

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv methylovaných derivátů dehydrosilybinu na  
aktivaci Akt a ERK kinas v kardiomyocytech**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Dominika Čmielová</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.</b>
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 24. 4. 2023

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce prof. Mgr. Martinu Modrianskému, Ph.D. za jeho ochotné jednání, odborné vedení a věnovaný čas. Ráda bych také poděkovala Mgr. Zdeňku Dostálovi, Ph.D. za věnovaný čas, pomoc a rady při samotných experimentech i jejich vyhodnocování. Zároveň bych chtěla poděkovat Ing. Haně Přichystalové, Ph.D. za poskytnutí buněčné linie HEK293. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali. Diplomová práce byla finančně podpořena z projektu IGA\_LF\_2022\_025.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Dominika Čmielová
Název práce	Vliv methylovaných derivátů dehydrosilybinu na aktivaci Akt a ERK kinas v kardiomyocytech
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav lékařské chemie a biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

I přes rozsáhlý rozvoj ve zdravotnictví, zůstává ischemická choroba srdeční jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Právě díky vysoké mortalitě způsobené ischemickou chorobou srdeční, jsou častým zájmem výzkumu různé kardioprotektivní strategie. Obecně jsou známy dvě metody, tzv. prekondicionování a postkondicionování, kdy se v obou případech jedná o krátké epizody ischemie, jejichž cílem je aktivovat procesy tlumící tkáňové poškození buď před nebo po samotné ischemii. Jednou z možností, jež vede ke zmírnění poškození, je aktivace signální kaskády RISK. Výzkum zabývající se kardioprotektivními strategiemi se v posledních letech zaměřil kromě syntetických léčiv také na přírodní látky. Konkrétně se jedná například o dehydrosilybin vyskytující se v extraktu ze semen ostropestřce mariánského. V rámci diplomové práce byl studován vliv methylovaných derivátů dehydrosilybinu na prvky signální dráhy RISK v kardiomyocytech. Konkrétně byly stanovovány parametry přítomnosti apelinového receptoru, míra fosforylace kinas Akt a ERK1/2, a pomocí fluorescenčních sond byl stanoven tok vápníku a produkce cAMP a NO. Výsledky ukázaly variabilní aktivitu testovaných derivátů, ale také výrazný vliv DMSO na fosforylaci kinas, který zřejmě maskoval minoritní efekty derivátů dehydrosilybinu.

Klíčová slova	ischemicko-reperfuzní poškození, kardioprotekce, dehydrosilybin, kinasy Akt a ERK1/2
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Bc. Dominika Čmielová
Title	Influence of methylated dehydrosilybin derivatives on Akt and ERK kinases located in cardiomyocytes
Type of thesis	Diploma
Department	Department of medical chemistry and biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.
The year of presentation	2023

### **Abstract**

Despite extensive medical development, coronary artery disease remains one of the most common causes of death. Thanks to the high mortality caused by coronary artery disease various cardioprotective strategies are of research interest. Generally, two methods are known, i.e. preconditioning and postconditioning. In both cases, these are short episodes of ischemia, which aim to activate processes that reduce tissue damage either before or after the ischemia itself. Activation of the RISK signaling cascade is one of the options that leads to the reduction of damage. In recent years, research on cardioprotective strategies has focused on natural substances in addition to synthetic drugs. In particular, dehydrosilybin is one of components found in the seed extract of milk thistle. The influence of methylated dehydrosilybin derivatives on the elements of the RISK signaling pathway in cardiomyocytes was studied as part of the thesis. Specific parameters such as the presence of the apelin receptor, and phosphorylation of the Akt and ERK1/2 kinases were determined. Fluorescent probes were used to determine calcium flow, and production of cAMP and NO. Results demonstrate variable activity of the tested derivatives but also major influence of DMSO on the phosphorylation of the kinases, effect that may have masked some minor effects of the derivatives.

Keywords	Ischemic-reperfusion injury, cardioprotection, dehydrosilybin, Akt and ERK1/2 kinases
Number of pages	86
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>3</b>
2.1	Ischemická choroba srdeční	3
2.1.1	Mechanismus ischemického poškození	5
2.1.2	Reperfuze	7
2.1.2.1	Mechanismus reperfuzního poškození	7
2.1.3	Mitochondriální pór přechodné propustnosti	9
2.2	Kardioprotekce	9
2.2.1	Mechanismus prekondicionování	10
2.2.2	Role fosfolipas v rámci prekondicionování	13
2.2.3	Proteinkinasa B	13
2.2.4	Endoteliální NO-syntasa	14
2.2.5	Produkce ROS a aktivace PKC	15
2.2.6	ERK1/2	16
2.2.7	Glykogensyntasa kinasa-3 $\beta$	16
2.2.8	RISK a SAFE	17
2.3	Ostropestřec mariánský	19
2.3.1	Silymarin	20
2.4	2,3-dehydrosilybin	21
2.4.1	Antioxidační vlastnosti DHS	22
2.4.2	Vliv DHS na poškození kardiomyocytů	22
2.4.3	Vliv DHS na produkci ROS	23
2.4.4	Pozitivní inotropní efekt DHS	24
2.4.5	Vliv DHS na hladinu Ca <sup>2+</sup>	25
2.4.6	Signální dráha DHS	25
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>27</b>
3.1	Materiál	27
3.1.1	Biologický materiál	27
3.1.2	Chemikálie	27
3.1.3	Protilátky	29
3.1.4	Kultivační média a roztoky	30
3.1.5	Přístrojové vybavení	31
3.1.6	Ostatní použitý materiál	32
3.1.7	Software	32

3.2	Metody	33
3.2.1	Kultivace buněčné linie H9c2	33
3.2.2	Stanovení cytotoxicity methylovaných derivátů DHS	33
3.2.3	Lýza buněk a stanovení proteinů pomocí BCA metody	35
3.2.4	SDS-PAGE	35
3.2.5	Western blot a imunodetekce	36
3.2.6	Stanovení míry fosforylace kinas v závislosti na čase	37
3.2.7	Transfekce buněčné linie H9c2	38
3.2.8	Transfekce buněčné linie HEK293	39
3.2.9	Stanovení hladiny $Ca^{2+}$	39
3.2.10	Stanovení hladiny cAMP	40
3.2.11	Stanovení produkce NO	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>41</b>
4.1	Stanovení životaschopnosti H9c2 buněk po intoxikaci vybranými methylovanými deriváty DHS	41
4.2	Vliv methylovaných derivátů DHS na přítomnost apelinového receptoru	43
4.3	Stanovení míry fosforylace Akt kinas v závislosti na čase	44
4.4	Stanovení míry fosforylace ERK1/2 kinas v závislosti na čase	50
4.5	Ověření účinků apelinu-13 a DHS na míru fosforylace kinas	56
4.6	Vliv apelinu-13, DHS a methylovaných derivátů na hladinu vápníku v buňkách H9c2	59
4.7	Vliv apelinu-13 a DHS na hladinu cAMP v buněčné linii H9c2	61
4.8	Vliv apelinu-13 a DHS na hladinu cAMP v buněčné linii HEK293	63
4.9	Vliv testovaných látek na produkci NO v buněčné linii H9c2	64
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>84</b>

## CÍLE PRÁCE

### **Teoretická část:**

- a) Vypracování literární rešerše zaměřené na polyfenoly, konkrétně dehydrosilybin, které vykazují kardioprotektivní účinky v rámci regulace signálních drah doprovázejících srdeční ischemii a následné ischemicko-reperfuzní poškození.

### **Praktická část:**

- a) Stanovení životaschopnosti buněk H9c2 v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů dehydrosilybinu.
- b) Imunodetekční stanovení cílových proteinů (apelinový receptor, fosforylované kinasy).
- c) Stanovení toku vápníku v buňkách H9c2 pomocí fluorescenčních metod.
- d) Stanovení hladiny signálních molekul (ROS, RNS) v buňkách H9c2 v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů dehydrosilybinu.



# 1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění je početná skupina onemocnění, která postihuje především srdeční sval a cévní systém. Ischemická choroba srdeční (ICHS), cévní mozková příhoda a městnavé srdeční selhání se poté řadí mezi kardiovaskulární onemocnění s nejvyšší morbiditou a mortalitou (WHO, 2021). Rozsáhlá studie z roku 2017 udává, že v tomto roce zemřelo celosvětově 17,8 milionů lidí v souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními. Konkrétně se nejčastěji jednalo o ICHS (50 % případů) a cévní mozkovou příhodu (35 % případů) (Roth *et al.*, 2018).

Samotná ischemie je příčinou rozsáhlého poškození tkáně. Stejně tomu je i v případě následné reperfuze, jež je nezbytná pro obnovu srdeční tkáně. Jedná se o tzv. ischemicko-reperfuzní poškození (Kalogeris *et al.*, 2012). V rámci zmírnění účinků ischemicko-reperfuzního poškození jsou testovány dva přístupy: prekondicionování a postkondicionování. V obou případech se jedná o krátké epizody ischemie, navozené mechanicky či farmakologicky, jejichž cílem je aktivovat procesy tlumící tkáňové poškození buď před nebo po samotné ischemii (Vinten-Johansen *et al.*, 2007).

Farmakologická modulace ischemicko-reperfuzního poškození zahrnuje, kromě syntetických léčiv, také přírodní látky, které jsou přirozeně přítomny v dietě. V obou případech je však potřeba poznat mechanismus účinku tak, aby byl farmakologický přístup aplikovatelný v různých situacích. V posledních letech se výzkum zaměřil na polyfenoly, např. na dehydrosilybin (DHS), který se běžně vyskytuje v rostlině zvané ostropestřec mariánský (Gabrielová *et al.*, 2019).

V rámci diplomové práce byl studován vliv methylovaných derivátů DHS na signální dráhu apelinového receptoru (APJ). Aktivace APJ spouští signální kaskádu kinas, konkrétně se jedná o kinasy 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) (Chapman *et al.*, 2014). Tyto kinasy se podílí na modulaci ischemicko-reperfuzního poškození (Cohen & Downey, 2015). U samotného DHS, jež spadá do skupiny flavonolignanů, byla již v minulosti pozorována schopnost modulovat rozsah a průběh ischemického poškození srdce (Gabrielová *et al.*, 2019). V předchozí práci bylo rovněž zjištěno, že DHS se podílí na samotné aktivaci kinas Akt a ERK1/2 (Opletalová, 2021). Cílem diplomové práce

bylo tedy identifikovat strukturní motivy DHS, které by se mohly podílet na aktivaci obou kinas.

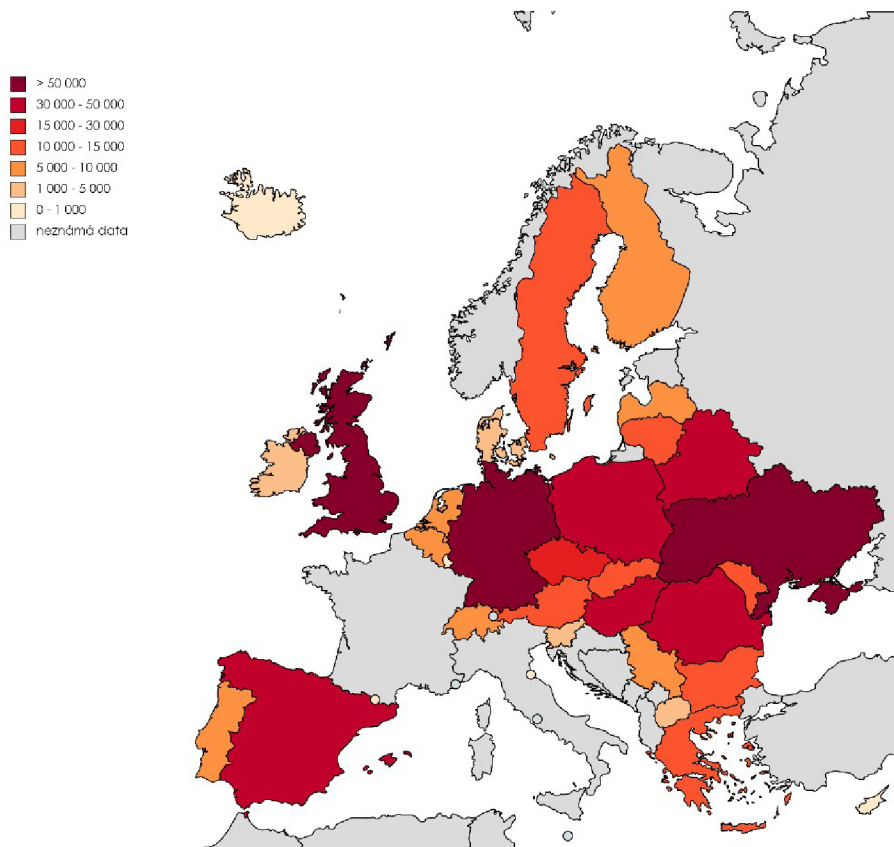
## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí ve světě (WHO, 2021). Celosvětový trend se projevuje i v Evropě, kde jsou kardiovaskulární onemocnění nejčastější příčinou úmrtí již od 80. let 20. století. Podle nejnovějších dat umírá každoročně v Evropě asi 3,8 milionu lidí v souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními (Obr. 1). Přesněji tedy 1,76 milionu mužů (39 % případů) a více než 2 miliony žen (46 % případů). Uvedená data se vztahují na pacienty starší sedmdesáti let. U pacientů mladších sedmdesáti let je trend v závislosti na pohlaví pacienta opačný. V souvislosti s kardiovaskulárními onemocněními umírá 32 % mužů mladších sedmdesáti let a 28 % žen mladších sedmdesáti let (Townsend *et al.*, 2022).

Hlavní příčinou rozvoje tohoto onemocnění je nedostatečný přívod krve do postižené tkáně v důsledku zablokování koronárních cév zásobujících srdeční sval (Wenger *et al.*, 2010). Takovýto patologický stav může vzniknout nejčastěji v důsledku aterosklerózy věnčitých tepen, případně embolie, zánětu nebo spazmu tepen (Hradec & Býma, 2007; IKEM, 2022). Klinickým projevem ICCHS je angina pectoris. Jedná se o stav, který je charakteristický nepříjemným pocitem na hrudi, zádech, ramenou nebo pažích. Tento nepříjemný pocit nabývá na intenzitě s fyzickou námahou nebo emočním stresem, naopak ustupuje po užití nitroglycerinu nebo po odpočinku (Wenger *et al.*, 2010).

Jelikož je ateroskleróza hlavních věnčitých tepen nejčastější příčinou ICCHS, jsou rovněž rizikové faktory pro rozvoj ICCHS spojené s rizikovými faktory aterosklerózy, které můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na ovlivnitelné a neovlivnitelné. V konečném důsledku jsou rizikové faktory výsledkem interakce mezi životním stylem jedince a jeho genetickými predispozicemi. Mezi ovlivnitelné faktory se řadí kouření, dyslipidémie (zvýšený celkový cholesterol v plazmě – především LDL-cholesterol, zvýšené triacylglyceroly, snížený HDL-cholesterol), hypertenze, diabetes mellitus a obezita. Mezi neovlivnitelné se poté řadí věk, mužské pohlaví a rodinná anamnéza předčasné ICCHS (muži mladší 55 let, ženy mladší 65 let) (Hradec & Býma, 2007). U žen se mezi rizikové faktory řadí navíc menopauza a užívání hormonální antikoncepce (Gandalovičová, 2002).



Obr. 1 Mapa zobrazující mortalitu spojenou s ischemickou chorobou srdeční v jednotlivých evropských zemích. Data z roku 2018 jsou uváděna pro všechny věkové skupiny a pro obě pohlaví (upraveno podle <https://www.who.int/> a <https://www.mapchart.net/index.html>).

ICHS je z patologického hlediska stavem, kdy je spotřeba kyslíku v myokardu v nerovnováze s jeho dodávkou. Tento nerovnovážený stav se může projevit jak v klidu, tak během fyzické nebo emoční zátěže. V klidovém stavu se v myokardu spotřebovává asi desetina přijatého kyslíku, během zátěže se poté spotřeba kyslíku zvyšuje až pětkrát. Rovněž bylo prokázáno, že spotřeba kyslíku v myokardu není rovnoměrně rozložena. Mezi části myokardu s největší spotřebou se řadí především subendokardiální vrstva levé komory (Hromadová, 2004).

ICHS je spojena s tzv. ischemicko-reperfuzním poškozením (Obr. 2). Jedná se o poškození myokardu v důsledku ischemie (z řeckého *isch-*, omezení a *-haema*, krev), což je nerovnovážený stav mezi přísunem kyslíku a jeho spotřebou v myokardu, a reperfuze. Reperfuze je stav, kdy je obnoven přísun kyslíku do srdeční tkáně. Tento stav je rovněž spojen s vlnou poškození (Frank *et al.*, 2012).

### 2.1.1 Mechanismus ischemického poškození

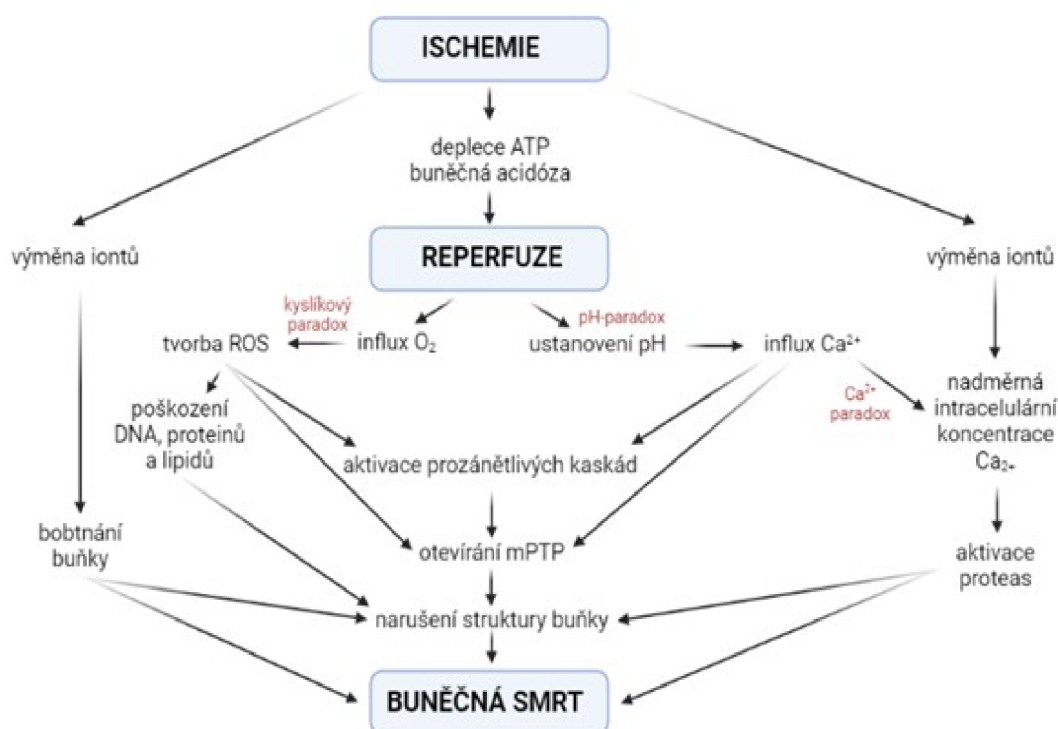
Následkem uzavření hlavní větve věnčité tepny je spuštěna řada metabolických změn. Většina těchto reakcí je spojena se dvěma hlavními účinky snížení arteriálního průtoku. Jedná se tedy o již zmíněný snížený přísun kyslíku (hypoxie) a také o hromadění produktů ischemického metabolismu v tkáni myokardu (Jennings & Reimer, 1991).

V důsledku sníženého přísunu kyslíku do zasažené tkáně je aerobní glykolýza nedostatečným zdrojem energie ve formě vysokoenergetického fosfátu (Kloner & Jennings, 2001). Koncentrace vysokoenergetického fosfátu v buňce výrazně klesá již během prvních 30 sekund od okluze (Braasch *et al.*, 1968). Jakmile dojde k okluzi hlavní věnčité tepny, již po osmi až deseti sekundách, se hlavním zdrojem energie stává anaerobní glykolýza (Kloner & Jennings, 2001). Ta dodává asi 80 % potřebného vysokoenergetického fosfátu ve tkáních těžce až úplně poškozených ischemií (Jennings *et al.*, 1981). Substrátem anaerobního metabolismu je především glykogen. Samotná anaerobní glykolýza je dostačujícím zdrojem ATP po dobu šedesáti až devadesáti minut (Jennings & Reimer, 1991). Zásoby kreatinfosfátu jsou dostatečným zdrojem vysokoenergetického fosfátu jen po dobu 30 minut od propuknutí ischemie (Braasch *et al.*, 1968).

V souvislosti s anaerobní glykolýzou se zvyšuje koncentrace intracelulárního laktátu a vodíkových protonů. Důsledkem zvyšující se koncentrace těchto látek je snížení intracelulárního pH na 5,8 až 6,0 (Kloner & Jennings, 2001). Kyselé prostředí v buňce a vysoká koncentrace laktátu mají rovněž za následek inhibici přeměny ADP na ATP. Nadbytek ADP je přeměněn pomocí ATP-difosfát lyasy (adenylátcyklasa, EC 4.6.1.1) na AMP, které se akumuluje v intracelulárním prostoru a následně dochází k degradaci na adenosin. Adenosin je poté schopen difundovat do extracelulárního prostoru, kde je přeměněn na inosin a hypoxanthin. Vlivem výše zmíněných reakcí dochází ke ztrátě 30 až 40 % buněčných zásob adeninu (Jennings & Steenbergen, 1985; Kloner & Jennings, 2001).

Rozsah poškození buněk závisí také na intenzitě ischemie a oblasti myokardu, ve které se konkrétní buňky nacházejí. Ischemie může být podle míry snížení průtoku mírná až totální, kdy nastává úplná absence perfuze (Jennings & Reimer, 1991). Výzkumy prováděné na pokusných zvířatech ukazují, že při těžké nízkoprůtokové ischemii (průtok <10 % oproti kontrolním hodnotám) dochází k nekróze buněk

již po 20 minutách. V rámci závislosti míry poškození buněk na lokaci buněk bylo prokázáno, že nejvíce jsou poškozeny kardiomyocyty v subendokardiální oblasti, jelikož se jedná o oblast myokardu s největšími energetickými nároky. Kardiomyocyty v této oblasti odumírají jako první, a to do pouhých 60 minut od počátku ischemie. Naopak kardiomyocyty v zónách vystavených mírnější ischemii, tedy takové ischemii, kdy je průtok snížen na 10-35 % původních hodnot, odumírají po třech až šesti hodinách od propuknutí ischemie. Pro přežití kardiomyocytů je poté potřebný průtok snížený maximálně na 35 % původních hodnot (Jennings, 1970; Reimer & Jennings, 1979; Jennings & Reimer, 1991).



Obr. 2 Hlavní patologické procesy přispívající k ischemicko-reperfuznímu poškození a buněčné smrti (upraveno podle Kalogeris *et al.*, 2017 v programu BioRender.com).

## 2.1.2 Reperfuze

Již během několika sekund dochází v rámci reperfuze k obnovení mitochondriální oxidativní fosforylace na úroveň porovnatelnou se stavem před samotnou ischemií (Jennings *et al.*, 1990; Kloner & Jennings, 2001). Arteriální průtok se zvýší až o 400-600 % během prvních pěti minut. Zvýšený arteriální průtok se poté během 15-20 minut vrací na původní hodnoty (Kloner & Jennings, 2001).

V rámci okamžité obnovy arteriálního průtoku je obnovena dodávka kyslíku a dalších substrátů do postižené tkáně. Právě dodané substráty umožní přeměnu buněčného adeninu zpět na ATP, a to pomocí refosforylace AMP a ADP naakumulovaného během ischemie (Jennings *et al.*, 1985, Kloner & Jennings, 2001). Takováto obnova zásob ATP v mitochondriích probíhá v největší míře 3-20 minut po obnovení arteriálního průtoku (Jennings *et al.*, 1985). Ovšem úplné obnovení celkových zásob adeninu je proces, jež trvá i několik dní (Reimer *et al.*, 1981). Mnohem rychlejším procesem je ustanovení pH na původní hodnoty, dochází k němu již během prvních 30-120 sekund od nástupu reperfuze (Strömer *et al.*, 2000). V počátcích reperfuze dochází rovněž ke snížení koncentrace intracelulárního laktátu, který může být vyplaven do oběhu nebo probíhá oxidace na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Jennings *et al.*, 1985, Kloner & Jennings, 2001).

Dalším projevem ICHS je zvýšená koncentrace vybraných proteinů. Jedná se například o superoxid:superoxid oxidoreduktasu (superoxiddismutasa, SOD, EC 1.15.1.1), indukovanou NO syntasu (iNOS, EC 1.14.13.39) nebo proteiny teplotního šoku (Hoshida *et al.*, 1993; Marber *et al.*, 1993; Takano *et al.*, 1998). Tyto proteiny jsou detekovatelné po uplynutí 24 hodin od počátku reperfuze a jsou považovány za fyziologickou odpověď kardiomyocytů na ischemické poškození (Kloner & Jennings, 2001).

### 2.1.2.1 Mechanismus reperfuzního poškození

Reperfuzní poškození bylo poprvé blíže popsáno v roce 1960 týmem, který vedl R. B. Jennings. Výzkum probíhal na psích srdcích a klíčovým zjištěním bylo, že reperfuze urychluje rozvoj nekrózy myokardu. Histologické změny pozorované po pouhých 30-60 minutách reperfuze byly srovnatelné se stupněm nekrózy, který je běžně pozorován po 24 hodinách trvalé koronární okluze (Jennings *et al.*, 1960).

Kritickým jevem spojeným s negativními účinky reperfuze je příliš rychlé ustanovení intracelulárního pH na původní preischemické hodnoty. V průběhu ischemie se  $H^+$  hromadí v intracelulárním prostoru jako důsledek anaerobní glykolýzy.  $H^+$  jsou tedy po obnovení arteriálního toku transportovány do extracelulárního prostoru v rámci antiportu s  $Na^+$ . Zvýšená koncentrace  $Na^+$  v intracelulárním prostoru má za následek aktivaci  $2Na^+/Ca^{2+}$  transportéru, jehož nadměrná aktivita může vést až k buněčné smrti v důsledku velmi vysoké koncentrace vápenatých kationtů v intracelulárním prostoru (Frank *et al.*, 2012). Výše zmíněné procesy spojené s transportem iontů a změnou pH se označují jako pH-paradox (Currin *et al.*, 1991).

Dalším významným projevem reperfuze je zvýšená koncentrace volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS). Za nadměrnou tvorbu ROS je zodpovědný vysoký přísun kyslíku spojený s nástupem reperfuze. Tento jev se označuje také jako tzv. kyslíkový paradox (Kalogeris *et al.*, 2017). Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou poté zodpovědné za poškození proteinů a lipidů (Guarnieri *et al.*, 1980; Kalogeris *et al.*, 2017). ROS se dále podílejí na aktivaci drah souvisejících se stresem. V rámci ischemicko-reperfuzního poškození tak dochází k uvolňování cytokinů a následné tvorbě faktoru nádorové nekrózy (TNF- $\alpha$ ). Důsledkem nadměrné exprese TNF- $\alpha$  a ději s ní spojenými jsou poté hypertrofie, kontraktilní dysfunkce, fibróza a buněčná smrt (Frank *et al.*, 2012).

Zvýšená intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  je příčinou mnoha dalších procesů. Jedná se například o tvorbu komplexů pyrofosfátu vápenatého a kyseliny močové. Takovéto komplexy jsou poté zodpovědné za aktivaci prozánětlivých molekul jako jsou interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) a TNF- $\alpha$ . IL- $1\beta$  a TNF- $\alpha$  zhoršují dopady ischemicko-reperfuzního poškození a spouštějí řetězové reakce, v rámci nichž dochází k aktivaci transkripčních faktorů, zvýšení exprese dalších prozánětlivých cytokinů. Výsledkem je poté rozsáhlá zánětlivá reakce (Kalogeris *et al.*, 2017).

Dalším jevem spojeným s reperfuzí je zvýšená oxidace mastných kyselin. Zvýšená míra  $\beta$ -oxidace je příčinou snížené oxidace glukosy, což vede k vytvoření nerovnováhy mezi glykolýzou a oxidací glukosy. Vysoká koncentrace vzniklých volných mastných kyselin v cytoplasmě má za následek omezení oxidace pyruvátu. Všechny tyto mechanismy vedou k tvorbě nežádoucích  $H^+$  v intracelulárním prostoru (Jaswal *et al.*, 2011).



### 2.1.3 Mitochondriální pór přechodné propustnosti

Kritickou složkou reperfučního poškození je mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP). Jedná se o neselektivní kanál nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně, která se za normálních okolností jeví jako relativně nepropustná. mPTP propouští za fyziologických podmínek pouze molekuly menší než 1 500 Da (Halestrap *et al.*, 2004). Po celou dobu trvání ischemie je mPTP uzavřený, otevírá se až po nástupu reperfuze (Frank *et al.*, 2012). Na otevření mPTP se podílí několik faktorů, jedná se především o vysokou intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , oxidační stres a depleci ATP (Halestrap *et al.*, 2004).

Důsledkem otevření mPTP je v první řadě neschopnost mitochondrií syntetizovat ATP. Po otevření mPTP se zvyšuje propustnost pro  $\text{H}^+$ , následkem čehož zaniká protonmotivní hnací síla, která je závislá na pH gradientu a membránovém potenciálu. Bez protonmotivní hnací síly nemůže být ATP syntetizováno pomocí oxidativní fosforylace. Za takovýchto podmínek změni ATPasa svou funkci a začne štěpit ATP syntetizované v rámci glykolýzy. V důsledku zmíněných změn v metabolismu nastává nekróza (Halestrap & Pasdois, 2009).

Druhým důsledkem otevření mPTP je tzv. bobtnání mitochondrií, jež je spojeno se zvýšenou propustností vnitřní mitochondriální membrány pro malé molekuly. Vysoká koncentrace těchto malých molekul je poté příčinou osmotického gradientu. Bobtnání způsobuje rozpínání především vnější mitochondriální membrány (rozpínají se kristy), vnitřní mitochondriální membrána si zachovává integritu. Následkem prasknutí vnější mitochondriální membrány dochází k uvolnění cytochromu c a dalších proapoptických proteinů do cytoplasmy, což v konečném důsledku vede k apoptóze (Halestrap & Pasdois, 2009).

## 2.2 Kardioprotekce

Jedním z prvních výzkumů provedených na téma kardioprotekce provedl tým Murry *et al.* v roce 1986. Zabývali se vlivem krátkých opakujících se ischemických epizod na rozsah poškození myokardu. Jako nejefektivnější se ukázal postup, kdy je myokard vystaven čtyřem pětiminutovým ischemiím, které se vždy střídají s 5 minutami reperfuze. Takto ošetřená srdce byla poté vystavena 40 minut trvající okluzi. Ukázalo se, že došlo k poklesu v rámci poškození myokardu až o 25 %. Autoři studie se domnívali, že důvodem poklesu je nižší úbytek ATP a nižší akumulace

katabolitů v zasažených kardiomyocytech (Murry *et al.*, 1986). Souvislosti mezi kardioprotekcí a koncentrací adeninových nukleotidů a laktátu v zasažených kardiomyocytech se zabývali ve stejném roce i Reimer *et al.* Z jejich výsledků bylo rovněž patrné, že opakující se epizody reperfuze slouží jako prevence před rozsáhlým poškozením myokardu (Reimer *et al.*, 1986). Výše zmíněné použité metody byly pojmenovány jako tzv. prekondicionování (PC, Obr. 3) (Murry *et al.*, 1986).

