

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA VANICKA GOJČIČ

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA VANICKA GOJČIČ

**AKUTNI VPLIVI ZAVIRALCA SIGNALNE POTI WNT NA  
ISHEMIČNO-REPERFUZIJSKE POŠKODBE IZOLIRANEGA SRCA  
PODGANE**

**ACCUTE EFFECTS OF THE WNT PATHWAY INHIBITOR ON  
ISCHEMIA-REPERFUSION INJURIES IN ISOLATED RAT HEART**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratoriju za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

## ZAHVALE

*Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorju viš. znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol. za pomoč in strokovne nasvete pri nastajanju magistrske naloge.*

*Zahvala gre tudi delovni mentorici Ireni Marin, dr. med. za vso pomoč pri delu v laboratoriju.*

*Posebna zahvala gre tudi mojim staršem, ki so mi omogočili študij in me vzpodbujali med izpitnimi obdobji.*

*Hvala tudi vsem drugim, ki so pripomogli k nastanku magistrske naloge in jih nisem posebej omenila.*

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom viš. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

Predsednica komisije:izr. prof. dr. Anamarija Zega

Član komisije:izr. prof. dr. Robert Roškar

Ljubljana, 2015

Sara Vanicka Gojčič

# VSEBINA

POVZETEK .....	IV
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1. Srčno-žilni sistem .....	1
1.1.1. Zgradba srca .....	1
1.1.2. Delovanje srca .....	2
1.2. Ishemična bolezen srca .....	3
1.2.1. Ishemično-reperfuzijska poškodba.....	3
1.3. Signalna pot Wnt .....	5
1.3.1. Kanonična signalna pot Wnt .....	5
1.3.2. Zaviranje signalne poti Wnt .....	6
1.3.3. Miokardni infarkt in signalna pot Wnt.....	8
1.3.4. Zdravila, ki delujejo na signalno pot Wnt.....	10
1.3.5. Aktivatorji in zaviralci signalne poti Wnt naravnega izvora.....	12
1.3.6. Signalna pot Wnt med razvojem srca.....	13
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	15
3. MATERIALI IN METODE .....	16
3.1. Poskusne živali .....	16
3.2. Reagenti in raztopine pri poskusih na izoliranih srcih podgan.....	16
3.3. Pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih srcih podgan ...	17
3.4. Izolacija src podgan po Langendorff-u .....	18
3.4.1. Potek poskusov na izoliranih srcih podgan .....	19
3.4.2. Merjene spremenljivke .....	19
3.5. Obdelava podatkov .....	21
4. REZULTATI .....	22
4.1. Koronarni pretok.....	22

4.2. Moč kontrakcij levega ventrikla .....	24
4.3. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH).....	26
4.4. Frekvenca srčnih utripov .....	28
4.5. Aritmije.....	30
4.5.1. Ventrikularna fibrilacija .....	31
4.5.2. Ventrikularna tahikardija.....	32
4.5.3. Asistolija.....	33
4.5.4. Ekstrasistola oz. ventrikularni prezgodnji utrip .....	34
4.5.5. Trajanje vseh vrst aritmij.....	35
5. RAZPRAVA.....	37
5.1. Razprava o materialih in metodah .....	37
5.1.1. Zaviralec OMP-18R5 .....	37
5.1.2. Metoda po Langendorff-u .....	38
5.2. Razprava o rezultatih .....	38
5.2.1. Koronarni pretok .....	38
5.2.2. Moč kontrakcij levega ventrikla.....	39
5.2.3. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH) .....	40
5.2.4. Frekvenca srčnih utripov .....	42
5.2.5. Pojavljanje in trajanje aritmij .....	42
6. ZAKLJUČEK.....	44
7. LITERATURA .....	46

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shematičen prikaz kanonične signalne poti Wnt. Povzeto po (15). .....	6
<b>Slika 2:</b> Modeli zaviranja signalne poti Wnt. Povzeto po (19). .....	8
<b>Slika 3:</b> Spremembe v ravneh komponent sistema Wnt po MI. Povzeto po (21). .....	9
<b>Slika 4:</b> Ivermektin. Povzeto po (28). .....	11
<b>Slika 5:</b> Niklozamid. Povzeto po (30). .....	11
<b>Slika 6:</b> Pirvinium. Povzeto po (33). .....	12
<b>Slika 7:</b> Koronarni pretok v mL/min izoliranih src podgan. ....	23
<b>Slika 8:</b> Površina pod krivuljo koronarnega pretoka izoliranih src podgan. ....	24
<b>Slika 9:</b> Moč kontrakcij levega ventrikla v mmHg izoliranih src podgan. ....	25
<b>Slika 10:</b> Površina pod krivuljo moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih src podgan. ..	26
<b>Slika 11:</b> Hitrost sproščanja LDH v $\mu$ kat/g min iz izoliranih src podgan. ....	27
<b>Slika 12:</b> Površina pod krivuljo hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih src podgan. ....	28
<b>Slika 13:</b> Srčna frekvenca izoliranih src podgan. ....	29
<b>Slika 14:</b> Površina pod krivuljo srčne frekvence izoliranih src podgan. ....	30
<b>Slika 15:</b> Graf trajanja ventrikularne fibrilacije pri izoliranih srcih podgan. ....	31
<b>Slika 16:</b> Graf trajanja ventrikularne tahikardije pri izoliranih srcih podgan. ....	32
<b>Slika 17:</b> Graf trajanja asistolij pri izoliranih srcih podgan. ....	33
<b>Slika 18:</b> Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih srcih podgan. ....	34
<b>Slika 19:</b> Graf vsote trajanja vseh aritmij pri izoliranih srcih podgan. ....	35
<b>Slika 20:</b> Graf trajanja vseh aritmij po posameznih skupinah. ....	36

