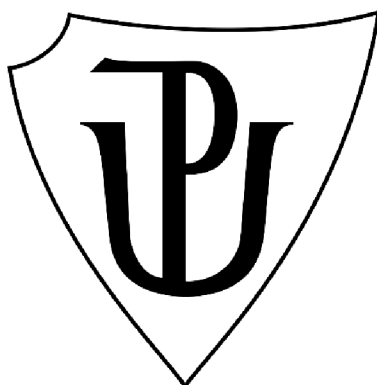


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Biologická aktivita 2,3-dehydrosilybinu**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Markéta Žáková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Zdeněk Dostál, 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 .....

.....  
Podpis studenta

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Zdeňku Dostálovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, připomínky, veškerý věnovaný čas, pomoc a rady, které mi dal.

Dále bych poděkovala Ing. Haně Přichystalové, Ph.D., stejně jako ostatním z kolektivu Ústavu lékařské chemie a biochemie, za vstřícný přístup, všestranné rady, ochotu a čas při vypracovávání experimentální části bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Bancířové, Dr. za pomoc s provedením experimentu souvisejícím s posouzením míry uvolňování oxidu dusnatého do média a MSc. Marině Ingremeau za izolaci použitých buněk.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Martině Kadláčkové a Richardu Masařovi za psychickou podporu, trpělivost, rady a ochotu pomoci.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Žáková
Název práce	Biologická aktivita 2,3-dehydrosilybinu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

2,3-dehydrosilybin je přírodní látka ze skupiny flavanolignanů vykazující velké množství pozitivních účinků, obzvláště kardioprotekci. Nicméně jeho komplexní mechanismus účinku není stále dostatečně popsán. Teoretická část práce je věnována oxidačnímu stresu a účinkům 2,3-dehydrosilybinu a endogenního peptidu apelinu-13 na srdeční tkáň. V experimentální části práce bylo cílem posoudit, zda souvisí působení 2,3-dehydrosilybinu s apelinovým receptorem. Hypotézy byly otestovány pomocí experimentů s 2,3-dehydrosilybinem, apelinem-13 a jeho antagonistou ML221 na primárních kulturách endoteliálních buněk lidské pupečnickové žíly. Součástí experimentální části bylo stanovení cytotoxicity 2,3-dehydrosilybinu a posouzení míry uvolňování oxidu dusnatého do média, které bylo prokázáno pouze v případě apelinu-13. Dále byla provedena imunodetekce, kdy bylo zjištěno, že 2,3-dehydrosilybin i apelin-13 mají vliv na fosforylaci proteinkinasy B a kinasy regulované extracelulárním signálem.

Klíčová slova	2,3-dehydrosilybin, oxid dusnatý, western blot
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český



## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Markéta Žáková
Title	Biological activity of 2,3-dehydrosilybin
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký university, Olomouc
Supervisor	Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

2,3-dehydrosilybin is a natural compound, part of flavonolignan group, which shows many positive effects, especially cardioprotection. However, its mechanism of action is still insufficiently understood. The theoretical part of the study concerns with oxidative stress and the effects of 2,3-dehydrosilybin and the endogenous peptide apelin-13 on cardiac tissue. The aim of the experimental part of the study was to assess whether the action of 2,3-dehydrosilybin is related to the apelin receptor. These hypotheses were tested by experiments with 2,3-dehydrosilybin, apelin-13 and its antagonist ML221 on primary cultures of human umbilical vein endothelial cells. The experimental part included determination of 2,3-dehydrosilybin cytotoxicity and assess the release rate of nitric oxide into the medium, which has been demonstrated only in the case of apelin-13. Lastly, an immunodetection analysis showed that 2,3-dehydrosilybin and apelin-13 affect phosphorylation of protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase.

Keywords	2,3-dehydrosilybin, nitric oxide, western blot
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>2</b>
2.1	Infarkt myokardu	2
2.2	Ateroskleróza	2
2.2.1	Oxidační stres v ateroskleróze	3
2.2.2	Antioxidační systémy	5
2.3	Ischemicko-reperfuzní poškození	7
2.3.1	Patofyziologie ischemicko-reperfuzního poškození	7
2.4	Silybin a 2,3-dehydrosilybin	8
2.4.1	Účinek 2,3-dehydrosilybinu na srdeční tkáň	9
2.4.1.1	Mechanismus kardioprotektivního účinku DHS	9
2.5	Apelin-13	12
2.5.1	Účinek apelinu-13 na kardiovaskulární systém	12
2.5.1.1	Vliv apelinu-13 na angiogenezi	13
2.5.1.2	Vliv apelinu-13 na vasodilataci	14
2.5.1.3	Apelin a inotropní účinek	15
2.5.1.4	Apelin a oxidační stres	16
2.5.1.5	Apelin-13 a srdeční selhání	17
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>19</b>
3.1	Materiál a přístroje	19
3.1.1	Chemikálie	19
3.1.1.1	Roztoky	20
3.1.2	Přístroje a pomůcky	22
3.1.3	Biologický materiál	23
3.2	Metody	23
3.2.1	Kultivace primárních kultur lidských endoteliálních buněk pupečníkové žíly	23
3.2.2	MTT test	24
3.2.3	Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně	24
3.2.4	Imunodetekční stanovení proteinů	25
3.2.5	SDS-PAGE elektroforéza, Western blot a detekce	26
3.2.6	Stanovení oxidu dusnatého	27
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	<b>28</b>
4.1	Kultivace	28
4.2	Stanovení cytotoxicity DHS	28
4.2.1	MTT test	28
4.2.2	Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně	29
4.3	Ověření přítomnosti apelinového receptoru	31
4.4	Evaluace vlivu jednotlivých látek na fosforylaci Akt a ERK1/2	31
4.4.1	Vliv 24hodinové inkubace s jednotlivými látkami na fosforylaci kinas	32
4.4.2	Vliv krátkodobé inkubace s jednotlivými látkami na fosforylaci kinas	33
4.5	Evaluace vlivu jednotlivých látek na míru uvolňování oxidu dusnatého do média	35
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>40</b>

<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých symbolů a zkratek</b>	<b>46</b>

## **CÍLE PRÁCE**

V teoretické části bakalářské práce bude cílem zpracovat přehled současného poznání o účincích 2,3-dehydrosilybinu na srdeční tkáň. V praktické části bude cílem evaluovat cytotoxicitu 2,3-dehydrosilybinu pomocí experimentu prováděného na primárních kulturách lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly (HUVEC) a zhodnotit vliv 2,3-dehydrosilybinu na míru uvolňování oxidu dusnatého (NO) do média a jeho spojitost s apelinovým receptorem. Pomocí imunodetekce bude ověřena přítomnost apelinového receptoru v testovaném buněčném modelu.

# 1 ÚVOD

Akutní infarkt myokardu a srdeční selhání, které po infarktu často následuje, patří mezi hlavní příčiny úmrtí a invalidity na celém světě (Ramachandra et al., 2020).

Infarkt myokardu můžeme definovat jako ložiskové ischemické odumírání části srdeční svaloviny. Během ischemie není daná část srdce dostatečně zásobena kyslíkem a dochází k poklesu hladiny adenosintrifosfátu (ATP) a poškození mitochondrií, ve kterých se po reperfuzi ve velké míře tvoří volné kyslíkové radikály (ROS) a způsobují v buňce oxidativní stres (Polderman, 2009; Widimský et al., 2009). V poslední době jsou v mnoha studiích zkoumány přírodní látky rostlinného původu, které by mohly zabránit rozvoji srdeční dysfunkce vyvolané oxidativním stresem. Zájem o tyto látky plyne zejména z jejich dostupnosti, nižší ceny a menší toxicity ve srovnání se syntetickými léky (Razavi & Karimi, 2016).

Silybin je hlavní aktivní složkou silymarinových flavonoidů extrahovaných ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Mimo jiné je používán k léčbě hepatitidy, jaterní cirhózy a má antineoplastickou aktivitu (Zholobenko & Modriansky, 2014).

2,3-dehydrosilybin (DHS) je jeho oxidovaným derivátem, který představuje minoritní složku silymarinu. Ve srovnání se silybinem vykazuje významně vyšší antioxidační a protirakovinnou aktivitu. Bylo také zjištěno, že má pozitivní inotropní účinek (zesiluje svalové kontrakce) v perfundovaném srdci dospělého potkana (Gabrielová et al., 2019). Jeho signální dráha ovšem není zcela známá, proto se experimentální část této práce zaměřuje na vliv DHS na fosforylaci ATP:protein fosfotransferasy (proteinkinasa B, Akt, EC 2.7.11.1) a ATP:protein fosfotransferasy (kinasa regulovaná extracelulárním signálem, ERK1/2, EC 2.7.11.24) ve spojitosti s apelinovým receptorem. Dále je v experimentální části zkoumán vliv DHS na produkci oxidu dusnatého (NO) v porovnání s peptidovým hormonem apelinem-13. U apelinu bylo dříve prokázáno, že má pozitivní účinek na kontraktilitu a pozitivní inotropní účinek na selhávající myokard (Koguchi et al., 2012).

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Infarkt myokardu**

Akutní infarkt myokardu a srdeční selhání, které po infarktu často následuje, patří mezi hlavní příčiny úmrtí a invalidity na celém světě (Ramachandra et al., 2020). Z hlediska patofyziologie lze infarkt myokardu definovat jako ložiskové ischemické odumírání části srdeční svaloviny, které vzniká v důsledku uzavření či nadměrného zúžení levé nebo pravé věnčité tepny. Koronární okluze je v naprosté většině případů způsobená koronární aterosklerózou (Widimský et al., 2009). Významné omezení nebo úplná blokáce průtoku krve do myokardu zamezí přístupu kyslíku a živin ke kardiomyocytům. Tento stav je označován jako akutní ischemie myokardu a vede ke smrti kardiomyocytů (Ramachandra et al., 2020).

Hlavním cílem v léčbě infarktu myokardu je snížit komplikace a mortalitu zvrácením ischemie myokardu a omezením velikosti infarktu (Rao & Viswanath, 2007).

### **2.2 Ateroskleróza**

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění. Je charakteristická akumulací lipidů a zánětlivých buněk ve stěnách středních a velkých tepen a je hlavní příčinou vzniku ischemické choroby srdeční a mozkové mrtvice (Malekmohammad et al., 2019).

Vzniku samotné aterosklerózy předchází endoteliální dysfunkce. Následně dochází k infiltrování a akumulaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) v subendoteliálním prostoru. LDL jsou v patologických stavech oxidovány za vzniku oxidovaných LDL (ox-LDL). Modifikované lipoproteinové částice a cytokiny zvyšují expresi buněčných adhezních molekul na endoteliálních buňkách, což vede ke shromažďování leukocytů (hlavně monocytů a T-lymfocytů) v subendoteliálním prostoru. Následně tyto buňky migrují do intimy. Monocyty se diferencují na makrofágy, exprimují scavenger receptory a internalizují modifikované lipoproteiny. V důsledku tohoto hromadění jsou makrofágy postupně přeměňovány na pěnové buňky a jejich přítomnost v arteriální stěně je charakteristický znak, poukazující na časnou aterosklerotickou lézi. Do intimy migrující T-lymfocyty a žírné buňky uvolňují různé cytokiny, které podporují zánět a tvorbu ROS. Na jejich tvorbě se podílí i pěnové buňky. Růstové faktory, které jsou uvolněny z těchto buněk spolu s ROS, stimulují migraci buněk hladkého svalstva do intimy a ukládání kolagenu, což vede k rozvoji aterosklerotického plátu. Zvýšená tvorba ROS také souvisí s indukcí sekrece metaloproteinasy (MMP, EC 3.4.24), které degradují vláknitou stěnu aterosklerotického plátu a bazální membránu, což vede k fyzickému

narušení plátu (Kattoor et al., 2017). Vzniklá ruptura aterosklerotického plátu má za následek přibližně 76 % všech fatálních koronárních trombů a má vyšší prevalenci u mužů (80 %) než u žen (60 %) (Falk, 2006).

Na rozvoji aterosklerózy se kromě oxidačního stresu podílejí také hypertenze, *diabetes mellitus*, inzulinová rezistence, obezita, stres, kouření, genetické predispozice a další (Malekmohammad et al., 2019).

### **2.2.1 Oxidační stres v ateroskleróze**

ROS mají za fyziologických podmínek důležitou signalizační roli. Jejich nadměrná produkce však vede při překročení kapacity dostupných antioxidačních obranných systémů k oxidačnímu stresu, který má klíčovou roli v progresi kardiovaskulárního onemocnění spojeného s aterosklerózou (Förstermann et al., 2017). Mezi hlavní reaktivní formy volných radikálů patří hydroxylový, hydroperoxylový a peroxylový radikál, superoxidový anion a oxid dusičitý. Mezi reaktivní neradikálové částice se pak řadí peroxid vodíku, peroxydusitany a dusitany (Malekmohammad et al., 2019).

ROS jsou produkovány oxidačními enzymy, a to zejména v makrofázích, buňkách hladkého svalstva cév a endoteliálních buňkách. K těmto oxidačním enzymům řadíme NAD(P)H:kyslík oxidoreduktasu (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát oxidasa, EC 1.6.3), xanthin:kyslík oxidoreduktasu (xantinoxidasa, EC 1.17.3.2), mitochondriální enzymy, lipoxygenasy (EC 1.13.11), chlorid:peroxid vodíku oxidoreduktasu (myeloperoxidasa, EC 1.11.2.2) a rozpřaženou endoteliální NO syntasu (eNOS, EC 1.14.13.39) (Malekmohammad et al., 2019).

Z pohledu oběhové soustavy jsou hlavním systémem generujícím ROS NADPH oxidasy. Jedná se o membránově vázané komplexy, které jsou exprimovány ve vaskulární tkáni za účelem produkce ROS, posttranslačního zpracování proteinů, buněčné signalizace, regulace genové exprese a buněčné diferenciaci. Jejich aktivace má za následek vznik superoxidového aniontu přenosem elektronu z NADPH na molekulu kyslíku (Bedard & Krause, 2007; Gracia et al., 2017; Kattoor et al., 2017). Navíc jsou zapojeny do vzájemné interakce mezi výše zmíněnými prooxidačními systémy. Například může rozpojit eNOS, aktivovat xantinoxidasu a spustit mitochondriální produkci ROS (Förstermann et al., 2017).

Systémem produkujícím superoxidové anionty na fyziologických úrovních jsou mitochondriální enzymy. V případě mitochondriální dysfunkce či selhání

antioxidačních mechanismů mají potenciál stát se patologickými a může docházet k nadměrné produkci ROS.

Xanthinoxidasy katalyzují přeměnu hypoxantinu na xanthin a dále jeho oxidaci na kyselinu močovou. Účastní se katabolismu pteridinů, purinů a dalších látek. Nacházejí se kromě endoteliálních buněk a plazmy také v aterosklerotickém plátu, a to ve zvýšeném množství. Podílí se na tvorbě superoxidových aniontů a peroxidu vodíku. Na souvislost aktivity xantinoxidasy s aterosklerózou ukazuje i fakt, že inhibitory xantinoxidas jsou schopné snížit rozvoj aterosklerózy u myšího modelu nebo zmírnit endoteliální dysfunkci u těžkých kuřáků (Förstermann et al., 2017).

Lipoxygenasy patří mezi nehemové dioxygenasy mastných kyselin, které jsou všudypřítomné v rostlinách a zvířatech. Katalyzující přeměnu kyseliny arachidonové na hydroperoxydy, které jsou dále redukovány na hydroxydy a leukotrieny. Ty jsou samy o sobě prozánětlivé a aktivují makrofágy a pěnové buňky. Vedou také k uvolňování cytokinů a MMP. Se samotnou aterogenezí souvisí zejména arachidonát:kyslík 5-oxidoreduktasa (5-lipoxygenasa, EC 1.13.11.34) a arachidonát:kyslík 15-oxidoreduktasa (12/15-lipoxygenasa, EC 1.13.11.33). Obě indukují aktivaci NADPH oxidas ve vaskulárních buňkách hladkého svalstva, což má za následek oxidační stres ve vaskulárních tkáních. Patologický význam 5-lipoxygenas podporuje i fakt, že jejich inhibice zlepšuje změny po zánětu při reperfuzi (Kattoor et al., 2017; Liavonchanka & Feussner, 2006).

