeční iontové kanály již u 13 pacientů; nejčastěji šlo o varianty v genech *KCNH2* (4 pacienti) a *RYR2* (5 pacientů). Pro nedávno zahájenou detailní funkční analýzu byla mimo jiné vybrána doposud neznámá varianta Y4734C-RYR2. Tato varianta se nachází v blízkosti jiné varianty v genu *RYR2* asociované s idiopatickou FK, A4860G-RYR2, která při funkční analýze překvapivě vykazovala sníženou tendenci k uvolňování Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula (SR) při jeho přeplnění Ca²⁺ (Jiang *et al.*, PNAS 2007, 104, 18309-14). Tyto vlastnosti ji významně odlišují od doposud funkčně charakterizovaných variant v genu *RYR2*, které bývají obvykle asociovány s dědičným arytmogenním syndromem zvaným katecholaminergní polymorfni komorová tachykardie (CPVT) a vyznačují se naopak navýšením funkce RYR2 kanálu projevujícím se spontánním upouštěním Ca²⁺ ze SR. To během zvýšené β-adrenergní stimulace v průběhu fyzické zátěže vede typicky ke vzniku pozdních následných depolarizací až k polymorfni komorové tachykardii, která může degenerovat ve FK. Byť byl náš pacient s variantou Y4734C-RYR2 v minulosti resuscitován pro FK, při následném opakovaném vyšetření u něj nebyly přítomny žádné příznaky CPVT. V rámci kaskádového screeningu byli nedávno vyšetřeni příbuzní našeho pacienta. Jeho zdravý synovec s přirozenou (*wild-type*) variantou genu *RYR2* je bez známek jakékoliv arytmie. Naproti tomu sestra našeho pacienta je rovněž nosičkou varianty Y4734C-RYR2 a vykazuje typické znaky CPVT. Je tedy pravděpodobné, že varianta Y4734C-RYR2 je variantou patogenní, jak bude prověřeno probíhající funkční analýzou, a že typické projevy CPVT jsou u našeho pacienta pravděpodobně maskovány a mohou se objevit jen za specifické, doposud nám neznámé situace, jejíž charakter se budeme snažit objasnit. Získaná data by mohla pomoci objasnit patogenezi vzniku FK u našeho pacienta a identifikovat rizikové faktory, které u něj vedly ke vzniku život ohrožující arytmie.

Podpořeno z projektu č. NU22-02-00348 poskytnutého Ministerstvem zdravotnictví ČR a z projektu č. MUNI/A/1133/2021 specifického vysokoškolského výzkumu, který poskytlo Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Activation of RISK signalling pathway is associated with cardioprotective effect of remote ischemic preconditioning in SHR rats

V. Farkašová¹, L. Kindernay¹, M. Ferko¹, T. Rajtík², A. Szobi², A. Adameová², T. Ravingerová¹

¹*Center of Experimental Medicine Slovak Academy of Sciences, branch Institute for Heart Research, Bratislava, Slovak Republic;* ²*Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*

Remote ischemic preconditioning (RIPC) represents a form of innate cardioprotection. However, its application in humans has not been always beneficial, which might be attributed to the presence of various comorbidities and/or confounders, such as hypertension, gender or middle age of the patients. RIPC has been shown to mediate its cardioprotective effect by activating reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway in healthy animals, however, there is no evidence supporting this effect of RIPC in the hearts of spontaneously hypertensive (SHR) rats. The study aimed to investigate the effectiveness of RIPC in male SHR rats of different age and to evaluate the role of RISK pathway in the effect of RIPC on cardiac ischemic tolerance. RIPC was performed on the right hind limb of thiopental (50-60 mg/kg i.p.)-anesthetized SHR rats aged three, five and eight months. Subsequently, hearts were excised, Langendorff-perfused and exposed to 30min ischemia and 2h reperfusion. Enhanced resistance to myocardial infarction after RIPC was observed only in three and five month old animals. In three and five month old animals, RIPC exhibited antiarrhythmic effect, while its impact on the severity of arrhythmias in eight months old SHR rats was negative. Beneficial effects of RIPC were accompanied by increased RISK and decreased apoptotic signalization observed only in three and five months old animals. In conclusion, RIPC showed cardioprotective effects in SHR rats that were partially age-dependent and may be attributed to the differences in the activation of RISK pathway and a distinct way of influencing various aspects of ischemia/reperfusion injury.

