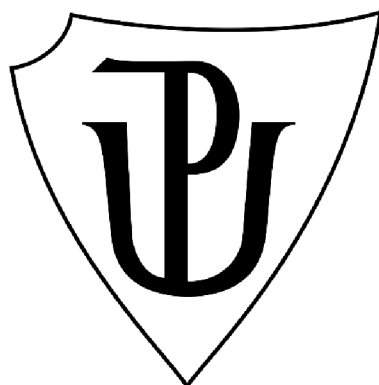


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Kardioprotektivní účinky polyfenolů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Eliška Remešová</b>
Studijní program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.</b>
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 13. 5. 2022

.....  
Podpis studenta

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. Mgr. Martinovi Modrianskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat panu Mgr. Zdeňkovi Dostálovi, Ph.D. zejména za výpomoc s provedením experimentů.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Remešová
Název práce	Kardioprotektivní účinky polyfenolů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Ischemicko-reperfuzní poškození vzniká během oběhové zástavy (ischemie), která způsobuje nedostatečné okysličení tkání. Po resuscitaci může vlivem reperfuze docházet k akumulaci metabolitů, zánětlivým mechanismům a buněčné smrti. Tento jev je pro svůj častý výskyt a závažnost cílem mnoha výzkumů. Polyfenol kvercetin řadíme mezi flavonoly a jedná se o biologicky aktivní přírodní sloučeninu s řadou příznivých účinků na lidský organismus. Jeho signální dráha a kardioprotektivní účinky však nejsou plně prozkoumány. Tato práce je zaměřena na porovnání signální dráhy apelinu, endogenního peptidu s prokázanými kardioprotektivními účinky a kvercetinu. Experimenty jsou zaměřeny na porovnání účinku kvercetinu na expresi apelinu-13 v buněčné linii H9c2 a stanovení vlivu kvercetinu na fosforylaci kinas ERK1/2 a AKT.</p>
Klíčová slova	Ischemicko-reperfuzní poškození, kardioprotekce, apelin, kvercetin, ERK1/2, AKT
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Remešová
Title	Cardioprotective effects of polyphenols
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of medical chemistry and biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Ischaemia-reperfusion injury occurs during circulatory arrest, which causes insufficient tissue oxygenation (ischaemia). After resuscitation, accumulation of metabolites, inflammatory mechanisms and cell death may occur due to reperfusion. Due to its frequent occurrence and seriousness, this phenomenon is the goal of many researches. Polyphenol quercetin belongs to the group of flavonols and it is a biologically active natural compound with a number of beneficial effects on the human body. However, its signaling pathway and cardioprotective effects have not been fully investigated. This work is focused on the comparison of the signaling pathway of apelin, an endogenous peptide with proven cardioprotective effects and quercetin. Experiments are aimed at comparing the effect of quercetin on apelin-13 expression in the H9c2 cell line and determining the effect of quercetin on the phosphorylation of ERK1/2 and AKT kinases.</p>
Keywords	Ischaemia-reperfusion injury, cardioprotection, apelin, quercetin, ERK1/2, AKT
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
	2.1 Ischemicko-reperfuzní poškození srdce.....	2
	2.1.1 Dysfunkce myokardu .....	3
	2.1.2 Experimentální metody studia ischemicko-reperfuzního poškození.....	4
	2.2 Kyslíková homeostáza .....	6
	2.2.1 Hypoxie .....	7
	2.2.2 Ochrana kardiomyocytů při hypoxii.....	7
	2.1 Polyfenoly .....	11
	2.1.1 Kardioprotektivní účinky polyfenolů .....	12
	2.1.2 Kvercetin .....	13
	2.2 Apelin.....	15
	2.2.1 Apelinový receptor .....	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
	3.1 Přístrojové vybavení .....	18
	3.2 Materiál .....	18
	3.2.1 Biologický materiál .....	18
	3.2.2 Kultivační médium .....	19
	3.2.3 Protilátky .....	19
	3.3 Metody .....	19
	3.3.1 Stanovení cytotoxicity kvercetinu .....	19
	3.3.2 Stanovení účinku kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru 22	
	3.3.3 Zhodnocení fosforylace kinas v závislosti na čase.....	22
	3.3.4 Lýza buněk .....	22
	3.3.5 Stanovení koncentrace proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové .....	23
	3.3.6 SDS-PAGE elektroforéza.....	23
	3.3.7 Western blot .....	24
	3.3.8 Imunodetekce .....	24
	3.3.9 Zpracování dat .....	25
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	26
	4.1 Stanovení cytotoxicity kvercetinu .....	26
	4.1.1 Neutrální červeň .....	26
	4.1.2 MTT test.....	27
	4.2 Stanovení účinku koncentrace kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru .....	28

	4.3 Zhodnocení fosforylace kinas v závislosti na čase .....	29
	4.3.1 ERK1/2 .....	29
	4.3.2 AKT .....	31
5	ZÁVĚR.....	32
6	LITERATURA .....	33
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	40

## **Cíle práce**

Cílem teoretické části práce je přehled znalostí o ischemicko-reperfuzním poškození a možném zapojení kvercetinu do regulace jedné ze signálních drah, kterou spouští apelin jako přirozený kardioprotektivní efektor.

Cílem experimentální části práce je posoudit vliv polyfenolu kvercetinu na signální dráhy ERK a AKT v porovnání s přirozeným aktivátorem apelinem-13. Zásadní metodou pro vypracování je sledování *in vitro* aktivačních/deaktivačních mechanismů (imunodetekce fosforylovaných proteinů) s využitím buněčných kultur.



# 1 ÚVOD

Ischemicko-reperfuzní poškození řadíme mezi nejčastější choroby po celém světě a pro svou závažnost se stalo cílem mnoha výzkumů. V organismu dochází k ischemické fázi vlivem oběhové zástavy, která vede k zastavení cirkulace krve tkání a následnému nedostatečnému prokysličení neboli hypoxii. Tento stav, není-li krevní oběh obnoven, může vést k fatálnímu poškození mozkové i srdeční tkáně. Po obnovení srdečního oběhu nastává fáze reperfuze, kdy dochází v odumřelé či poškozené tkáni k vyplavování akumulovaných metabolitů do krevního řečiště, což vede k indukci zánětlivých mechanismů a nepříznivých oxidativních procesů. To má za následek poškození srdečních i jiných buněk, jako jsou například fibroblasty, imunitní buňky, buňky endotelu apod.

Kvercetin řadíme mezi široce rozšířené biologicky aktivní flavonoidní sloučeniny. Chemickou strukturou jej řadíme mezi flavonoly a v přírodě jej lze nalézt v řadě druhů ovoce i zeleniny i v jejich derivátech, jako je například víno a med. Je také součástí rostlin s prokázanými léčivými účinky, například v jinanu dvoulaločném známém jako *Ginkgo biloba* či v třezalce tečkované (Mitchell et al., 2007). Jeho účinky na lidské zdraví jsou zkoumány již řadu let, stal se proto významným doplňkem stravy, podávaným nejčastěji ve formě tablet. Příznivé účinky kvercetinu spočívají zejména ve vychytávání volných kyslíkových radikálů či ve snižování rizika trombózy a alergických reakcí. Inhibuje také syntézu enzymů podílejících se na vzniku zánětů (Kim et al., 1998). Bylo též prokázáno snížení apoptózy v kvercetinem ošetřených kardiomyocytech (Chen et al., 2013).

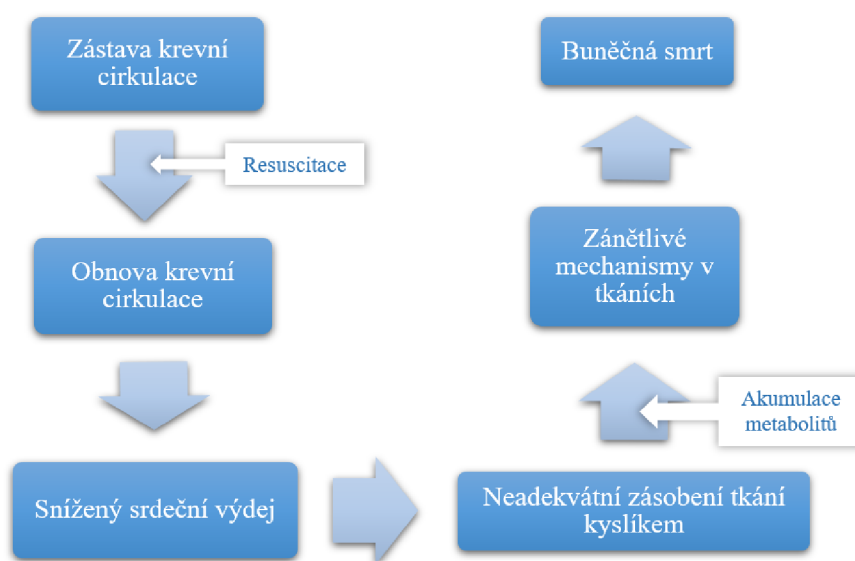
Vliv kvercetinu na srdeční tkáň však ještě není plně prozkoumán, stejně jako signální dráhy, které v buňce může ovlivňovat. V bakalářské práci se proto věnuji porovnání jeho účinků se signální drahou apelinu-13, což je endogenní peptid s prokázanými kardioprotektivními účinky. Apelin-13 vstupuje do buňky přes transmembránový apelinový receptor, což vede k aktivaci apelinergního systému. Jednou ze signálních drah apelinu-13 je dráha  $G\alpha_i$  vedoucí ke spuštění mitogenní signální dráhy kinas ERK a protein kinasy B (Chapman et al., 2014; Masri et al., 2006). V rámci experimentální části jsou proto sledovány účinky kvercetinu na fosforylaci kinas ERK1/2 a AKT v porovnání s apelinem-13. Jako *in vitro* model slouží potkaní kardiomyocyty H9c2.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Ischemicko-reperfuzní poškození srdce

Ischemické poškození srdce (Obr. 1) řadíme mezi nejčastější příčiny úmrtí po celém světě. Je zodpovědné za přibližně více jak jednu třetinu úmrtí u osob starších 35 let (Abella & Becker, 2002) a ve Spojených státech k němu dochází téměř u poloviny mužů a jedné třetiny žen (Lloyd-Jones et al., 1999). Nejběžnější formou ischemických onemocnění je infarkt myokardu, což je akutní stav způsobený nekrózou v části srdečního svalu v důsledku nedostatečného průtoku krve (Goldstein et al., 2000; Gunata & Parlakpinar, 2021).

Je známo, že k ischemii dochází v důsledku několika patofyziologických mechanismů během oběhové zástavy. Během ischemie dochází ke snížení či úplnému zastavení přítoku krve do tkáně, což vede k jejímu nedostatečnému prokysličení (hypoxii) a může být následováno i srdeční zástavou. K záchraně života je v této situaci nezbytná akutní resuscitace k obnovení krevní cirkulace. Ischemie však během oběhové zástavy způsobuje celou řadu obtíží, jež postihnou celý organismus a mohou vyvolat až fatální poškození, nazývané „postresuscitační nemoc“ nebo též „post cardiac arrest syndrome“ (PCAS), jež může mít za následek poškození mozkové i srdeční tkáně a jiných orgánů (Kang, 2019). Na míru poškození má velký vliv stav organismu a délka trvání ischemie.



Obr. 1 Schéma průběhu ischemicko-reperfuzního poškození (vytvořeno v programu MS Word)

Pojem reperfuze zahrnuje reakci organismu na obnovení krevní cirkulace. Obnovení průtoku krve během ischemie sice může zabránit nevratnému poškození buněk vlivem nedostatečného okysličení, samotná reperfuze však může vést k ještě závažnějšímu poškození (Nolan et al., 2008). V odumřelé tkáni dochází po obnově oběhu k vyplavování akumulovaných škodlivých metabolitů do krevního řečiště, což vede ke spuštění zánětlivých mechanismů. To má za následek poškození kardiomyocytů, ale ovlivňuje i další buňky jako jsou fibroblasty, imunitní buňky, buňky endotelu a hladké svaloviny. Tyto procesy nebývají tkáňově specifické a patofyziologické pochody během ischemicko-reperfuzního poškození mohou být v různých tkáních do jisté míry podobné. Jednou z nejcitlivějších tkání pro ischemicko-reperfuzní poškození je však mozek, kde dochází k akumulaci škodlivých neurotransmiterů a vzniku edému, a také srdeční tkáň (Carden & Granger, 2000; Ošťádal, 2009). Oxidační procesy, k nimž dochází během reperfuze srdeční tkáně, navíc snižují tvorbu oxidu dusnatého (NO) poškozením intracelulárních signálních drah a mitochondriálních pórů. Tímto jsou limitovány kardioprotektivní účinky NO zprostředkované indukovatelnou izoformou L-arginin, NADPH:kyslíkové oxidoreduktasy (syntasa oxidu dusnatého, NOS, EC 1.14.13.39), která je na základě mnoha studií považována za významný protein podílející se na ochraně tkání během ischemicko-reperfuzního poškození (Jones & Bolli, 2006).

### **2.1.1 Dysfunkce myokardu**

Srdeční svalovina, zvaná též jako myokard, je jednou ze srdečních vrstev, které se nacházejí mezi epikardem a endokardem. Pro správné fungování tohoto svalu je nezbytné dostatečné krevní zásobení tkáně, zajištěné věnčitými tepnami obklopujícími srdce. Vlivem nedostatečného zásobení srdeční svaloviny kyslíkem či metabolity může dojít k výraznému poškození, jež může mít za následek různá zánětlivá i nezáneťlivá onemocnění myokardu, srdeční arytmii, či v nejhorším případě i smrt. Obvykle v podobných případech dochází nejprve k srdeční zástavě, která uvede tělo do výrazného šokového stavu, kdy je zastaven přívod kyslíku a metabolických substrátů. Ke zlepšení stavu organismu a obnovení krevního oběhu je proto nezbytná resuscitace. Minutový srdeční výdej však i po resuscitaci zůstává stále výrazně nižší, než je pro běžnou funkci myokardu potřeba a pokračuje proto neadekvátní zásobení tkání kyslíkem (Laver et al. 2004), což vede k dalšímu srdečnímu poškození.

Vlivem srdeční zástavy dochází k výskytu ischemických chorob srdečních (ICHS). Tyto choroby mají mnoho forem, řadíme zde jak ischemicko-reperfuzní poškození, tak

i infarkt myokardu (Haluzíková a Jabůrková, 2021). K výskytu infarktu dochází v důsledku dlouhodobého nedostatečného zásobení srdeční svaloviny krví (Vojáček et al. 2013). Závažnost tohoto onemocnění je velmi vysoká, vlivem nedokrvění srdečního svalu bývá pacient ohrožen na životě. Krevní recirkulaci je poté nutno obnovit do dvou hodin od prvních potíží, po delším časovém intervalu již dochází k nekróze tkáně a závažným komplikacím. Česká republika je ve světových žebříčcích výskytu akutního infarktu myokardu na prvních místech. Ročně se úmrtnost pohybuje v řádu tisíců (Šimek, 2015).