Myeloperoxidasa se nachází hlavně v neutrofilech, kde poskytuje ochranu proti patogenům. V malé míře se nachází také v monocytech a při reakci s peroxidem vodíku vytváří hypohalogenové kyseliny, jako je kyselina chlorná (HClO) a kyselina hypothiokyanová (HOSCN). Dysfunkce tohoto systému generuje ROS a vyvolává oxidační stres. HOSCN navíc modifikuje LDL (respektive HDL) a zvyšuje katabolismus oxidu dusnatého, čímž spouští a zesiluje aterogenezi (Gracia et al., 2017).

Oxid dusnatý funguje jako intracelulární posel, který stimuluje rozpustnou guanylátcyklastu (sGC, EC 4.6.1.2), a tím uvolňuje hladké svaly v cévách. Je konstitutivně tvořen v endotelu aktivací eNOS. Díky tomu, že je NO nenabitý a vysoce rozpustný v hydrofobním prostředí, může volně difundovat přes biologické membrány a jeho prostorová distribuce v tkáních je velká (Rochette et al., 2013). Předpokládá se, že signalizace související s NO je hlavní složkou kardioprotekce proti ischemicko-reperfuznímu poškození cílenému na mitochondrie. V kardiomyocytech jsou exprimovány všechny 3 isoenzymy NO syntasy (NOS) – neuronální (nNOS,



NOS1), indukovaná (iNOS, NOS2) a endoteliální (eNOS, NOS3) (Gabrielová et al., 2019).

NO je důležitou signální molekulou pro regulaci životních funkcí. V podmínkách oxidačního stresu však reaguje se superoxidovými anionty za vzniku vysoce reaktivního peroxynitritu ( $\text{OONO}^-$ ). Peroxynitrit interaguje s kofaktory eNOS, což má za následek rozpřažení redukce kyslíku a syntézy NO. Rozpřažená eNOS produkuje superoxidové anionty místo NO a je tedy systémem generujícím ROS. Studie prokázaly inverzní vztah mezi dostupností kofaktorů eNOS a rozvojem endoteliální dysfunkce (Rochette et al., 2013, Kattoor et al., 2017). Kromě ROS může být eNOS inhibována také nedostatkem substrátu, kterým je L-arginin, či nedostatkem kofaktoru tetrahydrobiopterinu ( $\text{BH}_4$ ) (Zhou et al., 2016).

### **2.2.2 Antioxidační systémy**

Antioxidanty jsou molekuly, které jsou schopné zabránit interakci ROS s buněčnými biomolekulami a zabraňují tak změně jejich struktury nebo funkce (Malekmohammad et al., 2019).

Mezi hlavní enzymatické antioxidační systémy v cévní stěně patří superoxid:superoxid oxidoreduktasy (superoxiddismutasa, SOD, EC 1.15.1.1), glutathion:peroxid vodíku oxidoreduktasy (glutathionperoxidasa, GPx, EC 1.11.1.9), peroxid vodíku:peroxid vodíku oxidoreduktasy (katalasa, EC 1.11.1.6) a paraoxonasy (EC 3.1.8.1). Příkladem neenzymatických antioxidantů mohou být thioredoxiny, NO, vitaminy jako kyselina askorbová (vitamín C), tokoferol (vitamín E) a další přímé antioxidanty jako je glutathion (GSH) (Rochette et al., 2013).

SOD eliminují superoxidové anionty, a to jejich přeměnou na peroxid vodíku, který je dále degradován glutathionperoxidasami a katalasami. Ačkoli SOD může snižovat poškození zprostředkovaná superoxidovými anionty, může také paradoxně zvýšit oxidační stres, pokud není v buňce dostatek enzymů, které by metabolizovaly konečný produkt.

Katalasy se nacházejí v peroxisomech a přeměňují peroxid vodíku na kyslík a vodu. Zároveň bylo zjištěno, že zmírňují aterosklerózu u myši s vysokým obsahem tuku v těle (Yang et al., 2004).

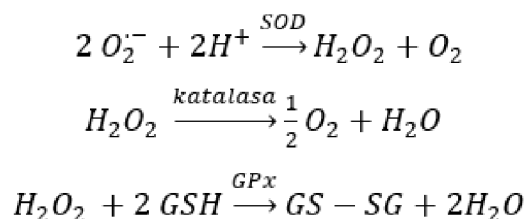
Glutathion a glutathionperoxidasy tvoří hlavní antioxidační obranný systém v savčích buňkách. GPx redukuje v přítomnosti GSH peroxid vodíku na vodu a lipidové hydroperoxy na odpovídající alkoholy. GSH je následně regenerován pomocí glutathion:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasy (glutathionreduktasa, EC 1.8.1.7). Bylo zjištěno, že nadměrná exprese GPx u myši snižovala proaterogenní děje i peroxidaci lipidů (Wagner et al., 2009, Deponte, 2013, Förstermann et al., 2017).

Paraoxonasy jsou rodinou proteinů, které snižují oxidační stres, peroxidaci lipidů a zmírňují aterosklerózu na zvířecích modelech (Förstermann et al., 2017).

Thioredoxinový systém (Trx) je tvořen z NADPH, thioredoxinu a thioredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktasy (thioredoxinreduktasa, EC 1.8.1.9). Antioxidační účinek spočívá v jeho disulfidreduktasové aktivitě regulující dithiol/disulfidovou rovnováhu v proteinech (Lu & Holmgren, 2014).

Syntasy oxidu dusnatého hrají při ateroskleróze jak antioxidační, tak prooxidační roli. eNOS je konstitutivně exprimována v endoteliálních buňkách. NO produkovaný aktivací eNOS inhibuje oxidaci LDL, adhezi a migraci leukocytů (Kattoor et al., 2017).

Rovnice působení vybraných antioxidačních enzymů jsou vyobrazeny na Obr. 1.



Obr. 1: Rovnice působení hlavních antioxidačních enzymů.

## **2.3 Ischemicko-reperfuzní poškození**

Ischemická choroba srdeční se stala celosvětovým zdravotním problémem, který postihuje všechny ekonomické skupiny společnosti (Rao & Viswanath, 2007).

Dočasná okluze koronární arterie způsobuje ischemii myokardu. Závažnost ischemie závisí na délce jejího trvání a nerovnováze mezi potřebou a zásobou kyslíku. (Guaricci et al., 2018).

Ischemicko-reperfuzní poškození je hlavním patologickým faktorem průběhu ischemické choroby srdeční. Reperfuze po ischemii myokardu je spojena s jeho poškozením a má klinický význam v situacích jako jsou infarkt myokardu, koronární angioplastika, koronární revaskularizace a transplantace srdce (Rao & Viswanath, 2007).

### **2.3.1 Patofyziologie ischemicko-reperfuzního poškození**

Během ischemie není daná část srdce dostatečně zásobena kyslíkem a dochází k poklesu hladiny ATP a také kreatinfosfátu. Při nedostatku kyslíku zároveň dochází k anaerobnímu získávání energie. Anaerobní glykolýza vede ke zvýšení hladiny intracelulárního anorganického fosfátu, laktátu a vodíkových iontů, což má za následek jak intracelulární, tak i extracelulární acidózu a příliv vápenatých iontů do buňky. Nízký obsah ATP, buňce znemožňuje odstranění přebytečných vápenatých iontů. Konkrétně je tento problém způsoben selháním sodno-draselné ATPasy (EC 7.2.2.13) a sodných, draselných a vápníkových kanálů, což je spojeno s dalším přílivem vápenatých iontů do buňky. Vápenaté ionty představují důležité signální molekuly a jejich přebytek je pravděpodobně spojen s aktivací řady intracelulárních enzymů (proteas a kinas). Na mitochondriální membráně je standardně negativní potenciál, který usnadňuje transport pozitivně nabitých vápenatých iontů do matrix mitochondrií. Ve výsledku je způsobena mitochondriální dysfunkce narušením elektrochemického potenciálu a dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku a dusíku. V takto poškozených mitochondriích se po reperfuzi ve velké míře tvoří ROS a způsobují v buňce oxidační stres. Ačkoli jsou v organismu přítomny různé antioxidační mechanismy, produkce volných radikálů po ischemii a následné reperfuzi je tak velká, že převyšuje kapacitní možnosti těchto obranných mechanismů, což vede k peroxidaci lipidů a oxidativnímu poškození proteinů a nukleových kyselin (Polderman, 2009).

Může docházet k poškozením, jako jsou reperfuzní arytmie, mikrovaskulární poškození a buněčná smrt (apoptóza či nekróza) (Dhalla et al., 2000).

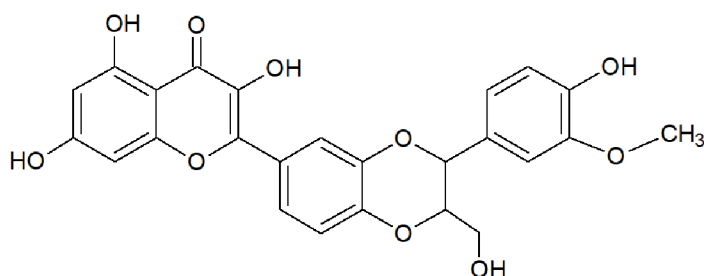
Mezi další dysfunkce myokardu po ischemii a reperfuzi patří tzv. myocardial stunning, kdy dochází k částečnému či zcela reversibilnímu zhoršení kontraktilní funkce. Jedná se o jak systolickou, tak diastolickou dysfunkci myokardu. Při vznikající endoteliální dysfunkci dochází k tvorbě vazokonstrikčních látek, které umocňují snížení průtoku krve. Mezi vazokonstriktory snižující dostupnost oxidu dusnatého se řadí i ROS (Guaricci et al., 2018).

## 2.4 Silybin a 2,3-dehydrosilybin

V poslední době jsou přírodní látky rostlinného původu zkoumány v mnoha studiích. Jejich cílem je zabránit rozvoji srdeční dysfunkce vyvolané oxidačním stresem. Zájem o tyto látky plyne zejména z jejich dostupnosti, nižší ceny a menší toxicity ve srovnání se syntetickými léky (Razavi & Karimi, 2016).

Silybin je hlavní aktivní složkou silymarinových flavonoidů extrahovaných ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Mimo jiné je používán k léčbě hepatitidy, jaterní cirhózy a má antineoplastickou aktivitu (Zholobenko & Modriansky, 2014).

2,3-dehydrosilybin (Obr. 2) je jeho oxidovaným derivátem, který představuje minoritní složku silymarinu, standardizovaného extraktu ostropestřce mariánského. Ve srovnání se silybinem vykazuje významně vyšší antioxidační a protirakovinovou aktivitu. V současnosti roste zájem o studium jeho kardioprotektivních vlastností, které jsou výsledkem jeho cytoprotektivních, antioxidačních a chemopreventivních účinků (Gabrielová et al., 2019). Dehydrogenace silybinu ovšem vede ke zhoršené rozpustnosti ve vodě, což omezuje terapeutickou účinnost DHS (Tong et al., 2011).



Obr. 2: Chemická struktura 2,3-dehydrosilybinu. Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

## **2.4.1 Účinek 2,3-dehydrosilybinu na srdeční tkáň**

Bylo prokázáno značné množství pozitivních účinků silymarinu. Jeho extrakt je ovšem směsí polyfenolických sloučenin a za jeho kardioprotektivní aktivitu by tedy mohla být zodpovědná kterákoliv z nich (Zholobenko & Modriansky, 2014).

Při zkoumání jednotlivých minoritních částí bylo zjištěno, že DHS je schopen buněčné deenergizace a snižuje tvorbu mitochondriálních ROS. Zároveň zvyšuje spotřebu kyslíku doprovázenou poklesem potenciálu mitochondriální membrány. Byla vytvořena domněnka, že DHS chrání kardiomyocyty před poškozením zprostředkovaným ROS díky tomu, že se chová jako odpráhovač. Tedy jako sloučenina schopná transportu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, která může odpojit generování protonmotivní síly od syntézy ATP (Gabrielová et al., 2010).

Dále bylo také zjištěno, že DHS má pozitivní inotropní účinek v perfundovaném srdci dospělého potkana (Gabrielová et al., 2019).

### **2.4.1.1 Mechanismus kardioprotektivního účinku DHS**

Jak již bylo zmíněno dříve, ischemie způsobuje vážné mitochondriální poruchy, mezi které patří zastavení syntézy ATP a inhibice buněčného dýchání, což je doprovázeno zvýšením koncentrace vápenatých iontů a fosfátů v buňce. Při následné reperfuzi dochází k velkému nárůstu ROS, které pocházejí z dýchacího řetězce. Tyto faktory dohromady zapříčiňují trvalé otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (MPTP) ve vnitřní mitochondriální membráně, což je hlavní příčinou nekrotické buněčné smrti při ischemicko-reperfuzním poškození. Kardioprotekce tedy musí zahrnovat prevenci otevření MPTP (Garlid et al., 2009).

Ochrana před ischemicko-reperfuzním poškozením myokardu bývá často zaměřena na ischemickou pre- a post-kondicionaci. Při prekondicionování dochází 5 - 10 minut před ischemickou zátěží ke krátkým koronárním okluzím. Postkondicionování se provádí ještě kratšími (sekundovými) okluzemi, a to několik sekund po skončení ischemie. První minuty reperfuze jsou vhodné pro postkondicionování, neboť v prvních minutách po ukončení ischemie dochází k největšímu reperfuznímu poškození z důvodu vyplavení ROS (Folino et al., 2015). Mechanismus kondicionování může být napodoben pomocí různých farmakologických činidel, které aktivují různé receptory, např.  $\alpha$ -adrenergní, opioidní nebo adenosinové receptory (Khan et al., 2020).

Bylo zjištěno, že ochranné účinky ischemického postkondicionování v izolovaném srdci závisí na ATP:protein fosfotransferase (proteinkinasa C-epsilon, PKC $\epsilon$ ,

EC 2.7.11.13). PKC $\epsilon$  je aktivována fosforylacemi ve své katalytické doméně, kdy fosforylace na Ser729 zvyšuje kardioprotekci a ztráta fosfátu na Ser729 je spojena s translokací PKC $\epsilon$  do buněčné periferie nebo jádra (Gabrielová et al., 2015b). Mitochondriální PKC $\epsilon$  může navíc přímo interagovat s MPTPs v srdci a inhibovat jejich otevření (Baines et al., 2003).

Postkondicionování buněk pomocí DHS zabránilo poklesu množství fosforylovaného pPKC $\epsilon$  v pozici Ser729 ve srovnání s celkovým PKC $\epsilon$  v reakci na hypoxii a následnou reoxygenaci kardiomyocytů. To prokazuje, že DHS ovlivňuje signální dráhy, které ovlivňují stav fosforylace PKC $\epsilon$ , a to včetně adrenergických drah. Tím pádem může být DHS pozitivním modulátorem srdečních funkcí za různých (pato)fyziologických podmínek (Gabrielová et al., 2015b).

Gabrielová et al. (2015b) zjistili, že je DHS inotropní činidlo, jehož aktivita závisí na přítomnosti endogenních katecholaminů. Vyloučili, že by DHS působil jako  $\beta$ -agonista či  $\beta$ -antagonista, což může snižovat pravděpodobnost negativních vedlejších účinků, pokud by byl silymarin nebo samotný DHS kombinován s jinými kardiovaskulárními léčivy.

Jelikož byla vyslovena hypotéza, že kardioprotekce vyvolaná DHS je pravděpodobně zprostředkována rozpojením na mitochondriální úrovni (Gabrielová et al., 2010), byl dále zkoumán účinek DHS na celé buňky. Bylo zjištěno, že krátkodobá inkubace ve fyziologických koncentracích DHS nemá žádný bezprostřední účinek na respirační parametry buňky. DHS navíc neovlivňuje mitochondriální koncentraci vápenatých iontů, ale vyvolává příliv extracelulárních vápenatých iontů do cytoplazmy. Z těchto informací lze usoudit, že je nepravděpodobné, aby byla ochrana poskytovaná fyziologicky tolerovanými koncentracemi DHS způsobena rozpojením. Pre- či postkondicionování je tedy pravděpodobně zprostředkováno zesílením adrenergické signalizace. Vzhledem k tomu, že DHS ovlivňuje potenciál plazmatické membrány a koncentraci vápenatých iontů v celé buňce, je pravděpodobné, že působí primárně na plazmatické membráně (Zholobenko et al., 2017).

Informace o tom, že nízká koncentrace DHS je účinná, spouští pouze mírnou stimulaci srdeční aktivity a zároveň působí na úrovni plazmatické membrány vedla k myšlence srovnat mechanismus působení DHS se signálními drahami hormonálních nebo hormonům podobných efektorů, např. bradykininem (Gabrielová et al., 2019).