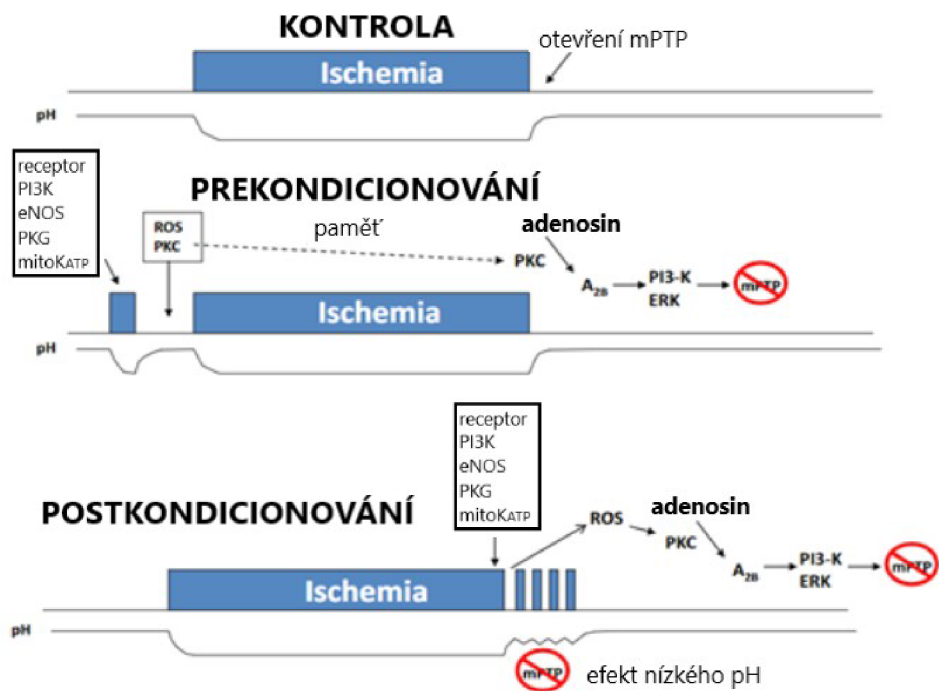
PC je v klinické praxi proveditelný pouze v případech plánovaných operací srdce. Pokud se ovšem jedná například o akutní infarkt myokardu, PC není možný, jelikož koronární tepna je v době přijetí pacienta již ucpaná. V takových případech se využívá tzv. postkondicionování (Frank *et al.*, 2012).

První studie zabývající se postkondicionováním pochází z roku 2003. Výzkum probíhal opět na psích srdcích, kdy byla srdce vystavena ischemii trvající 60 minut a následně tříhodinové reperfuzi. V rámci postkondicionování předcházely tříhodinové reperfuzi tři cykly třicetisekundové reperfuze a třicetisekundové reokluze. Zároveň byl na psích srdcích testován i PC, který byl poté porovnáván s postkondicionováním. U obou výše zmíněných typů kardioprotekce byly pozorovány pozitivní účinky na rozsah poškození myokardu po infarktu, který se snížil asi o 10 % oproti kontrole (Zhao *et al.*, 2003).

V literatuře se rovněž využívá termín „farmakologické prekondicionování“. Jedná se o postup využívající farmakologické přípravky za účelem zmírnit účinky infarktu na poškození myokardu. Použité farmakologické přípravky spouštějí sekundární signální dráhy, které jsou spojené s kardioprotekcí bez vyvolání předchozí ischemie. Mezi takovéto látky se řadí např. agonisté adenosinu A<sub>1</sub> (Kloner *et al.*, 1998).

### **2.2.1 Mechanismus prekondicionování**

Poprvé byl PC využit v již zmíněné studii Murry *et al.* z roku 1986. Na základě provedených studií bylo zjištěno, že PC je kardioprotektivní metoda, jež se podílí na redukci poškození myokardu po infarktu a rovněž na zachování funkce vaskulárního endotelu (Murry *et al.*, 1986; DeFily & Chillian, 1993). Dalším účinkem PC je inhibice apoptózy v kardiomyocytech způsobená zamezením akumulace neutrofilů a snížením exprese proapoptického proteinu Bax (z anglického **B**cl2-associated **X** protein) (Nakamura *et al.*, 2000).



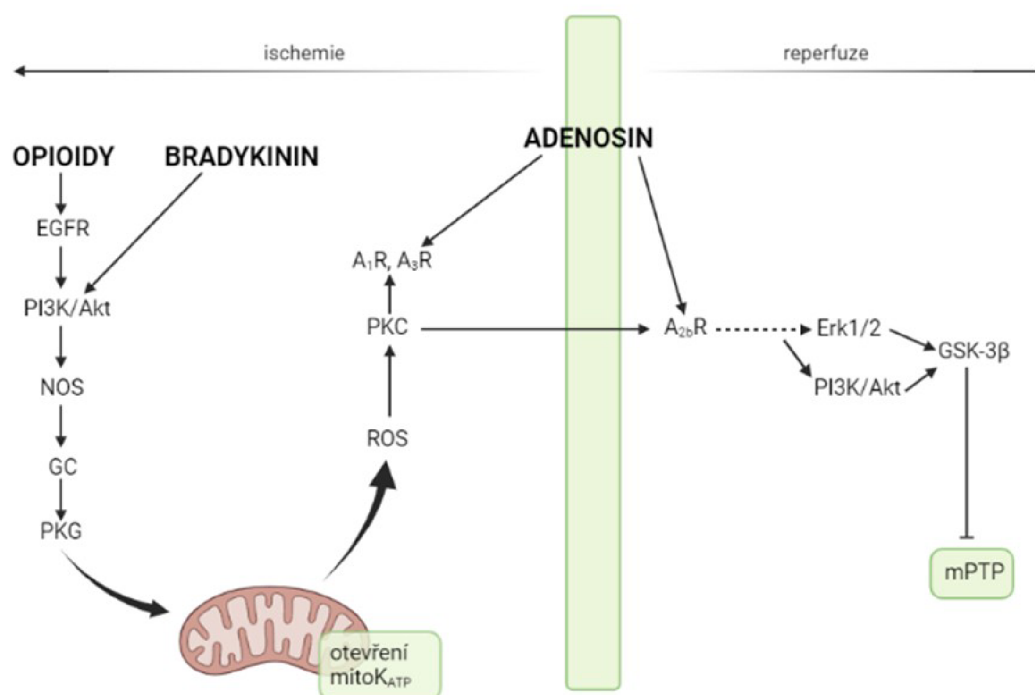
Obr. 3 Zapojení signálních drah, změny pH a formování mPTP v průběhu preconditionování a postkondicionování (upraveno podle Cohen & Downey, 2015).

V rámci pokusů provedených na králících bylo zjištěno, že mechanismus PC zahrnuje stimulaci adenosinových, bradykininových a opioidních receptorů spojených s G-proteinem. Všechny tyto dráhy působí v myokardu paralelně a jejich společným cílem je aktivace ATP:protein fosfotransferasy (proteinkinasa C, PKC, EC 2.7.11.13) (Obr. 4) (Goto *et al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 1995; Miki *et al.*, 1998). V rámci výzkumu zaměřeného na kardioprotekci a PC byly nalezeny i další ligandy vážící se na receptory spřažené s G-proteinem, jež jsou schopny podobným způsobem stimulovat PKC. Jedná se například o endotelin nebo angiotensin II (Liu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Tyto látky ovšem nehrají příliš významnou roli v rámci PC (Downey *et al.*, 2007).

Opioidy a bradykinin aktivují PKC, na rozdíl od adenosinu, přes kaskádu několika dalších proteinů. Konkrétně se jedná o ATP:1-fosfatidyl-1D-*myo*-inositol 3-fosfotransferasu (fosfatidylinositol-3-kinasa, PI3K, EC 2.7.1.137), Akt, endoteliální NO syntasu (eNOS), GTP-difosfát lyasu (guanylylcyklasa, GC, EC 4.6.1.2), ATP:protein fosfotransferasu závislou na cGMP (proteinkinasa G, PKG, EC 2.7.11.12), která aktivuje otevření mitochondriálních draselných kanálků závislých na ATP (mitoK<sub>ATP</sub>). Tento proces má za následek produkci ROS a s tím spojenou aktivaci PKC. U adenosinu dochází po navázání na receptor k přímé aktivaci PKC pomocí fosfolipas. Drobné rozdíly jsou i mezi samotnými opioidními a bradykininovými receptory.

V případě opioidních receptorů dochází ještě k zapojení receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) (Downey *et al.*, 2007).

Adenosin se váže na receptory ukotvené v plasmatické membráně kardiomyocytů, které jsou spojeny s G-proteiny. Různé typy adenosinových receptorů se vážou na různé  $\alpha$  podjednotky G-proteinů.  $A_1$  receptory se vážou na  $G_i$ -proteiny, kdežto  $A_2$  receptory se vážou na  $G_s$ -proteiny. Rovněž se adenosinové receptory liší svou lokalizací.  $A_1$  a  $A_2$  receptory jsou typické pro hladké svalstvo cév,  $A_2$  se dále vyskytují ve velké míře v buňkách endotelu a  $A_3$  receptory jsou typické pro komorové kardiomyocyty (de Jong *et al.*, 2000). Na PC se poté podílejí především  $A_1$  a  $A_3$  receptory (de Jonge, 1999). U myši a kuřat bylo pozorováno, že zvýšená exprese adenosinových receptorů  $A_1$  a  $A_3$  má za následek zmírnění ischemicko-reperfuzního poškození (Dougherty *et al.*, 1998; Headrick *et al.*, 1998). Takovýto mechanismus je v rámci různých druhů velmi konzervovaný a projevuje se i u člověka (de Jong *et al.*, 2000).



Obr. 4 Rozdělení mechanismu signalizace v rámci PC na základě stimulace různých receptorů – opioidních, bradykininových a adenosinových (upraveno podle Downey *et al.*, 2007 v programu BioRender.com).

### 2.2.2 Role fosfolipas v rámci prekonkondicionování

Z fosfolipas jsou v rámci PC důležité především fosfolipasy C a D (Cohen *et al.*, 1996). Fosfolipasa C je aktivována přes adenosinové receptory  $A_1$  a  $A_{2B}$ , fosfolipasa D poté především přes  $A_3$  (Parsons *et al.*, 1998). Aktivovaná fosfolipasa C katalyzuje hydrolýzu membránových fosfolipidů obsahujících inositol. Produkty hydrolýzy jsou fosfatidylinositol, fosfatidylinositol-4-monofosfát nebo fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ).  $PIP_2$  je následně dále hydrolyzován na 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát ( $IP_3$ ) (Majerus *et al.*, 1990).  $IP_3$  je zodpovědný za otevření vápenatých kanálků v membráně sarkoplasmatického retikula a uvolnění  $Ca^{2+}$  (Cohen *et al.*, 1996). DAG se naopak účastní translokace a aktivace PKC (Bell & Burns, 1991).

V případě fosfolipasy D je mechanismus hydrolýzy membránových fosfolipidů poněkud odlišný. Fosfolipasa D hydrolyzuje především hojně se vyskytující fosfatidylcholin (Shukla & Halenda, 1991). Produkty hydrolýzy jsou cholin a kyselina fosfatidová (PA). Konečným produktem hydrolýzy PA je poté DAG. V rámci výzkumu na králících bylo zjištěno, že ischemie a s ní související zvýšené koncentrace adenosinu zvyšují aktivitu fosfolipasy D (Cohen *et al.*, 1996).

### 2.2.3 Proteinkinasa B

V rámci PC dochází k aktivaci hned několika kinas. Konkrétně se jedná o již zmíněnou PKC, dále pak o MAP kinasy, tyrosin kinasy a další. Tyto kinasy se poté podílejí na aktivaci signálních drah vedoucích k přežití buňky (Uchiyama *et al.*, 2004).

Důležitým prvkem rozhodujícím o přežití buňky je proteinkinasa B (Akt) (Uchiyama *et al.*, 2004). Jedná se o protein řadící se do rodiny serin/threoninových kinas (NCBI, 2022). Aktivátorem Akt je PI3K (Uchiyama *et al.*, 2004). V konečném důsledku vede tato signální dráha k růstu buněk, vstupu do buněčného cyklu, migraci buněk nebo jejich přežití (Cantley, 2002).

V rámci signální dráhy aktivující Akt, dochází k fosforylaci na pozici D3 inositolového kruhu lipidů obsahujících fosfatidylinositol. Stimulem pro fosforylaci fosfatidylinositolu mohou být hormony nebo růstové faktory. Tyto molekuly se vážou na receptory spřažené s tyrosinovými kinasami. V důsledku aktivace tyrosinových kinas dochází k autofosforylaci residuí tyrosinu a následně k přenosu fosfátové skupiny na další proteiny, mezi něž se například řadí GAB1 (z anglického GRB2-associated-

binding protein 1), p38 nebo Ras protein. Přenos fosfátové skupiny mezi jednotlivými proteiny vede až k aktivaci PI3K kinasy. Aktivovaná PI3K je schopná katalyzovat přeměnu PIP<sub>2</sub> na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát. Ten se akumuluje na plasmatické membráně, kde se na něj vážou proteiny s PH-doménou (z anglického pleckstrin-homology domain). Mezi takové proteiny se řadí i fosfoinositol dependentní kinasa 1 (PDK1), která se již přímo účastní aktivace Akt (Cantley, 2002). Aktivace Akt je zprostředkována navázáním fosfátové skupiny na pozici Thr308 (Lawlor & Alessi, 2001).

Aktivace Akt může ovlivňovat další signální dráhy, jedná se například o p38MAPK (isoforma mitogenem aktivovaných proteinkinás) a JNK (z anglického c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases). Akt v tomto případě fosforyluje Ser83 a tím i inhibuje aktivátor těchto drah, ATP:L-aspartát 4-fosfotransferasu (kinasa regulující signály pro apoptózu 1, ASK1, EC 2.7.2.4). Výsledkem spřažení výše zmíněných signálních drah dochází k inhibici apoptózy (Kim *et al.*, 2001).

Aktivace Akt se jeví jako dostatečná v rámci zablokování buněčné smrti navozené i dalšími stimuly (Uchiyama *et al.*, 2004). Mezi takovéto stimuly se řadí například BAD (proapoptický promotor spojený s genem Bcl-2), prokaspasa-9, CREB (protein vážící CRE - element citlivý na cAMP) a proteiny z rodiny transkripčních faktorů Forkhead (Datta *et al.*, 1997; Cardone *et al.*, 1998; Du & Montminy, 1998; Brunet *et al.*, 1999).

## 2.2.4 Endoteliální NO syntasa

Oxid dusnatý (NO) je primárně produkován především cévními endoteliálními buňkami a zaujímá důležitou roli v rámci kardioprotekce. V klinické praxi jsou již pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění využívány látky, které jsou zdrojem NO. Konkrétně se jedná například o nitroglycerin (Li *et al.*, 2006). Ošetření srdeční tkáně donory NO je spojeno se zmírněním postischemického poškození v podobě inhibice agregace krevních destiček, útlumu interakce mezi granulocyty a endotelem a zachování ostatních funkcí endotelu (Liu *et al.*, 1998).

V buňce je za fyziologických podmínek zdrojem NO endoteliální NO-syntasa (eNOS), která se podílí na udržování kardiovaskulární homeostázy (Dimmeler *et al.*, 1999). Konkrétně se NO podílí na regulaci krevního tlaku, vaskulární remodelaci a angiogenezi (Murohara *et al.*, 1998; Rudic *et al.*, 1998). Enzym eNOS je v rámci signální dráhy aktivován pomocí Akt, dochází k jeho fosforylaci na Ser1177

(Dimmeler *et al.*, 1999). Produkovaný NO se poté podílí na aktivaci GC, která přeměňuje GTP na cGMP (Downey *et al.*, 2007). Vznikající cGMP aktivuje PKG, která je nezbytná v rámci otevírání mitoK<sub>ATP</sub> (Costa *et al.*, 2005).

Další podstatnou funkcí NO je účast na S-nitrosylaci cysteinových residuí. Jedná se o reverzibilní posttranslační modifikaci proteinů typickou pro redoxní buněčnou signalizaci. Důsledkem S-nitrosylace nejsou jen strukturní a funkční změny, ale i ochrana před možnými modifikacemi následkem oxidace cysteinových residuí (Sun, 2007). Takto chráněny jsou především proteiny spojené s transportem vápenatých kationtů. Jedná se například o vápenaté kanály typu L, Ca<sup>2+</sup>-ATPasu v sarkoplasmatickém retikulu a další. Regulace vápenatých transportérů vede ke snížení koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytosolu, která je příčinou dalších pro buňku fatálních procesů (Sadat, 2009).

### **2.2.5 Produkce ROS a aktivace PKC**

Otevření mitoK<sub>ATP</sub> závisí především na přenosu signálu z PKG. Jedná se ovšem o cytosolický enzym, který nepřichází do styku s kanálky na vnitřní mitochondriální membráně. Řešením je přenos signálu pomocí PKC $\epsilon$  (Costa *et al.*, 2005). Následkem otevření mitoK<sub>ATP</sub> dochází k influxu K<sup>+</sup> do matrix a mitochondrie začínají bobtnat. Tento proces vede k tvorbě ROS, které hrají významnou roli v rámci kardioprotekce (Downey *et al.*, 2007). Jejich kardioprotekční vlastnosti byly poprvé popsány v roce 1997 (Baines *et al.*, 1997; Tritto *et al.*, 1997). Poprvé bylo dokázáno, že ROS nepřispívají jen negativně v rámci reperfuze poškození, ale působí i jako druzí poslové v rámci signální dráhy spouštějící PC. Cílem signální dráhy, jíž jsou radikály součástí, je PKC (Korichneva *et al.*, 2002).

Důležitost PKC v rámci PC byla poprvé odhalena v roce 1994 na základě výzkumu prováděného s calphostinem, tedy inhibitorem PKC (Armstrong, 1994). PKC může být v rámci signální dráhy aktivována dvěma způsoby. Jedním je aktivace přes lipidy (konkrétně DAG) nebo právě pomocí ROS. Pokud dojde k oxidaci proteinu, je enzym katalyticky aktivní. Naopak redukce vede k opačnému stavu. Zároveň je pro oba typy aktivace PKC nezbytná přítomnost kofaktorů. V případě aktivace pomocí DAG se jedná o vápník a fosfolipidy. Pro aktivaci PKC pomocí ROS je pak nutný dostatek vitamínu A. K samotné aktivaci PKC dochází po uvolnění Zn<sup>2+</sup> z regulační domény (Korichneva *et al.*, 2002).

Aktivovaná PKC je rovněž považována za nositele paměťových stop v rámci kardioprotekce i po stažení spouštěče a udržuje kardioprotekční procesy funkční po celou dobu trvání ischemického stavu (Downey *et al.*, 2007).

### **2.2.6 ERK1/2**

Rodina MAPK (mitogenem aktivované proteinkinasy) zahrnuje celkem čtyři různé serin/threoninové kinasy. Jedná se o ERK1/2 (extracelulární signálem regulovaná kinasa 1/2), p38 (isoforma MAPK), JNK a BMK1 (velká MAP kinasa 1 neboli ERK5). Tyto kinasy poté reagují podle stejného modelu MAP kinasa kinasa kinasa – MAP kinasa kinasa – MAP kinasa. MAPK jsou kinasy spojené především s regulací buněčné proliferace, diferenciaci a přežití (Widmann *et al.*, 1999). Tři z výše uvedených MAP kinas jsou přítomny v kardiomyocytech – ERK1/2, p38 a JNK. Ovšem pouze ERK1/2 se podílí na kardioprotekci, p38 a JNK se poté účastní signálních drah vedoucích k apoptóze (Ma *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 2000). Na základě několika studií bylo prokázáno, že ERK1/2 je v odpovědi na PC ve větší míře lokalizována v jádře, cytosolu a mitochondriích (Ping *et al.*, 1999; Fryer *et al.*, 2001; Baines *et al.*, 2002).

K aktivaci ERK1/2 přispívá kromě PKC a Akt také NO (Li *et al.*, 2006). Aktivace je zprostředkována zvýšením aktivity up-stream aktivátoru (například Ras protein) nebo inaktivací down-stream inaktivátoru (například MKP-3) (Yun *et al.*, 1998; Rössig *et al.*, 2000). NO se rovněž podílí na inaktivaci JNK a p38, které mají proapoptické účinky, jak již bylo zmíněno výše (Li *et al.*, 2006).

Cílem ERK1/2, je poté stejně jako u Akt, fosforylace proteinu p70s6K (70 kDa ribosomální protein-S6 kinasa). Jedná se o protein, který hraje důležitou roli v translaci (Krolikowski *et al.*, 2006). Důsledkem fosforylace p70s6K je zvýšená transkripce antiapoptických molekul, mezi něž se řadí například CREB. Dále se ERK1/2 podílí na fosforylaci Ser112 v proteinu BAD. Fosforylace může být přímá nebo nepřímá přes ERK/p90RSK (90 kDa ribosomální S6 kinasa). Tento proces vede k inhibici apoptózy přes protein BAD (Li *et al.*, 2006).

### **2.2.7 Glykogensyntasa kinasa-3 $\beta$**

ATP:protein O-fosfotransferasa (glykogensyntasa kinasa-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ , EC 2.7.11.26) je enzym, který hraje důležitou roli v rámci PC. GSK-3 $\beta$  je fosforylována na Ser9, což má za následek inhibici enzymu a s tím spojenou inhibici formování mPTP



(Stambolic & Woodgett, 1994; Juhaszova *et al.*, 2004). Na fosforylaci se může podílet přímo PKC nebo nepřímo ERK1/2 a PI3K, které jsou aktivovány přes adenosinové receptory a PKC (Downey *et al.*, 2007).

### 2.2.8 RISK a SAFE

Pojem RISK (signální kaskáda reperfučního poškození) se běžně používá v rámci kardioprotekce. Jedná se o mechanismus zahrnující několik signální kinas přispívajících k přežití buňky. Konkrétně se jedná o kinasy PI3K, Akt a ERK1/2. Signální dráhy, jejichž součástí jsou tyto kinasy, jsou aktivovány již během několika prvních minut po nástupu reperfuze, a jak již bylo zmíněno výše, podílejí se na inhibici apoptózy (Cohen & Downey, 2015). Důležitost kaskády RISK byla prokázána u potkanů a králíků (Yang *et al.*, 2004a; Hausenloy *et al.*, 2005a). Pravděpodobně se však nejedná o univerzální mechanismus, jelikož z výzkumů zaměřených na prasata je patrné, že důležitější jsou kaskády zahrnující TNF- $\alpha$  receptory a JAK/STAT kinasy (Skyschally *et al.*, 2009). Tato alternativní kaskáda se poté označuje jako SAFE (přežití zajišťující signální kaskáda) (Cohen & Downey, 2015).

RISK kaskáda je aktivována po navázání vhodné molekuly na receptor spřažený s G-proteinem (Hausenloy *et al.*, 2005b). Jedná se například o růstové faktory (insulin), bradykinin nebo agonisty opioidních receptorů (Jonassen *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004b). V rámci kaskády RISK existují dvě cesty, přes které jsou aktivovány cílové efekторы. Jedná se o již popsané PI3K-Akt a ERK1/2 dráhy (Ping *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2000). Zároveň bylo prokázáno, že obě dráhy jsou na sobě závislé v takové míře, že pokud dojde k inhibici jedné dráhy, dojde zároveň k aktivaci druhé dráhy (Hausenloy *et al.*, 2004). Mezi efekторы, jež jsou závislé na fosforylaci v rámci kaskády RISK, patří p70S6K, eNOS, BAD, GSK-3 $\beta$  a další (Jonassen *et al.*, 2001; Bell & Yellon, 2003; Gross *et al.*, 2004). Většina těchto molekul přispívá k inhibici otevírání mPTP, který je tím pádem konečným efektořem RISK kaskády (Brookes *et al.*, 2000; Tsurata *et al.*, 2002; Juhaszova *et al.*, 2004).

SAFE kaskáda a její mechanismus byly v minulosti popsány například u hlodavců nebo prasat (Lecour *et al.*, 2002; Heusch *et al.*, 2011). Důležitým prvkem SAFE je TNF- $\alpha$ . Jedná se o endogenní molekulu podílející se na kardioprotekci jak v rámci PC, tak postkondicionování (Cohen & Downey, 2015). U TNF- $\alpha$  hraje ovšem důležitou roli koncentrace. Jak již bylo zmíněno výše, při vyšších koncentracích ztrácí TNF- $\alpha$

své kardioprotektivní účinky, a naopak dochází ve zvýšené míře k poškození myokardu (Lecour *et al.*, 2002). Dále je důležitá i isoforma receptoru, na kterou se TNF- $\alpha$  váže. Jedná se o isoformy TNFR1 a TNFR2 (TNF- $\alpha$  receptor 1 a 2). Aktivace TNFR1 se jeví jako kardiotoxická, naopak aktivace TNFR2 spouští kardioprotektivní dráhu (Lacerda *et al.*, 2009; Cohen & Downey, 2015).

Jak již bylo zmíněno dříve, v rámci kaskády SAFE nedochází k aktivaci Akt nebo ERK1/2, jako je tomu v případě kaskády RISK. Naopak je aktivován transkripční faktor STAT3 (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3) (Lecour *et al.*, 2005). K aktivaci STAT3 dochází například přes fosforylaci kinasou z rodiny JAK (Janus kinas). Jedná se o tyrosinové kinas, které jsou spojeny s doménou TNFR2 (Cohen & Downey, 2015). Po navázání TNF- $\alpha$  na receptor dochází k transfosforylaci dvou přilehlých JAK kinas, což má za následek fosforylaci STAT3 a dochází tak k aktivaci tohoto proteinu (Somers *et al.*, 2012). V rámci fosforylace STAT3 mohou být fosforylovány tyrosinové nebo serinové zbytky. Pokud je fosforylován Tyr705, dochází k tvorbě homodimerů nebo heterodimerů, které jsou následně translokovány do jádra. V jádře se poté podílejí na ovlivnění transkripce genů souvisejících s odpovědí na stresové faktory (Levy & Lee, 2002; Kurdi & Booz, 2007; Myers, 2009). Pokud ovšem dojde k aktivaci STAT3 přes Ser727, jsou STAT3 translokovány do mitochondrií, kde regulují transport elektronů (Kurdi & Booz, 2007; Myers, 2009). STAT3 jsou považovány především za regulátory transkripce, ovšem tento proces je příliš zdlouhavý a v rámci kardioprotekce, tak nehraje příliš velkou roli (Cohen & Downey, 2015). Význam STAT3 se tedy spíše projevuje v inaktivaci GSK-3 $\beta$ , zadržování vápníku, stimulaci komplexu I dýchacího řetězce a inhibici otevírání mPTP (Lacerda *et al.*, 2009; Boengler *et al.*, 2010; Heusch *et al.*, 2011; Pedretti & Raddatz, 2011).

Důležitou komponentou, jež spojuje kaskády RISK a SAFE, je sfingosin (Somers *et al.*, 2012). Počáteční reakcí je přeměna sfingosinu na sfingosin-1-fosfát (S1P) za katalýzy pomocí ATP:sfingosin 1-fosfotransferasy (sfingosin kinasa, SPHK, EC 2.7.1.91) (Kohama *et al.*, 1998). S1P se váže na odpovídající receptory označované jako S1P<sub>1</sub>, které jsou v největší míře exprimovány v kardiomyocytech (Nakajima *et al.*, 2000; Mazurais *et al.*, 2002). Jedná se o receptory spřažené s G-proteiny a jsou známy ještě další dva typy těchto receptorů – S1P<sub>2</sub> a S1P<sub>3</sub>. S1P<sub>1</sub> receptor se váže na podjednotku G<sub>oi</sub> a tím aktivuje ERK1/2 (Tao *et al.*, 2009; Knapp, 2011). S1P<sub>2</sub> a S1P<sub>3</sub> receptory interagují s podjednotkami G<sub>oq</sub>, G<sub>o13</sub> i G<sub>oi</sub>, což vede v případě S1P<sub>3</sub> k aktivaci

Akt a PI3K v rámci kaskády RISK (Means *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2009). S1P<sub>2</sub> je komponentou jež spojuje obě kaskády vedoucí k přežití. V případě kaskády RISK aktivuje stejně jako S1P<sub>1</sub> ERK1/2 a v případě kaskády SAFE poté aktivuje STAT3 (Cohen & Downey, 2015).

Spojení mezi oběma dráhami je tedy zprostředkováno jak mezi dráhami PI3K/Akt a JAK/STAT3, tak mezi dráhami Mek/ERK a JAK/STAT3 (Lecour *et al.*, 2009). Spojovacím znakem u drah PI3K/Akt a JAK/STAT3 je podjednotka PI3K označovaná p85. Tato podjednotka je zodpovědná za fosforylaci serinu u STAT3 (Pfeffer *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2006). Na základě výzkumu týmu Suleman *et al.* bylo prokázáno, že u myších kardiomyocytů deficitních na gen pro STAT3, nedocházelo ve zvýšené míře k fosforylaci Akt. Rovněž bylo prokázáno, že míra fosforylace Akt byla snížena v přítomnosti inhibitoru dráhy JAK/STAT3 a naopak (v přítomnosti inhibitoru dráhy PI3K/Akt byla snížena fosforylace STAT3) (Suleman *et al.*, 2008). V případě drah Mek/ERK a JAK/STAT3 se spojitost projevuje ve fosforylaci Ser727 STAT3 pomocí ERK (Kuroki & O'Flaherty, 1999). Kooperace mezi těmito dráhami ovšem ještě není zcela prozkoumané téma a stále existuje mnoho nesrovnalostí (Lecour *et al.*, 2009).

### 2.3 Ostropestřec mariánský

Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* L.) je jednoletá nebo dvouletá bylina spadající do čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*, Tab. 1). Rostlina se přirozeně vyskytuje v oblastech Středozemního moře, severní Afriky, Blízkého Východu a v některých částech USA (Kumar *et al.*, 2011).

Tab. 1 Taxonomické zařazení ostropestřce mariánského (upraveno podle <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Taxonomické kategorie	
Doména	<i>Eukaryota</i>
Říše	<i>Viridiplantae</i> (zelené rostliny)
Podříše	<i>Tracheophyta</i> (cévnaté rostliny)
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné rostliny)
Třída	<i>Eudicots</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
Řád	<i>Asterales</i> (hvězdnicotvaré)
Čeleď	<i>Asteraceae</i> (hvězdnicovité)
Rod	<i>Silybum</i> (ostropestřec)
Druh	<i>Silybum marianum</i> L. (ostropestřec mariánský)

Léčivé účinky ostropestřce mariánského na játra, ledviny, slezinu a žlučové kameny jsou známy již od starověku (Abenavoli *et al.*, 2018). Poprvé byla tato rostlina pravděpodobně popsána řeckým filozofem a botanikem Theofrastem ve 4. století př. n. l., který ji ve svých spisech označoval jako „Pternix“ (Jegorov, 1996). Výtažek z ostropestřce v kombinaci s medem měl podle římského filozofa Plinia staršího (23-79 př. n. l.) příznivé účinky na lidské zdraví. Další starověký filozof Dioscorides doporučoval ve svém spisu odvar z ostropestřce proti hadímu uštknutí. Ve středověku poté Sasové využívali extrakt z ostropestřce k léčbě jedinců, jež byli pokousáni zvířetem nakaženým vzteklinou (Abenavoli *et al.*, 2018). V 16. století využíval ostropestřec britský bylinář Nicholas Culpeper proti bolestem vyvolaným jaterními onemocněními a rovněž ke zmírnění horečnatých stavů (Post-White *et al.*, 2007; Abenavoli *et al.*, 2018). Příznivé účinky ostropestřce na jaterní onemocnění znal rovněž německý lékař Johannes Gottfried Rademacher (1772-1850) (Abenavoli *et al.*, 2018). Na americkém kontinentu byly výtažky z ostropestřce využívány původním obyvatelstvem v rámci léčby vředů a dalších kožních onemocnění (Post-White *et al.*, 2007). Popularita této léčivé rostliny neupadla ani v současnosti a přípravky na bázi ostropestřce mariánského jsou jedny z nejprodávanějších na světě. Například v roce 2015 se v USA prodaly produkty obsahující výtažek z ostropestřce mariánského za více než 16,8 milionů dolarů (Smith *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Silymarin

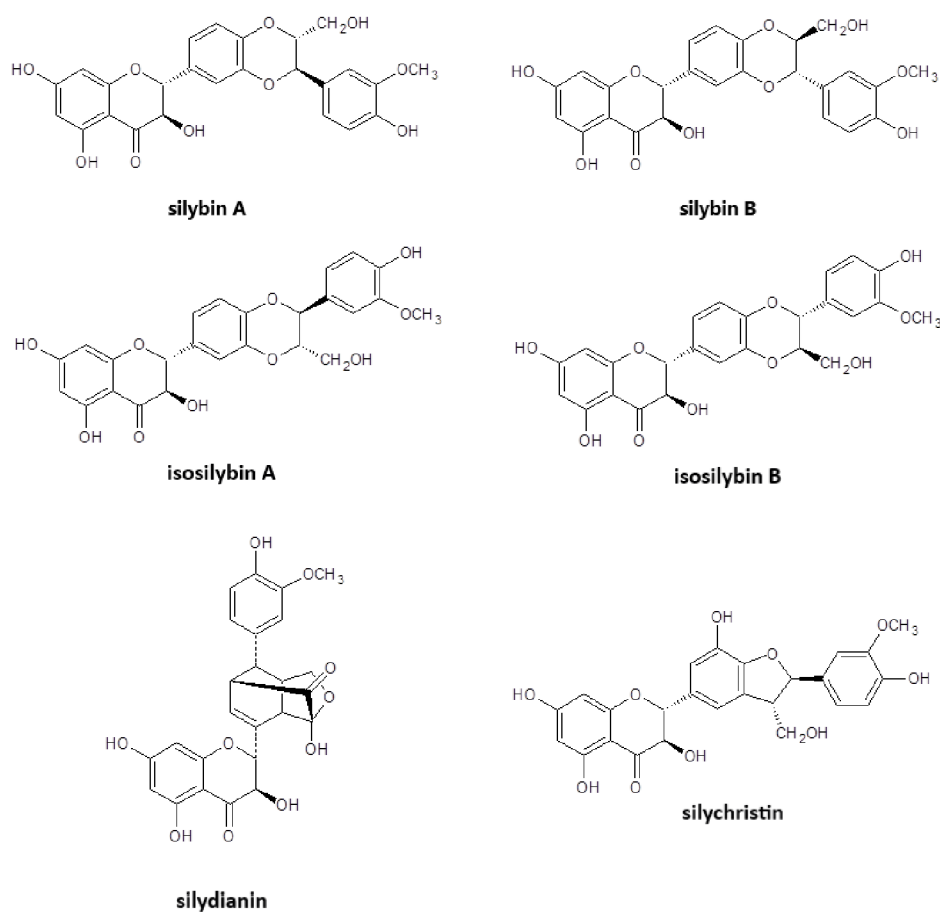
Silymarin je směs flavonoidů vyskytujících se v extraktu ze semen ostropestřce mariánského. Silymarin tvoří až 80 % extraktu a jeho součástí jsou silybin, isosilybin, silydianin a silychristin (Obr. 5) (Kumar *et al.*, 2011). Silybin i isosilybin se vyskytují ve formě dvou isomerů, silybin A a B, které jsou přítomny v poměru 1:1 a celkově tvoří asi 60 % až 70 % obsahu polyfenolů v silymarinu (asi 30 % z celkového rostlinného extraktu, Tab.2) (Šimánek *et al.*, 2000). Dále jsou v rostlině obsaženy i látky jako taxifolin, kvercetin, betain a silybonol (Kumar *et al.*, 2011).