Jednou z méně závažných poruch srdeční svaloviny je bezpochyby srdeční arytmie neboli porucha srdečního rytmu. Tato porucha s velmi častým výskytem je obvykle bez výraznějších příznaků, v jistých případech však může přinést řadu obtíží. K výskytu poruch srdečního rytmu může dojít i následkem srdeční zástavy a nedostatečného zásobení tkání kyslíkem. To poté vede i k poškození srdečních buněk a spuštění zánětlivé reakce, čímž se navýší rizika infekce či orgánového selhání. Výrazně ohroženi mohou být pacienti po prodělání infarktu myokardu. (Gunata a Parlakpinar, 2021)

### **2.1.2 Experimentální metody studia ischemicko-reperfuzního poškození**

Vzhledem k vysoké úmrtnosti a závažnosti je ischemicko-reperfuzní poškození srdce předmětem mnoha vědeckých výzkumů s cílem rozvíjet postupy a metody, jež sníží mortalitu i rizikovost tohoto stavu. V experimentálních studiích jsou jako živé modely pro snadný chov, nízkou cenu a rychlé množení často využíváni hlodavci. Hlodavci jsou také nejčastějšími modely v oblasti molekulární biologie a genetiky, která je zaměřena na studium funkce srdeční tkáně při manipulaci s genomem. Kvůli rozdílu v tepové frekvenci a velikosti srdce však mohou být získané poznatky obtížně aplikovány na jiné savce či člověka. Mezi větší modely řadíme zejména psy, primáty a prasata. Pro studium *in vitro* jsou také využívány jako modelový systém buněčné kultury, které nám umožňují hodnotit buněčné odpovědi na použítá farmakologická činidla.

Ke studiu ischemicko-reperfuzního poškození byla vyvinuta řada *in vivo* metod, jako je například omráčení (Bolli, 1990), hibernace a kondicionování myokardu (Kloner et al., 1998). Velmi využívanou a zkoumanou je pro své příznivé účinky metoda kondicionování srdce, jež byla objevena v roce 1986 (Murry et al., 1986) a spočívá ve vystavení organismu krátkým cyklům ischemie a reperfuze vedoucí k ochraně

myokardu při srdeční příhodě (Lotz et al., 2021; Roth et al., 2021). Mezi další metody patří *ex vivo* metody, kdy je srdce vyjmuto z organismu, např. Langendorffova metoda, vyvinuta koncem 19. století a stále využívaná (Bell et al., 2011; Skrzypiec-Spring et al., 2007), či tzv. „running heart model“, který zachovává průtok perfuzátu běžným způsobem cirkulace, čímž napodobuje experimentální metody *in vivo* (Neely et al., 1973).

### 2.1.2.1 HL-1 buněčná linie

Ke studiu struktury a funkce srdečního svalu *in vitro* se využívá mnoho modelových buněčných linií. Radíme zde buněčnou linii HL-1, izolovanou nejčastěji z embryonálních či neonatálních potkaních kardiomyocytů (White et al., 2004). HL-1 je proliferující buněčná linie srdeční svaloviny, která zajišťuje srdeční stah, a zachovává morfologické, biochemické a elektrofyziologické vlastnosti kardiomyocytů (Claycomb et al., 1998). Na základě svých vlastností je tato linie užitečná i jako modelový systém studia mnoha patofyziologických stavů organismu, například hyperglykémie či hypoxie. Zároveň je také užitečným nástrojem pro studium buněčných signálních drah a receptorů v kardiomyocytech. Kardiomyocyty reagují na různé stresové podněty produkcí peptidového hormonu adrenomedullinu, jenž se podílí na prevenci rozvoje patologických stavů a srdečního selhání, a zároveň zvyšuje toleranci buněk vůči oxidačnímu stresu či hypoxickému poškození, čímž má pozitivní vliv na různá kardiovaskulární onemocnění. V reakci na hypoxii indukuje buněčná linie HL-1 zvýšenou produkci faktoru HIF-1, což vede ke zvýšené expresi genu pro adrenomedullin. Buňky HL-1 exprimují také adrenergní receptory, jež reagují na řadu buněčných podnětů (McWhinney et al., 2000). Bylo též prokázáno, že tato buněčná linie může být užitečná ke studiu efektu opioidů na srdeční tkáň, neboť exprimuje  $\delta$ -opioidní receptory, jejichž stimulace může mít prospěšný účinek během ischemicko-reperfuzního poškození (McPherson & Yao, 2001).

Buněčná linie HL-1 byla charakterizována použitím různých mikroskopických, imunohistochemických a farmakologických metod. Na základě studií bylo usouzeno, že ve své struktuře obsahuje vysoce organizované sarkomery, jež jsou nezbytné pro zprostředkování kontrakce. Analýza jejich genové exprese poukázala na to, že projevují podobný model genové exprese, jako dospělé kardiomyocyty. Buňky také spontánně depolarizují a exprimují iontové kanály pro generování akčních potenciálů, jež jsou charakteristické pro primární kardiomyocyty. Ke dlouhodobější kultivaci nad 72 hodin

vyžaduje buněčná linie HL-1 fibronektin-želatinový substrát a speciální růstové médium. (White et al., 2004)

### **2.1.2.2 H9c2 buněčná linie**

H9c2 buňky jsou permanentní buněčnou linií, která byla odvozena mnohonásobným pasážováním embryonálních buněk z BD1X potkaní srdeční tkáně v roce 1970 (Kimes & Brandt, 1976). Buněčná linie H9c2 nachází díky svým morfologickým vlastnostem připomínajícím nezralé embryonální kardiomyocyty bohaté využití v *in vitro* výzkumu mechanismů srdečních chorob, reakcí srdeční tkáně na chemické sloučeniny a také k hodnocení toxických účinků protinádorových léčiv.

Embryonální kardiomyocyty H9c2 dobře proliferují při *in vitro* kultivaci za teploty 37 °C v inkubátoru, mohou však být kultivovány pouze po omezený počet pasáží. Stárnutí buněk může mít vliv na opakovatelnost výsledků studie. Při studiu vlivu toxických činidel na buněčnou linii H9c2 v závislosti na počtu buněčných pasáží bylo prokázáno, že vyšší množství pasáží vede ke zvýšené citlivosti buněk na stresové podmínky a tím i různorodým výsledkům a náročnější opakovatelnosti experimentů při použití buněk s rozdílnou úrovní pasáží (Witek et al., 2016).

## **2.2 Kyslíková homeostáza**

Kyslíková homeostáza má velký význam pro udržení základních životních funkcí. Buňky potřebují nepřetržitý příjem kyslíku po celou dobu svého života. Lidské tělo je schopno udržet zásoby kyslíku, ne však po dobu delší než pět minut. Tyto zásoby jsou z velké části ve formě kyslíku navázaného na hemoglobin v krevním oběhu a volně v dýchací soustavě, zlomek je pak navázán na myoglobin ve svalech. Primárně je poté kyslík spotřebován aerobním metabolismem mitochondrií.

V průběhu ischemie nebo následné reperfúze dochází důsledkem změn zásobení tkání kyslíkem k metabolickým změnám, jež vedou k přechodu z aerobní na anaerobní glykolýzu. Důsledkem snížené produkce adenosintrifosfátu (ATP) dojde k jeho syntéze ze dvou molekul ADP, což vede ke vzniku ATP a AMP. AMP je odstraňováno přeměnou na hypoxantin, který však v srdeční tkáni nelze odbourat, proto se zde hromadí a může vést k následnému poškození. Dochází také k poklesu energetických zdrojů, tím je snížena funkčnost buněčných procesů závislých na ATP, což vede k akumulaci vody, sodných a vápenatých iontů v buňce. Zároveň je také hypoxantin produkovaný katabolismem v nukleotidech během ischemie přeměňován na reaktivní formy kyslíku

(ROS), jež mají za následek poškození během reperfúze (Liu & Yenari, 2007). Lidské srdeční buňky mají stejně jako buňky jiných savců endogenní enzymy, jež zachycují volné kyslíkové radikály. Radikály vzniklé během ischemicko-reperfuzního poškození však nemohou být těmito enzymy adekvátně odstraněny. Tento oxidativní stres pak snižuje aktivitu Na/K ATPasy a Ca<sup>2+</sup> ATPasy a zároveň způsobuje peroxidaci lipidů, což má negativní vliv na buněčnou integritu (Gunata & Parlakpinar, 2021; Maltepe & Saugstad, 2009).

### **2.2.1 Hypoxie**

Termín hypoxie označuje stav nedostatku kyslíku ve tkáních. K tomu může docházet zamezením přívodu kyslíku cílovým buňkám a při poruchách krevního oběhu. Jedná se přitom o běžný patofyziologický znak srdečních chorob včetně cukrovky. Zdravý organismus reaguje na tento stav několika mechanismy, jež mají za cíl tento nedostatek kompenzovat např. zvýšením počtu erytrocytů nebo vyšší plicní ventilací. Tyto odpovědi jsou v organismu zprostředkovány buněčnými signalizačními drahami a jejich komponenty, jako například MAPKK-aktivovanými ATP:protein fosfotransferasami (extracelulární signálem regulované kinasy, ERK, EC 2.7.11.24) nebo nespecifickou ATP:protein fosfotransferasou (protein kinasa B, PKB, AKT, EC 2.7.11.1) (Miura et al., 2010). Obě skupiny kinas regulují expresi transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$ , jenž vyvolává procesy vedoucí k ochraně buněk (Tekin et al., 2010). Po vyčerpání těchto mechanismů dochází postupně ke smrti buněk a posléze i celého organismu (Karimova & Pinsky, 2001). Přívod kyslíku je v takových situacích regulován dle citlivosti tkání na kyslíkový deficit – méně náročným tkáním jako je kůže či svaly je přívod kyslíku omezen a preferována bude tkáň mozková, která reaguje na kyslíkový deficit ztrátou vědomí již po několika málo sekundách (Kapounková 2013).

### **2.2.2 Ochrana kardiomyocytů při hypoxii**

V reakci na hypoxii kardiomyocyty aktivují mechanismy, které jim umožňují tolerovat stav nízkého množství kyslíku. Tato reakce je zprostředkována ERK a PKB. Aktivace vede ke zvýšené expresi faktoru HIF-1, který podporuje procesy k ochraně buňky – indukuje glykolytickou dráhu ke zvýšení produkce ATP a snižuje množství toxických reaktivních forem kyslíku, což má za následek sníženou indukci buněčné smrti (Semenza, 1998; Shahzad et al., 2013).

### 2.2.2.1 Role MAP kinas

Proteinové kinasy hrají velkou roli v regulačních drahách organismu a účastní se velkého množství buněčných pochodů (Hunter, 2000). Mitogenem aktivované (MAP) kinasy se nachází pouze v eukaryotech. Vyskytují se u všech zvířat, hub i rostlin a můžeme je nalézt také v řadě jednobuněčných eukaryot. Skládají se z cytoplasmatických protein serinových/threoninových kinas, které se podílejí na transdukcii signálu z povrchu do vnitřku buňky (Manning et al., 2002).

MAP kinasy katalyzují fosforylaci mnoha proteinů včetně transkripčních faktorů, fosfatas a dalších funkčních proteinů. V základní formě nejsou katalyticky aktivní, k jejich aktivaci je zapotřebí několikastupňová fosforylační kaskáda, kdy dochází k přenosu  $\text{PO}_3^{2-}$  skupiny z předchozí kinasy na aktivační místo následující. Aktivační místo zpravidla obsahuje charakteristický T-x-Y (threonin-x-tyrosin) motiv tří aminokyselin a k aktivaci je nutná fosforylace jak threoninových, tak i tyrosinových zbytků. MAP kinasy je možné také inaktivovat, a to prostřednictvím MAP kinasových fosfatas (MKPs). Tyto enzymy jsou schopny hydrolyzovat fosfát jak z fosfotyrosinových, tak i fosfothreoninových zbytků.

U savců můžeme nalézt skupinu extracelulárních signálem regulovaných kinas, dále skupinu p38 kinas a c-Jun N-terminálních kinas, které jsou taktéž známé jako stresem aktivované proteinové kinasy neboli SAPK (Roskoski, 2012).

### 2.2.2.2 ERK1/2 kinasa

Extracelulární signálem regulovaná kinasa je skupina enzymů řadící se do rodiny mitogenem aktivovaných proteinových kinas. Signální dráha ERK1/2 je pravděpodobně jedním z nejlépe charakterizovaných MAPK systémů.

ERK1 a ERK2 kinasy jsou aktivovány skrze Ras/Raf/MEK fosforylační kaskádu, která je součástí mnoha buněčných procesů, jako je buněčná adheze, migrace, diferenciacce, proliferace, transkripce, metabolismus i přežití buňky v ohrožujících situacích (Wortzel & Seger, 2011). Aktivace heterotrimerního G proteinu Ras pomocí tyrosinkinasevého receptoru vede k aktivaci kinasy Raf, která aktivuje MEK. MEK fosforyluje ERK1 a ERK2 v místě threoninu 202/185 a tyrosinu 204/187 a tím dochází k jejich aktivaci. Tento proces je však reverzibilní. Defosforylace ERK1/2 je řízena tyrosin či threonin-specifickými fosfatasami, či fosfatasami specifickými pro oba tyto proteiny.



Raf kinasa i skupina MEK proteinů mají výraznou substrátovou specifitu na rozdíl od ERK1/2, jež katalyzují řadu cytoplazmatických i jaderných substrátů včetně regulačních molekul a transkripčních faktorů. Při katalýze však preferují fosforylaci substrátů obsahujících Pro-X-Ser/Thr-Pro sekvence.

Je známo několik ERK izoenzymů, nejvíce studovány jsou však formy ERK1 a ERK2. Obě tyto kinasy mají z 84 % identickou sekvenci. Stejně jako zbytek skupiny těchto kinas obsahují unikátní N- a C-terminální konce, jež zajišťují signální specifitu. Lidská forma ERK1 se skládá z 360 aminokyselinových zbytků, u ERK2 je to 379. Všechny známé buněčné stimulanty dráhy ERK1/2 vedou k paralelní aktivaci obou kinas a i jejich funkce jsou velmi podobné (Lloyd, 2006).