Bradykinin (BK) je vasodilatátor, jehož činnost je doprovázena snížením krevního tlaku v ischemické tkáni. Má kardioprotektivní účinek při ischemickém

prekondicionování prostřednictvím aktivace signální dráhy ATP:1-fosfatidyl-1D-*myo*-inositol 3-fosfotransferasa (fosfatidylinositol-3-kinasa, PI3K, EC 2.7.1.137)/Akt/eNOS a regulace redoxního stavu přes uvolňování NO (Sharma et al., 2015).

Bylo zjištěno, že v mitochondriích se nachází několik různých ATP:protein-L-tyrosin *O*-fosfotransferas (Src tyrosinkinasa, EC 2.7.10.2). Src tyrosinkinasa v srdečních mitochondriích je spojována se snížením poškození buněk (Gabrielová et al., 2019). Pro kardioprotekci zprostředkovanou BK jsou zásadní Src kinasa, eNOS, guanylylcyklasa, ATP:protein fosfotransferasa závislá na cGMP (proteinkinasa G, PKG, EC 2.7.11.12), mitochondriální ATP-senzitivní draslíkový kanál a ROS (Oldenburg et al., 2004).

Kardioprotektivní účinek je pak rušen 4-amino-3-(4-chloridofenyl)-1-(*t*-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinem (PP2), což je inhibitor Src kinasy. Bylo zjištěno, že PP2 kromě účinku BK významně snížil i účinek DHS. Inhibice účinku DHS pomocí PP2 však nebyla natolik velká jako v případě BK (Gabrielová et al., 2019).

Bylo dokázáno, že prekondicionování pomocí DHS je schopné zlepšit biomechanické parametry ve srovnání s neléčeným srdcem. Prekondicionováním lze také omezit velikost infarktu spojeného s ischemicko-reperfučním poškozením a omezit uvolnění (*S*)-laktát:NAD<sup>+</sup> oxidoreduktasy (laktátdehydrogenasa, LDH, EC 1.1.1.27), která je historicky markerem pro diagnostiku ischemické choroby srdeční. Poslední dva zmíněné účinky jsou propojeny, protože čím větší je poranění (velikost infarktu), tím více LDH se uvolňuje. BK použitý ve stejné koncentraci jako DHS vykazoval pozitivní účinek na srdeční biomechanické parametry. Nicméně při srovnání byly některé parametry ovlivněny více DHS a jiné BK, ale celkový dojem vede k hypotéze, že oba mohou působit stejnou nebo podobnou signální cestou. Byla taktéž testována přítomnost eNOS v izolovaných ošetřených a kontrolních srdcích. Bylo zjištěno, že přítomnost eNOS je větší v srdcích ošetřených DHS než u srdcí ošetřených BK. Zatímco PP2 ovlivňuje hladinu eNOS v srdcích ošetřených DHS, neovlivňuje totéž u srdcí ošetřených BK, což naznačuje, že je rozdíl mezi oběma efekty. Je tedy pravděpodobné, že DHS zlepšuje endoteliální aktivitu a účinek je částečně závislý na Src kinase. Přesný mechanismus kardioprotektivní aktivity DHS je však stále neobjasněný (Gabrielová et al., 2019).





Bylo zjištěno, že pre-pro-apelin a APJ mají podobné sekvence aminokyselin jako angiotensin II (Ang II) a receptor angiotenzinu II typu 1 (AT<sub>1</sub>R). Ang II se podílí na různých kardiovaskulárních onemocněních. Systém apelin/APJ působí jako kontraregulátor systému renin-angiotenzin (RAS), ve kterém hraje ústřední roli Ang II. Antagonismus apelinu vůči RAS ukazuje, že apelin vykazuje důležitý ochranný účinek proti remodelaci srdeční tkáně po infarktu myokardu.

Terapeutické využití apelinu je omezeno především jeho stabilitou (plazmatický poločas apelinu je 8 minut) a rozsahem jeho účinku (Folino et al., 2015).

### **2.5.1.1 Vliv apelinu-13 na angiogenezi**

Zúžení velkých tepen, způsobená aterosklerózou, zánětlivými procesy a dalšími událostmi mohou zapříčinit ischemii v různých tkáních a orgánech. Ischemie může vést k redukci množství funkčních kapilár a progresi ischemické ulcerace a gangrény. Proto je terapeutická angiogeneze nezbytná pro obnovení průtoku krve do ischemických tkání a orgánů (Kidoya et al., 2010). Bylo zjištěno, že apelin hraje roli v angiogenezi (novotvorbě krevních kapilár), neboť podporuje proliferaci, migraci a tvorbu trubic *in vitro* na modelu myokardiálních endoteliálních buněk (Yang et al., 2014).

Kromě angiogeneze přispívá apelin také k postischemické regeneraci cév. U myši s ischemickým poškozením zadní končetiny apelin spolu s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) podporuje vývoj relativně velkých neporušených cév (Kidoya et al., 2010).

Protože apelin indukuje fosforylaci eNOS v endoteliálních buňkách a NO se účastní procesu angiogeneze, předpokládá se, že je role apelinu při tvorbě cév spojena s tvorbou NO (Folino et al., 2015). Apelin stimuluje angiogenezi v myokardiálních mikrovaskulárních endoteliálních buňkách prostřednictvím fosforylace Thr-172 ATP:[hydroxymethylglutaryl-CoA reduktasa (NADPH)] fosfotransferasy (AMP-aktivovaná proteinkinasa, AMPK, EC 2.7.11.31) a prostřednictvím fosforylace Ser-1179 eNOS. Výše zmíněná data byla podložena experimenty s inhibitory - sloučeninou C (inhibice AMPK) a LY294002 (inhibitorem fosfatidylinositol-3-kinasy – PI3K) (Yang et al., 2014).

### 2.5.1.2 Vliv apelinu-13 na vasodilataci

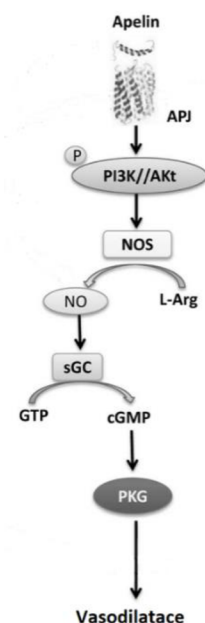
Dřívější studie kardiovaskulární aktivity apelinu odhalily jeho vasodilatační a hypotenzní účinky. Po navázání apelinu na APJ endoteliálních buněk je indukována fosforylace eNOS prostřednictvím aktivace dráhy PI3K/Akt. Vzniklé NO difunduje do vaskulárních buněk hladkého svalstva (VSMC), kde aktivuje sGC. Výsledkem je intracelulární zvýšení koncentrace cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) v cílových buňkách s následnou aktivací cGMP senzitivní proteinkinasy G. Její aktivace indukuje zpětné vychytávání vápníku sarkoplazmatickým retikulem (SR) prostřednictvím aktivace vápenaté ATPasy sarko/endoplazmatického retikula (SERCA, EC 7.2.2.10), což má za následek podporu vasodilatace (Zhou et al., 2016). Výše popsaná dráha je znázorněna na Obr. 4.

PKG také podporuje defosforylaci lehkých řetězců myosinu, která je zodpovědná za snížení počtu příčných můstků, což má hlavní význam při inhibici kontrakce hladkého svalstva (Folino et al., 2015).

Role dráhy apelin/APJ během kardiovaskulárních poruch spojených s endoteliální dysfunkcí zůstává ovšem nejasná, neboť v několika studiích bylo zjištěno, že v nepřítomnosti funkčního endotelu se apelin váže na APJ receptory vaskulárních buněk hladkého svalstva a způsobuje jejich kontrakci, což může přispívat k hypertenzi.

Mechanismus účinku je založen na aktivaci fosfolipasy C (PLC, EC 3.1.4.11) a s ní související produkcí inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerolu (DAG). Tyto mediátory vedou ke kontrakci prostřednictvím zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů a fosforylace lehkých řetězců myosinu.

Ke zvýšení koncentrace vápenatých iontů v buňce dochází také vlivem membránové depolarizace, která vede k otevření vápníkových kanálů typu L, čímž dochází ke vstupu vápenatých iontů z extracelulárního prostoru do cytosolu (Fan et al., 2019). Tyto vápenaté ionty dále stimulují otevření ryanodinových receptorových kanálů (RyR), což vede k uvolnění vápenatých iontů ze zásob endoplazmatického retikula. Také DAG přispívá ke zvýšení hladiny vápenatých iontů v buňce prostřednictvím PKC, která zprostředkovává aktivaci sodno-vodíkových a sodno-vápenatých kanálů (Folino et al., 2015).



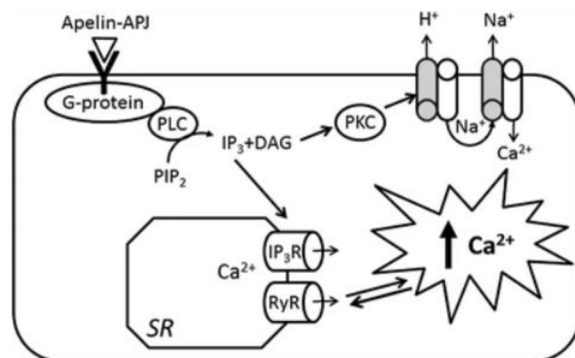
Obr. 4: Schéma dráhy působení apelinu na vasodilataci. APJ apelinový receptor, Akt proteinkinasa B, cGMP cyklický guanosinmonofosfát, GTP guanosintrifosfát, L-Arg L-arginin, NO oxid dusnatý, NOS syntasa oxidu dusnatého, PI3K fosfatidylinositol-3-kinasa, PKG protein kinasa G, rozpustná guanosincyklasa (sGC). Převzato a upraveno podle Zhou et al., 2016.

### 2.5.1.3 Apelin a inotropní účinek

Uvádí se, že apelin vyvolává inotropii myokardu u izolovaných preparátů. Zdá se, že různé trvání účinku nezávisí na jednotlivých izoformách apelinu, protože (pyr)apelin-13, apelin-13 a apelin-36 vykazují srovnatelnou sílu a účinnost při navození pozitivního inotropního účinku (Folino et al., 2015).

Apelin může zvýšit kontraktilitu myokardu prostřednictvím zvýšení intracelulární hladiny vápníku. Zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů je zprostředkováno pomocí aktivace sodno-draselných a sodno-vápenatých kanálů nebo aktivací IP<sub>3</sub>R a RyR receptorů uvolňujících vápenaté ionty ze SR (Yamaleyeva et al., 2016).

Schéma apelinem indukované zvýšené kontraktility prostřednictvím mechanismu závislém na vápníku je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5: Apelinem indukovaná zvýšená kontraktilita prostřednictvím mechanismu závislém na vápníku. PLC fosfolipasa C,  $PIP_2$  fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, DAG diacylglycerol,  $IP_3$  inositol trifosfát, PKC protein kinasa C, NHE sodno-vodíková pumpa, NCE sodno-vápenatá pumpa,  $IP_3R$   $IP_3$  receptorový kanál, RyR ryanodinový receptorový kanál, SR sarkoplazmatické retikulum. Převzato z Folino et al., 2015.

#### 2.5.1.4 Apelin a oxidační stres

Bylo zjištěno, že apelin-13 může podporovat tvorbu ROS v buňkách vaskulárního hladkého svalstva a systém apelin/APJ je tak mediátorem oxidačního stresu ve vaskulární tkáni. Apelinen-13 způsobený nárůst ROS indukují proliferaci buněk hladkého svalstva cév, která může vést k ateroskleróze, a to prostřednictvím signální dráhy ERK1/2. Bylo prokázáno, že ERK1/2, jakožto důležitý mitogenní signál, se účastní proliferace buněk hladkého svalstva cév (Li et al., 2011).

Na druhou stranu během ischemicko-reperfuzního poškození apelin v buňkách myokardu inhibuje mitochondriální oxidační poškození a peroxidaci lipidů zvýšením aktivity SOD. Tím pádem omezí působení volných kyslíkových radikálů (klíčového faktoru zapojeného do ischemicko-reperfuzního poškození). Apelin tak chrání myokard před oxidačním stresem a snižuje poškození způsobené ischemií a následnou reperfuzí (Duan et al., 2019; Zeng et al., 2009).

Bylo prokázáno, že apelin může aktivovat eNOS a zvýšit uvolňování NO pomocí signální kaskády reperfuzního poškození (RISK). (Zhou et al., 2016). Dráhu RISK představují PI3K/Akt a ERK1/2 (Yang et al., 2015).

Oxid dusnatý ruší poškození mitochondrií oxidanty u kardiomyocytů dospělých potkanů. NO je schopen inhibovat produkci neutrofilních superoxidových aniontů přímým působením na membránové složky NADPH oxidasy a podjednotky NADH/NADPH oxidasy (Zeng et al., 2009). Dá se tedy konstatovat, že v procesu

ischemie a následné reperfuze hraje apelin antagonistickou roli a má ochranný účinek na myokard.

### **2.5.1.5 Apelin-13 a srdeční selhání**

Roli dráhy apelin/APJ v patogenezi srdečního selhání je věnována velká pozornost. Bylo prokázáno, že podání apelinu bezprostředně po ischemickém inzultu může zmírnit srdeční dysfunkci během časně reperfuze a to potlačením apoptózy myokardu a rezistencí vůči ROS (Tycinska et al., 2012).

Skutečnost, že apelin může omezit okamžité a opožděné následky ischemie myokardu, podtrhuje jeho možnou roli v léčbě onemocnění koronárních tepen. Deficit apelinu u lidí trvale zhoršuje ischemicko-reperfuzní poškození, včetně rozšíření velikosti infarktu, souvisejícího zánětu a mortality (Folino et al., 2015).

Regulace dráhy apelin/APJ je při akutním ischemickém poranění pozměněna. Hypoxie reguluje expresi a sekreci genu apelinu v kardiomyocytech. Indukce apelinu při hypoxii by tedy mohla být součástí akutní reakce srdečního svalu na zhoršené zásobování kyslíkem, např. v době infarktu myokardu (Tycinska et al., 2012). V reakci na hypoxii je zvýšení exprese apelinu zprostředkováno hypoxií indukovaným faktorem-1 (HIF-1).

Bylo zjištěno, že při exogenním podání apelinu před ischemií nedochází k žádné ochraně myokardu. Při podání apelinu na začátku reperfuze ovšem dochází k významnému snížení velikosti infarktu a postischemickému zotavení.

Expese endogenní apelinové mRNA se významně zvyšuje na konci ischemie a na kontrolní hodnotu se vrací po 60 minutách reperfuze. Naproti tomu expese APJ mRNA se na konci ischemie nemění. To znamená, že apelin napodobuje spíše postkondicionování, a že endogenní produkce apelinu během ischemie může představovat proces vlastní ochrany myokardu (Folino et al., 2015).

Apelin chrání srdce před ischemicko-reperfuzním poškozením dvěma cestami - cestou závislou na NO a cestou nezávislou na NO. Cesta závislá na NO začíná aktivací dráhy PI3K/Akt, která je zodpovědná za aktivaci eNOS. Inhibice PI3K pomocí LY294002 pak ruší apelinem indukovanou redukci velikosti infarktu. Role PI3K byla potvrzena zvýšenou fosforylací Akt v myších izolovaných srdcích během reperfuze. Druhá cesta je cesta nezávislá na NO. Fosforylace ERK1/2 a účinek její inhibice naznačují, že za ochrannou aktivitu apelinu je zodpovědná kaskáda nezávislá na NO, která je vyvolaná aktivací G proteinu. Výsledkem této kaskády je snížení exprese

proapoptotických proteinů. Obě tyto ochranné dráhy zabraňují otevření MPTP, který je, jak již bylo řečeno, klíčovým faktorem ischemicko-reperfuzního poškození (Folino et al., 2015).

