

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů (NFYZZIV)



Bc. Petr Kordač

Úloha sukcinátu v ischemické toleranci srdce potkanů
The role of succinic acid in cardiac ischemic tolerance in rats

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 10. 8. 2021

.....
Petr Kordač

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Janu Neckářovi Ph.D. za umožnění dělat na této diplomové práci na Oddělení na vývojové kardiologie AVČR, za jeho vstřícné a odborné vedení a především za všechny cenné rady, které mi během práce poskytl.

Abstrakt

Sukcinát je jedním z meziproduktů Krebsova cyklu u kterého se v posledních letech ukazuje, že zasahuje i do množství buněčných dějů, z nichž některé ovlivňují odolnost srdce k ischemicko-reperfuznímu poškození. Cílem této práce bylo objasnit vliv extracelulárně podávaného sukcinátu v ischemické toleranci srdce u laboratorního potkana. Odolnost srdce k akutní ischemii (velikost infarktu a výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií) byla analyzována za použití metody izolovaného perfundovaného srdce dle Langendorfa za konstantního průtoku s akutním podáváním sukcinátu. Lokální ischemie srdce byla navozena podvazem sestupné větve levé koronární arterie.

Akutní podávání 1 mM sukcinátu před 60minutovou ischemií nebo jen před reperfuzí mělo příznivý vliv na snížení rozsahu infarktu myokardu o 25-30 % oproti kontrolní skupině. Zároveň však zvýšilo výskyt i závažnosti ischemických a reperfuzních arytmií.

Klíčová slova: Sukcinát, srdce, potkan, infarkt myokardu, komorové arytmie

Abstract

Succinate is one of the intermediate in the Krebs cycle, which in recent years has been shown to interfere with other cellular events, some of which may affect cardiac ischemic tolerance. The aim of this project was to clarify its cardioprotective role in rat hearts subjected to acute ischemia-reperfusion. The myocardial resistance to acute ischemia (infarct size and incidence and severity of ischemic and reperfusion arrhythmias) was analyzed using the Langendorff method of isolated perfused heart at a constant flow with acute succinate administration. Local ischemia was induced by ligation of left anterior descending coronary artery.

Acute administration of 1 mM succinate before 60 minutes of ischemia or before reperfusion only had a beneficial effect on reducing the infarct size by 25-30 % compared to the control group. At the same time, it had an adverse effect on the incidence and severity of ischemic and reperfusion arrhythmias.

Key words: Succinate, heart, rat, heart-attack, ventricular arrhythmias

Obsah

Úvod.....	8
Literární přehled	9
Srdce a ischemická choroba srdeční.....	9
Metabolismus srdce	9
Tvorba energie za fyziologických podmínek.....	10
Přeměna substrátu	11
Krebsův cyklus	13
Ischemicko-reperfuční poškození myokardu	16
Ischemie myokardu	16
Reperfuze myokardu.....	17
Vliv reperfučního poškození na činnost srdce.....	19
Ischemická tolerance srdce.....	20
Věk.....	20
Pohlaví	21
Komorbidity.....	21
Kardioprotektivní fenomény.....	22
Sukcinát	23
Působení sukcinátu mimo mitochondrie	24
Působení sukcinátu v krevním řečišti	25
Hypoxií indukovaný faktor.....	27
Cíle práce	28
Metodika	29
Experimentální zvířata	29
Materiál a chemikálie	29
Průběh pokusu	32
Příprava roztoku.....	32
Průběh experimentu.....	33
Barvení a focení vzorků.....	34
Vyhodnocování rozsahu infarktu.....	36
Vyhodnocování arytmií	37
Statistické vyhodnocování výsledků	38
Výsledky.....	39

Rozsah infarktu.....	39
Arytmie	43
Ischemické arytmie.....	43
Reperfuční arytmie	46
Hemodynamické hodnoty.....	49
Diskuze	50
Vliv sukcinátu na ischemickou toleranci srdce	50
Působení endogenního sukcinátu	51
Působení exogenního sukcinátu	52
Shrnutí.....	55
Závěr.....	56
Seznam literatury	57

Seznam použitých zkratk

ACoA	Acetylkoenzym A
CAA	<i>Cardiac Arrhythmias analysis</i>
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin závislá proteinkináza II
CAR	<i>Cardiac Arrhythmias Recorder</i>
CAT	Kataláza
CDK	Chronické onemocnění ledvin
CoQ10	Koenzym Q10
ETC	Elektronový transportní řetězec
F ₁ F ₀ -ATPáza	Oxidativní fosforyláza
Glu-6-P	Glukóza-6-fosfát
GPx	Glutathion peroxidáza
HIF	Hypoxií indukovaný faktor
HSP	Chaperon
ICHS	Ischemická choroba srdeční
I/R poškození	Ischemicko-reperfuzní poškození
LAD arterie	Sestupná větev levé koronární arterie
LDH	Laktátdehydrogenáza
mPTP	Mitochondriální pór přechodné propustnosti
mtDNA	mitochondriální DNA
PKA	Protein kináza A
PDH	Pyruvát dehydrogenáza
PFK-1	Fosfofruktokináza
PHDs	Prolyl hydroxylázy
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
RAAS	Renin-angiotenzin-aldosteronový systém
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SDH	Sukcinátdehydrogenáza
SERCA	Ca ²⁺ ATPáza sarkoplazmatického retikula
SOD	Superoxid dismutáza
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid
VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Úvod

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je včetně přidružených komorbidit nečastější příčinou mortality a morbidit ve vyspělých zemích světa. Vysokou prevalenci začínají mít i v rozvojových zemích díky úspěšnému postupnému vymysování nemocí jako je malárie či AIDS. Jen na ICHS zemře ročně přes 9 milionů lidí. Spolu s mrtvicí dokonce přes 15 milionů lidí a toto číslo každým rokem roste (WHO, 2020). Jedním z důvodů stále se zvyšujícího počtu úmrtí je stárnoucí populace, protože se stářím se zvyšuje prevalence kardiovaskulárních chorob a zhoršuje se jejich průběh i následné léčení. Druhým důvodem je stále více sedavý způsob života. Ten je kvůli špatné životosprávě spojené s nadváhou, malou fyzickou aktivitou a požíváním alkoholických a tabákových výrobků příčinou častějšího výskytu kardiovaskulárních onemocnění i u mladých lidí. Dalším důvodem je rovněž zvýšená prevalence chronického onemocnění ledvin a *diabetu mellitus*. Obě tyto onemocnění zásadně přispívají ke snížené ischemické toleranci myokardu (Widimský et al., 2003).

Je proto logické, že je na oblast vědy a výzkumu v této oblasti kladen vysoký důraz s cílem najít nové terapeutické postupy zvyšující odolnost srdce k ischemii. Jak na prevenci, tak i na pozdější důsledky způsobené vznikem ICHS.

Výzkumy posledních několika let ukazují, že sukcinát není jen meziproduktem Krebsova cyklu, ale může hrát velkou roli i v ischemické toleranci myokardu. O tom, zda se jedná o úlohu protektivní nebo naopak negativní, zhoršující ischemickou toleranci srdce, není zatím úplně jasné.

Právě potenciální protektivní roli sukcinátu se bude věnovat i tato diplomová práce, která má za úkol pokusit se tuto otázku blíže objasnit.

Literární přehled

Srdce a ischemická choroba srdeční

Srdce je dutý orgán tvořený svalovinou, jehož úkolem je udržovat stálý krevní oběh a zásobovat tak všechny tkáně a orgány kyslíkem a živinami a odvádět metabolity. Zajistit jeho funkci je energeticky velice náročné a jeho selhání sebou nese fatální důsledky. V klidu spotřebovává lidské srdce přibližně 12 % (9,7 ml/100 g/min) z celkové spotřeby kyslíku organismu (Barret et al. 2016). Extrémní zátěží či stresem se může tato spotřeba až zpětinásobit (Duncker & Bache, 2008).

Pokud má srdce zvýšené metabolické nároky, nastává zvýšení srdeční frekvence a vasodilatace cév. Jestliže to zvýšenou poptávkou po kyslíku a živinách nevyřeší, dochází k rozvoji ICHS, jenž může vést až ke vzniku infarktu myokardu. Za většinu případů vzniku ICHS může okluze koronárních tepen, typicky kvůli rozvoji koronární aterosklerózy, kdy jsou tepny zúžené aterosklerotickými pláty a dojde k ruptuře intimy a trombóze v místě plátu. Pláty vznikají usazováním cholesterolu, jiných tukových částic a vápníku pod endotelem. To způsobí nakupení makrofágů, které se přeměňují na tzv. pěnové buňky. Nahromaděné pěnové buňky vytvoří „tukový proužek“, který fibrilizuje (Nečas et., 2003; Widimský et al., 2009). Uvádí se, že ICHS, je nejčastější příčinou srdečního selhání. Samotná ICHS anebo v kombinaci s hypertenzí (ta zvýší riziko až trojnásobně) je ve vyspělých zemích nejčastější příčinou úmrtí (Widimský et al., 2003).

V následujících kapitolách budou detailněji probrány klíčové metabolické dráhy, jež se mohou podílet na rozvoji srdečního poškození v důsledku ICHS.

Metabolismus srdce

Myokard spotřebovává na kontrakci velké množství energie každý den, po celý náš život. Hlavním místem produkce ATP jsou mitochondrie, které u kardiomyocytů zabírají přibližně 30 % objemu buňky. Pro lepší efektivitu jsou lokalizovány v blízkosti myofibril, t-tubulů a sarkoplazmatického retikula. Značné množství ATP je spotřebováno kromě kontrakce také na funkci Ca^{2+} ATPázy sarkoplazmatického retikula (SERCA) a sodno-draselné pumpy udržující iontovou homeostázu kardiomyocytů (Barth et al., 1992; Maack & O'Rourke, 2007).

Mitochondrie jsou membránové orgány eukaryotních buněk. Jsou obaleny dvěma fosfolipidovými membránami a mají vlastní genom s proteosyntetickým aparátem. Jejich primární funkce je poskytovat buňce energii ve formě ATP. Dále se podílejí na biosyntéze aminokyselin, mastných kyselin, vitamínových kofaktorů, železo-sirných klastrů, řízení buněčné smrti. Vnější membrána obsahuje velké množství porinů, což ji činí propustnou pro ionty a molekuly menší než 5 kDa. Proteiny skrz ně neprojdou a musí použít speciální komplex pro transport bílkovin (tzv. TOM-TIM komplex). Dále obsahuje enzymy, které jsou součástí metabolismu fosfolipidů a mastných kyselin. Vnitřní membrána je zvlněná do krist, pro vytvoření co největší plochy a je tvořena z velké části bílkoviny, především komponenty elektronového transportního řetězce a přenašeči. Mitochondriální matrix je bohatá na bílkoviny, zejména enzymy Krebsova cyklu. Nachází se zde vlastní DNA a proteosyntetický aparát. Většina mitochondriálních bílkovin je však kódována v jaderném DNA, syntetizována v cytoplasmě a do mitochondrie je dopravena až po postranlačních úpravách (Logan, 2006).

Tvorba energie za fyziologických podmínek

Hladina ATP v kardiomyocytech je relativně nízká (cca $5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ wet wt}$). Tato nízká zásoba ATP je ale kompenzována vysokou maximální hydrolyzou ATP (v klidu cca $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{g wet wt}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Při přibližné spotřebě 2 % ATP na stah je za klidu všechno ATP spotřebováno za jednu minutu. Jeho kompletní obnova však trvá jen 10 vteřin. Srdce je tak v klidu na pouhých 15-25 % své maximální tvorby, díky čemuž má prostor na razantní zvýšení produkce za stresových podmínek a dosáhnout více než 90 % své maximální oxidativní kapacity (Stanley et al., 2005; Ventura-Clapier et al., 2004).

Za normoxických podmínek je více než 95 % ATP tvořeno oxidativní fosforylací v mitochondriích (Sarkar et al., 2012; Ventura-Clapier et al., 2004). Z toho je 60-70 % ATP spotřebováno na kontrakci mikrofilament a zbylých 30-40 % je využito na funkci iontových pump, primárně SERCA (Stanley et al., 2005).

Produkcí ATP můžeme rozdělit na tři fáze:

- 1) Přeměna substrátu na acetylkoenzym A (AcCoA)
- 2) Krebsův cyklus
- 3) Oxidace redukovaných koenzymů v elektronovém transportním řetězci (ETC)

Přeměna substrátu

Lipidy, sacharidy a některé aminokyseliny jsou metabolizovány na ACoA. Z lipidů se tvoří volné mastné kyseliny, které jsou transportovány do mitochondrií a přeměněné na ACoA procesem β -oxidace. Sacharidy jsou rozštěpené na glukózu. Glukóza je glykolýzou přeměněna na pyruvát a v mitochondriích na ACoA. Aminokyseliny jsou buď přeměněny na pyruvát, nebo přímo na meziproducty Krebsova cyklu (Czibik et al., 2014).

Beta-oxidace

Přes 90 % ACoA za normoxických podmínek pochází v srdci z β -oxidace mastných kyselin, i když je přítomno dostatečné množství glukózy. Intenzita β -oxidace je závislá hlavně na poměru volného CoA k vázanému ACoA (Jafri et al., 2001).

V plasmě se mastné kyseliny kvůli své vysoké hydrofóbnosti nevyskytují volně, ale jsou navázané na jiné molekuly. V neesterifikované formě jsou vázané na albumin, kovalentně vázané na triglycerid, tvoří chylomikrony nebo lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL). Jejich koncentrace je ovlivněná denní dobou a pohybuje se mezi 0,2-0,8 mM. Za některých stresových podmínek jako je hladovění, *diabetes mellitus*, či hypoxie, může jejich hladina stoupnout až na 1 mM. Do plasmy jsou uvolňovány z triglyceridů v adipocytech vlivem hormon senzitivní lipázy, nebo z chylomikronů a VLDL pomocí lipoprotein lipázy vázané na endoteliálních buňkách a kardiomyocytech (Stanley et al., 2005).

Do kardiomyocytů vstupují mastné kyseliny pasivní difúzí nebo pomocí přenašečů. Po vstupu do buňky je na mastné kyseliny navázán Acyl-CoA. Přibližně 10-30 % je dále esterifikováno na triglycerid a slouží jako zásoba energie. Zbýlých 70-90 % slouží jako substrát pro β -oxidaci (Stanley et al., 2005).

Beta-oxidace probíhá primárně v matrixu mitochondrií, částečně i v peroxisomech. Jejimi primárními produkty jsou ACoA a redukované koenzymy NADH a FADH₂. Přes vnější membránu vstupují mastné kyseliny s navázaným Acyl-CoA prostou difúzí. Přes vnitřní membránu vstupují prostřednictvím karnitin acetyltranslokázy výměnou za volný karnitin. Během β -oxidace jsou opakovaně odštěpovány 2 uhlíky s ACoA a tvoří se NADH a FADH₂. Celý proces se uskuteční ve 4 reakcích, se specifickými enzymy pro každý krok a podle délky MK. Při poslední reakci je Acyl-CoA regenerován pro další kolo a je uvolněn ACoA, který vstupuje do Krebsova cyklu. NADH a FADH₂ vznikají v předchozích reakcích a přesouvají se rovnou do ETC (Stanley et al., 2005).

Glykolýza

Přestože má glykolýza jen minoritní podíl na totální produkci energie, tak hraje důležitou roli v iontové homeostáze. Glykolytické enzymy se nachází v blízkosti iontových kanálů a pump sarkolemy a sarkoplazmatického retikula, kde se starají o syntézu ATP přímo v blízkosti míst iontového transportu (Jafri et al., 2001).

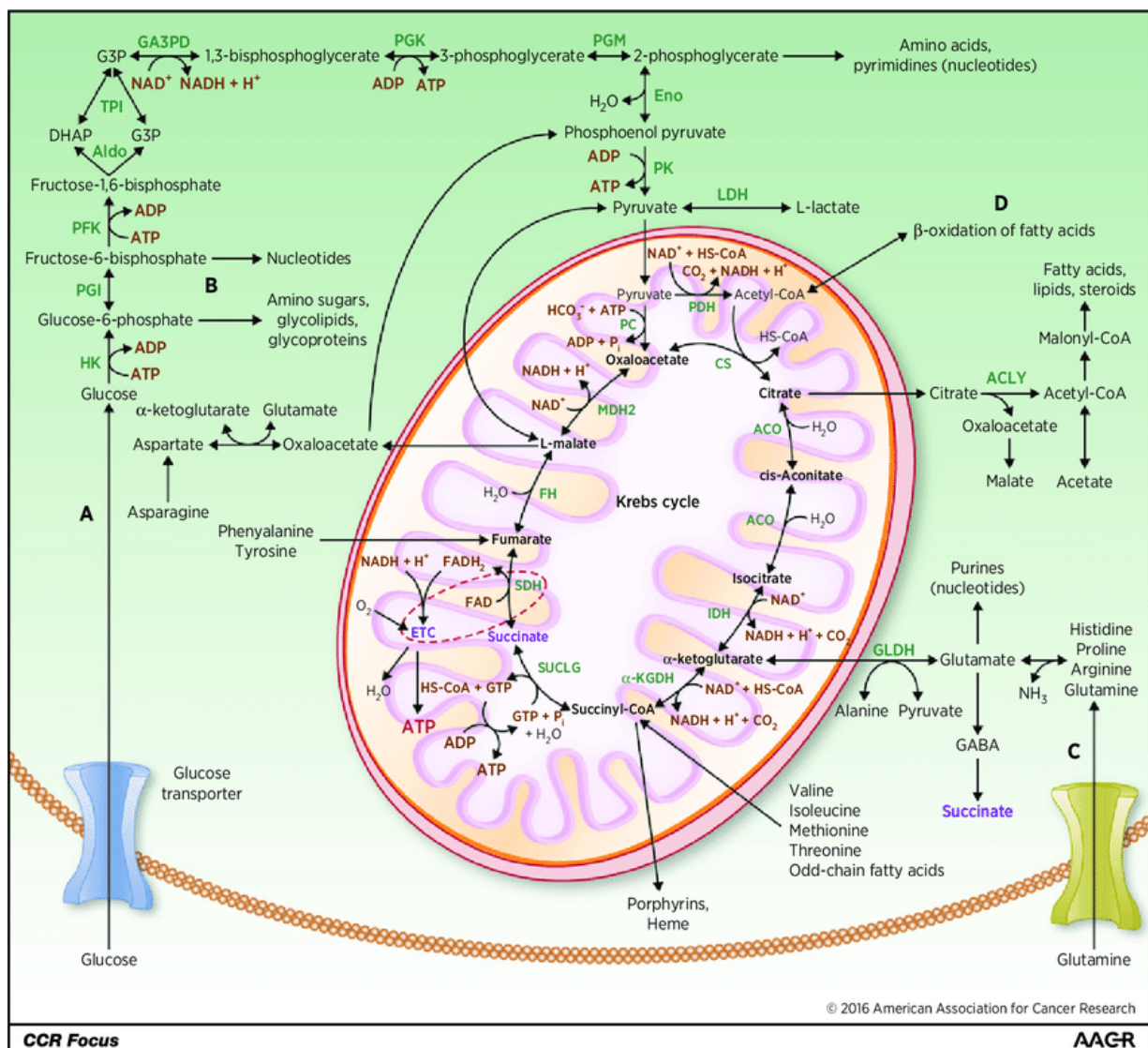
Substrát pro glykolýzu je uvolňován ze zásob glykogenu nebo vychytáván z krve. Zásoby glykogenu jsou v srdci oproti kosterním svalům přibližně pětikrát nižší. Jeho případný nárůst je způsoben zvýšeným přenosem glukózy z plasmy a/nebo při hyperinzulinemii. Z glykogenu je glykogen fosforylázou uvolňována glukóza-1-fosfát, která je následně přeměněna fosfoglukomutázou na glukózu-6-fosfát (Glu-6-P), jenž vstupuje do glykolýzy. Dalším zdrojem glukózy je její vychytávání z plasmy. Do kardiomyocytů vstupuje glukóza facilitovanou difuzí přes glukozový transportér. Transportéry jsou uskladněné v intracelulárních vezikulách a do membrány jsou zabudovány vlivem insulínu, zvýšené srdeční práce nebo ischemie. Po vstupu do buňky je glukóza hexakinázou přeměněna na Glu-6-P (Jafri et al., 2001; Stanley et al., 2005).