ERK1/2 patří mezi komponenty buněčné signalizace, jež odpovídá i na nízké množství kyslíku v organismu. Při hypoxii dochází k fosforylaci cytosolických ERK1/2 pomocí MEK1, což vede k jejich aktivaci. Jsou přitom přemístěny z cytosolu do buněčného jádra, kde spolu s protein kinasou B regulují expresi transkripčního faktoru HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2001). Tento faktor zprostředkovává základní reakce savců na snížené množství kyslíku a v případě ohrožení vyvolává procesy vedoucí k ochraně buňky (Semenza, 1998). Jeho působením dochází ke zvýšení intracelulárních hladin ATP a snížení reaktivních forem kyslíku, což vede k redukci buněčné smrti (Minet et al., 2000; Roskoski, 2012).

### **2.2.2.3 Protein kinasa B**

Protein kinasa B (AKT, PKB) je souhrnný název pro skupinu tří serin-threoninových kinas, kterou můžeme nalézt v genomu každého eukaryotického organismu a má nezastupitelné místo v řadě buněčných procesů jako je proliferace, metabolismus sacharidů či syntéza proteinů. Popsána byla poprvé v roce 1987 Stephenem Staalem při studiu transformujících virů, kdy poukázal na její roli v onkogenezi. Ovlivňuje regulaci mnoha buněčných procesů, například buněčný růst, signalizaci přes inzulinové receptory růstových faktorů u savců či nádorovou transformaci.

AKT řadíme do skupiny AGC kinas, do níž spadá více než 60 kinas lidského genomu a dále se klasifikuje do 14 podskupin – PDK1, AKT/PKB, SGK, PKA, PKG, PKC, PKN/PRK, RSK, NDR, MAST, YANK, DMPK, GRK a SGK494. AGC kinasy se také nachází v řadě jiných eukaryot, nevyjímaje původce lidských infekčních chorob a díky své struktuře a úloze v organismu jsou cílem řady výzkumů. Klíčem k regulaci těchto kinas je tzv. PIF-kapsa, která slouží jako dokovací místo pro substráty PDK1 a podílí se

také na fosforylaci a alosterické regulaci N-terminálních domén kinas PKC a PKN/PRK. Hlavní kinasou je PDK1, která je zodpovědná za fosforylaci aktivačního místa, čímž se podílí na aktivaci 23 kinas včetně AKT (Leroux et al., 2018).

U člověka se AKT vyskytuje ve třech izoformách, které jsou produkty tří různých genů (AKT1, AKT2, AKT3). Jejich sekvenční struktura je téměř identická, jsou však rozdílné svou tkáňově-specifickou expresí i funkcí. AKT1 je vysoce exprimovaná ve všech orgánech, zatímco výskyt AKT2 je typický především pro inzulin senzitivní tkáň, mezi které patří tuková tkáň, kosterní svalstvo a játra. K expresi AKT3 nejvíce dochází ve varlatech a mozku (Roskoski, 2012; Suralová, 2018).

#### **2.2.2.4 Adenin-nukleotid translokasa**

Adenin-nukleotid translokasa (ANT) je nejčastěji se vyskytující skupina proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně. Usnadňuje výměnu ADP z intermembránového prostoru do matrice a ATP z mitochondriální matrice do intermembránového prostoru (Klingenberg, 2008). ANT také hraje významnou roli v přežití buňky ovlivněním permeability mitochondriálních pórů, což bylo potvrzeno v roce 2021 při studiu molekulárních mechanismů mitochondriální permeability pomocí genetické manipulace s F-ATP syntasou (Carrer et al., 2021).

ANT1 vzniká především v srdci, kosterním svalstvu a v mozku. Mutace a snížená exprese této translokasy jsou spojeny se závažnými chorobami srdečního svalu. Její nadměrná exprese naopak stav zlepšuje a snižuje indukci apoptózy. Zároveň usnadňuje výměnu ADP a ATP přes mitochondriální membránu, čímž udržuje aktivitu dýchacího řetězce. To má také vliv na důležité signální kinasy (ERK1/2 a AKT) chránící buňky během hypoxie. Nadměrná exprese zvýšila míru přežití hypoxických kardiomyocytů, což souvisí se stabilizací potenciálu mitochondriální membrány, potlačením aktivity kaspasy 3 a snížením fragmentace DNA.

ANT2 se nachází především v orgánech schopných regenerace jako jsou játra, slezina či ledviny, mohou však vznikat i v orgánech primárně tvořících ANT1. (Winter et al., 2016)

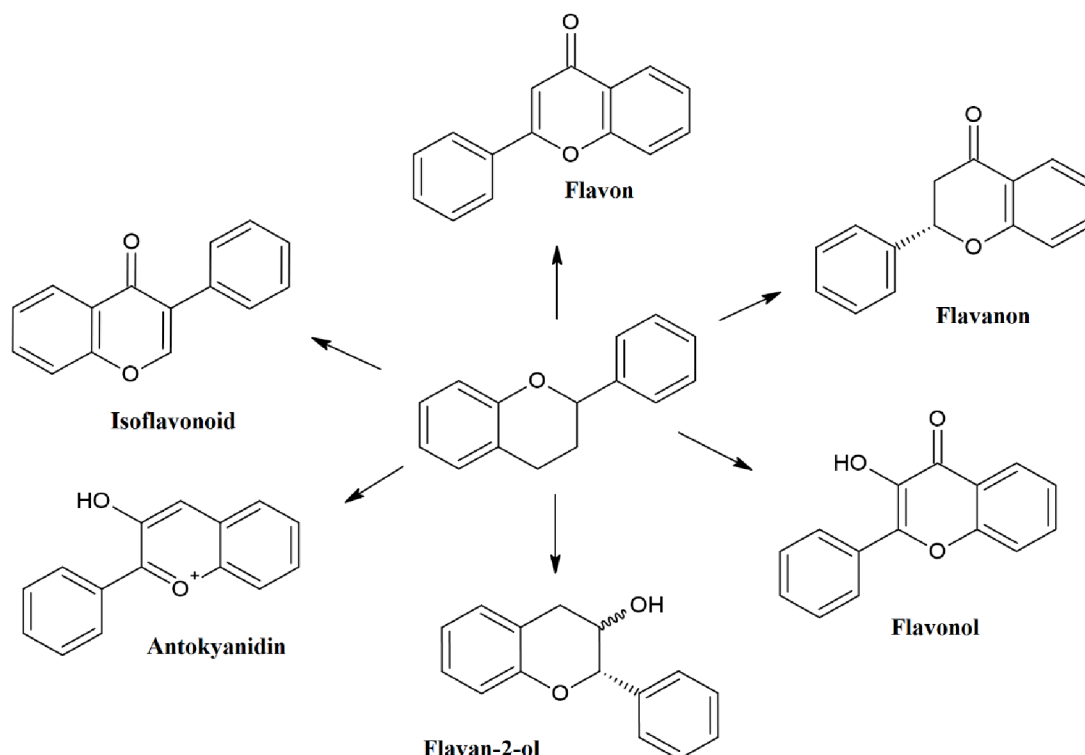
#### **2.2.2.5 Hypoxií inducibilní faktor 1**

Hypoxií inducibilní faktor 1 (HIF-1) je transkripční faktor klíčový pro regulaci odpovědi organismu na nedostatečné zásobení tkání kyslíkem. Jedná se o heterodimerní protein

skládající se ze dvou podjednotek – kyslíkem regulované podjednotky HIF-1 $\alpha$  (či jejích paralogů HIF-2 $\alpha$  a HIF-3 $\alpha$ ) a podjednotky HIF-1 $\beta$ , zvanou též jaderný translokátor aryluhlovodíkového receptoru (ARNT). Během normoxie je cytosolická podjednotka HIF-1 $\alpha$  degradovaná ubiquitin-proteasomovou cestou, což je zprostředkováno degradační doménou závislou na kyslíku (ODDD), během hypoxie je však její degradace inhibována (Salceda & Caro, 1997). Protein je translokován do jádra, kde dochází k dimerizaci s jaderným proteinem HIF-1 $\beta$ , čímž dojde ke vzniku kompletního HIF-1 faktoru. HIF-1 se následně váže na cis-elementy reagující na hypoxii (HRE), které se nacházejí v promotorech nebo zesilovačích (Minet et al., 2000).

## 2.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou různorodou skupinou více než 8 000 chemických sloučenin obsažených zejména v ovoci, zelenině, obilovinách i jejich derivátech (např. čokoláda, džusy, olivový olej, víno, čaj). Jedná se o produkty sekundárního metabolismu rostlin a mohou vycházet z acetátové či šikimátové syntetické dráhy. Vzhledem ke svému velkému potenciálu v potravinářství i v medicíně jsou nyní polyfenoly předmětem řady studií. Obecně jsou polyfenoly klasifikovány na základě strukturních vlastností na flavonoidní a neflavonoidní sloučeniny (Obr. 2).



Obr. 2 Příklady chemických struktur flavonoidních sloučenin (vytvořeno v programu ChemSketch)

Flavonoidní polyfenoly jsou složeny ze dvou aromatických kruhů, jež jsou vázány třemi atomy uhlíku a tvoří heterocyklický kruh s kyslíkem. Jsou významnou součástí lidské potravy a vykazují řadu příznivých účinků na organismus, např. jako antioxidanty.

Řadíme zde například flavonoly (kvercetin, kaempferol), jejichž biosyntéza je stimulovaná dopadem světla na rostlinná pletiva, a flavanony, které se vyskytují zejména v citrusových plodech. Na základě *in vivo* i *in vitro* studií bylo prokázáno, že flavonoidy z červených hroznů mohou mít příznivý vliv na střevní bakterie a trávení (Magrone et al., 2020). Jedná se o významná přírodní barviva, antokyany a antokyanidiny, se širokou barevnou škálou od modré přes fialovou až po červenou. Pokud svou strukturou polyfenoly nespádají do skupiny flavonoidů, řadíme je mezi neflavonoidní látky. Může se jednat o jednoduché fenoly či benzochinony, jež se uplatňují zejména v potravinářství jako produkty činnosti metabolismu mikroorganismů či jako silice a vonné látky. Dále do této skupiny spadá řada fenolových kyselin, např. kyselina benzoová a skořicová. Spektrum využití těchto kyselin je obrovské, svůj účel nachází zejména v potravinářství. Sodná sůl kyseliny benzoové je hojně využívaná jako protiplísňový konzervant kyselých potravin (Krebs et al., 1983).

Význam polyfenolů v rostlinách spočívá zejména v ochraně před nepříznivými vlivy prostředí jako je UV záření, vysoké teploty apod. Studie v oblasti Středomoří prokázala, že olivy a hrozny zvýšily produkci polyfenolů při obraně vůči stresovým podmínkám (Servili et al., 2004). Byl prokázán také jejich antioxidační a protizánětlivý účinek, mohou mít příznivý vliv na léčbu Alzheimerovy choroby, rakoviny, aterosklerózy apod., jsou proto součástí mnoha kosmetických, farmaceutických i medicínálních aplikací (Panche et al. 2016). Ve výživě se s nimi můžeme setkat v podobě doplňků stravy.

### **2.1.1 Kardioprotektivní účinky polyfenolů**

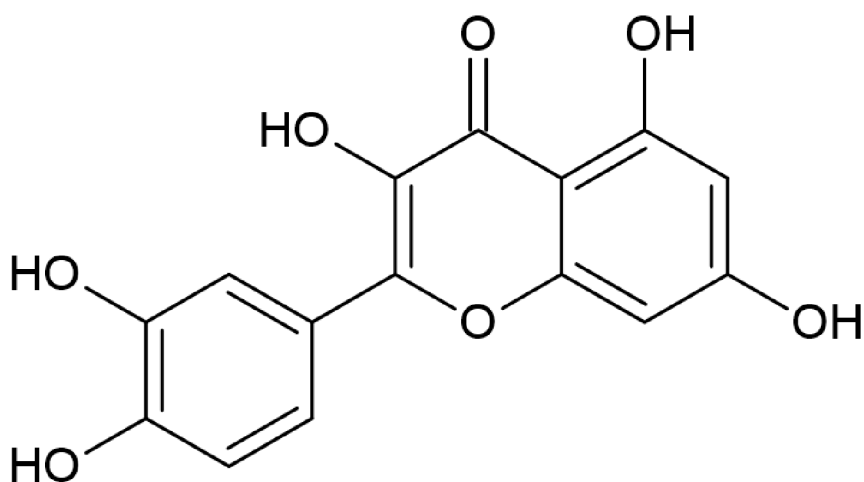
Na základě studií týkajících se pozitivních účinků polyfenolů na lidský organismus se předmětem zkoumání staly také jejich kardioprotektivní účinky. Polyfenoly, především flavonoly a antokyaniny, jsou důležitou složkou hroznové šťávy, z níž se poté získává víno. Bylo prokázáno, že mírná konzumace alkoholických nápojů a zejména červeného vína brzdí vývoj aterosklerózy a podílí se na prevenci a ochraně při ischemické chorobě srdeční. Během studie zabývající se absorpcí antokyaninů z potravy krys bylo zjištěno, že při dlouhodobém příjmu antokyaninů došlo k významnému vzestupu množství celkového i oxidovaného glutationu v srdeční tkáni, což naznačuje, že

dlouhodobý zisk polyfenolů z potravy by mohl zvyšovat antioxidační potenciál srdečních buněk. To by mohlo vést k ochraně srdečního svalu při ischemicko-reperfučním poškození (Toufektsian et al. 2008; Táborský et al. 2010). Na základě dalších studií bylo zjištěno, že polyfenoly omezují vstřebávání cholesterolu, což vedlo ke snížení obsahu cholesterolu v krevní plazmě (Zern & Fernandez, 2005). Při výzkumu vlivu lidských polyfenolových metabolitů na potkaní neonatální kardiomyocyty a diferencované kardiomyoblasty při simulaci buněčné smrti isoproterenolem bylo zjištěno, že již dvouhodinová inkubace zvrátila škodlivý účinek isoproterenolu a byl pozorován také nižší výskyt superoxidových aniontů, což vedlo k nižšímu buněčnému stresu (Dias-Pedroso et al., 2019). Lze tedy předpokládat, že polyfenoly mohou mít na srdeční sval řadu příznivých účinků, jež mohou vést i k ochraně při ischemicko-reperfučním poškození.