Závěrem bylo zjištěno, že podávání apelinu-13 nebo jeho modifikované formy, (pyr)apelinu-13, má antihypertenzní a vasodilatační účinky. Jeho centrální aplikace však zvyšuje krevní tlak a v případě endoteliální dysfunkce mohou být jeho účinky opačné. Kardioprotektivní účinky apelinu po infarktu myokardu a pozitivní inotropní účinky naznačují jeho terapeutický potenciál v prevenci a léčbě srdečního selhání a následků ischemie myokardu. Terapeutické použití apelinu je však omezeno především jeho krátkým poločasem a parenterálním podáváním. V posledních letech se studie zaměřují zejména na vývoj nových agonistů, způsobů podávání a zlepšení účinnosti agonistů u APJ (Yamaleyeva et al., 2016).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a přístroje

##### 3.1.1 Chemikálie

Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok) (Merck, kat. č. 1.00641.1000)

Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, kat. č. RPN2232)

Propanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 402893)

Bromfenolová modř (Sigma Aldrich, kat. č. B0126)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, kat. č. D2650)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, kat. č. D0632)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma Aldrich, kat. č. L5750)

Fetální bovinní sérum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, kat. č. SV 30160.03)

Gentamicin (Sandoz, reg. č. 15/ 278/91-B/C)

Fluorid sodný (Sigma Aldrich, kat. č. S7920)

Glycerol (Sigma Aldrich, kat. č. G2025)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner, kat. č. 30175-AP0-G1000-1)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Serva, kat. č. 11930.03)

Chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0-G1000-1)

Chlorid vápenatý (Lach-Ner, kat. č. 30096-AP1-G1000-1)

ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, kat. č. sc-2048)

Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová (EGTA) (Sigma Aldrich, kat. č. E4378)

Kyselina chlorovodíková 35% (Penta, kat. č. 19360-11000)

Kyselina octová 99% (Lach-Ner, kat. č. 10047-A99)

Methanol (Sigma Aldrich, kat. č. 322415)

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva, kat. č. 35930)

Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich, kat. č. A3678)

Ponceau S (Sigma Aldrich, kat. č. P3504)

Protilátky primární:

Akt (Cell Signaling, kat.č. 9272)

$\beta$ -tubulin (Cell Signaling, kat. č. 2146)

Fosfo-Akt (S473) (Cell Signaling, kat. č. 9271)

Fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Thr204) (E10) (Cell Signaling, kat. 9106)

GAPDH (Cell Signaling, kat. č.5174)

p44/42 MAPK (ERK1/2) (Cell Signaling, kat. č.9102)

Protilátky sekundární konjugované s křenovou peroxidasou:

Anti-mouse IgG (Cell signaling, kat. č. 7076)

Anti-rabbit IgG (Cell signaling, kat. č. 7074)

Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> 5× Transfer Buffer (BioRad, kat. č. 10026938)

Triton X-100 (Sigma Aldrich, kat. č. T9284)

Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma Aldrich, kat. č. P1379)

Tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris) (Carl Roth, kat. č. 0188.4)

Vanadičnan trisodný (Sigma Aldrich, kat. č. S6508)

### **3.1.1.1 Roztoky**

#### **BCA pracovní činidlo:**

Reagent A/reagent B (50:1, v/v)

#### **HUVEC pufr pro přípravu celkových lyzátů:**

Tris (20 mmol·l<sup>-1</sup>), EGTA (5 mmol·l<sup>-1</sup>), NaCl (150 mmol·l<sup>-1</sup>), glycerolfosfát (20 mmol·l<sup>-1</sup>), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mmol·l<sup>-1</sup>), NaF (1 mmol·l<sup>-1</sup>), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas Complete<sup>™</sup> (1 tableta v 50 ml), pH=7,5.

#### **Krebs-Henseleitův roztok (bez glukózy):**

NaCl (118 mmol·l<sup>-1</sup>), KCl (5,9 mmol·l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (1,75 mmol·l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mmol·l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mmol·l<sup>-1</sup>), EDTA (0,5 mmol·l<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (25 mmol·l<sup>-1</sup>), pH=7,4.

#### **Koncentrovaný roztok PBS (10×):**

NaCl (137 mmol·l<sup>-1</sup>), KCl (2,68 mmol·l<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O (8,96 mmol·l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,47 mmol·l<sup>-1</sup>), pH=7,4.

#### **Médium pro růst endoteliálních buněk (PromoCell<sup>®</sup>, Německo) doplněno o:**

Fetální bovinní sérum (2 %), doplněk pro růst endoteliálních buněk (0,4 %), epidermální růstový faktor (0,1 ng·ml<sup>-1</sup>), základní fibroblastový růstový faktor (1 ng·ml<sup>-1</sup>), heparin (90 μg·ml<sup>-1</sup>), hydrokortison (1 μg·ml<sup>-1</sup>) a gentamicin (30 μg·ml<sup>-1</sup>).



### **Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot:**

#### **12,5% SDS polyakrylamidový migrační gel**

40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (30,9 %), deionizovaná voda (42,3 %), migrační pufr (24,7 %), 10% SDS (1 %), 10% peroxidisíran amonný (1 %), tetramethylethylendiamin (0,1 %) a 10% SDS (1 %).

#### **Zaostřovací pufr**

Tris ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH=6,8.

#### **4% polyakrylamidový zaostřovací gel**

40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (13,1 %), deionizovaná voda (60,6 %), zaostřovací pufr (24,7 %), 10% SDS (1 %), 10% peroxidisíran amonný (0,3 %), tetramethylethylendiamin (0,15 %).

#### **Přenosový pufr**

Tris ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), glycin ( $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), methanol (20%, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH=8,3.

#### **Barvicí roztok**

Kyselina octová (5%, v/v), Ponceau S (0,1% m/v).

#### **TBS (tris-buffered saline)**

Tris ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), NaCl ( $154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pH=7,5.

#### **TBS/T**

Tween 20 (0,1%, v/v) v TBS.

#### **TBS/T/mléko**

Tween 20 (0,1%, v/v), sušené mléko (5%, m/v) v TBS.

### **Roztoky pro stanovení cytotoxicity:**

#### **Roztok neutrální červeně 1**

Formaldehyd (0,5%, v/v), chlorid vápenatý (1%, v/v).

#### **Roztok neutrální červeně 2**

Kyselina octová (1%, v/v), methanol (50%, v/v).

#### **Roztok Tritonu**

Triton X-100 (15% v/v) v PBS

#### **Roztok kolagenu na potahování kultivačních desek:**

0,2% sterilní roztok kolagenu a 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  v poměru 1:15.

### 3.1.2 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Analytické váhy AX105 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Bloková třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)

Blotovací podložky (VWR, USA)

Blotovací systém Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA)

Buněčná škrabka (Biologix, USA)

Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)

Chlazená centrifuga Mikro 22R (Hettich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 380R (Hettich Zentrifugen, Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-17AIC (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Digitální předvážky GX-600 (A&D, Japonsko)

Magnetická míchačka (IKA RH basic KT/C (Slabo, ČR)

Fotografický film Fuji medical x-ray (FujiFilm, Japonsko)

Fotografická vývojka a ustalovač Kodak GBX (Eastman Kodak, USA)

Fotometr pro měření absorbance/fluorescence v 96jamkových deskách Infinite M200 pro (Tecan, Švýcarsko)

Hlubokomrazicí box Inova U535 (Eppendorf, Německo)

Laminární box Biohazard EF/S 4 BSC (Schoeller Instruments, Česká republika)

Kultivační lahve, kultivační desky, centrifugační kyvety (TPP, Švýcarsko)

Mikrodestičkový multifunkční reader (Schoeller Instruments, Česká republika)

Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)

Mikroskop NIB-100 (Novel optics, Čína)

Mini-rocker třepačka typ MR-1 s kývavým pohybem (Biosan, Litva)

MiniSpin centrifuga vč. rotoru (Eppendorf, Německo)

Multikanálová pipeta Finnpipette® (Thermo Fisher Scientific, USA)

Odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson, USA)

Parafilm „M“ (Pechiney Plastic Packaging, USA)

pH-metr inoLab Level 1 (Schoeller Instruments, ČR) s elektrodou SenTix41 (WTW, Německo)

Pipetový dávkovač Easypet 3 (Eppendorf, Německo)

Plastové mikrozkmavky (Eppendorf, Německo)

PVDF membrána Immun-Blot™ 0,2 μm (Bio-Rad Laboratories, USA)

Sérologické pipety (Capp, Dánsko)

Sterilizační filtr 0,22 µm Millex<sup>®</sup>-GP (Millipore, USA)

Sterilizační filtr 0,22 µm Steritop<sup>®</sup> (Millipore, USA)

System pro elektroforézu Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Cell se zdrojem PowerPac 200 (Bio-Rad Laboratories, USA)

Špičky (Eppendorf, Německo)

Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo)

Vakuové čerpadlo Vacc-space (Chromservis, Slovensko)

Vodní lázeň s třepáním OLS 26 Aqua Pro (Grant Instruments, Velká Británie)

Vortex MIX-28 Touch fairy (Hangzhou Miu Instruments, Čína)

Vortex Reax top (Heidolph, Německo)

Zařízení pro přípravu deionizované vody Ultrapur (Watrex, ČR)

### **3.1.3 Biologický materiál**

V práci byly použity primární kultury HUVEC zamražené v první pasáži po izolaci v roce 2018.

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Kultivace primárních kultur lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly**

Primární kultury lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly byly vysety v médiu pro kultivaci endoteliálních buněk, které bylo, kromě standardních suplementů dodaných k médiu a gentamicinu, doplněno o 2 % fetálním bovinním sérem. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a při 5% atmosféře CO<sub>2</sub> ve sterilních podmínkách. Pro lepší adhezi buněk probíhala kultivace v lahvích potažených vrstvou kolagenu.

Po 24 hodinách od vysetí bylo médium vyměněno. Po dosažení 70–80% konfluence byly buňky pasážovány. Buňky byly nejprve 2× omyty sterilním PBS a poté inkubovány s 1 ml trypsinu. Po uvolnění buněk z povrchu lahve byl trypsin inhibován přídatkem média. Následně byly buňky centrifugovány po dobu 10 minut při 26 °C a 178×g. Poté bylo médium odlito a k peletu bylo přidáno 5 ml nového média. Z buněčné suspenze bylo odebráno 20 µl, které byly naředěny trypanovou modří a buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Následně byly buňky vysety na 6jamkové či 96jamkové destičky pro další experimenty.

### 3.2.2 MTT test

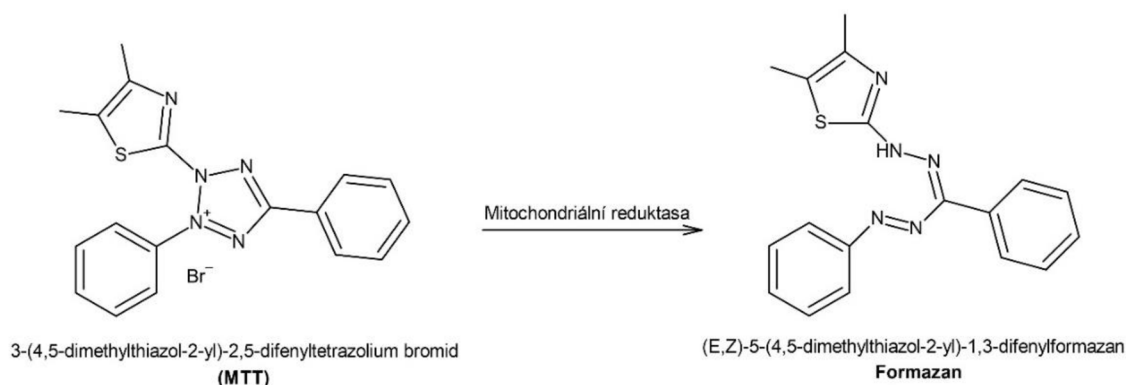
MTT test stanovuje metabolickou aktivitu buněk a využívá se pro zjištění schopnosti jejich proliferace, viability a cytotoxicity aplikovaných látek. Test je založen na redukcí žluté tetrazoliové soli MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) vlivem mitochondriálních reduktas živých buněk na nerozpustný fialový formazanový produkt (Obr. 6). Formazanové krystalky jsou následně rozpuštěny pomocí směsi s 1% NH<sub>3</sub> v DMSO a spektrofotometricky je stanovena hodnota absorpance roztoku.

Po vysetí a dosažení 70% konfluence byly buňky vystaveny působení různých koncentrací 2,3-dehydrosilybinu (1; 2; 5 a 10 μmol·l<sup>-1</sup>), jako negativní kontrola bylo použito médium a jako pozitivní kontrola 15% roztok Tritonu X-100 v PBS.

Po 24hodinové inkubaci s testovanou látkou bylo vyměněno médium za 100 μl 10% roztoku MTT v médiu na jamku a následně byly buňky inkubovány po dobu 40 minut při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub> ve sterilních podmínkách. Poté byl roztok odsán a bylo k buňkám přidáno 150 μl 1% NH<sub>3</sub> v DMSO. V posledním kroku byla změřena spektrofotometricky absorpance při 540 nm a byla vyhodnocena toxicita DHS.

### 3.2.3 Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně

Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně slouží k určení množství životoschopných buněk, neboť při kontaktu živých buněk s neutrální červení dochází k pinocytóze tohoto barviva a jeho hromadění v lysozomech. Naopak mrtvé buňky tuto schopnost ztrácejí a barvivo neakumulují. Celkové množství životoschopných buněk je pak možno stanovit spektrofotometricky pomocí intenzity zbarvení.



Obr. 6: Princip MTT testu. Nakresleno ve freeware ACD/ChemSketch.

Po dosažení 70% konfluence byly buňky vystaveny působení různých koncentrací 2,3-dehydrosilybinu (1; 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), jako negativní kontrola bylo použito médium a jako pozitivní kontrola 15% roztok Tritonu X-100 v PBS. Po 24hodinové inkubaci s DHS bylo médium vyměněno za 50  $\mu\text{l}$  roztoku neutrální červeně na jamku a následně byly buňky inkubovány po dobu 40 minut při 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub> ve sterilních podmínkách. Poté byl roztok odsán a každá jamka byla rychle promyta 200  $\mu\text{l}$  směsí 0,5% formaldehydu a 1% CaCl<sub>2</sub> v poměru 1:1. Následně bylo na každou jamku přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku 1% CH<sub>3</sub>COOH v methanolu. Poté byla destička třepána 20 minut na třepačce a byla změřena absorbance spektrofotometricky při 550 nm.

### **3.2.4 Imunodetekční stanovení proteinů**

Pro porovnání efektu apelinu-13 a DHS byl po 48hodinové kultivaci na 6jamkové destičce na primární kultury HUVEC nanesen roztok média s DHS o koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , apelinem-13 o koncentraci 200  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , antagonistou apelinového receptoru ML221 o koncentraci 2,2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a kombinaci DHS nebo apelinu-13 s ML221. Jako kontroly byly na buňky nanесeny 0,1% roztok DMSO a médium. Po inkubaci s danými látkami (24 hodin, případně 5, 10, 15, 30 a 60 minut) bylo na ledu médium odsáto a buňky byly 2× omyty 1 ml studeného PBS obohaceného o inhibitory fosfatas (NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Následně byly buňky seškrabány a přeneseny do chlazených mikrozkušavek. Buňky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 1960×g a 4 °C. K peletu bylo přidáno 75  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru HUVEC. Mikrozkušavky s buňkami poté stály 30 minut na ledu a byly průběžně vortexovány. Následně byla suspenze propipetována pro dosažení maximálního rozbití buněk a centrifugována po dobu 13 minut při 21 000×g a 4 °C. Supernatanty byly odebrány do čistých mikrozkušavek a byla stanovena koncentrace proteinů pomocí BCA metody.

Lyzáty byly 5× zředěny PBS a napipetovány na 96jamkovou destičku. Na každou jamku bylo nanесeno 200  $\mu\text{l}$  BCA reakční směsi v poměru reagentu A ku B 50:1 (v/v). Poté byly vzorky 30 minut inkubovány při 37 °C a posléze byla spektrofotometricky měřena absorbance při 562 nm. K jednotlivým lyzátům byl přidán vzorkovací pufr v poměru 4:1, poté byly povařeny 5 minut při teplotě 95 °C, ochlazeny na ledu, krátce stočeny a skladovány při -20 °C.

### 3.2.5 SDS-PAGE elektroforéza, Western blot a detekce

Pro SDS-PAGE elektroforézu byly připraveny gely o obsahu akrylamidu 12,5 % a tloušťce 1,5 mm. Na gel byly aplikovány vzorky v množství 4,5 µg proteinu na jamku a marker.