Silymarin i konkrétně silybin mají řadu pozitivních účinků na lidské zdraví (Křen & Walterová, 2005). Jedná se například o vliv na snížení hladiny glukosy v krvi u pacientů trpících diabetem II. typu, ochranu před poškozením kůže UVB i UVA zářením, ochranu dopaminergních neuronů před neurotoxicitou způsobenou

lipopolysacharidy a mnoho dalších účinků (Katiyar *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Křen & Walterová, 2005; Huseini *et al.*, 2006; Rajnochová Svobodová *et al.*, 2018).

## 2.4 2,3-dehydrosilybin

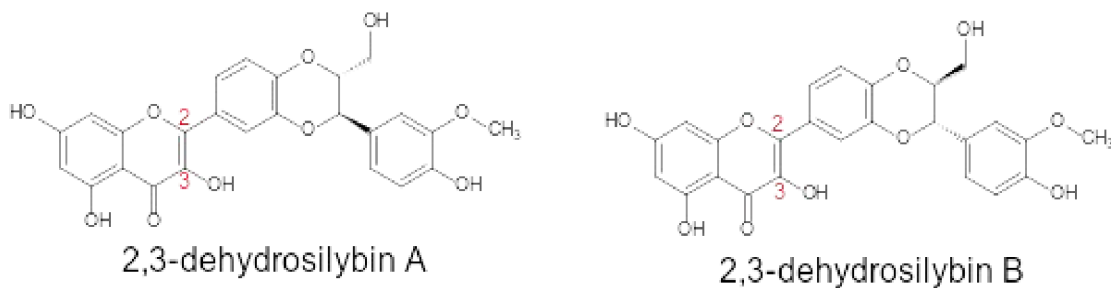
2,3-dehydrosilybin (DHS) je derivát silybinu odlišující se přítomností dvojné vazby mezi uhlíky C2 a C3. Nenasycená dvojná vazba je poté příčinou hyperkonjugace kruhů A, B a C, což má za následek zvýšení hydrofobicity struktury. DHS se rovněž vyskytuje ve formě dvou enantiomerů A a B (Obr. 6) (Gabrielová *et al.*, 2010).



Obr. 5 Strukturální vzorce jednotlivých složek silymarinu (silybin A a B, isosilybin A a B, silydianin, silychristin) (upraveno podle Kumar *et al.*, 2011).

Tab. 2 Procentuální podíl jednotlivých složek silymarinu v celkovém rostlinném extraktu (upraveno podle Šimánek *et al.*, 2000).

Složka	Obsah (%)
Silybin	30,1
Isosilybin	9,1
Silydianin	12,0
Silychristin	14,9



Obr. 6 Strukturní vzorce enantiomerů 2,3-dehydrosilybinu (A a B) (upraveno podle Vrba *et al.*, 2021).

### 2.4.1 Antioxidační vlastnosti DHS

Antioxidační vlastnosti flavonoidů jsou závislé na struktuře a substituentech na kruhu B. V rámci struktury jsou poté důležité prvky jako je dvojná vazba mezi uhlíky C2 a C3 v konjugaci s 4-oxo skupinou nebo přítomnost 3-OH skupiny v konjugaci s 4-oxo skupinou (Dorta *et al.*, 2008). Díky těmto strukturálním prvkům je DHS lepším antioxidantem než samotný silybin (Gažák *et al.*, 2004; Gabrielová *et al.*, 2010). Dále je známo, že OH-skupiny na uhlících C3 a C20 jsou zodpovědné za interakce s radikály, čímž mohou přispívat k ochraně buněk před poškozením ROS (Gabrielová *et al.*, 2015a).

Struktura některých flavonolů může mít negativní vliv na fluiditu membrán. Konkrétně může docházet ke snížení fluidity, což je následně spojeno se změnami v rámci mitochondriální respirace. Struktura kruhu B u flavonolů může mít vliv buď na inhibici dýchacího řetězce, v případě kvercetinu, nebo na rozpojení dýchacího řetězce v případě galanginu (Dorta *et al.*, 2008). Pro DHS je důležitá i přítomnost kruhu D ve struktuře molekuly, podobně jako u galanginu. Právě přítomnost kruhu D je příčinou snížené polaritě DHS a galanginu oproti kvercetinu. Účinek těchto molekul na mitochondriální respiraci je poté odlišný (Gabrielová *et al.*, 2010).

### 2.4.2 Vliv DHS na poškození kardiomyocytů

Podle studie Gabrielová *et al.* (2019) dochází v důsledku ischemie a následné reperfuze k poškození 76 % srdeční tkáně. Naopak použití DHS v rámci prekonkondicionování vedlo ke snížení míry poškození o 50-60 %. Tyto výsledky byly srovnatelné s účinky bradykininu, jehož role v rámci prekonkondicionování je již známa. Vyhodnocení míry poškození srdeční tkáně bylo provedeno pomocí tzv. TTC barvení (2,3,5-trifenylnitroimidazolium chlorid). Principem je přeměna TTC na nerozpustný produkt

pomocí aktivních mitochondriálních dehydrogenas. Jedná se tedy o metodu, která podává informace o počtu fungujících mitochondrií, na základě čehož je možné odlišit živou a odumřelou tkáň (Gabrielová *et al.*, 2019).

S rozsahem poškození myokardu v důsledku ischemie souvisí i hladina (S)-laktát:NAD<sup>+</sup> oxidoreduktasy (laktátdehydrogenasa, LDH, EC 1.1.1.27) v krevním séru. Jedná se o enzym, který se za normálních podmínek vyskytuje především v cytosolu. Pokud ovšem dojde k poškození buňky, LDH se dostává do krevního séra. Hladiny LDH tak reflektují změny v integritě membrán na rozdíl od dříve zmíněného TTC barvení, které odráží metabolické vlastnosti buňky (Gabrielová *et al.*, 2019). U LDH bylo potvrzeno, že se jedná o vhodný marker v rámci diagnózy ICHS. Konkrétně hladina isoenzymu LDH-1 narůstá po 5-10 hodinách od propuknutí infarktu myokardu. Maximálních hodnot LDH dosahuje po 2,5-6 dnech a původních fyziologických hodnot dosahuje LDH až po 12 dnech (Danese & Montagnana, 2016). V rámci výzkumu bylo zjištěno, že prekondicionování srdcí pomocí 100 nmol·l<sup>-1</sup> roztoku DHS vedlo k výraznému snížení hladiny LDH oproti kontrole (srdce vystavená pouze ischemii bez předchozího prekondicionování). Výrazný pokles hladiny LDH byl pozorován během prvních deseti minut od začátku reperfuze (Gabrielová *et al.*, 2019). Obdobné výsledky přinesla i studie Gabrielová *et al.*, 2015a, kdy byly neonatální potkaní kardiomyocyty ošetřeny DHS o koncentraci 10 μmol·l<sup>-1</sup>. po dobu 10 minut (Gabrielová *et al.*, 2015a).

### **2.4.3 Vliv DHS na produkci ROS**

Reaktivní formy kyslíku a dusíku produkované mitochondriemi hrají důležitou roli v rámci prekondicionování a kardioprotekce (Gabrielová *et al.*, 2010). Při nižších koncentracích hrají ROS roli signálních molekul, naopak při vyšších koncentracích mají ROS negativní účinky na buňku a přispívají k jejímu poškození (Penna *et al.*, 2009). V rámci studie Gabrielová *et al.*, 2010 bylo zjištěno, že DHS dokáže potlačovat tvorbu ROS rozpojováním dýchacího řetězce v izolovaných mitochondriích. Zároveň dochází ke snížení membránového potenciálu mitochondrií a zvýšení mitochondriálního dýchání. Jedná se o tzv. deenergetizaci buňky. Tyto výsledky naznačují, že se DHS chová jako tzv. rozpojovač dýchacího řetězce. Účinky DHS na rozpojování dýchacího řetězce byly v porovnání se syntetickými rozpojovači mnohem nižší (Gabrielová *et al.*, 2010).

V rámci výzkumu byl efekt DHS porovnáván se syntetickými rozpojovači, například karbonylkyanid-m-chlorofenylhydrazonem (CCCP). CCCP umožňuje zpětný tok protonů z mezimembránového prostoru do matrix a tím zabraňuje propojení protonmotivní síly a syntézy ATP. Podle studie Gabrielová *et al.*, 2010 byly účinky DHS inhibovány přítomností karboxyatractylosidu a purinových nukleotidů. Tato skutečnost naznačuje, že DHS se nechová jako pravý rozpojovač (tedy CCCP), ale je pravděpodobně spojen s ANT (adenin nukleotidový transportér) nebo UCP2 (rozpojovací protein 2). O těchto proteinech je známo, že zprostředkovávají protonoforní rozpojení v závislosti na mastných kyselinách (MK). Ionizované MK jsou translokovány pomocí ANT nebo UCP2 a poté prochází na základě spontánní difuze skrz fosfolipidovou dvojvrstvu ve formě protonovaných sloučenin. V případě DHS je zřejmě mechanismus velmi podobný jako u MK. DHS je schopný disociovat protony, podstoupit transport pomocí ANT ve formě aniontu a následně projít vnitřní mitochondriální membránou ve formě neionizované sloučeniny (Gabrielová *et al.*, 2010).

Na základě studie Zholobenko *et al.*, 2017 bylo ovšem zjištěno, že DHS má funkci rozpojovače pouze v izolovaných mitochondriích nikoliv v rámci celé srdeční tkáně. DHS se rovněž podílí na ochraně aktivity komplexu I dýchacího řetězce. Tato ochranná funkce se už ovšem nevztahuje na komplex II (Zholobenko *et al.*, 2017).

#### **2.4.4 Pozitivní inotropní efekt DHS**

Inotropika jsou sloučeniny schopné regulovat srdeční kontrakce. V případě pozitivních inotropů, jako jsou například srdeční glykosidy, histamin,  $\beta$ -adrenergní léky a další, dochází ke stimulaci kontrakcí srdečního svalu. Následkem čehož se zvyšuje srdeční tep. Inotropní efekt je spojen s koncentrací intracelulárního vápníku. V případě pozitivní inotropie se koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  zvyšuje, což podporuje navázání  $\text{Ca}^{2+}$  na kontraktilní proteiny nebo se zvyšuje citlivost myofilament k  $\text{Ca}^{2+}$  (Scholz, 1984; Gabrielová *et al.*, 2015b).

V rámci studie Gabrielová *et al.*, 2015b byl studován vliv DHS na perfundovaná potkaní srdce ve spojitosti právě s inotropií. Bylo zjištěno, že DHS má pozitivní inotropní efekt na perfundovaná potkaní srdce, ale pouze za předpokladu, že jsou v zasažené tkáni přítomny katecholaminy. Katecholaminy jsou jako neurotransmitery uvolňovány z presynaptických vezikulí v sympatických nervech srdeční tkáně.



Aby došlo k samotnému uvolnění katecholaminů, je nutné, aby byla plasmatická membrána depolarizována. K depolarizaci plasmatické membrány poté přispívají zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a snížená koncentrace ATP, jež jsou důsledkem již výše zmíněné deenergetizace buňky a depolarizace mitochondriální membrány. Za takových podmínek se poté DHS spolu s katecholaminy účastní prekonkondicionování i postkonkondicionování (Gabrielová *et al.*, 2015b).

V souvislosti s katecholaminy bylo dále zjištěno, že DHS pravděpodobně nepůsobí jako  $\beta$ -agonista. DHS se tedy podílí na inotropním efektu i přesto, že nemá roli  $\beta$ -agonisty. Zároveň není DHS ani  $\beta$ -antagonistou, což naznačuje absenci možných vedlejších účinků v rámci léčby kombinující DHS a další metody léčby kardiovaskulárního selhání (Gabrielová *et al.*, 2015b)

#### **2.4.5 Vliv DHS na hladinu $\text{Ca}^{2+}$**

Vápenaté ionty hrají důležitou roli v rámci prekonkondicionování i postkonkondicionování. V rámci studie Zholobenko *et al.*, 2017 byl studován vliv rozpojení dýchacího řetězce na tok  $\text{Ca}^{2+}$  v mitochondriích. Bylo zjištěno, že stejně jako nedochází k rozpojení dýchacího řetězce vlivem DHS na tkáňové úrovni, tak na stejné úrovni není ovlivněna ani koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . V kardiomyocytech dochází k mírnému snížení membránového potenciálu, a to ovlivňuje akumulaci  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách. Dále bylo zjištěno, že DHS neovlivňuje mitochondriální koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , ale je zodpovědný za influx extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$ . Na základě těchto zjištění, se předpokládá, že změny v toku  $\text{Ca}^{2+}$  v přítomnosti DHS nejsou zapříčiněny rozpojením dýchacího řetězce, ale spíše se na nich podílí nějaká signální dráha (Zholobenko *et al.*, 2017).

Právě vliv DHS na membránový potenciál a důsledky spojené s jeho změnami byly podkladem pro hypotézu, že plasmatická membrána je hlavním místem působení DHS (Zholobenko *et al.*, 2017).

#### **2.4.6 Signální dráha DHS**

Signální dráha DHS není ještě zcela známa. V rámci studie Gabrielová *et al.*, 2019 bylo ovšem zjištěno, že mechanismus působení DHS vykazuje jistou podobnost s mechanismem působení bradykininu. Zmiňovaná podobnost je v zapojení ATP:protein-L-tyrosin O-fosfotransferasy (Src tyrosinkinasa, EC 2.7.10.2) do signálních drah prekonkondicionování (Gabrielová *et al.*, 2019). Src kinasa se řadí

do rodiny tyrosinových kinas, které jsou aktivovány oxidačním stresem během ischemie a reperfúze. Src kinasy poté interagují například s PKC nebo PI3K kinasami a tím se zapojují do signální dráhy prekonkicionování (Das & Das, 2008).

Důležitou složkou signální dráhy podílející se na kardioprotekci je NO, za jehož produkci je poté zodpovědná především eNOS. Při pokusech na perfundovaných potkaních srdcích bylo zjištěno, že prekonkicionování DHS má za následek zvýšenou přítomnost eNOS v srdeční tkáni, a s tím spojenou zvýšenou produkci NO (Gabrielová *et al.*, 2019). Prekonkicionování DHS dokonce zvyšovalo přítomnost eNOS více než v případě využití bradykininu, u něhož již byla signální dráha zahrnující NO zmapována (Oldenburg *et al.*, 2004; Gabrielová *et al.*, 2019).

V rámci studie Gabrielová *et al.*, 2015a bylo zjištěno, že DHS se podílí na modulaci fosforylace PKC $\epsilon$  (Gabrielová *et al.*, 2015a). PKC $\epsilon$  je důležitou složkou intramitochondriální signalizace, na které závisí kardioprotekce v rámci postkonkicionování (Dong *et al.*, 2010). PKC $\epsilon$  je aktivována v důsledku fosforylace katalytické domény enzymu, konkrétně tedy Ser729 (Gabrielová *et al.*, 2015a). Defosforylace aminokyseliny poté vede k translokaci PKC $\epsilon$  do jádra nebo na periferii buněk (Xu *et al.*, 2007). Na základě experimentů bylo potvrzeno, že hladina fosforylované PKC $\epsilon$  (Ser729) se po ošetření kardiomyocytů DHS (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zvyšuje a zároveň dochází k úbytku nefosforylované formy enzymu. Součástí signální dráhy DHS je tedy pravděpodobně i PKC $\epsilon$  (Gabrielová *et al.*, 2015a).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

Buněčná linie potkaních kardiomyoblastů H9c2 (ATCC, CRL-1446, LOT: 70026606)

Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk HEK293 (ATCC, CRL-1573)

Plasmid pGP-CMV-jGCaMP7f (104483, <https://www.addgene.org>)

Plasmid pCAG-G-Flamp2 (192782, <https://www.addgene.org>)

Plasmid C-geNOp (cytosolický) (<https://www.ngfi.eu/>)

#### **3.1.2 Chemikálie**

##### **Testované látky:**

2,3-dehydrosilybin; 3-O-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7-O-methyl-2,3-dehydrosilybin; 20-O-methyl-2,3-dehydrosilybin; 3,7-di-O-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7,20-di-O-methyl-2,3-dehydrosilybin (poskytnuty profesorem Vladimírem Křenem, Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha)

Apelin-13 (Sigma-Aldrich, USA)

##### **Ostatní:**

0,4% trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)

Akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok) (Merck, USA)

Aminokyseliny (Gibco, USA)

Amoniak (La:chner, ČR)

Bromfenolová modř (Lachema, ČR)

BSA (Sigma-Aldrich, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (La:chner, ČR)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsíran sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, USA)

Doděkahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, USA)

Dulbeccem modifikované Eaglovo medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)

Fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco, USA)

Fluorid sodný (Lachema, ČR)

Formaldehyd (La:chner, ČR)

Forskolin (Thermo Scientific, USA)  
Fumarát železnatý (Sigma-Aldrich, USA)  
Glukosa (Sigma-Aldrich, USA)  
Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)  
Glycerol fosfát (Sigma-Aldrich, USA)  
Glycin (Sigma-Aldrich, USA)  
Hepes (Sigma-Aldrich, USA)  
Heptahydrát chloridu hořečnatého (La:chner, ČR)  
Hydrogenfosforečnan sodný (La:chner, ČR)  
Hydrogenuhličitan sodný (La:chner, ČR)  
Hydroxid sodný (La:chner, ČR)  
Chlorid draselný (La:chner, ČR)  
Chlorid sodný (La:chner, ČR)  
Chlorid vápenatý (La:chner, ČR)  
Ionomycin (Merck, USA)  
Isopropanol (LA:chner, ČR)  
Kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich, USA)  
Kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA) (Sigma-Aldrich, USA)  
Kyselina chlorovodíková (Penta, ČR)  
Kyselina octová 99% (La:chner, ČR)  
L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA)  
Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 (Invitrogen, USA)  
Marker pro SDS-PAGE PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)  
Methanol (Sigma-Aldrich, USA)  
MTT (Sigma-Aldrich, USA)  
*N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)  
Neesenciální aminokyseliny (Gibco, USA)  
Neutrální červen (Sigma-Aldrich, USA)  
Nitroprusid sodný dihydrát (Penta, ČR)  
Penicilin (Sigma-Aldrich, USA)  
Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, USA)  
Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)  
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Reagent<sup>®</sup> 3000 (Invitrogen, USA)

Reagenty A, B pro BCA metodu (Thermo Scientific, USA)  
Reagenty A, B pro chemiluminiscenci ImunoCruz (Santa Cruz Biotechnology, USA)  
Reagenty A, B pro chemiluminiscenci ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE HealthCare, USA)  
Reagent pro primární protilátky (Merck, USA)  
Reagent pro sekundární protilátky (Merck, USA)  
Sušené mléko (Samantha, ČR)  
Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)  
Tableta complete (Roche, Švýcarsko)  
Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA)  
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)  
Trypsin (Sigma-Aldrich, USA)  
Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)  
Ustalovač (AGFA, Belgie)  
Vanadičnan trisodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Vitaminy (Gibco, USA)  
Vývojka (AGFA, Belgie)  
a další chemikálie v laboratořích na Ústavu lékařské chemie a biochemie.

### **3.1.3 Protilátky**

#### **Primární protilátky:**

Akt Antibody Rabbit (9272S) (Cell Signaling Technology, USA)  
GAPDH XP(R) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, USA)  
p44/42 MAPK (ERK1/2) Rabbit Antibody (9102S) (Cell Signaling Technology, USA)  
Phospho-Akt (Ser473) Rabbit mAb (9271S) (Cell Signaling Technology, USA)  
Phospho-Akt (Thr308) (244F9) Rabbit mAb (4056S) (Cell Signaling Technology, USA)  
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) Mouse mAb (9106S) (Cell Signaling Technology, USA)  
Rabbit pAb to APJ (Abcam, Velká Británie)

#### **Sekundární protilátky:**

Anti-mouse IgG, HRP-linked (7076S) (Cell Signaling Technology, USA)

Anti-rabbit IgG, HRP-linked (7074S) (Cell Signaling Technology, USA)

### 3.1.4 Kultivační média a roztoky

**0,1% neutrální červeně:** 0,1 g neutrální červeně; 100 ml deionizované vody; 2 kapky ledové kyseliny octové.

**0,5% formaldehyd:** 3,47 ml 36% roztoku formaldehydu; 250 ml deionizované vody.

**1% CaCl<sub>2</sub>:** 1 g CaCl<sub>2</sub>; 100 ml deionizované vody.

**5% BSA:** 2,5 g BSA; 50 ml TBS/T.

**5% sušené mléko:** 2,5 g sušeného mléka; 50 ml TBS/T.

**2CaNa pufr:** 2 mmol·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 138 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 1 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> HEPES; 10 mmol·l<sup>-1</sup> glukosa; pH upraveno koncentrovaným NaOH na 7,4.

**EHL roztok:** 2 mmol·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 135 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 1 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 5 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> HEPES; 2,6 mmol·l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>; 0,44 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,34 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1% směs aminokyselin; 1% směs vitaminů; 10 mmol·l<sup>-1</sup> glukosa; 2 mmol·l<sup>-1</sup> L-glutamin; 1% penicilin; 1% streptomycin; pH upraveno koncentrovaným NaOH na 7,45.

**Inhibitory fosfatas:** 1 mmol·l<sup>-1</sup> NaF; 1 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 50 ml PBS.

**Isotonický Tris pufr (TBS):** 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 0,9% NaCl; pH 7,5.

**Koncentrovaný PBS (10x):** 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,68 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 8,96 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O; 1,47 mol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Kultivační médium pro buněčnou linii H9c2:** DMEM; 10% FBS; penicilin; streptomycin; neesenciální aminokyseliny.

**Kultivační médium pro buněčnou linii HEK293:** DMEM; 10% FBS; penicilin; streptomycin, pyruvát sodný.

**Lyzační pufr HUVEC:** 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 5 mmol·l<sup>-1</sup> EGTA; 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 20 mmol·l<sup>-1</sup> glycerol fosfát; 1 mmol·l<sup>-1</sup> NaF; 1 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; Triton X-100 1% (v/v); Tween 20 0,1% (v/v); 1x tableta complete.

**Migrační pufr:** 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin; 0,1% SDS, pH 8,3.

**Fosfátový izotonický tlumivý roztok (PBS; 10x koncentrovaný):** 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,68 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 8,96 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 1,47 mol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Ponceau S:** Ponceau S 0,1% (w/v); 5% kyselina octová.

**Roztok DMSO s NH<sub>3</sub>:** 1000 ml DMSO; 10 ml NH<sub>3</sub>.

**Roztok fumarátu železnatého s kyselinou askorbovou:** 1 mmol·l<sup>-1</sup> fumarát železnatý; 1 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina askorbová; rozpuštěno v 2CaNa pufru.

**Separační pufr** (4x koncentrovaný; 1,5 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8): 36,3 g Tris-HCl; 150 ml destilované vody; pH upraveno koncentrovanou HCl na 8,8; doplněno do 200 ml destilovanou vodou.

**TBS/T:** 50 ml TBS (10x koncentrovaný); 500 µl Tween-20; doplnit do 500 ml deionizovanou vodou.

**Transferový pufr:** 25 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 192 mmol·l<sup>-1</sup> glycin; 0,1% SDS; 20% methanol.

**Ustalovač:** ředění 1:4 s destilovanou vodou.

**Vzorkovací pufr** (5x koncentrovaný): 125 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 0,2 mol·l<sup>-1</sup> dithiotreitol, 0,02% bromfenolová modř; pH 6,8.

**Vývojka:** ředění 1:4 s destilovanou vodou.

**Zaostřovací pufr** (4x koncentrovaný; 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8): 3,0 g Tris-HCl; 40 ml destilované vody; pH upraveno koncentrovanou HCl na 6,8; doplněno do 50 ml destilovanou vodou.

### 3.1.5 Přístrojové vybavení

Analytické váhy *AX105 DeltaRange*<sup>®</sup> (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Bürkerova počítačící komůrka (Marienfeld, Německo)

Centrifuga *Minispin* (Eppendorf, Německo)

Centrifuga *Rotina 380 R* (Hettich Zentrifugen, Německo)

Fluorescenční mikroskop *Axiovert 40 CFL* (Zeiss, Německo)

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

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

Laminární box *Biohazard EF/S 4 BSC* (Schoeller, Německo)

Mikroskop *NIB-100* (Novel optics, Čína)

Odsávačka *Aspiration Station* (Gilson Safe, USA)

Skener *CanoScan 5600F* (Canon, Japonsko)

Souprava na SDS-PAGE/WB *Trans-Blot*<sup>®</sup> *TURBO*<sup>™</sup> *Transfer System* (BioRad, USA)

Spektrofotometr pro měření absorbance v 96-ti jamkových deskách *Infinite M200 PRO* (Tecan, Švýcarsko)

System pro elektroforézu *Mini-Protean*<sup>®</sup> *3 Cell* (BioRad, USA)

Termoblok *Thermomixer comfort* (Eppendorf, Německo)

Třepačka *Duomax 1030* (Heidolph, Německo)  
Vakuové čerpadlo *Vacc-space* (Chromservis, Slovensko)  
Vodní lázeň *OLS 26 Aqua Pro* (Grant Instruments, Velká Británie)  
Zařízení pro přípravu deionizované vody *Ultrapur* (Watrex, ČR)  
Zdroj napětí pro elektroforézu *PowerPac 200* (BioRad, USA)  
a další vybavení laboratoří na Ústavu lékařské chemie a biochemie.

### **3.1.6 Ostatní použitý materiál**

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)  
Fotografický papír (FujiFilm, Japonsko)  
Kultivační desky (6-ti a 96-ti jamkové) (TPP, Švýcarsko)  
Kultivační láhve (25, 50 a 75 cm<sup>2</sup>) (TPP, Švýcarsko)  
Perfúzní komůrka *PC30* (NGFI, Rakousko)  
Pipety (Eppendorf, Německo)  
PVDF membrána *Immobilon<sup>®</sup>-P Transfer Membrane* (Sigma-Aldrich, USA)  
Škrabka na stěr buněk (Biologix, USA)  
a další vybavení laboratoří na Ústavu lékařské chemie a biochemie.

### **3.1.7 Software**

AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss, Německo)  
i-control<sup>™</sup> 2.0 (Tecan, Švýcarsko)  
ImageJ (University of Wisconsin, USA)  
IrfanView 64 4.60 (<http://www.irfanview.com>)  
Magellan (Tecan, Švýcarsko)  
MP navigator (Canon, Japonsko)



## 3.2 Metody

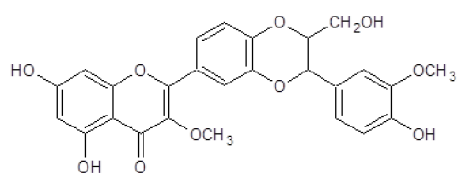
### 3.2.1 Kultivace buněčné linie H9c2

Buněčná linie H9c2 byla kultivována při optimálních podmínkách, tedy při 37 °C, v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub> a v prostoru nasyceném vodními parami. V rámci kultivace buněk probíhalo i tzv. pasážování, které bylo provedeno vždy po dosažení asi 90% konfluence. Prvním krokem při pasážování buněk bylo odebrání starého kultivačního média a následné opakované promytí buněk pomocí PBS (1x koncentrovaný roztok). Oddělení buněk od povrchu kultivační láhve bylo zajištěno přidáním 1 ml 0,25% roztoku trypsinu a 1 ml PBS. Takto byly buňky inkubovány po dobu 10 min v inkubátoru. Štěpení trypsinem bylo poté inhibováno přidáním 8 ml kultivačního média. Obsah kultivační láhve byl přenesen do falkony a centrifugován při 973 g po dobu 3 min. Získaný pelet byl poté rozpuštěn v 5 ml kultivačního média. Vzniklá suspenze byla naředěna trypanovou modří v poměru 1:5, buňky byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky a vysety do desek pro další experiment nebo vloženy do kultivační láhve k další kultivaci.

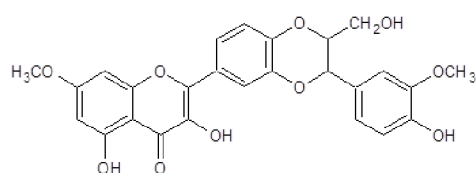
### 3.2.2 Stanovení cytotoxicity methylovaných derivátů DHS

Za účelem stanovení viability H9c2 buněk po intoxikaci vybranými methylovanými deriváty DHS byly provedeny dva testy. Jednalo se o MTT test a test s využitím neutrální červeně (NR test). Pro potřeby experimentu byly 24 h před samotným experimentem buňky vysety do 96-ti jamkových desek o koncentraci  $2,5 \times 10^4$  buněk v objemu 200  $\mu$ l na jamku. Následujícího dne byly na buňky nanесeny roztoky vybraných derivátů DHS (3-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 20-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 3,7-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 3,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin) (Obr. 7). Byly použity roztoky derivátů o různých koncentracích (0,1 mmol·l<sup>-1</sup>; 0,2 mmol·l<sup>-1</sup>; 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>; 1 mmol·l<sup>-1</sup>; 2 mmol·l<sup>-1</sup>; 5 mmol·l<sup>-1</sup> a 10 mmol·l<sup>-1</sup>). K ředění roztoků byl použit 0,1% DMSO. Jako kontrola byl použit také 0,1% DMSO a detergent Triton X-100. Z 96-ti jamkových desek s buňkami bylo nejdříve odsáto staré médium a následně byla k buňkám přidána směs obsahující kultivační médium a vybraný roztok methylovaného derivátu DHS o dané koncentraci. Po 24-hodinové inkubaci byly provedeny výše zmíněné testy.