### 2.1.2 Kvercetin

Kvercetin je látka rostlinného původu řadící se mezi flavonoidní polyfenoly, konkrétně flavonoly. Vyskytuje se v řadě druhů ovoce i zeleniny a následných derivátů jako je víno, med a zelený i černý čaj a pro své příznivé zdravotní účinky jej můžeme nalézt v řadě doplňků stravy. Je součástí mnoha rostlin s prokázanými léčivými účinky, například v jinanu dvoulaločném známém jako *Ginkgo biloba* či v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*). Obsah tohoto flavonolu v rostlinách se může lišit také způsobem pěstování. Na základě desetileté studie bylo prokázáno, že obsah kvercetinu v rajčatech pěstovaných přirozených způsobem byl o 79 % vyšší než u rajčat pěstovaných za umělých podmínek (Mitchell et al., 2007). Nejvyšší obsah kvercetinu v potravině byl prokázán u syrové kapary (234 mg/100 g), nejnižší u čaje (2 mg/100g). V rostlinách zastává funkci přirozeného polárního inhibitoru auxinu (Fischer et al., 1997). Jeho název byl poprvé použit v roce 1857 a je odvozen od slova *quercetum* (dubový les) podle dubu rodu *Quercus* (Y. Li et al., 2016).

Z hlediska nomenklatury se jedná o 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavon (Obr. 3). Radíme jej mezi aglykony a v čistém stavu má vzhled žlutého jehličkovitého krystalu. Jeho rozpustnost ve vodě je velmi nízká, zvyšuje se však s rostoucí teplotou. Zcela rozpustný je pak v alkoholu a lipidech. Glykosilací na některé z -OH skupin vzniká kvercetinový glykosid, jehož vlastnosti jako je rozpustnost, absorpce i *in vivo* účinky se oproti kvercetinovému aglykonu liší (Hollman et al., 1999).



Obr. 3 Chemická struktura kvercetinů (vytvořeno v programu ChemSketch)

Úroveň vstřebávání kvercetinů se může lišit na základě připojeného cukru, glykosidy mohou být lépe absorbovány než rutinoidy. Ke vstřebání nejčastěji dochází v horním segmentu tenkého střeva. Následně dochází k přeměně na kyselinu fenolovou a další metabolity střevními bakteriemi a enzymy sliznice. Metabolity jsou poté absorbovány, transformovány a vylučovány. Hlavním vylučovacím orgánem kvercetinů jsou ledviny (Graefe et al., 1999).

U kvercetinů a jeho metabolitů bylo pozorováno široké spektrum příznivých účinků jak na zvířecích, tak i lidských modelech. Kvercetin vycytává v organismu volné kyslíkové i hydroxylové radikály. Zabraňuje riziku trombózy potlačením vzniku krevní sraženiny v cévách a tlumí alergické účinky či reakce na bodnutí hmyzem. Byly pozorovány též imunosupresivní účinky na funkci dendritických buněk (Huang et al., 2010). Jiné studie prokázaly inhibiční účinky vůči lipopolysacharidem (LPS) indukované produkci tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) v makrofázích i vůči oxidům dusíku, které mohou společně s TNF- $\alpha$  ve vyšších koncentracích při chronickém i akutním zánětu působit negativně na organismus (K & Ghosh, 1999). V gliových buňkách může inhibovat LPS indukovanou hladinu mRNA TNF- $\alpha$  a interleukinu, což vede ke snížení apoptotické smrti buněk (Bureau et al., 2008). Inhibuje také syntézu enzymů podílejících se na vzniku zánětů (Kim et al., 1998). Preinkubace kardiomyocytů s kvercetinem a hydroxytyrosolem prokázala, že kvercetin může mít vliv na MAPK kaskádu a ERK1/2, neboť dochází k následné inhibici fosforylace, což může vést k ochrannému účinku při srdeční hypertrofii. Byl analyzován také účinek kvercetinů na potkaní buňky H9c2 vystavené peroxidu vodíku, kdy bylo zjištěno, že buňky ošetřené kvercetinem měly vyšší enzymatickou odpověď na stresové podněty, kvercetin také snížil hladinu

(5Z,8Z,11Z,14Z)-ikosa-5,8,11,14-tetraenoát, vodík-donorové: kyslíkové oxidoreduktasy (cyklooxygenasa, COX, EC 1.14.99.1) a inhiboval produkci reaktivních forem kyslíku. Bylo též prokázáno, že kvercetin v ošetřených kardiomyocytech snížil apoptózu (Chen et al., 2013). Při výzkumu vlivu kvercetinu na xantinoxidasovou toxicitu u buněk H9c2 bylo prokázáno, že inkubace kardiomyocytů s kvercetinem ( $0,1-10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 24 h) výrazně inhibovala produkci ROS. Zaznamenána byla také inhibice fosforylace MAPK a ERK1/2 (Özbek et al., 2015).

Navzdory řadě příznivých účinků kvercetinu však stále vyvstávají otázky ohledně jeho bezpečné suplementace a účincích na těhotné či kojící ženy a dospívající. Jeho suplementace může interferovat s účinky léků změnou jejich působení či snížením účinku. Studie na zvířatech prokázala, že může také podpořit vznik nádorů zejména u estrogen-dependentní rakoviny a nefrotoxický efekt u poškozené ledviny (Andres et al., 2018).

## 2.2 Apelin

Apelin řadíme mezi skupinu endogenních peptidů, které jsou u lidí kódovány genem *APLN*, umístěným na chromozomu Xq 25-26. Tento gen kóduje pre-proprotein, neboli proteinový prekurzor o 77 aminokyselinách, který obsahuje v N-terminální oblasti signální peptid bohatý na hydrofobní aminokyseliny (Tatemoto et al., 1998). Mezi hovězími, lidskými, krysími a myšími prekurzory preproapelinu byla pozorována 76–95% homologie (Medhurst et al. 2003).

Poté, co dojde k translokaci pre-proapelinu do endoplazmatického retikula, se odštěpí signální peptid a zbylý protein může tvořit několik fragmentů, jež můžeme rozdělit na základě délky sekvence. Všechny apelinové izoformy sdílí stejných 12 C-terminálních zbytků (RPRLSHKGMPF), jež zajišťují biologickou aktivitu. Kratší sekvence, například apelin-13 i pyroglutamát-apelin-13 (pyr-apelin-13), jsou účinnými regulátory kardiovaskulárních funkcí v lidských tkáních, zatímco delší peptidy, například apelin-36, mají vliv na inhibici infekce virem lidské imunodeficiency (HIV), kdy dochází k blokaci koreceptoru HIV APJ (Kleinz & Davenport, 2005).

Apelin aktivuje transmembránový receptor spřažený s G proteinem (APJ). Apelin i apelinový receptor jsou široce distribuovány v těle. Expres apelinu byla pozorována v centrální nervové soustavě, srdci, kosterním svalu i v tukové tkáni. Bylo zjištěno, že apelin ovlivňuje léčbu mnoha nenádorových onemocnění, včetně onemocnění

reprodukčního systému u žen i mužů (Kurowska et al., 2018). U rakoviny naopak může stimulovat tvorbu nádorů a být tedy využit jako marker nádorových onemocnění (Antushevich & Wójcik, 2018). Na základě experimentálních studií bylo také zjištěno, že se apelin podílí na regulaci lipolýzy, krevního tlaku, kontrole homeostázy tekutin i metabolismu glukózy. Byl také testován vliv apelinu a jeho deficiencie u mutantních myši. U apelin-knockout myši byly pozorovány srdeční abnormality a poruchy srdeční kontraktility. Studie prokázala, že tento endogenní peptid je zásadní pro udržení srdeční kontraktility při náhlém zhoršení stavu organismu či stárnutí. Bylo též prokázáno, že koncentrace apelinu jsou u lidí i zvířat při chronickém kardiovaskulárním onemocnění trvale sníženy (Kuba et al., 2007).

### 2.2.1 Apelinový receptor

Apelinový receptor byl objeven v roce 1993 (O'Dowd et al., 1993) a řadíme jej mezi receptory spřažené s G proteinem, zkráceně GPCR. Tyto receptory mohou být aktivovány řadou molekul (polypeptidové hormony, biogenní aminy, ionty apod.) a skládají se ze sedmi membrán-přemostujících domén. Některé z těchto receptorů nemají známé endogenní ligandy, ligandem apelinového receptoru je apelin (Tatemoto et al., 1998).

Exprese apelinového receptoru stejně jako apelinu zahrnuje celý organismus. APJ je vysoce exprimován v nervovém systému (zejména osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny), srdci, slinivce břišní i v jiných orgánech. Gen kódující apelinový receptor nazýváme zkratkou *APLNR*. *APLNR* gen kóduje proteinovou sekvenci 380 aminokyselin a nachází se na chromozomu 11q12 (O'Dowd et al., 1993). Homologie mezi lidským a myším APJ je přitom 92% (Devic et al., 1999).

Zprostředkování signálu apelinergního systému probíhá dvěma cestami (Obr. 4). Jedna cesta probíhá reakcí spřaženou s G proteinem, signálními drahami vedoucími přes  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  a  $G\alpha_{13}$ .

$G\alpha_i$  se účastní aktivace ATP:1-fosfatidyl-1D-myo-inositol 3-fosfotransferasy (fosfatidylinositol 3-kinasa, PI3K, EC 2.7.1.137), vedoucí k aktivaci protein kinasy B a podílí se na aktivaci diacylglycerol-dependentní ATP:protein fosfotransferasy (protein kinasa C, PKC, EC 2.7.11.13), čímž spouští mitogenní signální dráhu kinasy ERK; může také inhibovat aktivaci cAMP dependentní ATP:protein fosfotransferasy (protein kinasa A, PKA, EC 2.7.11.11) inhibicí enzymu ATP difosfát-lyasy (adenylát cyklasa, AC, EC 4.6.1.1) za vzniku cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který působí jako

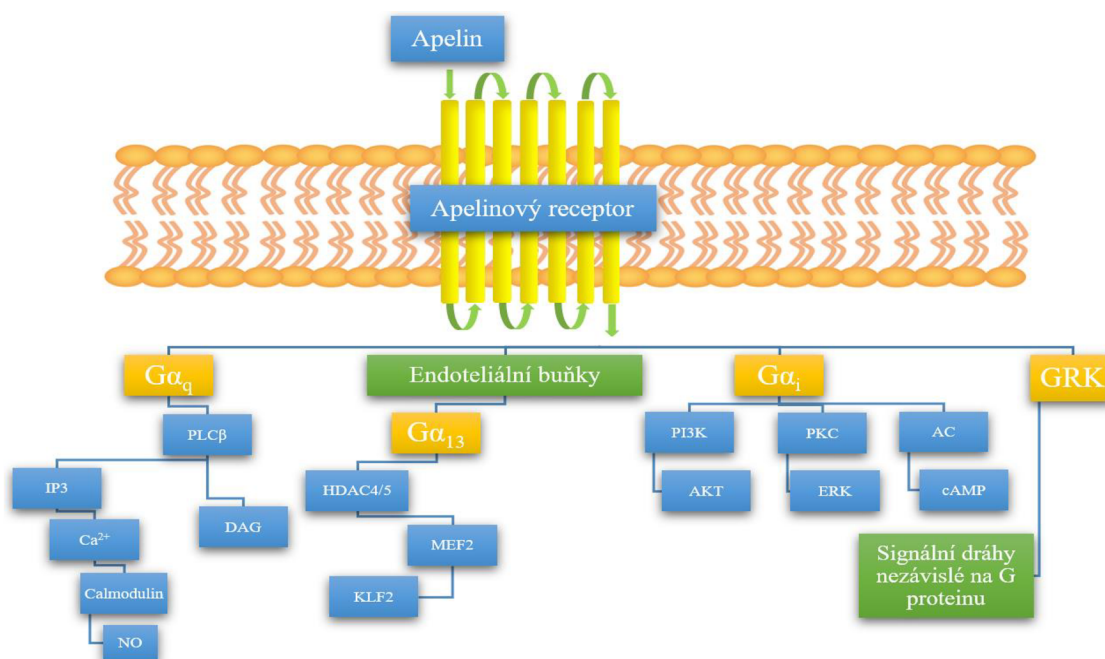


vnitrobuněčný druhý posel v řadě signálních drah (Chapman et al., 2014; Masri et al., 2006).

$G\alpha_q$  aktivuje 1-fosfatidyl-1D-myo-inositol-4,5-bisfosfát inositoltrisfosfohydrolasu (fosfoinositid fosfolipasa C,  $PLC\beta$ , EC 3.1.4.11), která indukuje produkci diacylglycerolu (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfátu (IP3) a usnadňuje aktivaci PKC kaskády a uvolňování intracelulárních vápenatých iontů, což vede k uvolnění kalmodulinu a následným vasodilatačním účinkům prostřednictvím aktivace syntasy oxidu dusnatého. Tento účinek může být u indukován také u endoteliální NOS aktivací AKT prostřednictvím  $G\alpha_i$  (Fleming & Busse, 2003).

$G\alpha_{13}$ , je signální cestou v endoteliálních buňkách vedoucí k fosforylaci a cytoplazmatické translokaci histon amidohydrolas (histon deacetylas, HDAC, EC 3.5.1.98) a následné aktivaci myocytového zesilovacího faktoru 2 (MEF2), který indukuje expresi genu *MEF2* Krüppel-faktoru 2 (KLF2), který působí jako přirozená ochrana cévního endotelu indukci protizánětlivých a antioxidantních mediátorů (Kang et al., 2013).

Druhou cestou je stimulace APJ apelinem vedoucí k fosforylaci prostřednictvím receptorové ATP:fosfotransferasy spřažené s G proteinem (receptorová kinasa spřažená s G-proteinem, GRK, EC 2.7.11.16), čímž se mohou aktivovat signální dráhy nezávislé na G proteinu (Loot & Fleming, 2013; Tian et al., 2020).



Obr. 4 Schéma signální dráhy apelinu (vytvořeno v programu MS Word)

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístrojové vybavení

Chlazená centrifuga *Mikro 22* (Hettich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga *Rotina 380R* (Hettich Zentrifugen, Německo)

Centrifuga *Minispin* (Ependorf, Německo)

Laboratorní kývačka *Duomax 1030* (Heidolph, Německo)

Odsávačka *Aspiration Station* (Gilson Safe, Švýcarsko)

Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)

Mikroskop *CK40-F200* (Olympus Optical, Japonsko)

Laminární box *Clean Air* (Schoeller Instruments, ČR)

Počítací komůrka *Bürker* (Marienfeld, Německo)

Inkubátor *MCO-17AIC* (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Vodní lázeň *GRANT OLS200* (Grant, Anglie)

Souprava na SDS-PAGE/Western blotting *Trans-Blot® TURBO™ Transfer System* (BioRad, USA)

Spektrometr *Infinite M200 Pro* (Tecan, Rakousko)

### 3.2 Materiál

#### 3.2.1 Biologický materiál

Pro provedení všech experimentů byly použity buňky buněčné linie H9c2 z potkaních kardiomyoblastů (ECACC, číslo 88092904 Rat BDIX heart myoblast). Buňky byly uchovávány v inkubátoru při optimálních podmínkách (37 °C, atmosféra s 5 % CO<sub>2</sub> v prostoru nasyceném vodními parami) při zachování sterilního prostředí. Buňky ve směsi FBS a DMSO byly nejprve rychle rozmrazeny a následně přeneseny do falkony s 9 ml media. Následně byly centrifugovány (178 g, 3 minuty, pokojová teplota). Po centrifugaci byl supernatant vylit do odpadu a pelet rozpipetován v čerstvém médiu. Buňky byly poté přeneseny do kultivační lahve a inkubovány.