Funding: APVV -19-0540; APVV-20-0242; VEGA 2/104/22; VEGA 1/0775/21

Dichlóracetát ako modulátor endogénnej ochrany mitochondrií v myokarde so zníženou utilizáciou kyslíka

M. Ferko¹, I. Waczulíková², T. Ravingerová¹, N. Andelová¹

¹Centrum experimentálnej medicíny SAV, v.v.i., Bratislava, Slovenská republika; ²Oddelenie jadrovej fyziky a biofyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Vysoké riziko predstavujú poruchy metabolizmu kyslíka, ktoré často vedú k dysfunkcii orgánov. Najmä myokard je charakterizovaný zvýšenými energetickými nárokmi v podmienkach patologického zaťaženia. Pre štúdium energetického deficitu v podmienkach zníženého využitia kyslíka bol navrhnutý experimentálny model akútneho strepotocínom (STZ) indukovaného diabetes mellitus (D). Vzhľadom na to, že mitochondrie zohrávajú dôležitú úlohu v metabolizme kyslíka, je potrebné sledovať práve ich výkonnosť s ohľadom na ochorenia, ktoré sa vyznačujú zvýšenou potrebou energie. Zamerali sme sa na rozšírenie vedomostí o kľúčových signálnych dráhach spojených s reguláciou otvárania mitochondriálnych pórov prechodnej permeability (mPTP) a signalizácie ROS v podmienkach zníženej využitia kyslíka liečených metabolickým modulátorom dichlóracetátom (DCA).

Materiály a metódy: Na experimenty boli použité samce potkanov kmeňa Wistar (n=24) vo veku 12-15 týždňov a s hmotnosťou 323 ± 28 g. Akútny 8-dňový D model bol indukovaný jednou dávkou STZ (65 mg/kg i.p.). DCA bol podávaný zvieratám v dávkach (150 mg/kg a 75 mg/kg i.p.) 60 minút a 15 minút pred excíziou srdca. Pred extrakciou srdca boli zvieratá stabilizované počas 30 minút. Izolované mitochondrie srdca potkana Wistar sa použili na kvantitatívnu LC-MS/MS proteomickú analýzu a fluorescenčné analýzy.

Výsledky: Proteomické analýzy odhalili významnú ($p < 0,0001$) proteínovú stimuláciu komplexu dýchacieho reťazca I a II v skupine so zníženou využitia kyslíka v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou (C). U diabetických zvierat v kombinácii s DCA sme pozorovali významný pokles pre komplex II ($p < 0,001$) a komplex IV ($p < 0,05$). Preukázali sme signifikantne ($p < 0,001$) upregulovanú proteínovú aminooxidázu [flavín-obsahujúca] A (AOFA) v D mitochondriách, čo naznačuje zvýšenú tvorbu voľných radikálov (ROS). DCA u diabetických zvierat (D+DCA) znížila reguláciu AOFA ($p < 0,05$) a stimulovala peroxidovú reductázu závislú od tioredoxínu ($p < 0,05$), proteín s antioxidačnou funkciou. D stav bol spojený s mitochondriálnou rezistenciou voči preťaženiu vápnikom prostredníctvom regulácie mPTP. Na rozdiel od toho stav D+DCA ovplyvnil hladiny ROS v porovnaní so samotným D.

Záver: Stimulácia proteínov mitochondriálneho dýchacieho reťazca a komplexu mPTP sa podieľa na endogénnych kompenzačných mechanizmoch vedúcich k udržaniu funkcie myokardu v podmienkach zvýšenej energetickej záťaže. Charakterizácia kombinovaného účinku D+DCA ukazuje, že DCA pôsobila ako efektor regulácie vychytávania vápnika a produkcie ROS. Celkovo dosiahnuté výsledky rozšírili dostupné poznatky o mitochondriálnych signálnych dráhach v srdci potkana, ktoré môžu viesť ku kardioprotekcii počas zníženého využitia kyslíka v podmienkach D.

Granty: APVV 15-0119, APVV 19-0540, APVV 20-0242, VEGA 2/0121/18, VEGA 2/0141/18, VEGA 1/0016/20, VEGA 1/0775/21.