## POVZETEK

Signalna pot Wnt igra pomembno vlogo v številnih celičnih procesih in med embrionalnim razvojem. Pomembna je uravnotežena aktivacija poti Wnt, saj številne raziskave ugotavljajo, da pretirano ali oslABLJENO izražanje te poti vodi v številna obolenja, kot je npr. rak, kjer je potrebno prekomerno izraženo pot Wnt zavirati. Zelo pomembno vlogo ima tudi v samem srcu, med njegovim razvojem in pri miokardnem infarktu. Zato je bil naš cilj ugotoviti možen vpliv zaviralca poti Wnt OMP-18R5 na obseg poškodb srca, povzročenih z ishemijo-reperfuzijo. Vpletenost signalne poti Wnt na modelu izoliranega srca še doslej ni bila raziskana.

Pri poskusih na izoliranih srcih podgan smo uporabili metodo po Langedorff-u. Za perfuzijo src smo uporabili fiziološko raztopino Krebs-Henseleit, v katero smo dodali zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5 v treh različnih koncentracijah (1,5 mg/L, 15 mg/L in 150 mg/L). Po 30 minut dolgi stabilizaciji je sledila 40 minut trajajoča globalna ishemija, nato pa še 60 minut trajajoča reperfuzija. Skozi celoten poskus smo merili naslednje spremenljivke, s pomočjo katerih smo lahko določili obseg okvare miokarda: koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze in elektrokardiogram, iz katerega smo odčitali frekvenco srčnih utripov in trajanje ter pojavnost aritmij.

Ugotovili smo, da najnižja koncentracija zaviralca 1,5 mg/L nima vpliva na poškodbe srca, povzročene z ishemijo-reperfuzijo, saj so bile vrednosti za hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze skoraj identične kontrolni skupini, prav tako so rezultati podobni tudi za aritmije. Na drugi strani je koncentracija 15 mg/L pokazala zaščitne učinke, saj je značilno znižala sproščanje laktatne dehidrogenaze. Dolžina trajanja vseh aritmij tudi nakazuje na očitno antiaritmogeno delovanje zaviralca poti Wnt. Opazili smo, da OMP-18R5 v višjih koncentracijah deluje na žile vazokonstriktorno, saj se je koronarni pretok zmanjševal s povečevanjem koncentracije. Prav tako se je moč kontrakcij v levem ventriklu značilno znižala pri večjih koncentracijah zaviralca v primerjavi s kontrolno skupino.

Naša raziskava potrjuje, da ima zaviralec poti Wnt OMP-18R5, ki je sicer potencialna učinkovina za zdravljenje rakavih obolenj, v določenih koncentracijah pozitivne učinke na ishemično-reperfuzijske poškodbe po miokardnem infarktu. Vendar bi bilo potrebnih še veliko raziskav, tako *in vitro* kot *in vivo*, da bi lahko videli, ali bi lahko preiskovana spojina predstavljala potencialno novo zdravilo za bolnike z ishemično boleznijo srca.

**Ključne besede:** signalna pot Wnt, zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5, miokardni infarkt, ishemično-reperfuzijske poškodbe.



## ABSTRACT

Wnt signalling pathway plays an important role in many cellular processes and during embryonal development. A balanced activation of Wnt pathway is important, because several studies have shown that enhanced or impaired expression of this pathway leads to many diseases, such as cancer, where overexpressed Wnt pathway needs to be inhibited. It also has a very important role in the heart, during its development and in myocardial infarction. Therefore, we wanted to determine the possible influence of the Wnt pathway inhibitor OMP-18R5 on the severity of heart injuries, caused by ischemia-reperfusion. The involvement of Wnt signalling pathway on the isolated heart model has not been investigated so far.

We used the Langendorff's method for experiments on the isolated rat hearts. The hearts were perfused with physiological Krebs-Henseleit solution, to which we added Wnt pathway inhibitor OMP-18R5 in three different concentrations (1,5 mg/L, 15 mg/L and 150 mg/L). After 30 minutes of stabilization, followed by a 40-minute ischemia, the hearts were subjected to a 60-minute reperfusion. To determine the severity of myocardial injury we were measuring the following parameters during the experiment: coronary flow, left ventricular pressure, lactate dehydrogenase release rate and electrocardiogram, from which we determined the frequency of heartbeats and the duration and incidence of arrhythmias.

We found that the lowest 1,5 mg/L concentration had no effects on heart injuries caused by ischemia-reperfusion. The results for the lactate dehydrogenase release rate were almost identical to the control group and the results were similar for arrhythmias as well. However, 15 mg/L concentration showed protective effects, because it significantly reduced the lactate dehydrogenase release rate. Overall duration of arrhythmia clearly showed antiarrhythmic effects of the Wnt pathway inhibitor. We noticed that OMP-18R5 had vasoconstrictory effects in higher concentrations, because the coronary flow was decreasing with the increase in concentration. The left ventricular pressure was significantly reduced in higher concentrations of inhibitor compared to the control group.

Our study confirms that Wnt pathway inhibitor OMP-18R5, which is a potential anticancer drug, shows positive effects on ischemia-reperfusion injuries in certain concentrations after myocardial infarction. But it would be necessary to carry out a lot of *in vitro* and *in vivo* research to see if the tested compound could be a potential new drug for patients with ischemic heart disease.