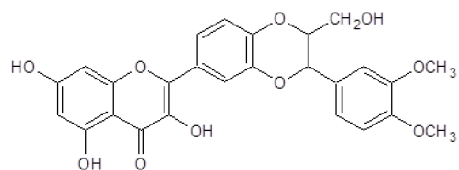
V rámci MTT testu byly buňky po inkubaci nejdříve omyty roztokem PBS. Poté byl na buňky aplikován roztok obsahující MTT a kultivační médium v poměru 1:9. Následovala inkubace po dobu 1,5 h při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci bylo médium odsáto a na buňky byl aplikován roztok DMSO s NH<sub>3</sub> (100 μl na jamku). Následovala inkubace po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Absorbance produktu byla změřena fotometricky při 540 nm.



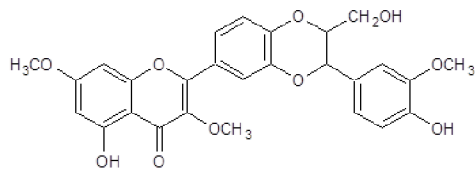
**3-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**



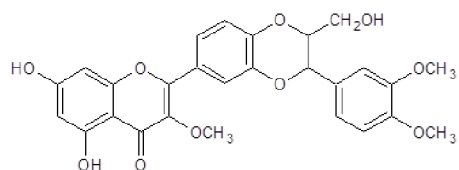
**7-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**



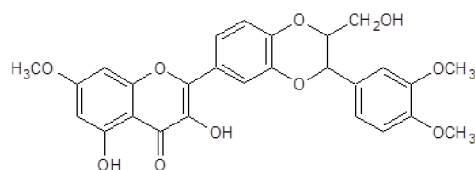
**20-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**



**3,7-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**



**3,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**



**7,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin**

Obr. 7 Strukturální vzorce vybraných metylovaných derivátů DHS (3-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 20-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 3,7-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 3,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin; 7,20-di-*O*-methyl-2,3-dehydrosilybin).

Při detekci životaschopnosti buněk s využitím NR testu bylo médium odsáto a na buňky bylo aplikováno 40  $\mu\text{l}$  roztoku neutrální červeně (0,1% roztok neutrální červeně a roztok PBS v poměru 3:8). Následovala inkubace po dobu 1,5 h při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci bylo kultivační médium opět odsáto a buňky byly promyty 200  $\mu\text{l}$  směsi formaldehydu a  $\text{CaCl}_2$  (0,5 % roztok formaldehydu a 1% roztok  $\text{CaCl}_2$  v poměru 1:1). Po odsátí směsi bylo na buňky aplikováno 200  $\mu\text{l}$  extrakčního roztoku (1% roztok kyseliny octové). Následovala inkubace po dobu 20 min za stálého třepání (300 rpm). Absorbance produktu byla změřena fotometricky při 540 nm

### **3.2.3 Lýza buněk a stanovení proteinů pomocí BCA metody**

Pro potřeby experimentů byly 24 h před samotným experimentem buňky vysety do 6-ti jamkových desek ( $3 \times 10^5$  buněk v 1,5 ml média na jamku). Z 6-ti jamkových desek s buňkami bylo následující den odsáto staré médium a následně bylo k buňkám přidáno 1,5 ml kultivačního média s methylovaným derivátem DHS o koncentraci 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Po 24-hodinové inkubaci byl připraven celkový lyzát.

Po inkubaci buněk s danými látkami bylo médium odsáto a buňky byly dvakrát promyty v 1 ml studeného PBS. Následně byly buňky seškrábány do 500  $\mu\text{l}$  PBS a přeneseny do mikrozkušavek. Buňky byly centrifugovány při 1960 g po dobu 5 min při 4 °C. Získaný pelet byl rozpuštěn v 75  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru HUVEC. Následovala třicetiminutová inkubace na ledu za pravidelného vortexování. Lyzát byl poté několikrát propipetován pomocí pipety se špičkou s malým průřezem, aby došlo k rozbití buněk. Takto připravené vzorky byly centrifugovány při 12 740 g po dobu 13 min při 4 °C. Supernatant byl odebrán do čistých mikrozkušavek a zamražen.

Proteiny byly stanoveny pomocí BCA metody. Vzorky byly desetkrát zředěny PBS na celkový objem 10  $\mu\text{l}$ . K tomuto množství bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  BCA reakční směsi, kdy reagent A a reagent B byly v poměru 50:1. Vzorky byly inkubovány po dobu 30 min při 37 °C za stálého míchání (300 rpm). Následně byla měřena absorbance vzorků při 562 nm.

### **3.2.4 SDS-PAGE**

Pro účely SDS-PAGE byly vzorky nejdříve smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 5:1. Celkový objem roztoku byl 30  $\mu\text{l}$  a každý vzorek obsahoval stejné množství proteinu (takové množství proteinu, jaké bylo obsaženo ve vzorku s nejnižším obsahem proteinu). Vzorky byly následně povařeny při 95 °C po dobu 5 min a poté zchlazeny

na ledu a centrifugovány ve stolní centrifuze. Pro vhodnou separaci proteinů byly připraveny 10% separační a 4% zaostřovací gely o tloušťce 1,5 mm (Tab. 3 a 4). Nejdříve byl mezi skla napipetován gel separační, jež byl převrstven isopropanolem a ponechán 20 min polymerovat. Po ztuhnutí gelu byl přebytečný isopropanol odstraněn pomocí filtračního papíru a zaostřovací gel byl napipetován nad gel separační. Do zaostřovacího gelu byl ponořen hřebínek a gel byl ponechán 30 min tuhnout. Gel byl následně přenesen do elektroforetické komůrky naplněné migračním pufrem. Na gel byl následně aplikován marker (2  $\mu$ l) a jednotlivé vzorky (25  $\mu$ l). Elektroforéza probíhala zpočátku za konstantního proudu 15 mA/gel a po zaostření byl proud zvýšen na 30 mA/gel. Elektroforéza byla ukončena v okamžiku, kdy vzorky doputovaly do čela gelu a gely byly na 5 min přeneseny do transferového pufru.

### 3.2.5 Western blot a imunodetekce

Nejdříve byly připraveny PVDF membrány o rozměrech 6,5 x 8,5 cm. Ty byly hydratovány ve 100% methanolu po dobu 10 s, poté byly promyty v deionizované vodě po dobu minimálně 5 min a nakonec byly na 5 min ponořeny do transferového pufru. Následně byly do blotovací kazety vloženy všechny komponenty (dříve namočené v transferovém pufru) v následujícím pořadí: blotovací molitan, filtrační papír, gel, PVDF membrána, filtrační papír a blotovací molitan. Samotný Western blotting probíhal po dobu 30 min při 16 V a 1 A. Po ukončení přenosu byly membrány promyty v roztoku TBS/T po dobu 5 min a následně byly membrány barveny roztokem Ponceau S. Po promytí v TBS/T byly membrány nastříhány a následně inkubovány v 5% roztoku sušeného mléka po dobu 1,5 h při laboratorní teplotě (nebo přes noc při 4 °C překryté parafilmem) za účelem zablokování nespecifických vazebných míst.

Tab. 3 Složení separačního gelu.

Separací gel (%)	Milli-Q H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	40% akrylamid ( $\mu$ l)	1,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8 ( $\mu$ l)	10% SDS ( $\mu$ l)	10% APS ( $\mu$ l)	TEMED ( $\mu$ l)
10	9800	5000	5000	200	200	20

Tab. 4 Složení zaostřovacího gelu.

Zaostřovací gel (%)	Milli-Q H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	40% akrylamid ( $\mu$ l)	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8 ( $\mu$ l)	10% SDS ( $\mu$ l)	10% APS ( $\mu$ l)	TEMED ( $\mu$ l)
4	5120	800	2000	80	60	8

Jako primární protilátky byly v případě stanovení přítomnosti apelinového receptoru (APJ) použity protilátky anti-APJ a GAPDH, jež byly ředěny 5% roztokem sušeného mléka v poměru 1:1000 pro GAPDH a 1:500 pro anti-APJ. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při 4 °C. Následující den byly membrány třikrát promyty v roztoku TBS/T po dobu 10 min. Sekundární protilátka (kozí anti-králičí IgG1), která byla značena peroxidasou, byla ředěna 5% roztokem sušeného mléka v poměru 1:5000. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala po dobu 1,5 h při laboratorní teplotě. Poté byly membrány opět třikrát promyty v roztoku TBS/T po dobu 10 min.

Pro potřeby detekce bylo připraveno chemiluminiscenční činidlo v poměru 1:1. Činidlo (250  $\mu$ l) bylo nanášeno na membrány vložené mezi dvě folie a vzniklé vzduchové bubliny byly odstraněny pomocí buničiny. Folie byly vloženy do vyvolávací kazety a přeneseny do temné místnosti. Na folii byl vložen fotografický film a kazeta byla uzavřena. Po vhodné dlouhé expozici (záleželo na použité primární protilátce) byl film vytažen z kazety a krátce ponořen do vývojky, poté byl rychle promyt v deionizované vodě a následně byl vložen do ustalovače. Nakonec byl film promyt v deionizované vodě. Po uschnutí byl film naskenován do počítače a bylo provedeno denziometrické vyhodnocení pomocí programu Image J.

### **3.2.6 Stanovení míry fosforylace kinas v závislosti na čase**

V rámci dalšího experimentu byly buňky inkubovány s vybranými methylovanými deriváty DHS o koncentraci 2  $\mu$ mol $\cdot$ l<sup>-1</sup>. Buňky byly vysety na 6-ti jamkové destičky a po 24 h na ně byl aplikován roztok testované látky. Následně byly k buňkám po 60, 30, 15, 10 a 5 minutách přidány inhibitory fosfatáz rozpuštěné v PBS (fluorid sodný, orthovanadičnan sodný) a byly připraveny buněčné lyzáty (obdobný postup jako v kapitole 3.2.3). U takto připravených vzorků byly stanoveny celkové proteiny pomocí BCA a následně byly obdobně provedeny elektroforéza a Western blotting jako v předchozím postupu (kapitoly 3.2.4-3.2.5). Primárními protilátkami byly v tomto případě Akt, fosfo-Akt, p44/42 MAPK ERK1/2, fosfo-p44/42 MAPK ERK1/2. Sekundární protilátkou byla v případě Akt, fosfo-Akt a p44/42 MAPK ERK1/2 koží anti-králičí IgG1. A v případě fosfo-p44/42 MAPK ERK1/2 to byla koží anti-myší IgG1. Primární protilátky byly ředěny v poměru 1:1000 5% roztokem sušeného mléka a sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:5000. Primární a sekundární protilátky

pro detekci fosfo-Akt byly poté rozpouštěny v tzv. boosteru, namísto 5% roztoku sušeného mléka.

### 3.2.7 Transfekce buněčné linie H9c2

Před samotnou transfekcí byly buňky vysety na 96-jamkovou destičku v počtu  $1,5 \times 10^4$  buněk na jamku. Následující den byla připravena směs pro transfekci podle Tab. 5 pro jednotlivé plasmidy. Do první mikrozkušavky bylo napipetováno holé DMEM médium, byl přidán roztok lipofectaminu<sup>®</sup> 3000 (pipetován přímo do holého DMEM média, ne po stěně mikrozkušavky) a takto připravená směs byla lehce promíchána a inkubována po dobu 5 min. Během inkubace byl do druhé mikrozkušavky napipetován plasmid, k němuž bylo přidáno holé DMEM médium a daný objem Reagentu<sup>®</sup> 3000. Obě směsi byly smíchány (směs obsahující lipofectamin<sup>®</sup> 3000 byla pipetována do směsi obsahující plasmid) a následovala inkubace trvající 15 min při laboratorní teplotě. Ke směsi byl přidán potřebný objem kompletního DMEM média (doplnění do zvoleného objemu), směs byla jemně promíchána pipetováním a následně bylo nanášeno 200  $\mu$ l směsi na jamku. Po 24 hodinách bylo vyměněno médium a po dalších 24 hodinách byly buňky použity pro další postup.

V případě plasmidu C-geNOP byly buňky vysety na sklíčka umístěná v 6-jamkové destičce. V rámci optimalizace byla využita sklíčka potažená kolagenem i sklíčka bez kolagenu. Rovněž byla otestována možnost transfekce buněk v suspenzi. Za tímto účelem bylo smícháno 300  $\mu$ l Opti-Mem média a 10  $\mu$ l Lipofectaminu<sup>®</sup> 3000 (objemy uvedeny pro 4 jamky na 6-ti jamkové desce). Směs byla inkubována po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Následně byla směs napipetována do zkumavky s plasmidem (4  $\mu$ g), Reagentem<sup>®</sup> 3000 (8  $\mu$ l), Opti-Mem médiem (300  $\mu$ l) a po jemném protřepání byla směs inkubována po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Následně byla ke směsi přimíchána suspenze obsahující  $1 \times 10^6$  buněk v holém DMEM médiu (doplněno do celkového objemu 8 ml). Po jemném promíchání byly nanášeny 2 ml směsi na jamku. Po 6 h bylo holé DMEM médium vyměněno za kompletní DMEM médium. Další den bylo vyměněno médium a po dalších 24 hodinách byly buňky použity pro další postup.

Tab. 5 Složení směsi k transfekci pro jednotlivé plasmidy. V případě plasmidů G CaMP 7F a G-Flamp2 jsou uvedeny objemy pro 5 jamek na 96-ti jamkové destičce. V případě plasmidu C-geNOp jsou objemy uvedeny pro 1 jamku na 6-ti jamkové destičce.

Typ plasmidu (koncentrace)	G CaMP 7F (1224 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	G-Flamp2 (1574 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	C-geNOp (0,753 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
<b>Řada 1</b>			
Holé DMEM médium ( $\mu\text{l}$ )	125	125	250
Lipofectamin <sup>®</sup> 3000 ( $\mu\text{l}$ )	3,0	1,5	3,0
<b>Řada 2</b>			
Plasmid ( $\mu\text{g}$ )	1,0	0,5	1,0
Holé DMEM médium ( $\mu\text{l}$ )	125	125	250
Reagent <sup>®</sup> 3000 ( $\mu\text{l}$ )	2,0	1,0	2,0
Kompletní DMEM médium ( $\mu\text{l}$ )	744	747	1494

### 3.2.8 Transfekce buněčné linie HEK293

Buněčná linie HEK293 byla transfekována stejným způsobem jako buněčná linie H9c2 (kapitola 3.2.7). Bylo ovšem použito médium specifické pro buněčnou linii HEK293 s přidavkem FBS, penicilinu, streptomycinu a pyruvátu sodného. Detekce byla provedena po 24 hodinách od transfekce na rozdíl od buněk H9c2 (po 48 h).

### 3.2.9 Stanovení hladiny $\text{Ca}^{2+}$

Stanovení toku  $\text{Ca}^{2+}$  bylo provedeno pomocí fluorescenční sondy G CaMP 7F. Po transfekci, výměně média a 24-hodinové inkubaci bylo odsáto médium a k buňkám bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  pufru 2CaNa. Takto nachystaná destička byly uchovávána ve tmě. Následně byly pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorovány změny v koncentraci vápníku v buňkách před a po přidavku testované látky ve 100  $\mu\text{l}$  roztoku 2CaNa (finální koncentrace testovaných derivátů byla jako v předchozích experimentech 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Pozorování bylo dokumentováno po dobu 12 min, přičemž snímky byly pořizovány v intervalech po 10 s. Jako pozitivní kontrola byl použit ionomycin o koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO. Průběh experimentu je schematicky znázorněn na Obr. 8. Výsledky byly následně vyhodnoceny v programu ImageJ.



Obr. 8 Schematické znázornění experimentálního stanovení toku  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.2.10 Stanovení hladiny cAMP

Stanovení přítomnosti molekul cAMP bylo provedeno pomocí fluorescenční sondy G-Flamp2. V rámci této metody byly využity dva typy buněk, buněčné linie H9c2 a HEK293. Po transfekci, výměně média (pouze v případě buněk H9c2) a 24-hodinové inkubaci bylo odsáto médium a k buňkám bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku EHL. Takto nachystaná destička byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1 h. Následně byl EHL pufr vyměněn za 100  $\mu\text{l}$  pufru 2CaNa. Změny v koncentraci cAMP v buňkách po přidavku testované látky ve 100  $\mu\text{l}$  pufru 2CaNa byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pozorování bylo dokumentováno po dobu 13 min (testovaná látka byla přidána po 1 min měření), přičemž snímky byly pořizovány v intervalech po 10 s. Jako pozitivní kontrola byl použit forskolin o koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a jako negativní kontrola byl použit 0,1% DMSO. Výsledky byly následně vyhodnoceny v programu ImageJ.

### 3.2.11 Stanovení produkce NO

Detekce NO byla provedena pomocí fluorescenční sondy C-geNOp. Po transfekci, výměně média a 24-hodinové inkubaci bylo odsáto médium a k buňkám bylo přidáno 2000  $\mu\text{l}$  pufru EHL. Po hodinové inkubaci ve tmě byl EHL pufr vyměněn za 2000  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího fumarát železnatý a kyselinu askorbovou o koncentraci 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Opět proběhla hodinová inkubace a roztok fumarátu železnatého s kyselinou askorbovou byl opět na 1 h vyměněn za EHL pufr. Následně bylo sklíčko z destičky vyjmuta a vloženo do perfuzní komůrky. Ta byla uzavřena a na sklíčko byl aplikován 1 ml pufru 2CaNa. Perfuzní komůrka byla následně napojena na systém přivádějící daný roztok a rovněž odčerpávající roztok z komůrky pomocí vakuového čerpadla. Takto přichystaný vzorek byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem. Jako pozitivní kontrola byl zvolen roztok nitroprusidu sodného o koncentraci 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako negativní kontrola byl poté zvolen 0,1% DMSO.

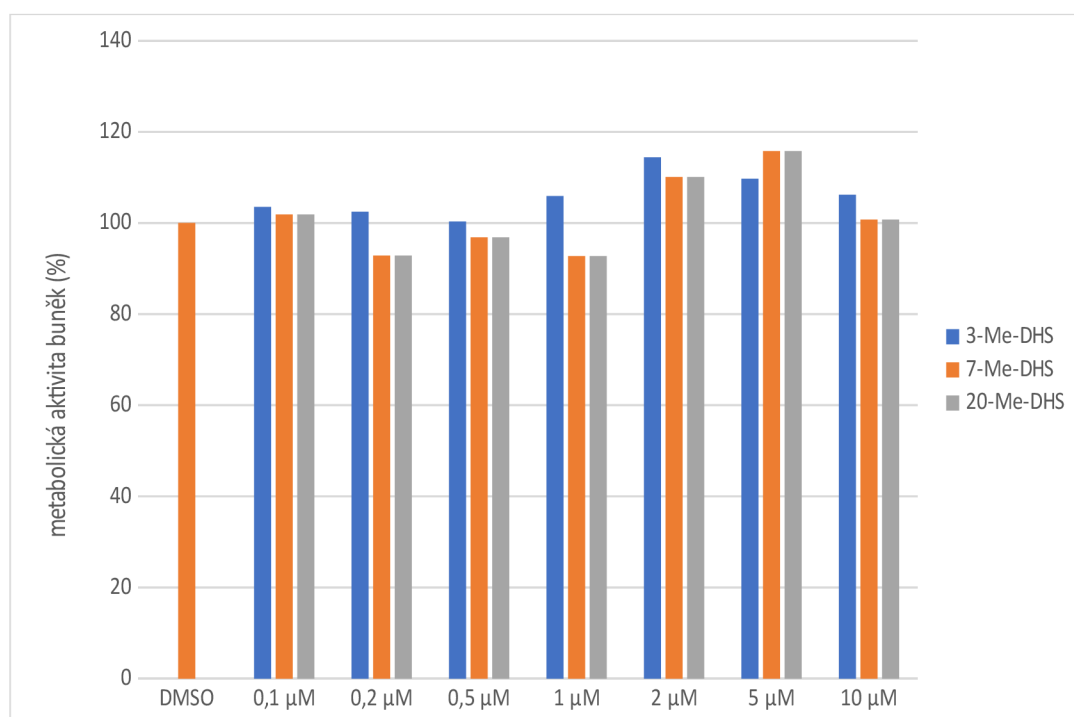


## 4 VÝSLEDKY

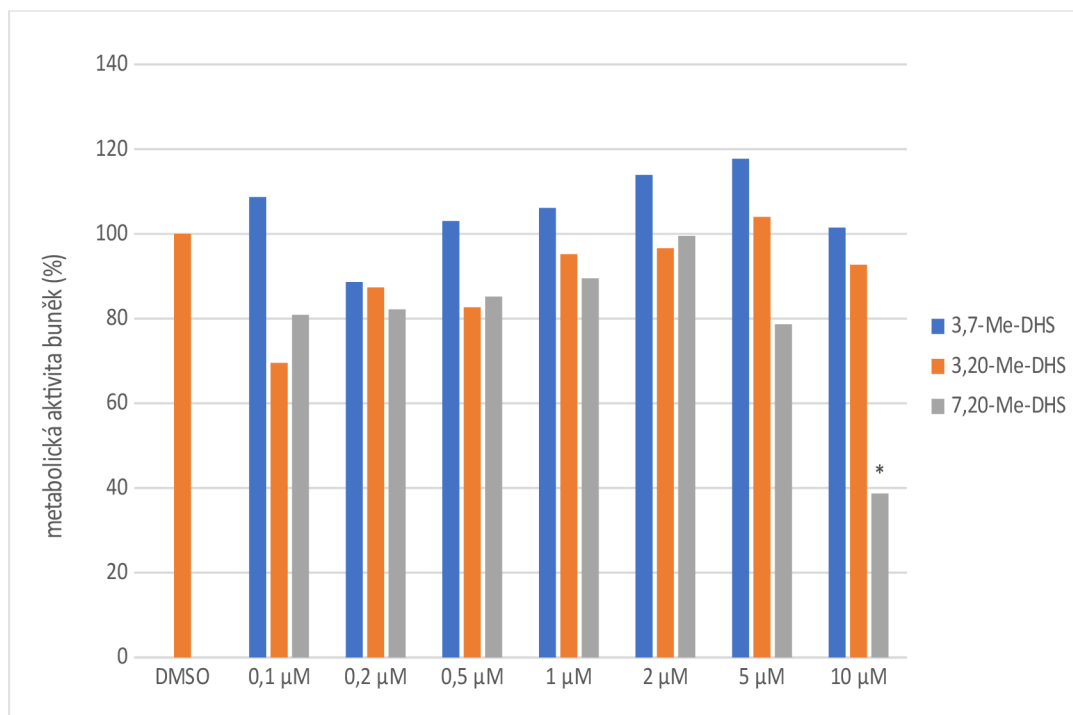
### 4.1 Stanovení životaschopnosti H9c2 buněk po intoxikaci vybranými methylovanými deriváty DHS

V rámci testování životaschopnosti buněk v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS o různých koncentracích byly provedeny dva testy, MTT test (Obr. 9 a 10) a NR test (Obr. 11 a 12). Jako kontrola bylo zvoleno 0,1% DMSO (hodnota 100 %). Dále byla využita negativní kontrola v podobě Tritonu X-100 (hodnota 0 %). Experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních, vždy v triplikátech.

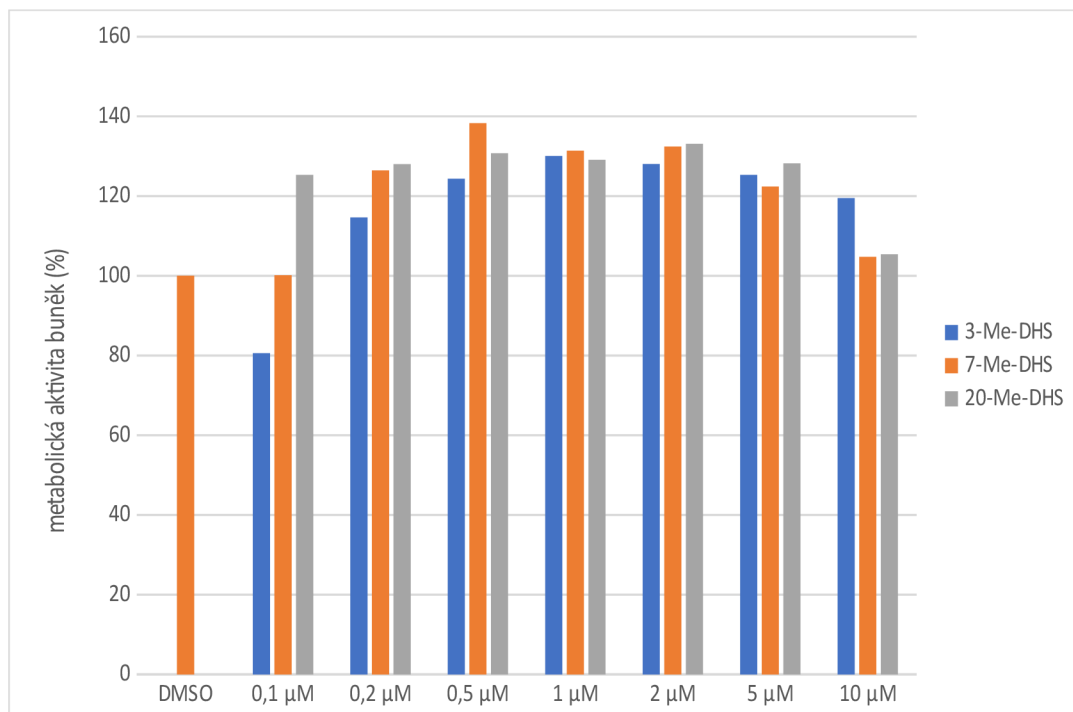
U většiny testovaných látek nebyly pozorovány žádné výrazné toxické účinky na buňky. Jako nejvíce toxické se jeví koncentrace 5 a 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to především v případě derivátu 7,20-Me-DHS, kdy byla koncentrace 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  vyhodnocena jako statisticky významná (na základě párového t-testu). Jako optimální byla poté zvolena koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , jelikož to byla nejvyšší možná koncentrace, která nepůsobila na buňky toxicky. Zvolená koncentrace byla poté využívána ve všech dalších experimentech.



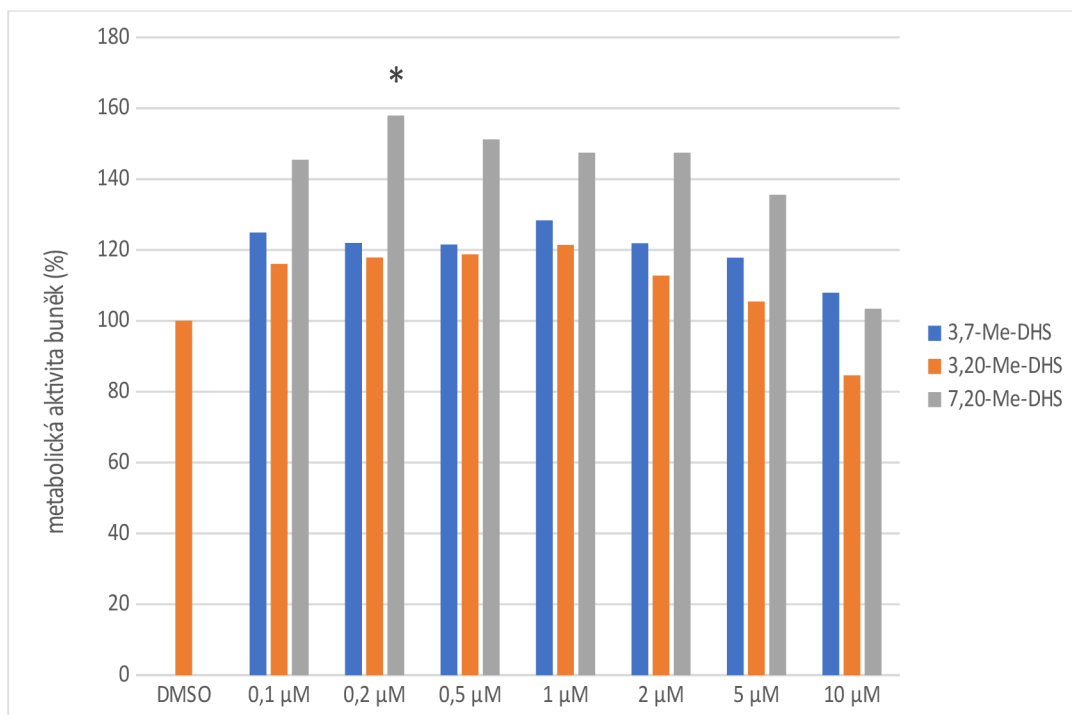
Obr. 9 Viabilita buněčné linie H9c2 ovlivněná 24-hodinovou inkubací s methylovanými deriváty DHS (3-Me-DHS; 7-Me-DHS; 20-Me-DHS) o různých koncentracích (0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Stanoveno na základě MTT testu.



Obr. 10 Viabilita buněčné linie H9c2 ovlivněná 24-hodinovou inkubací s methylovanými deriváty DHS (3,7-Me-DHS; 3,20-Me-DHS; 7,20-Me-DHS) o různých koncentracích (0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Stanoveno na základě MTT testu. Statisticky významné hodnoty jsou označeny \* pro  $p < 0,05$ ; vyhodnoceno pomocí párového t-testu.



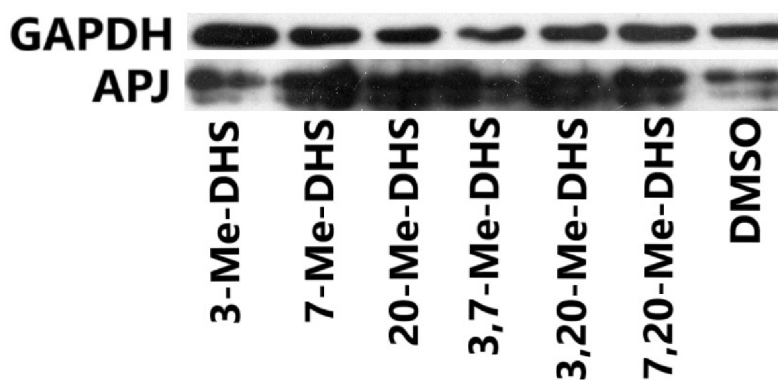
Obr. 11 Viabilita buněčné linie H9c2 ovlivněná 24-hodinovou inkubací s methylovanými deriváty DHS (3-Me-DHS; 7-Me-DHS; 20-Me-DHS) o různých koncentracích (0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Stanoveno na základě NR testu.



Obr. 12 Viabilita buněčné linie H9c2 ovlivněná 24-hodinovou inkubací s methylovanými deriváty DHS (3,7-Me-DHS; 3,20-Me-DHS; 7,20-Me-DHS) o různých koncentracích (0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Stanoveno na základě NR testu. Statisticky významné hodnoty jsou označeny \* pro  $p < 0,05$ ; vyhodnoceno pomocí párového t-testu.

## 4.2 Vliv methylovaných derivátů DHS na přítomnost apelinového receptoru

Dalším krokem v rámci diplomové práce bylo stanovení vlivu methylovaných derivátů DHS na hladinu apelinového receptoru v použité buněčné linii H9c2. Buňky byly inkubovány s vybranými methylovanými deriváty DHS po dobu 24 hodin, následně byl připraven celkový buněčný lyzát a za účelem konečné detekce byla použita imunodetekce s využitím několika protilátek (anti-APJ, GAPDH). Z Obr. 13 je patrné, že APJ je v buňkách ošetřených vybranými methylovanými deriváty DHS přítomen. Je možné konstatovat, že přítomnost APJ nebyla v porovnání s kontrolním vzorkem příliš ovlivněna 24-hodinovou inkubací s vybranými methylovanými deriváty DHS. Testované látky, tak zřejmě neovlivňují syntézu ani degradaci APJ, jelikož v přítomnosti derivátů zůstává hladina APJ v buňkách stabilní po dobu 24 hodin. Hladina APJ byla vztažena k hladině glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPDH).