Vazoaktívny účinok perivaskulárneho tukového tkaniva a sírovodíka v hrudnej aorte potkana v podmienkach esenciálnej hypertenzie a metabolického syndrómu

S. Golas, A. Berényiová, A. Zemančíková, S. Čačányiová

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

Perivaskulárne tukové tkanivo (PVAT) má schopnosť vylučovať látky parakrinným alebo endokrinným spôsobom. Jednou z vazoaktívnych látok produkovaných z PVAT ale aj cievnou stenou môže byť sírovodík (H_2S) s bifázickým efektom na kardiovaskulárny systém. Avšak v patologických podmienkach esenciálnej hypertenzie a metabolického syndrómu môže byť účinok vazoaktívnych látok produkovaných PVAT redukovaný. Cieľom tejto práce bolo zistiť vazoaktívnu úlohu PVAT ako aj jeho vzájomný vzťah s endogénnym a exogénnym H_2S vo vazoaktívnych odpovediach izolovanej hrudnej aorty (HA) u dospelých normotenzných Wistar, spontánne hypertenzných (SHR) a hypertriglyceridemických (HTG) potkanov. Zmeny izometrickej tenzie sme registrovali prostredníctvom elektromechanického snímača zmien tenzie po exogénne aplikovanom noradrenalíne (NA), acetylcholíne (Ach) a Na_2S , exogénnom donore H_2S v izolovanej HA bez PVAT a s intaktným PVAT. Na inhibíciu endogénnej produkcie H_2S sa použil inhibítor cystationín-gama-lyázy, DL-propargylglycín (PPG).

Najväčšie vazokontraktilné odpovede HA na exogénny NA sme zaznamenali u HTG potkanov. Avšak bez ohľadu na kmeň, PVAT malo antikotraktilný efekt a signifikantne redukovalo kontraktilné odpovede HA. Endotel závislé vazorelaxačné odpovede HA na exogénny Ach boli redukované len u HTG potkanov, ale PVAT zhoršilo vazorelaxáciu u všetkých troch kmeňov. Avšak najmenšie vazorelaxačné odpovede HA s PVAT sme pozorovali u HTG potkanov.

U SHR potkanov sme zaznamenali, že H_2S produkovaný cievnou stenou ako aj PVAT mal prokontraktilný efekt a podieľal sa zväčšenej vazokontrakcii HA. Na druhej strane H_2S z cievnej steny ale nie PVAT mal pro-relaxačný účinok a podieľal sa na endotel závislej vazorelaxácii HA. U HTG potkanov sme nezaznamenali žiadny efekt H_2S z cievnej steny, avšak H_2S produkovaný z PVAT mal antikotraktilný efekt a prispieval tak ku redukcii vazokontraktilných odpovedí HA. Na druhej strane H_2S produkovaný cievnou stenou ako aj PVAT mal anti-relaxačný účinok na endotel závislej vazorelaxácii HA.

Podávanie Na_2S vyvolalo duálny vazoaktívny účinok u všetkých kmeňov. U SHR HA s PVAT mala signifikantne zmenenú odpoveď: zmenšenú kontraktilnú a zväčšenú vazorelaxačnú fázu. Rovnako u HTG potkanov sme zaznamenali signifikantný efekt PVAT; posun v prospech vazokontrakcie bol pozorovaný u HA s PVAT. Pri vzájomnom porovnaní SHR a HTG, bola bez ohľadu na prítomnosť PVAT, signifikantne zvýšená vazorelaxačná odpoveď a zmenšená kontraktilná fáza Na_2S -vyvolaných odpovedí u SHR. Navyše prítomnosť PVAT ešte viac zväčšilo vazorelaxačnú odpoveď HA u SHR.

V našej práci sme ukázali, že u SHR potkanov mal endogénne produkovaný H_2S duálny účinok v závislosti od typu spustenej signálnej dráhy. H_2S produkovaný cievnou stenou mal pro-kotraktilné účinky, čím pravdepodobne prispieval k patologickým zmenám esenciálnej hypertenzie. Na druhej strane sa u SHR potkanov spúšťali kompenzačné vazoaktívne mechanizmy, ktorý zahŕňali pro-relaxačný účinok H_2S produkovaného z cievnej steny. U HTG