Elektroforéza probíhala v migračním pufru při konstantním proudu. Nejprve byl proud nastaven na 15 mA na gel a po zaostření vzorků byl zvýšen na 30 mA na gel. Elektroforéza byla ukončena po doputování vzorků na konec gelu. Následně byla odstraněna zaostřovací část gelu a separační část gelu byla vložena do Transblot turbo pufru a po promytí byla přenesena do blotovací kazety. Do kazety byly materiály vkládány v následujícím pořadí: blotovací molitan, filtrační papír, PVDF membrána, gel, filtrační papír a blotovací molitan. Všechny materiály byly navlhčeny Transblot turbo puffrem a válečkem byl odstraněn vzduch z prostor mezi jednotlivými součástmi sendviče. Před použitím bylo potřeba PVDF membránu rehydratovat 10 sekund v methanolu a ponechat minimálně 5 minut v deionizované vodě.

Western blotting probíhal při 25 V a 1 A po dobu 30 minut. Posléze byla membrána 3×5 minut promývána v roztoku TBS/T a obarvena roztokem Ponceau S. Po uschnutí byla membrána nastříhána, rehydratována 10 sekund v methanolu a 3×5 minut promývána v TBS/T. Během promývání byl připraven 5% roztok odstředěného mléka v TBS/T a membrána byla poté hodinu v tomto roztoku blokována. Následně byla nanесena na požadovanou část membrány vybraná primární protilátka (Akt, fosfo-Akt, p42/44 MAPK ERK1/2, fosfo-p42/44 MAPK ERK1/2, APJ) v 5% roztoku mléka v poměru 1:1 000. Protilátka byla inkubována na membráně v chladu přes noc. Na druhý den byla membrána promyta 3×5 minut v TBS/T a byla nanесena sekundární protilátka značená peroxidasou v 5% roztoku mléka v poměru 1:5 000. Sekundární protilátka byla nanесena po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a membrány byly poté 3×5 minut promývány v TBS/T. Následně byla provedena detekce.

Detekční činidlo bylo připraveno v poměru 1:1 a bylo inkubováno po dobu 1 minuty na membránách uložených na fólii. Následně byly membrány umístěny mezi dvě fólie a případné bublinky vzduchu, které by rušily detekci, byly vytlačeny pomocí buničiny. Pro detekci některých protilátek bylo použito zesilující detekční činidlo.

Membrána mezi fóliemi pak byla vložena do vyvolávací kazety a přenesena do temné komory, kde byl na folii přiložen fotografický film a kazeta byla uzavřena. Po expozici byl film rychle ponořen do vývojky, následně do deionizované vody, poté do

ustalovače a opět do deionizované vody. Filmy byly naskenovány a míra fosforylace jednotlivých kinas byla stanovena denzitometricky v programu ImageJ (Schneider et al., 2012).

### **3.2.6 Stanovení oxidu dusnatého**

Primární kultura HUVEC byla zpasážována a přenesena na 6jamkovou destičku. Po 24 hodinách kultivace byly buňky 2× omyty Krebs-Henseleitovým roztokem a následně na ně byly aplikovány jednotlivé roztoky 0,1% DMSO, DHS o koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , apelinu-13 o koncentraci  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , antagonisty apelinového receptoru ML221 o koncentraci  $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a kombinace DHS nebo apelinu-13 s ML221. Tyto roztoky byly připraveny v Krebs-Henseleitově roztoku. Jako kontrola sloužil Krebs-Henseleitův roztok obsahující testovanou látku, který nepřišel do kontaktu s buňkami.

Buňky byly s jednotlivými roztoky inkubovány 0, 5, 10, 15, 30 nebo 60 minut. Po uplynutí časového intervalu bylo z jamky odebráno 50  $\mu\text{l}$  roztoku, který byl přidán do reakční směsi luminolu a peroxidu vodíku. Množství přítomného NO je přímo úměrné intenzitě luminiscence.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUSE**

### **4.1 Kultivace**

Ve většině experimentů byly využity zásoby kryoprezervovaných primárních kultur HUVEC. Vlastní zamrazení v parách tekutého dusíku představuje pro buňky relativně velký stres. Výsledkem může být negativní dopad na kultivaci po rozmrazení (Baust et al., 2014). V našem případě se ukázalo, že kryoprezervace HUVEC pravděpodobně způsobuje dřívější navození senescence v porovnání s čerstvě vyzolovanými kulturami. Standardně je v literatuře uváděna použitelnost kultur až do sedmé pasáže ( Karas et al., 2016, Yi et al., 2020), avšak u námi použitých kryoprezervovaných buněk docházelo k zastavení růstu a postupnému pomalému umírání již po 3. pasáži. Z tohoto důvodu byly pro vlastní experimenty použity výhradně primární kultury HUVEC zmražené v 1. pasáži. U buněk zmražených ve vyšších pasážích byla pozorována značně snížená viabilita, což komplikovalo provedení experimentů. První část experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci jejich kultivace. V začátcích byly buňky kultivovány ve standardních kultivačních lahvích, avšak následné experimenty ukázaly, že použití lahví potažených kolagenem mělo za následek lepší adhezi a menší úmrtnost buněk.

Dále bylo zjištěno, že médium použité pro kultivaci je velmi citlivé na teplo a při delším nebo častějším pobytu ve vodní lázni dochází k vysrážení jeho komponent. Proto bylo médium rozplněno po 50 ml do centrifugačních kyvet a následně bylo použito pouze potřebné množství alikvotů.

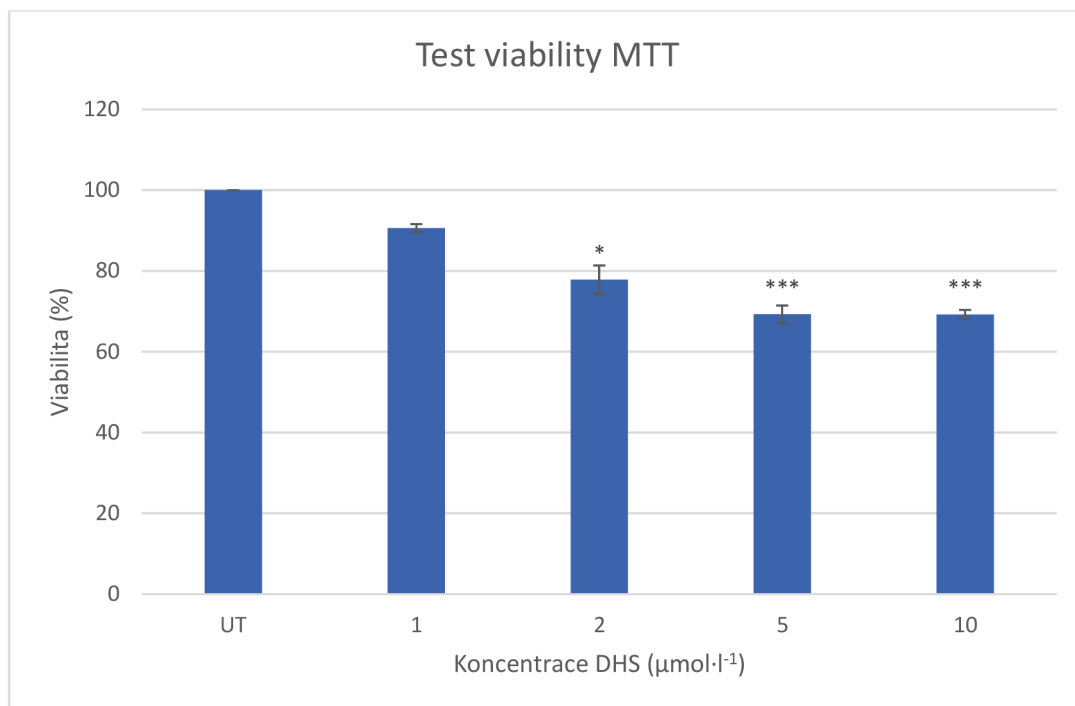
### **4.2 Stanovení cytotoxicity DHS**

Cytotoxicita DHS byla stanovena z důvodu vyhodnocení jeho vlivu na buňky a výběru vhodné koncentrace pro další experimenty. Ke stanovení cytotoxicity DHS o různých koncentracích byly použity stanovení viability pomocí neutrální červeně a MTT test.

#### **4.2.1 MTT test**

Byl pozorován vliv jednotlivých koncentrací DHS na životaschopnost primárních kultur HUVEC. Buňky byly inkubovány s DHS o koncentracích 1; 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po dobu 24 hodin. Jako negativní kontrola bylo použito médium, jako pozitivní kontrola 15% roztok Tritonu-X100 v PBS. Testování bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech, pokaždé v kvadruplikátu. Doba inkubace s testovanými látkami byla zvolena na základě zkušeností, délky dalších plánovaných experimentů a studií, např. Karas, 2019.





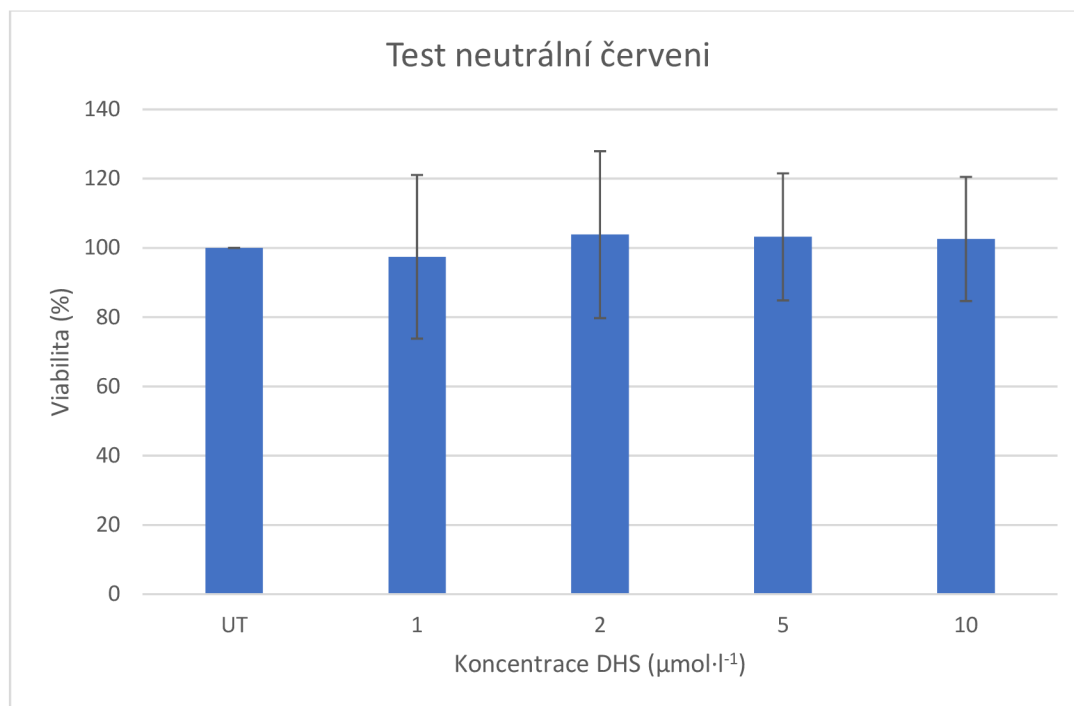
Obr. 7: Viabilita buněk měřená pomocí MTT testu po 24hodinové inkubaci s DHS o koncentracích 1; 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledné hodnoty  $\pm$  směrodatná odchylka, vztaheny k negativní kontrole (UT - médiu) jsou získány ze dvou nezávislých experimentů. Statisticky významné hodnoty jsou označeny  $p < 0,05$  - \*,  $p < 0,01$  - \*\*,  $p < 0,001$  - \*\*\*, vyhodnoceno pomocí párového t-testu.

Největší pokles viability oproti kontrole byl zaznamenán u koncentrací 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to o 30 %. Pokles viability zhruba o 20 % vůči negativní kontrole byl pozorován u koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 7).

#### 4.2.2 Stanovení cytotoxicity pomocí neutrální červeně

Následně byla cytotoxicita DHS stanovena pomocí neutrální červeně. Byl pozorován vliv jednotlivých koncentrací DHS na životaschopnost primární kultury HUVEC. Buňky byly inkubovány s DHS o koncentracích 1; 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po dobu 24 hodin. Jako negativní kontrola byl použito médium, jako pozitivní kontrola 15% roztok Tritonu X-100 v PBS. Testování bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech, pokaždé v kvadruplikátu.

Ke snížení viability buněk oproti kontrole došlo pouze v případě koncentrace DHS 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a to o 3 %. V případě koncentrací 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  došlo ke zvýšení viability o 3 % oproti kontrole. Žádná ze změn viability však nebyla vyhodnocena jako statisticky významná (Obr. 8).



Obr. 8: Viabilita buněk měřená pomocí testu neutrální červení po 24hodinové inkubaci s DHS o koncentracích 1; 2; 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledné hodnoty  $\pm$  směrodatná odchylka, vztaheny k negativní kontrole (UT - médiu) jsou získány ze dvou nezávislých experimentů.

Ve srovnání s MTT testem byla získána vyšší viabilita, což by mohlo být způsobeno potenciální interferencí s testovanou látkou. Tato hypotéza by se dala ověřit zavedením promytí buněk pomocí PBS před aplikací pracovního roztoku neutrální červeně na buňky. Ze studie Karas, 2019 je však patrné, že při dlouhodobé inkubaci 2,3-dehydrosilybin vykazuje toxické účinky. Hodnota  $\text{IC}_{50}$ , tedy koncentrace DHS snižující redukci MTT o 50 %, byla po 72hodinové inkubaci stanovena na  $12,0 \pm 1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . To naznačuje možné mírné podhodnocení vlivu 2,3-dehydrosilybinu pomocí neutrální červeně. Nicméně přesto je potřeba mít na paměti i úskalí MTT testu. K redukci MTT totiž dochází v celé buňce a může být významně ovlivněna řadou faktorů, například metabolickými a energetickými poruchami, změnami v aktivitě oxidoreduktas nebo intracelulárním transportem a mnoha dalšími. Podcenění buněčné životaschopnosti testem MTT může být způsobeno jak adaptivním metabolickým, tak mitochondriálním přeprogramováním buněk vystavených stresu (Stepanenko & Dmitrenko, 2015).

### 4.3 Ověření přítomnosti apelinového receptoru

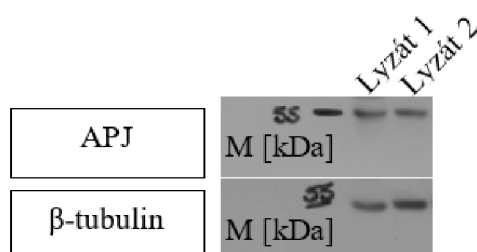
Mnohé studie, jako např. Lu et al., 2012 uvádějí, že APJ je exprimován na úrovni mRNA v mnoha potkaních a lidských tkáních. Tato myšlenka vedla k ověření přítomnosti apelinového receptoru v primárních kulturách endoteliálních buněk lidské pupečnickové žily.

Z Obr. 9 je zřejmé, že buňky HUVEC exprimují apelinový receptor.  $\beta$ -tubulin byl zvolen jako kontrola rovnoměrného nanášení proteinu.

### 4.4 Evaluace vlivu jednotlivých látek na fosforylaci Akt a ERK1/2

Ve dřívějších studiích, jako např. Gabrielová et al., 2019, bylo zjištěno, že DHS ovlivňuje fosforylaci kinasy Akt. Byla tak vytvořena hypotéza, že DHS projevuje své kardioprotektivní účinky skrze dráhu podobnou signální dráze apelinu-13. Kardioprotekce způsobená apelinem-13 spočívá v aktivaci dráhy PI3K/Akt/eNOS fosforylací. Fosforylace eNOS vede ke zvýšené produkci NO, který je znám pro své vasodilatační účinky (Azizi et al., 2013).

Pro ověření byl sledován vliv DHS a apelinu-13 na míru fosforylace kinas Akt a ERK1/2. Pro potvrzení, že DHS působí přes APJ byl testován také vliv kombinace ML221 s DHS nebo apelinem-13 na míru fosforylace jednotlivých kinas.