**Key words:** Wnt signalling pathway, Wnt pathway inhibitor OMP-18R5, myocardial infarction, ischemia-reperfusion injuries.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat ( <i>angl.</i> adenosine triphosphate)
AV vozal	atrioventrikularni vozal
AV zaklopka	atrioventrikularna zaklopka
CK-I $\alpha$	kazein kinaza I $\alpha$ ( <i>angl.</i> casein kinase I $\alpha$ )
EKG	elektrokardiogram
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila ( <i>angl.</i> Food and drug administration)
GSK-3 $\beta$	glikogen sintazna kinaza 3 $\beta$ ( <i>angl.</i> glycogen synthase kinase 3 $\beta$ )
I-R poškodba	ishemično-reperfuzijska poškodba
K-H raztopina	raztopina Krebs-Henseleit
Krm1	kremen1 ( <i>angl.</i> kremen1)
Krm2	kremen2 ( <i>angl.</i> kremen2)
LDH	laktatna dehidrogenaza
LRP 5/6	LDL-receptorju soroden protein 5/6 ( <i>angl.</i> low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6)
MI	miokardni infarkt
mPTP pora	mitohondrijska velika prevodna pora ( <i>angl.</i> mitochondrial permeability transition pore)
MSC	mezenhimske izvorne celice ( <i>angl.</i> mesenchymal stem cells)
NaDH	nikotinamid adenin dinukleotid
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SA vozal	sinoatrialni vozal
TRIS	trihidroksimetil aminometan
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik ( <i>angl.</i> vascular endothelial growth factor)
VF	ventrikularna fibrilacija
VT	ventrikularna tahikardija
WIF-1	zaviralni dejavnik Wnt-1 ( <i>angl.</i> Wnt inhibitory factor 1)

# 1. UVOD

## 1.1. Srčno-žilni sistem

Srčno-žilni sistem sestavljajo srce, ki črpa kri in zaprt sistem arterij, ven in kapilar. Kri se skozi pljučni krvni obtok nasiči z kisikom in se vrne v srce, od koder vstopi v sistemski krvni obtok in dobavlja organom potreben kisik in hranila, hkrati pa odnaša odpadne snovi in tako vzdržuje ustrezno homeostazo (1, 2).

### 1.1.1. Zgradba srca

Srce se nahaja za prsnico v prsnem košu med desnimi in levimi pljuči v spodnjem delu sprednjega medpljučja. Obdaja ga osrčnik oz. perikardij. Notranjost srca je razdeljena na štiri votline. Zgornji dve votlini se imenujeta atrija (preddvora), spodnji dve pa ventrikla (prekata). vzdolž srca votline ločuje srčni pretin oz. septum, ki deli srce na levo in desno polovico. Desni ventrikel potiska kri v pljuča, levi ventrikel pa v sistemski krvni obtok. Srce ima tudi štiri zaklopke, ki zagotavljajo enosmeren tok krvi skozi srce. Med obema atrijema in ventriklo se nahajata leva in desna atrioventrikularna (AV) zaklopka. Leva se imenuje mitralna, desna pa trikuspidalna zaklopka. Drugi dve zaklopki imenujemo semilunarni zaklopki. Prva aortna zaklopka se nahaja v aornem ustju, druga pa v ustju pljučnega debla (1, 2).

Srčno steno sestavljajo tri plasti: epikard (zunanja plast), miokard (srednja plast) in endokard (notranja plast). Miokard oz. srčno mišičnino uvrščamo med prečno progaste mišičnine. Ločimo prevodno in delovno srčno mišičnino. Osnovna enota slednje so kardiomiociti (srčna mišična celica), ki so med seboj povezani z anastomozami. Med celicami najdemo stičnice, ki so pomembne za prevajanje vzbujenja iz ene celice na drugo. Prevodno srčno mišičnino pa sestavljajo snopi modificirane srčne mišičnine, kjer se v mišičnih vlaknih tvorijo in prevajajo impulzi za krčenje srčne mišice (1).

Srce prehranjujeta dve koronarni arteriji, leva in desna, ki izhajata iz aorte tik nad aortno zaklopko. V času kontrakcije ventriklov sta arteriji stisnjeni, med ventrikularno relaksacijo pa se razširita in napolnita s krvjo. Desna arterija prehranjuje večji del srca, torej desni atrij in ventrikel in večji del prevodnega sistema srca. Leva arterija prehranjuje večji del levega atrija in ventrikla. Levi ventrikel opravlja največ dela z iztisom krvi ob ustreznem tlaku v sistemski krvni obtok. Med glavnima koronarnima arterijama obstaja nekaj povezav ali

anastomoz, ki v manjšem obsegu zagotavljajo pretok med obema žilama. Veliko povezav pa obstaja med manjšimi arterijami v srcu, ki v primeru ishemije lahko nastanejo, da zagotovijo ustrezen pretok v neprekrvavljene predele srca (1, 2).

### **1.1.2. Delovanje srca**

Srce je črpalka, ki ima določeno frekvenco utripov glede na potrebe organizma. Med srčnim utripom se srce krči (sistola) in sprošča (diastola). Z kisikom revna kri priteče po veni cavi v desni atrij, izmenično pa priteka kri iz pljuč v levi atrij. V času polnjenja atrijev, sta AV zaklopki zaprti in ventrikla skrčena. Ko tlak v atrijih preseže tlak v ventriklih, se odpreta obe AV zaklopki in kri steče v ventrikla. Ko se oba napolnita s krvjo, se začneta krčiti in tlak narašča do vrednosti, ki preseže tlak v pljučni arteriji in aorti. Obe AV zaklopki se zapreta, odpreta pa se semilunarni zaklopki in kri steče v pljučni in sistemski krvni obtok. Ob koncu krčenja ventriklov tlak znotraj njih naglo pada in zapre obe semilunarni zaklopki. Takrat se ponovno odpreta obe AV zaklopki in začne se nov srčni cikel (3).