Při další práci byly v intervalu 48-72 hodin pravidelně pasážovány, vždy po dosažení ~90% konfluence. Při pasážování bylo nejprve odlito staré médium, buňky byly 2x omyty sterilním roztokem PBS (137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,68 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 8,96 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O; 1,47 mol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ředěno 10x) a následně byly podrobeny trypsinizaci 0,25% roztokem trypsinu po dobu několika minut pro oddělení od povrchu lahve. Trypsinizace byla vždy zkontrolována mikroskopem a následně bylo

přidáno sérové médium pro inhibici účinku trypsinu. Buňky byly poté centrifugovány (178 g, 3 minuty, pokojová teplota) ve falkoně pro oddělení od média obsahujícího trypsin. Po centrifugaci byl supernatant odlit do odpadní lahve a vzniklý pelet rozpipetován v čerstvém médiu. Část buněk byla poté oddělena do Eppendorfovy zkumavky pro počítání s trypanovou modří na Bürkerově komůrce. Po spočítání buněk byla odpovídající část média s buňkami přenesena do nové kultivační lahve a doplněna čerstvým médiem.

### **3.2.2 Kultivační médium**

Pro kultivaci buněčné linie H9c2 bylo použito sterilní Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (vyrobena firmou Sigma Aldrich). Kultivační médium obsahovalo glukosu o obsahu  $4500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , L-glutamin,  $\text{NaHCO}_3$  a bylo do něj přidáno 10% fetální hovězí sérum, penicilin, streptomycin a neesenciální aminokyseliny. Médium bylo uchováváno při teplotě 2-8°C.

### **3.2.3 Protilátky**

Produkty firmy Cell Signaling Technology (USA):

Specifické primární protilátky

Králičí protilátky: GAPDH, Anti-APJ receptor, p42/44 MAPK (ERK1/2), Akt, fosfo-Akt (Thr308)

Myší protilátky: fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)

Specifické sekundární protilátky:

Kozí proti-myší IgG-HRP

Kozí proti-králičí IgG-HRP

## **3.3 Metody**

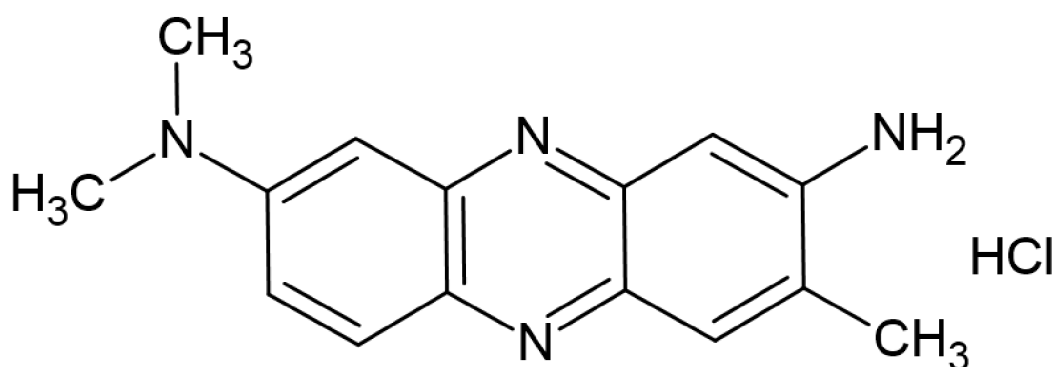
### **3.3.1 Stanovení cytotoxicity kvercetinu**

Pro intoxikaci byly buňky nejprve vysety na 96-jamkovou destičku o počtu 25 000 buněk na jamku. Následně bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  média na jamku a takto byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5 %  $\text{CO}_2$  po dobu jednoho dne. Druhý den byly na buňky naneseny různé koncentrace roztoku kvercetinu (1, 2, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), DMSO jako kontroly a Triton TX-100 pro rozpuštění buněk. Nachystané destičky s koncentrační řadou kvercetinu byly ponechány ke kultivaci v inkubátoru po dobu jednoho dne. Následně byla stanovena cytotoxicita pomocí MTT testu či neutrální červeně.

### 3.3.1.1 Neutrální červeně

Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně je metoda založená na principu pohlcení barviva 3-amin-7-dimethylamin-2-methylphenazin hydrochloridu (Obr. 5) pouze živými buňkami. Barvivo je slabě bazické a koncentruje se uvnitř lysozomů na základě pasivní difúze skrze plazmatickou membránu až ke kyselému prostředí lysozomů. Výsledek je detekován spektrofotometricky a intenzita zbarvení by měla být přímo úměrná počtu životaschopných buněk. Při praktickém provádění metody je nutné dbát na dodržení podmínek teploty a inkubační doby, neboť by mohlo dojít k vysrážení barviva.

Pro stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně bylo z destiček nejprve odsáto médium a následně byl přidán roztok neutrální červeně v PBS o objemu 40  $\mu$ l na jamku. Destičky byly následně inkubovány při 37  $^{\circ}$ C a 5 %  $\text{CO}_2$  v inkubátoru po dobu jedné hodiny. Po inkubaci bylo odsáto médium a buňky byly promyty 200  $\mu$ l směsí formaldehydu s  $\text{CaCl}_2$ . Tato směs byla odsáta a bylo přidáno 200  $\mu$ l extrakčního roztoku (1% kyselina octová v methanolu). Destička se poté nechala míchat 20 minut na třepačce a následně byla změřena absorbance při  $\lambda = 540$  nm.

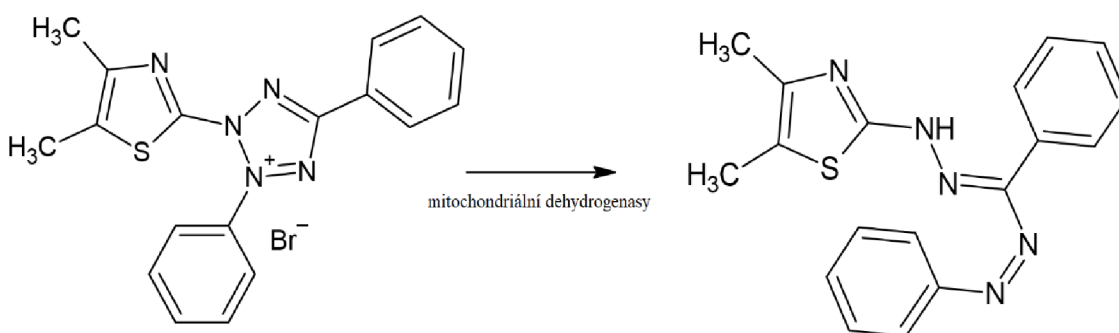


Obr. 5 Chemická struktura neutrální červeně (vytvořeno v programu ChemSketch)

### 3.3.1.2 MTT test

MTT test je kolorimetrická analýza určená k hodnocení buněčné metabolické aktivity, proliferace a životnosti. Principem MTT testu je redukce 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidu (Obr. 6) mitochondriálními dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk na formazánové barvivo. Absorbance je měřena spektrofotometricky při  $\lambda = 540$  nm.

Buňky byly po kultivaci s kvercetinem opláchnuty roztokem PBS a následně na ně byl nanesen 0,1% roztok MTT v kultivačním DMEM médiu. Buňky byly následně kultivovány 1,5 hod v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po kultivaci byl roztok odsát a byl aplikován roztok DMSO s 1 % NH<sub>3</sub>. Destička byla ponechána 5 minut při pokojové teplotě a následně byla změřena absorbance.



Obr. 6 Redukce MTT na formazánové barvivo (vytvořeno v programu ChemSketch)

### **3.3.2 Stanovení účinku kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru**

Pro stanovení účinku koncentrace kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru byly buňky na 6-jamkové destičce inkubovány s koncentrační řadou kvercetinu o hodnotách 1, 2, 5, 10 a 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a kontrolním vzorkem 0,1% DMSO po dobu 24 hodin. Následně bylo se vzorky pracováno podle postupu uvedeném v bodech 3.3.4 – 3.3.9.

### **3.3.3 Zhodnocení fosforylace kinas v závislosti na čase**

Pro zhodnocení fosforylace kinas byly buňky vysety na 6-jamkové destičky a kultivovány s roztokem 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kvercetinu po dobu 0, 5, 10, 15, 30 a 60 minut a kontrolním vzorkem 0,1% DMSO pro každý čas. Pro vyhodnocení byl přidán také vzorek apelinu-13 o koncentraci 200  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  v čase 5 minut. Po inkubaci byl na buňky nanesen roztok inhibitorů fosfatas (roztok NaF a  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  v PBS o koncentraci 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Následně bylo se vzorky pracováno podle postupu uvedeném v bodech 3.3.4 – 3.3.9.

### **3.3.4 Lýza buněk**

Buňky na 6-jamkové destičce byly nejprve zbaveny média a následně dvakrát promyty 1 ml PBS o teplotě 4 °C. Poté byly přeneseny v 500  $\mu\text{l}$  PBS do Eppendorfovy zkumavky pro centrifugaci (1 960 g, 5 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a k peletu byl přidán lyzační pufr HUVEC (20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS, 5  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EGTA, 150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycerol fosfát, 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaF, 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Triton X-100 1%, Tween-20 0,1%, 1x tableta inhibitor proteáz Complete v 50 ml) o objemu 75  $\mu\text{l}$  na jamku. Vzorky s lyzačním pufrem byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě a během inkubace 3x promíchány na vortexu. Po uplynutí této doby byly buňky propipetovány. Následně byla provedena centrifugace (20 780 g, 13 minut, 4 °C) a byl odebrán supernatant do čistých zkumavek. Část získaného lyzátu byla použita pro následné stanovení koncentrace proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové, zbylý lyzát byl před použitím zamrazen při 80 °C.

Pro metodu western blot byly vzorky smíchány s 5x vzorkovým pufrem (25  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris-Cl, 4% SDS, 20% glycerol, 200  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dithiotreitol, 0,02% bromfenolová modř; pH= 6,8) v poměru 1:4 (10  $\mu\text{l}$  pufru:40  $\mu\text{l}$  lyzátu) a povařeny při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Následně byly zchlazeny na ledu a krátce centrifugovány. Takto připravené

vzorky byly zamrazeny do  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro aplikaci na gel byly vzorky rozmrazeny a 5 minut inkubovány při  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  v termobloku.

### **3.3.5 Stanovení koncentrace proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové**

Metodu BCA řadíme mezi nepřímé metody stanovení proteinů a je založena na redukční reakci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů. Ionty  $\text{Cu}^{2+}$  reagují s proteiny za vzniku komplexu a dochází k jejich redukci na  $\text{Cu}^{+}$ , na které se podílí peptidová vazba. Kyselina bicinchoninová obsažená v BCA working reagent tvoří s  $\text{Cu}^{+}$  ionty v alkalickém prostředí modro-fialový komplex.

Pro provedení metody bylo zapotřebí připravit kalibrační roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) rozpuštěného v PBS o koncentracích 0; 0,125; 0,25; 0,5 a  $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Druhým potřebným roztokem byla směs BCA working reagent A a B (50:1; 200  $\mu\text{l}$ /jamka). Vzorky byly nanесeny na 96-jamkovou destičku v tripletu (10  $\mu\text{l}$ ). Ideální teplotou pro reakci je  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vzorky byly proto inkubovány 30 minut při dané teplotě za neustálého třepání. Následně byly ochlazeny na pokojovou teplotu a byla změřena absorbance při  $\lambda = 562\text{ nm}$ . Získané hodnoty absorbance byly porovnány s kalibračními roztoky hovězího sérového albuminu. Z těchto hodnot byla vytvořena kalibrační křivka a byly vypočteny koncentrace proteinů ve vzorcích lyzátu.

### **3.3.6 SDS-PAGE elektroforéza**

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) je metoda určená k separaci proteinů na základě molekulové hmotnosti. Při přípravě byly vzorky proteinu nejprve denaturovány vysokou teplotou (viz. 3.3.4 Lýza buněk), což zajistilo redukci disulfidických vazeb  $\beta$ -merkaptoetanolem a jejich obalení dodecylsulfátem sodným (SDS), který uděluje proteinům záporný náboj. Záporně nabitě proteiny poté migrují gelem směrem ke kladné anodě na základě molekulové hmotnosti.

Vzorky byly v předem určeném objemu následně s pomocí nástavce nanесeny na gel o tloušťce 1,5 mm a 10% koncentraci. Ke vzorkům byl přidán také žebříček s definovanými markery pro určení molekulové hmotnosti separovaných proteinů. Elektroforéza s jedním gelem probíhala nejprve za konstantního proudu 15 mA, po průniku ze zásobního gelu (stacking gel) do dělicího gelu (running gel) byl proud zvýšen na 30 mA a takto ponechán až do úplné separace proteinů. Po ukončení elektroforézy byl z gelu odstraněn pomocí špachtle stacking gel a byl vyznačen rožek

pro rozpoznání vzorků. Následně byl gel přenesen do transferového pufru a inkubován ~5 minut na houpačce k promytí.

### **3.3.7 Western blot**

Pro provedení přenosu separovaných proteinů z elektroforézy na membránu byla použita metoda Western blot. Polyvinyliden fluoridová (PVDF) membrána byla připravena nejprve krátkou rehydratací v methanolu (5 sekund) a následně promyta destilovanou vodou. Před použitím byla ještě po dobu 5 minut inkubována v transferovém pufru. Následně byl vytvořen sandwich skládající se z molitanu, filtru, PVDF membrány, gelu, filtru a molitanu. U membrány byl ustřižen rožek podle gelu pro rozpoznání a při skládání byly opatrně vytlačovány bubliny směrem od středu ke stranám. Vytvořený sandwich byl vložen do blotovací kazety a následně do přístroje. Transfer byl prováděn na program Standart – Mini gel o konstantním proudu 1 A po dobu 30 minut. Po dokončení přenosu byla membrána vyjmuta a vložena do vaničky s TBS/T na 2 x 5 minut. Na membránu byl následně nanesen roztok Ponceau S (0,1% Ponceau S, 5% kyselina octová) na 5 minut pro vybarvení přenesených proteinů. Pro následující úkony byla použita pouze potřebná část membrány podle vyobrazeného žebříčku, zbytek byl ustřižen. Membrána byla poté několikrát promyta ddH<sub>2</sub>O na houpačce.