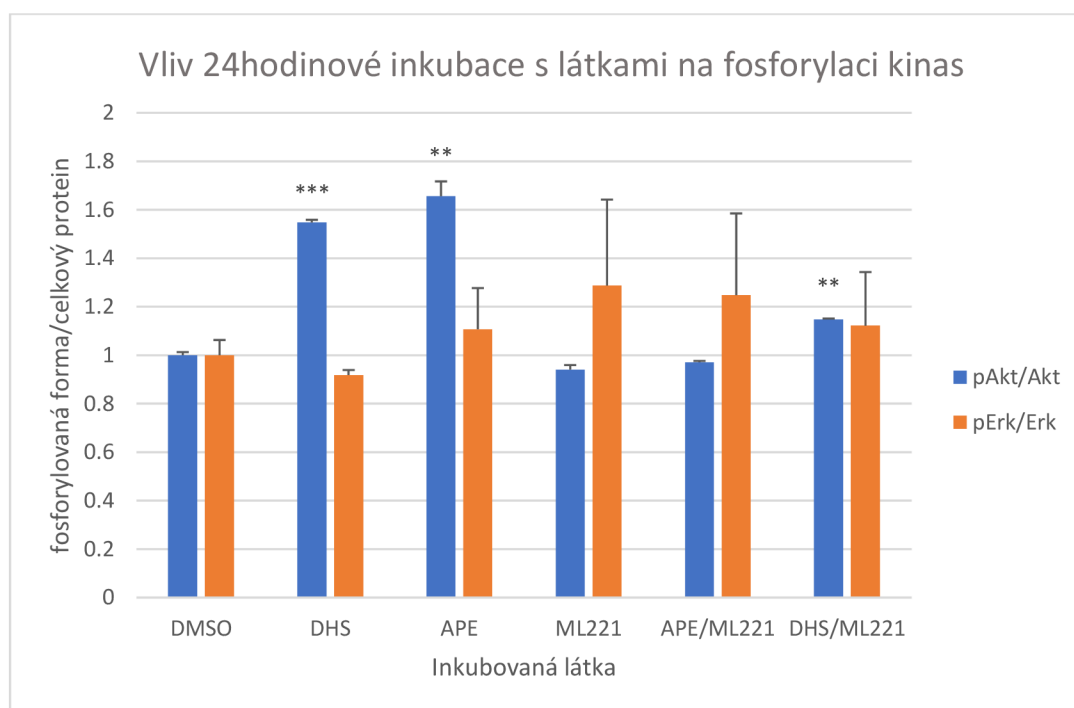
Obr. 9: Reprezentativní western blot detekce přítomnosti apelinového receptoru.

#### 4.4.1 Vliv 24hodinové inkubace s jednotlivými látkami na fosforylaci kinas

Během tohoto experimentu byly buňky inkubovány s 0,1% DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinem-13 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), antagonistou apelinového receptoru ML221 ( $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kombinací DHS a apelinu-13 s ML221 v médiu po dobu 24 hodin. Experiment proběhl ve dvou opakováních. Daná koncentrace DHS byla zvolena na základě přechozích zkušeností a studií jako např. Gabrielová et al., 2015a.

Jak již bylo řečeno, apelinové peptidy způsobují vasodilataci závislou na endotelu. Vasodilatace souvisí s fosforylací Akt a zvýšením koncentrace intracelulárního vápníku, které vedou k fosforylaci eNOS a tvorbě NO (Azizi et al., 2013). Pro experiment byl využit (pyr)apelin-13, neboť byl identifikován jako převládající izoforma v srdeční tkáni pacientů s onemocněním koronárních tepen a nejúčinnější izoforma v testech využívajících buňky, které exprimují APJ (Maguire et al., 2009).

Na Obr. 10 je znázorněn poměr fosforylované kinasy vůči celkové kinase pro Akt a ERK1/2.



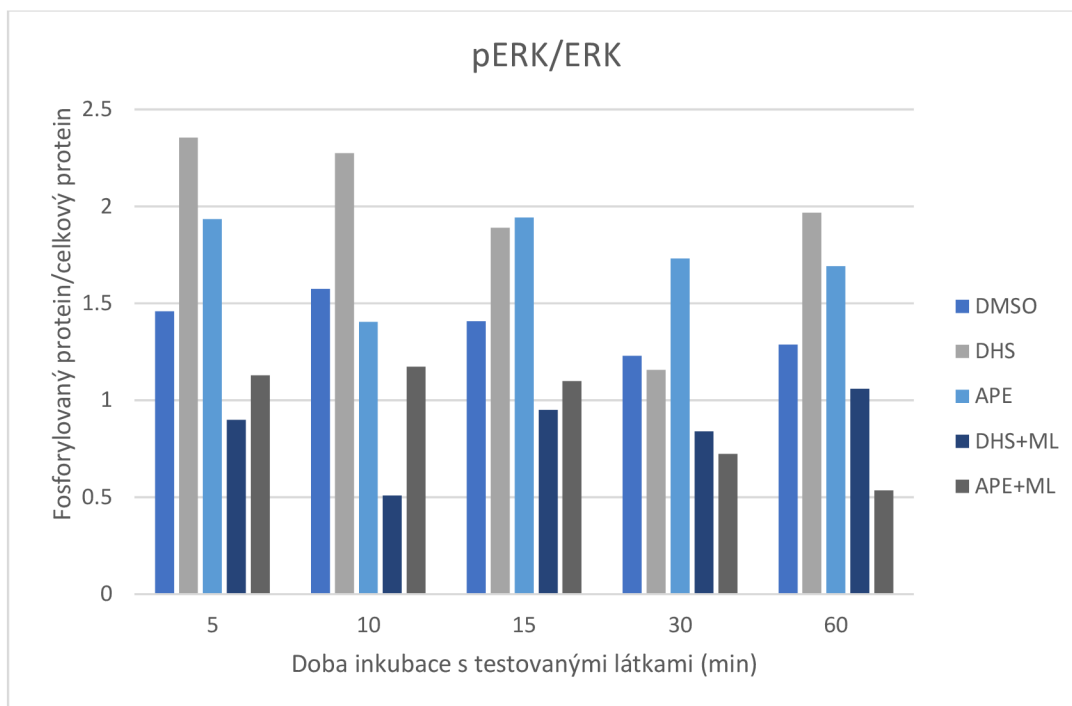
Obr. 10: Vliv inkubace s 0,1% DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinem-13 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), antagonistou apelinového receptoru ML221 ( $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kombinací DHS nebo apelinu-13 s ML221 v médiu po dobu 24 hodin na poměr fosforylované a celkové kinasy Akt a ERK1/2.

U kinasy Akt je největší poměr koncentrace fosforylovaného proteinu ku celkovému u buněk inkubovaných s apelinem-13 a DHS. Navíc je popsán efekt potlačitelný antagonistou ML221. U kinasy ERK1/2 je efekt 2,3-dehydrosilybinu a apelinu téměř nulový. Naopak u buněk vystavených ML221 je v porovnání s kontrolou mírně zvýšený, avšak statisticky nevýznamně. Statisticky významných rozdílů nabyly pouze hodnoty pro DHS, apelin-13 a DHS/ML v případě poměru pAkt/Akt.

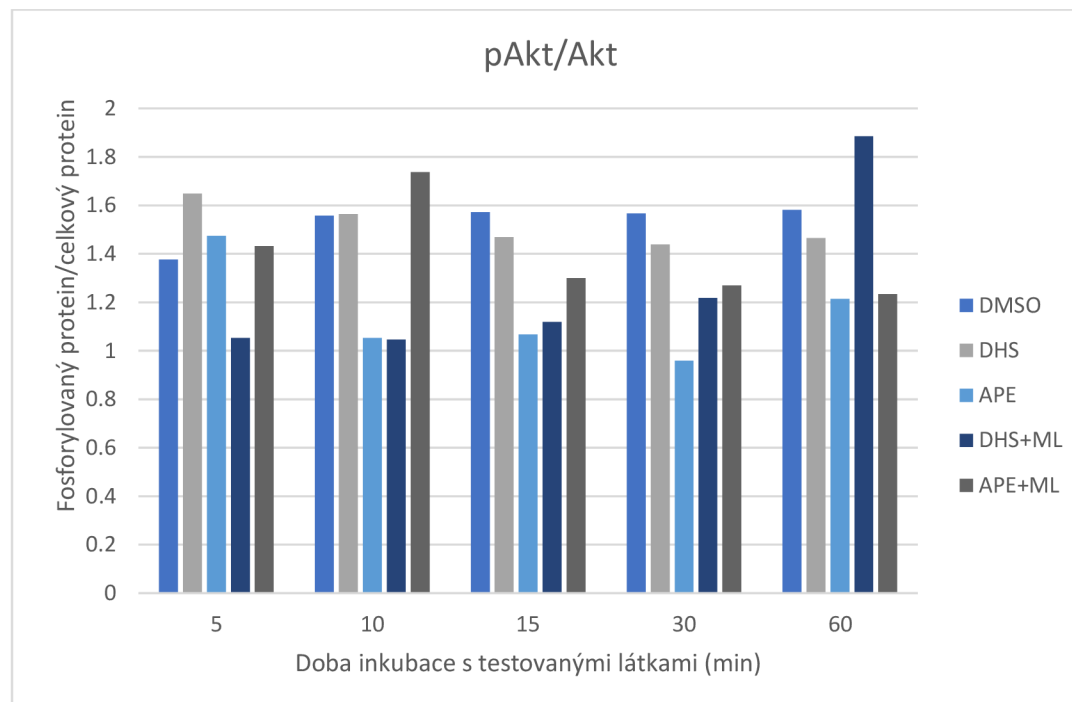
#### **4.4.2 Vliv krátkodobé inkubace s jednotlivými látkami na fosforylaci kinas**

Jelikož je apelin peptidový hormon, měla by být odpověď tkáně na jeho přítomnost relativně rychlá, což bude pravděpodobně souviset se stabilitou apelinu. Poločas rozpadu (pyr)apelinu-13 je nižší než 8 minut (Yang et al., 2017). Tento fakt je zohledňován i již publikovanými experimenty, které zkoumají efekty apelinu například Masri et al., 2004. Z tohoto důvodu byl proveden experiment testující vliv krátkodobé inkubace s 0,1% DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinem-13 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), antagonistou apelinového receptoru ML221 ( $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kombinací DHS a apelinu-13 s ML221 v médiu. Inkubace s jednotlivými látkami probíhala po dobu 5, 10, 15, 30 a 60 minut.

Na Obr. 11 lze pozorovat, že k největšímu nárůstu fosforylace kinas ERK1/2 došlo po 5 minutách inkubace s DHS i apelinem-13, přičemž u následujících měření lze pozorovat na čase závislé snížení míry fosforylace proteinu ERK1/2. Podobné chování bylo pozorováno v publikaci Masri et al., 2004, ale také na buněčné linii H9c2 ve studii Opletalová, 2021. Kombinace DHS nebo apelinu-13 s ML221 měla za následek výrazné snížení fosforylace proteinu ERK1/2, což opět podporuje hypotézu, že efekt je zprostředkovaný přes APJ. Na Obr. 12 jsou uvedeny výsledky míry fosforylace proteinu Akt. Z dat je patné, že efekt DHS i apelinu je v čase 5 min nevýrazný a s prodlužující se délkou expozice se pohybuje kolem hodnoty kontroly obsahující DMSO. U apelinu se pohybuje dokonce pod touto hodnotou. Z těchto informací lze usoudit, že DHS působí na HUVEC prostřednictvím APJ a působí podobnou signální drahou jako apelin-13. Navýšení míry fosforylace je v případě kinas ERK1/2 u apelinu-13 i DHS vyšší než navýšení poměru pAkt/Akt.



Obr. 111: Vliv inkubace s 0,1% DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinem-13 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), antagonistou apelinového receptoru ML221 ( $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kombinací DHS a apelinu-13 s ML221 v médiu po dobu 5, 10, 15, 30 a 60 minut na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2.



Obr. 12: Vliv inkubace s 0,1% DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinem-13 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), antagonistou apelinového receptoru ML221 ( $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a kombinací DHS nebo apelinu-13 s ML221 v médiu po dobu 5, 10, 15, 30 a 60 minut na poměr fosforylované a celkové kinasy Akt.

## 4.5 Evaluace vlivu jednotlivých látek na míru uvolňování oxidu dusnatého do média

Dále byl evaluován vliv jednotlivých testovaných látek na míru uvolňování oxidu dusnatého do média. Nárůst NO byl pozorován jako nárůst luminiscence daných vzorků. Jako luminiscenční detekční činidlo byl vybrán roztok luminolu a peroxidu vodíku podle studie Opletalová, 2021.

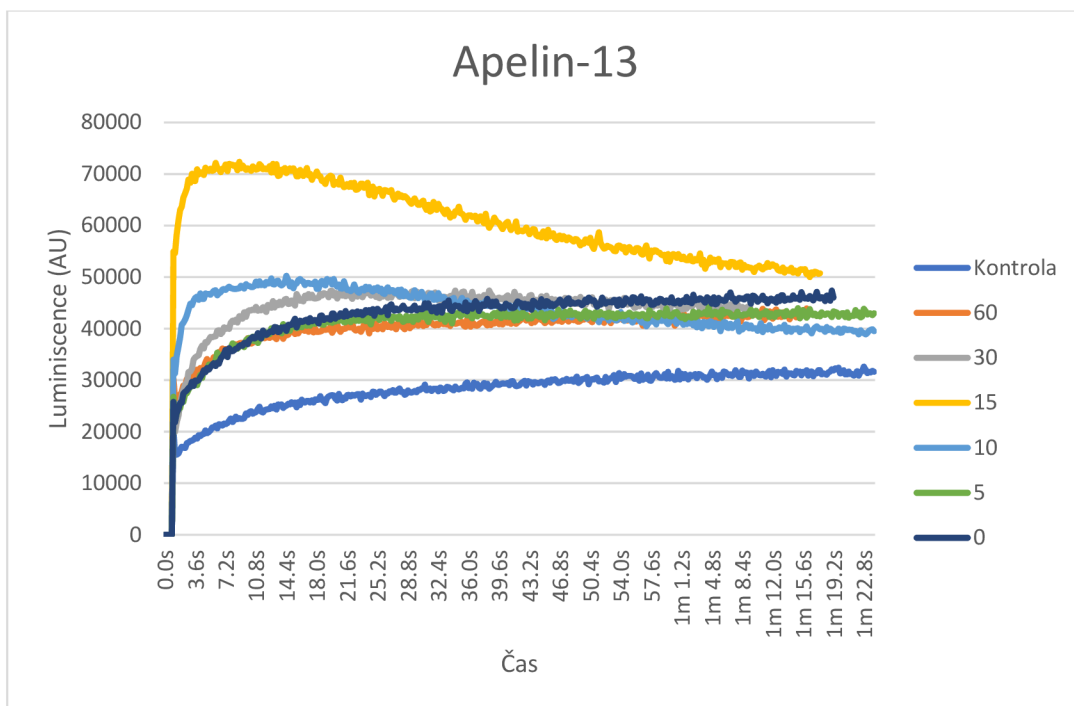
Uvolňování NO bylo stanoveno v časech 0, 5, 10, 15, 30, a 60 minut po vystavení buněk DMSO, apelinu-13, DHS, ML221 a kombinací apelinu-13 nebo DHS s ML221 v Krebs-Henseleitově roztoku. Jako kontrola byl vždy použit Krebs-Henseleitův roztok s danou látkou, aniž by přišel do styku s buňkami. Pro detekci NO bylo odebráno vždy 50  $\mu$ l roztoku. Volba délky inkubace i Krebs-Henseleitova roztoku, jakožto média, byla provedena na základě předchozích experimentů a studie Opletalová, 2021.

Na Obr. 13–18, můžeme pozorovat vliv inkubace jednotlivých látek na tvorbu NO u buněk HUVEC. V případě apelinu-13 (Obr. 13) můžeme pozorovat největší nárůst po 15 minutách inkubace s HUVEC. V případě ostatních inkubačních dob byl nárůst srovnatelný. U kombinace apelinu-13 s antagonistou apelinového receptoru ML221 (Obr. 14) můžeme pozorovat až na výjimku menší nárůst NO oproti apelinu-13. K největšímu nárůstu NO došlo v tomto případě po 30 minutách inkubace. Při evaluaci vlivu DHS (Obr. 15) můžeme pozorovat prudký nárůst NO po 15 minutách inkubace, u kombinace DHS s ML221 (Obr. 16) pak v 5. minutě. Tento nárůst byl ovšem menší než v případě DHS. U vzorků s ML221 (Obr. 17) můžeme pozorovat největší nárůst NO po 5 minutách inkubace. Pozoruhodné je, že ve všech případech kromě apelinu-13, došlo u jednoho či více vzorků k nižší tvorbě NO než v případě kontrolního vzorku, který nepřišel do styku s buňkami.