Srce oživčujejo simpatična in parasimpatična vlakna avtonomnega živčevja. Hkrati pa srce proizvaja tudi svoj akcijski potencial. Sistem, ki proizvaja in prevaja akcijski potencial se imenuje prevodni sistem srca. V ta sistem spada sinoatrialni (SA) in atrioventrikularni (AV) vozeli, iz katerega izhaja njegov snop, ki se konča s Purkinjevimi vlakni v ventriklih. SA vozeli imenujemo tudi spodbujevalnik. V njem nastaja primarni dražljaj za krčenje srca, ki nato potuje preko obeh atrijev, ki se začneta krčiti, do AV vozla, kjer se prevajanje dražljaja nekoliko upočasni, da lahko atrija zaključita svoje krčenje preden dražljaj doseže oba ventrikla. Poznamo dva tipa akcijskega potenciala: počasen tip potenciala v SA in AV vozlu, ter hiter tip v Purkinjevih vlaknih in miocitih atrijev in ventriklov (1, 2, 4).

Akcijski potencial v ventrikularnih miocitih v človeškem srcu ima pet faz. Začne se s fazo 0, ko pride do depolarizacije membrane in odprtja hitrih napetostno odvisnih  $\text{Na}^+$  kanalov. V fazi 1 ali fazi delne repolarizacije  $\text{Na}^+$  vdre v celico in spremeni membranski potencial, kar povzroči zaprtje  $\text{Na}^+$  kanalov in odprtje prehodno odprtih  $\text{K}^+$  kanalov. Sledi faza 2 ali faza platoja, kjer se odprejo počasni, dolgo odprti  $\text{Ca}^{2+}$  kanali tipa L in tok  $\text{Ca}^{2+}$  v celico uravnoteži tok  $\text{K}^+$  iz celice. Medtem se v sarkoplazmi povečuje koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$ , ki pospeši delovanje  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  črpalke, kar ustvari neto tok  $\text{Na}^+$  v celico. V fazi 3 se  $\text{Ca}^{2+}$  kanali zaprejo in odprejo se počasni, od napetosti odvisni  $\text{K}^+$  kanali in celica se

repolarizira. Sledi ji faza mirovnega membranskega potenciala oz. faza 4. V večini miocitov je ta potencial stabilen, v nekaterih miocitih pa tokovi  $\text{Na}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v celico počasi depolarizirajo membrano proti pragu vzdraženja, kar posledično sproži nov akcijski potencial (4, 5).

## **1.2. Ishemična bolezen srca**

Ishemična bolezen srca je vodilni vzrok obolevanja in smrti v razvitih državah in je posledica zmanjšane koronarnega pretoka skozi srce. Najpogostejši vzrok za nastanek te bolezni je ateroskleroza koronarnih arterij. Za normalno delovanje srčne mišice je potreben optimalen pretok krvi, ki srce oskrbuje z kisikom. Srce namreč nima velikih zalog kisika, zato je odvisno predvsem od koronarnega pretoka. Če se ta zmanjša, se poruši ravnovesje med dobavo in porabo kisika, kar privede do ishemije srčne mišice, ki jo bolnik občuti kot bolečino v predelu prsnice. Ishemija povzroči elektrofiziološke, biokemične in mehanične spremembe v srcu, kar dolgoročno povzroča poslabšanje stanja in vodi k razvoju kroničnih miopatij (6, 7).

### **1.2.1. Ishemično-reperfuzijska poškodba**

Miokardna ishemija v celicah povzroča oksidativni stres. Pomanjkanje kisika v celicah ustavi oksidativno fosforilacijo v mitohondrijih, kar povzroči izgubo glavnega vira energije adenzin trifosfata (ATP), ki začne nastajati po anaerobni poti. V celicah se začnejo kopičiti  $\text{H}^+$  ioni in laktat, kar privede do znotrajcelične acidoze in inhibicije glikolize. Posledica je elektrolitsko neravnovesje. Preko  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  črpalke celica izloča  $\text{H}^+$  ione in vanjo prihajajo  $\text{Na}^+$  ioni, zato naraste znotrajcelična koncentracija  $\text{Na}^+$ . Gradient za  $\text{Na}^+$  se s tem zmanjša in vzpodbudi delovanje  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  črpalke, preko katere prihajajo  $\text{Ca}^{2+}$  ioni v celico. Povečana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira proteaze in fosfolipaze, ki poškodujejo citoskelet. Poveča se razgradnja fosfolipidov, pri čemer se sproščajo proste maščobne kisline in lizofosfolipidi. Razgradni produkti prodirajo v celične membrane in oslabijo njihovo funkcijo (8, 9, 10).

V zgodnjih fazah reperfuzije nastaja v celici veliko reaktivnih kisikov zvrsti (ROS). Kopičijo se  $\text{Ca}^{2+}$  ioni in nevtrofilci, ki preidejo v mikrocirkulacijo. ROS in nevtrofilci nastajajo v poškodovanih miocitih in endotelnih celicah v območju ishemije. ROS povzročijo lipidno peroksidacijo in poškodujejo celične membrane,  $\text{Ca}^{2+}$  ioni pa prožijo

nekontrolirano krčenje miofibrilov. Reperfuzija lahko izzove irreverzibilno poškodbo miocitov, krvavitve zaradi poškodovanih krvnih žil in s tem sproščanje določenih encimov, ki so označevalci miokardnega infarkta in jih lahko dokažemo z ustreznimi laboratorijskimi testi (9).