Jedním z klíčovým regulačních enzymů glykolýzy je fosfofruktokináza (PFK-1), která katalyzuje první ireverzibilní krok, ve kterém se za spotřeby ATP vytvoří frukto-1,6-bisfosfát. Aktivuje ji zvýšená hladina ADP a inhibována je alostericky, zvýšenou hladinou ATP a volnými mastnými kyselinami. Skrze PFK-1 je v srdci řízena případná změna mitochondriálního oxidativního metabolismu na glykolýzu. Následuje série reakcí (obr. 1) jejichž výsledkem je tvorba 2 molekul pyruvátu, 2NADH a 2ATP. Vniklý pyruvát může být dále metabolizován na laktát, dekarboxylován na ACoA nebo karboxylován na oxalacetát či malát (Stanley et al., 2005). Malá část vzniklé Glu-6-P se glykolýzy neúčastní, ale je metabolizována pentozofosfátovým cyklem na ribózu-5-fosfát využitou k tvorbě nukleotidů (Jochmanova et al., 2016).

Laktát je z pyruvátu vytvořen enzymem laktátdehydrogenázou (LDH) a krevním řečištěm je dopraven do jater, kde je znovu metabolizován na glukózu. Zdravé, neischemické srdce je schopné všechen laktát oxidovat zpátky na pyruvát a žádný tak neuvolňovat do krve. Uvolňovat ho začne pouze v případě, kdy se značně zvýší glykolýza a zhorší oxidace pyruvátu, což je typicky způsobeno ischemií. Na ACoA je pyruvát metabolizován enzymem pyruvát dehydrogenázou (PDH) již v matrixu mitochondrií. Poslední možností pyruvátu je jeho přeměna rovnou na meziprodukty Krebsova cyklu jako je oxalacetát či malát (Stanley et al., 2005).

Krebsův cyklus

Krebsův cyklus je poslední část katabolismu sacharidů a mastných kyselin přeměněných na ACoA a některých aminokyselin, které tvoří rovnou meziprodukty cyklu (anaplerotické reakce). Do Krebsova cyklu se ACoA začlení za vzniku citrátu. Citrát je následně řadou reakcí postupně metabolizován až na oxalacetát, který spojením s novým ACoA znovu vytvoří citrát (obr. 1). Jedním z meziproduktů cyklu je i sukcinát, který bude detailněji probrán na straně 23. Během cyklu jsou mimo jiné tvořeny NADH a FADH₂ putující dále do ETC, kde jsou použity k syntéze ATP. Na citrátový cyklus jsou napojené další děje jako je glukoneogeneze, lipogeneze a transaminace a deaminace aminokyselin (Jochmanova et al., 2016).



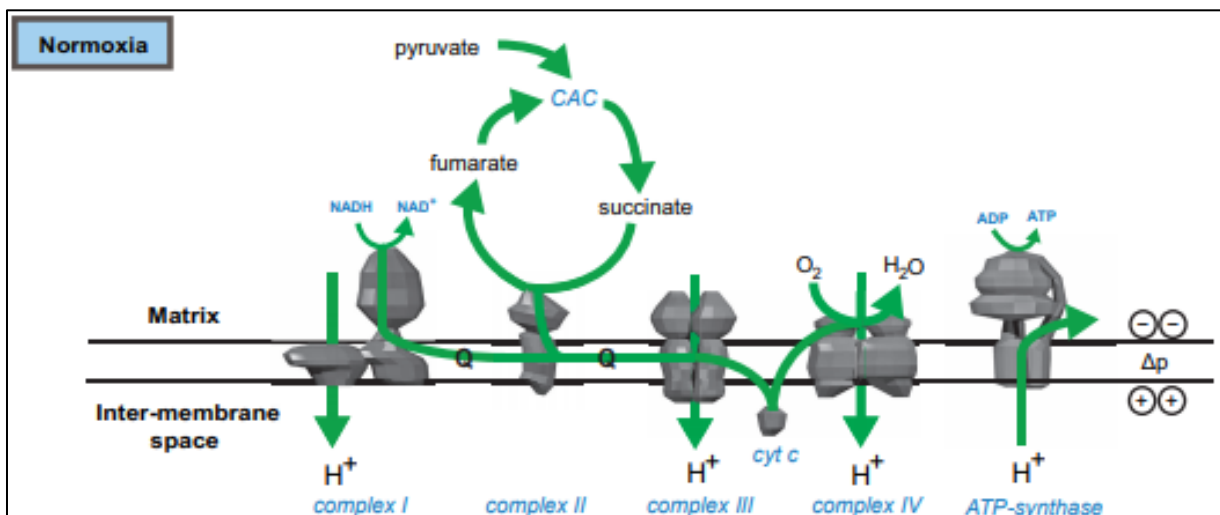
Obrázek 1 – Schématické znázornění Krebsova cyklu a s ním souvisejících reakcí. A) Glykolýza. B) Pentozofosfátový cyklus. C) Glutaminolýza. D) β-oxidace mastných kyselin (Jochmanova et al., 2016)

Oxidativní fosforylace

Energie vzniklá katabolismem substrátu v glykolýze a Krebsově cyklu se ukládá do redukováných koenzymů NADH a FADH₂, které putují do ETC. Ze získaných 2 molů NADH se vytvoří 3 moly ATP a 1 mol FADH₂ dá vzniknou 2 molům ATP (King et al., 2006).

Proteiny ETC a oxidativní fosforyláza (F₁F₀-ATPáza) jsou lokalizovány na vnitřní membráně mitochondrie. Díky umístění mitochondrií v těsné blízkosti myofilament přerušovaných pouze Z-liniemi, je F₁F₀-ATPáza co nejbližší hlavnímu místu spotřeby ATP.

Samotný ETC se skládá ze 4 enzymatických komplexů (obr. 2). V komplexu I dochází k oxidaci NADH na NAD⁺ a přesunu elektronů na ubiquinon, který redukuje na ubiquinol. Na komplexu II zase dochází k oxidaci FADH₂ na FAD a rovněž k přesunu elektronů na ubiquinon. Z ubiquinolu jsou elektrony přesunuty na komplex III, který je po jednom přesouvá přes vnitřní membránu na cytochrom c, ze kterého pokračují na komplex IV (cytochrom oxidáza), kde za spotřeby kyslíku vzniká voda. Energie uvolněná přenosem elektronů skrz jednotlivé komplexy je využita k transportu vodíkových iontů do mezimembránového prostoru. Vzniklý protonový gradient je využit F₁F₀-ATPázou na tvorbu ATP fosforylací ADP. Funkce F₁F₀-ATPázy je přímo regulována množstvím ADP, respektive poměrem ADP ku ATP. Pokud je hladina ATP vysoká, je pumpa alostericky inhibována (Li et al., 2013; Turrens, 2003; Zhao et al., 2019).

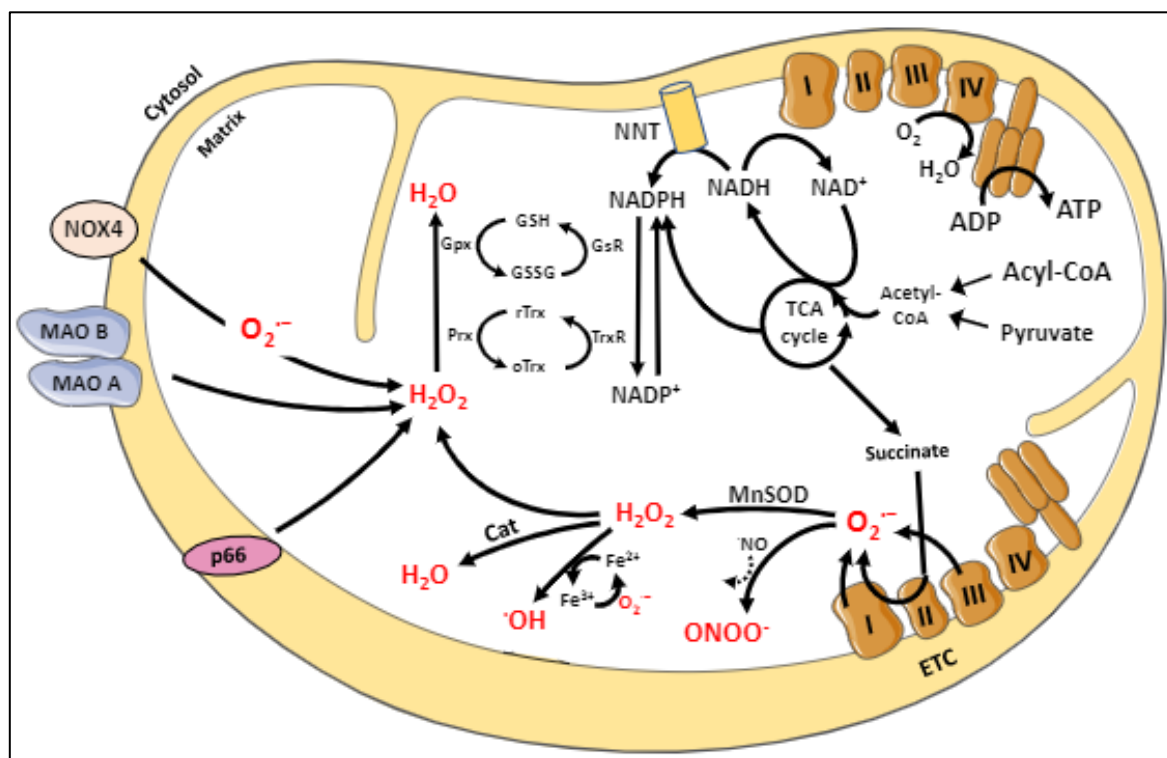


Obrázek 2 – Elektronový transportní řetězec (Chouchani et al., 2014)

Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou kyslíkaté sloučeniny obsahující alespoň jeden nepárový elektron. Účastní se enzymatických reakcí, signalizace, aktivace transkripčních faktorů a genové exprese. Hlavním zdrojem ROS je ETC, především komplexy I a III. Pokud nejsou ROS dostatečně rychle odbourávány antioxidanty dochází k jejich hromadění v buňkách. Při vysoké koncentraci mají naopak negativní efekt. Poškozují DNA, proteiny a lipidy (Bayr, 2005; Chouchani et al., 2014). Mitochondrie, jako hlavní místo tvorby ROS, jsou jejich negativnímu vlivu i nejvíce vystavené. Mitochondriální DNA (mtDNA) se nachází přímo v blízkosti největší tvorby ROS a nemá na rozdíl od jaderné DNA opravné mechanismy a dostatek histonů, které by ji ochránili. Poškození a mutace v mtDNA jsou spojovány s tvorbou dalších ROS a kardiovaskulárními chorobami (Misra et al., 2009). Před nadměrným oxidačním stresem se buňky chrání antioxidantními systémy (obr. 3).

Mezi enzymy antioxidantního systému patří superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx) a kataláza (CAT). Dalšími antioxidanty jsou například koenzym Q10 (ubiquinon), bilirubin či L-karnitin. Významné antioxidanty jsou také vitamíny, zejména vitamín E, β -karoten (provitamin A) a vitamín C (askorbát). Vitamín C funguje buď přímo jako antioxidant nebo také jako kofaktor pro vitamín E (Bugger & Pfeil, 2020; Dhalla et al., 2000; Rizzo et al., 2010; Scortegagna et al., 2003).



Obrázek 3 – Schématické znázornění tvorby a neutralizace ROS (Bugger & Pfeil, 2020)

Ischemicko-reperfuzní poškození myokardu

Ischemie myokardu vzniká kvůli částečnému či úplnému omezení průtoku krve srdcem. Kromě sníženého přísunu živin a kyslíku je tak rovněž omezené i odplavování metabolitů. Nejčastější příčinou bývá okluze koronární tepny například trombem. Dalšími příčinami může být arteritida, spasmy či embolie (Adeyinka & Kondamudi, 2018; Widimský et al., 2009).

Reperfuze je znovuobnovení průtoku krve ischemickou tkání a tím nastolení normoxie. Přestože je včasná reperfuze nezbytná pro přežití postiženého myokardu, dala by se označit za „dvoječnou zbraň“, protože je často spojena s ještě dalším poškozením myokardu, než který způsobila samotná ischemie.

Ischemie myokardu

Během ischemie klesá efektivita oxidativní fosforylace mastných kyselin a aerobní glykolýza, jenž jsou za normoxie hlavním zdrojem ATP. Začíná převládat anaerobní glykolýza, která není schopná pokrýt poptávku ATP a jeho hladina v myokardu se snižuje. Klesá i hladina kreatinfosfátu (Sanada et al., 2011). Zvýšenou glykolýzou dochází ke snížení intracelulárního pH kvůli hromadění laktátu vzniklého z redukce pyruvátu. Nadměrná koncentrace H^+ snižuje kontraktilitu interakcí s troponinem C a zabráněním tak vytvoření Ca^{2+} -troponin C komplexu, což může přispívat ke tvorbě ischemických arytmií (Raedschelders et al., 2012). Zvýšená acidóza navíc inhibuje glykolýzu a oxidaci zbytků mastných kyselin v mitochondriích, čímž se ještě víc snižuje už tak značně omezená tvorba energie (Buja, 2005).

Kromě acidózy dochází absencí ATP k narušení iontové rovnováhy selháním aktivního transportu iontů přes buněčné membrány. Kvůli nefunkčnosti sodno-draselné pumpy a SERCA a současnému otevření L-typu napětově řízených Ca^{2+} kanálů se zvyšuje intracelulární koncentrace sodných a vápenatých iontů a dochází k efluxu iontů draselných. Ke zvýšení koncentrace Na^+ přispívá ještě aktivovaný pH regulační systém zahrnující mimo jiné $Na^+-HCO_3^-$ transportér a Na^+-H^+ výměník. Vysoká hladina Na^+ a nízké pH způsobí sníženou účinnost Na^+-Ca^{2+} výměníku na plasmatické membráně a podporuje hromadění Ca^{2+} (Turrer et al., 2010). Tyto změny vedou k bobtnání mitochondrií, sarkoplazmatického retikula a cytoplasmy. Poškození mitochondriální membrány může vést k uvolnění zásob Ca^{2+} a dalšímu zvýšení koncentrace v cytoplasmě. S postupující

ischemií dochází vlivem trvalého zvýšení plasmatického Ca^{2+} k aktivaci fosfolipázy. Produkty degradace fosfolipidů se společně s v mitochondriích naakumulovaných volných mastných kyselinách, acyl karnitinu a mastných kyselinách s navázaným Acyl-CoA začleňují do membrán, narušují jejich funkci a utvářejí v nich trhliny (Buja, 2005). Snížením gradientu Na^+ a zvýšenou koncentrací Ca^{2+} běží Na^+ - Ca^{2+} výměník na mitochondriální membráně opačným směrem a zvyšuje koncentraci Ca^{2+} v mitochondriích. Pokud překročí hladina Ca^{2+} v mitochondriích určitou hladinu, může to způsobit otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP) a způsobit smrt buňky. Jeho otevření je však během ischemie inhibováno nízkým pH buňky (Murphy & Steenbergen, 2008).

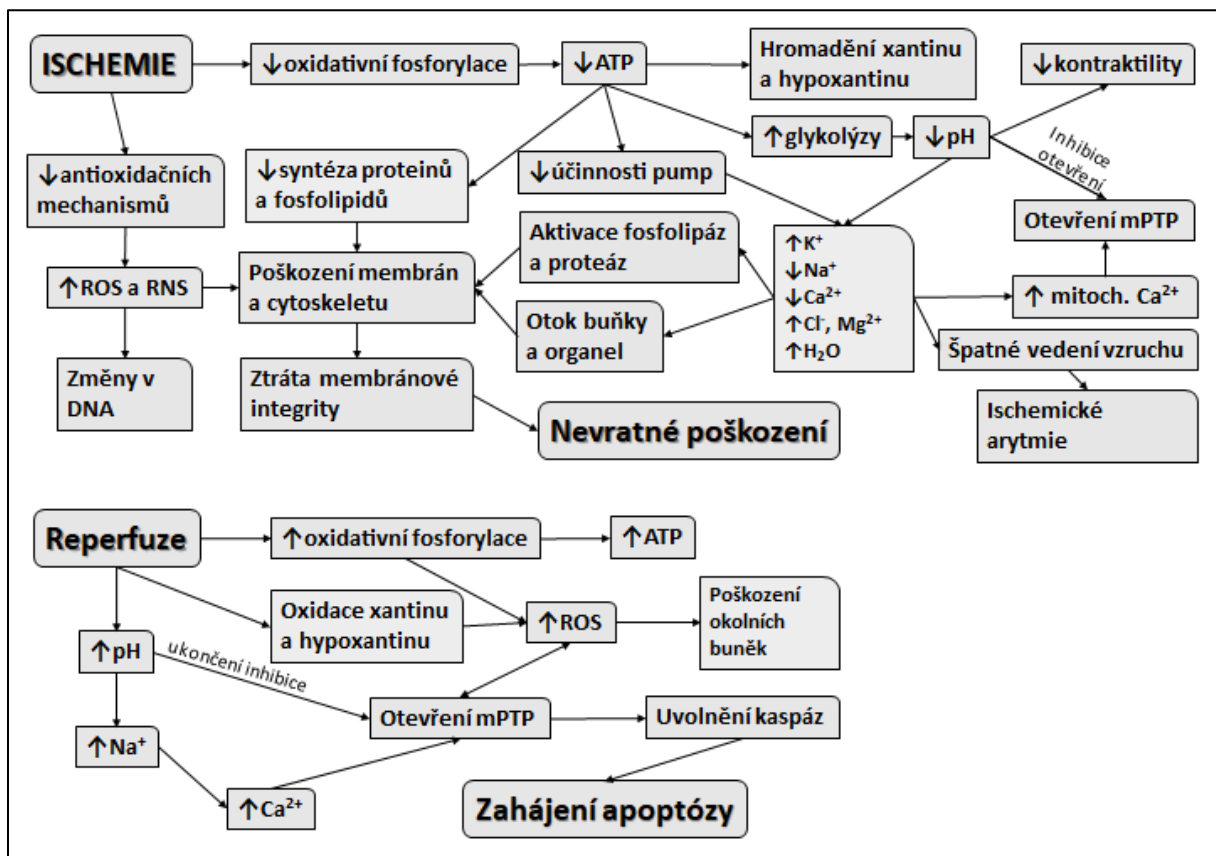
Během ischemie také vznikají ROS a reaktivní formy dusíku v kardiomyocytech, endotelu a aktivovaných leukocytech a hromadí se kvůli omezení antioxidantních mechanismů. Poškozují DNA, membránové fosfolipidy a aktivují proteázy, které poškozují cytoskelet (Buja, 2005; Rodrigo et al., 2013). Ve vysokých koncentracích mohou způsobit nevratné poškození a smrt buňky. Děje probíhající v průběhu ischemie jsou znázorněné na obrázku 4.

Reperfuze myokardu

Po obnovení průtoků se k buňkám dostane kyslík a živiny potřebné pro tvorbu ATP a vyplaví se metabolity. Nahromaděný laktát je oxidován na CO_2 a H_2O a tím se extracelulární pH stabilizuje na fyziologické hodnotě již do 2 minut od reperfuze. Stabilizace extracelulárního pH vytvoří gradient pro H^+ ionty, které opouštějí buňku výměnou za Na^+ . Masivní influx Na^+ může způsobit reverzní chod Na^+ - Ca^{2+} výměníku na plasmatické membráně, což má za následek ještě další zvýšení intracelulárního vápníku (Sanada et al., 2011), který může vést k otevření mPTP, jehož inhibice způsobená nízkým pH za ischemie již v této fázi reperfuze pominula. To vede ke ztrátě elektrochemického potenciálu na vnitřní mitochondriální membráně, uvolnění ROS do cytoplazmy a může to vést k zahájení apoptózy prostřednictvím kaspáz (Turer et al., 2010). Po otevření mPTP se ještě zvýší produkce ROS, kvůli úniku cytochromu c a NADPH z mitochondrií (Andrienko et al., 2017). Inhibice mPTP během reperfuze má tedy příznivý vliv na snížení rozsahu infarktu myokardu vzniklého během reperfuze (Piot et al., 2008).