potkanov sme pozorovali, že H₂S produkovaný z cievnej steny sa podieľal pro-kontraktilným účinkom na zvyšovaní cievneho tonusu a navyše anti-relaxačný účinok H₂S prispieval do endotelovej dysfunkcie. Na základe toho sa domnievame, že prítomnosť ďalšej metabolickej poruchy u HTG zosilňovala patologické pôsobenie H₂S produkovaného cievnu stenou HA. Taktiež sme potvrdili, že existuje špecifická interakcia medzi aktivitou PVAT a pôsobením exogénnych H₂S donorov. Ukázali sme, že aj keď exogénne donory H₂S by mohli byť vhodnou kompenzačnou vazorelaxačnou terapeutickou látkou v podmienkach esenciálnej hypertenzie, je potrebné vziať do úvahy aj možný negatívny vplyv hypertriglyceridémie na výsledný vazoaktívny efekt donora.

Podporené: VEGA 2/0147/22

Action potential characteristics in derived cardiomyocytes of a patient carrying RYR2 variant

M. Král¹, O. Švecová¹, Š. Zelenák², J. Pacherník², T. Bárta³, I. Synková⁴, T. Novotný⁵, M. Bébarová^{1,5}

¹ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ² Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ³ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁴ Institute of Medical Genetics and Genomics, Clinic of Internal Haematology and Oncology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ⁵ Department of Internal Medicine and Cardiology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Ventricular fibrillation (VF) is a common cause of death in young adults. It can originate from a dysfunction of a cardiac ionic channel which may be caused by a variant in the encoding gene. We have found a potentially proarrhythmic variant in the *RyR2* gene, p.Y4734C-RYR2, in a patient with VF, but structurally and functionally healthy heart (no signs of heart impairment on magnetic resonance, echocardiography, and electrocardiography both at rest and after exercise; *i.e.* idiopathic VF). This variant has not been functionally tested yet. RYR2 channel variants are usually associated with an inherited arrhythmogenic syndrome called catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). It might also apply to this variant because a sister of the proband suffers from this disease as has been recently revealed. However, no signs of CPVT could be identified in the proband. Hence, the dysfunction might be masked by other electrophysiological changes in his heart. To reveal the mechanism and specific conditions that may lead to VF in the proband, we have recently started a functional analysis of the Y4734C-RYR2 variant using cardiomyocytes derived from patient-specific human-induced pluripotent stem cells (hiPSC). It is a clinically relevant, up-to-date model that enables fast transmission of the experimentally acquired data to clinical practice. Here we bring pilot data showing basic characteristics of spontaneous action potential waveforms in Y4734C-RYR2 cardiomyocytes in comparison with the characteristics in hiPSC-derived cardiomyocytes of an unrelated healthy control (WT-RYR2; methods: whole-cell patch-clamp technique, at 37°C, 5 and 6 samples in Y4734C-RYR2 and WT-RYR2 cardiomyocytes, respectively). No significant differences have been identified. We just observed a tendency to an increased beating rate and decreased action potential duration in Y4734C-RYR2 cardiomyocytes; the latter remained even after correction of the action potential duration to the respective beating rate using both Bazett's and Fridericia's formulas. For a better understanding of the influence of this variant, we will have to perform more measurements and analyse changes in action potential configuration at specific conditions. It will help us to better understand the mechanism of VF generation in the proband which might be essential for his treatment and prevention of life-threatening VF episodes in the future.

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant No. NU22-02-00348, and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Grant No. MUNI/A/1133/2021.

Hypertension and dyslipidemia alter cardiac response to ischemia via suppression of innate cardioprotection

T. Ravingerová¹, V. Ledvényiová-Farkašová¹, M. Ferko¹, A. Lazou²

¹Inst Heart Res, CEM SAS v.v.i., Bratislava, Slovakia, ²School of Biol, Aristotle Univ of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Lifestyle-related risk factors (RF), such as hypertension and dyslipidemia have a negative effect on the cardiac response to ischemia. On the other hand, moderate stress including ischemia(hypoxia), hyperglycemia and/or free radicals, may trigger adaptive processes increasing resistance to ischemia/reperfusion injury (IRI) known as preconditioning (PC), which is also observed in the diabetic heart. We hypothesized that RF may exacerbate tolerance to ischemia via interference with mechanisms of intrinsic cardioprotection. While acute STZ-induced diabetes or high-fat diet alone reduced cardiac susceptibility to ischemia, combination of RF markedly exacerbated IRI in the adapted hearts promoting pro-oxidative and apoptotic processes. Accordingly, severity of arrhythmias and infarct size were increased in preconditioned or diabetic SHR and diabetic-hypercholesterolemic animals. Research shows that although innate cardioprotection is still retained in the pathologically altered myocardium, its potential is lower. Thus, a higher intensity of adaptive stimulus is required to reach a similar level of protection as in the „healthy“ heart. Cardioprotective pleiotropic (independent of primary) effects of PPAR agonists indicate a promising approach to improve ischemic tolerance in the „diseased“ myocardium.