Celična smrt je ključnega pomena med embrionalnim razvojem in tkivno homeostazo pri odraslih. Nepravilnosti v nadzoru celične smrti prispeva k številnim boleznim. Smrt celic vključuje tako fiziološke kot patološke procese in se lahko zgodi po različnih mehanizmih, kot sta apoptoza in nekroza. Apoptoza je vpletena v razvojno remodelacijo številnih tkiv, v tkivno homeostazo pri odraslih in v odgovor na stres. Nekroza je omejena na patološke procese, kot je npr. vnetje po poškodbi tkiva. Takšne oblike celične smrti so opazili tudi v srčno-žilnem sistemu (11).

Glavni razlog za letalno poškodbo miocitov med reperfuzijo je povečana koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, anorganskega fosfata in pomanjkanje ATP-ja, kar spodbuja odprtje mitohondrijskih velikih prevodnih por (mPTP), posledica tega pa je nekroza miocitov. Ugotovili so, da glikogen sintazna kinaza 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) v odgovor na povečano koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  in ROS, prispeva k odprtju teh por. mPTP pore se odprejo v 5 do 10 minutah po začetku reperfuzije, vendar ne v času ishemije. V času ishemije-reperfuzije (I-R) se aktivirajo kaspaze-3, -8, -9 in pride do translokacije Bax in Bcl-2, kar vodi v apoptozo (12). GSK-3 $\beta$  se direktno veže na jedrni protein p53 in s tem vzpodbuja od p53 odvisno apoptozo. Druge študije pa so pokazale, da GSK-3 $\beta$  tudi zavira aktivacijo p53. Obstaja negativna povratna zanka med  $\beta$ -kateninom in p53. Medtem ko prekomerno izražanje  $\beta$ -katenina zvišuje raven p53, aktivacija p53 povzroči razgradnjo  $\beta$ -katenina preko GSK-3 $\beta$ . Prav tako GSK-3 $\beta$  uravnava ravni  $\beta$ -katenina v celicah s fosforilacijo in s tem povzroči njegovo razgradnjo. Zaviranje aktivnosti GSK-3 $\beta$  vodi v stabilizacijo in akumulacijo  $\beta$ -katenina v citosolu, ki potem začne prehajati v jedro, kjer nadzira izražanje tarčnih genov (13). Od p53 odvisno regulacijo mPTP por lahko zavremo z zaviranjem aktivnosti GSK-3 $\beta$ . Prav tako z zaviranjem GSK-3 $\beta$  zaviramo hidrolizo ATP-ja z zmanjšanjem transporta ATP-ja iz citosola v mitohondrije. Zmanjšanje hidrolize ATP-ja med ishemijo bi preprečilo pomanjkanje ATP-ja in akumulacijo anorganskega fosfata, ki oba spodbujata odprtje mPTP por (12).

### 1.3. Signalna pot Wnt

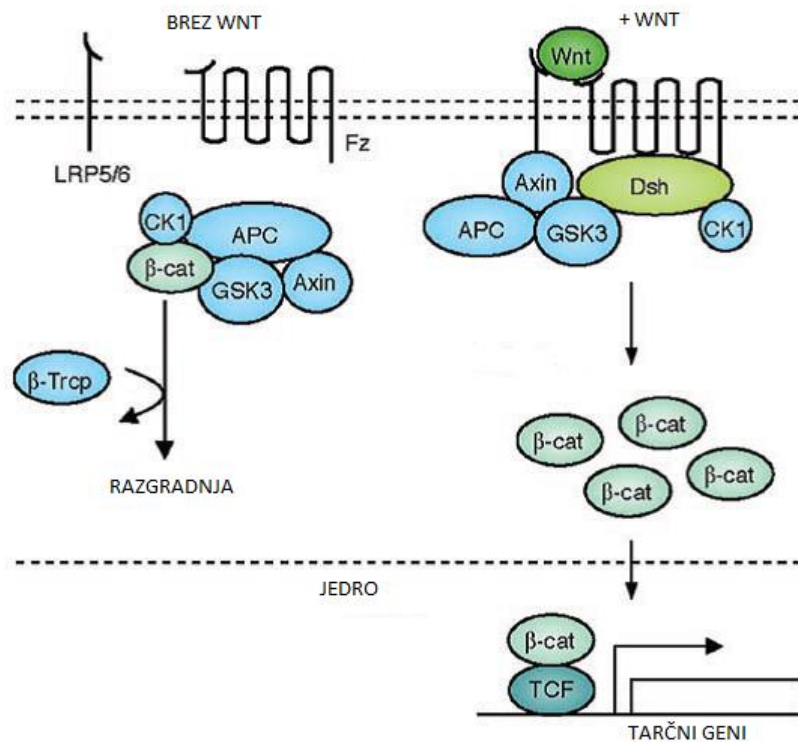
Signalna pot Wnt je evolucijsko pomembna pot, ki preko glikoproteinov Wnt uravnava celično proliferacijo, polarnost in determinacijo med embrionalnim razvojem in tkivno homeostazo. Mutacije v poti Wnt so pri ljudeh pogosto povezane s prirojenimi napakami, rakom in drugimi boleznimi (14). Glikoproteini Wnt se vežejo na svoj Fz (*angl.* frizzled) receptor, transmembranski protein, ki je sklopljen s proteinom G. Pri ljudeh poznamo 19 proteinov Wnt in 10 Fz receptorjev. Poznamo tri vrste signalne poti Wnt:

- Kanonična signalna pot Wnt ali od  $\beta$ -katenina odvisna signalna pot,
- Nekanonična signalna pot Wnt ali od  $\beta$ -katenina neodvisna signalna pot,
- Nekanonična signalna pot Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  (15, 16).