ROS vznikají již během ischemie, ale absencí kyslíku v buňce není jejich koncentrace příliš vysoká. Během reperfuze jejich tvorba akceleruje již v první minutě

kvůli přísunu nového substrátu. ROS se šíří skrze *gap junctions* do okolního myokardu, poškozují buňky a mohou i otevřít mPTP (tzv. mechanismus „*ROS-induced ROS release*“). Dalším zdrojem ROS je enzym xantin reduktáza, který po obnovení průtoku začne metabolizovat naakumulovaný hypoxantin a xantin (výsledek degradace AMP) na kyselinu močovou za vzniku ROS (Boban et al., 2014; Turrer et al., 2010). Podávání antioxidantů jako například vitamínu E způsobuje snížení oxidativního stresu, kterému je buňka vystavena, a sníží velikost infarktu způsobeného ischemicko-reperfučním (I/R) poškozením (Dhalla et al., 2000). Stejně pozitivní účinek na snížení produkce ROS má i infuze vitamínu C podávaného v dostatečně vysokých dávkách, aby byla plasmatická koncentrace alespoň 10 mmol/l (Rodrigo et al., 2013). Děje probíhající v průběhu reperfuze jsou znázorněné na obrázku 4.



Obrázek 4 – Schématické znázornění pochodů během ischemie a reperfuze

Vliv reperfuzního poškození na činnost srdce

Na velikosti finálního infarktu myokardu se reperfuzní poškození může podílet až z 50 %. Poškození myokardu v průběhu reperfuze se může projevit čtyřmi různými formami srdeční dysfunkce (Yellon et al., 2007):

„*Myocardial stunning*“ je dočasná srdeční dysfunkce, projevující se po reperfuzi zhoršenou kontraktilní funkcí, přestože nedošlo k nevratnému poškození myokardu. Zasažená je systolická i diastolická funkce. Dysfunkce je způsobena zvýšenou koncentrací Ca^{2+} , snížením citlivosti mikrofilament na Ca^{2+} a poškozením sarkoplazmatického retikula vedoucí k rozpřažení excitace a kontrakce. Nezanedbatelný vliv má také prudký vzestup ROS během reperfuze, jenž fungují jako silné vasokonstriktory snižující vazodilatační účinky oxidu dusného na endotelové buňky a snižují tak cirkulaci krve. Efekt vymizí nejpozději do 48 hodin v závislosti na délce ischemie (Guaricci et al., 2018).

Pod pojmem „*no-flow*“ fenomén se označuje zhoršený průtok krve v ischemii postižené oblasti i přes dostatečnou obnovu průchodnosti cév. Jeho rozsah je odvíjen od velikosti infarktu, doby trvání okluze a délce reperfuze. Se zvyšující se délkou reperfuze se rapidně zvyšuje poškození perfuze (Reffelmann & Kloner, 2006). Klinicky se projevuje sníženým výdejem levé komory a její remodelací. Příčinou je edém, poškození endotelu kapilár, ucpání kapilár neutrofily a trombem a zánět kvůli nadprodukci ROS (Ito, 2006). Tato dysfunkce přetrvává minimálně 4 týdny po reperfuzi, které jsou ovšem zásadní pro uzdravení tkáně zasažené ischemií (Reffelmann & Kloner, 2006).

Reperfuzní arytmie, zejména pak síňové tachykardie a fibrilace jsou nejčastější příčiny náhlé smrti v reperfuzi. Arytmie mohou být způsobovány heterogenním vedením vzruchu, nekompletní reperfuzí, impulsy z ektopického ložiska a reentry. Hlavní příčinou je aktivace Ca^{2+} /kalmodulin závislé proteinkinázy II (CaMKII), která fosforyluje napětově řízené vápenaté kanály a ryanodinové receptory, které zapříčiní vzestup intracelulárního vápníku. Reperfuzní ROS ještě zvyšují oxidací účinnost CaMKII a tím přispívají k reperfuzním arytmiím (Said et al., 2011; Zhao et al., 2010).

Letální reperfuzní poškození je termín užívaný pro smrt buněk, které na konci ischemie ještě nebyly nereverzibilně poškozeny (Ong et al., 2015). Akumulace ROS a Ca^{2+} a rychlá obnova intracelulárního pH do fyziologických hodnot způsobí otevření mPTP, což způsobí kolaps membránového potenciálu na vnitřní membráně mitochondrie a uvolnění cytochromu c a dalších proapoptických faktorů do cytosolu (Argaud et al., 2005).

Ischemická tolerance srdce

Velikost poškození myokardu vzniklého v důsledku I/R poškození není závislé pouze na délce trvání ischemie a její intenzitě, ale také na schopnosti srdce odolávat nedostatku kyslíku. Odolnost srdce na ischemii závisí na mnoha různých faktorech jako jsou věk, váha, pohlaví a různá onemocnění.

Věk

Jedním z faktorů snižující schopnost myokardu odolávat ischemii je věk. Odhaduje se, že například v USA se více než 80 % úmrtí způsobených onemocněním koronárních tepen vyskytuje u pacientů starších 65 let (Willems et al., 2005). Zmenšená schopnost obnovit srdeční funkce po operaci srdce u starších pacientů oproti pacientům mladším naznačuje s věkem se zhoršující citlivost myokardu na ischemii. Rozdíly v toleranci jsou přisuzovány ke změnám v mitochondriích, ve kterých dochází vinou mutací mtDNA ke změnám genové exprese proteinů ETC a oxidativní fosforylace a tím snížení produkce energie. Velikou citlivost na staří prokazuje protein cytochrom c, který je kódován především mtDNA. Jeho poškození je spojováno s několika mitochondriálními nemocemi a jeho množství je výrazně zmenšené v kardiomyocytech u lidí nad 50 let. Výskyt mutací mtDNA stejně jako jaderné DNA se zvyšuje s věkem především působením ROS (Mariani et al., 2000). Citlivost na oxidativní stres se s věkem zvyšuje kvůli poklesu koenzymu Q10 (CoQ10). CoQ10 je integrální membránový protein vyskytující se především v srdci, konkrétně hlavně v ETC, kde slouží jako antioxidant. Podávání CoQ10 zvyšuje tvorbu energie mitochondriemi a snižuje rozsah I/R poškození (Rosenfeld et al., 2002).

Kromě ve stáří snížené efektivity produkce energie může za sníženou ischemickou toleranci také porucha vápníkové homeostázy. S věkem se snižuje genová exprese SERCA a prodlužuje se trvání akčního potenciálu vedoucí k delšímu otevření napěťově řízených vápenatých kanálů. Vychytávání Ca^{2+} zpět do sarkoplasmatického retikula se dá zvýšit suplementací ω -3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA), kterých ve stáří ubývá na úkor kyseliny arachidonové. Pozitivní efekt je pravděpodobně způsobován působením ω -3 PUFA na iontové kanály (Hano et al., 1995).

Pohlaví

U žen před menopauzou je nižší riziko kardiovaskulárních onemocnění oproti mužům. Tento rozdíl se po menopauze vytrácí a mortalita z důvodů ischemické choroby srdeční je u obou pohlaví totožná. Rovněž se pohlavní rozdíly nevyskytovaly při pokusech na mladých, ještě pohlavně neaktivních potkanech (Williems et al., 2005).

Estrogen má příznivý vliv na zmenšení infarktu a zlepšení kontraktilní funkce po reperfuzi různými signalizačními drahami. Zvyšuje expresi chaperonů (HSP) a β -adrenergických receptorů, zvyšuje tvorbu NO, potencuje šanci na otevření Ca^{2+} aktivovaných draselných kanálů a snižuje intracelulární hladinu Na^+ a Ca^{2+} (Ogita et al., 2002; Williems et al., 2005).

Za zmínku také stojí rozdíl v aktivitě antioxidantních enzymů CAT a GPx, která je v mozcích potkaních samic vyšší než u samců a u obou pohlaví se jejich aktivita se stářím snižuje (Sobočanec et al., 2003). Pokud se stejný trend nachází i v srdci, mohl by mít také vliv na rozdílnou ischemickou toleranci srdce v závislosti na pohlaví.

Komorbidity

Na ischemickou toleranci srdce mají také vliv přidružená onemocnění, z nichž za nejvýznamnější lze považovat vysoký krevní tlak neboli hypertenzi, chronické onemocnění ledvin (CDK) a *diabetes mellitus*.

Spolu s ICHS patří systémová hypertenze mezi nejvíce rizikové faktory způsobující chronické srdeční selhání (Widimský et al., 2003). Hypertenze má navíc negativní vliv na ischemickou toleranci srdce. Kvůli nadměrnému *afterloadu* dochází k hypertrofii levé komory, která se projevuje zhoršenou systolickou funkcí snižující práci srdce za normálních podmínek. Rovněž má hypertenze negativní dopad na vážnost I/R poškození kvůli zhoršenému energetickému metabolismu a iontové homeostáze, zejména vápníku. Také se projevuje zhoršenou obnovou kontraktilní funkce a zvýšeným výskytem arytmií (Mariani et al., 2000; Ravingerova et al., 2011). Kromě srdce poškozují hypertenze i mozek, oči, cévy a ledviny (Barri et al., 2008).

CKD může být způsobeno jako následek systémové hypertenze nebo naopak může být jeho příčina. Pacienti trpící CKD mají větší prevalenci rozvoje ischemické choroby srdeční a úmrtnost na ní. CKD se projevuje glomerulosklerózou, sníženou produkcí oxidu dusnatého, arytmiemi, uremií a městnavým srdečním selháním. Právě zvýšená uremie by

mohla být příčinou zhoršené ischemické tolerance u jedinců trpících CKD (Dikow & Hardt, 2012; Kuczmarks et al., 2014; Tonelli et al., 2016). Nahromaděná urea se v plasmě disociuje na kyanát, který může nevratně karbamylovat proteiny. To způsobuje poškození endotelu spojeného se zhoršenou schopností dilatace a zvýšení tvorby aterosklerotických plátů (Tonelli et al., 2016) a výrazně zhoršuje funkci mitochondrií v kardiomyocytech (Taylor et al., 2015). Jelikož jednou z funkcí ledvin je produkce hormonu erythropoetinu, bývá CKD spojeno i s anemií kvůli jeho snížené produkci (O'Mara, 2008).

U lidí s výskytem *diabetem mellitus* je výrazně vyšší prevalence výskytu srdečních onemocnění, zejména ischemické choroby srdeční. Vyskytuje se u nich kardiomyopatie, zvýšení I/R poškození, poškozený metabolismus glukózu a snížení nebo až úplná inhibice některých kardioprotektivních signálních drah. Na vině budou pravděpodobně změny ve složení lipidových membránách, které ovlivňují transportní funkce, kontraktilní funkci a elektrické jevy na membráně (Russell et al., 2017). Zároveň je *diabetes mellitus* jednou z nejběžnějších příčin CKD a je spojována s výskytem hypertenze (Winocour, 2018).

Kardioprotektivní fenomény

Ischemickou toleranci můžeme ovlivňovat i naším životním stylem. Činnosti jako sportování nebo přerušovaný půst mají příznivý vliv na ischemickou toleranci srdce. Jiné činnosti nám mohou zase naopak ischemickou toleranci snižovat.

Cílené vystavování se chronické hypoxii například pobytem ve vysokých nadmořských výškách je jedním ze způsobů, jak si dočasně zlepšit ischemickou toleranci srdce (Kolář & Ošťádal, 2004). U zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii dochází k menšímu infarktu myokardu, snížení ischemických arytmií a zlepšení kontraktilních funkcí po ukončení ischemie (Ošťádal & Kolář, 2007). Dalším způsobem je pravidelné cvičení. Prospěšnost krátkodobého cvičení ukázali ve své práci Demirel et al (2001), kteří nechali potkany denně běhat hodinu na běžeckém pásu při 60-70 % $VO_{2\max}$ po dobu 3 nebo 5 dní. Skupiny podrobené cvičení vykazovaly zlepšenou ischemickou toleranci srdce oproti kontrolám. Došlo u nich ke zvýšení aktivity mitochondriální SOD a zvýšení množství glutathionu a HSP72, což vede ke zlepšení antioxidačních mechanismů. Také došlo ke zlepšení kontraktility ischemií nezasažené oblasti srdce. Dalšími možnými mechanismy způsobující zlepšení jsou zlepšený energetický metabolismus a zlepšená vápníková homeostáza.

Přerušovaný půst je trendem posledních let. Jedná se o typ diety s kalorickou restrikcí s tím, že všechny kalorie se musí přijmout pouze v určité denní době. Lidé praktikující tuto dietu prokazují snížený krevní tlak a zlepšenou regulaci krevní glukózy. U potkanů řídicích se touto dietou došlo po mozkové mrtvici k menší úmrtnosti neuronů a zlepšenému neurologickému zotavení (Vemuganti & Arumugam, 2020). V srdci vyvolává hladovění zvýšenou aktivitu proteinu siturin 1, který podněcuje autofagii. Aktivování autofagie v srdci během ischemie vede ke snížení rozsahu infarktu (Sala-Mercado et al., 2010; Yamamoto & Sadoshima, 2011).

Naopak nadměrné přejídání vedoucího k obezitě je jedním z faktorů, kterým si můžeme ischemickou toleranci srdce snížit. V pokusech prováděných skupinou Clark et al. (2011) na potkaních, vedla obezita k dyslipidémii, zvýšené hladině inzulínu a glukózy a inzulínové toleranci. Tyto faktory způsobily větší rozsah infarktu po *in vivo* vyvolané ischemii. I zde hrálo roli pohlaví, poněvadž samice během vysokokalorické diety nenabraly takovou váhu a všechny jejich hodnoty včetně rozsahu infarktu byly oproti samcům lepší. Dalším negativním faktorem je kouření, které zvyšuje šanci na onemocnění ledvin (Tonelli et al., 2016) a tvorbu aterosklerotického plátu (Widimský et al., 2003).

Ischemickou toleranci srdce také můžeme ovlivňovat podáváním různých látek zasahujících do dějů během I/R. Podávání enzymu Nampt inhibuje apoptózu a podporuje autofagii (Hsu et al., 2009), cyklosporin zase inhibuje otevření mPTP (Ong et al., 2015), rotenon snižuje produkci ROS během reperfuze inhibicí komplexu I ETC (Lesnefsky et al., 2004) a podávání nitroglycerinu zmenšuje výskyt reperfučních i ischemických arytmií (Yui et al., 2011). Také suplementace antioxidantů jako CoQ10 (Rosenfeld et al., 2002), vitamin E (Coombes et al., 2000) nebo vitamin C (Spoelstra-de Man et al., 2018) zlepšuje odolnost srdce vůči oxidativnímu stresu a snižuje velikost I/R poškození.

V posledních několika letech se ukazuje, že i sukcinát by mohl mít vliv na zlepšení ischemické tolerance srdce, proto se začíná věnovat zvýšená pozornost jeho účinkům nejenom v rámci Krebsova cyklu.

Sukcinát

Sukcinát je anion kyseliny jantarové, běžně se vyskytující v přírodě ve všech živočišných a rostlinných tkáních, rašelině anebo například uhlí. Je jedním z meziproduktů v Krebsově cyklu, ve kterém je tvořen ze sukcinyl-CoA a následně je přeměněn na fumarát, který v cyklu pokračuje dál (Saxena et al., 2017).

V matrixu mitochondrií je činností sukcinyl-CoA syntetázy ze sukcinylu-CoA odstraněna CoA-SH skupina a vzniká tím sukcinát. Ten se přesouvá k vnitřní membráně mitochondrií, kde je ukotven enzym sukcinátdehydrogenáza (SDH). SDH je jediný enzym Krebsova cyklu volně se nenacházející v matrixu mitochondrií, ale je ukotven na vnitřní membráně jako součást ETC (komplex II). Sukcinát tak slouží i jako přímý donor elektronů do ETC. SDH se skládá ze 4 podjednotek. SDHC a SDHD jsou hydrofobní a slouží k ukotvení v membráně. Mezi nimi je uložena molekula hemu B. SDHA a SDHB jsou hydrofilní a mají enzymatickou aktivitu. SDHA je flavoprotein a obsahuje vazebné místo pro sukcinát a hlavní vazebné místo pro ubichinon. SDHB je protein obsahující Fe-S klastry a spojuje SDHA s kotvou. Sukcinát se váže na SDHA, dochází k jeho oxidaci na fumarát a uvolnění. Současně je FAD redukován na FADH₂. Elektrony z FADH₂ jsou následně přesouvány mezi Fe-S klastry v podjednotce SDHB až na ubichinon, což ho redukuje na ubichinol (Sun et al., 2005; Tretter et al., 2016; Zhao et al., 2019).

Koncentrace sukcinátu v mitochondriích je za normoxie přibližně 0,5 mM. Vlivem ischemie může tato koncentrace vystoupat až na 6 mM (Prag et al., 2021; Tretter et al., 2016) a následně může dojít k jeho efluxu do cytosolu. Přes vnitřní mitochondriální membránu je přenesen pomocí sukcinát-fumarát/malátového transportéru. Přes vnější pak již prostupuje volně pomocí porinů (Selak et al., 2005).

Působení sukcinátu mimo mitochondrie

V cytosolu může sukcinát zasahovat do různých procesů (obr. 5). Nepřímo způsobí zvýšení hladiny hypoxií indukovaného faktoru (HIF) inhibicí degradačních enzymů HIF, prolylhydroxyláz (Selak et al., 2005). Zvýšení sukcinátu vede ke zvýšení sukcinyl-CoA, který v cytosolu a jádře může sukcinylovat proteiny a tím modifikovat jejich vlastnosti. Sukcinát se váže aminovou vazbou nejčastěji k lysinovým zbytkům. V závislosti na pH cytosolu se může vázat i na histidinové a argininové zbytky (Tretter et al., 2016). Inhibicí demethyláz podporuje metylaci DNA a histonů, což může mít nejrůznější dopad na změnu genové exprese (Murphy et al., 2018; Xiao et al., 2012).

Během reperfuze se přibližně 50 % ischemií naakumulovaného sukcinátu vrátí do mitochondrií, kde je oxidován. Zbytek je transportován přes cytoplasmatickou membránu do krevního řečiště symportem s H⁺ přes monokarboxylový transportér 1. Hnací silou je rozdíl pH mezi cytosolem a krevním řečištěm (Prag et al., 2021; Reddy et al., 2020).

Působení sukcinátu v krevním řečišti

Fyziologická hladina sukcinátu v krevním řečišti je u člověka 2-20 μM a fyzickou zátěží může vystoupat až téměř na 100 μM (Grimolizzi & Arranz, 2018). Rovněž se jeho koncentrace zvedá při hypertenzi, *diabetu mellitus* (Sadagoban et al., 2007) a při I/R poškození, kdy jeho hladina přímo koreluje s vážností poškození (Kohlhauer et al., 2018).

Receptorem pro extracelulární sukcinát je receptor vázaný s G-proteinem, GPR91. Podle tkáně interaguje GPR91 s G_i nebo G_q proteinem a předpokládá se, že může interagovat i s G_s proteinem, takže odpověď vyvolaná jeho aktivací je velmi variabilní. GPR91 je exprimován v ledvinách, játrech, srdci, adipocytech, retině a různých krevních buňkách (de Castro et al., 2016; Grimolizzi et al., 2018). Koncentrace, při které vyvolá aktivace GPR91 polovinu maximální odpovědi je 30-70 μM . To ukazuje, že stačí pouze mírné zvýšení hladiny krevního sukcinátu k aktivaci GPR91 (Sadagopan et al., 2007).

Játra jsou cílem mnoha růstových hormonů, které se váží přímo na hepatocyty, nebo další buňky jako jsou například stelární buňky. Vlivem oxidativního stresu se v hepatocytech tvoří sukcinát, opouští je a aktivuje stelární buňky vazbou na GPR91, které začínají tvořit α -aktin 2, kolagen I a TGF- β . V retině je GPR91 exprimován především v gangliových buňkách a vazba na receptor způsobí neovaskularizaci. V cévách zase způsobí proliferaci endotelových buněk. V ledvinách vede signalizace přes GPR91 k aktivaci buněk *macula densa*, které stimulují buňky juxtaglomerulárního aparátu k sekreci reninu. Renin přes renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS) způsobí zvýšení krevního tlaku vasokonstrikcí periferních cév (de Castro et al., 2016). Během fyzické zátěže je sukcinát ze svalů uvolňován do mezibuněčného prostoru, kde interaguje s GPR91 receptory na kosterních svalech a indukuje jejich remodelaci, zlepšuje citlivost na inzulin a přispívá k regulaci inervace svalu (Reedy et al., 2020).

V srdeční svalovině hraje signalizace sukcinátem důležitou roli v regulaci tloušťky komor a regulaci krevního tlaku. Dlouhodobé vystavení sukcinátu může vést k srdeční hypertrofii. K té dochází i při paralelní inhibici RAAS. Jedná se o přímou aktivaci GPR91 v srdci, a ne důsledek zvýšeného krevního tlaku způsobeného aktivací GPR91 v ledvinách. Aktivace GPR91 se zdá být dokonce esenciální spouštěč hypertrofie, protože u GPR91-KO potkanů, kterým byl sukcinát podáván nedošlo k rozvoji hypertrofii a v jejich krvi nebyly ani přítomny markery prokazující hypertrofii, které byly naopak u kontrol ve dvounásobné koncentraci (Aguiar et al., 2014).