Obr. 13 Reprezentativní blot stanovení přítomnosti APJ v buněčné linii H9c2 v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

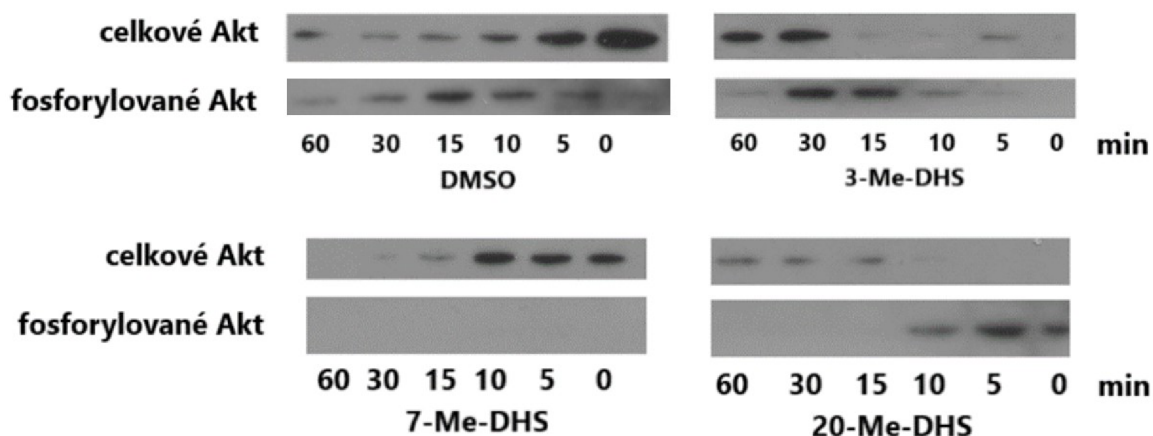
### 4.3 Stanovení míry fosforylace Akt kinasy v závislosti na čase

V předchozích studiích bylo již potvrzeno, že DHS ani apelin-13 neovlivňují fosforylaci kinas Akt a ERK1/2 v horizontu hodin, ale jedná se o kratší časovou jednotku (Opletalová, 2021). Míra fosforylace kinas byla tedy stanovována v časových úsecích 5, 10, 15, 30 a 60 minut. Aby byl potlačen vliv fosfatas přítomných v buňkách, byly buňky ihned po inkubaci ošetřeny roztokem inhibitorů fosfatas v PBS – NaF a  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Byly testovány všechny výše zmíněné deriváty o koncentraci  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a jako kontrola byl využit 0,1 % DMSO, ke kterému byla míra fosforylace v rámci vyhodnocení vztažena. Experimenty byly provedeny ve třech opakováních.

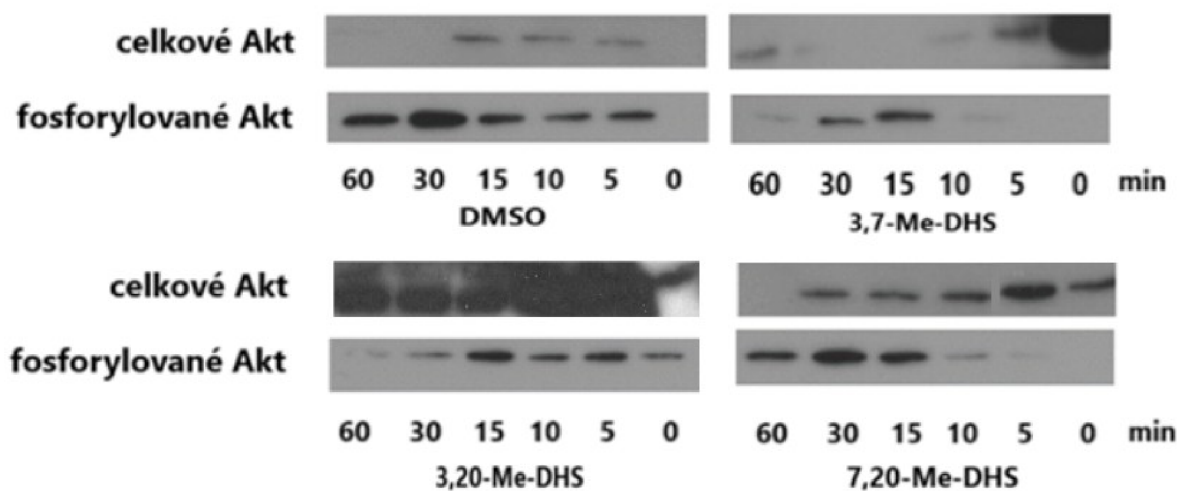
Ze snímků blotů i odpovídajících grafů (Obr. 14 až 23) je patrné, že u většiny derivátů dochází v daném čase k navýšení fosforylované formy Akt a následně dochází opět k úbytku fosforylované formy. Čas, kdy dochází k nejprudšímu navýšení fosforylace se u jednotlivých opakování pro daný derivát mění. Mění se rovněž míra navýšení fosforylované formy Akt. To může být způsobeno skutečností, že pro jednotlivá opakování byly použity různě staré buňky. Právě kvůli významným rozdílům v míře fosforylace nebyla opakování průměrována, ale jsou v práci uvedena jako jednotlivé experimenty.

I přesto, že není možno pro jednotlivé deriváty určit čas, ve kterém dochází k nejvyššímu navýšení fosforylace, je možné konstatovat, že k aktivaci kinasy Akt dochází vlivem derivátů později, než je tomu v případě samotného DHS nebo apelinu-13. Z předchozích prací je známo, že DHS i apelin-13 způsobují nárůst fosforylace Akt již v 5. minutě (Opletalová, 2021). Jediným derivátem, u něhož nebyl pozorován vliv na fosforylaci Akt, je 3,20-Me-DHS.

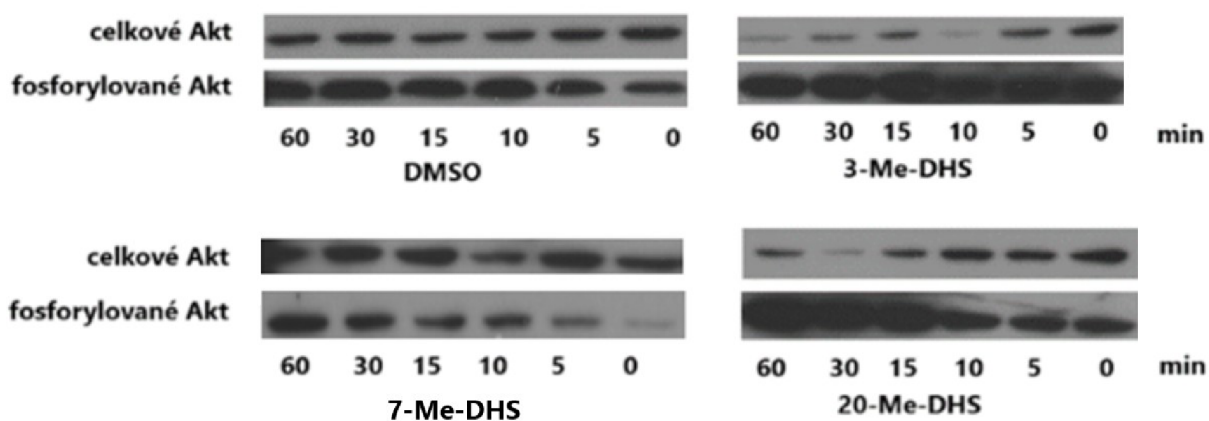
Vyhodnocování negativně ovlivnila i samotná kontrola v podobě DMSO. U DMSO byl rovněž pozorován vliv na míru fosforylace Akt, což je patrné z přiložených snímků blotů.



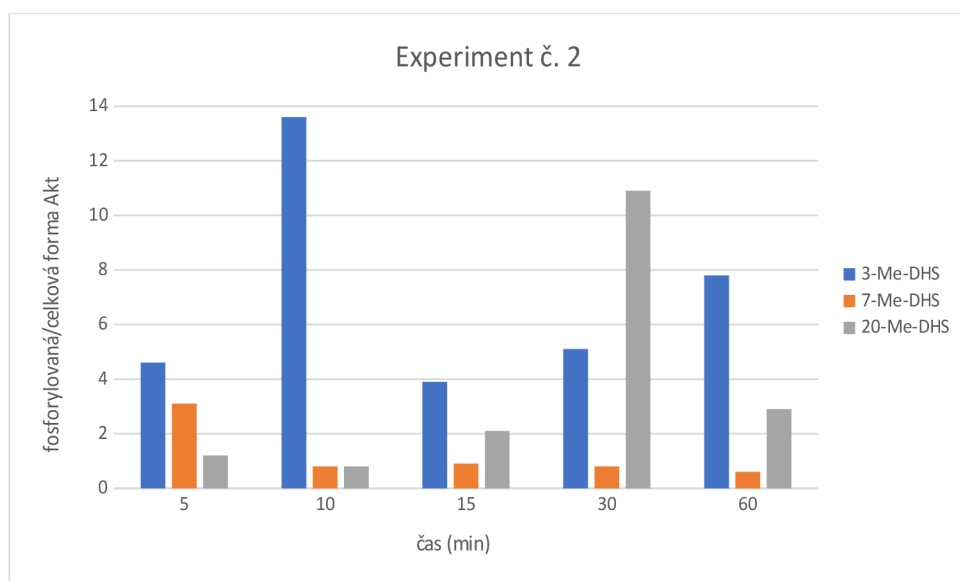
Obr. 14 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 1.



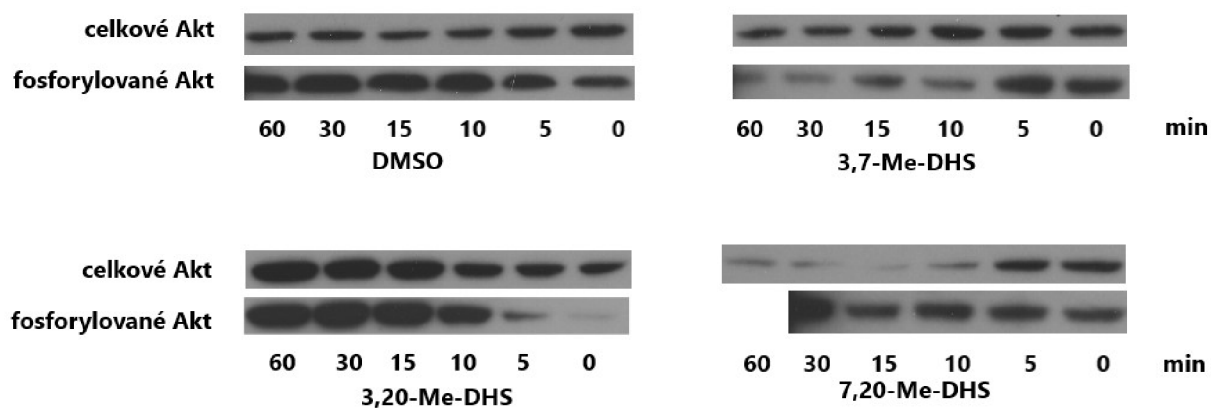
Obr. 15 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 1.



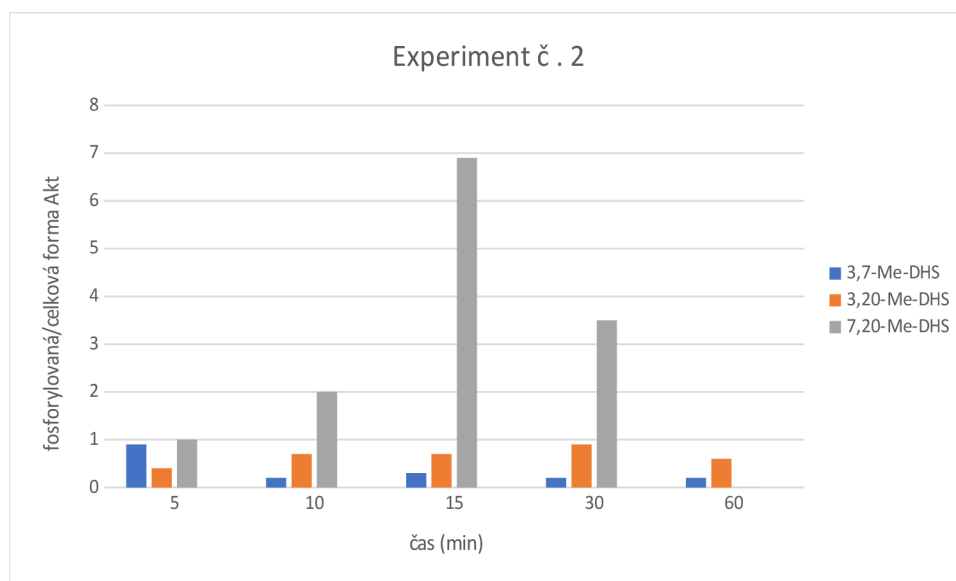
Obr. 16 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 2.



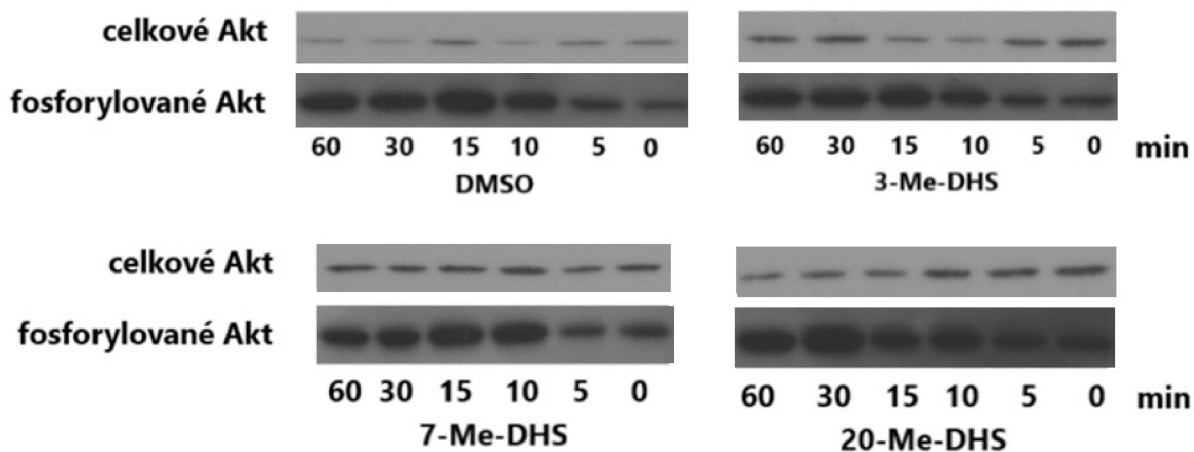
Obr. 17 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy Akt v závislosti na čase - experiment č. 2. Vztaženo k DMSO.



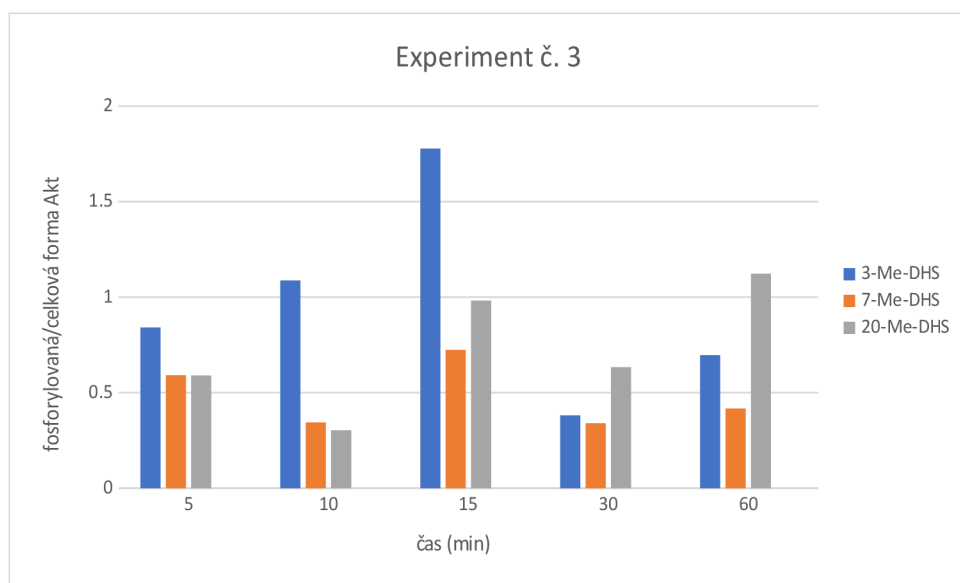
Obr. 18 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 2.



Obr. 19 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy Akt v závislosti na čase - experiment č. 2. Vztaheno k DMSO.

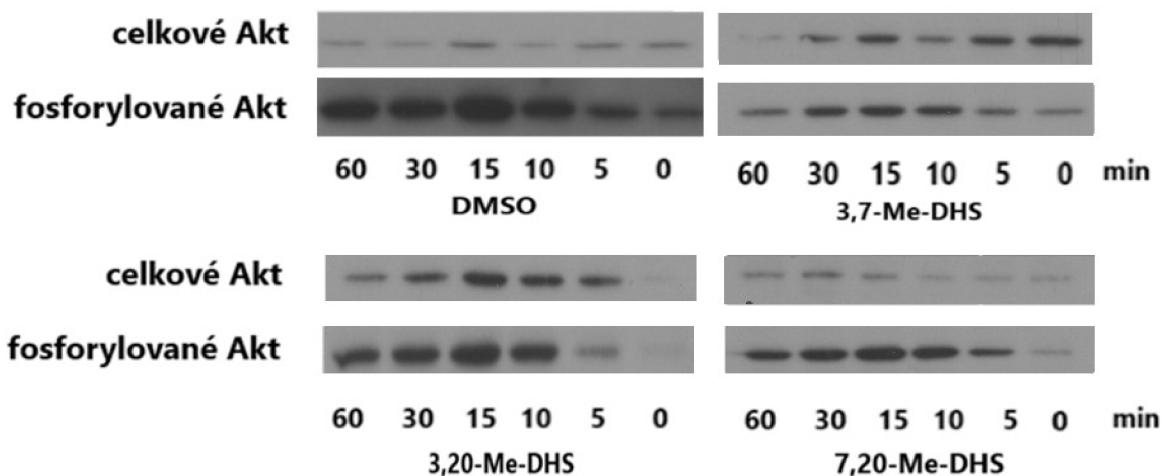


Obr. 20 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných metylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 3.

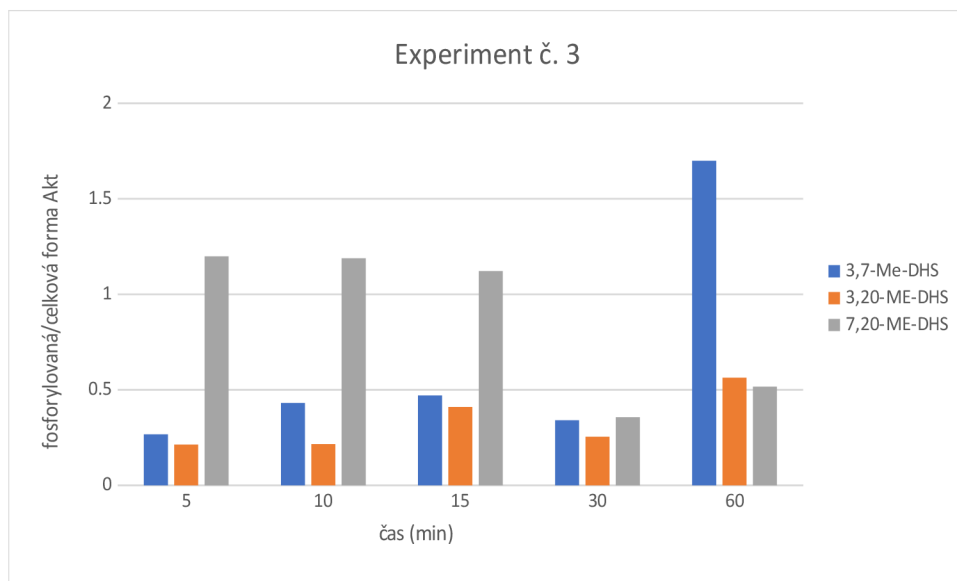


Obr. 21 Vliv vybraných metylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinyasy Akt v závislosti na čase - experiment č. 3. Vztaženo k DMSO.





Obr. 22 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 3.



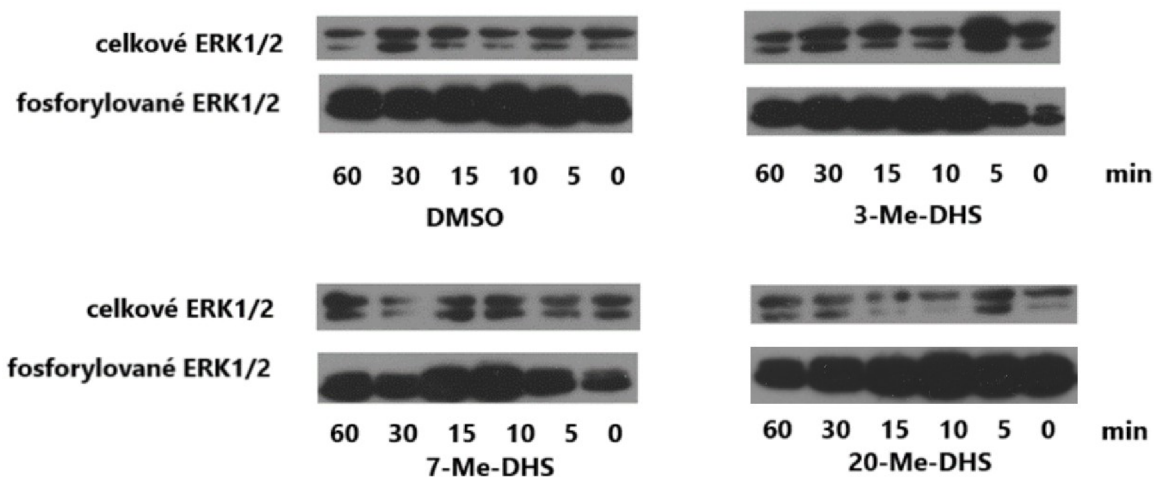
Obr. 23 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy Akt v závislosti na čase - experiment č. 3. Vztaheno k DMSO.

#### 4.4 Stanovení míry fosforylace ERK1/2 kinasy v závislosti na čase

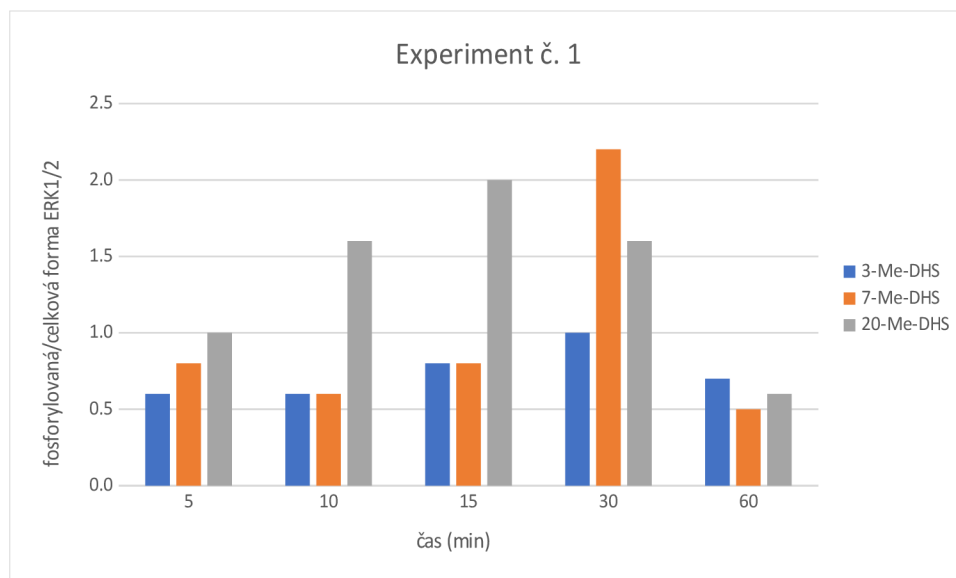
Stejně jako v případě kinasy Akt, byla i v případě ERK1/2 míra fosforylace pozorována v časových úsecích 5, 10, 15, 30 a 60 minut. Obdobně byly použity i inhibitory fosfatas a 0,1% DMSO jako kontrola. Experimenty byly rovněž provedeny ve třech opakováních.

Ze snímků blotů i odpovídajících grafů (Obr. 24 až 35) je opět zřejmé, že tentokrát u všech derivátů dochází k navýšení fosforylované formy ERK1/2 a následně dochází postupně k úbytku fosforylované formy. Podobně jako u Akt, ani u ERK1/2 není možno určit čas, kdy dochází k nejprudšímu navýšení fosforylace, ani míru navýšení fosforylované formy. Z těchto důvodů nebyla jednotlivá opakování průměrována, ale jsou opět uvedena jako samostatné experimenty. Rovněž i zde se projevuje trend, kdy dochází vlivem derivátů k navýšení fosforylace později, než je tomu u DHS a apelinu-13. Konkrétně se jedná ve většině případů o 10.-15. minutu.

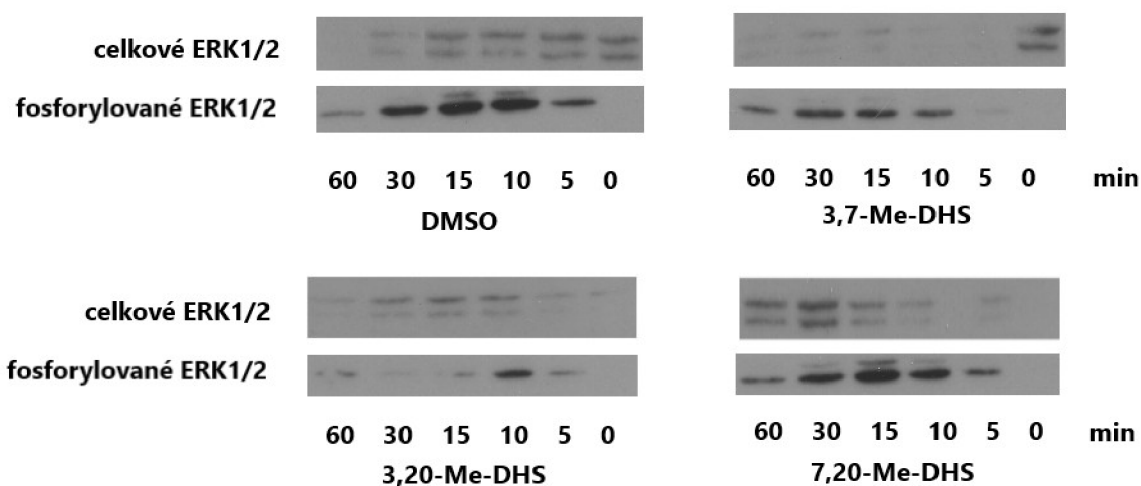
Vyhodnocování i v případě ERK1/2 negativně ovlivnil DMSO, kdy byl opět pozorován vliv DMSO na míru fosforylace ERK1/2 v čase.



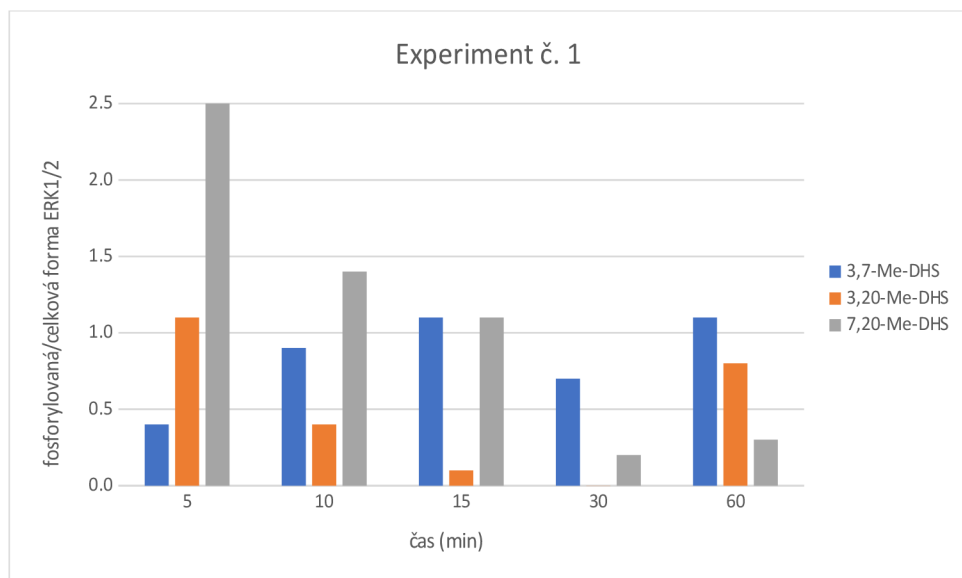
Obr. 24 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných metylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 1.



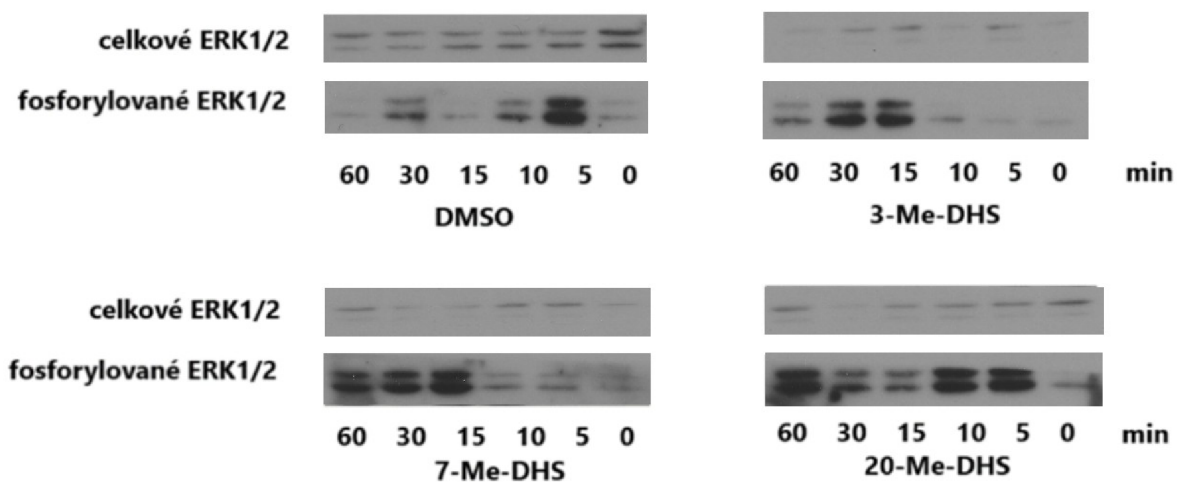
Obr. 25 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS; koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2 v závislosti na čase - experiment č. 1. Vztaheno k DMSO.



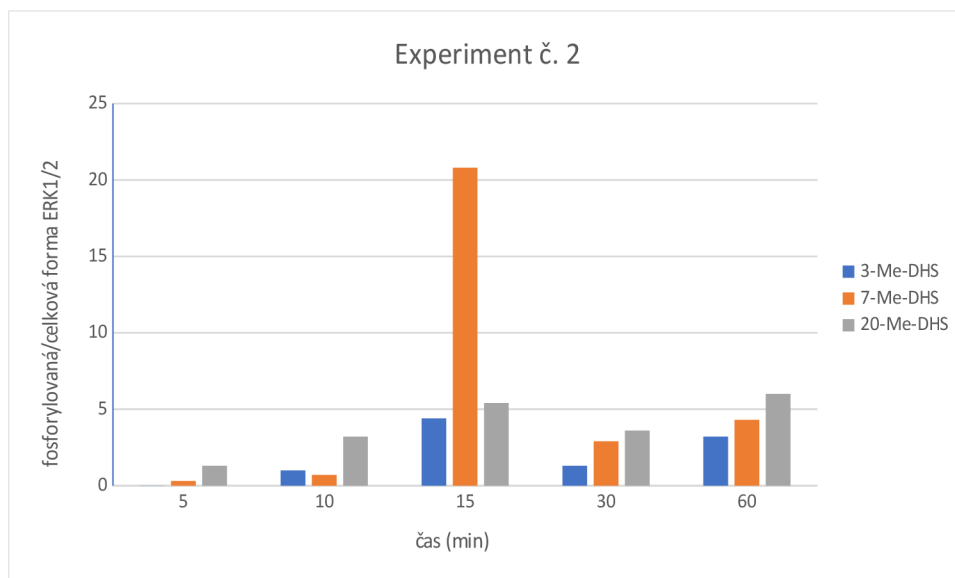
Obr. 26 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 1.