Grants VEGA-SR 2/0104/22, APVV-19-0540.

Cerebrovaskulární preklinický výzkum u potkanů - když translace naráží na klinickou realitu bez ohledu na kalcémii.-)

P. Scheer^{1,2}, J. Hložková^{1,2}, A. Novobilský³, E. Brhelová¹, J. Doležalová¹, A.D. Aksu Ahmet², G. Kuzmínová², M. Robert¹

¹Mezinárodní centrum klinického výzkumu při Fakultní nemocnici u svaté Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno; ²Ústav farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Masarykovy Univerzity, Palackého třída 1, 612 00 Brno; ³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, Oddělení farmakologie a toxikologie

Úvod: Klasický MCAO (okluze střední mozkové tepny) model naráží na fyziologické limity – nelze současně sledovat v jednom jedinci efektivitu trombolýzy a bezpečnost léčby. Jediná aktuální parketa pro studium mozkové mrtvice - trombolýza ale vyžaduje právě seriózní a spolehlivé posouzení efektivity nových (in vitro a in vivo) trombolytik a současně získat na hodnověrném modelu informace o bezpečnosti nové substance/dávkovacího režimu či kombinace trombolytik. In-vivo testování trombolytik musí splňovat primárně schopnost hodnotit trombolýzu jako dynamický proces. Toto kritérium lze splnit pomocí přímého sledování trombolýzy a bezpečnost hodnotit na dostatečně velkých infarktových lézích s trombolýzou mezi 3 a 4 hodinou po indukci MCAO.

Cíl: Vyvinout experimentální model systémové embolie (SE) umožňující přímé sledování trombolýzy v *in vivo* modelu a optimalizovat MCAO model na incidenci hemoragických transformací (HT) v prvních 24 hodinách na úrovni 25-35 %.

Metodologie: Model SE používá umělé sraženiny (AC) připravené z tkáňového lepidla na bázi lidského fibrinu a pro rentgenologickou vizualizaci byl přidán síran barnatý. SE je indukován aplikací AC (3 kusy, délka 10 mm) retrográdně ze společné karotidy do aortálního oblouku. Zvířata jsou snímkována současně se zahájením trombolytické terapie. Pro detekci lýzy je použita skiaskopie (permanentní živý obraz, záznam každých 5 minut) nebo mikroCT (záznam každých 10 minut). Model byl použit úspěšně u 144 skiaskopií a 25 mikroCT vyšetření. Skiaskopické snímky byly analyzovány pomocí software ImageJ, mikroCT pomocí software Bruker CTan. V MCAO modelu jsou použité identicky vyrobené AC jenom menšího kalibru. Do povodí Willisova okruhu jsou aplikovány 3 AC 2 mm vyrobené v PE10 hedičcea 1 3 mm v PE50. Trombolýzu lze sledovat stejně jako v SE modelu skiaskopicky či na mikroCT. Po trombolýze je subjekt monitorován pomocí termokamery a pokud dojde k úhynu před časovým oknem 24 h post MCAO je tento časový údaj součástí hodnocení bezpečnosti. Mozky jsou exvivo impregnovány jodem a následně zobrazeny pomocí mikroCT s možností kvantifikovat objemy nekrózy a krvácení.

Výsledky: Model SE je bezpečný a v případě úspěšné aplikace AC má nulovou mortalitu. Při použití mikroCT je počet hodnocených AC stejný nebo vyšší než aplikovaný (možnost fragmentace AC při aplikaci). U skiagrafie byl počet analyzovaných AC 309, průměrný počet měřených AC 2,15±0,74.

Limitem skiagrafie je 1/ 2D obraz (měřený stín je ovlivněn projekčním úhlem) a 2/ relativním limitem je počet zobrazených AC nižší než počet aplikovaných AC, 3/ nižší kvalita zobrazení AC v mozkových cévách. Limitem mikroCT je 1/ pohybová neostrost v případě AC

v mezenterických tepnách, 2/ relativně malá skenovaná část zvířete, při které lze ne vždy sledovat všechny 3 aplikované sraženiny v abdominální oblasti.