Hypoxií indukovaný faktor

HIF je klíčový transkripční faktor v buněčné odpovědi na hypoxii. Přímo regulací exprese stovek genů způsobuje změny v metabolismu glukózy, signalizaci, vasodilataci a remodelaci cév, migraci buněk a erythropoézu (Wang et al., 1995). Jeho přímá souvislost s hladinou intracelulárního kyslíku je dána podjednotkou HIF α , která je za normoxie degradována. Podjednotka HIF β je na kyslíku zcela nezávislá (De Jesus et al., 2018)

Hlavními regulátory intracelulární koncentrace HIF za normoxie jsou enzymy PHDs, patřící do skupiny dioxygenáz, které hydroxylyjí prolinové zbytky na HIF α (Bugg, 2003). Ke své funkci potřebují α -ketoglutarát, dvojmocné železo a především kyslík (Kanelakis et al., 2009). Činnost PHDs je kromě absencí substrátu inhibována ROS a sukcinátem (Yang et al., 2014) Po hydroxylaci prolinových zbytků na protein nasedne *von Hippel-Lindau tumor suppressor* a označí podjednotku k degradaci 26S proteozomální cestou (King et al., 2006; Leung & Ohh, 2002). Za hypoxie nemůže kvůli absenci kyslíku dojít k hydroxylaci prolinových zbytků. HIF α se přesouvá do jádra a dimerizuje s HIF β (Jain et al., 2016). Zde může být regulován další dioxygenázou, faktorem inhibujícím HIF, který je však rovněž za hypoxie nefunkční (Zhang et al., 2010).

Po nasednutí stabilizovaného HIF na DNA se spustí transkripce až 1000 různých cílových genů zasahujících do nejrůznějších buněčných pochodů. U některých genů HIF přímo reguluje jejich genovou expresi, jiné reguluje nepřímo prostřednictvím dalších transkripčních faktorů (Semenza, 2014).

Nejdůležitějšími procesy na buněčné úrovni, do kterých HIF zasahuje je snižování oxidačního stresu a změny v metabolismu glukózy. Nadprodukcí ROS v mitochondriích může snížit úpravami v ETC, omezením přístupu pyruvátu do mitochondrií a transkripcí antioxidantních enzymů SOD, GPx a CAT (Li et al., 2013; Scortegagna et al., 2003). Expresí glukozových transportérů 1 a 3 podporuje anaerobní glykolýzu zvýšeným přísunem glukózy do cytosolu (Chen et al., 2001). Na orgánové úrovni zase HIF podporuje adaptaci na hypoxii především erythropoézou a neovaskularizací. Erythropoézu podporuje jednak expresí erythropoetinu a jeho receptoru a jednak i transkripcí dalších genů regulujících absorpci, transport a utilizaci železa (Prabhakar & Semenza, 2012). Proces neovaskularizace v hypoxických tkáních je po stabilizaci HIF zahájen transkripcí vaskulárních endoteliálních růstových faktorů a angiopoetinů, které stimulují endoteliální buňky (Novotný & Zikán, 2010).

Cíle práce

- 1) Zjistit, jak ovlivní akutní podání sukcinátu před ischemií a v průběhu reperfuze ischemickou toleranci srdce
 - a. Rozsah infarktu myokardu
 - b. Výskyt ischemických a reperfuzních arytmií
- 2) Zjistit, jak ovlivní akutní podání sukcinátu pouze v průběhu reperfuze akutní ischemickou toleranci srdce
 - a. Rozsah infarktu myokardu
 - b. Výskyt reperfuzních arytmií

Metodika

Všechny pokusy jsem prováděl na Fyziologickém ústavu (FgÚ) Akademie věd České republiky (AVČR) na oddělení Vývojové kardiologie pod vedením školitele a v souladu se schváleným projektem pokusů (75/2016).

Experimentální zvířata

K pokusům se využívali dospělí samci potkanů z kmene Wistar pocházející z chovu FgÚ. Po převozu z hlavního zvěřince byla zvířata ponechána alespoň dva dny v klidu v příručním zvěřinci, aby případný stres z převozu neovlivnil plánované experimenty. Zvířata byla chována po 2-3 jedincích v plastových boxech s podestýlkou z pilin. V místnosti byla udržována konstantní teplota na 21-23 °C a 12hodinový režim světlo/tma. K vodě i potravě ve formě granulí měli přístup *ad libidum*. V den pokusu potkani vážili průměrně 349 ± 8 g a byli staří 3-4 měsíce.

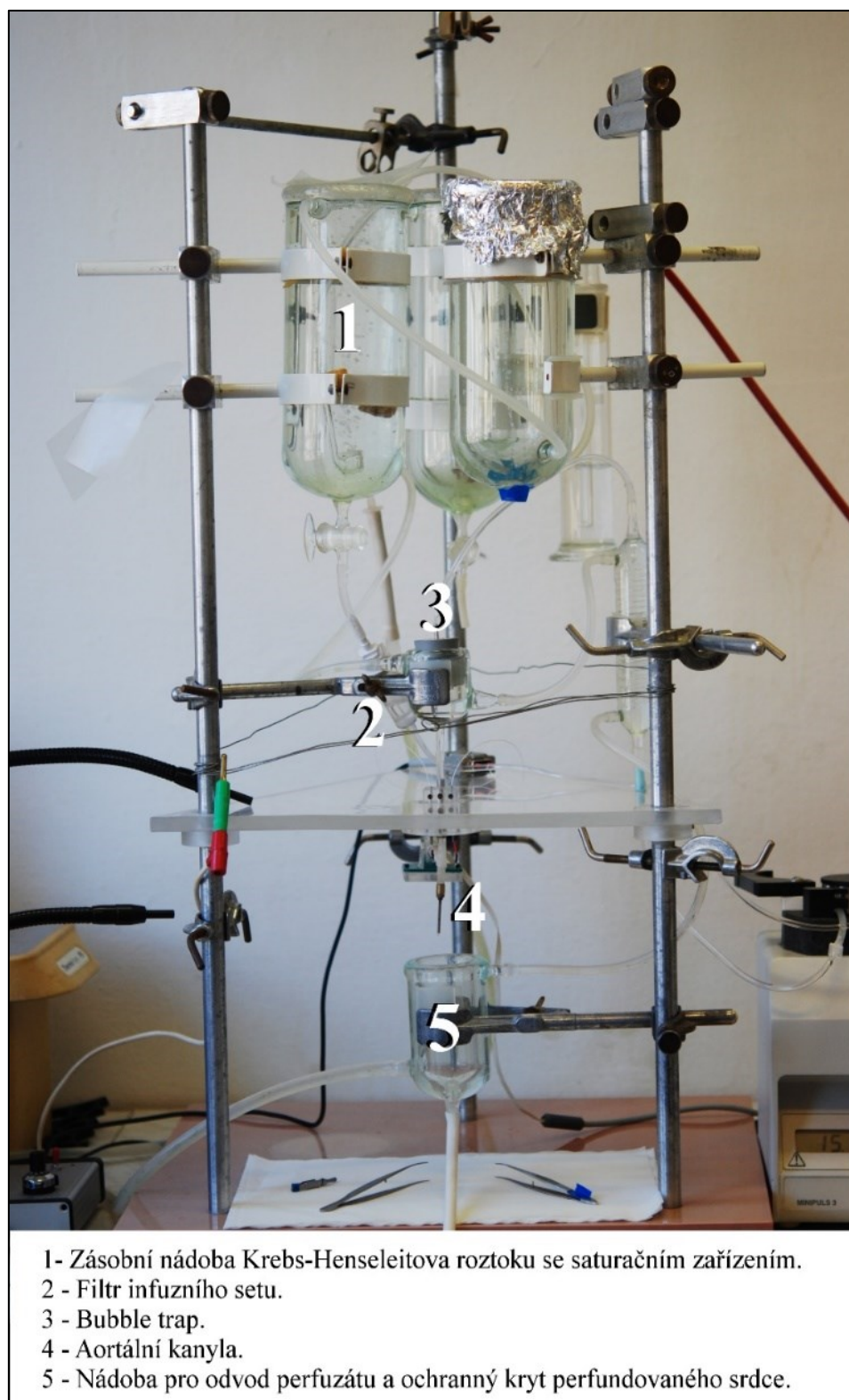
Materiál a chemikálie

Ischemická tolerance srdce byla testována na modelu izolovaného perfundovaného srdce podle Langendorffa za konstantního průtoku, kdy byl použit Krebs-Henseleitův roztok jako živné médium. Roztok byl připravován nový vždy v den pokusu. Na jeho přípravu je potřeba destilovaná voda, chlorid sodný (NaCl), chlorid draselný (KCl), dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) a bezvodá glukóza v množství uvedeném v tabulce č. 1.

Chemikálie	[mM]	[g/5 l]
NaCl	118,0	34,50
KCl	4,7	1,75
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	1,84
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2	1,48
NaHCO_3	25,0	10,50
KH_2PO_4	1,2	0,82
Glukóza	7,0	6,30

Tabulka č. 1 – Chemikálie a jejich množství potřebné na přípravu Krebs-Henseleitova roztoku použitého na 2-3 pokusy, podle hmotnosti zvířat a délky experimentálního protokolu

Aparatura pro model izolovaného perfundovaného srdce s necirkulujícím roztokem je složená ze zásobních nádob, infuzního setu s filtrem, spirálovým chladičem, *bubble trapu*, kovové kanyly a ochranné komůrky s odtokem (obr. 6).



Obrázek 6 – Aparatura pro model izolovaného perfundovaného srdce podle Langendorfa (Škutová, 2018)

Celá aparatura byla vždy na začátku dne i po pokusech důkladně promyta destilovanou vodou a vyčištěna. Filtr infuzního setu, nutný pro finální očištění perfuzního roztoku, se měnil každý den. Jednotlivé hadičky, kterými roztok protékal, se měnily dle výskytu lokálního znečištění, které bylo pravidelně kontrolováno na počátku dne. Dle potřeby se dávalo také laboratorní sklo na 48 hodin do kyseliny chromsírové k důkladnému očištění.

Zásobní baňky, chladič, *bubble trap* i ochranná komůrka s odtokem byly vyhřívány, aby měl proudící živný roztok stálou teplotu 37 °C. Roztok v zásobních baňkách byl po celou proceduru probubláván karbogenem (95 % O₂, 5 % CO₂).

Konstantní průtok roztoku aparaturou byl zajištěn peristaltickou pumpou, jejíž rychlost se nastavovala individuálně pro každé zvíře v závislosti na váze srdce. Vycházelo se z předpokladu, že by mělo srdce o hmotnosti 1 gram být perfundováno cca 10 ml Krebs-Henselitova roztoku za minutu. Váha srdce se odhadovala podle hmotnosti zvířete, z dat získaných FgÚ AVČR v letech 2012-2017 (obr. 7). Pokud měli potkani vyšší hmotnost, než byla v tabulce, tak byla rychlost průtoku dopočítána a rozdíl v rychlostech byl následně odečten od rychlosti vycházející pro nejvyšší hmotnost.

m potkana	m srdce	m potkana	m srdce	m potkana	m srdce
250	642,2	284	733,4	318	825,1
251	644,9	285	736,1	319	827,8
252	647,5	286	738,8	320	830,6
253	650,2	287	741,5	321	833,3
254	652,9	288	744,2	322	836
255	655,6	289	746,9	323	838,7
256	658,2	290	749,6	324	841,4
257	660,9	291	752,3	325	844,1
258	663,6	292	755	326	846,8
259	666,3	293	757,7	327	849,5
260	669	294	760,4	328	852,2
261	671,6	295	763,1	329	854,9
262	674,3	296	765,7	330	857,6
263	677	297	768,4	331	860,3
264	679,7	298	771,1	332	863
265	682,4	299	773,8	333	865,7
266	685,1	300	776,5	334	868,4
267	687,7	301	779,2	335	871,2
268	690,4	302	781,9	336	873,9
269	693,1	303	784,6	337	876,6
270	695,8	304	787,3	338	879,3
271	698,5	305	790	339	882
272	701,2	306	792,7	340	884,7
273	703,9	307	795,4	341	887,4
274	706,5	308	798,1	342	890,1
275	709,2	309	800,8	343	892,8
276	711,9	310	803,5	344	895,6
277	714,6	311	806,2	345	898,3
278	717,3	312	808,9	346	901
279	720	313	811,6	347	903,7
280	722,7	314	814,3	348	906,4
281	725,4	315	817	349	909,1
282	728	316	819,7		
283	730,7	317	822,4		

Obrázek 7 – Pravděpodobná hmotnost srdce odvozena z hmotnosti zvířete u kmene Wistar na základě křivky lineární regrese, $y = 0,884x + 593,3$; m = hmotnost

Koronární tlak byl měřen a zaznamenáván po celou dobu pokusu v bočním raménku aparatury umístěným těsně nad aortální kanylou snímačem připojeným na zesilovač. Pro měření srdeční frekvence a EKG byly použity dvě elektrody umístěné na apex komor a ouško pravé síně. Záznam byl nahráván programem *Cardiac Arrhythmias Recorder* (CAR) a hodnocen programem *Cardiac Arrhythmias Analysis* (CAA). Oba programy byly vytvořeny přímo na oddělení Vývojové kardiologie.

Průběh pokusu

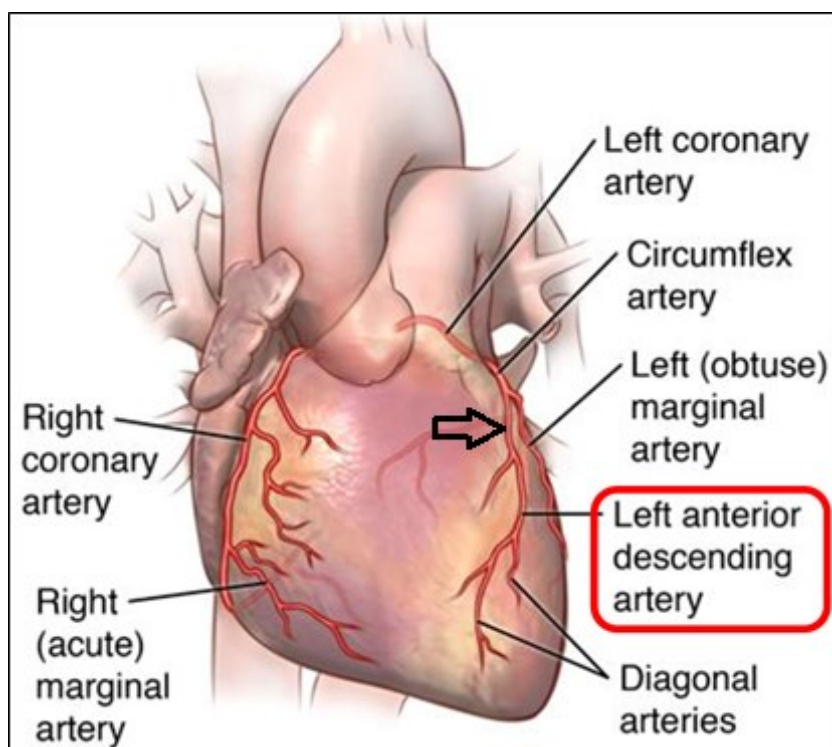
Pokusy byly prováděny v dopoledních až brzkých odpoledních hodinách. Za jeden den byly obvykle provedeny dva experimenty, výjimečně i třetí. Pokud byly za den prováděny pokusy tři, tak bylo potřeba před posledním znovu vyměnit filtr infuzního setu, protože již býval zanesen a mohl tak zpomalovat průtok roztoku srdcem.

Příprava roztoku

Jednotlivé chemikálie byly podle tabulky č. 1 naváženy a za stálého míchání přidávány do 5l nádoby s destilovanou vodou, která byla na ohřevu. Z praktického hlediska se chemikálie rozmíchávaly zprvu pouze ve 2 litrech destilované vody a zbytek byl dolit po přidání a rozmíchání poslední chemikálie. Kvůli riziku vysrážení a tím znehodnocení roztoku se $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ připravil zvlášť v 1l odměrném válci a byl doplněn do finálního média až jako poslední. Následně byl roztok saturován alespoň 20 minut karbogenem. Po dostatečně dlouhé saturaci a dosažení teploty roztoku $37\text{ }^\circ\text{C}$ (měřeno rtuťovým teploměrem) byl plastovou pipetou přidáván po kapkách koncentrovaný roztok kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu draselného, aby se ustálilo pH roztoku na 7,40. Požadované pH se měřilo elektrickým pH metrem, jenž byl před každým měřením nově kalibrován třístupňovou kalibrací. Poté byl roztok přefiltrován za pomoci vakuové pumpy s filtračním nástavcem (filtrační membrána měla velikost pórů $1,2\text{ }\mu\text{m}$), aby se zbavil prachu a dalších možných nečistot. Roztok se sukcinátem se připravil tak, že se po přefiltrování část roztoku odlila a rozpustil se v něm sukcinát sodný ($0,27\text{ g/l}$), aby vznikl 1 mM roztok. Kvůli velmi dobré rozpustnosti sukcinátu stačilo prosté rozmíchání v odměrném válci. Finální roztoky se přelily do zásobních válců aparatury.

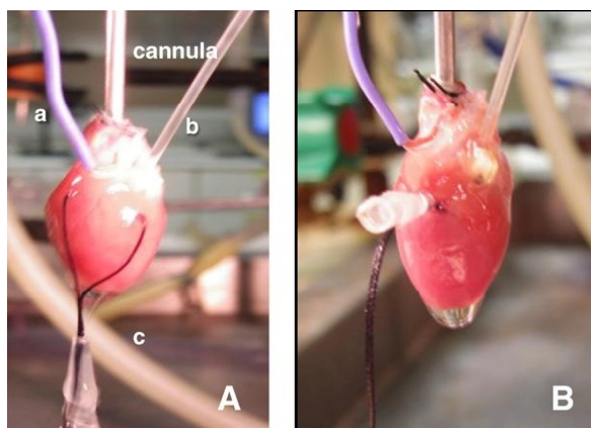
Průběh experimentu

Potkani byli uspáni intraperitoneální (i. p.) aplikací pentobarbitalu sodného (150 mg/kg váhy). Hloubka anestezie se testovala štípnutím do konce ocasu a rohovkovým reflexem. Následně byl proveden příčný řez dutinou břišní těsně pod hrudním košem. Následovalo odstranění bránice a přestřížení žeber po obou stranách hrudního koše a jeho odklopení. Srdce bylo i s aortou vystřiženo a co nejrychleji napojeno přes aortu na kovovou kanylu s již tekoucím perfuzním roztokem a provizorně uchycené svorkou. Uchycení svorkou bylo co nejdříve nahrazeno hedvábnou nití, která zamezila protékání roztoku okolo aortální kanyly. Ustřižená aorta musela dosahovat dostatečné délky, aby mohla být kovová kanyla v takové výšce, kdy se roztok může dostat do koronárních tepen, tj. těsně nad bází srdce. Mezi otevřením hrudního koše a utažení hedvábné nitě byla prodleva, ve které se srdce nacházelo kompletně mimo oběh, maximálně do 90 vteřin. Tepající perfundované srdce se očistilo od přebytečné extrakardiální tkáně a chirurgickou jehlou se šicím vláknem se připravil podvaz okolo sestupné větve levé koronární (LAD) arterie (obr. 8). Přesná poloha arterie byla odhadována podle srdeční vény, jenž je na obnaženém srdci jasně vidět a prochází těsně vedle LAD arterie. Do pravého ouška a apexu komor se připevnilly elektrody pro registraci EKG a srdeční frekvence.



Obrázek 8 – Cévní zásobení srdce, šipkou je znázorněné ideální místo podvazu omezující průtok sestupnou větví levé koronární arterie (left anterior descending artery; Wills, 2017)

Srdce se nechalo stabilizovat v perfuzním systému po dobu 20 minut před okluzí koronární arterie (obr. 9A). Po celou dobu experimentu bylo srdce chráněno umístěním v komůrce, rovněž vyhřívané na teplotu 37 °C. V 19. minutě stabilizace bylo zapnuté nahrávání EKG a tlaku a po 30 vteřinách byla provedena lokální ischemie utážením podvazu provléknutého tenkou trubičkou, která tak tlačila na LAD arterii a omezovala průtok (obr. 9B). Utažený podvaz byl zajištěn svorkou. Úspěšný podvaz byl indikován okamžitým zvýšením perfuzního tlaku. V ischemii se srdce nacházelo 45 nebo 60 minut, podle konkrétního pokusu. Ischemie byla zakončena uvolněním svorky a následovalo 60 minut reperfuze. Měření EKG bylo zastaveno v 10. minutě reperfuze. Měření tlaku probíhalo až do konce fáze reperfuze. Během celého experimentu se podle potřeby různě přecházelo mezi zásobními baňkami s Krebs-Hanseleitovým roztokem a Krebs-Hanseleitovým roztokem s rozpuštěným sukcinátem o koncentraci 1 mM.