#### 1.3.1. Kanonična signalna pot Wnt

Glavno vlogo pri tej poti ima citoplazemski protein  $\beta$ -katenin (slika 1). V odsotnosti proteina Wnt se  $\beta$ -katenin razgradi s pomočjo destruktivskega kompleksa, ki ga sestavljajo aksin, APC (*angl.* adenomatous polyposis coli), GSK-3 $\beta$  in kazein kinaza I $\alpha$  (CK-I $\alpha$ ). CK-I $\alpha$  in GSK-3 $\beta$  fosforilirata  $\beta$ -katenin, kar sproži ubikvitinacijo in proteosomsko razgradnjo  $\beta$ -katenina preko  $\beta$ -TrCP. Znak aktivacije kanonične poti Wnt je kopičenje  $\beta$ -katenina v celičnem jedru. Po vezavi proteina Wnt na transmembranski Fz receptor in LRP 5/6 koreceptor (*angl.* low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) se destruktivski kompleks razgradi. Kazein kinaza I $\gamma$  in GSK-3 $\beta$  fosforilirata LRP 5/6 koreceptor, kar povzroči nastanek vezavnega mesta za aksin. Na aksin se vežejo še citoplazemski protein DVL (*angl.* dishevelled) in APC, kar onemogoči nastanek destruktivskega kompleksa. Na ta način se zavira aktivnost GSK-3 $\beta$ , ki ne more fosforilirati  $\beta$ -katenina, zato se ta nakopiči v citoplazmi in začne prehajati v jedro, kjer preko vezave na transkripcijske dejavnike TCF/LEF1 (*angl.* T-cell factor/lymphoid enhancing factor) sproži izražanje tarčnih genov (15, 17, 18). Proteini, ki aktivirajo kanonično pot Wnt so Wnt-1, -3a in -8. Ugotovili so, da je za signalizacijo Wnt/ $\beta$ -katenin pomembna lokalna sprememba v pH, kot pri nekanonični poti. Spremembo pH regulira proreninski receptor in H<sup>+</sup> črpalka (16).





**Slika 1:** Shematičen prikaz kanonične signalne poti Wnt. Povzeto po (15).

### 1.3.2. Zaviranje signalne poti Wnt

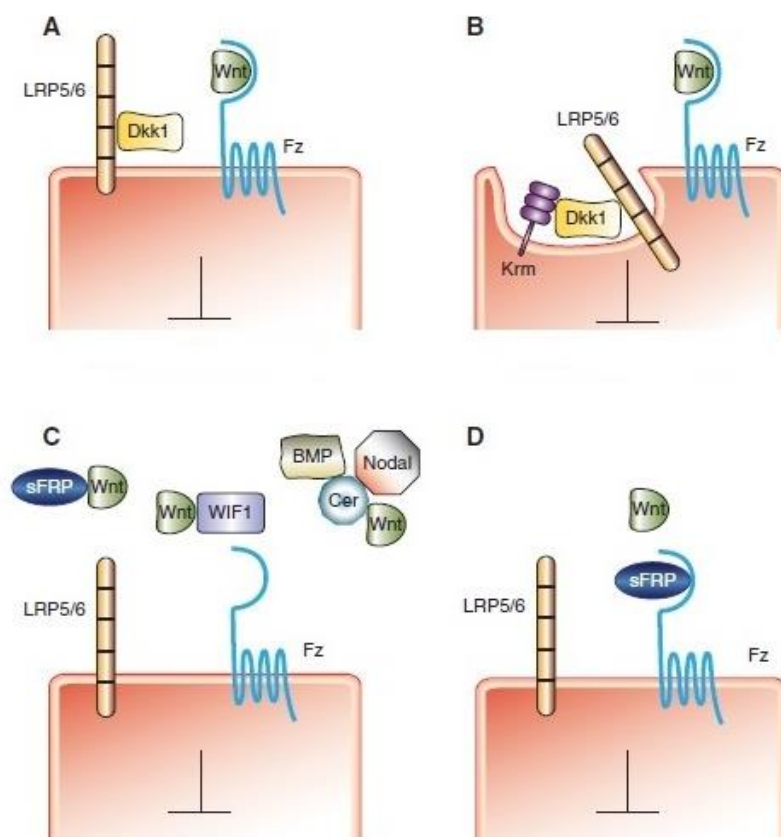
Signalizacijo Wnt uravnava veliko število naravnih zaviralcev in aktivatorjev te poti. Ti lahko delujejo bodisi intracelularno, kjer regulirajo komponente transdukcijskega kompleksa ali ekstracelularno, pri čemer regulirajo interakcije med ligandi in njihovimi receptorji. Zaviralci poti Wnt spadajo v več manjših družin proteinov, med katere spadajo Dkk (*angl.* dickkopf proteins), sFRP (*angl.* secreted frizzled-related proteins), WIF-1 (*angl.* Wnt-inhibitory factor 1), Wise/SOST, Cerberus, IGF1BP, Shisa, Waif-1, APCDD-1 in Tiki-1. Njihova skupna lastnost je, da preprečijo interakcije med proteini Wnt in receptorjem. Aktivatorja Wnt, R-spondin in Norrin pa spodbujata signalizacijo Wnt z vezavo na receptorje Wnt ali s sprostitvijo zaviralca Wnt (19) in lahko aktivirajo pot Wnt neodvisno od proteinov Wnt (15).