### **3.3.8 Imunodetekce**

Prvním krokem detekce bylo zablokování membrány 5% roztokem odtučněného mléka v TBS/T (100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 0,9% NaCl; pH = 7,5; ředěno 10x a přidáno 0,1% Tween-20). Tento krok byl proveden pro prevenci nespecifické vazby protilátky k povrchu membrány. Membrána byla takto promývána po dobu 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Poté byla na destičce s parafilmem naložena do celkového roztoku 5% mléka s primární protilátkou při teplotě 4 °C přes noc. Primární protilátka byla ředěna ve standartním poměru 1:1 000 5% roztokem mléka v TBS/T. Druhý den byla membrána promyta 3x 10 minut v TBS/T a poté naložena do celkového roztoku sekundární protilátky v 5% mléce s TBS/T v poměru 1:5 000. Takto byla znovu promývána po dobu 1,5 hodiny při pokojové teplotě a následně 3x promyta v TBS/T pro zablokování nespecifických vazeb.

Pro samotnou detekci v temné komoře bylo připraveno detekční činidlo skládající se ze dvou roztoků smíchaných v poměru 1:1. Membrány byly vloženy do folie a bylo na ně nanášeno pipetou detekční činidlo. Folie byla přeložena a rozetřením byly vytlačeny



bubliny. Následně byla folie s membránami vložena do kazety. V temné komoře byl vytažen film, který byl následně přiložen na membránu a exponován v uzavřené kazetě po dobu až 2 minut. Poté byl film pinzetou vytažen a přenesen do vývojky po dobu 30 s. Poté byl chvíli promýván v ddH<sub>2</sub>O a vložen do ustalovače na 3 minuty. Následně byl vytažen a usušen na filtračním papíře. Membrány byly promyty ddH<sub>2</sub>O a usušeny.

### **3.3.9 Zpracování dat**

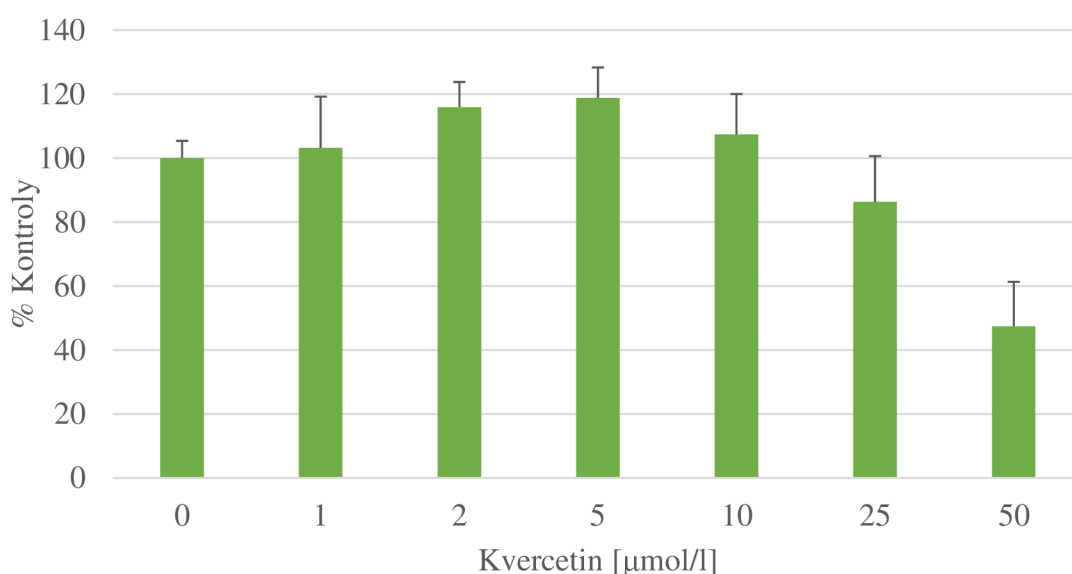
Pro vyhodnocení byly filmy naskenovány na skeneru CanoScan 5600F a následně vyhodnoceny v programu ImageJ a MS Excel.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Stanovení cytotoxicity kvercetinu

#### 4.1.1 Neutrální červeně

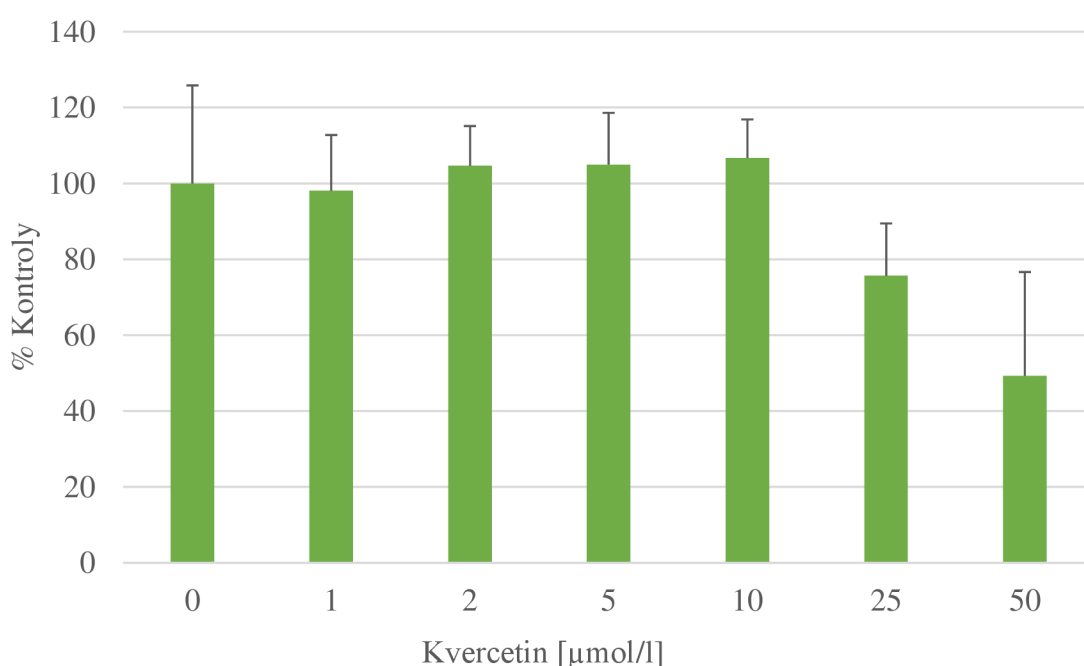
Graf č. 1 znázorňuje výsledky stanovení cytotoxicity kvercetinu na buněčnou linii H9c2 pomocí neutrální červeně, přičemž hodnota 100 % je vztažena na kontrolní vzorek. Experiment byl proveden ve třech opakováních. Na grafu lze sledovat mírný nárůst buněk oproti kontrolnímu vzorku u hodnot koncentrace 1–10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Cytotoxické účinky bylo možné pozorovat až u koncentrace 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší, kdy došlo k pozorovatelné inhibici růstu. Velmi podobné výsledky byly dosaženy při testování toxicity kvercetinu s využitím neutrální červeně na buněčných liniích ze střevního epitelu prasete IPEC-J2 (Vergauwen et al., 2016) a myších fibroblastů NIH3T3 (Bonechi et al., 2018). Pro další experimenty se jevila jako vhodná koncentrace 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , protože se jednalo o nejvyšší koncentraci bez toxického účinku. Výsledky jsou ověřeny ještě alternativní metodou MTT.



Graf č. 1 Stanovení cytotoxicity kvercetinu o koncentracích v rozmezí 0–50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na buněčnou linii H9c2 pomocí neutrální červeně

### 4.1.2 MTT test

Graf č. 2 znázorňuje stanovení cytotoxicity koncentrační řady kvercetinů na buněčnou linii H9c2 pomocí MTT testu, jenž byl proveden ve třech měřeních. Hodnota 100 % je vztažena na kontrolní vzorek. Lze pozorovat, že u koncentrací v rozmezí 1–10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nedošlo k ovlivnění buněčného růstu kvercetinem. Při navýšení koncentrace na 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší došlo k pozorovatelné inhibici růstu. Na základě těchto výsledků bylo možné usoudit, že koncentrace kvercetinů 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší vykazují na růst buněk toxické účinky, přičemž toxicita narůstá se zvyšující se koncentrací. Opět byly velmi podobné výsledky dosaženy dalšími výzkumnými týmy, které testovaly kvercetin na buněčné linii HepG2 (Leng et al., 2018) a na linii H9c2 (Zhang et al., 2022). Druhá jmenovaná publikace vyšla tiskem v době zpracovávání této práce a stala se potvrzením získaných výsledků. Stojí však za připomínku, že Zhang a kolektiv nepozorovali toxický účinek kvercetinů ani při vyšších koncentracích. Je však možné, že jejich experimenty byly prováděny na buňkách H9c2 v jiné pasáži, což může způsobovat vyšší odolnost, neboli odlišné metabolické schopnosti. Na základě výsledků s neutrální červení a po potvrzení MTT testem byla pro následující experimenty zvolena koncentrace kvercetinů 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

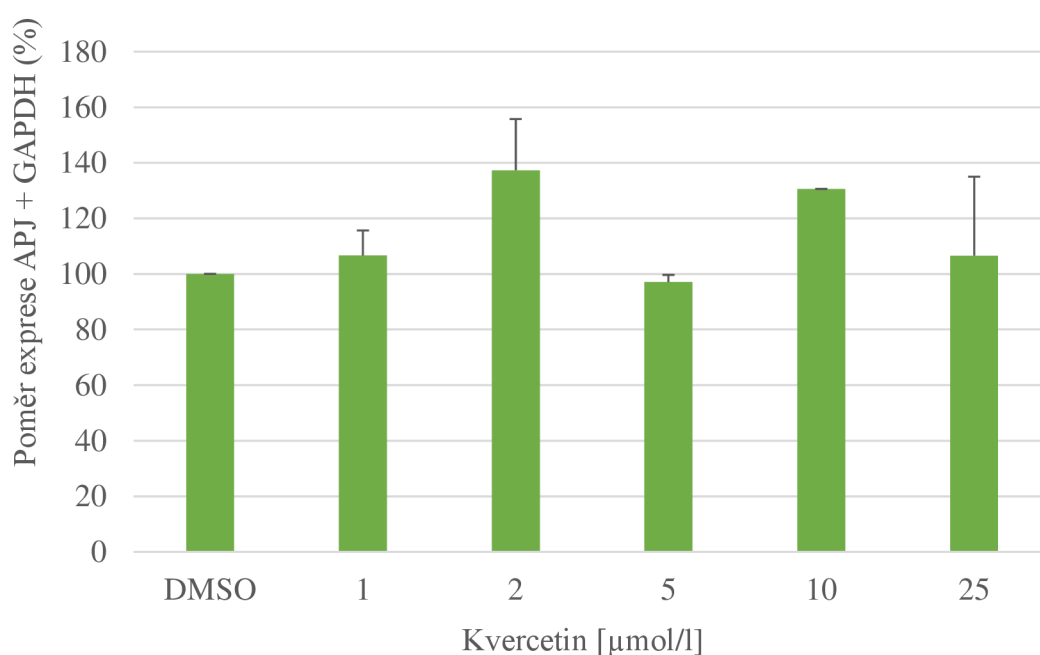


Graf č. 2 Stanovení cytotoxicity kvercetinů o koncentracích v rozmezí 0–50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na buněčnou linii H9c2 pomocí MTT testu

## 4.2 Stanovení účinku koncentrace kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru

Na grafu č. 3 lze pozorovat vyhodnocení účinků koncentrační řady kvercetinu v rozmezí 1–25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na úroveň exprese apelinového receptoru. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. Lze pozorovat, že exprese apelinového receptoru nebyla vzhledem ke kontrolnímu vzorku ovlivněna narůstající koncentrací kvercetinu. Kvercetin zřejmě neovlivňuje ať už syntézu nebo degradaci apelinového receptoru, protože přítomnost receptoru v buňkách je stabilní po dobu 24 hodin. V dostupné literatuře nejsou žádná data o vlivu kvercetinu na apelinový receptor, respektive se touto problematikou nikdo nezabýval.

Vzhledem k tomu, že další experimenty byly prováděny v časových intervalech do 60 minut, jakýkoli vliv kvercetinu pravděpodobně nebude souviset s úrovní exprese apelinového receptoru.