Obrázek 9 – Model izolované perfundované srdce za konstantního průtoku s připojenými elektrodami a připraveným podvazem (Bell et al., 2011) A) Srdce ve fázi stabilizace. B) Srdce ve fázi ischemie

Barvení a focení vzorků

Na konci pokusu se utáhla sutura dvojitým uzlem a srdce, stále připevněné na kovové kanyle, bylo přesunuto z aparatury na injekční stříkačku, ze které bylo promyto 2-3 ml 5% roztoku manganistanu draselného (KMnO_4). Tím se odlišily ischemické oblasti, u kterých nedošlo k obarvení, od normálně perfundované oblasti jenž byly zbarvené do hněda až černa. Hnědé zbarvení bylo způsobeno redukcí manganistanu na oxid manganičitý (burel), vyznačující se právě temně hnědou barvou. Následovalo promývání vychlazeným fyziologickým roztokem od přebytečného KMnO_4 , dokud ze srdce odkapávající tekutina nebyla bez známek zbarvení. Poté byly odštíhnuty cévy a síně a komorový myokard byl osušen v buničině.

Nabarvené a osušené srdce bylo uloženo do plastové Petriho misky a umístěno do mrazáku o teplotě -20 °C alespoň na 1 hodinu, aby dostatečně promrzlo a bylo jej možné nakrájet. Po vyndání z mrazáku byly žiletkou odstraněné zbytky síní a komory byly nakrájené na 6-8 plátek podobné tloušťky (přibližně 1 mm). Řezy byly vedené kolmo na dlouhou osu levé komory. Plátky se pinzetou přesunuly do skleněné lahvičky s 8 ml 1% roztoku 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridu (TTC) ve fosfátovém pufru (pH 7,4). Zde se nechaly 30 min inkubovat ve vodní lázni o teplotě 37 °C. TTC pozitivně barví tkáň, která odolala ischemii (červená), a negativně nekrotické oblasti (bílá). Důvodem zbarvení je redukce tetrazoliové soli za vzniku karmínově červeného formazanu. K redukci je nutná přítomnost koenzymů, které se v nekrotické oblasti nenacházejí

Po 30 minutách byl roztok TTC nahrazen 7 ml 10% roztoku formaldehydu, ve kterém se nechaly plátky zhruba týden v lednici fixovat pro zlepšení kontrastu mezi barevnými oblastmi jenž ischemii přežily, a těmi co ischemii nepřežily. Po týdnu byly u jednotlivých plátků odstřiženy zbytky pravé komory a byly nafoceny z apikální i bazální strany. Celý proces experimentu je graficky znázorněn na obrázku 10.

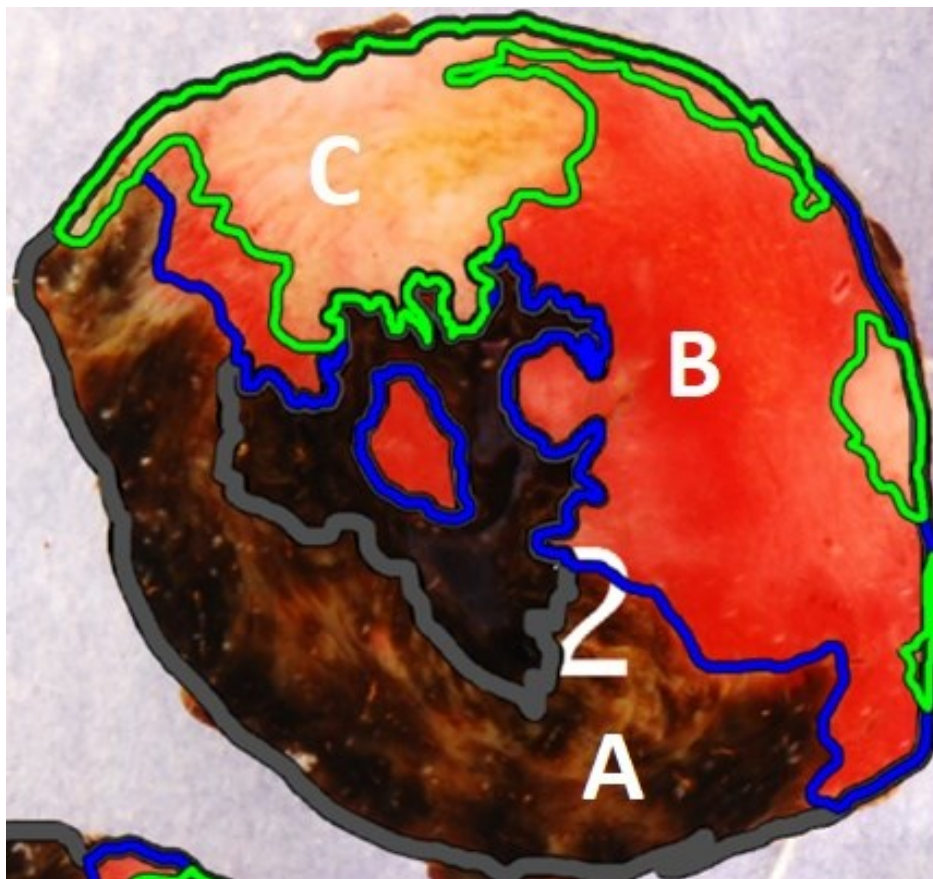
Při focení byly řezy v Petriho misce ponořené ve formaldehydu (10%), aby se zlepšila rozlišitelnost jednotlivých oblastí. K focení byl použit digitální fotoaparát NIKON D60 s makro objektivem umístěný na stativu. Petriho miska byla nasvícena kruhovým osvětlením. Každá strana se fotila několikrát s různým nastavením korekce clony, tak aby byly získány fotografie s optimální expozicí.



Obrázek 10 – Časová osa celého protokolu skládající se z fáze stabilizace (20 min), ischemie (45-60 min), reperfuze (60 min), mražení (alespoň 60 min), inkubace (30 min) a fixace (7 dní). A) Dávkování sukcinátu u skupin, které byl podáván jen během reperfuze. B) Dávkování sukcinátu u skupiny, které byl podáván během ischemie i reperfuze

Vyhodnocování rozsahu infarktu

Získané fotky se vyhodnocovaly na počítači programem *Cardiac Ischemia 1.0* (obr. 11). V programu byla na řezech vyznačená jejich celková plocha (LV). V té byla následně vyznačená ohrožená oblast (AR), která byla ischemizována, a v ní oblast nekrotická (IS). Naměřené hodnoty program přepisoval do Excelu, kde je spojil pro apikální i bazální strany řezů a vypočítal relativní velikost infarktu vztaženou na velikost celé komory (IS/LV), relativní velikost ohrožené oblasti vztaženou na velikost celé komory (AR/LV) a relativní velikost nekrotické oblasti vztaženou na velikost ohrožené oblasti (IS/AR). Pro každou z hodnot IS/LV, AR/LV a IS/AR byla vypočítána průměrná hodnota na celé srdce.



Obrázek 11 – Nabarvený příčný řez levou srdeční komorou vyhodnocený programem *Cardiac Ischemia 1.0*.
A) Neohrožená oblast. B) Ohrožená oblast. C) Nekrotická oblast

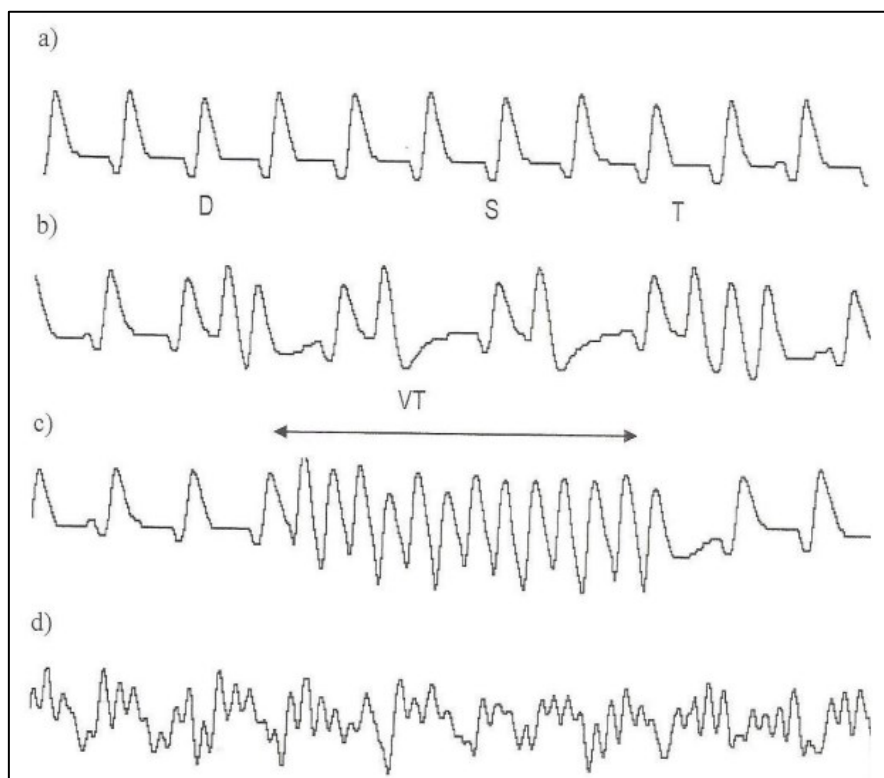
Vyhodnocování arytmíí

EKG bylo zaznamenáváno po celou dobu ischemie a prvních 10 minut reperfuze programem CAR. Na EKG záznamu byla programem CAA sledován četnost výskytu jednotlivých typů arytmíí a jejich počet. U tachykardií a fibrilací se rovněž analyzovala délka jejich trvání.

Typy hodnocených arytmíí ze záznamu EKG:

- 1) Jednoduché předčasné komorové stahy
- 2) Dvojité předčasné komorové stahy
- 3) Trojité předčasné komorové stahy
- 4) Tachykardie – čtyři a více po sobě jdoucí předčasné komorové stahy
- 5) Komorová fibrilace

Výše zmíněné typy arytmíí jsou zobrazené na obrázku 12. Po vyhodnocení bylo každému srdci přiděleno bodové hodnocení, tzv. skóre, zvlášt' za průběh ischemie a za průběh reperfuze (tabulka 2). Dvojité a trojité předčasné stahy byly souhrnně označovány jako salvy.



Obrázek 12 – EKG záznam s výskytem různých srdečních arytmíí. A) Normální srdeční rytmus. B) Singly (S), doubly (D) a triplety (T). C) Komorová tachykardie. D) Komorová fibrilace (Boudíková, 2010)

Typ arytmie	Bodové ohodnocení
Bez arytmií	0
Singly	1
Salvy	2
Tachykardie	3
Reverzibilní fibrilace	4
Ireverzibilní fibrilace	5

Tabulka 2 – Bodové hodnocení skóre dle výskytu jednotlivých typů arytmií

Statistické vyhodnocování výsledků

Výsledky byly statisticky a graficky zpracovány v programu GraphPad Prism v 9.1.2. Naměřené výsledky, kromě výskytu arytmií, jsou uváděny jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Arytmie jsou uváděné jako medián s rozpětím hodnot. Statistické rozdíly mezi dvěma skupinami s normálním rozložením byly hodnoceny t-testem. Ischemické a reperfuzní arytmie, které nemají normální rozložení byly hodnoceny Mann-Whitneyho testem. Pro zjištění statistické významnosti mezi třemi skupinami byla použita jednocestná ANOVA s Newman-Keulsovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s $P < 0,05$.

Výsledky

V rámci této diplomové práce byl metodou izolovaného perfundovaného srdce zkoumán vliv sukcinátu na ischemickou myokardu potkana. Hlavními sledovanými parametry byly rozsah infarktu a výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií.

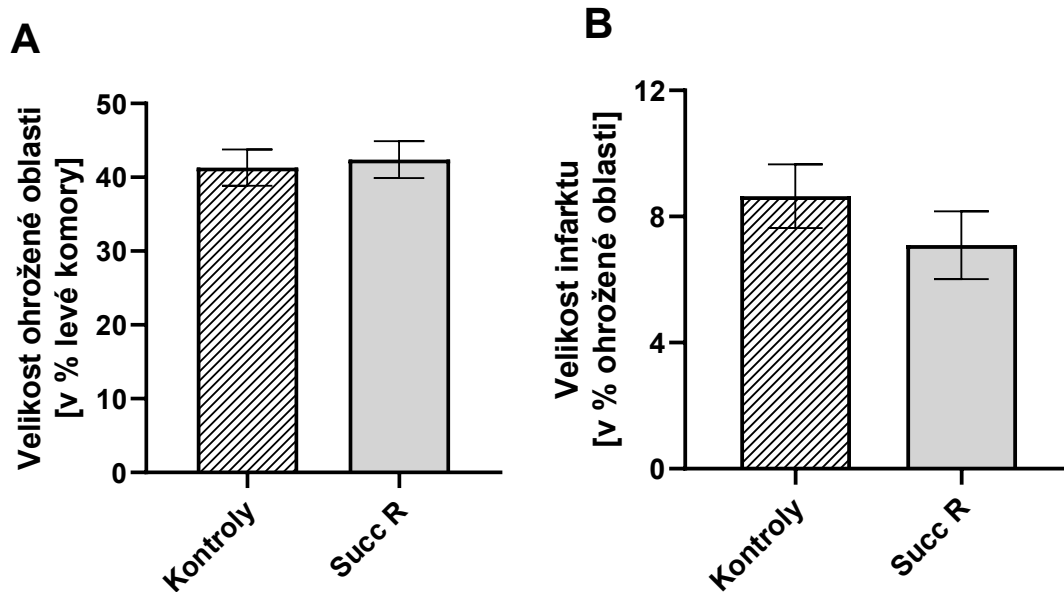
Rozsah infarktu

Pro měření rozsahu infarktu myokardu bylo nejdříve použito 22 potkanů o průměrné hmotnosti 406 g (min. 309 g, max. 542 g) rozdělených na 2 skupiny. Fáze ischemie u obou skupin trvala 45 minut:

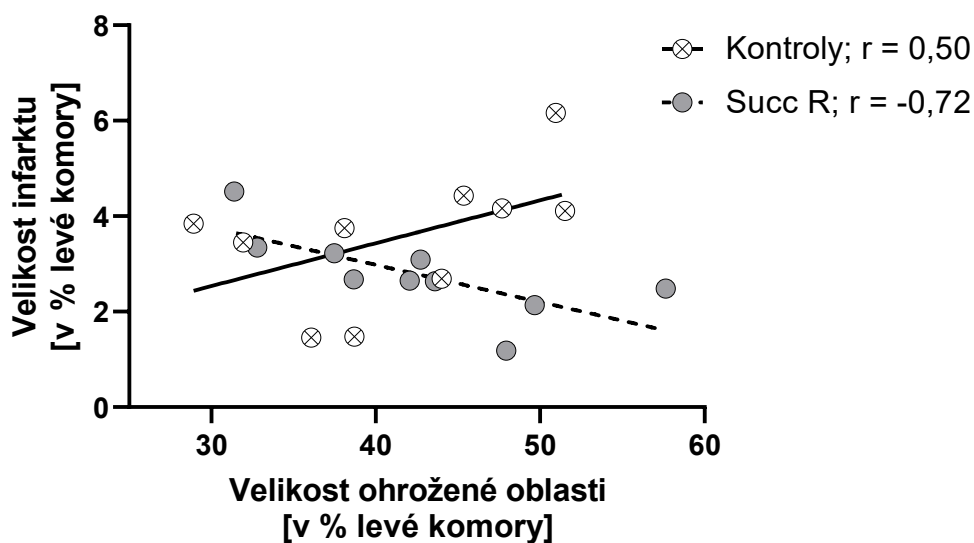
- 1) Kontrolní skupina (Kontroly – K; n = 12)
- 2) Skupina, jenž byl podáván sukcinát od posledních 5 minut ischemie po 15. minutu reperfuze (Succ R – S; n = 10)

Pokud srdce nepřežilo až do konce experimentu, bylo z hodnocení vyřazeno. Takto byla vyřazena dvě srdce z kontrolní skupiny, která během reperfuze měla přetrvávající komorovou fibrilaci.

Obě skupiny měly podobnou relativní velikost ohrožené oblasti udávanou v procentech levé komory (K: $41,3 \pm 2,47$ %; S: $42,4 \pm 2,52$ %; graf 1A), ve které se statisticky významně nelišily. Velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti se u skupiny se sukcinátem nijak výrazně nelišila oproti kontrolní skupině (K: $8,6 \pm 1,01$ %; S: $7,1 \pm 1,07$ %; graf č. 1B). Tyto experimenty přesto naznačily určitý kardioprotektivní potenciál sukcinátu, který však nebyl statisticky významný. Při vynesení hodnot každého pokusu do grafu (graf č 2) ukazující závislost velikosti infarktu na velikosti ohrožené oblasti, můžeme u kontrolní skupiny sledovat očekávaný trend, tj. že velikost nekrotické oblasti se bude zvyšovat úměrně s velikostí ohrožené oblasti. U skupiny se sukcinátem je zřejmé, že u srdcí s větší velikostí ohrožené oblasti se velikost infarktu nemění nebo dokonce klesá.