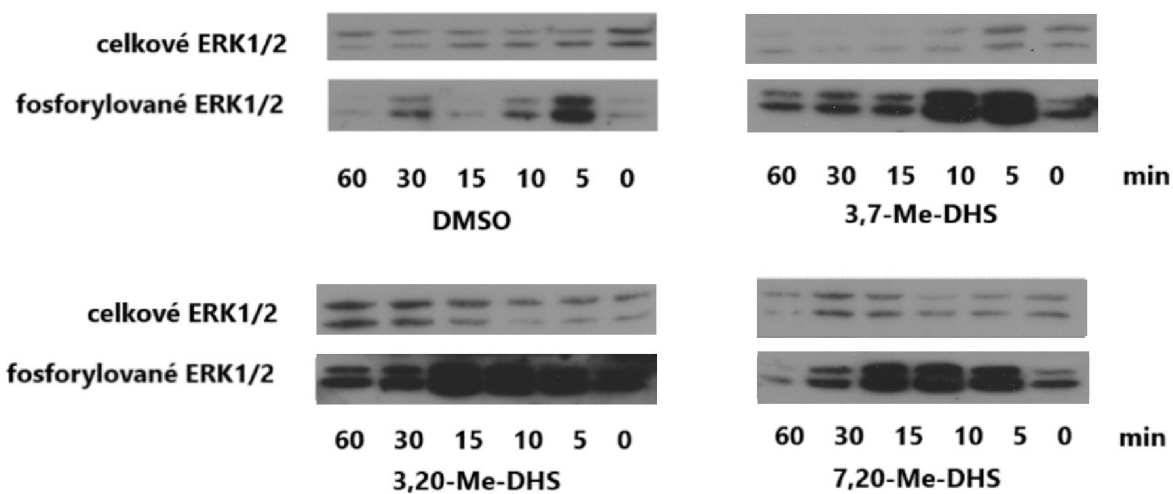
Obr. 27 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2 v závislosti na čase – experiment č. 1. Vztaženo k DMSO.



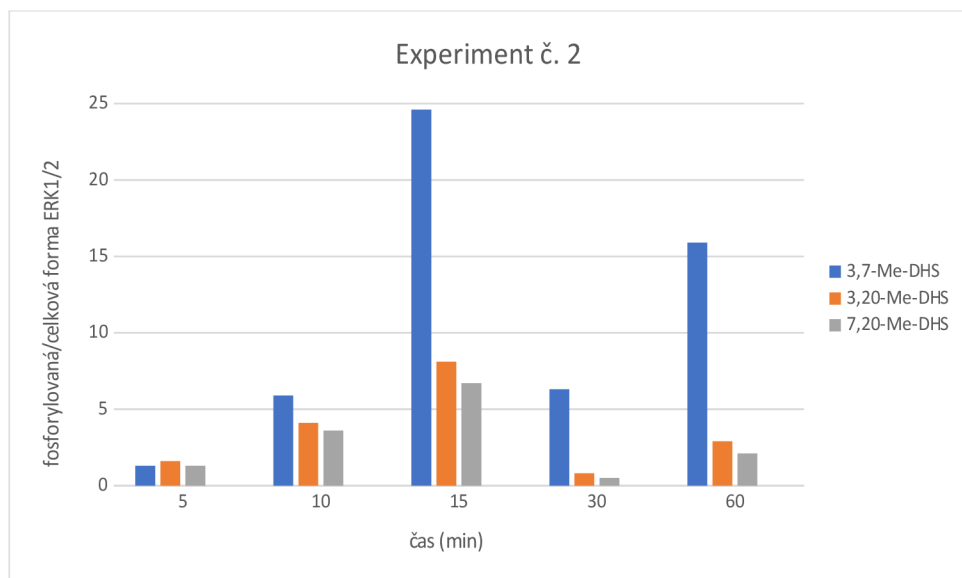
Obr. 28 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 2.



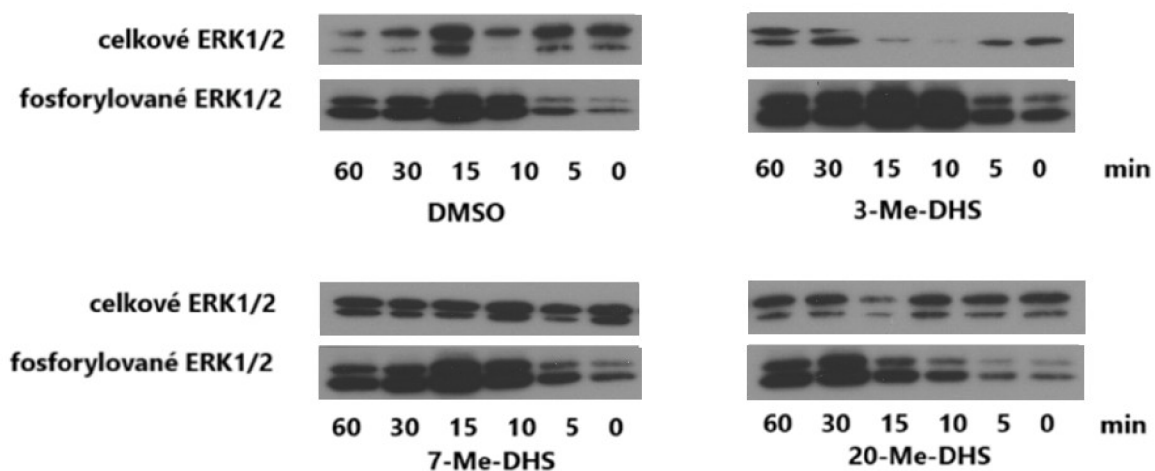
Obr. 29 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS; koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2 v závislosti na čase - experiment č. 2. Vztaheno k DMSO.



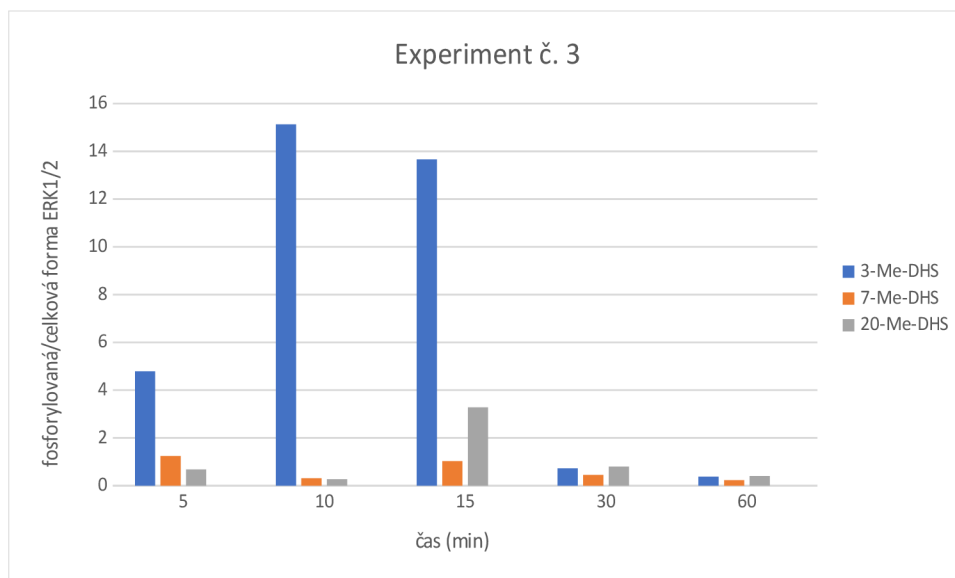
Obr. 30 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 2.



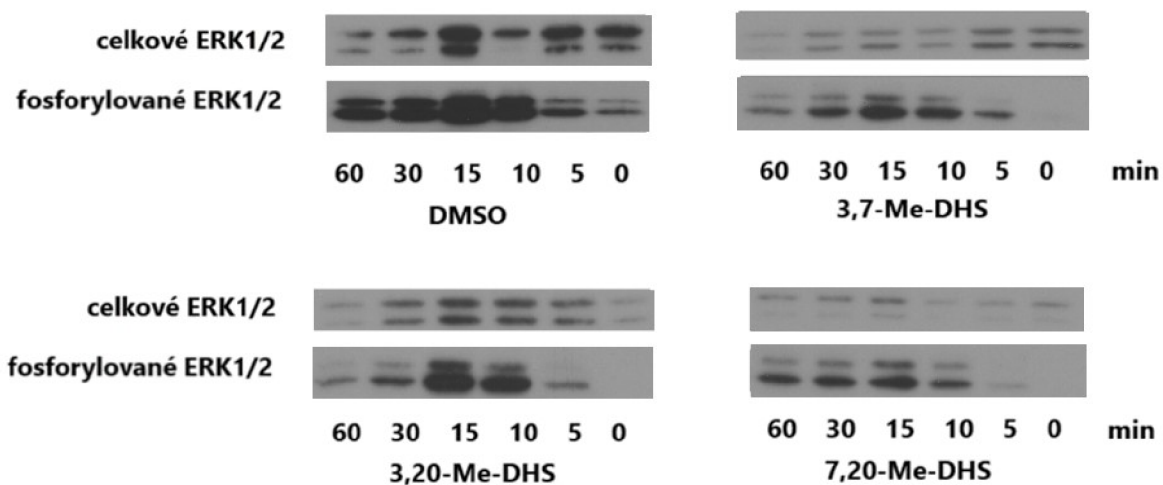
Obr. 31 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2 v závislosti na čase – experiment č. 2. Vztaženo k DMSO.



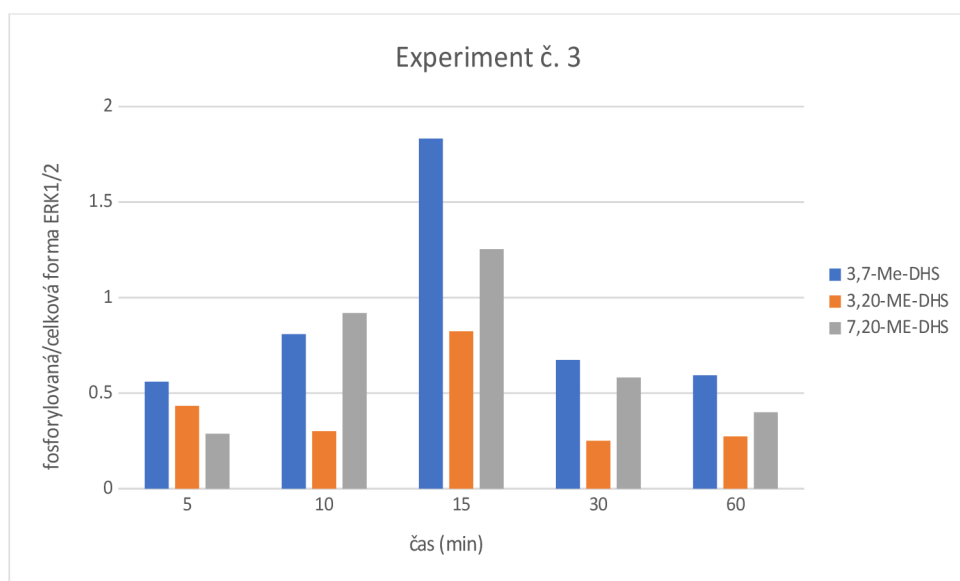
Obr. 32 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 3.



Obr. 33 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3-Me-DHS, 7-Me-DHS, 20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kinasy ERK1/2 v závislosti na čase - experiment č. 3. Vztaheno k DMSO.



Obr. 34 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS) a kontroly (DMSO). Experiment č. 3.



Obr. 35 Vliv vybraných methylovaných derivátů DHS (3,7-Me-DHS, 3,20-Me-DHS, 7,20-Me-DHS; koncentrace  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylované a celkové kiny ERK1/2 v závislosti na čase – experiment č. 3. Vztaheno k DMSO.

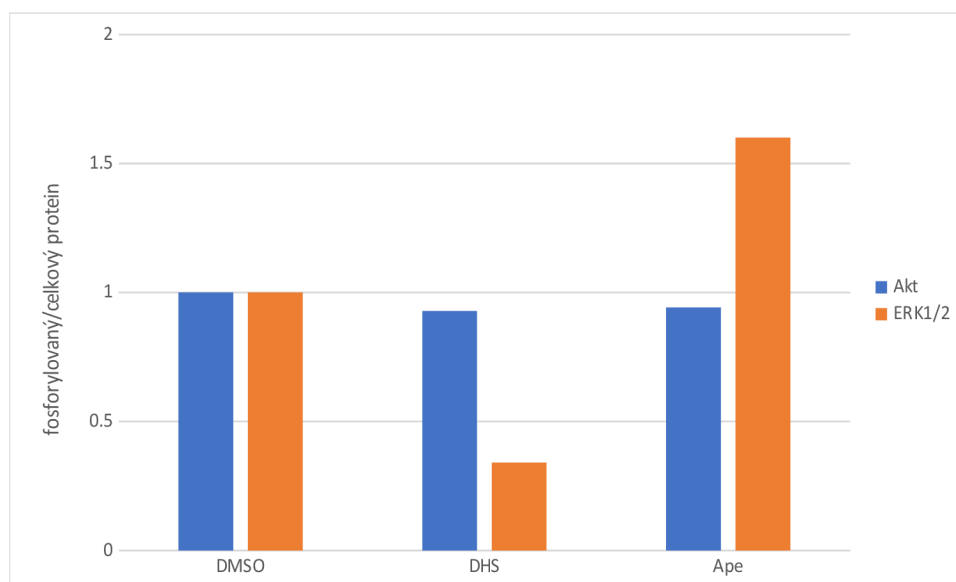
#### 4.5 Ověření účinků apelinu-13 a DHS na míru fosforylace kinas

Za účelem porovnání účinků derivátů s účinky DHS a apelinu-13 byl opět sledován vliv na míru fosforylace kinas Akt a ERK1/2 (Obr. 36). Účinky DHS i apelinu-13 byly stanovovány po pětiminutové inkubaci buněk s testovanými látkami. Pozorovaný účinek DHS i apelinu-13 byl překvapivě nízký, což je v rozporu s daty publikovanými v práci Opletalové, 2021. Byl proto proveden ověřovací experiment, kdy byl pro porovnání použit i zásobní roztok používaný v předchozí práci (označení jako DHS starý) a byla rovněž použita koncentrace  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , která byla testována v práci Opletalové, 2021. I tento ověřovací experiment prokázal velmi nízké účinky DHS na míru fosforylace kinas v porovnání s DMSO (Obr. 37, 38).

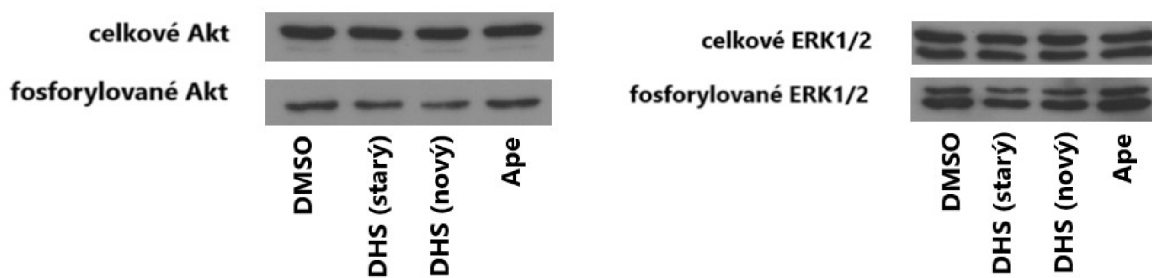
V rámci ověřovacího experimentu pro apelin-13 byl připraven nový zásobní roztok apelinu-13, z důvodu možné degradace peptidu vlivem času. Tentokrát byla jako rozpouštědlo zvolena namísto DMSO deionizovaná voda. Důvodem bylo předejít vlivu samotného DMSO na míru fosforylace kinas, což bylo pozorováno v předchozích experimentech s deriváty (kapitoly 4.3-4.4). Ani tento ověřovací experiment s apelinem-13 rozpuštěným ve vodě nepřinesl výsledky srovnatelné s výsledky publikovanými v práci Opletalové, 2021 (Obr. 37, 38). Byl tedy proveden další ověřovací experiment, kdy byla navýšena koncentrace apelinu-13 z  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  na  $400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zároveň byl proveden experiment, kdy byl k apelinu-13 ( $400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )



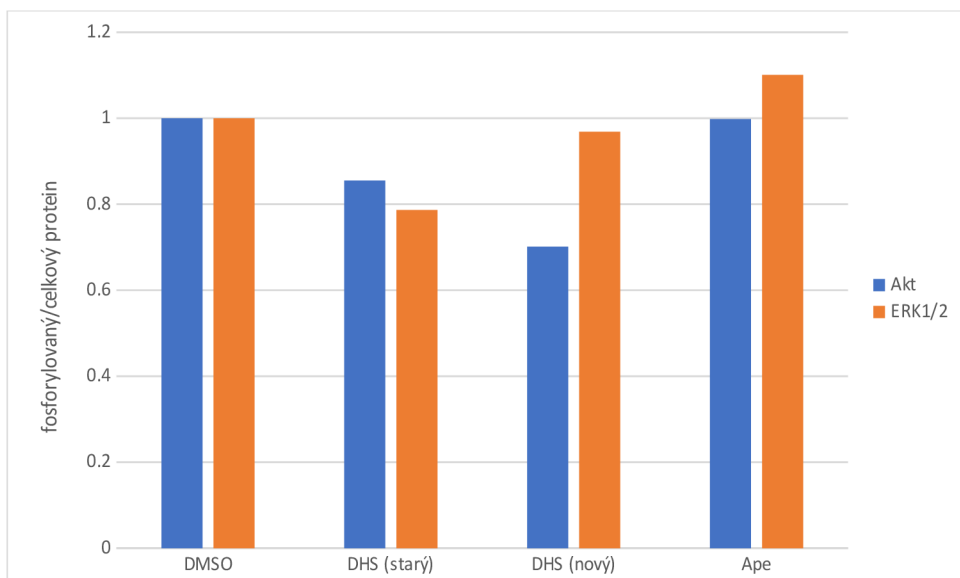
přidán stejný objem DMSO. Na základě tohoto ověřovacího experimentu bylo zjištěno, že vyšší koncentrace apelinu-13 nemá vliv na míru fosforylace kinas. Rovněž byla vyvrácena hypotéza, že by kombinace apelinu-13 a DMSO navyšovala fosforylaci kinas (Obr. 39, 40).



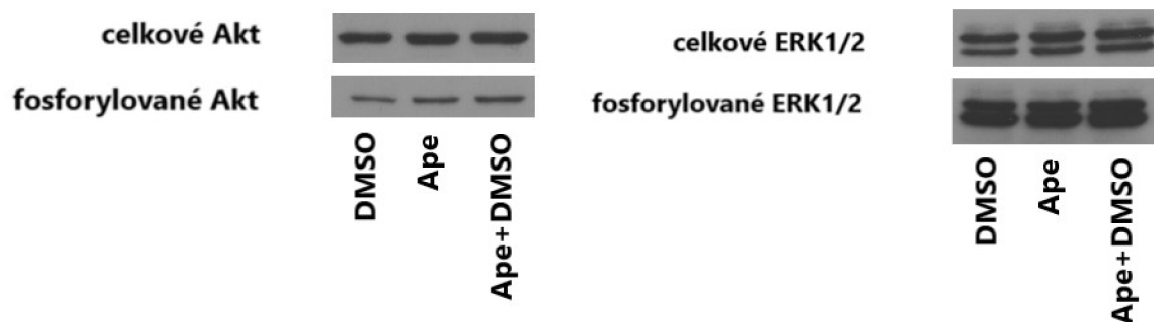
Obr. 36 Vliv DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 (rozpuštěný v DMSO,  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylovaných a celkových kinas Akt a ERK1/2 v závislosti na čase. Vztaheno k DMSO.



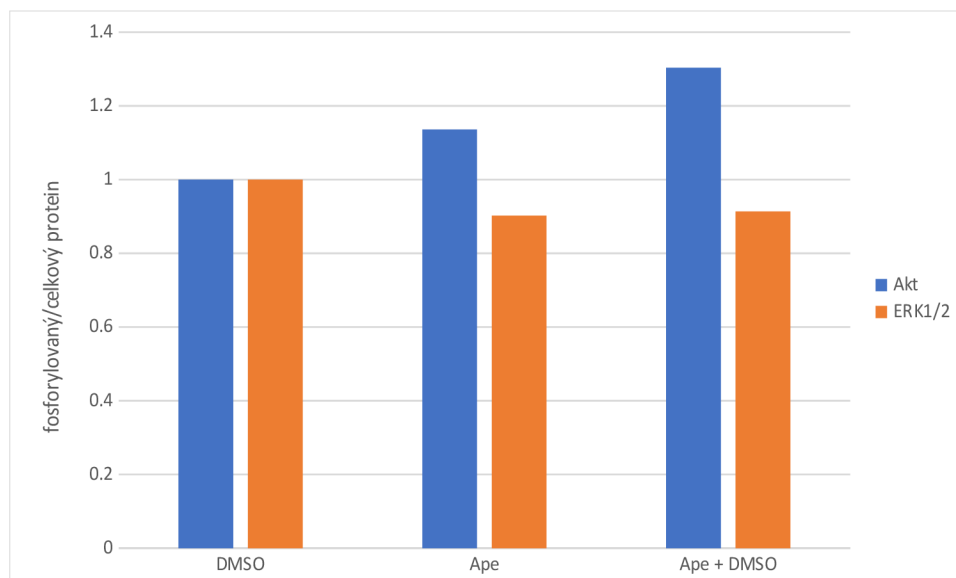
Obr. 37 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt a ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti DMSO, DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 (rozpuštěný ve vodě,  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).



Obr. 38 Vliv DHS ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 (rozpuštěný ve vodě,  $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na poměr fosforylovaných a celkových kinas Akt a ERK1/2 v závislosti na čase. Vztaženo k DMSO.



Obr. 39 Reprezentativní blot stanovení celkové (nahore) a fosforylované (dole) formy Akt a ERK1/2 v závislosti na čase v přítomnosti vybraných DMSO, apelinu-13 (rozpuštěný ve vodě,  $400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 v kombinaci s DMSO (rozpuštěný ve vodě,  $400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).



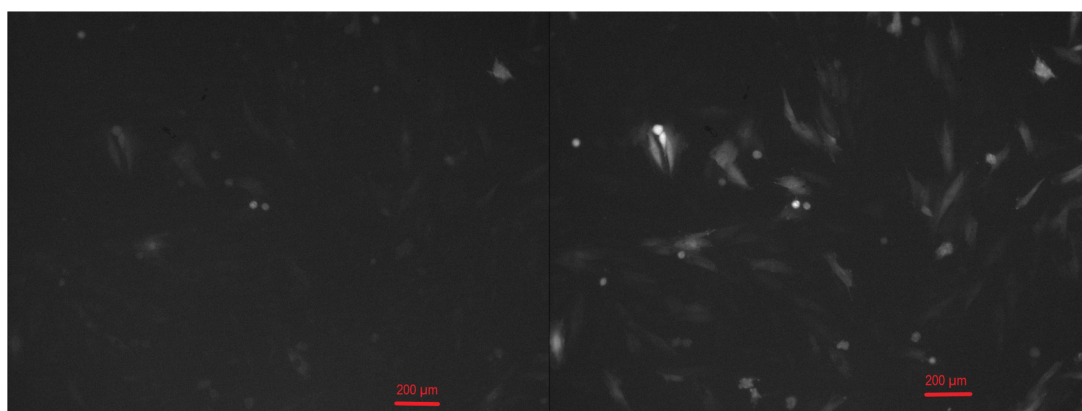
Obr. 40 Vliv apelinu-13 (rozpuštěný ve vodě, 400 nmol·l<sup>-1</sup>) a apelinu-13 (rozpuštěný ve vodě, 400 nmol·l<sup>-1</sup>) v kombinaci s DMSO na poměr fosforylovaných a celkových kinas Akt a ERK1/2 v závislosti na čase. Vztaženo k DMSO.

#### 4.6 Vliv apelinu-13, DHS a methylových derivátů na hladinu vápníku v buňkách H9c2

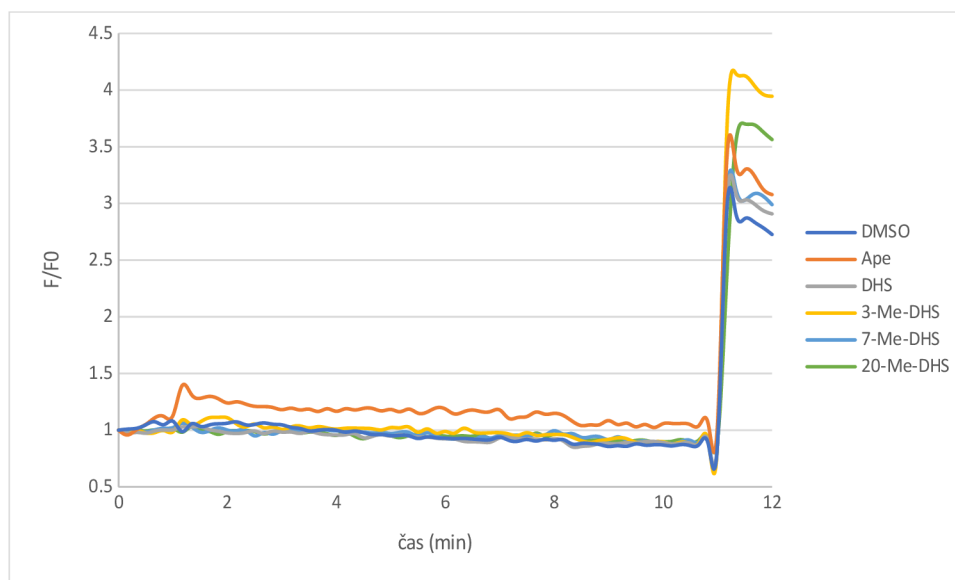
V rámci stanovení toku vápníku v buňkách H9c2 byl porovnáván vliv několika látek – DHS (2 μmol·l<sup>-1</sup>), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě (200 nmol·l<sup>-1</sup>) a vybraných methylovaných derivátů (3-Me-DHS; 7-Me-DHS; 20-Me-DHS, 3,7-Me-DHS; 3,20-Me-DHS; 7,20-Me-DHS; 2 μmol·l<sup>-1</sup>). Jako pozitivní kontrola sloužil roztok ionomycinu (1 μmol·l<sup>-1</sup>), který byl na buňky aplikován minutu před koncem měření. Ionomycin, jež se řadí do skupiny ionoforů, byl použit díky své vlastnosti přenášet Ca<sup>2+</sup> přes buněčnou membránu a zvyšovat tak hladinu intracelulárních Ca<sup>2+</sup>. Jako negativní kontrola sloužil poté 0,1% DMSO, který by neměl mít žádný vliv na hladinu intracelulárních Ca<sup>2+</sup>.

Nejdříve byl optimalizován protokol k transfekci, kdy byly testovány různé koncentrace lipofectaminu<sup>®</sup> 3000 – 0,6; 0,3 a 0,15 μl na jamku v 96-jamkové destičce. Úspěšnost transfekce byla otestována přidáním pozitivní kontroly – ionomycinu. Po přidání ionomycinu byl u buněk pozorován prudký nárůst fluorescence, který byl způsoben zvýšenou hladinou intracelulárních Ca<sup>2+</sup>. Jako nejvhodnější byla zvolena varianta 0,6 μl lipofectaminu<sup>®</sup> 3000 na jamku (Obr. 41).

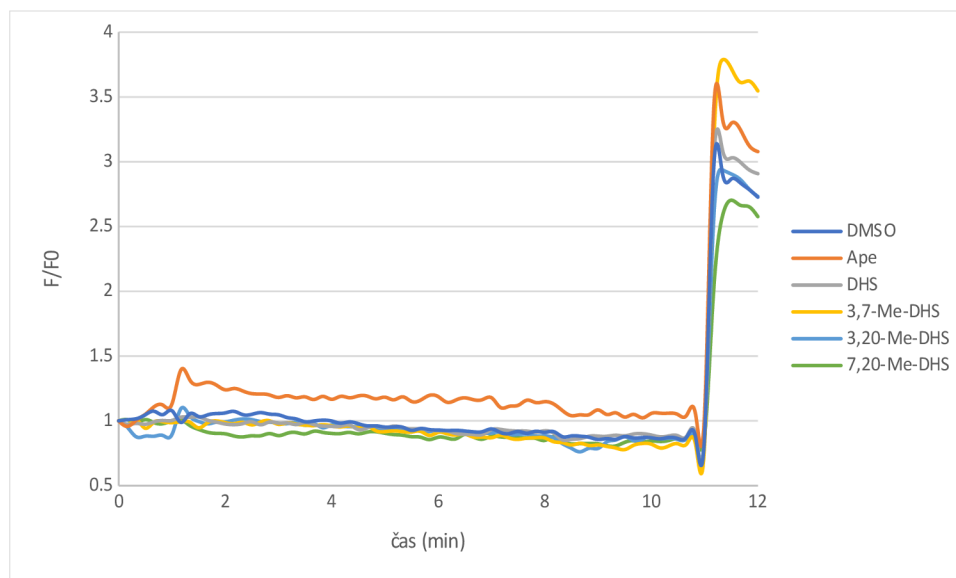
Po úspěšné optimalizaci podmínek transfekce byl otestován vliv DMSO, DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a jednotlivých methylovaných derivátů DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Daný roztok látky byl na buňky aplikován po minutě měření a v 11. minutě byly poté buňky ošetřeny roztokem ionomycinu o finální koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 42, 43). Z grafů je patrné, že jedinou látkou, která zvyšovala fluorescence, a tedy i hladinu intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$ , byl apelin-13. U DHS ani žádného derivátu nebyl po aplikaci na buňky pozorován významný nárůst fluorescence.



Obr. 41 Reprezentativní fotografie buněčné linie H9c2 před přidavkem ionomycinu (vlevo) a po přidavku ionomycinu (vpravo).



Obr. 42 Grafické znázornění vlivu 0,1% DMSO ( $n=23$ ), DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=26$ ), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=20$ ), 3-Me-DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=25$ ), 7-Me-DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=27$ ) a 20-Me-DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=23$ ) na tok vápníku u buněčné linie H9c2, n, počet buněk v experimentu.



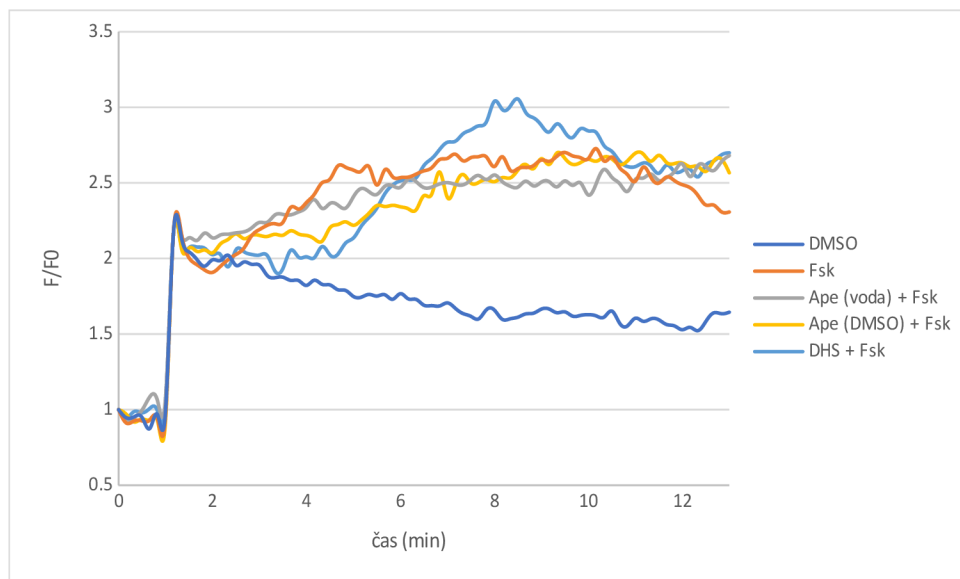
Obr. 43 Grafické znázornění vlivu 0,1% DMSO (n=23), DHS (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=26), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě (200  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=20), 3,7-Me-DHS (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=31), 3,20-Me-DHS (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=24) a 7,20-Me-DHS (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=34) na tok vápníku u buněčné linie H9c2, n, počet buněk v experimentu.