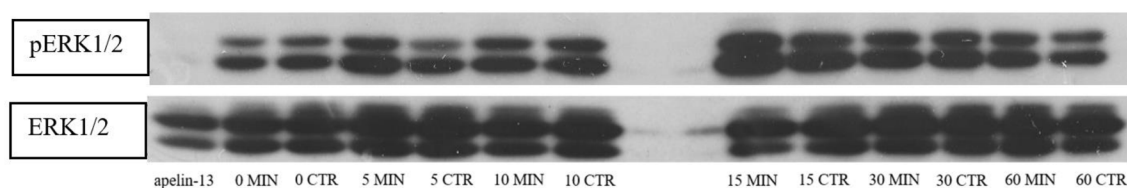


Graf č. 3 Stanovení účinku koncentrace kvercetinu na úroveň exprese apelinového receptoru, exprese porovnána s účinky DMSO jako kontroly

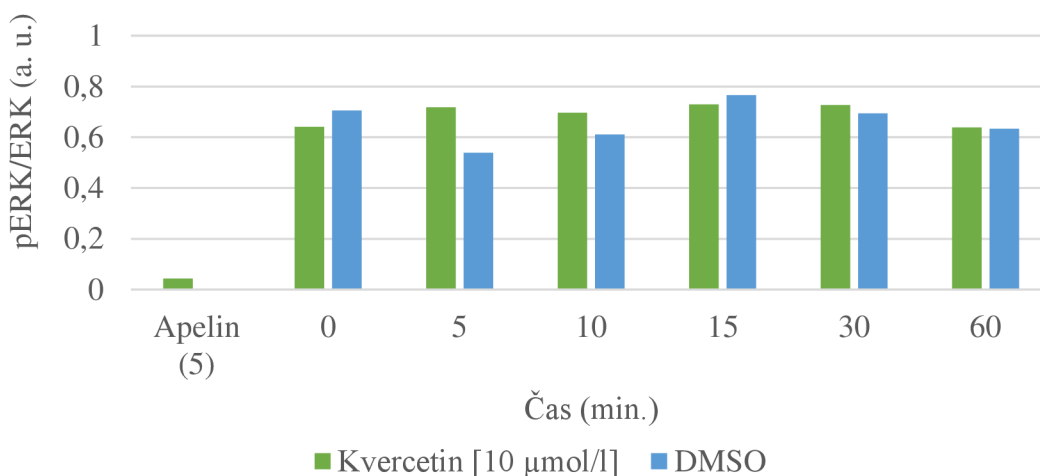
### 4.3 Zhodnocení fosforylace kinas v závislosti na čase

#### 4.3.1 ERK1/2

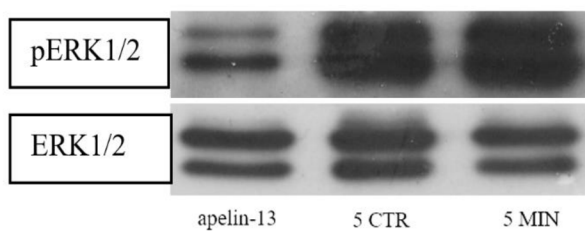
Graf č. 4 znázorňuje vyhodnocení fosforylace kinasy ERK 1/2 v závislosti na čase vzhledem k DMSO jako kontrole. Lze usoudit, že v páté a desáté minutě došlo vlivem kvercetinu k pozorovatelné stimulaci fosforylace vyjádřené jako poměr fosforylované ERK vůči celkové ERK v porovnání s vlivem rozpouštědla (Obr. 7). Po delší inkubaci bylo možné pozorovat pokles fosforylace. Výsledky naznačují, že by kvercetin mohl v buňkách ovlivňovat signální dráhu jejíž součástí je ERK1/2. Fosforylace byla také porovnána s apelinem-13, který tuto signální dráhu spouští. Pozorovaný účinek apelinu však byl překvapivě velmi nízký, což neodpovídá výsledkům publikovaným v diplomové práci Barbory Opletalové (2021). Vzhledem k tomuto výsledku byl proveden ověřovací experiment, jehož výsledky jsou uvedeny v grafu č. 5 a na Obr. 8. Tento experiment však potvrdil, že účinek apelinu může být velmi silně ovlivněn počtem pasáží, tj. „stářím“ použitých buněk, protože použité buňky H9c2 zřejmě nebyly zcela identické těm použitým dříve. Data publikovaná v článku F. Li et al. (2021) ukazují spíše inhibiční účinek kvercetinu na fosforylaci ERK1/2 vyvolanou v buňkách H9c2 jinými efektoři.



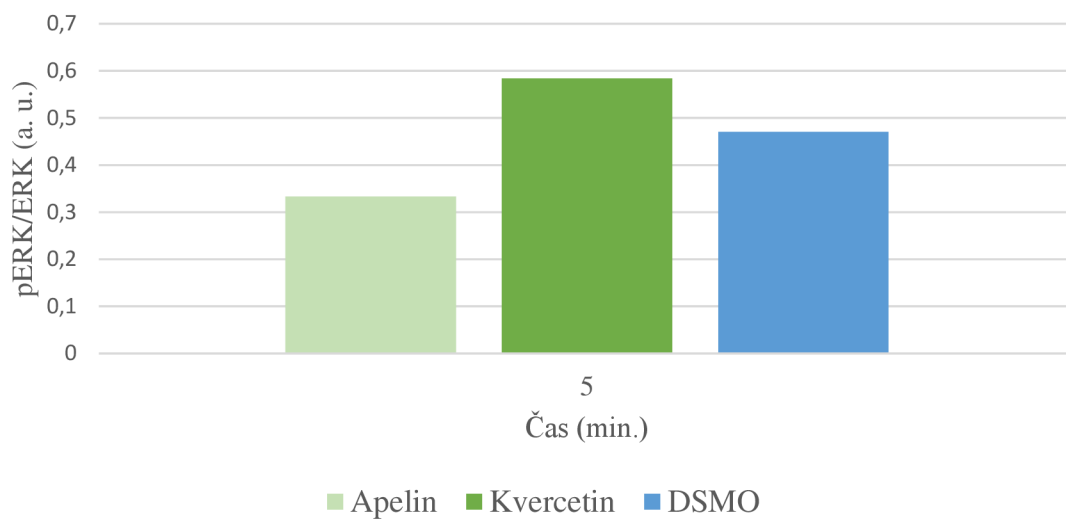
Obr. 7 Reprezentativní blot stanovení fosforylované (nahore) a celkové (dole) ERK1/2 v závislosti na čase v porovnání s apelinem-13; CTR=kontrolní vzorek DMSO



Graf č. 4 Zhodnocení fosforylace ERK1/2 v závislosti na čase vzhledem k DMSO, porovnáno s apelinem-13 v čase 5 min.



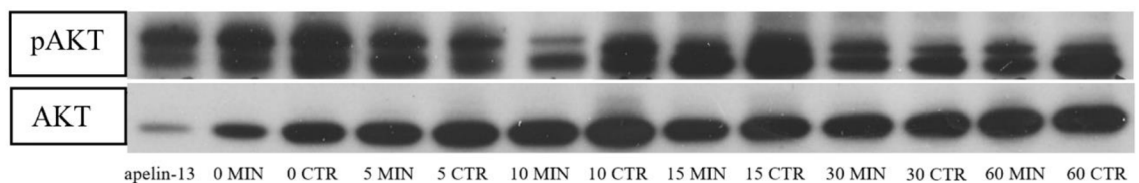
Obr. 8 Reprezentativní blot stanovení fosforylované (nahore) a celkové (dole) ERK1/2 v čase 5 minut v porovnání s apelinem-13; CTR=kontrolní vzorek DMSO



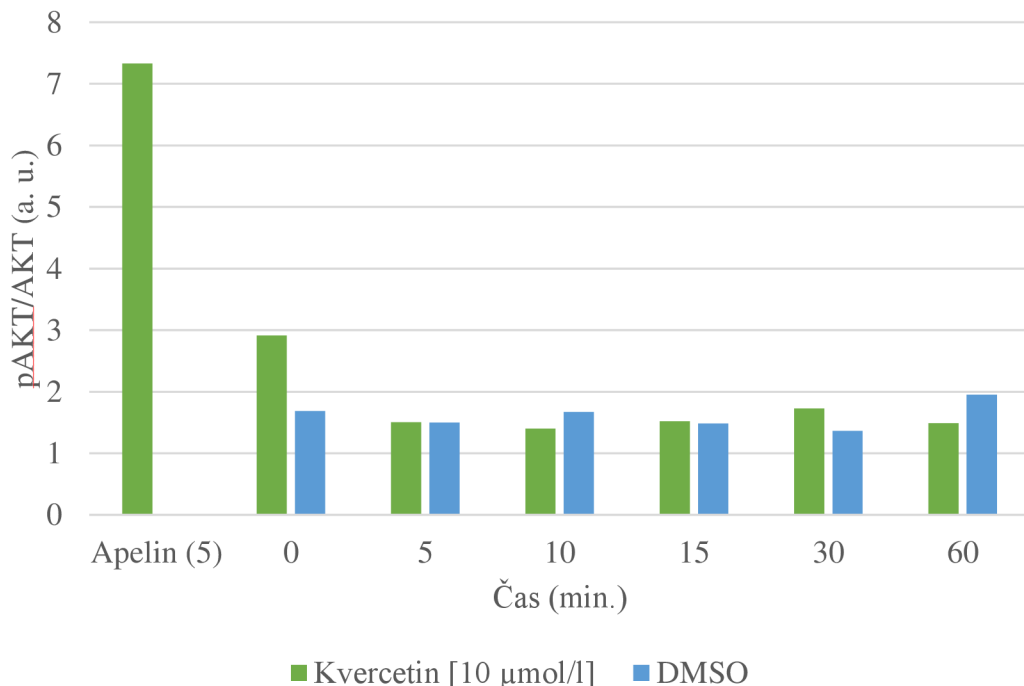
Graf č. 5 Porovnání exprese apelinu-13 a kvercetinu v čase 5 min. vzhledem k DMSO

### 4.3.2 AKT

Graf č. 6 znázorňuje vyhodnocení fosforylace kinasy AKT v závislosti na čase vzhledem k DMSO jako kontrole. Fosforylace byla též porovnána s apelinem-13, jenž byl vyhodnocen v páté minutě (Obr. 9). Na základě výsledků lze usoudit, že vlivem kvercetinu nedošlo ke stimulaci signální dráhy AKT oproti apelinu-13, který prokazuje dle očekávání výraznou stimulaci, neboť tuto signální dráhu ovlivňuje. Publikovaná data ukazují silný inhibiční vliv na fosforylaci AKT v buňkách HG-3 (Cervellera et al., 2021). S odvoláním na závěry článku Zholobenko et al. (2017) kde je účinek kvercetinu přisuzován jeho vlivu na signální dráhy až uvnitř buňky, nikoli přes receptory přítomné v cytoplasmatické membráně, lze usoudit, že kvercetin pravděpodobně ovlivňuje jinou signální dráhu než tu, která spojuje apelinový receptor s AKT.



Obr. 9 Reprezentativní blot stanovení fosforylované (nahore) a celkové (dole) AKT v závislosti na čase v porovnání s apelinem-13; CTR=kontrolní vzorek DMSO



Graf č. 6 Zhodnocení fosforylace AKT v závislosti na čase vzhledem k DMSO, porovnáno s apelinem-13 v čase 5 min.

## 5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv polyfenolu kvercetinu na fosforylaci (aktivaci) kinas ERK a AKT v porovnání s přirozeným aktivátorem apelinem-13. Nejprve byla vyhodnocena cytotoxicita kvercetinu pomocí testu s neutrální červení a MTT, kdy se podařilo úspěšně vyhodnotit, že koncentrace kvercetinu 1–10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nemá na růst buněčné linie H9c2 inhibiční vliv. Cytotoxické účinky se projeví až u koncentrace 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší. V následujících experimentech se proto pracovalo s koncentrací kvercetinu 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

V následující části byl stanoven účinek koncentrační řady kvercetinu v rozmezí 1–25  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na úroveň exprese apelinového receptoru, kdy bylo zjištěno, že kvercetin pravděpodobně expresi apelinového receptoru neovlivňuje, neboť byl receptor stabilní po celou dobu inkubace s kvercetinem.

Následně byla vyhodnocena fosforylace kinasy ERK1/2 v závislosti na čase. Dle získaných výsledků bylo možné usoudit, že v páté a desáté minutě došlo vlivem kvercetinu k pozorovatelné stimulaci fosforylace vyjádřené jako poměr fosforylované ERK vůči celkové ERK v porovnání s vlivem rozpouštědla, přičemž po delší inkubaci bylo možné pozorovat pokles fosforylace. Tyto výsledky naznačují, že by kvercetin mohl v buňkách ovlivňovat signální dráhu kinasy ERK1/2. Fosforylace byla také porovnána s apelinem-13, jenž tuto signální dráhu spouští. Pozorovaný účinek apelinu však byl překvapivě velmi nízký, což neodpovídá výsledkům publikovaným v diplomové práci Barbory Opletalové (2021). Vzhledem k tomuto výsledku byl proveden ověřovací experiment, který předchozí výsledky potvrdil. Účinek apelinu může být nejspíše velmi silně ovlivněn počtem pasáží neboli „stářím“ použitých buněk.

V poslední části byla vyhodnocena fosforylace kinasy AKT v závislosti na čase. Fosforylace byla také porovnána s apelinem-13, jenž byl vyhodnocen v páté minutě. Dle výsledků bylo možné usoudit, že vlivem kvercetinu nedošlo ke stimulaci signální dráhy AKT oproti apelinu-13, který prokazuje dle očekávání výraznou stimulaci, neboť tuto signální dráhu ovlivňuje, což bylo potvrzeno publikací Cervellera et al. (2021). Vzhledem k získaným poznatkům a porovnání s publikovanými daty lze usoudit, že kvercetin pravděpodobně ovlivňuje jinou signální dráhu než tu, která spojuje apelinový receptor s AKT. Získané výsledky nevylučují možnost kardioprotektivních účinků kvercetinu, pouze ukazují, že kvercetin zřejmě nepůsobí přes apelinový receptor.



## 6 LITERATURA

- Abella, B. S., & Becker, L. B. (2002). Ischemia-reperfusion and Acute Apoptotic Cell Death. In J.-L. Vincent (Ed.), *Intensive Care Medicine: Annual Update 2002* (s. 3–11). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5551-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5551-0_1)
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I., & Lampen, A. (2018). Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*, *62*(1), 1700447. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>
- Antushevich, H., & Wójcik, M. (2018). Review: Apelin in disease. *Clinica Chimica Acta*, *483*, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.012>
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *50*(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Bolli, R. (1990). Mechanism of myocardial „stunning“. *Circulation*, *82*(3), 723–738. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.3.723>
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., Lamponi, S., & Magnani, A. (2018). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophysical Chemistry*, *233*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.11.003>
- Bureau, G., Longpré, F., & Martinoli, M.-G. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1002/jnr.21503>
- Carden, D. L., & Granger, D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, *12*.
- Carrer, A., Tommasin, L., Šileikytė, J., Ciscato, F., Filadi, R., Urbani, A., Forte, M., Rasola, A., Szabò, I., Carraro, M., & Bernardi, P. (2021). Defining the molecular mechanisms of the mitochondrial permeability transition through genetic manipulation of F-ATP synthase. *Nature Communications*, *12*(1), 4835. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25161-x>
- Cervellera, C., Russo, M., Dotolo, S., Facchiano, A., & Russo, G. L. (2021). STL1, a New AKT Inhibitor, Synergizes with Flavonoid Quercetin in Enhancing Cell Death in A Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Line. *Molecules*, *26*(19), 5810. <https://doi.org/10.3390/molecules26195810>
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., & Izzo, N. J. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *6*.
- Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., & Audigier, Y. (1999). Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mechanisms of Development*, *84*(1), 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(99\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(99)00081-7)
- Dias-Pedroso, D., Guerra, J., Gomes, A., Oudot, C., Brenner, C., Santos, C. N., & Vieira, H. L. A. (2019). Phenolic Metabolites Modulate Cardiomyocyte Beating in Response to Isoproterenol. *Cardiovascular Toxicology*, *19*(2), 156–167. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9485-8>