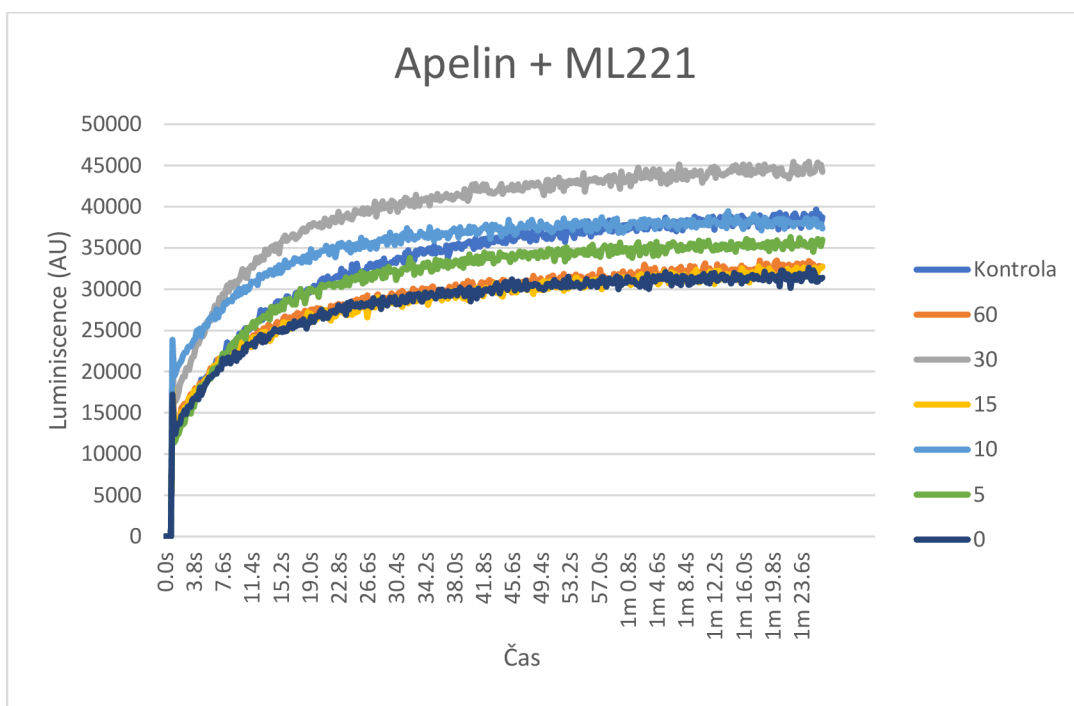
Srovnáme-li hodnoty nárůstu NO po inkubaci s jednotlivými látkami s hodnotami po inkubaci s DMSO (Obr. 18), které sloužilo jako kontrola, zjistíme, že všechny hodnoty kromě apelinu-13 vykazují srovnatelný či nižší nárůst NO. Může se tedy zdát, že DMSO indukovalo tvorbu NO. Této problematice se věnovala studie Opletalová, 2021, kdy byla vytvořena hypotéza, že buňky fyziologicky produkují určitou molekulu, která interaguje s peroxidem vodíku za tvorby radikálu, který je následně detekován pomocí luminolu. Tuto metodu by bylo potřeba optimalizovat, aby nedocházelo ke zdánlivé tvorbě NO.

Tato metoda stanovení množství uvolněného NO bylo zvolena z důvodu její dostupnosti na pracovišti a na základě očekávaného rozdílu ve vlastnostech použitých buněčných modelů. Endoteliální buňky obsahují mnohem větší množství NOS oproti kardiomyocytům a tím pádem by mělo docházet k výraznější tvorbě NO (Strijdom et al., 2005) a možnému upozadění dalších nežádoucích interakcí popsaných v Opletalová, 2021. Ukázalo se však, že ani přesto není zvolená metoda vhodná. Pokud by optimalizace metody nevedla ke zlepšení odezvy, mohlo by být využito elektrochemických metod nebo Griessovy metody, což je nepřímá kolorimetrická metoda pro stanovení dusitanů a dusičnanů, které vznikají reakcí NO s kyslíkem nebo superoxidem (Miranda et al., 2001). Další možnou metodou je využití geneticky kódovaných sond NO (geNOps). Tyto fluorescenční sondy specificky a přímo reagují na NO již v buňce a poskytují tak vhodný nástroj k jeho detekci již v místě jeho vzniku a mohou poskytovat informace o změně dynamiky NO v reálném čase (Eroglu et al., 2016).

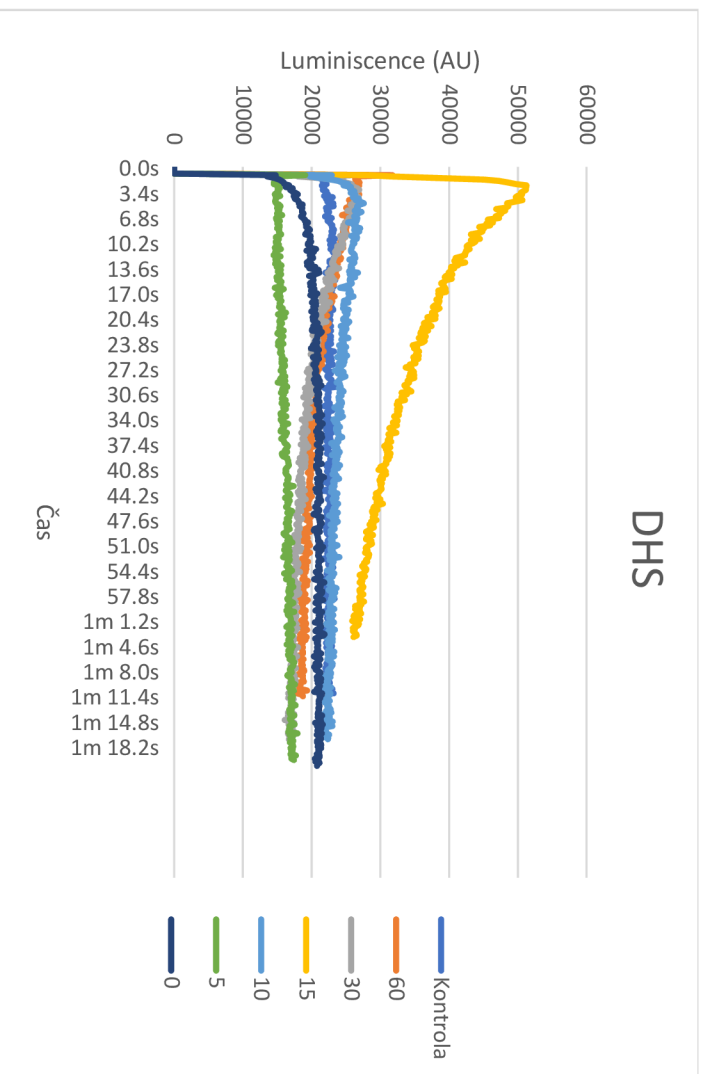




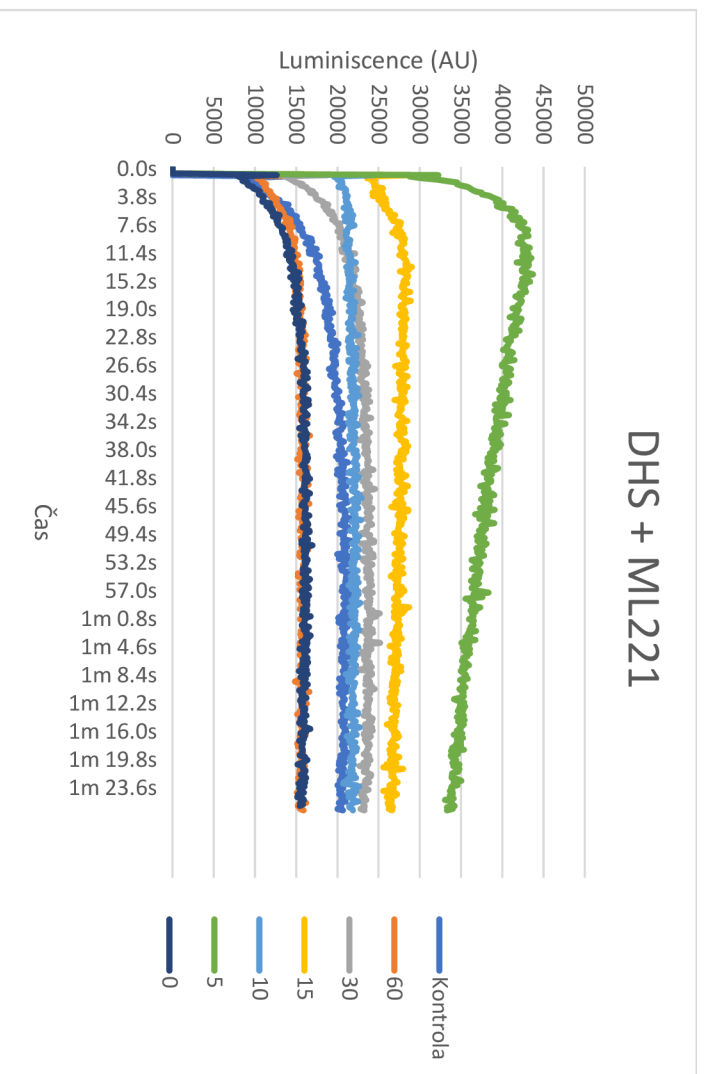
Obr. 13: Grafické znázornění vlivu délky inkubace s apelinem-13 na míru uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.



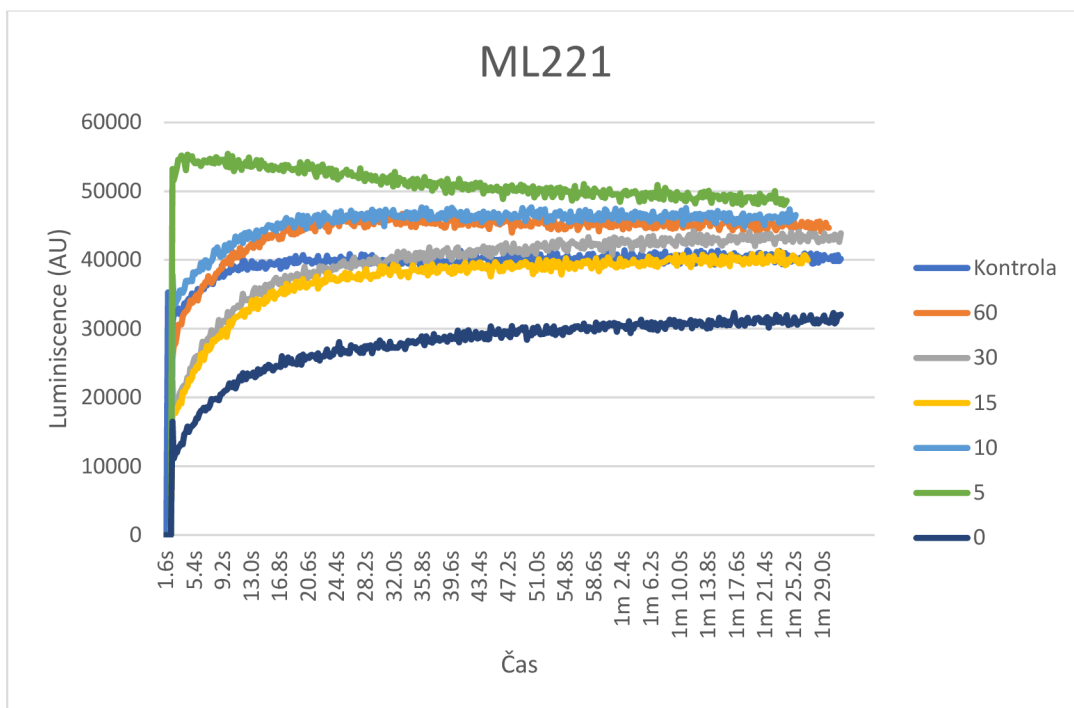
Obr. 14: Grafické znázornění vlivu délky inkubace s kombinací apelinu-13 a ML221 na míru uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.



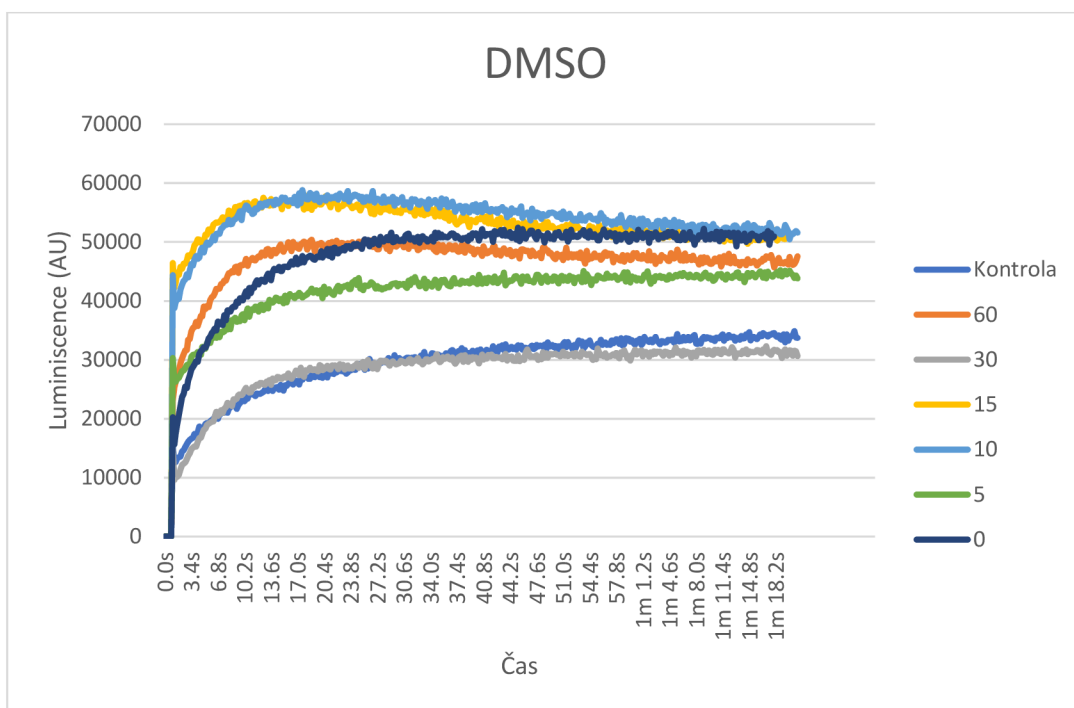
Obř. 15: Grafické znázornění vřivnu děřky inkubace s DHS na mířu uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.



Obř. 16: Grafické znázornění vřivnu děřky inkubace s kombinací DHS a ML221 na mířu uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.



Obr. 17: Grafické znázornění vlivu délky inkubace s ML221 na míru uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.



Obr. 18: Grafické znázornění vlivu délky inkubace s DMSO na míru uvolnění NO do Krebs-Henseleitova roztoku.

## 5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla věnována biologické aktivitě 2,3-dehydrosilybinu. V teoretické části práce byl zpracován přehled týkající se infarktu myokardu, aterosklerózy a ischemicko-reperfuzního poškození, což jsou zdravotní komplikace, které by mohl příznivě ovlivnit právě 2,3-dehydrosilybin. Byl zpracován přehled účinků DHS na srdeční tkáň a také vliv apelinu-13 na kardiovaskulární systém.

Mezi hlavní cíle experimentální části práce patřilo ověření přítomnosti apelinového receptoru na primárních kulturách endoteliálních buněk lidské pupečnickové žíly, tento fakt byl potvrzen ve dvou lyzátech.

Dále byla stanovena cytotoxicita DHS v koncentračním rozmezí 1 - 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24hodinové inkubaci s využitím stanovení viability pomocí neutrální červeně a MTT testu. Cytotoxicita byla stanovena vždy ve dvou opakováních. U MTT testu bylo pozorováno mírné snížení viability pro koncentrace vyšší než 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , u testu využívajícího neutrální červeně ovšem k žádnému snížení viability nedošlo.