#### 4.7 Vliv apelinu-13 a DHS na hladinu cAMP v buněčné linii H9c2

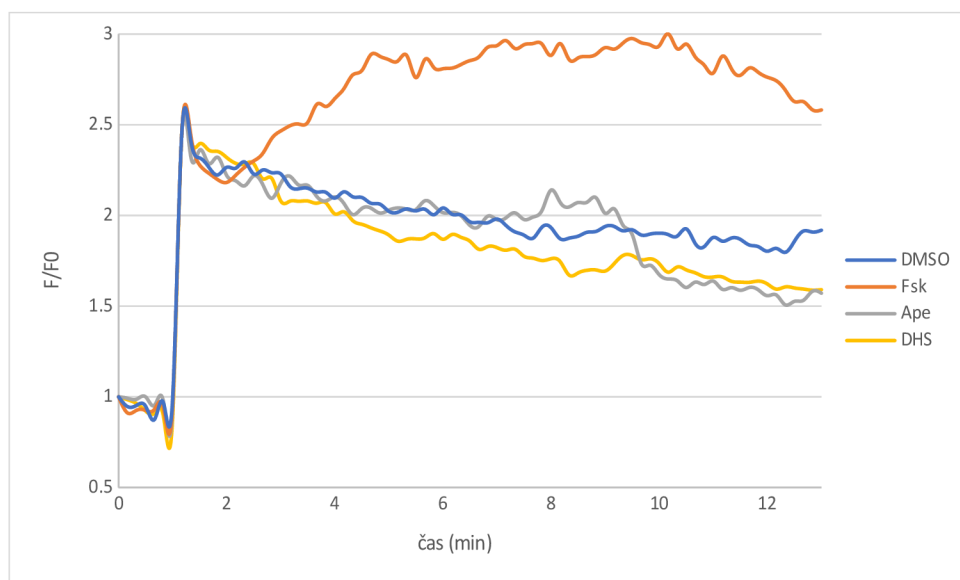
Dalším krokem bylo ověření inhibice adenylylcyklasy po navázání testovaných látek na APJ. K tomuto účelu byla využita fluorescenční sonda G-Flamp2, díky níž je možno detekovat hladinu cAMP v buňkách v reálném čase. Jako pozitivní kontrola sloužil roztok forskolinu (Fsk) o koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , který má schopnost podporovat produkci cAMP v buňkách. Jako negativní kontrola sloužil opět DMSO, který by neměl mít žádný vliv na hladinu cAMP v buňkách.

Nejdříve byl otestován vliv DHS (2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinu-13 rozpuštěného v DMSO (200  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 rozpuštěného ve vodě (200  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) inhibovat účinky Fsk. Testované látky byly na buňky nanášeny 1 min od začátku měření a samotné měření trvalo celkem 13 minut. Z obr. 44 je patrné, že apelin-13 (rozpuštěný v DMSO i ve vodě) má schopnost zmírňovat účinky Fsk. Tato skutečnost tedy potvrzuje, že apelin-13 skutečně interaguje s APJ a následně dochází k inhibici adenylylcyklasy. Naopak DHS tuto schopnost nemá a z Obr. 44 je patrné, že DHS neinhibuje účinky Fsk, tak jako apelin-13. DHS pouze oddaluje nástup účinků Fsk. Zatímco přítomnost samotného Fsk postupně zvyšovala hladinu cAMP již od 2. minuty, DHS oddaluje tento efekt až o dvě minuty.

Byl rovněž testován i vliv samotného DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), apelinu-13 rozpuštěného v DMSO ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a apelinu-13 rozpuštěného ve vodě ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). U těchto látek nebyl pozorován signifikantní vliv na míru fluorescence po aplikaci testovaných látek na buňky (Obr. 45).



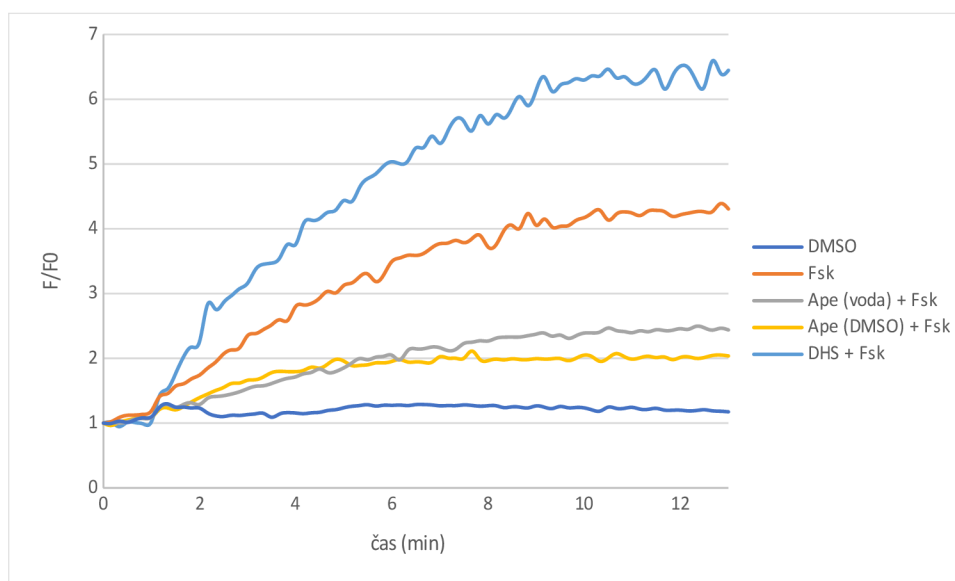
Obr. 44 Grafické znázornění vlivu DMSO ( $n=7$ ), forskolinu ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě s forskolinem ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ), apelinu-13 rozpuštěného v DMSO s forskolinem ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ) a DHS s forskolinem ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=10$ ) na hladinu cAMP u buněčné linie H9c2, n, počet buněk v experimentu.



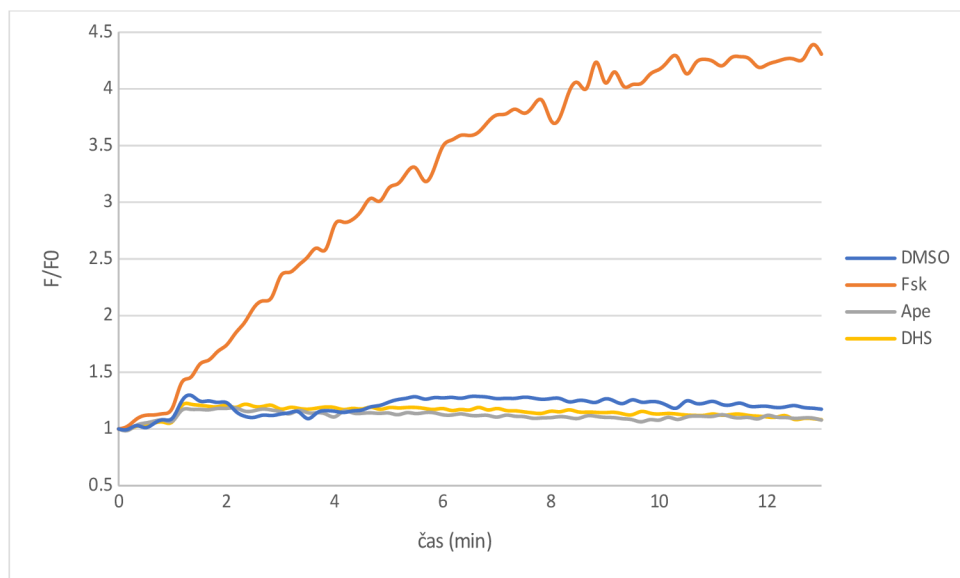
Obr. 45 Grafické znázornění vlivu DMSO ( $n=7$ ), forskolinu ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ) a DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=13$ ) na hladinu cAMP u buněčné linie H9c2, n, počet buněk v experimentu.

#### 4.8 Vliv apelinu-13 a DHS na hladinu cAMP v buněčné linii HEK293

Schopnost inhibovat adenylylcyklasu byla otestována i na buněčné linii HEK293, jež stejně jako buněčná linie H9c2 exprimuje APJ. Byla tak eliminována možnost abnormálního chování buněk H9c2. Průběh experimentu byl stejný jako v případě použití buněčné linie H9c2 (kapitola 4.7). Stejně jako u buněk H9c2 byla pozorována schopnost apelinu-13 inhibovat účinky Fsk (Obr. 46). U DHS se projevila opačná vlastnost, a to podpora produkce cAMP (Obr. 46). Stejný trend jako u buněčné linie H9c2 byl pozorován i u testovaných látek bez Fsk, kdy nedocházelo po aplikaci testované látky na buňky k žádným změnám v míře fluorescence vlivem těchto látek (Obr. 47).



Obr. 46 Grafické znázornění vlivu DMSO ( $n=12$ ), forskolinu ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=15$ ), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě s forskolinem ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=20$ ), apelinu-13 rozpuštěného v DMSO s forskolinem ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=18$ ) a DHS s forskolinem ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $n=11$ ) na hladinu cAMP u buněčné linie Hek293,  $n$ , počet buněk v experimentu.



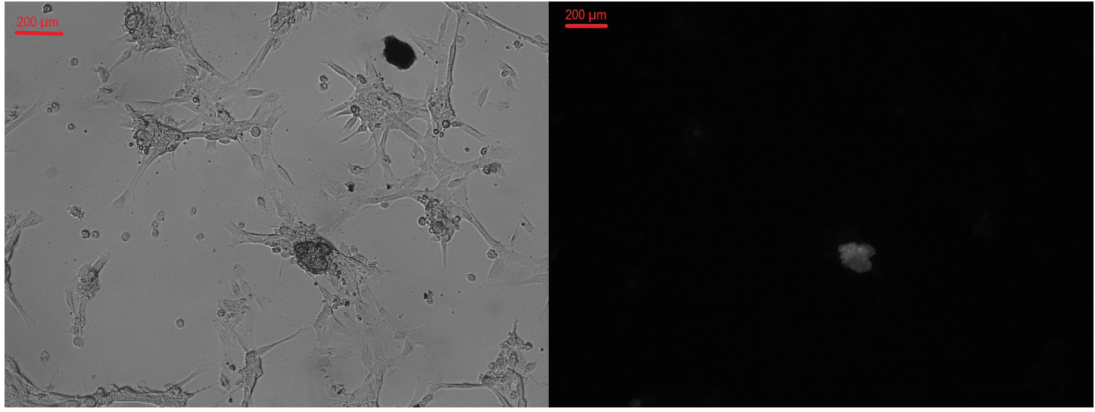
Obr. 47 Grafické znázornění vlivu DMSO (n=12), forskolinu ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=15), apelinu-13 rozpuštěného ve vodě ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=8) a DHS ( $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; n=16) na hladinu cAMP u buněčné linie HEK293, n, počet buněk v experimentu.

#### 4.9 Vliv testovaných látek na produkci NO v buněčné linii H9c2

Pro účely stanovení produkce NO v buněčné linii H9c2 byla využita fluorescenční sonda C-geNOp. Pozitivní kontrolou by byl nitroprusid sodný ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a jako negativní kontrola sloužil opět DMSO.

Nejdříve byly buňky vysety na sklíčka potažená kolagenem. Po ozáření buněk modrým světlem pod fluorescenčním mikroskopem bylo zjištěno, že transfekce proběhla s velmi nízkou účinností (Obr. 48). V rámci optimalizace transfekce byly buňky vysety na sklíčka bez kolagenu. Tento krok opět nevedl k úspěšné transfekci. Dále pak byla provedena transfekce v buněčné suspenzi, kdy byly buňky opět vysety na sklíčka s kolagenem i bez kolagenu. Ani tento přístup nevedl k úspěšné transfekci. Není tedy zřejmé, jestli došlo k poškození plasmidu nebo jen vneseného genu.





Obr. 48 Reprerentativní fotografie buněčné linie H9c2. Vlevo snímek ze světelného mikroskopu, vpravo snímek z fluorescenčního mikroskopu po ozáření vzorku modrým světlem.

## 5 DISKUZE

Ischemická choroba srdeční, jež se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí ve světě, je spojena s ischemicko-reperfuzním poškozením (Kalogeris *et al.*, 2012; WHO, 2021). V současnosti jsou zájmem mnoha studií různé kardioprotektivní metody, které by vedly ke zmírnění následků ischemicko-reperfuzního poškození. Obecně se jedná o dva přístupy, prekondicionování a postkondicionování. V obou případech se jedná o krátké epizody ischemie, které mohou být vyvolány mechanicky nebo farmakologicky (Vinten-Johansen *et al.*, 2007). Cílem kardioprotektivních strategií je například i signální kaskáda RISK, jejímž cílem je inhibice otevírání mPTP (Cohen & Downey, 2015).

V rámci diplomové práce byla poté testována hypotéza, že methylované deriváty DHS mají podobné účinky a mechanismus aktivace komponent signální kaskády RISK jako samotný DHS nebo apelin-13. U samotného DHS, byla již v minulosti pozorována schopnost modulovat rozsah a průběh ischemického poškození srdce (Gabrielová *et al.*, 2019). V předchozí práci bylo rovněž zjištěno, že DHS se podílí na samotné aktivaci kinas Akt a ERK1/2 (Opletalová, 2021). Cílem diplomové práce bylo tedy identifikovat strukturní motivy DHS, které by se mohly podílet na aktivaci obou kinas.

Pilotním experimentem bylo stanovení optimální koncentrace methylovaných derivátů DHS. Za tímto účelem byly provedeny dva testy. Jednalo se o MTT test a NR test. MTT test využívá principu přeměny žlutého MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový formazanový derivát pomocí mitochondriálních dehydrogenas v metabolicky aktivních buňkách (Mosmann, 1983). NR test je založen na schopnosti živých buněk inkorporovat neutrální červeně do lysozomů (Reader *et al.*, 1989). Absorbance vzniklých produktů byla poté v obou případech měřena při 540 nm. Z testované koncentrační řady o rozsahu 0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla jako nejvhodnější zvolena koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V předchozích studiích, zaměřujících se na účinky samotného DHS, byla využívána koncentrace 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Gabrielová *et al.*, 2015a; Opletalová, 2021). Takto vysoká koncentrace nemohla být v případě diplomové práce využívána, jelikož derivát 7,20-Me-DHS vykazoval při této koncentraci statisticky významné toxické účinky na buňky. Tím vznikl problém porovnání účinku derivátů versus DHS a byl proveden kontrolní experiment s koncentrací 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  DHS. Tento, ani následný experiment s vyšší koncentrací

však účinek DHS nepotvrdil a až do dokončení diplomové práce se nepodařilo rozklíčovat, proč tomu tak je.

Apelinový receptor je receptor spřažený s G-proteinem, který je ve velké míře exprimován v centrálním nervovém systému nebo kardiovaskulární soustavě. Je zapojen do signálních drah spojených s regulací energetického metabolismu, homeostázy tekutin nebo angiogeneze (Chapman *et al.*, 2014). Součástí diplomové práce byl i experiment ověřující hypotézu, že v buňkách H9c2 je APJ přítomen. Na základě získaných výsledků je možno konstatovat, že hladina APJ je v buňkách H9c2 detekovatelná. Stejných výsledků bylo dosaženo i v předchozí práci, kdy byla rovněž využívána buněčná linie H9c2 (Opletalová, 2021). Úroveň přítomnosti APJ nebyla ovlivněna po inkubaci buněk s methylovanými deriváty DHS, protože přítomnost APJ v buňkách zůstala stabilní po dobu 24 hodin.

Jedním z cílů diplomové práce bylo ověřit vliv methylovaných derivátů DHS na míru fosforylace kinas Akt a ERK1/2. Obě kinasy jsou součástí signální kaskády RISK, jejíž aktivace vede ke zmírnění následků ischemicko-reperfuzního poškození (Cohen & Downey, 2015). Kinasy Akt a ERK1/2 jsou rovněž součástí signální dráhy, kterou spouští apelin po navázání na APJ (Chapman *et al.*, 2014). V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že methylované deriváty DHS mají vliv na fosforylaci kinas. Z výsledků uvedených výše vyplývá, že deriváty zvyšují míru fosforylace kinas po určitém čase a následně je patrný úbytek fosforylované formy. Čas, kdy fosforylace dosahuje maxima, ovšem nebylo možno přesně určit z důvodu variability získaných dat u každého opakování. Lze tedy spekulovat o tom, že maximum fosforylace je dosaženo v čase, který může souviset s momentálním stavem testované populace buněk (stáří, buněčný cyklus apod.). Podobně nebylo možno určit ani míru navýšení fosforylace, což může souviset se skutečností, že pro jednotlivá opakování byly použity buňky po různém počtu pasáží. Ve studii Witek *et al.*, 2016 bylo zjištěno, že u buněčné linie H9c2 dochází v rámci stárnutí (vyšší množství pasáží) ke zvýšení citlivosti buněk na stresové podmínky a zároveň ke změnám v morfologii buněk. Tyto efekty mají poté za následek větší rozdíly v opakovatelnosti experimentů u různě starých buněk (Witek *et al.*, 2016).

I přesto, že nebylo možno určit čas, kdy jednotlivé deriváty DHS způsobují nejsilnější fosforylaci kinas Akt a ERK1/2, je možné konstatovat, že deriváty aktivují kinasy později než samotný DHS nebo apelin-13. V práci Opletalové, 2021 bylo zjištěno, že DHS i apelin-13 mají nejsilnější efekt v 5. minutě. U derivátů je poté možno

pozorovat nejvyšší aktivitu ve většině případů až okolo 10.-15. minuty. Aby bylo možné porovnat účinky derivátů s účinky samotného DHS a apelinu-13, byl proveden obdobný experiment jako v práci Opletalové, 2021. Účinky DHS i apelinu-13 byly tedy stanovovány po pětiminutové inkubaci. Pozorovaný účinek DHS i apelinu-13 byl překvapivě nízký, což je v rozporu s daty publikovanými právě v práci Opletalové, 2021. Příčinou by mohlo být opět rozdílné stáří použitých buněk. V případě apelinu-13 byl připraven i nový zásobní roztok, aby se předešlo možné degradaci peptidu. Rovněž byla k rozpouštění použita deionizovaná voda namísto DMSO. Ani tento postup nepřinesl výsledky srovnatelné s výsledky publikovanými v práci Opletalové, 2021. Jednou z možností, jak předejít těmto komplikacím by bylo skladovat zásobní roztok při -80 °C (skladování při -20 °C zaručí stabilitu peptidu jen po dobu 1-2 týdnů). Dále by bylo vhodné rozpustit apelin-13 v tzv. fyziologickém roztoku, případně PBS s ohledem na pH a iontovou sílu.

Další komplikací spojenou s ověřením vlivu methylovaných derivátů na míru fosforylace kinas byl i efekt DMSO, který taktéž navyšoval fosforylaci kinas. Bohužel v dostupné literatuře nejsou v současnosti žádná data o vlivu DMSO na fosforylaci kinas Akt nebo ERK1/2 u buněčné linie H9c2. U primárních myších fibroblastů bylo zjištěno, že DMSO má vliv na fosforylaci kinasy Akt. V uvedené studii byla ovšem detekována fosforylace Thr308, nikoliv Ser473 jako v této diplomové práci (Guo *et al.*, 2020). Sám o sobě je účinek DMSO zajímavý z pohledu podobných studií, které využívají DMSO jako rozpouštědlo testovaných látek. Také není zřejmé, jestli by podobný účinek byl zaznamenán i v jiných buněčných liniích či primárních buňkách. Je však známo, že organická rozpouštědla a jmenovitě DMSO ovlivňují úroveň exprese a případně aktivitu cytochromů P450 (CYP), které jsou odpovědné za I. fázi metabolismu xenobiotik (Nishimura *et al.*, 2003). V této souvislosti je nejčastěji zmiňován CYP 2E1 (Nishimura *et al.*, 1999).

Dalším klíčovým experimentem bylo stanovení vlivu methylovaných derivátů DHS a dalších látek (DHS a apelin-13) na hladinu  $Ca^{2+}$  v buňkách H9c2. Za tímto účelem byla využita fluorescenční sonda GCaMP7f, jež je tvořena třemi hlavními komponentami - GFP (zelený fluorescentní protein), kalmodulinem a peptidem vážícím kalmodulin (CBP). Fluorescence vyvolaná zvýšenou hladinou  $Ca^{2+}$  je spjata s navázáním  $Ca^{2+}$  na kalmodulin, u něhož dochází ke změnám v konformaci a následně kalmodulin interaguje jak s CBP, tak GFP. Takováto interakce je poté příčinou aktivace GFP chromoforu a vyvolává fluorescenci. Transfekované buňky H9c2 byly

poté pozorovány v modrém světle (Dana *et al.*, 2019). Ze získaných výsledků je patrné, že jedinou látkou, která navyšovala hladinu intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  byl apelin-13. O apelinu je již známo, že se jedná o látku s pozitivním inotropním efektem a má tudíž schopnost navyšovat hladinu intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang *et al.*, 2008).

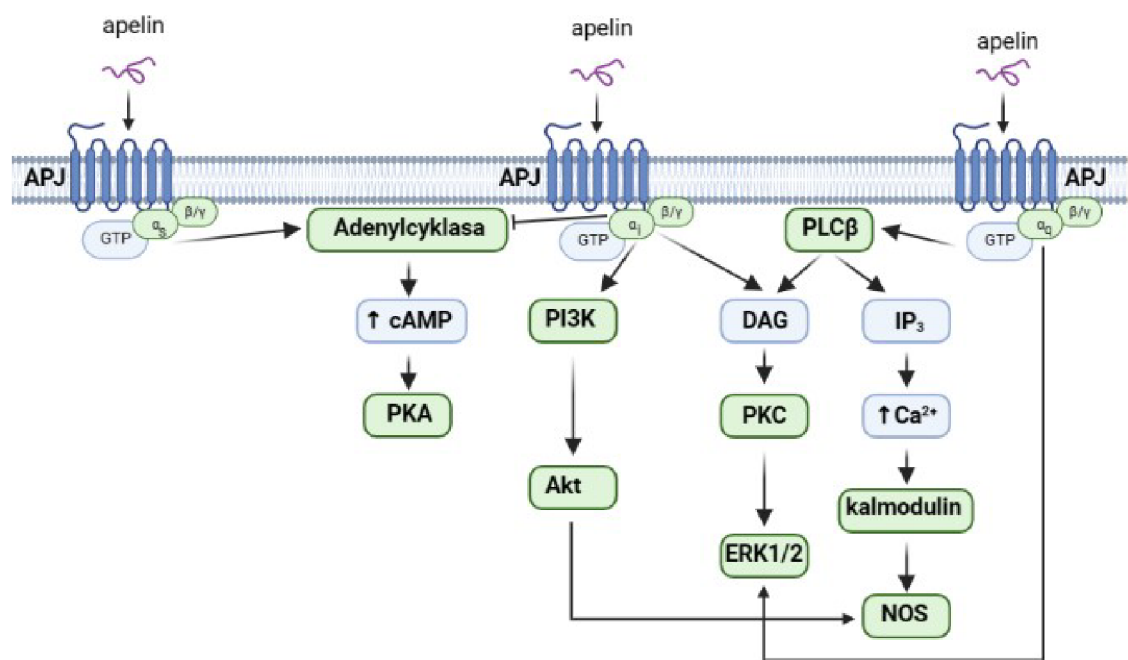
DHS ani methylované deriváty DHS neovlivňovaly hladinu intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$ . Tyto výsledky jsou v rozporu s výsledky publikovanými ve studiích Zholobenko *et al.*, 2017 a Opletalová, 2021. V práci Opletalové, 2021 byl pozorován nárůst fluorescence u buněk po přidání DHS o koncentraci  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V rámci této studie byly ovšem používány buněčné linie CEPIA a GECO, které byly modifikovány tak, aby byla fluorescenční sonda exprimována do mitochondrií. V mém případě nebyla exprese fluorescenční sondy spojena s konkrétní buněčnou organelou, ale fluorescence byla pozorovatelná v rámci celé buňky. V případě studie Zholobenko *et al.*, 2017 bylo zjištěno, že DHS neovlivňuje mitochondriální koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , ale je zodpovědný za influx extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$ . Získané výsledky rovněž nekorelují s poznatky o pozitivním inotropním efektu DHS (Gabrielová *et al.*, 2015b).

Navázání signální molekuly na APJ může aktivovat různé podjednotky G proteinu, jedná se o  $\text{G}\alpha_i$ ,  $\text{G}\alpha_q$  a  $\text{G}\alpha_s$  (Obr. 49). V případě aktivace  $\text{G}\alpha_q$  dochází k fosforylaci  $\beta$ -podjednotky fosfolipasy, která hydrolyzuje  $\text{PIP}_2$  na DAG a  $\text{IP}_3$ .  $\text{IP}_3$  se poté podílí na otevření vápenatých kanálků v membráně sarkoplasmatického retikula, uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  a aktivaci NOS. DAG se naopak účastní aktivace PKC a následné fosforylace a aktivace ERK1/2. Druhou možností je aktivace podjednotky  $\text{G}\alpha_i$ . V tomto případě je přes PI3K aktivována kinasa Akt a zároveň dochází k inhibici adenylylcyklasy, a tím k poklesu hladiny cAMP (Chapman *et al.*, 2014). Naopak při aktivaci  $\text{G}\alpha_s$  není adenylylcyklasa inhibována a dochází k produkci cAMP a tím aktivaci ATP:protein fosfotransferasy (protein kinasa A, PKA, EC 2.7.11.1) (Scimia *et al.*, 2012).

Na základě dosavadních výsledků, kdy nebyl pozorován vliv DHS na aktivaci Akt a ERK1/2 kinas ani na tok  $\text{Ca}^{2+}$ , byla otestována teorie, zda DHS opravdu reaguje přes APJ. Za tímto účelem byla stanovována hladina cAMP v buňkách H9c2 a HEK293. Apelin-13 podle očekávání působil proti forskolinu a inhiboval adenylylcyklasu a produkci cAMP. Naopak samotný apelin-13 neměl vliv na hladinu cAMP v buňkách. Pro signální dráhu aktivovanou apelinem-13 je tedy stěžejní právě podjednotka  $\text{G}\alpha_i$ . Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Scimia *et al.*, 2012. U DHS nebyl pozorován stejný efekt jako u apelinu-13. V případě experimentu na buňkách H9c2 byl pozorován pouze efekt oddálení nástupu účinků forskolinu.

V případě buněk HEK293 se tento efekt ovšem neprojevil a DHS spíše podporoval účinky forskolinu. Stejně jako v případě apelinu-13 nedošlo ani vlivem samotného DHS k navýšení hladiny cAMP. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Gabrielová *et al.*, 2015b, kdy byly ovšem porovnávány účinky DHS s účinky noradrenalinu. Ze získaných dat je tak možné konstatovat, že DHS pravděpodobně neaktivuje  $G\alpha_s$  podjednotku APJ.

Posledním provedeným experimentem byla detekce NO v buňkách H9c2 v přítomnosti testovaných látek. NO byl detekován kvůli své stěžejní roli v rámci kardioprotekce, kdy se NO podílí na otevírání  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  a následné aktivaci PKC. Role DHS v rámci produkce NO byla již objasněna ve studii Gabrielová *et al.*, 2019. Bylo zjištěno, že DHS je zodpovědný za zvýšenou fosforylaci eNOS. Pro účely stanovení produkce NO v rámci diplomové práce byla využita fluorescenční sonda C-geNOp. Tato sonda je značena CFP (cyan fluorescent protein) a jeví se jako vhodnější než sonda značená GFP. Sonda značená CFP totiž vykazuje až dvojnásobnou citlivost oproti sondě značené GFP (Eroglu *et al.*, 2016). Bohužel ani po snaze optimalizovat pracovní postup nebylo dosaženo úspěšné transfekce buněk H9c2. Další možným krokem v rámci optimalizace by bylo zakoupení prázdného plasmidu a jeho transfekce do buněk. Takto by bylo zjištěno, zda není použitý transfekční postup pro buňky toxický. Dále by bylo vhodné provést sekvenaci používaného plasmidu, aby byla zajištěna neporušenost DNA. Sekvence byla sice provedena po selekci transformovaných buněk, ale k porušení DNA mohlo dojít v průběhu izolace plasmidu. Pokud by byl postup vhodně optimalizován a transfekce by byla úspěšná, bylo by k detekci vhodné využít mikroskop s emisními filtry pro 482/18 nm (Eroglu *et al.*, 2016).



Obr. 49 Schematický přehled signálních drah spojených s aktivací APJ (upraveno podle Chapman *et al.*, 2014 v programu BioRender.com).

## 7 ZÁVĚR

V teoretické části předložené diplomové práce byla vypracována aktuální literární rešerše se zaměřením na ischemickou chorobu srdeční, ischemicko-reperfuční poškození a jeho podrobnější průběh na molekulární úrovni. Dále byly popsány jednotlivé kardioprotektivní strategie se zaměřením na prekonkondicionování, tedy především se jednalo o popis signální kaskády RISK. Součástí teoretické části je i charakterizace 2,3-dehydrosilybinu a jeho vlivu na procesy vedoucí ke zmírnění následků ischemicko-reperfučního poškození.

Experimentální část diplomové práce měla za cíl především otestovat hypotézu, že methylované deriváty DHS mají podobné účinky a mechanismus aktivace komponent signální kaskády RISK jako samotný DHS nebo apelin-13.

Nejdříve byla pomocí testů MTT a NR stanovována cytotoxicita methylovaných derivátů v koncentračním rozmezí 0,1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že nejvíce toxický je pro buňky derivát 7,20-Me-DHS, a to především při koncentraci 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako nejvhodnější byla poté zvolena koncentrace 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , která byla využívána ve všech dalších experimentech. Dále bylo ověřeno, že testované deriváty nemají vliv na přítomnost apelinového receptoru v buňkách H9c2 a jeho přítomnost zůstává stabilní po dobu 24 hodin.

Hlavním cílem diplomové práce bylo poté otestovat vliv methylovaných derivátů DHS na aktivitu kinas Akt a ERK1/2. Bylo zjištěno, že methylované deriváty aktivují dané kinasy. Ovšem kvůli výrazné variabilitě projevující se u buněčné linie H9c2, která je závislá na stáří buněk (počtu pasáží), nebylo možno určit přesný čas, kdy dochází k aktivaci kinas. Lze tedy spekulovat o tom, že mnou stanovované parametry souvisejí s momentálním stavem testované populace buněk. I přesto, že nebylo možno určit čas, kdy jednotlivé deriváty DHS aktivují kinasy Akt a ERK1/2, je možné konstatovat, že k aktivaci kinas dochází vlivem derivátů později, než je tomu v případě samotného DHS nebo apelinu-13. V předchozí práci bylo zjištěno, že DHS i apelin-13 mají nejsilnější efekt již v 5. minutě (Opletalová, 2021). V rámci ověřovacího experimentu ovšem tyto výsledky nebyly pozorovány. Bylo rovněž zjištěno, že samotná kontrola v podobě DMSO má vliv na fosforylaci kinas a DMSO tedy maskoval účinky samotných derivátů.

Dalším krokem bylo stanovení vlivu testovaných látek na hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách H9c2. U DHS ani jeho methylovaných derivátů nebyly pozorovány žádné účinky



na hladinu intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$ . Získané výsledky ovšem neodpovídají dříve publikovaným výsledkům o vlivu DHS na influx extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  a o pozitivním inotropním efektu DHS (Gabrielové *et al.*, 2015b; Zholobenko *et al.*, 2017). Právě díky odlišnostem ve výsledcích, kdy nebyl pozorován vliv DHS na aktivaci Akt a ERK1/2 kinas ani na tok  $\text{Ca}^{2+}$ , byla otestována teorie, zda DHS opravdu reaguje přes APJ. Za tímto účelem byla stanovována hladina cAMP v buňkách H9c2 a HEK293. Bylo ověřeno, že pro apelin-13 je stěžejní podjednotka  $\text{G}\alpha_i$ , jejíž aktivace vede následně i k aktivaci kinas Akt a ERK1/2. V případě DHS byly pozorovány odlišné účinky a získaná data pouze naznačují, že DHS pravděpodobně neaktivuje  $\text{G}\alpha_s$  podjednotku apelinového receptoru.

V neposlední řadě bylo provedeno několik pokusů o optimalizaci metody pro stanovení produkce NO. V rámci optimalizace transfekce byly buňky vysety na sklíčka potažená kolagenem i bez kolagenu a dále byla ještě provedena transfekce v suspenzi. Optimalizace ovšem nebyla úspěšná a v budoucnu bude potřeba provést další změny v transfekčním postupu.

Získané výsledky poukazují na určité podobnosti v signální dráze methylovaných derivátů a samotného DHS. Dále bylo ověřeno, že signální dráhy DHS a apelinu jsou i přes určité podobnosti odlišné, a to především v aktivaci  $\text{G}\alpha$  podjednotek apelinového receptoru. Toto téma je ještě značně neprozkoumané a bylo by potřeba provést další experimenty zabývající se vlivem testovaných látek na další prvky signální kaskády RISK nebo i jiných signálních drah spojených s kardioprotekcí.