- Fischer, C., Speth, V., Fleig-Eberenz, S., & Neuhaus, G. (1997). Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *The Plant Cell*, 9(10), 1767–1780. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1767>
- Fleming, I., & Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(1), R1–R12. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2002>
- Goldstein, J. A., Demetriou, D., Grines, C. L., Pica, M., Shoukfeh, M., & O'Neill, W. W. (2000). Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 343(13), 915–922. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431303>
- Graefe, E. U., Derendorf, H., & Veit, M. (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 37, 219–233.
- Gunata, M., & Parlakpınar, H. (2021). A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochemistry and Function*, 39(2), 190–217. <https://doi.org/10.1002/cbf.3587>
- Haluzíková, J., & Jabůrková, P. (b.r.). *Kvalita života u nemocných po akutním infarktu myokardu*. 5.
- Hollman, P. C. H., Bijlsman, M. N. C. P., van Gameren, Y., Cnossen, E. P. J., de Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 31(6), 569–573. <https://doi.org/10.1080/10715769900301141>
- Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., & Fujino, M. (2000). Molecular and Functional Characteristics of APJ: TISSUE DISTRIBUTION OF mRNA AND INTERACTION WITH THE ENDOGENOUS LIGAND APELIN\*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21061–21067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908417199>
- Huang, R.-Y., Yu, Y.-L., Cheng, W.-C., OuYang, C.-N., Fu, E., & Chu, C.-L. (2010). Immunosuppressive Effect of Quercetin on Dendritic Cell Activation and Function. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6815–6821. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903991>
- Hunter, T. (2000). Signaling—2000 and beyond. *Cell*, 100(1), 113–127. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81688-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81688-8)
- Hypoxie organismu. (2013). *Obečná patofyziologie*. <https://www.fsps.muni.cz/inovace-RVS/kurzy/patofyziologie/hypoxie.html>
- Chapman, N. A., Dupré, D. J., & Rainey, J. K. (2014). The apelin receptor: Physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochemistry and Cell Biology*, 92(6), 431–440. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0072>
- Chen, Y.-W., Chou, H.-C., Lin, S.-T., Chen, Y.-H., Chang, Y.-J., Chen, L., & Chan, H.-L. (2013). Cardioprotective Effects of Quercetin in Cardiomyocyte under Ischemia/Reperfusion Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, e364519. <https://doi.org/10.1155/2013/364519>
- Jones, S. P., & Bolli, R. (2006). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 40(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.09.011>

- K, R. M., & Ghosh, B. (1999). Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 21(7), 435–443. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(99)00024-7)
- Kang, Y. (2019). Management of post-cardiac arrest syndrome. *Acute and Critical Care*, 34(3), 173. <https://doi.org/10.4266/acc.2019.00654>
- Kang, Y., Kim, J., Anderson, J. P., Wu, J., Gleim, S. R., Kundu, R. K., McLean, D. L., Kim, J., Park, H., Jin, S., Hwa, J., Quertermous, T., & Chun, H. J. (2013). Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development. *Circulation Research*, 113(1), 22–31. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301324>
- Karimova, A., & Pinsky, D. J. (2001). The endothelial response to oxygen deprivation: Biology and clinical implications. *Intensive Care Medicine*, 27(1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s001340000790>
- Kim, H. P., Mani, I., Iversen, L., & Ziboh, V. A. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 58(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(98\)90125-9](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(98)90125-9)
- Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, 98(2), 367–381. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90447-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90447-X)
- Kleinz, M. J., & Davenport, A. P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 198–211. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.001>
- Klingenberg, M. (2008). The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(10), 1978–2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>
- Kloner Robert A., Bolli Roberto, Marban Eduardo, Reinlib Leslie, & Braunwald Eugene. (1998). Medical and Cellular Implications of Stunning, Hibernation, and Preconditioning. *Circulation*, 97(18), 1848–1867. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1848>
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., & Bedoya, F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214(3), 657. <https://doi.org/10.1042/bj2140657>
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Makovic, M., Schwaighofer, J., Beetz, N., Musialek, R., Neely, G. G., Komnenovic, V., Kolm, U., Metzler, B., Ricci, R., Hara, H., ... Penninger, J. M. (2007). Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circulation Research*, 101(4), e32-42. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.158659>
- Kurowska, P., Barbe, A., Różycka, M., Chmielińska, J., Dupont, J., & Rak, A. (2018). Apelin in Reproductive Physiology and Pathology of Different Species: A Critical Review. *International Journal of Endocrinology*, 2018, e9170480. <https://doi.org/10.1155/2018/9170480>
- Laver, S., Farrow, C., Turner, D., & Nolan, J. (2004). Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Medicine*, 30(11), 2126–2128. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2425-z>
- Leng, E., Xiao, Y., Mo, Z., Li, Y., Zhang, Y., Deng, X., Zhou, M., Zhou, C., He, Z., He, J., Xiao, L., Li, J., & Li, W. (2018). Synergistic effect of phytochemicals on cholesterol metabolism and lipid accumulation in HepG2 cells. *BMC*

- Complementary and Alternative Medicine*, 18, 122.  
<https://doi.org/10.1186/s12906-018-2189-6>
- Leroux, A. E., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. (2018). AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Seminars in Cancer Biology*, 48, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.05.011>
- Li, F., Li, D., Tang, S., Liu, J., Yan, J., Chen, H., & Yan, X. (2021). Quercetin Protects H9c2 Cardiomyocytes against Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis by Regulating the ERK1/2/DRP1 Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, e7522175. <https://doi.org/10.1155/2021/7522175>
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Liu, L., & Yenari, M. A. (2007). Therapeutic hypothermia: Neuroprotective mechanisms. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 816–825. <https://doi.org/10.2741/2104>
- Lloyd, A. C. (2006). Distinct functions for ERKs? *Journal of Biology*, 5(5), 13. <https://doi.org/10.1186/jbiol46>
- Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Beiser, A., & Levy, D. (1999). Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 353(9147), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10279-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10279-9)
- Loot, A. E., & Fleming, I. (2013). A Novel APJ Signaling Cascade That Regulates Cardiovascular Development. *Circulation Research*, 113(1), 4–6. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301632>
- Lotz, C., Herrmann, J., Notz, Q., Meybohm, P., & Kehl, F. (2021). Mitochondria and Pharmacologic Cardiac Conditioning—At the Heart of Ischemic Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3224. <https://doi.org/10.3390/ijms22063224>
- Magrone, T., Magrone, M., Russo, M. A., & Jirillo, E. (2020). Recent Advances on the Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Red Grape Polyphenols: In Vitro and In Vivo Studies. *Antioxidants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010035>
- Maltepe, E., & Saugstad, O. D. (2009). Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis-Clinical Implications. *Pediatric Research*, 65(3), 261–268. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181818fc83f>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Masri, B., Morin, N., Pedebernade, L., Knibiehler, B., & Audigier, Y. (2006). The Apelin Receptor Is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments \*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18317–18326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600606200>
- McPherson, B. C., & Yao, Z. (2001). Signal Transduction of Opioid-induced Cardioprotection in Ischemia-Reperfusion. *Anesthesiology*, 94(6), 1082–1088. <https://doi.org/10.1097/00000542-200106000-00024>
- McWhinney, C. D., Hansen, C., & Robishaw, J. D. (2000). Alpha-1 adrenergic signaling in a cardiac murine atrial myocyte (HL-1) cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 214(1), 111–119. <https://doi.org/10.1023/A:1007129723949>
- Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., Lawrie, K. W. M., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J. E., Herrity, N. C., Murdock,

- P., & Darker, J. G. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1162–1172. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x>
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J., & Michiels, C. (2000). ERK activation upon hypoxia: Involvement in HIF-1 activation. *FEBS Letters*, 468(1), 53–58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01181-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01181-9)
- Mitchell, A. E., Hong, Y.-J., Koh, E., Barrett, D. M., Bryant, D. E., Denison, R. F., & Kaffka, S. (2007). Ten-Year Comparison of the Influence of Organic and Conventional Crop Management Practices on the Content of Flavonoids in Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6154–6159. <https://doi.org/10.1021/jf070344+>
- Miura, T., Tanno, M., & Sato, T. (2010). Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovascular Research*, 88(1), 7–15. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq206>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124–1136. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
- Neely, Rovetto, M., Whitmer, J., & Morgan, H. (1973). Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 225(3), 651–658. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.225.3.651>
- Nolan, J. P., Neumar, R. W., Adrie, C., Aibiki, M., Berg, R. A., Böttiger, B. W., Callaway, C., Clark, R. S. B., Geocadin, R. G., Jauch, E. C., Kern, K. B., Laurent, I., Longstreth, W. T., Merchant, R. M., Morley, P., Morrison, L. J., Nadkarni, V., Peberdy, M. A., Rivers, E. P., ... Hoek, T. V. (2008). Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*, 79(3), 350–379. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2008.09.017>
- O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H. Q., Tsui, L.-C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., & Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 136(1), 355–360. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90495-O](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90495-O)
- Opletalová Barbora. (2021). *Kardioprotektivní účinky dehydrosilybinu – srovnání s účinkem apelinu* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého.
- Ošťádal, P. (2009). Ischemicko-reperfuční poškození po srdeční zástavě a protektivní účinky hypotermie. *Kardiologická Revue*, 11(1), 11–15.
- Özbek, N., Bali, E., & Karasu, Ç. (2015). Quercetin and hydroxytyrosol attenuates xanthine/xanthine oxidase-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by regulation of oxidative stress and stress-sensitive signaling pathways. *General physiology and biophysics*, 34. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2015021](https://doi.org/10.4149/gpb_2015021)
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Roth, S., Torregroza, C., Feige, K., Preckel, B., Hollmann, M. W., Weber, N. C., & Huhn, R. (2021). Pharmacological Conditioning of the Heart: An Update on Experimental Developments and Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2519. <https://doi.org/10.3390/ijms22052519>
- Salceda, S., & Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22642–22647. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22642>
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), 588–594. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80016-6](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80016-6)
- Semenza, G. L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine*, 7(8), 345–350. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02090-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02090-1)
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>
- Shahzad, T., Kasseckert, S. A., Iraqi, W., Johnson, V., Schulz, R., Schlüter, K.-D., Dörr, O., Parahuleva, M., Hamm, C., Ladilov, Y., & Abdallah, Y. (2013). Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.003>
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55(2), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>
- Souralová, B. T. (2018). *Specifická úloha izoforem kinázy AKT v maligní transformaci* [Diplomová práce]. Masarykova Univerzita.
- Šimek, S. (b.r.). *Léčba infarktu je závod s časem*. 3.
- Táborský, M., Ošťádal, P., Petřek, M., Heinc, P., Václavík, J., Lazárová, M., & Vítovec, J. (b.r.). *Máme v současné době dostatek důkazů o kardioprotektivním efektu konzumace mírného množství vína na kardiovaskulární onemocnění?* 5.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.-X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., & Fujino, M. (1998). Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(2), 471–476. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9489>
- Tekin, D., Dursun, A. D., & Xi, L. (2010). Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1085–1094. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.132>
- Tian, Y., Chen, R., Jiang, Y., Bai, B., Yang, T., & Liu, H. (2020). The Protective Effects and Mechanisms of Apelin/APJ System on Ischemic Stroke: A Promising Therapeutic Target. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2020.00075>

- Toufeksian, M.-C., de Lorgeril, M., Nagy, N., Salen, P., Donati, M. B., Giordano, L., Mock, H.-P., Peterek, S., Matros, A., Petroni, K., Pilu, R., Rotilio, D., Tonelli, C., de Leiris, J., Boucher, F., & Martin, C. (2008). Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Nutrition*, *138*(4), 747–752. <https://doi.org/10.1093/jn/138.4.747>
- Vergauwen, H., Prims, S., Degroote, J., Wang, W., Casteleyn, C., Van Cruchten, S., De Smet, S., Michiels, J., & Van Ginneken, C. (2016). In Vitro Investigation of Six Antioxidants for Pig Diets. *Antioxidants*, *5*(4), 41. <https://doi.org/10.3390/antiox5040041>
- Vojáček, J., Janský, P., & Janota, T. (2013). Third universal definition of myocardial infarction. *Cor et Vasa*, *55*(3), e228–e235. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2012.12.004>
- White, S. M., Constantin, P. E., & Claycomb, W. C. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: Use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *286*(3), H823–H829. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2003>
- Winter, J., Klumpe, I., Heger, J., Rauch, U., Schultheiss, H.-P., Landmesser, U., & Dörner, A. (2016). Adenine nucleotide translocase 1 overexpression protects cardiomyocytes against hypoxia via increased ERK1/2 and AKT activation. *Cellular Signalling*, *28*(1), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.11.002>
- Witek, P., Korga, A., Burdan, F., Ostrowska, M., Nosowska, B., Iwan, M., & Dudka, J. (2016). The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology*, *68*(6), 2407. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9957-2>
- Wortzel, I., & Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, *2*(3), 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Zern, T. L., & Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, *135*(10), 2291–2294. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2291>
- Zhang, P., Zhang, J., Zhao, L., Li, S., & Li, K. (2022). Quercetin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin–cyclophosphamide regimen and potentiates its chemotherapeutic effect against triple-negative breast cancer. *Phytotherapy Research*, *36*(1), 551–561. <https://doi.org/10.1002/ptr.7342>
- Zholobenko, A. V., Mouithys-Mickalad, A., Dostal, Z., Serteyn, D., & Modriansky, M. (2017). On the causes and consequences of the uncoupler-like effects of quercetin and dehydrosilybin in H9c2 cells. *PLOS ONE*, *12*(10), e0185691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185691>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AC	adenylát cyklasa
AKT	protein kinasa B
ANT	adenin-nukleotid translokasa
APJ	apelinový receptor
ARNT	translokátor aryluhlovodíkového receptoru
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DAG	diacylglycerol
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo medium
DMSO	dimethylsulfoxid
ERK1/2	extracelulární signálem regulovaná kinasa
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GRK	kinasy spřažené s G proteinem
HDAC	histondeacetylasy třídy II
HIF-1	hypoxií indukibilní faktor 1
HIV	vir lidské imunodeficiency
HRE	elementy reagující na hypoxii
HUVEC	lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly
IgG – HRP	protilátka navázaná na křenovou peroxidasu
IP3	inositol 1,4,5-trifosfát
ISCH	ischemické choroby srdeční
KLF2	Krüppel-faktor 2
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogenem aktivované proteinové kinasy
MEF2	myocytový zesilovací faktor 2
MKPs	MAP kinasové fosfatasy
NOS	syntasa oxidu dusnatého
ODDD	degradační doména závislá na kyslíku
PCAS	postresuscitační nemoc
PI3K	fosfatidylinositid 3-kinasa
PKA	protein kinasa A
PKB	protein kinasa B



PKC	protein kinasa C
PLC $\beta$	fosfolipasa C
ROS	reaktivní formy kyslíku
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$