Graf 1 – Výsledky kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl během reperfúze podáván sukcinát (Succ R), podrobených 45 minutám regionální ischemie srdce. A) Relativní velikost ohrožené oblasti vztážená na velikost levé komory. B) Relativní velikost nekrotické oblasti vztážená na velikost ohrožené oblasti. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM



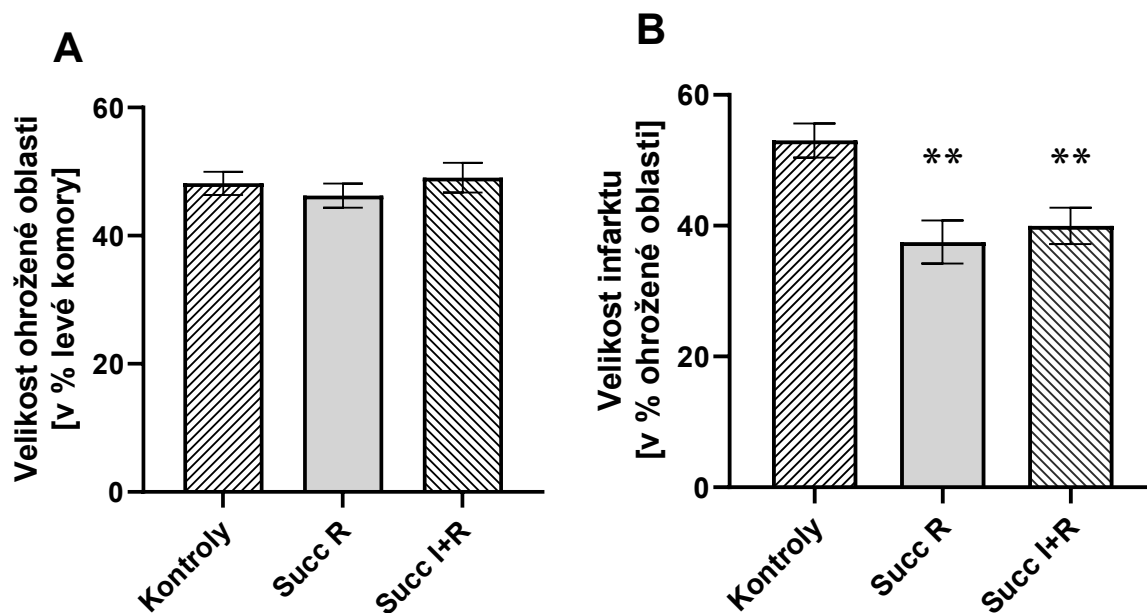
Graf 2 – Závislosti relativní velikosti infarktu myokardu ku ohrožené oblasti vztážených na velikost levé komory u kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl během reperfúze podáván sukcinát (Succ R), podrobených 45 minutám regionálních ischemie srdce. r = korelační koeficient

Kvůli relativně malému infarktu myokardu u obou skupin po 45 minutách ischemie, byl tento pokus zopakován. Tentokrát však byla ischemická fáze prodloužena a trvala 60 minut. Použito bylo celkem 45 potkanů o průměrné hmotnosti 322 g (min. 261 g, max. 415 g) rozdělených na 3 skupiny:

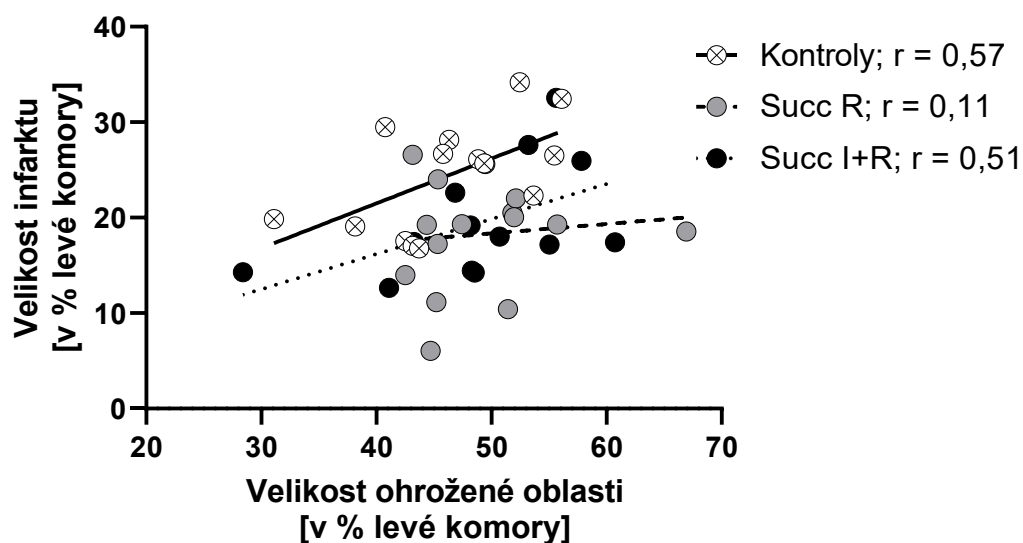
- 1) Kontrolní skupina (Kontroly – K; n = 15)
- 2) Skupina, jenž byl sukcinát podáván od posledních 5 minut ischemie po 15. minutu reperfuze (Succ R – S₂₀; n = 17)
- 3) Skupina, jenž byl sukcinát podáván od posledních 5 minut stabilizace po 15. minutu reperfuze (Succ I+R – S₈₀; n = 13)

Opět byly z hodnocení vyřazená srdce, která nepřežila až do konce experimentu. Vyřazené byly takto 2 srdce ze druhé skupiny (Succ R – S₂₀) která zfibrovala během reperfuze a 1 ze skupiny kontrolní (Kontroly – K), které zfibrovalo v pozdní fázi ischemie. Nebyl u nich hodnocen rozsah infarktu ani výskyt arytmií, ale bylo jim přidělené bodové hodnocení 5 (dle tabulky 2).

Všechny tři skupiny měly podobnou velikost ohrožené oblasti udávanou v procentech levé komory (K: 46,2 ± 1,96 %; S₂₀: 49,2 ± 1,69 %; S₈₀: 49,1 ± 2,42 %; graf č. 3A), ve které se statisticky významně nelišily. Velikost nekrotické oblasti vztažené na velikost ohrožené oblasti se tentokrát mezi kontrolní skupinou oproti skupinám se sukcinátem lišila. Pozorovali jsme statisticky signifikantní pokles velikosti infarktu o 25-30 % u obou skupin s podaným sukcinátem (K: 53,0 ± 2,93 %; S₂₀: 37,5 ± 3,39 %; S₈₀: 40,0 ± 2,90 %). Mezi skupinami se sukcinátem nebyl významný rozdíl (graf č. 3B). Při vynesení jednotlivých hodnot do grafu ukazující závislost velikosti infarktu myokardu na velikosti ohrožené oblasti (graf č. 4) je patrný protektivní účinek u obou skupin se sukcinátem (Succ R, Succ I+R) Oproti kontrolám došlo k posunu korelačních přímk směrem dolů a snížil se jejich sklon.



Graf 3 – Výsledky kontrolní skupiny (kontroly), skupiny, které byl během reperfúze podáván sukcinát (Succ R) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfúze (Succ I+R), podrobených 60 minutám regionální ischemie srdce. A) Relativní velikost ohrožené oblasti vztahená na velikost levé komory. B) Relativní velikost nekrotické oblasti vztahená na velikost ohrožené oblasti. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM. ** $P < 0,01$ oproti kontrolní skupině



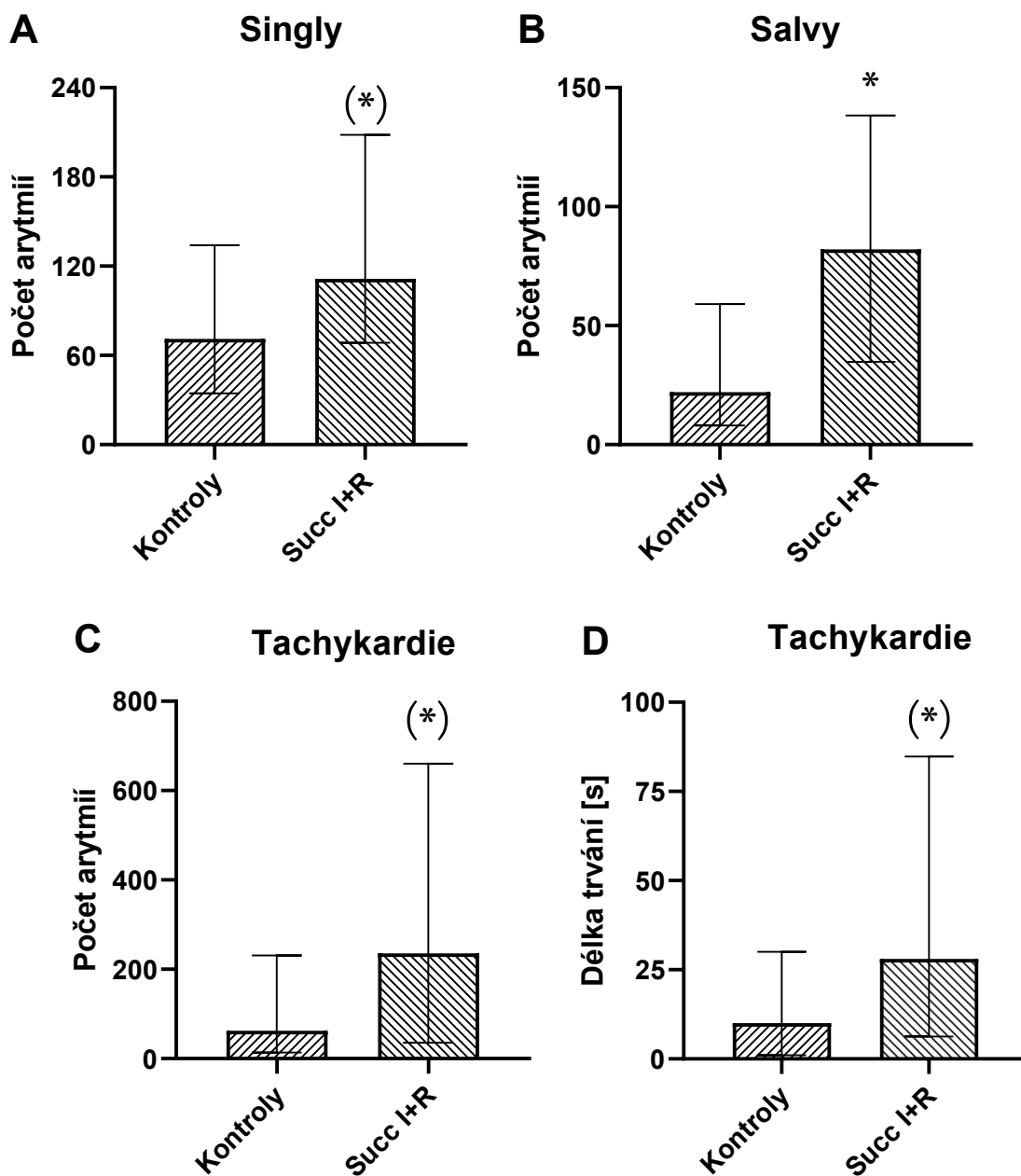
Graf 4 – Závislosti relativní velikosti infarktu myokardu ku ohrožené oblasti vztahených na velikost levé komory u kontrolní skupiny (kontroly), skupiny, které byl během reperfúze podáván sukcinát (Succ R) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfúze (Succ I+R), podrobených 60 minutám regionální ischemie srdce. r = korelační koeficient

Arytmie

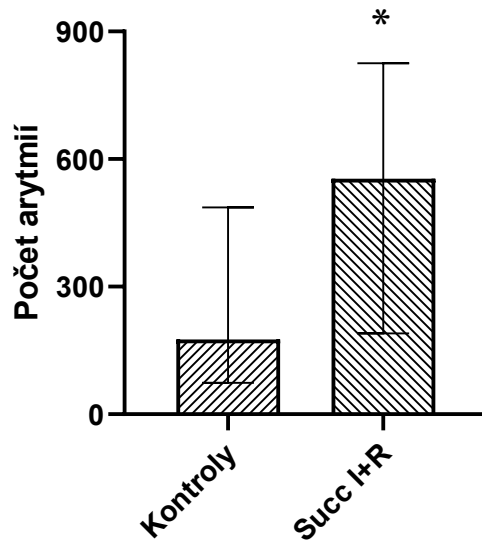
Arytmie, ať už ischemické či reperfuční, byly z technických důvodů zaznamenávány a následně analyzovány až u skupin s trváním fáze ischemie 60 minut.

Ischemické arytmie

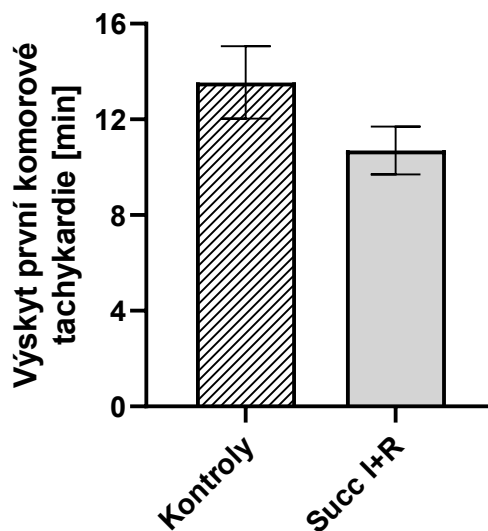
Ischemické arytmie byly zaznamenávány po celou dobu ischemie. Arytmie se nejvíce vyskytovaly v rozmezí od 10. do 25. minuty ischemie. Protože ve fázi ischemie nebyl mezi kontrolní skupinou a skupinou Succ R rozdíl (sukcinát byl podán až během reperfuze), tak jsou hodnoty výskytu a závažnosti ischemických arytmií sloučeny do jedné skupiny (Kontroly). Hodnocen byl celkový počet singlů (graf č. 5A), salv (graf č. 5B), tachykardií (graf č. 5 C) a celková doba trvání tachykardií (graf č. 5D). Všechny tyto parametry byly vyšší ve skupině, které byl podáván sukcinát před ischemií oproti kontrolní skupině a dosahovaly statistické významnosti alespoň $P < 0,1$. Singly: K: 71 (357), S_{80} : 111,5 (316); salvy: K: 22 (116), S_{80} : 82 (270); tachykardie: K: 62 (1053), S_{80} 235,5 (1963); celková doba trvání tachykardií: K: 10 (92) sec, S_{80} : 28 (167) sec. Celkový počet ischemických arytmií (graf č. 6) tak byl u skupiny se sukcinátem signifikantně ($P < 0.05$) vyšší oproti kontrolní skupině; K: 176 (1148), S_{80} : 553,5 (2481). Hodnocena byla i doba výskytu první ischemické tachykardie (K: 14. min; S_{80} : 11. min; graf č 7). I zde lze usuzovat o zhoršení výskytu ischemických arytmií u skupiny se sukcinátem oproti kontrolní skupině, neboť arytmogeneze začala dříve. Tento parametr však nedosahoval statistické významnosti. U skupiny Succ I+R se vyskytovaly komorové tachykardie ve všech pokusech, u kontrolní skupiny u 92,0 %. Kvůli výskytu komorových tachykardií téměř při všech pokusech, mají obě skupiny podobné bodové hodnocení (graf č. 8).



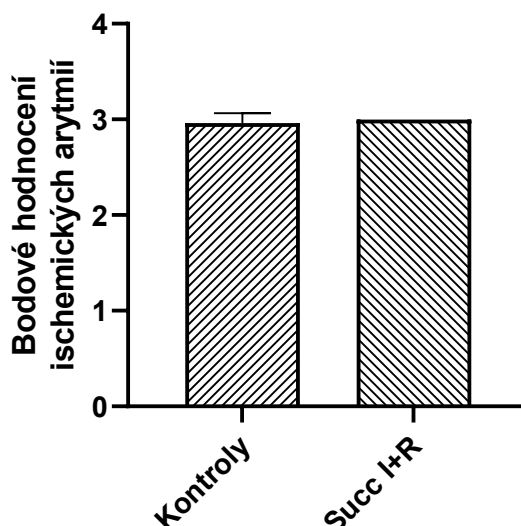
Grafč. 5 – Celkový počet jednotlivých typů arytmií během regionální ischemie srdce u kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). A) Celkový počet singlů. B) Celkový počet salv. C) Celkový počet tachykardií. D) Celková doba trvání tachykardií. Hodnoty jsou uváděné jako medián s mezikvartilovým rozpětím. * $P < 0,05$ oproti kontrolní skupině; (*) $P < 0,1$ oproti kontrolní skupině



Graf č. 6 – Celkový počet arytmií během regionální ischemie srdce u kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). Hodnoty jsou uváděny jako medián s mezikvartilovým rozpětím. * $P < 0,05$ oproti kontrolní skupině



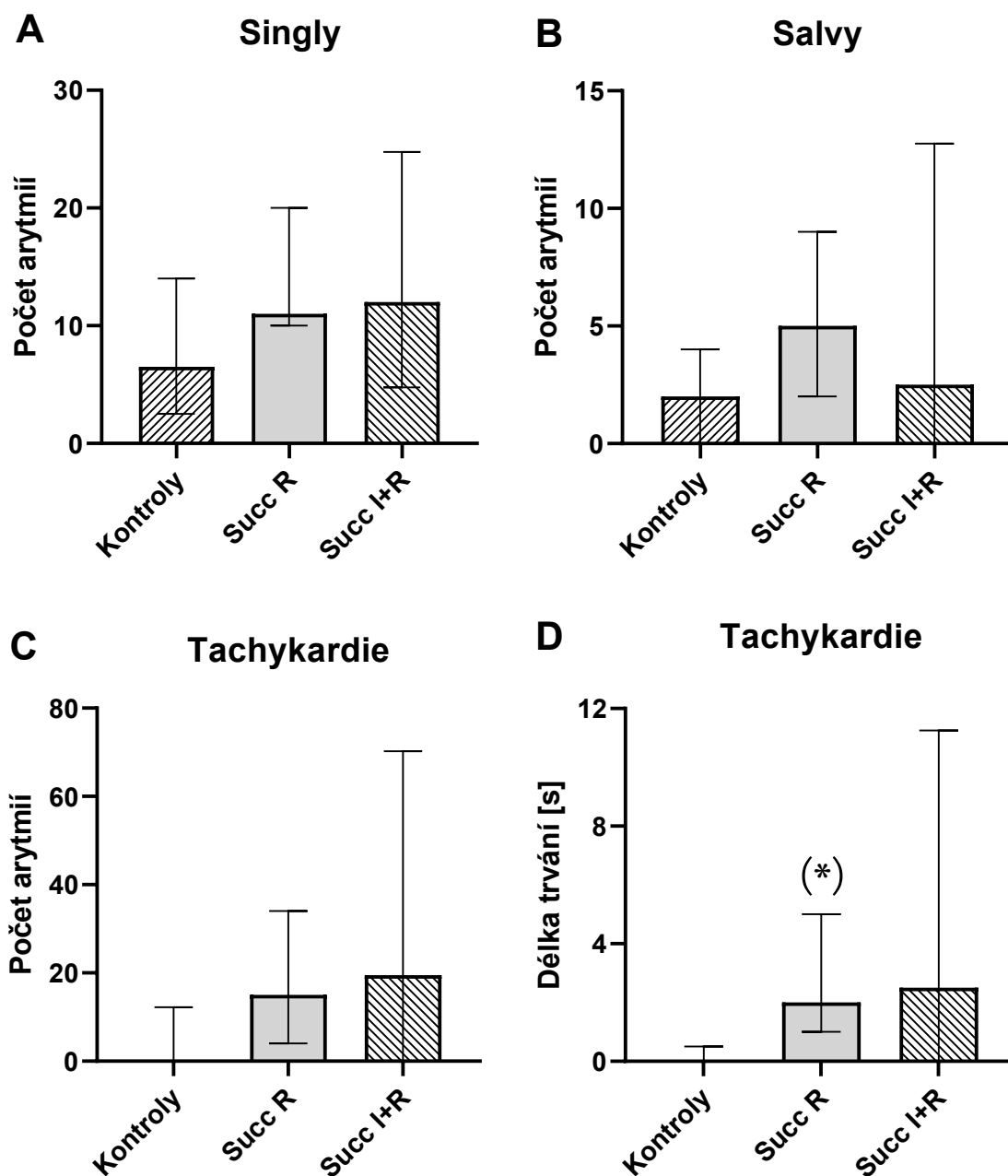
Graf č. 7 – Výskyt první ischemické arytmie u kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm SEM



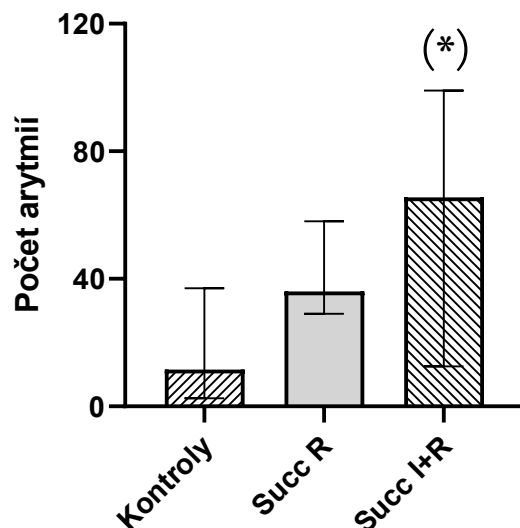
Graf č 8 – Bodové hodnocení ischemických arytmií u kontrolní skupiny (kontroly) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM

Reperfuční arytmie

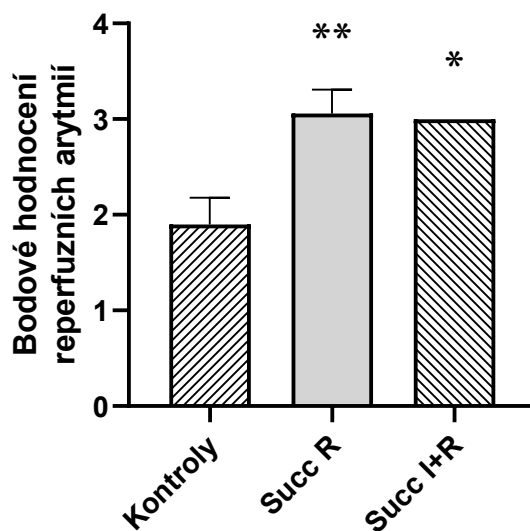
Reperfuční arytmie byly zaznamenávány prvních 10 minut reperfuze. Arytmie se vyskytovaly především v prvních dvou minutách od uvolnění okluze koronární arterie. Stejně jako u ischemie se hodnotily singly (graf č. 9A), salvy (graf č. 9B), tachykardie (graf č. 9C) a celková doba trvání tachykardií (graf č. 9D). Stejně jako u ischemických arytmií měla většina těchto parametrů arytmogemeze tendenci ke zvýšenému výskytu u skupin vystavených sukcinátu, ale nejednalo se o staticky významné změny. Navíc bylo patrné zhoršení v počtu arytmií mezi skupinami se sukcinátem (Succ R vs. Succ I+R). Výskyt téměř všech typů arytmií měl tendenci stoupat s dobou vystavení sukcinátu, tj. více bylo výskytu u skupiny Succ I+R oproti skupině Succ R. Singly: K: 6,5 (26), S₂₀: 11 (26), S₈₀: 12 (43); salvy: K: 2 (4), S₂₀: 5 (17), S₈₀: 2,5 (27); tachykardie: K: 0 (75), S₂₀: 15 (58), S₈₀: 19,5 (513); celková doba trvání tachykardií: K: 0 (11) sec, S₂₀: 2 (8) sec, S₈₀: 2,5 (40) sec. Celkový počet reperfučních arytmií (graf č. 10) měl jasný trend být vyšší u skupiny Succ I+R; K: 11,5 (83), S₂₀: 36 (72), S₈₀: 65,5 (509). Z hlediska bodového hodnocení skóre (graf č. 11) na tom byly kontroly lépe oproti skupinám vystaveným sukcinátu (P < 0,05), protože se u nich během reperfuze vyskytovaly komorové tachykardie méně často (K: 1,9 ± 0,3; S₂₀: 2,8 ± 0,2; S₈₀: 3,0 ± 0,0).