## 7 LITERATURA

- Abenavoli L., Izzo A.A., Milić N., Cicala C., Santini A. & Capasso R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy research*, 32(11), 2202-2213. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>
- Armstrong S.C. (1994). Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 61(3), 427-436. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.09.031>
- Baines C.P., Goto M. & Downey J.M. (1997). Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(1), 207-216. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0265>
- Baines C.P., Zhang J., Wang G.W., Zheng Y.T., Xiu J.X., Cardwell E.M., Bolli R. & Ping P. (2002). Mitochondrial PKC $\epsilon$  and MAPK form signaling modules in the murine heart. *Circulation research*, 90(4), 390-397. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000012702.90501.8D>
- Bell R.M. & Burns D.J. (1991). Lipid activation of protein-kinase-C. *Journal of biological chemistry*, 266(8), 4661-4664. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)67698-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)67698-2)
- Bell R.M. & Yellon D.M. (2003). Atorvastatin, Administered at the Onset of Reperfusion, and Independent of Lipid Lowering, Protects the Myocardium by Up-Regulating a Pro-Survival Pathway. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(3), 508-515. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)02816-4](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)02816-4)
- Boengler K., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G. & Schulz (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), 771-785. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0124-1>
- Braasch W., Gudbjarnason S., Puri P.S., Ravens K.G. & Bing R.J. (1968). Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circulation research*, 23(3), 429-438. <https://doi.org/10.1161/01.RES.23.3.429>
- Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-Usmar K., Eiserich J.P., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M. & Anderson P.G. (2000). Concentration-dependent Effects of Nitric Oxide on Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome c Release. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20474-20479. <https://doi.org/10.1074/jbc.m001077200>
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J. & Greenberg M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857-868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Cantley L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657. <https://doi.org/10.1126/science.296.5573.1655>
- Chapman N.A., Dupré D.J. & Rainey J.K. (2014). The apelin receptor: Physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochemistry and Cell Biology*, 92(6), 431-440. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0072>
- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. & Reed J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392), 1318-1321. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1318>
- Cohen M.V., Liu Y., Liu G.S., Wang P., Weinbrenner C., Cordis G.A., Das D.K. & Downey J.M. (1996). Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation*, 94(7), 1713-1718. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.7.1713>
- Cohen M.V. & Downey J.M. (2015). Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. *British Journal of Pharmacology*, 172(8), 1913-1932. <https://doi.org/10.1111/bph.12903>
- Costa A.D.T., Garlid K.D., West I.C., Lincoln T.M., Downey J.M., Cohen M.V. & Critz S.D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research*, 97(4), 329-336. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000178451.08719.5b>

- Currin R.T., Gores G.J., Thurman R.G., Lemasters J.J. (1991). Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *The FASEB Journal*, 5(2), 207-210. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.2.2004664>
- Dana H., Sun Y., Mohar B., Hulse B.K., Kerlin A.M., Hasseman J.P., Tsegaye G., Tsang A., Wong A., Patel R., Macklin J.J., Chen Y., Konnerth A., Jayaraman V., Looger L.L., Schreiter E.R., Svoboda K. & Kim D.S. (2019). High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nature Methods*, 16(7), 649-657. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0435-6>
- Danese E. & Montagnana M. (2016). An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine*, 4(10), 194. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.05.19>
- Das M. & Das D.K. (2008). Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*, 60(4), 199-203. <https://doi.org/10.1002/iub.31>
- Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. & Greenberg M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5)
- de Jong J.W., de Jonge R., Keijzer E. & Bradamante S. (2000). The role of adenosine in preconditioning. *Pharmacology & Therapeutics*, 87(2-3), 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(00\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00044-9)
- de Jonge R., Out M., Maas W.J. & de Jong J.W. (1999). Adenosine, carbohydrates, and ischemic preconditioning (1. vydání). Erasmus University Rotterdam.
- DeFily D.V. & Chillian W.M. (1993). Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Heart and circulatory physiology*, 265(2), H700-H706. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.2.H700>
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Herman C., Busse R. & Zeiher A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605. <https://www.nature.com/articles/21224>
- Dong S., Teng Z., Lu F., Zhao Y., Li H., Ren H., Chen H., Pan Z., Lv Y., Yang B., Tian Y., Xu C. & Zhang W. (2010). Post-conditioning protects cardiomyocytes from apoptosis via PKC $\epsilon$ -interacting with calcium-sensing receptors to inhibit endo(sarco)plasmic reticulum-mitochondria crosstalk. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 341(1-2), 195-206. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0450-5>
- Dorta D.J., Pigoso A.A., Mingatto F.E., Rodrigues T., Pestana C.R., Uyemura S.A., Santos A.C. & Curti C. (2008). Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytotherapy research*, 22(9), 1213-1219. <https://doi.org/10.1002/ptr.2441>
- Dougherty C., Barucha J., Schofield P.R., Jacobson K.A. & Liang B.T. (1998). Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A<sub>1</sub> or A<sub>3</sub> receptor. *The FASEB journal*, 12(15), 1785-1792. <https://doi.org/10.1096%2Ffasebj.12.15.1785>
- Downey J.M., Davis A.M. & Cohen M.V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart failure reviews*, 12(3-4), 181-188. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9025-2>
- Du K. & Montminy M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *Journal of biological chemistry*, 273(49), P32377-P32379. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32377>
- 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(10623). <https://doi.org/10.1038/ncomms10623>
- Frank A., Bonney M., Bonney S., Weitzel L., Koeppen M. & Eckle T. (2012). Myocardial ischemia reperfusion injury - from basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 16(3), 123-132. <https://doi.org/10.1177/1089253211436350>
- Fryer R.M., Pratt P.F., Hsu A.K. & Gross G.J. (2001). Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection.

- Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), 642-649. <https://jpet.aspetjournals.org/content/296/2/642.short>
- 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), 79-91. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932703>
- Gabrielová E., Zholobenko A.V., Bartošiková L., Nečas J. & Modrianský 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., Bartošiková 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>
- Gandalovičová J. (2002). Ischemická choroba srdeční u žen. *Controversies in Cardiology*, 6, 297-301.
- Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Sedmera P., Příkrylová V., Walterová D. & Křen V. (2004). Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(21), 5677-5687. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.064>
- Goto M., Liu Y., Yang X., Ardell J.L., Cohen M.V. & Downey J.M. (1995). Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circulation research*, 77(3), 611-621. <https://doi.org/10.1161/01.RES.77.3.611>
- Gross E.R., Hsu A.K. & Gross G.J. (2004). Opioid-Induced Cardioprotection Occurs via Glycogen Synthase Kinase  $\beta$  Inhibition During Reperfusion in Intact Rat Hearts. *Circulation research*, 94(7), 960-966. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000122392.33172.09>
- Gross E.R., Hsu A.K. & Gross G.J. (2006). The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 $\beta$ . *American Journal of Physiology*, 291(2), H827-H834. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00003.2006>
- Guarnieri C., Flamigni F. & Caldarera C.M. (1980). Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 12(8), 797-808. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(80\)90081-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(80)90081-4)
- Guo W., Qiu W., Ao X., Li W., He X., Ao L., Hu X., Li Z., Zhu M., Luo D., Xing W. & Xu X. (2020). Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *British Journal of Pharmacology*, 177(14), 3327-3341. <https://doi.org/10.1111/bph.15052>
- Halestrap A.P., Clarke S.J. & Javadov S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular research*, 61(3), 372-385. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00533-9)
- Halestrap A.P. & Pasdois P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1787(11), 1402-1415. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.017>
- Hausenloy D.J., Mocanu M.M. & Yellon D.M. (2004). Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research*, 63(2), 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.011>
- Hausenloy D.J., Tsang A., Mocanu M.M. & Yellon D.M. (2005a). Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Heart and circulatory physiology*, 288(2), H971-H976. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00374.2004>
- Hausenloy D.J., Tsang A. & Yellon D.M. (2005b). The Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway: A Common Target for Both Ischemic Preconditioning and Postconditioning. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(2), 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.03.001>

- Headrick J.P., Gauthier N.S., Berr S.S., Morrison R.R. & Matherne G.P. (1998). Transgenic A1 adenosine receptor overexpression markedly improves myocardial energy state during ischemia-reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(5), 1059-1064. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0672>
- Heusch G., Musiolik J., Gedik N. & Skyschally A. (2011). Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation research*, 109(11), 1302-1308. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255604>
- Hoshida S., Kuzuya T., Fuji H., Yamashita N., Oe H., Hori M., Suzuki K., Taniguchi N. & Tada M. (1993). Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Heart and circulatory physiology*, 264(1), H33-H39. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.1.H33>
- Hradec J. & Býma S. (2007). *Ischemická choroba srdeční* (1. vydání). Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře.
- Hromadová D. (2004). *Kardiovaskulární onemocnění* (1. vydání). Neptun.
- Huseini H.F., Larijani B., Heshmat R., Fakhrzadeh H., Radjabipour B., Toliat T. & Raza M. (2006). The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytotherapy research*, 20(12), 1036-1039. <https://doi.org/10.1002/ptr.1988>
- IKEM: <https://www.ikem.cz/cs/ischemicka-choroba-srdecni-ichs/a-420/> (7. 12. 2022).
- Jaswal J.S., Keung W., Wang W., Ussher J.R. & Lopaschuk G.D. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation — A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing hear. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 1813(7), 1333-1350. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.015>
- Jegorov A. (1996). Flavanolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chemické listy*, 90(11), 859-862.
- Jennings R.B., Sommers H.M., Smyth G.A., Flack H.A. & Linn H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of pathology*, 70(1), 68-78.
- Jennings R.B. (1970). Myocardial ischemia observations, definitions and speculations. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1(4), 345-349.
- Jennings R.B., Reimer K.A., Hill M.L. & Mayer S.E. (1981). Total ischemia in dog hearts, in vitro: 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circulation research*, 49(4), 892-900. <https://doi.org/10.1161/01.res.49.4.892>
- Jennings R.B., Schaper J., Hill M.L., Steenbergen C. & Reimer K.A. (1985). Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circulation research*, 56(2), 262-278. <https://doi.org/10.1161/01.RES.56.2.262>
- Jennings R.B. & Steenbergen C. (1985). Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annual review of physiology*, 47, 727-749. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.47.030185.003455>
- Jennings R.B., Murry C.E., Steenbergen C. & Reimer K.A. (1990). Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*, 82(3), 2-12.
- Jennings R.B. & Reimer K.A. (1991). The cell biology of acute myocardial-ischemia. *Annual review of medicine*, 42, 225-246. <https://doi.org/10.1146/annurev.mc.42.020191.001301>
- Jonassen A.K., Sack M.N., Mjøs O.D. & Yellon D.M. (2001). Myocardial protection by Insulin at Reperfusion Requires Early Administration and Is Mediated via Akt and p70s6 Kinase Cell-Survival Signaling. *Circulation research*, 89(12), 1191-1198. <https://doi.org/10.1161/hh2401.101385>
- Juhászová M., Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., Ziman B.D., Wang S., Ytrehus K., Antos C.L., Olson E.N. & Sollott S.J. (2004). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The journal of clinical investigation*, 113(11), 1535-1549. <https://doi.org/10.1172/jci19906>

- Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M. & Korthuis R.J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M. & Korthuis R.J. (2017). Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology*, 6(7), 113-170. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160006>.
- Katiyar S.K., Korman N.J., Mukhtar H. & Agarwal R. (1997). Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(8), 556-565. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.8.556>
- Kim A.H., Khursigara G., Sun X., Franke T.F. & Chao M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 21(3), 893-901. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.893-901.2001>
- Kloner R.A., Bolli R., Marban E., Reinlib L. & Braunwald E. (1998). Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. *Circulation*, 97(18), 1848-1867. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.18.1848>
- Kloner R.A. & Jennings R.B. (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications (Part 1). *Circulation*, 104(24), 2981-2989. <https://doi.org/10.1161/hc5001.100039>
- Knapp M. (2011). Cardioprotective role of sphingosine-1-phosphate. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(6), 601-607. [https://www.researchgate.net/profile/Malgorzata-Knapp/publication/221814772\\_Cardioprotective\\_role\\_of\\_sphingosine-1-phosphate/links/5440effa0cf2ebb036905b9e/Cardioprotective-role-of-sphingosine-1-phosphate.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Malgorzata-Knapp/publication/221814772_Cardioprotective_role_of_sphingosine-1-phosphate/links/5440effa0cf2ebb036905b9e/Cardioprotective-role-of-sphingosine-1-phosphate.pdf)
- Kohama T., Olivera A., Edsall L., Nagiec M.M., Dickson R. & Spiegel S. (1998). Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23722-23728. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23722>
- Korichneva I., Hoyos B., Chua R., Levi E. & Hammerling U. (2002). Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *Journal of biological chemistry*, 277(46), P44327-44331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205634200>
- Krolkowski J.G., Weihrauch D., Bienengraeber M., Kersten J.R., Warltier D.C. & Pagel P.S. (2006). Role of ERK1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Canadian journal of anaesthesia*, 53(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/bf03021824>
- Křen V. & Walterová D. (2005). Silybin and silymarin – New effects and applications. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the Palacky University*, 149(1), 29–41. <https://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2005/01/02.pdf>
- Kumar T., Larokar Y., Iyer S., Kumar A. & Tripathi D.K. (2011). Phytochemistry and Pharmacological activities of *Silybum marianum*: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 1(3), 124-133.
- Kurdi M. & Booz G.W. (2007). Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 50(2), 126-141. <https://doi.org/10.1097/fjc.0b013e318068dd49>
- Kuroki M. & O'Flaherty J.T. (1999). Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-dependent and ERK-independent pathways target STAT3 on serine-727 in human neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines. *Biochemical journal*, 341(3), 691-696. <https://doi.org/10.1042/bj3410691>
- Lacerda L., Somers S., Opie L.H. & Lecour S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovascular research*, 84(2), 201-208. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp274>
- Lawlor M.A. & Alessi D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*, 114(16), 2903-2910. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.16.2903>
- Lecour S., Smith R.M., Woodward B., Opie L.H., Rochette L. & Sack M.N. (2002). Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF- $\alpha$  and ischemic

- preconditioning mediated cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(5), 509-518. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1533>
- Lecour S., Suleman N., Deuchar G.A., Somers S., Lacerda L., Huisamen B. & Opie L.H. (2005). Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- $\alpha$  activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, 112(25), 3911-3918. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581058>
- Lecour S. (2009). Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(1), 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.019>
- Levy D.E. & Lee C. (2002). What does STAT3 do? *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1143-1148. <https://doi.org/10.1172/jci15650>
- Li D.Y., Tao L., Liu H., Christopher T.A., Lopez B.L. & Ma X.L. (2006). Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis*, 11(6), 923-930. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-6305-6>
- Liu G.L., Christopher T.A., Lopez B.L., Gao F., Guo Y., Gao E., Knuettel K., Feelisch M. & Ma X.L. (1998). SP/W-5186, a cysteine-containing nitric oxide donor, attenuates postischemic myocardial injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(2), 527-537. <https://jpet.aspetjournals.org/content/287/2/527.short>
- Liu Y., Tsuchida A., Cohen M.V. & Downey J.M. (1995). Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(3), 883-892. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(95\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0022-2828(95)90038-1)
- Ma X.L., Kumar S., Gao F., Loudon C.S., Lopez B.L., Christopher T.A., Wang C., Lee J.C., Feuerstein G.Z. & Yue T.L. (1999). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 99(13), 1685-1691. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.13.1685>
- Majerus P.W., Ross T.S., Cunningham T.W., Caldwell K.K., Jefferson A.B. & Bansal V.S. (1990). Recent insights in phosphatidylinositol signaling. *Cell*, 63(3), 459-465. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90442-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90442-H)
- MapChart: <https://mapchart.net/world.html> (9. 9. 2022).
- Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M. & Yellon D.M. (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 88(3), 1264-1272. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.3.1264>
- Mazurais D., Robert P., Gout B., Berrebi-Bertrand I., Laville M.P. & Calmels T. (2002). Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(5), 661-669. <https://doi.org/10.1177/002215540205000507>
- Means C.K., Xiao C.Y., Li Z., Zhang T., Omens J.H., Ishii I., Chun J. & Brown J.H. (2007). Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(6), H2559-H3207. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01331.2006>
- Miki T., Cohen M.V. & Downey J.M. (1998). Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Molecular and cellular biochemistry*, 186(1-2), 3-12. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006856124501>
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murohara T., Asahara T., Silver M., Bauters C., Masuda H., Kalka C., Kearney M., Chen D., Symes J.F., Fishman M.C., Huang P.L. & Isner J.M. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The journal of clinical investigation*, 101(11), 2567-2578. <https://doi.org/10.1172/JCI1560>

- Murry C.E., Jennings R.B. & Reimer K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
- Myers M.G. (2009). Moonlighting in mitochondria. *Science*, 323(5915), 723-724. <https://doi.org/10.1126/science.1169660>
- Nakajima N., Cavalli A.L., Biral D., Glembofski C.C., McDonough P.M., Ho P.D., Betto R., Sandoná D., Palade P.T., Dettbarn C.A., Klepper R.E. & Sabbadini R.A. (2000). Expression and characterization of Edg-1 receptors in rat cardiomyocytes. *European Journal of Biochemistry*, 267(18), 5679-5686. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01656.x>
- Nakamura M., Wang N., Zhao Z., Wilcox J.N., Thourani V., Guyton R. & Vinten-Johansen J. (2000). Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovascular research*, 45(3), 661-670. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00393-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00393-4)
- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (3. 2. 2022).
- Nishimura Y., Kurata N., Iwase M., Li H. & Yasuhara H. (1999). The effects of organic solvents on trimethadione n-demethylation in rats. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 104(2), 229-239.
- Nishimura M., Ueda N. & Naito S. (2003). Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms, UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 26(7), 1052-1056. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1052>
- Oldenburg O., Qin Q., Krieg T., Yang X.M., Philipp S., Critz S.D. & Cohen M.V. (2004). Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286(1), H468-476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00360.2003>
- Opletalová B. (2021): *Kardioprotektivní účinky dehydrosilybinu – srovnání s účinkem apelinu*. [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Parsons M., Musikabhumma A., Jacobson K.A. & Liang B.T. (1998). Selective coupling of adenosine A<sub>1</sub> receptor to phospholipase C and of adenosine A<sub>3</sub> receptor to phospholipase D. *Circulation*, 98(17), 490-491.
- Pedretti S. & Raddatz E. (2011). STAT3 $\alpha$  interacts with nuclear GSK3 $\beta$  and cytoplasmic RISK pathway and stabilizes rhythm in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. *Basic Research in Cardiology*, 106(3), 355-369. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0152-5>
- Penna C., Mancardi D., Rastaldo R. & Pagliaro P. (2009). Cardioprotection: A radical view: Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1787(7), 781-793. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.02.008>
- Pfeffer L.M., Mullersman J.E., Pfeffer S.R., Murti A., Shi W. & Yang C.H. (1997). STAT3 as an Adapter to Couple Phosphatidylinositol 3-Kinase to the IFNAR1 Chain of the Type I Interferon Receptor. *Science*, 276(5317), 1418-1420. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1418>
- Ping P., Zhang J. Cao X., Li R.C.X., Kong D., Tang X.L., Qiu Y., Manchikalapudi S., Auchampach J.A., Black R.G. & Bolli R. (1999). PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276(5), H1468-H1481. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1468>
- Post-White J., Ladas E.J. & Kelly K.M. (2007). Advances in the Use of Milk Thistle (*Silybum marianum*). *Integrative cancer therapies*, 6(2), 104-109. <https://doi.org/10.1177/1534735407301632>
- Rajnochová Svobodová A., Gabrielová E., Michaelides L., Kosina P., Ryšavá A., Ulrichová J., Zálešák B. & Vostálová J. (2018). UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin. *Archives of Dermatological Research*, 310(5), 413-424. <https://doi.org/10.1007/s00403-018-1828-6>
- Reader S.J., Blackwell V., O'Hara R., Clothier R.H., Griffin G. & Balls M. (1989). A vital dye release method for assessing the short-term cytotoxic effects of chemicals and formulations.



- Alternatives to Laboratory Animals*, 17(1), 28-37.  
<https://doi.org/10.1177/026119298901700106>
- Reimer K.A. & Jennings R.B. (1979). The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 40(6), 633-644.
- Reimer K.A., Hill M.L. & Jennings R.B. (1981). Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resyn-thesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 13(2), 229-239. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(81\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0022-2828(81)90219-4)
- Reimer K.A., Murry C.E., Yamasawa I., Hill M.L. & Jennings R.B. (1986). Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *The American Journal of Physiology*, 251, H1306-15. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.251.6.h1306>
- Rössig L., Haendeler J., Hermann C., Urbich C., Zeiher A.M. & Dimmeler S. (2000). Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *Mechanisms of signal transduction*, 275(33), P25502-25507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002283200>
- Roth G.A., Abate D., Abate K.H., Abay S.M., Abbafati C., Abbasi N., Abbastabr H., Abd-Allah L., Abdela J., Abdelalim A. et al. (2018). *Lancet*, 392(10159), 1736-1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
- Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S. & Sessa W.C. (1999). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The journal of clinical investigation*, 101(4), 731-736. <https://doi.org/10.1172/JCI1699>
- Sadat U. (2009). Signaling pathways of cardioprotective ischemic preconditioning. *International journal of surgery*, 7(6), 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2009.06.004>
- Sakamoto J., Miura T., Goto M. & Imura O. (1995). Limitation of myocardial infarct size by adenosine A1 receptor activation is abolished by protein kinase C inhibitors in the rabbit. *Cardiovascular research*, 29(5), 682-688. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)88641-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)88641-X)
- Scimia M.C., Hurtado C., Ray S., Metzler S., Wei K., Wang J., Woods C.E., Purcell N.H., Catalucci D., Akasaka T., Bueno O.F., Vlasuk G.P., Kaliman P., Bodmer R., Smith L.H., Ashley E., Mercola M., Brown J.H. & Ruiz-Lozano P. (2012). APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature*, 488(7411), 394-398. <https://doi.org/10.1038/nature11263>
- Shukla S.D. & Halenda S.P. (1991). Phospholipase D in cell signalling and its relationship to phospholipase C. *Life Sciences*, 48(9), 851-866. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90031-6)
- Scholz H. (1984). Inotropic drugs and their mechanisms of action. *Journal of the American College of Cardiology*, 4(2), 389-397. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(84\)80231-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(84)80231-4)
- Skyschally A., van Caster P., Boengler K., Gres P., Musiolik J., Schilawa D., Schulz R. & Heusch G. (2009). Ischemic Postconditioning in Pigs: No Causal Role for RISK Activation. *Circulation research*, 104(1), 15-18. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.186429>
- Smith T., Kawa K., Eckl V. & Johnson J. (2016). Sales of Herbal Dietary Supplements in US Increased 7.5% in 2015 Consumers spent \$6.92 billion on herbal supplements in 2015, marking the 12th consecutive year of growth. *HerbalGram*, 111, 67-73. <https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/issues/111/table-of-contents/herbalgram-111-herb-market-report-american-botanical-council/>
- Somers S.J., Frias M., Lacerda L., Opie L.H., Lecour S. (2012). Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovascular drugs and therapy*, 26(3), 227-237. <https://doi.org/10.1007/s10557-012-6376-2>
- Stambolic V. & Woodgett J.R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical journal*, 303(3), 701-704. <https://doi.org/10.1042/bj3030701>
- Statistics Explained: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Main\\_Page](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Main_Page) (9. 9. 2022).
- Strömer H., de Groot M.C.H., Horn M., Faul C., Leupold A., Morgan J.P., Scholz W. & Neubauer S. (2000). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Inhibition With HOE642 Improves Postischemic

- Recovery due to Attenuation of  $\text{Ca}^{2+}$  Overload and Prolonged Acidosis on Reperfusion. *Circulation*, 101(23), 2749-2755. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.23.2749>
- Suleman N., Somers S., Smith R., Opie L.H. & Lecour S.C. (2008). Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovascular Research*, 79(1), 127-133. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn067>
- Sun J. (2007). Protein S-nitrosylation: a role of nitric oxide signaling in cardiac ischemic preconditioning. *Acta Physiologica Sinica*, 59(5), 544-552. [https://www.researchgate.net/profile/Junhui-Sun/publication/5904288\\_Protein\\_S-nitrosylation\\_A\\_role\\_of\\_nitric\\_oxide\\_signaling\\_in\\_cardiac\\_ischemic\\_preconditioning/links/0deec52c0e5c33827a000000/Protein-S-nitrosylation-A-role-of-nitric-oxide-signaling-in-cardiac-ischemic-preconditioning.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Junhui-Sun/publication/5904288_Protein_S-nitrosylation_A_role_of_nitric_oxide_signaling_in_cardiac_ischemic_preconditioning/links/0deec52c0e5c33827a000000/Protein-S-nitrosylation-A-role-of-nitric-oxide-signaling-in-cardiac-ischemic-preconditioning.pdf)
- Šimánek V., Křen V., Ulrichová J., Vicar J. & Cvak L. (2000). Silymarin: What Is in the Name? *Hepatology*, 32(2), 442-444. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.9770>
- Takano H., Manchikalapudi S., Tang X.L., Qiu Y., Rizvi A., Jadoon A.K., Zhang Q. & Bolli R. (1998). Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation*, 98(5), 441-449. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.5.441>
- Tao R., Hoover H.E., Zhang J., Honbo N., Alano C.C. & Karliner J.S. (2009). Cardiomyocyte S1P1 receptor-mediated extracellular signal-related kinase signaling and desensitization. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 53(6), 486-494. <https://doi.org/10.1097/fjc.0b013e3181a7b58a>
- Tong H., Chen W., Steenbergen C. & Murphy E. (2000). Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circulation research*, 87(4), 309-315. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.4.309>
- Townsend N., Kazakiewicz D., Wright F.L., Timmis A., Huculeci R., Torbica A., Gale C.P., Achenbach S., Weidinger F. & Vardas P. (2022). Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nature reviews CARDIOLOGY*, 19 (2), 133-143. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00607-3>
- Tritto I., D'Andrea D., Eramo N., Scognamiglio A., De Simone C., Violante A., Esposito A., Chiariello M. & Ambrosio G. (1997). Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circulation research*, 80(5), 743-748. <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.5.743>
- Tsuruta F., Masuyama N. & Gotoh Y. (2002). The Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt Pathway Suppresses Bax Translocation to Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14040-14047. <https://doi.org/10.1074/jbc.m108975200>
- Uchiyama T., Engelman R.M., Maulik N. & Das D.K. (2004). Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation*, 109(24), 3042-3049. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000130647.29030.90>
- Vinten-Johansen J., Zhao Z.Q., Jiang R., Zatta A.J. & Dobson G.P. (2007). Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology*, 103(4), 1111-1146. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00642.2007>
- Vrba J., Papoušková B., Lněničková K., Kosina P., Křen V. & Ulrichová J. (2021). Metabolism of 2,3-Dehydrosilybin A and 2,3-Dehydrosilybin B: A Study with Human Hepatocytes and Recombinant UDP-Glucuronosyltransferases and Sulfotransferases. *Antioxidants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antiox10060954>
- Wang P., Gallagher K.P., Downey J.M. & Cohen M.V. (1996). Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(3), 579-588. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0054>
- Wang M., Lin W., Chen H., Chang Y., Ou H., Kuo J., Hong J. & Jeng K.G. (2002). Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience*, 16(11), 2103-2112. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02290.x>
- Wang C., Du J.F., Wu F. & Wang H.C. (2008). Apelin decreases the SR  $\text{Ca}^{2+}$  content but enhances the amplitude of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient and contractions during twitches in isolated rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(6), H2540-H2546. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00046.2008>

- Wenger N.K., Boden W.E., Carabello B.A., Carney R.M., Cerqueira M.D., Criqui M.H., Epstein A.E., Froelicher E.S., Gibson G.H., Hlatky M.A., Jacobs A.K., Kuehl K.S., Miller T.D. & Stevenson L.W. (2010). *Cardiovascular disability* (1. vydání). The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12940>
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B. & Johnson G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*, 79(1), 143-180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>
- Witek P., Korga A., Burdan F., Ostrowska M., Nosowska B., Iwan M. & Dudka J. (2016). The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology*, 68(6), 2407-2415. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9957-2>
- World Health Organization: <https://www.who.int/> (9. 9. 2022).
- Xu T., He G., Dobson K., England K. & Rumsby M. (2007). Phosphorylation at Ser729 specifies a Golgi localisation for protein kinase C epsilon (PKC $\epsilon$ ) in 3T3 fibroblasts. *Cellular Signalling*, 19(9), 1986-1995. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.009>
- Yang X.M., Krieg T., Cui L., Downey J.M. & Cohen M.V. (2004a). NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 36(3), 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.12.008>
- Yang X.M., Proctor J.B., Cui L., Krieg T., Downey J.M., Cohen M.V. (2004b). Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of the American college of cardiology*, 44 (5), 1103–1110. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.05.060>
- Ytrehus K., Liu Y. & Downey J.M. (1994). Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Heart and circulatory physiology*, 266(3), H1145-H1152. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.3.H1145>
- Yue T.L., Wang C., Gu J.L., Ma X.L., Kumar S., Lee J.C., Feuerstein G.Z., Thomas H., Maleeff B. & Ohlstein E.H. (2000). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research*, 86(6), 692-699. <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.6.692>
- Yun H.Y., Gonzalez-Zulueta M., Dawson V.L. & Dawson T.M. (1998). Nitric oxide mediates N-methyl-d-aspartate receptor-induced activation of p21<sup>ras</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5773-5778. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5773>
- Zhao Z., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., Guyton R.A. & Vinten-Johansen J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Heart and circulatory physiology*, 285(2), H579-H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
- Zholobenko A.V., Mouithys-Mickalad A., Dostál Z., Serteyn D. & Modrianský M. (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>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Akt	proteinkinasa B
ANT	adenin nukleotidový transportér
Ape	apelin-13
APJ	apelinový receptor
APS	peroxodisíran amonný
ASK1	kinasa regulující signály pro apoptózu 1
BAD	proapoptický promotor spojený s genem Bcl-2
Bax	<b>Bcl2-associated X</b> protein
BCA	kyselina bicinchoninová
BMK1	velká MAP kinasa 1 (neboli ERK5)
CBP	kalmodulin vážící protein (z anglického <b>calmodulin-binding protein</b> )
CCCP	karbonylkyanid-m-chlorofenylhydrazon
CFP	cyan fluorescent protein
CRE	element citlivý na cAMP
CREB	protein vážící CRE
CYP	cytochrom P450
DAG	1,2-diacylglycerol
DHS	2,3-dehydrosilybin
DTT	dithiothreitol
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
eNOS	endoteliální NO-synthasa
ERK1/2	extracelulární signálem regulovaná kinasa 1/2
FBS	fetální bovinní sérum
Fsk	forskolin
GAB1	z anglického <b>GRB2-associated-binding protein 1</b>
GADPH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GC	guanylylcyklasa
GFP	zelený fluorescentní protein (z anglického <b>green fluorescent protein</b> )
GSK-3 $\beta$	glykogensyntasa kinasa-3 $\beta$

HDL	vysokodenzitní lipoprotein
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
JAK	Janus kinasy
JNK	z anglického c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinases
LDH	laktátdehydrogenasa
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
mitoK <sub>ATP</sub>	mitochondriální draselné kanálky závislé na ATP
MK	mastná kyselina
MKP-3	MAP kinasa fosfatasa-3
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NR	test s využitím neutrální červeně
p70s6K	ribosomální protein-S6 kinasa
p90RSK	90 kDa ribosomální S6 kinasa
PA	kyselina fosfatidová
PBS	fosfátový izotonický tlumivý roztok
PC	prekondicionování (z anglického preconditioning)
PK1	fosfoinositol dependentní kinasa 1
PH	pleckstrin-homologní doména
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	protein kinasa A
PKC	protein kinasa C
PKG	protein kinasa G
PVDF	polyvinyliden difluorid
RISK	signální kaskáda reperfučního poškození
ROS	reaktivní formy kyslíku
S1P	sřingosin-1-fosfát
SAFE	přezítí zajišťující signální kaskáda
SDS	dodecylsírán sodný
SPHK	sřingosin kinasa

STAT3	přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3
TBS	isotonický Tris pufr
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$
TNFR	TNF- $\alpha$ receptor
TTC	2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid
UCP2	rozpojovací protein 2