Výhodou skiaskopie je „real-time“ obraz, možnost provádět katetrizační zákroky včetně angiografie, velice nízká radiační zátěž. Výhodou mikroCT je vysoká přesnost v měření změn objemu sraženiny ve 3D vizualizaci a excelentní zobrazení malých AC v mozkových cévách.

V upraveném MCAO modelu se % zařazených jedinců z původních 55 % zvedá na 95 %. Další data ohledně incidence HT a zatím nejsou kompletně zpracována a budou prezentována v příští době.

Závěr: Použití umělých sraženin s kontrastní látkou na bázi síranu barnatého umožňuje rentgenologicky kvantifikovat rychlost rozpadu sraženiny a konstruovat lytickou křivku. Jednoduchost, opakovatelnost a robustnost modelu umožní porovnání trombolytického účinku nových potenciálních trombolitik. Modifikace klasického MCAO modelu umožňuje fundované posouzení bezpečnosti nových trombolitik, jejich kombinace či dávkovacích režimů.

Výzkum byl podpořen z Evropského fondu pro regionální rozvoj - projekt INBIO (reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008451), projektu MŠMT OPV VV POI project "FIT" CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000495 a projekt Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21-08-00510. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena

Změny v elektrické aktivitě varianty Y4734C-RYR2 asociované s idiopatickou fibrilací komor

O. Švecová¹, Š. Zelenák², J. Pacherník², T. Bárta³, I. Synková⁴, T. Novotný⁵, M. Běbarová^{1,5}

¹ Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR; ² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR; ³ Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR; ⁴ Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR; ⁵ Interní kardiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, ČR

K život ohrožující arytmii charakteru fibrilace komor (VF, z angl. *ventricular fibrillation*) může překvapivě dojít i u pacienta bez strukturálních změn v srdci a bez známek jakékoliv arytmie při klinickém vyšetření (magnetická rezonance, echokardiografie, elektrokardiografie v klidu i po zátěži). Takovýto stav vede k diagnóze tzv. idiopatické VF a k velké nejistotě stran možného opakování ataky VF v budoucnosti. Těmto pacientům je v rámci sekundární prevence VF implantován defibrilátor. Jak se ukazuje, podkladem idiopatické VF mohou minimálně u některých pacientů být genetické varianty v srdečních iontových kanálech. Otázkou zůstává, jak tyto varianty vedou k VF, když není patrný jejich vliv na srdeční elektrofyziologii při standardním klinickém vyšetření pacienta. Jediné řešení je důkladná funkční analýza nalezených variant. V rámci této studie byla pro funkční analýzu vybrána varianta v genu *RYR2*, p.Y4734C-RYR2. Obdobné varianty vedou obvykle k projevům tzv. katecholaminergní polymorfní komorové tachykardie (CPVT, z angl. *catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*), která se projevuje arytmií při fyzické zátěži. Tato diagnóza však byla u pacienta klinickým vyšetřením vyloučena. Probandovi byla odebrána krev a pomocí iPSC technologie a následné buněčné diferenciaci byly připraveny pacient-specifické kardiomyocyty nesoucí variantu Y4734C-RYR2. K zaznamenávání elektrické aktivity spontánně bijících pacient-specifických kardiomyocytů byla využita technika *multielectrode array* při 37°C. Měření proběhlo na třech různých klonech pacient-specifických kardiomyocytů (tj. Y4734C-RYR2 kardiomyocytů; $n = 3-5$) a na jednom klonu zdravých nepříbuzných kontrolních kardiomyocytů (tj. WT-RYR2 kardiomyocytů; $n = 8$), a to jak v kontrolním roztoku (Tyrodův roztok), tak po aplikaci 1 μM roztoku isoprenalinu s cílem navodit β -adrenergní stimulaci obdobnou jako při fyzické zátěži. Ze získaných pilotních dat byly prozatím stanoveny pouze frekvence spontánních elektrických výbojů (resp. tzv. pseudo-RR intervaly) jednotlivých skupin testovaných kardiomyocytů. Při srovnání frekvence výbojů mezi testovanými klony Y4734C-RYR2 kardiomyocytů a WT-RYR2 kardiomyocyty byla patrná tendence Y4734C-RYR2 kardiomyocytů k nesignifikantně vyšším frekvencím výbojů. Po aplikaci 1 μM isoprenalinu došlo u všech testovaných buněk k nesignifikantnímu nárůstu frekvence výbojů. Analýza variability pseudo-RR intervalů pomocí Poincaré plotu poukazuje na větší variabilitu tohoto parametru v přítomnosti 1 μM isoprenalinu u klonů pacient-specifických Y4734C-RYR2 kardiomyocytů. Vzhledem k nízkým počtům doposud naměřených dat nelze prozatím provést ze získaných dat jednoznačný závěr. Kromě doměření relevantního vzorku dat u všech skupin kardiomyocytů bude dále probíhat i analýza tzv. FDP (z angl. *field potential duration*, analogie intervalu QT) a rovněž hodnocení elektrické aktivity pacient-specifických