**Družina proteinov Dkk:** Pri vretenčarjih poznamo štiri proteine Dkk in sicer Dkk-1, -2, -3 in -4. Najbolj preučevan član te družine je Dkk-1, ki prepreči aktivacijo signalne poti Wnt z vezavo na LRP 5/6 koreceptor (zato zavira le kanonično pot) in transmembranski protein Kremen1 (Krm1) in Kremen2 (Krm2) (slika 2A, 2B). Tako Dkk-1 in tudi Dkk-2, LRP 5/6 in Krm skupaj tvorijo kompleks, ki moti signalizacijo Wnt s tem, da vzpodbuja endocitozo

in odstranitev receptorja Wnt s plazemske membrane. Krm1 in Krm2 močno potencirata delovanje Dkk-1 in s tem zavirajo poti Wnt. V številnih študijah humanih boleznih so ugotovili vpletenost družine proteinov Dkk. Spremembe v izražanju Dkk so opazili pri več vrstah raka in njihovo vpletenost pri nevrodegenerativnih procesih, kot je sproženje apoptoze po poškodbah nevronov (19, 20). Dkk-1, -2 in -3 so odkrili tudi v razvijajočem srcu. Dkk-3 je izražen v miocitih atrijev odraslih, vendar ga ni v ventriklih. Visoke ravni Dkk proteinov so povezane s prezgodnjim miokardnim infarktom (MI) pri ljudeh (21).

**Družina proteinov sFRPs** deluje antagonistično z direktno vezavo na proteine Wnt. Tako zavirajo kanonično in nekanonično pot (slika 2C, 2D). Pri ljudeh so identificirali 5 članov te družine in sicer sFRP-1, -2, -3, -4 in -5. Ugotovili so, da se sFRP1-4 vežejo na protein Wnt-3a, medtem ko se le sFRP-1 in sFRP-2 vežeta na protein Wnt-5a. Številne študije so opisovale možne interakcije med proteini sFRP in proteini Wnt v različnih razvojnih modelih, vključno z nevrnalno cevjo, žilnim endotelijem in razvojem srca. Inaktivacija sFRP-1 in sFRP-2 je smrtna za zarodek, saj prihaja do krajšanja osi AP in nepopolne somalne segmentacije, to stanje pa se poslabša, če je inaktiviran tudi sFRP-5. Če upoštevamo vlogo proteinov sFRP med razvojem, moramo upoštevati, da ti proteini ne delujejo vedno kot antagonisti poti Wnt. Eksperimenti na tkivnih kulturah so pokazali, da sFRP-1 pri nizkih koncentracijah potencira aktivnost Wg (*angl.* wingless – homolog Wnt pri drozofili). sFRP-1 ima nizko in visoko afinitetna vezavna mesta za Wg. Vezava na visoko afinitetno mesto bi spodbudilo signalizacijo Wnt, medtem ko bi vezava na nizko afinitetno vezavno mesto imela ravno obraten učinek. Opažanja so pokazala, da sFRP-1 in sFRP-2 izzoveta različne celične odgovore, če ju uporabimo v podobnih koncentracijah. Oba sta izražena v razvijajočih se ledvicah, kjer sFRP-1 zavira nastanek tubulov, medtem ko sFRP-2 nima nobenega učinka. sFRP-2 zavira učinek sFRP-1. Proteini sFRP naj bi delovali tudi kot tumorski zaviralni geni, saj je njihova izguba ali znižana raven povezana z več vrstami karcinomov (19, 20).

**Zaviralni dejavnik Wnt-1 WIF-1** je prisoten pri ribah, dvoživkah in sesalcih. Izražen je v mnogih tkivih, najpogosteje pa se pojavlja v možganih, pljučih, mrežnici in hrustancu. Deluje tako, da preprečuje vezavo proteinov Wnt na njihove receptorje in s tem zavira kanonično in nekanonično pot (slika 2C). Veže se na številne proteine kot so Wnt-3a, -4, -5a, -7a, -9a in -11. Tudi WIF-1 poleg Dkk in sFRP proteinov igra pomembno vlogo pri raku, saj so zaznali nizke ravni WIF-1 pri več vrstah raka (19).