Graf č. 9 – Celkový počet jednotlivých typů arytmií během reperfuze po regionální ischemii srdce u kontrolní skupiny (kontroly), skupiny, které byl během reperfuze podáván sukcinát (Succ R) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). A) Celkový počet singlů. B) Celkový počet salvy. C) Celkový počet tachykardií. D) Celková doba trvání tachykardií. Hodnoty jsou uváděné jako medián s mezikvartilovým rozpětím. (*) $P < 0,1$ oproti kontrolní skupině



Graf č. 10 – Celkový počet arytmií během reperfuze po regionální ischemii srdce u kontrolní skupiny (kontroly), skupiny, které byl během reperfuze podáván sukcinát (Succ R) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). Hodnoty jsou uváděny jako medián s mezikvartilovým rozpětím. (*) $P < 0,1$ oproti kontrolní skupině



Graf č. 11 – Bodové hodnocení reperfučních arytmií po regionální ischemii srdce u kontrolní skupiny (kontroly), skupiny, které byl podáván sukcinát během reperfuze (Succ R) a skupiny, které byl sukcinát podáván během ischemie i reperfuze (Succ I+R). Hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm SEM. ** $P < 0,01$ oproti kontrolní skupině; * $P < 0,05$ oproti kontrolní skupině

Hemodynamické hodnoty

Sledovanými hemodynamickými parametry byly perfuzní tlak a tepová frekvence. Jejich hodnoty byly stanoveny před zahájením ischemie (PE/fE), na konci ischemie (PI/fI), v 10. minutě reperfuze (fR) a na konci reperfuze (PR). Protože v době stabilizace nebyl mezi kontrolami a skupinou Succ R rozdíl, tak jsou jejich hodnoty opět sloučené dohromady (tabulka č. 3 a 4). Znovu byly z technických důvodů tlak i frekvence měřeny až u skupin s trváním fáze ischemie 60 minut.

Mezi skupinami se nevyskytovaly žádné signifikantní rozdíly v ani jednom ze sledovaných parametrů ve všech časových úsecích experimentu. Podávání sukcinátu do perfuzního média tedy nemělo zásadní vliv na srdeční frekvenci a perfuzní tlak.

Skupina	Počet jedinců ve skupině	Perfuzní tlak [mm Hg]		
		PE	PI	PR
Kontroly	13	33,7 ± 0,8	63,8 ± 3,6	41,5 ± 2,1
Succ R	15		57,3 ± 4,0	42,3 ± 3,8
Succ I+R	10	32,6 ± 0,9	62,2 ± 5,1	36,3 ± 2,6

Tabulka 2 – Perfuzní tlak jednotlivých experimentálních skupin v různých fázích pokusu. PE = tlak na konci stabilizace; PI = tlak na konci ischemie; PR = tlak na konci reperfuze. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM

Skupina	Počet jedinců ve skupině	Tepová frekvence [min ⁻¹]		
		fE	fI	fR
Kontroly	11	215,8 ± 6,5	234,6 ± 13,2	239,4 ± 18,1
Succ R	15		236,3 ± 17,6	246,2 ± 11,2
Succ I+R	10	199,3 ± 8,6	238,2 ± 12,6	238 ± 22,0

Tabulka 3 – Tepová frekvence jednotlivých experimentálních skupin v různých fázích pokusu. fE = tepová frekvence na konci stabilizace; fI = tepová frekvence na konci ischemie; fR = tepová frekvence v 10. minutě reperfuze. Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± SEM

Diskuze

V této diplomové práci jsem se zabýval studiem účinku akutního podávání sukcinátu sodného na ischemickou toleranci srdce potkana *in vitro*. Použita byla metoda izolovaného perfundovaného srdce dle Langendorfa za konstantního průtoku. Lokální ischemie byla u srdce potkana navozena podvazem LAD artérie.

Tento experimentální model byl zvolen, kvůli své jednodušší operační fázi, než tomu je tomu u modelu anestetizovaného uměle ventilovaného potkana, jenž je na našem pracovišti rovněž zaveden. Nevýhodou (ale i výhodou) této metody oproti *in vivo* experimentům je izolování srdce od vlivu autonomního nervového systému a humorální signalizace. Výsledky tak mohou být odlišné oproti experimentům na celém zvířeti. Například srdce potkana, které je normálně hlavně pod vlivem sympatiku, tak má v případě modelu izolovaného perfundovaného srdce nižší tepovou frekvenci.

Výhodou je, že studovaná látka, v našem případě sukcinát, není metabolizována ostatními orgány a je zkoumán pouze její vliv na srdce bez vlivů na další orgánové systémy, které mohou modifikovat ischemickou toleranci srdce (Zhang et al., 2018).

Vliv sukcinátu na ischemickou toleranci srdce

Podávání sukcinátu během ischemie a reperfuze, a i při podávání pouze během reperfuze mělo příznivý vliv na snížení rozsahu infarktu myokardu o 25-30 % (graf č. 3 a 4). Oba protokoly podání sukcinátu (před ischemií a na začátku reperfuze vs. jen na začátku reperfuze) měly podobný protektivní vliv na rozsah infarktu myokardu. To naznačuje, že sukcinát působí kardioprotektivně na rozsah letálního buněčného poškození především v časně reperfuzi. Naopak jeho působení během ischemie nemusí být vždy pozitivní, jak bylo patrné ze signifikantního zvýšení celkových ischemických arytmií o 108,9 % (graf č. 6).

Mechanismus, jakým sukcinát ovlivňuje ischemickou toleranci srdce nebyl dosud uspokojivě objasněn. Mnoho jiných skupin již také zkoumaly roli sukcinátu v ischemické toleranci srdce a dospěly k podobným, či naopak zcela odlišným výsledkům. Důvodem pravděpodobně může být jeho lokalizace a původ sukcinátu, tzn. je třeba rozlišovat, jestli se jednalo o vliv exogenního či endogenního sukcinátu. V našich pokusech byl používán sukcinát exogenně, tzn. primárně působil na buňky z krevního řečiště. Do něj se může

vyplavovat ze všech hypoxických buněk celého organismu, včetně těch, na které následně působí. Farmakologicky zvýšená hladina sukcinátu v krevním řečišti se podle našich výsledků a některých dalších studií (viz níže) zdá být ku prospěchu ischemické toleranci srdce. Působení endogenního, především mitochondriálního sukcinátu, se naopak ukazuje jako škodlivé a ischemickou toleranci srdce snižuje. Rozdíly v působení exogenního vs. endogenního sukcinátu na odolnost srdce k ischemie se blíže zabývají následující kapitoly diskuze.

Působení endogenního sukcinátu

Během ischemie dochází v mitochondriálním komplexu II ETC k přechodu do reverzního módu toku elektronů, kdy místo jako SDH funguje jako fumarát reduktáza, používající k redukci elektrony dodávané z komplexů I a III. Tato změna částečně přispívá k ischemické akumulaci sukcinátu v mitochondriích a tvorbě ROS, protože při reakcích téměř všech flavoproteinových enzymů vznikají ROS (Tretter et al., 2016; Zhang et al., 2018). Na základě výzkumů na buněčných kulturách Paddenberg et al. (2003) předpokládají, že je fumarát reduktáza alostericky inhibována, protože zvýšení koncentrace sukcinátu během ischemie vedlo ke snížení ROS. Tuto hypotézu podpořil výzkum Chouchani et al. (2014), ve kterém byl během ischemie podáván malonát, kompetitivní inhibitor SDH vážící se na aktivní místo enzymu, což vedlo výraznému poklesu sukcinátu v kardiomyocytech.

Tento mechanismus by se mohl částečně podílet na snížení rozsahu infarktu při podávání sukcinátu během ischemie, pokud by se sukcinát dokázal transportovat až do mitochondrií, respektive pokud by alespoň zvýšenou koncentrací v cytosolu snížil tok sukcinátu unikajícího z mitochondrií po koncentračním gradientu do cytosolu. Musíme vzít ale v potaz i druhou stranu mince, kdy během reperfuze je v prvních několika minutách naakumulovaný sukcinát v mitochondriích masivně oxidován SDH za tvorby velkého množství ROS (Chouchani et al., 2014). Je to způsobeno hyperpolarizací vnitřní membrány a reverzním chodem ETC, protože nadměrnou aktivitou komplexu II jsou komplexy III a IV na maximum své kapacity a elektrony jsou tak přesouvány z komplexu II i na komplex I, který tvoří ROS. Vzniklý oxidativní stres je pak hlavní příčinou ireverzibilního poškození buněk během reperfuze v důsledku otevření mPTP (Chouchani et al., 2014; Murphy et al., 2018). Nadměrná produkce ROS komplexem II by také mohla částečně vysvětlovat tendenci ke zvýšení počtu ischemických a reperfučních arytmií u

skupiny se sukcinátem oproti kontrolám pozorovanou v našich experimentech, zvláště pak na začátku reperfuze, kdy se ROS na vzniku arytmií dominantně podílí (Akar et al., 2005; Hicks et al., 2007). Bylo prokázáno, že inhibicí komplexu II během reperfuze malonátem dojde ke snížení rozsahu infarktu, a to jak na modelu anestetizovaného uměle ventilovaného zvířete (Consegal et al., 2021; Prag et al., 2020), tak i při použití metody izolovaného perfundovaného srdce (Jespersen et al., 2020; Valls-Lacalle et al., 2016). To dokazuje negativní vliv endogenního sukcinátu na ischemickou toleranci srdce. Zároveň tak může negativně působit i sukcinát, který byl transportován během ischemie z krevního řečiště do cytosolu, neboť během reperfuze se přibližně 50 % cytosolického sukcinátu přesune právě do mitochondrií, kde je oxidováno v ETC (Prag et al., 2021). Produkce ROS zapříčiněná reverzním chodem ETC může mít ale i protektivní vliv, protože ROS uvolněné do cytosolu aktivují HIF-1 α prostřednictvím inhibice enzymů PHDs (Murphy et al., 2018). Je proto zřejmé, že k objasnění vlivu endogenního sukcinátu na ischemickou toleranci srdce bude třeba ještě dalších studií.

Působení exogenního sukcinátu

Jak bylo uvedeno výše, působení především endogenního sukcinátu na ETC má na ischemickou toleranci srdce hlavně negativní vliv. Musí zde být proto další mechanismy, které jsou naopak kardioprotektivní, jak ukazují výsledky této práce.

Nejpravděpodobnější místo, ve kterém by mohl exogenní sukcinát působit protektivně je v cytosolu. Sem může pronikat jak naakumulovaný endogenní sukcinát z mitochondrií, tak i exogenní sukcinát z krevního řečiště. V cytosolu má sukcinát proti ischemii prokazatelně protektivní účinek, protože vazbou do aktivního centra kompetitivně inhibuje PHDs a tím stabilizuje HIF-1 α . Tento fenomén je běžný u vysoce vaskularizovaných nádorů s mutací SDH, která způsobuje akumulaci a eflux endogenního sukcinátu a navozuje stav tzv. pseudohypoxie, kdy je transkripční aktivita HIF-1 α spuštěná i za normoxických podmínek (Grimolizzi et al., 2018; Murphy et al., 2018; Selak et al., 2005). V srdci způsobí stabilizace HIF-1 α lepší toleranci na ischemické poškození (Ong et al., 2012; Wu et al., 2013). Pseudohypoxii vyvolává i právě podávání exogenního sukcinátu (Li et al., 2018). Ke stabilizaci HIF-1 α sice dochází samo už v důsledku hypoxie, ale přidáním ještě dalšího jejich inhibitoru by mohlo aktivitu HIF-1 α spustit ještě o něco dříve u skupiny Succ I+R a u obou sukcinátových skupin zvýšit jeho účinek, včetně prodloužení trvání aktivace i po reperfuzi. Tato možnost působení sukcinátu se shoduje

s výzkumem Neckáře et al., 2018, kteří použili jako možný inhibitor PHDs epoxyeikosatrinovou kyselinu, respektive její analog. Při podávání před ischemií nebo jen před reperfuzí bylo zaznamenáno snížení rozsahu infarktu myokardu. Této kardioprotekci bylo zcela zabráněno přidáním inhibitorů HIF-1 α před reperfuzí. Jiné pokusy, kde byla použita jako inhibitor PHDs látka ZYAN1 na hlodavcích, došlo také ke zlepšení funkcí zprostředkovaných aktivací HIF-1 α jako je zvýšení krvetvorby (Jain et al., 2016; Jain 2019) nebo při podávání zdravým dobrovolníkům (Kansagra et al., 2018). Stejně pozitivní účinky na krvetvorbu zprostředkovanou inhibicí PHDs měla látka roxadustat (Singh et al., 2020) nebo dimethyloxalylglicin, který zabránil apoptóze mezenchymálních buněk inhibicí vypuštění cytochromu c do cytosolu (Liu et al., 2009).

O protektivním účinku farmakologicky zvýšené hladiny sukcinátu pojednává i práce Sakamoto et al., 1998, kteří rovněž použili model izolovaného perfundovaného srdce. Při podávání 10 mM sukcinátu pozorovali zlepšení postischemické obnovy kontraktlní funkce levé komory a zvýšené množství energeticky bohatých fosfátů v reperfuzi oproti kontrolní skupině. Během ischemie však přítomnost sukcinátu neměla zřejmý vliv na hladinu vysokoenergetických fosfátů. To podporuje naši domněnku, že exogenní sukcinát může působit kardioprotektivně hlavně na začátku reperfuze.

Sukcinát působí protektivně zlepšením ischemické tolerance i když je jeho hladina zvýšená nepřímou. Dalším zdrojem sukcinátu vznikajícího během ischemie je degradace pyruvátu. Část pyruvátu je metabolizována na α -ketoglutarát, který je přeměněn na sukcinyl-CoA, ze kterého je následně enzymem sukcinyl-CoA syntetázou vytvořen sukcinát za vzniku ATP (GTP). Nahromaděný sukcinát se pak již popsanými mechanismy dostává do cytosolu a do krevního řečiště (Zhang et al., 2018). Tato metabolická dráha, respektive už tvorba pyruvátu, je inhibována mastnými kyselinami, které inhibují glykolýzu. U potkanů s *diabetem mellitus* typu 2 byla kvůli zvýšené hladině mastných kyselin snížena aktivita HIF-1 α , která ovšem byla normalizována podáváním sukcinátu (Dodd et al., 2018). Snížení hladiny HIF-1 α kvůli snížené tvorbě sukcinátu způsobené vysokou hladinou mastných kyselin by také mohl být další důvod snížené ischemické tolerance srdce u lidí trpících *diabetem mellitus*.

Jiný nepřímý způsob zvýšení hladiny sukcinátu je zvýšením hladiny ketolátek v krvi ketodietou, nebo přímou infuzí (Puchowicz et al., 2008). Během přeměně ketolátek na ACoA vzniká jako vedlejší produkt sukcinát. Při pokusech prováděných skupinou Puchowicz et al. (2008), byl u potkanů vystavených lokální ischemii mozku pozorován

značně menší rozsah infarktu spolu se zvýšenou hladinou HIF-1 α a sukcinátu u skupiny na ketodietě oproti kontrolní skupině. K podobným výsledkům došli i po intravenózním podávání ketolátky β -hydroxybutarátu.

Protektivně působí i podávání aminokyselin přeměňujících se na meziprodukty Krebsova cyklu, nebo přímo podávání meziproduktů Krebsova cyklu, které jsou metabolizovány na sukcinát (Czibik et al., 2014). V práci Wiesner et al., 1988 při pokusech na potkanech vystavených regionální ischemii srdce došlo po akutním podávání α -ketoglutarát, malátu nebo fumarátu (každý po 5 mM) ke zvýšení hladiny sukcinátu 3-4 \times . Také došlo ke snížení systolického i diastolického tlaku levé komory, zlepšení relaxace a zvýšení hladiny ATP. Podobně protektivně působí i podávání glutamátu (Lomivorotov et al., 2011). Glutamát reaguje s pyruvátem za vzniku alaninu a α -ketoglutarátu, který pokračuje v Krebsově cyklu a je postupně metabolizován na sukcinát za vzniku ATP (Wiesner et al., 1989).

Kromě výše popsaných kardioprotektivních vlivů má však dlouhodobá akumulace sukcinátu v cytosolu i negativní efekt (exogenního i endogenního). Sukcinát se přeměňuje na sukcinyl-CoA, který spontánně sukcinyluje proteiny a mění jejich vlastnosti. Při hypersukcinylaci dochází k zhoršení funkcí mitochondrií sukcinylací PDH a palmitoyltransferázy (Li et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Dalším negativní vliv exogenního sukcinátu na ischemickou toleranci srdce je způsobená přes GPR91 receptor, který je exprimován mimo jiné i v myokardu. Jedním z důsledků, které způsobí jeho aktivace v srdci je hypertrofie myokardu, která se ovšem při akutním podávání nestíhá projevit. Hypertrofie zvyšuje citlivost na I/R poškození kvůli změnám v energetickém metabolismu (Ravingerova et al., 2011, Sambandam et al., 2002). Dalším negativním účinkem přes GPR91 receptor je aktivace apoptózy přes protein kinázu A (PKA) signální cestou. Práce Aguiar et al. (2010) ukazuje, že dlouhodobé vystavení vysoké hladině sukcinátu (10 mM po dobu alespoň 60 minut) vede nadměrnou aktivitou GPR91 receptoru k apoptóze kardiomyocytů kvůli zvýšené činnosti kaspázy 3. Delší vystavení sukcinátu by tedy mohlo být jedno z možných vysvětlení, proč je u skupiny Succ I+R, která byla 1 mM sukcinátu vystavená po dobu 80 minut, lehce zvýšený infarkt oproti skupině Succ R, která byla sukcinátu vystavená pouze 20 minut. Navíc aktivovaná PKA fosforyluje ryanodinové receptory a L-typ napětově řízených Ca²⁺ kanálů čímž zvyšuje intracelulární koncentraci Ca²⁺ (Aguiar et al., 2010). Toto zvýšení vápníku by mohlo být zase důvodem signifikantního zvýšení komorových arytmí během ischemie.

Shrnutí

Působení sukcinátu na ischemickou toleranci srdce je komplexní děj zahrnující negativně i pozitivně působící procesy. Akutní zvýšení sukcinátu v krevním řečišti se ukazuje jako příznivé na snížení rozsahu infarktu myokardu, jak demonstruje tato diplomová práce a některé předchozí studie. Sukcinát pravděpodobně působí protektivně v cytosolu, kde inhibuje degradaci HIF, který je hlavním transkripčním faktorem zodpovědným za změny citlivosti buněk k nedostatku kyslíku. Negativní působení sukcinátu přes GPR91 receptor nebo sukcinylací proteinů zřejmě nemusí mít vliv na velikost infarktu myokardu při akutním podání, nebo je vykompenzován kardioprotektivní stabilizací HIF.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem sukcinátu na ischemickou toleranci srdce potkana. Na základě výsledků z provedených experimentů jsem dospěl k závěrům že:

- 1) Sukcinát podaný akutně před ischemií a na začátku reperfuze, resp. podaný pouze v reperfuzi snížil velikosti infarktu na modelu izolovaného perfundovaného srdce u potkana. Mezi skupinou, které byl podáván sukcinát před i po ischemii a skupinou, která dostávala sukcinát pouze během reperfuze nebyl statisticky významný rozdíl. Lze proto usuzovat, že kardioprotektivní působení sukcinátu snižující velikost infarktu se uplatňuje především v časně reperfuzi.
- 2) Na rozdíl od protektivního působení na velikost infarktu, sukcinát podaný před ischemií a na začátku reperfuze, zvyšoval výskyt ischemických i reperfuzních arytmií. Odlišného působení sukcinátu na velikost infarktu a výskyt a závažnost komorových arytmií v ischemii a reperfuzi bude třeba objasnit dalšími experimenty v budoucnosti.