kardiomyocytů za potenciálně proarytmogenních podmínek (např. zvýšená teplota, hypoa/nebo hyperkalémie, hyperkalcémie, hypomagnesémie).

Podpořeno z projektu č. NU22-02-00348 poskytnutého Ministerstvem zdravotnictví ČR a z projektu č. MUNI/A/1133/2021 specifického vysokoškolského výzkumu, který poskytlo Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

RyR-RyR coupling strength: calcium release site geometry vs. RyR gating

A. Zahradníková, B. Iaparov, I. Baglaeva, I. Zahradník

¹ *Department of Cellular Biophysics, Institute of Experimental Endocrinology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovakia.*

e-mail: alexandra.zahradnikova@savba.sk

Ryanodine receptors (RyRs) of cardiac myocytes cluster together at the sarcoplasmic reticulum membrane of dyadic junctions. RyR clusters operate as elementary calcium-releasing units – the calcium release sites (CRSs). At the commencement of systole, RyR clusters are activated by calcium ions incoming via the voltage-activated L-type calcium channels of the plasmalemma, and thus represent the core element of cardiac excitation-contraction coupling. The structural and functional characteristics of CRSs are affected by a variety of cardiac diseases. At diastole, the cytosolic $[Ca^{2+}]$ is very low and the frequency of RyR openings is extremely low. In many cardiac diseases, the RyR function is impaired and relates to excessive calcium leak from the sarcoplasmic reticulum. In some cases, RyR dysfunction was attributed to changes in the regulation of RyR gating by Mg^{2+} . Some cardiac diseases affect the calcium content of the SR, and a diminished luminal calcium concentration causes a decrease in the calcium gradient across the SR membrane and thus reduces the calcium release flux at CRSs.

To elucidate the effects of changes in CRS structure, RyR gating, and RyR calcium current on activation of calcium release events (CREs) in diastole, difficult to study experimentally *in situ*, we developed a mathematical model of calcium release sites of various RyR density [1] and a mathematical model of RyR gating (the MWC-Ca/Mg model) that incorporated interaction between the binding of Ca^{2+} or Mg^{2+} to the RyR activation site allosterically coupled to channel opening, as well as RyR closing by Mg^{2+} by binding to the RyR inhibition site [2]. The CRS models reflected the observed range of RyR distances and positions in clusters. The model of RyR gating was in good agreement with the observed dependence of RyR open probability, mean open time, and the rate of RyR activation on Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations.

The MWC-Ca/Mg RyR model was inserted into the model of the CRS, and the dependence of simulated CREs on the strength and kinetics of Mg^{2+} binding to RyRs, distances between RyRs, and the RyR calcium current amplitude were analysed. In simulated records of diastolic CRS activity, we have observed three types of calcium release events. Namely: calcium quarks, in which only a single RyR opens and does not activate neighbouring RyRs; calcium blips, in which a small fraction of RyRs is activated for a brief period; and calcium sparks, which lead to the opening of more than half of the RyR channels in the CRS and which would be observable by fluorescent Ca^{2+} dyes in confocal microscopy experiments. The relative occurrence of quarks, blips, and sparks followed a single dependence on the effective coupling strength, a parameter that jointly characterized RyR arrangement, Ca^{2+} flux, and RyR gating. The characteristics of CREs reacted sensitively and specifically to changes in any of the studied CRS parameters. Thus, placement of RyRs in the dyad, gating of RyR channels, and RyR

calcium current amplitude, which are dynamically affected by ligands, post-translational changes (e.g., phosphorylation) and pathologies (e.g., heart failure, RyR mutations) jointly determine the occurrence and amplitude of calcium release events and thus the extent of diastolic calcium leak.