Následně byl evaluován vliv 24hodinové inkubace DHS, apelinu-13 a jejich kombinací s antagonistou apelinového receptoru ML221 na fosforylaci kinas Akt a ERK1/2. Byla potvrzena zvýšená fosforylace Akt v případě apelinu-13 a DHS oproti kontrole. V případě ML221 a jeho kombinací s apelinem nebo DHS byla fosforylace oproti samotnému apelinu-13 a DHS vždy nižší. V případě ERK1/2 se vliv DHS a apelinu-13 na fosforylaci dostatečně nepotvrdil. Poté byla doba inkubace zkrácena na 5, 10, 15, 30 a 60 minut. Bylo pozorováno, že k největšímu nárůstu fosforylace ERK1/2 došlo po 5 minutách inkubace s DHS a apelinem-13. Prodloužení doby inkubace vedlo ke snížení míry fosforylace a nejnižší míra fosforylace byla pozorována v případě vzorků po inkubaci s kombinací DHS nebo apelinu-13 s ML221. U proteinu Akt došlo po 5 minutách inkubace s apelinem-13 a DHS pouze k téměř zanedbatelnému navýšení fosforylace. Získané výsledky naznačují, že DHS i apelin-13 jsou schopné modulovat fosforylaci obou sledovaných kinas. To, který z proteinů bude ovlivněn, závisí na délce inkubace s testovanými látkami. Dráha působení DHS v organismu je stále poměrně nejasná, ale vzhledem k tomu, že bylo pozorováno snížení fosforylace vlivem kombinace DHS s antagonistou apelinového receptoru ML221, stejně jako v případě kombinace apelinu-13 s ML221, můžeme usoudit, že DHS působí, alespoň částečně podobnou signální drahou jako apelin-13.

V poslední fázi experimentální části byl evaluován vliv DHS, apelinu-13 a jejich kombinací s ML221 na uvolňování NO do média. Bylo pozorováno, že apelin-13 i DHS vykazovali zvýšenou indukci NO při době inkubace 15 minut. Ovšem bylo zjištěno, že DMSO, které sloužilo jako rozpouštědlo, samo zdánlivě indukuje tvorbu NO a při porovnání naměřených hodnot s hodnotami DMSO můžeme vyhodnotit nárůst NO pouze v případě apelinu-13. Z výsledků je patrné, že použitou metodu bude potřeba optimalizovat nebo zvolit metodu založenou na jiném principu.

## 6 LITERATURA

- Azizi, Y., Faghihi, M., Imani, A., Roghani, M., & Nazari, A. (2013). Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction. *Peptides*, *46*, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.05.006>
- Baines, C. P., Song, C. -X., Zheng, Y. -T., Wang, G. -W., Zhang, J., Wang, O. -L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E. M., & Ping, P. (2003). Protein Kinase C $\epsilon$  Interacts With and Inhibits the Permeability Transition Pore in Cardiac Mitochondria. *Circulation Research*, *92*(8), 873-880. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000069215.36389.8DB>
- Barnes, G., Japp, A. G., & Newby, D. E. (2010). Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart*, *96*(13), 1011-1016. <https://doi.org/10.1136/hrt.2009.191122>
- Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. (2014). Cryopreservation. *Organogenesis*, *5*(3), 90-96. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.10021>
- Bedard, K., & Krause, K. -H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, *87*(1), 245-313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1830*(5), 3217-3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Dhalla, N. (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *47*(3), 446-456. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00078-X)
- Duan, J., Cui, J., Yang, Z., Guo, C., Cao, J., Xi, M., Weng, Y., Yin, Y., Wang, Y., Wei, G., Qiao, B., & Wen, A. (2019). Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1406-7>
- Eroglu, E., Gottschalk, B., Charoensin, S., Blass, S., Bischof, H., Rost, R., Madreiter-Sokolowski, C. T., Pelzmann, B., Bernhart, E., Sattler, W., Hallström, S., Malinski, T., Waldeck-Weiermair, M., Graier, W. F., & Malli, R. (2016). Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nature Communications*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10623>
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *47*(8), C7-C12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>
- Fan, G., Cui, Y., Gollasch, M., & Kassmann, M. (2019). Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle. *Channels*, *13*(1), 505-519. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1688910>
- Folino, A., Montarolo, P. G., Samaja, M., & Rastaldo, R. (2015). Effects of apelin on the cardiovascular system. *Heart Failure Reviews*, *20*(4), 505-518. <https://doi.org/10.1007/s10741-015-9475-x>
- Förstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, *120*(4), 713-735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326>
- Gabrielová, E., Jabůrek, M., Gažák, R., Vostálová, J., Ježek, J., Křen, V., & Modrianský, M. (2010). Dehydrosilybin attenuates the production of ROS in rat cardiomyocyte mitochondria with an uncoupler-like mechanism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *42*(6), 499-509. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9319-2>
- Gabrielová, E., Křen, V., Jabůrek, M., & Modrianský, M. (2015a). Silymarin component 2,3-dehydrosilybin attenuates cardiomyocyte damage following hypoxia/reoxygenation by limiting oxidative stress. *Physiological Research*, *64*(1). <https://doi.org/10.33549/physiolres.932703>
- Gabrielová, E., Zholobenko, A. V., Bartošiková, L., Nečas, J., Modriansky, M., & Bader, M. (2015b). Silymarin Constituent 2,3-Dehydrosilybin Triggers Reserpine-Sensitive Positive Inotropic Effect in Perfused Rat Heart. *PLOS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139208>

- Gabrielová, E., Bartošíková, L., Nečas, J., & Modrianský, M. (2019). Cardioprotective effect of 2,3-dehydrosilybin preconditioning in isolated rat heart. *Fitoterapia*, *132*, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.10.028>
- Garlid, K. D., Costa, A. D. T., Quinlan, C. L., Pierre, S. V., & Dos Santos, P. (2009). Cardioprotective signaling to mitochondria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(6), 858-866. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.11.019>
- Gracia, K., Llanas-Cornejo, D., & Husi, H. (2017). CVD and Oxidative Stress. *Journal of Clinical Medicine*, *6*(2). <https://doi.org/10.3390/jcm6020022>
- Guaricci, A. I., Bulzis, G., Pontone, G., Scicchitano, P., Carbonara, R., Rabbat, M., De Santis, D., & Ciccone, M. M. (2018). Current interpretation of myocardial stunning. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *28*(4), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.11.005>
- Karas, D. (2019). *Vliv přírodních látek z ostropestřce mariánského a jejich semi-syntetických derivátů na angiogenezi a apoptosu* [Disertační práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Karas, D., Gažák, R., Valentová, K., Chambers, C. S., Pivodová, V., Biedermann, D., Křenková, A., Oborná, I., Kuzma, M., Cvačka, J., Ulrichová, J., & Křen, V. (2016). Effects of 2,3-Dehydrosilybin and Its Galloyl Ester and Methyl Ether Derivatives on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Natural Products*, *79*(4), 812-820. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00905>
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, *19*(11). <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Khan, H., Kashyap, A., Kaur, A., & Singh, T. G. (2020). Pharmacological postconditioning: a molecular aspect in ischemic injury. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *72*(11), 1513-1527. <https://doi.org/10.1111/jphp.13336>
- Kidoya, H., Naito, H., & Takakura, N. (2010). Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood*, *115*(15), 3166-3174. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-232306>
- Koguchi, W., Kobayashi, N., Takeshima, H., Ishikawa, M., Sugiyama, F., & Ishimitsu, T. (2012). Cardioprotective Effect of Apelin-13 on Cardiac Performance and Remodeling in End-Stage Heart Failure. *Circulation Journal*, *76*(1), 137-144. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0689>
- Li, L., Li, F., Li, F., Mao, X., Yang, L., Huang, H., Guo, Y., Chen, L., & Li, J. (2011). NOX4-Derived Reactive Oxygen Species Drive Apelin-13-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via the ERK Pathway. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *17*(4), 307-315. <https://doi.org/10.1007/s10989-011-9269-5>
- Liavonchanka, A., & Feussner, I. (2006). Lipoxigenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, *163*(3), 348-357. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.006>
- Lu, Y., Zhu, X., Liang, G. -X., Cui, R. -R., Liu, Y., Wu, S. -S., Liang, Q. -H., Liu, G. -Y., Jiang, Y., Liao, X. -B., Xie, H., Zhou, H. -D., Wu, X. -P., Yuan, L. -Q., & Liao, E. -Y. (2012). Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF-κB/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids*, *43*(5), 2125-2136. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1298-7>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Maguire, J. J., Kleinz, M. J., Pitkin, S. L., & Davenport, A. P. (2009). [Pyr 1 ]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart. *Hypertension*, *54*(3), 598-604. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619>
- Malekmohammad, K., Sewell, R. D. E., & Rafieian-Kopaei, M. (2019). Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080301>
- Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., & Audigier, Y. (2004). Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *The FASEB Journal*, *18*(15), 1909-1911. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1930fje>

- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X. -M., Philipp, S., Critz, S. D., Cohen, M. V., & Downey, J. M. (2004). Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoK ATP channel opening and leads to cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(1), H468-H476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00360.2003>
- Opletalová, B. (2021). *Kardioprotektivní účinky dehydrosilybinu – srovnání s účinkem apelinu* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Polderman, K. H. (2009). Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Medicine*, 37(Supplement), S186-S202. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
- Ramachandra, C. J. A., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Lin, Y. -H., & Hausenloy, D. J. (2020). Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection. *EBioMedicine*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102884>
- Rao, P. R. & Viswanath, R. K. (2007). Cardioprotective activity of silymarin in ischemia-reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Experimental and Clinical Cardiology*, 12(4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2359609/>
- Razavi, B., Karimi, G. (2016). Protective effect of silymarin against chemical-induced cardiotoxicity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(9), 916-923. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2016.7590>
- Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. -C., Lorgis, L., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?. *Pharmacology & Therapeutics*, 140(3), 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.004>
- Shao, Z. -Q., Dou, S. -S., Zhu, J. -G., Wang, H. -Q., Wang, C. -M., Cheng, B. -H., & Bai, B. (2021). Apelin-13 inhibits apoptosis and excessive autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regeneration Research*, 16(6). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300725>
- Sharma, R., Randhawa, P. K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2015). Bradykinin in ischemic conditioning-induced tissue protection: Evidences and possible mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 768, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.029>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
- Strijdom, H., Jacobs, S., Hattingh, S., Page, C., & Lochner, A. (2005). Nitric oxide production is higher in rat cardiac microvessel endothelial cells than ventricular cardiomyocytes in baseline and hypoxic conditions: a comparative study. *The FASEB Journal*, 20(2), 314-316. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4225fje>
- Tong, S., Chu, C., Wei, Y., Wang, L., Gao, X., Xu, X., & Yu, J. (2011). Preparation and effects of 2,3-dehydrosilymarin, a promising and potent antioxidant and free radical scavenger. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(2), 238-244. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01210.x>
- Tycinska, A. M., Lisowska, A., Musial, W. J., & Sobkowicz, B. (2012). Apelin in acute myocardial infarction and heart failure induced by ischemia. *Clinica Chimica Acta*, 413(3-4), 406-410. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.021>
- Wagner, A. H., Kautz, O., Fricke, K., Zerr-Fouineau, M., Demicheva, E., Gülden-zoph, B., Bermejo, J. L., Korff, T., & Hecker, M. (2009). Upregulation of Glutathione Peroxidase Offsets Stretch-Induced Proatherogenic Gene Expression in Human Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(11), 1894-1901. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194738>
- Widimský, P., Hlinomaz, O., Kala, P., Jirmář, R., Vojáček, J. & Janoušek, S. (2009).



- Diagnostika a léčba akutního infarktu myokardu s elevací ST. *Cor et Vasa*, 51(10), 724-740. <https://doi.org/10.33678/cor.2009.178>
- Xu, W., Li, T., Gao, L., Zheng, J., Yan, J., Zhang, J., & Shao, A. (2019). Apelin-13/APJ system attenuates early brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress in a AMPK-dependent manner after subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1620-3>
- Yamaleyeva, L. M., Shaltout, H. A., & Varagic, J. (2016). Apelin-13 in blood pressure regulation and cardiovascular disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 25(5), 396-403. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000241>
- Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A., & Guo, Z. M. (2004). Retardation of Atherosclerosis by Overexpression of Catalase or Both Cu/Zn-Superoxide Dismutase and Catalase in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Circulation Research*, 95(11), 1075-1081. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000149564.49410.0d>
- Yang, P., Kuc, R. E., Brame, A. L., Dyson, A., Singer, M., Glen, R. C., Cheriyan, J., Wilkinson, I. B., Davenport, A. P., & Maguire, J. J. (2017). [Pyr1]Apelin-13(1–12) Is a Biologically Active ACE2 Metabolite of the Endogenous Cardiovascular Peptide [Pyr1]Apelin-13. *Frontiers in Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00092>
- Yang, S., Li, H., Tang, L., Ge, G., Ma, J., Qiao, Z., Liu, H. & Fang, W. (2015). Apelin-13 protects the heart against ischemiareperfusion injury through the RISK-GSK-3 $\beta$ -mPTP pathway. *Archives of Medical Science*, 11(5). <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.54863>
- Yang, X., Zhu, W., Zhang, P., Chen, K., Zhao, L., Li, J., Wei, M. & Liu, M. (2014). Apelin-13 stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in myocardial microvascular endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 9(5). <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1984>
- Yi, S., Lin, K., Jiang, T., Shao, W., Huang, C., Jiang, B., Li, Q., & Lin, D. (2020). NMR-based metabolomic analysis of HUVEC cells during replicative senescence. *Aging*, 12(4), 3626-3646. <https://doi.org/10.18632/aging.102834>
- Zeng, X. J., Zhang, L. K., Wang, H. X., Lu, L. Q., Ma, L. Q. & Tang, C. S. (2009). Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides*, 30(6). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.02.010>
- Zholobenko, A., & Modriansky, M. (2014). Silymarin and its constituents in cardiac preconditioning. *Fitoterapia*, 97, 122-132. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.016>
- Zholobenko, A. V., Mouithys-Mickalad, A., Dostal, Z., Serteyn, D., Modriansky, M., & Lesnfsky, E. J. (2017). On the causes and consequences of the uncoupler-like effects of quercetin and dehydrosilybin in H9c2 cells. *PLOS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185691>
- Zheng, Y., Zhao, G., Panhwar, F., & He, X. (2016). Vitreous Cryopreservation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells with Low Concentration of Cryoprotective Agents for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(10), 964-973. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0335>
- Zhou, Q., Cao, J. & Chen, L. (2016). Apelin/APJ system: A novel therapeutic target for oxidative stress-related inflammatory diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 37(5). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2544>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Akt	Proteinkinasa B
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
Ang II	Angiotenzin II
APJ	Apelinový receptor
AT <sub>1</sub> R	Receptor angiotenzinu II typu 1
ATP	Adenosintrifosfát
BCA	Kyselina bicinchonionová
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BK	Bradykinin
BSA	Hovězí sérový albumin
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
DAG	Diacylglycerol
DHS	2,3-dehydrosilybin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
ERK1/2	Kinasa regulovaná extracelulárním signálem 1/2
eNOS, NOS3	Endoteliální syntasa oxidu dusnatého
FBS	Fetální bovinní sérum
GAPDH	Glyceraldehydfosfátdehydrogenasa
GPx	Glutathionperoxidasa
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintrifosfát
HClO	Kyselina chlorná
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
HIF-1	Hypoxií indukovaný faktor-1
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisfosfát
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> receptorové kanály
HOSCN	Kyselina hypothiokyanová
HUVEC	Endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly
iNOS, NOS2	Indukovaná syntasa oxidu dusnatého
L-Arg	L-arginin

LDH	Laktátdehydrogenasa
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
MMP	Metaloproteinasy
MPTP	Mitochondriální pór přechodné permeability
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCE	Sodno-vápenatá pumpa
NHE	Sodno-vodíková pumpa
NO	Oxid dusnatý
NOS	Syntasa oxidu dusnatého
nNOS, NOS1	Neuronální syntasa oxidu dusnatého
OONO <sup>-</sup>	Peroxyinitrit
ox-LDL	Oxidované lipoproteiny o nízké hustotě
PBS	Fosfátový pufr
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKC	Proteinkinasa C
PKC $\epsilon$	Proteinkinasa C-epsilon
PKG	Proteinkinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PP2	4-amino-3-(4-chloridofenyl)-1-(t-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin
(pyr)apelin-13	Pyroglutamyl apelin-13
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Systém renin-angiotenzin
RISK	Signální kaskáda reperfučního poškození
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RyR	Ryanodinové receptorové kanály
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SERCA	Vápníkové ATPasy sarko/endoplazmatického retikula
sGC	Rozpustná guanosinicyklasa
SOD	Superoxiddismutasa
SR	Sarkoplasmatické retikulum
TBS	Trisový pufr

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminometan
Trx	Thioredoxinový systém
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VSMC	Vaskulární buňky hladkého svalstva