Seznam literatury

- Adeyinka, A., & Kondamudi, N. P. (2018). Cyanosis.
- Aguiar, C. J., Andrade, V. L., Gomes, E. R., Alves, M. N., Ladeira, M. S., Pinheiro, A. C. N., ... & Leite, M. F. (2010). Succinate modulates Ca²⁺ transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell calcium*, 47(1), 37-46.
- Aguiar, C. J., Rocha-Franco, J. A., Sousa, P. A., Santos, A. K., Ladeira, M., Rocha-Resende, C., ... & Lima, C. X. (2014). Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 78.
- Akar, F. G., Aon, M. A., Tomaselli, G. F., & O'Rourke, B. (2005). The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *The Journal of clinical investigation*, 115(12), 3527-3535.
- Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J., & Halestrap, A. P. (2017). The role of succinate and ROS in reperfusion injury—a critical appraisal. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 110, 1-14.
- Argaud, L., Gateau-Roesch, O., Muntean, D., Chalabreysse, L., Loufouat, J., Robert, D., & Ovize, M. (2005). Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 38(2), 367-374.
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2016). Ganong's review of medical physiology. 25. NY: McGraw-Hill Medical
- Barri, Y. M. (2008). Hypertension and kidney disease: a deadly connection. *Current hypertension reports*, 10(1), 39-45.
- Barth, E., Stämmli, G., Speiser, B., & Schaper, J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 24(7), 669-681.
- Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), S498-S501.
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 50(6), 940-950.
- Boban, M., Kocic, G., Radenkovic, S., Pavlovic, R., Cvetkovic, T., Deljanin-Ilic, M., ... & Jevtovic-Stoimenov, T. (2014). Circulating purine compounds, uric acid, and xanthine oxidase/dehydrogenase relationship in essential hypertension and end stage renal disease. *Renal failure*, 36(4), 613-618.

- Boudíková A. (2010). Vliv dexrazoxanu na ischemicko-reperfuzní poškození srdce potkana. Diplomová práce
- Bugg, T. D. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075-7101.
- Bugger, H., & Pfeil, K. (2020). Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(7), 165768.
- Buja, L. M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular pathology*, 14(4), 170-175.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., & Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9519-9525.
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., ... & Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431-435.
- Clark, C., Smith, W., Lochner, A., & Du Toit, E. F. (2011). The effects of gender and obesity on myocardial tolerance to ischemia. *Physiological research*, 60(2), 291.
- Consegal, M., Núñez, N., Barba, I., Benito, B., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., ... & Rodríguez-Sinovas, A. (2021). Citric Acid Cycle Metabolites Predict Infarct Size in Pigs Submitted to Transient Coronary Artery Occlusion and Treated with Succinate Dehydrogenase Inhibitors or Remote Ischemic Perconditioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4151.
- Coombes, J. S., Powers, S. K., Hamilton, K. L., Demirel, H. A., Shanely, R. A., Zergeroglu, M. A., ... & Ji, L. L. (2000). Improved cardiac performance after ischemia in aged rats supplemented with vitamin E and α -lipoic acid. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(6), R2149-R2155.
- Czibik, G., Steeples, V., Yavari, A., & Ashrafian, H. (2014). Citric acid cycle intermediates in cardioprotection. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(5), 711-719.
- de Castro Fonseca, M., Aguiar, C. J., da Rocha Franco, J. A., Gingold, R. N., & Leite, M. F. (2016). GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 1-9.
- De Jesus, A., Chang, H. C., & Ardehali, H. (2018). Metabolic suppression of HIF-1 α contributes to susceptibility of ischemic injury in diabetic hearts.

- Demirel, H. A., Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Coombes, J., & Naito, H. (2001). Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of applied physiology*, 91(5), 2205-2212.
- Dhalla, N. S., Elmoselhi, A. B., Hata, T., & Makino, N. (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 47(3), 446-456.
- Dikow, R., & Hardt, S. E. (2012). The uremic myocardium and ischemic tolerance: a world of difference.
- Dodd, M. S., Sousa Fialho, M. D. L., Montes Aparicio, C. N., Kerr, M., Timm, K. N., Griffin, J. L., ... & Heather, L. C. (2018). Fatty acids prevent hypoxia-inducible factor-1 α signaling through decreased succinate in diabetes. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(4), 485-498.
- Duncker, D. J., & Bache, R. J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological reviews*, 88(3), 1009-1086.
- Grimolizzi, F., & Arranz, L. (2018). Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood. *haematologica*, 103(10), 1586.
- Guaricci, A. I., Bulzis, G., Pontone, G., Scicchitano, P., Carbonara, R., Rabbat, M., ... & Ciccone, M. M. (2018). Current interpretation of myocardial stunning. *Trends in cardiovascular medicine*, 28(4), 263-271.
- Hano, O. S. A. M. U., Bogdanov, K. Y., Sakai, M. A. K. O. T. O., Danziger, R. G., Spurgeon, H. A., & Lakatta, E. G. (1995). Reduced threshold for myocardial cell calcium intolerance in the rat heart with aging. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 269(5), H1607-H1612.
- Hicks, J. J., Montes-Cortes, D. H., Cruz-Dominguez, M. P., Medina-Santillan, R., & Olivares-Corichi, I. M. (2007). Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Front Biosci*, 12, 2029-2037.
- Hsu, C. P., Oka, S., Shao, D., Hariharan, N., & Sadoshima, J. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circulation research*, 105(5), 481-491.
- Ito, H. (2006). No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*, 3(9), 499-506.
- Jafri, M. S., Dudycha, S. J., & O'Rourke, B. (2001). Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annual review of biomedical engineering*, 3(1), 57-81.

- Jain, M. R., Joharapurkar, A. A., Pandya, V., Patel, V., Joshi, J., Kshirsagar, S., ... & Desai, R. C. (2016). Pharmacological characterization of ZYAN1, a novel prolyl hydroxylase inhibitor for the treatment of anemia. *Drug research*, 66(02), 107-112.
- Jain, M., Joharapurkar, A., Patel, V., Kshirsagar, S., Sutariya, B., Patel, M., ... & Patel, P. R. (2019). Pharmacological inhibition of prolyl hydroxylase protects against inflammation-induced anemia via efficient erythropoiesis and hepcidin downregulation. *European journal of pharmacology*, 843, 113-120.
- Jespersen, N. R., Hjortbak, M. V., Lassen, T. R., Støttrup, N. B., Johnsen, J., Tonnesen, P. T., ... & Bøtker, H. E. (2020). Cardioprotective effect of succinate dehydrogenase inhibition in rat hearts and human myocardium with and without diabetes mellitus. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15.
- Jochmanova, I., & Pacak, K. (2016). Pheochromocytoma: the first metabolic endocrine cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(20), 5001-5011.
- Kanelakis, K. C., Palomino, H. L., Li, L., Wu, J., Yan, W., Rosen, M. D., ... & Barrett, T. D. (2009). Characterization of a robust enzymatic assay for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent hydroxylases. *Journal of biomolecular screening*, 14(6), 627-635.
- Kansagra, K. A., Parmar, D., Jani, R. H., Srinivas, N. R., Lickliter, J., Patel, H. V., ... & Barot, K. (2018). Phase I clinical study of ZYAN1, a novel prolyl-hydroxylase (PHD) inhibitor to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics following oral administration in healthy volunteers. *Clinical pharmacokinetics*, 57(1), 87-102.
- King, A., Selak, M. A., & Gottlieb, E. (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*, 25(34), 4675-4682.
- Kohlhauer, M., Dawkins, S., Costa, A. S., Lee, R., Young, T., Pell, V. R., ... & Channon, K. M. (2018). Metabolomic profiling in acute ST-segment-elevation myocardial infarction identifies succinate as an early marker of human ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Heart Association*, 7(8), e007546.
- Kolář, F., & Ošťádal, B. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*, 53(Suppl 1), S3-S13.
- Kuczmariski, J. M., Martens, C. R., Lennon-Edwards, S. L., & Edwards, D. G. (2014). Cardiac function and tolerance to ischemia-reperfusion injury in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(8), 1514-1524.

- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Moghaddas, S., Hassan, M. O., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2004). Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47961-47967.
- Leung, S. K., & Ohh, M. (2002). Playing tag with HIF: the VHL story. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(3), 131-135.
- Li, F., He, X., Ye, D., Lin, Y., Yu, H., Yao, C., ... & Zhao, S. (2015). NADP⁺-IDH mutations promote hypersuccinylation that impairs mitochondria respiration and induces apoptosis resistance. *Molecular cell*, 60(4), 661-675.
- Li, T., & Le, A. (2018). Glutamine metabolism in cancer. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*, 13-32.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 19.
- Liu, X. B., Wang, J. A., Ogle, M. E., & Wei, L. (2009). Prolyl hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine enhances mesenchymal stem cell survival. *Journal of cellular biochemistry*, 106(5), 903-911.
- Logan, D. C. (2006). The mitochondrial compartment. *Journal of experimental botany*, 57(6), 1225-1243.
- Lomivorotov, V., Efremov, S., Shmirev, V., Ponomarev, D., Lomivorotov, V., & Karaskov, A. (2011, December). Glutamine is cardioprotective in patients with ischemic heart disease following cardiopulmonary bypass. In *Heart Surgery Forum* (Vol. 14, No. 6, p. E384).
- Maack, C., & O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology*, 102(5), 369-392.
- Mariani, J., Ou, R., Bailey, M., Rowland, M., Nagley, P., Rosenfeldt, F., & Pepe, S. (2000). Tolerance to ischemia and hypoxia is reduced in aged human myocardium. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 120(4), 660-667.
- Misra, M. K., Sarwat, M., Bhakuni, P., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Medical Science Monitor*, 15(10), RA209-RA219.
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiological reviews*, 88(2), 581-609.
- Murphy, M. P., & O'Neill, L. A. (2018). Krebs cycle reimaged: the emerging roles of succinate and itaconate as signal transducers. *Cell*, 174(4), 780-784.

- Nečas, Emanuel. Patologická fyziologie orgánových systémů. Praha: Karolinum, 2003. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0615-1.
- Novotný, J., & Zikán, M. (2010). Nádorová angiogeneze. *Klinická farmakologie a farmacie*, 24(3), 124-126
- Nowbar, A. N., Gitto, M., Howard, J. P., Francis, D. P., & Al-Lamee, R. (2019). Mortality from ischemic heart disease: Analysis of data from the World Health Organization and coronary artery disease risk factors From NCD Risk Factor Collaboration. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*, 12(6), e005375.
- Ogita, H., Node, K., Asanuma, H., Sanada, S., Liao, Y., Takashima, S., ... & Kitakaze, M. (2002). Amelioration of ischemia-and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(5), 998-1005.
- O'Mara, N. B. (2008). Anemia in patients with chronic kidney disease. *Diabetes Spectrum*, 21(1), 12-19.
- Ong, S. G., & Hausenloy, D. J. (2012). Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacology & therapeutics*, 136(1), 69-81.
- Ong, S. B., Samangouei, P., Kalkhoran, S. B., & Hausenloy, D. J. (2015). The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 78, 23-34.
- Ostadal, B., & Kolar, F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respiratory physiology & neurobiology*, 158(2-3), 224-236.
- Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., ... & Kummer, W. (2003). Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(5), L710-L719.
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., ... & Ovize, M. (2008). Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 359(5), 473-481.
- Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews*, 92(3), 967-1003

- Prag, H. A., Gruszczuk, A. V., Huang, M. M., Beach, T. E., Young, T., Tronci, L., ... & Aksentijević, D. (2021). Mechanism of succinate efflux upon reperfusion of the ischaemic heart. *Cardiovascular research*, 117(4), 1188-1201.
- Prag, H. A., Pala, L., Kula-Alwar, D., Mulvey, J. F., Luping, D., Beach, T. E., ... & Krieg, T. (2020). Ester prodrugs of malonate with enhanced intracellular delivery protect against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 1-13.
- Puchowicz, M. A., Zechel, J. L., Valerio, J., Emancipator, D. S., Xu, K., Pundik, S., ... & Lust, W. D. (2008). Neuroprotection in diet-induced ketotic rat brain after focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(12), 1907-1916.
- Raedschelders, K., Ansley, D. M., & Chen, D. D. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & therapeutics*, 133(2), 230-255.
- Ravingerova, T., Bernatova, I., Matejikova, J., Ledvenyiova, V., Nemčeková, M., Pecháňová, O., ... & Slezák, J. (2011). Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Experimental & Clinical Cardiology*, 16(3), e23.
- Reddy, A., Bozi, L. H., Yaghi, O. K., Mills, E. L., Xiao, H., Nicholson, H. E., ... & Chouchani, E. T. (2020). pH-gated succinate secretion regulates muscle remodeling in response to exercise. *Cell*, 183(1), 62-75.
- Reffemann, T., & Kloner, R. A. (2006). The no-reflow phenomenon: a basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic research in cardiology*, 101(5), 359-372.
- Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., & Berra, B. (2010). Endogenous antioxidants and radical scavengers. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 52-67). Springer, Boston, MA.
- Rodrigo, R., Prieto, J. C., & Castillo, R. (2013). Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clinical science*, 124(1), 1-15.
- Rosenfeldt, F. L., Pepe, S., Linnane, A., Nagley, P., Rowland, M., Ou, R., ... & Lyon, W. (2002). The effects of ageing on the response to cardiac surgery: protective strategies for the ageing myocardium. *Biogerontology*, 3(1), 37-40.

- Russell, J., Du Toit, E. F., Peart, J. N., Patel, H. H., & Headrick, J. P. (2017). Myocyte membrane and microdomain modifications in diabetes: determinants of ischemic tolerance and cardioprotection. *Cardiovascular diabetology*, 16(1), 1-37.
- Sadagopan, N., Li, W., Roberds, S. L., Major, T., Preston, G. M., Yu, Y., & Tones, M. A. (2007). Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *American journal of hypertension*, 20(11), 1209-1215.
- Said, M., Becerra, R., Valverde, C. A., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., Mundina-Weilenmann, C., ... & Mattiazzi, A. (2011). Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51(6), 936-944.
- Sakamoto, M., Takeshige, K., Yasui, H., & Tokunaga, K. (1998). Cardioprotective effect of succinate against ischemia/reperfusion injury. *Surgery today*, 28(5), 522-528.
- Sambandam, N., Lopaschuk, G. D., Brownsey, R. W., & Allard, M. F. (2002). Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart failure reviews*, 7(2), 161-173.
- Sanada, S., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H1723-H1741.
- Sarkar, K., Cai, Z., Gupta, R., Parajuli, N., Fox-Talbot, K., Darshan, M. S., ... & Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity in endothelial cells is required for acute phase cardioprotection induced by ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10504-10509.
- Saxena, R. K., Saran, S., Isar, J., & Kaushik, R. (2017). Production and applications of succinic acid. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 601-630). Elsevier.
- Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L. J., ... & Garcia, J. A. (2003). Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nature genetics*, 35(4), 331-340.
- Sala-Mercado, J. A., Wider, J., Reddy Undyala, V. V., Jahania, S., Yoo, W., Mentzer Jr, R. M., ... & Przyklenk, K. (2010). Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 122(11_suppl_1), S179-S184.

- Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., ... & Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer cell*, 7(1), 77-85.
- Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual review of physiology*, 76, 39-56
- Singh, A., Wilson, J. W., Schofield, C. J., & Chen, R. (2020). Hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an in-vitro ischaemia model. *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Škutová, Š. (2018). Ischemická tolerance srdce potkana se zhoršenou kontraktílní funkcí. Diplomová práce
- Sobočanec, S., Balog, T., Šverko, V., & Marotti, T. (2003). Sex-dependent antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in ageing mouse brain. *Free radical research*, 37(7), 743-748.
- Spoelstra-de Man, A. M., Elbers, P. W., & Oudemans-van Straaten, H. M. (2018). Making sense of early high-dose intravenous vitamin C in ischemia/reperfusion injury. *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2018*, 125-139.
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*, 85(3), 1093-1129.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057.
- Taylor, D., Bhandari, S., & Seymour, A. M. L. (2015). Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 308(6), F579-F587.
- Tonelli, M., Karumanchi, S. A., & Thadhani, R. (2016). Epidemiology and mechanisms of uremia-related cardiovascular disease. *Circulation*, 133(5), 518-536.
- Tretter, L., Patocs, A., & Chinopoulos, C. (2016). Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1086-1101.
- Turer, A. T., & Hill, J. A. (2010). Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *The American journal of cardiology*, 106(3), 360-368.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, 552(2), 335-344

- Valls-Lacalle, L., Barba, I., Miró-Casas, E., Alburquerque-Béjar, J. J., Ruiz-Meana, M., Fuertes-Agudo, M., ... & García-Dorado, D. (2016). Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular research*, 109(3), 374-384.
- Vemuganti, R., & Arumugam, T. V. (2020). Molecular Mechanisms of Intermittent Fasting-induced Ischemic Tolerance. *Conditioning medicine*, 3(1), 9.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *The Journal of physiology*, 555(1), 1-13.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*, 92(12), 5510-5514.
- WHO – stránky Světové zdravotnické organizace: The top 10 causes of death. WHO | World Health Organization [online]. Copyright © [cit. 23.07.2021]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Widimský, Jiří. Srdeční selhání. 2. rozšíř. a přeprac. vyd. Praha: Triton, 2003. ISBN 80-7254-385-7
- Widimský, P., Hlinomaz, O., Kala, P., & Jirmář, R. (2009). Diagnostika a léčba akutního infarktu myokardu s elevacemi ST. *Cor Vasa*, 51(10), 724-740
- Wiesner, R. J., Deussen, A., Borst, M., Schrader, J., & Grieshaber, M. K. (1989). Glutamate degradation in the ischemic dog heart: contribution to anaerobic energy production. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 21(1), 49-59.
- Wiesner, R. J., Rösen, P., & Grieshaber, M. K. (1988). Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. *Biochemical medicine and metabolic biology*, 40(1), 19-34.
- Willems, L., Zatta, A., Holmgren, K., Ashton, K. J., & Headrick, J. P. (2005). Age-related changes in ischemic tolerance in male and female mouse hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 38(2), 245-256.
- Wills, L. (2017). SUMOylation of the B2AR influences receptor internalisation, desensitisation and downstream signalling (Doctoral dissertation, University of Glasgow).

- Winocour, P. H. (2018). Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. *Diabetic Medicine*, 35(3), 300-305.
- Wu, J., Chen, P., Li, Y., Ardell, C., Der, T., Shohet, R., ... & Wright, G. L. (2013). HIF-1 α in heart: protective mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(6), H821-H828.
- Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., ... & Guan, K. L. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development*, 26(12), 1326-1338.
- Yamamoto, T., & Sadoshima, J. (2011). Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends in cardiovascular medicine*, 21(1), 27-32.
- Yang, K. C., Bonini, M. G., & Dudley Jr, S. C. (2014). Mitochondria and arrhythmias. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 351-361.
- Yang, M., Su, H., Soga, T., Kranc, K. R., & Pollard, P. J. (2014). Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia*, 2, 127.
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121-1135.
- Yui, H., Imaizumi, U., Beppu, H., Ito, M., Furuya, M., Arisaka, H., & Yoshida, K. I. (2011). Comparative effects of verapamil, nicardipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Anesthesiology research and practice*, 2011.
- Zhang, F., Chen, X., Ma, X., Pei, J., & Tao, L. (2017). GW28-e0914 A Novel Mechanism Underlying Energy Metabolic Disorders in Failing Heart: Defective Branched Chain Amino Acid Catabolism-Induced Mitochondrial Metabolic Enzyme Hyper-Succinylation. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(16S), C34-C34.
- Zhang, J., Wang, Y. T., Miller, J. H., Day, M. M., Munger, J. C., & Brookes, P. S. (2018). Accumulation of succinate in cardiac ischemia primarily occurs via canonical Krebs cycle activity. *Cell reports*, 23(9), 2617-2628.
- Zhang, N., Fu, Z., Linke, S., Chicher, J., Gorman, J. J., Visk, D., ... & Johnson, R. S. (2010). The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α is an essential regulator of metabolism. *Cell metabolism*, 11(5), 364-378.

- Zhao, G., Gao, H., Qiu, J., Lu, W., & Wei, X. (2010). The molecular mechanism of protective effects of grape seed proanthocyanidin extract on reperfusion arrhythmias in rats in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 759-767.
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International journal of molecular medicine*, 44(1), 3-15.