Supported by grants SAV-TUBITAK JRP/2019/836/RyRinHeart, VEGA 2/0182/21, and projects IMTS: 313011V344 and IMTS: 313021BZC9, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

- [1] Iaparov B *et al.*, *J Gen Physiol.* 153: e202012685, 2021
- [2] Iaparov B *et al.*, *Front Physiol.* 12: 805956, 2022

Eternally mysterious CPVT - unexpected functions of RyR

A. Zahradníková jr

¹ *Department of Cellular Cardiology, Institute of Experimental Endocrinology, Biomedical Research Centre, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovakia.*

e-mail: ueensash@savba.sk

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a hereditary disease that presents as a life-threatening arrhythmia at a young age. Its typical feature is the absence of evident cardiac remodelling or baseline ECG changes and is generally caused by point mutations in genes regulating cardiomyocyte contraction by the release of calcium ions from the sarcoplasmic reticulum (SR). The most common form of CPVT is caused by mutations in the ryanodine receptor (RyR2). In this work, I analysed our recently published results [1] that uncovered a novel and unexpected property of RyR2.

The CPVT-associated R420Q mutation was of our interest for its location in the N-terminal domain (NTD) responsible for the tetramerization of RyR2 monomers, RyR-RyR interaction, and stabilization of the RyR2 central core domain (CCD). We have studied the effects of R420Q mutation in the murine knock-in (KI) model. The validity of the model was confirmed by the bidirectional ventricular tachycardia response to isoproterenol injection or emotional stress.

Our experiments in isolated field-stimulated ventricular cardiomyocytes from KI mice and their wildtype littermates (WT) have shown that both the systolic and the diastolic activity of RyR receptors are changed in KI versus WT cardiomyocytes, without any alterations in the calcium reuptake. The effect of cytosolic Ca^{2+} concentration on calcium release was not significantly different in WT and KI in permeabilized ventricular cardiomyocytes as well as in the heavy fraction of isolated membrane vesicles. Concurrent measurement of Ca^{2+} concentration in cytosol and SR lumen revealed activation of spontaneous Ca^{2+} waves at lower SR calcium filling, suggesting increased sensitivity of RyR activation on luminal Ca^{2+} in RyR2^{R420Q} compared to RyR2^{WT} mice.

Since this result was unexpected, we decided to explore other functions of the R420Q mutation. The rate of tetramerization of RyR N-terminal domains (NTD) was not different between WT and R420Q, but super-resolution imaging of immunolabeled RyRs in ventricular myocytes suggested differences in RyR2 clustering in dyadic structures. Electron microscopy revealed a smaller area of communication between the tubular and SR membranes and a lower number of RyR2 channels in the dyadic cleft, as well as an apparent swelling of the SR cisternae. Subsequent experiments did not confirm that this effect could explain the increased RyR2 basal activity and arrhythmogenic behaviour in KI myocytes. The co-immunoprecipitation analysis of RyR2 interaction with dyadic proteins revealed that, while the interaction of RyR2 with its regulators calsequestrin, triadin, and calmodulin, remained

unchanged in RyR2^{R420Q}, there was a significant decrease in the interaction between RyR2 and junctophilin, the structural dyadic protein.

The pivotal experiment that could explain the arrhythmogenic properties of the RyR^{R420Q} mutation was the co-expression of the RyR2 NTD with the RyR2 central domain (CD, residues 3529-4967). This revealed an increased interaction of CD with NTD-R420Q in comparison to NTD-WT.

In conclusion, these experiments revealed that the R420Q mutation stabilizes the open conformation of RyR2 channel, but importantly, it also reduces the structural integrity of dyads with possible consequences in other physiological as well as pathological processes.

Supported by grants SAV-TUBITAK JRP/2019/836/RyRinHeart and projects IMTS: 313011V344 and IMTS: 313021BZC9, co-financed by the European Regional Development Fund.

References

[1] Yin L, et al., *Circ Res.* 2021; 129: e35–e52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319094

Partneri podujatia



Sponzori podujatia