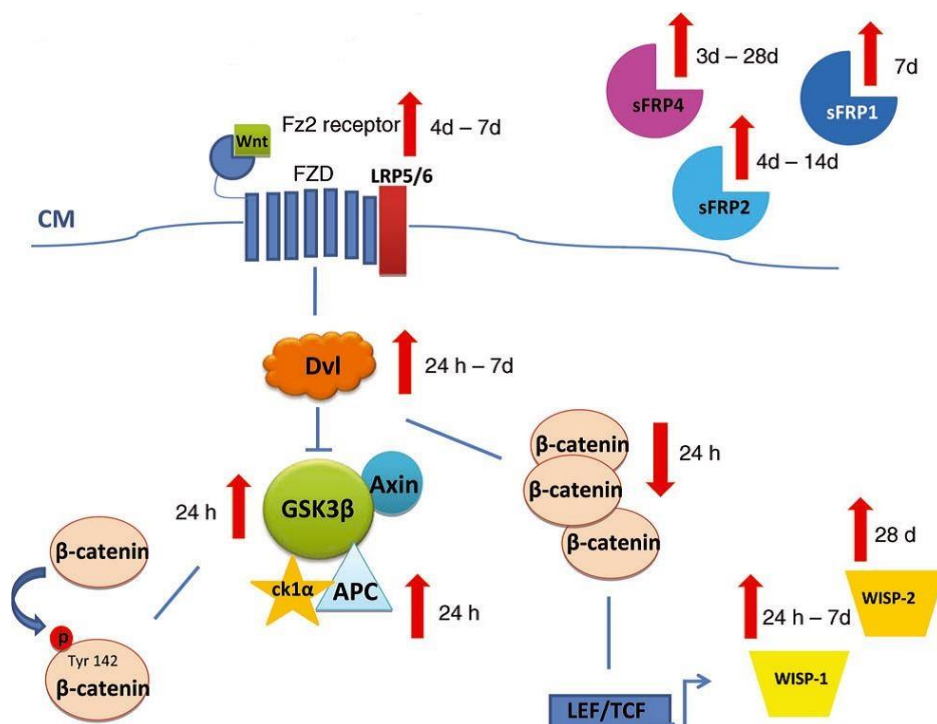


**Slika 2:** Modeli zaviranja signalne poti Wnt. Povzeto po (19).

### 1.3.3. Miokardni infarkt in signalna pot Wnt

MI povzroči nekrozo tkiva zaradi nezadostnega pretoka krvi. Temu sledi "celjenje", kjer igra pomembno vlogo proliferacija in migracija fibroblastov v prizadeto območje in njihova sprememba v miofibroblaste. Prizadeto tkivo se zabrazgotini, kar je ključno za normalno "celjenje" srca po infarktu. Pri spreminjanju oz. remodelaciji tkiva je signalizacija Wnt spremenjena (21, 22). Opazili so povečano izražanje nekaterih članov družine Wnt v celem srcu po infarktu: Wnt-1, -2, -4, -7a, -10b, -11, sFRP-1, -2, -4, Dkk-1, -2 (23) in dva člana Fz receptorjev Fz-1 in Fz-2 (24). Medtem ko v zdravem srcu lahko najdemo naslednje proteine: Wnt-2, -5a, -5b, -7b, -9a, -11, sFRP-1, -2 in Dkk-3. Ugotovili so, da se preko Wnt-1/ $\beta$ -katenina v fibroblastih po MI aktivira profibrotični popravilni odgovor. V prvih dneh po MI fibroblasti izražajo Wnt-1. Signalizacija Wnt-1/ $\beta$ -katenin je nujno pomembna za celjenje po MI, saj se pomanjkanje  $\beta$ -katenina v fibroblastih izraža v slabšem celjenju prizadetega tkiva (23). Pri migraciji miofibroblastov pri podganah so ugotovili, da izražajo Fz-2 receptor. Protein DVL-1 je bil prav tako izražen v infarktne območju, njegova koncentracija se je višala do 7. dneva po infarktu in je postala skoraj

nezaznavna po 28. dneh. Prav tako so opazili povečano raven APC v območju infarkta in GSK-3 $\beta$  v neprizadetem delu srca ter znižane ravni  $\beta$ -katenina v prizadetem delu srca po 24. urah. Zvišale so se tudi ravni sFRP-1, -2 in -4 (21, 22). Spremembe v ravneh komponent sistema Wnt prikazuje slika 3.



**Slika 3:** Spremembe v ravneh komponent sistema Wnt po MI. Povzeto po (21).

Nastanek novih žil ali angiogeneza je pomemben proces pri ishemični bolezni srca in je bistvena za vzpostavitev ponovnega pretoka krvi v prizadeti del srca. Glavni modulator angiogeneze je žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF). *In vitro* VEGF lahko spodbuja fosforilacijo  $\beta$ -katenina v endotelijskih celicah, kar vodi v motnje oz. razgradnjo kompleksa  $\beta$ -katenin/kadherin v adherentnih povezavah. Motnje v celičnih adhezivnih kompleksih so pomembne za migracijo endotelijskih celic v novo nastale žile. Torej je stimulacija nastanka novih žil po MI preko VEGF vsaj delno odvisno od  $\beta$ -katenina (22).

Po MI lahko vplivamo na različne sisteme in poti Wnt. Prekomerno izražanje sFRP-1 se odraža v manjšem prizadetem območju in tanjši brazgotini po MI. Uravnava sFRP-2 in učinki so odvisni od časa intervencije. sFRP-2 je vpleten v procesiranje kolagena. Injekcija sFRP-2 dva dni po infarktu je preprečila fibrozo 14 dni po infarktu. Preprečitev fibroze je potekla brez tanjšanja stene ali poškodbe miokarda. Ravni sFRP-2 po MI se hitro povišajo,

po 14 dneh pa padejo na raven, ko se poveča odlaganje kolagena, zato bi poznejša aplikacija sFRP-2 lahko preprečila fibrozo. sFRP-4 regulira odlaganje ekstracelularnega matriksa in preživetje celic po MI. Intramuskularna injekcija sFRP-4 ohranja kontraktilno funkcijo srca. Signalizacija  $\beta$ -katenina in tvorba brazgotine se zmanjšata. Po MI je signalizacija Wnt v epikardu okrepljena in spodbuja epitelijsko-mezenhimalni prehod v fibroblaste. Transgeno zaviranje izražanja  $\beta$ -katenina oslabi srčno funkcijo 8 dni po I-R poškodbi. Prenos gena adenovirusnega  $\beta$ -katenina na rob območja MI pri podganah je zmanjšalo infarktno območje in izboljšalo ventrikularno funkcijo. Prekomerno izražanje  $\beta$ -katenina v kardiomiocitih in fibroblastih se kaže v zmanjšani apoptozi. Spojini pirvinium in UM206 zmanjšujeta posledice poškodb srca po MI. Pirvinium aktivira CK-I $\alpha$  in s tem spodbuja razgradnjo  $\beta$ -katenina. Aplikacija 10 minut po MI je izboljšala diastolno funkcijo in razmerja levega ventrikla. UM206 zavira vezavo Wnt-3a/Wnt-5a na Fz-1 in Fz-2 receptor. Aplikacija 5 tednov po MI je zmanjšala širitev prizadetega območja in preprečila srčno popuščanje. Torej so pristopi, ki zmanjšujejo signalizacijo Wnt na splošno koristni, vendar ti po drugi strani krepijo signalizacijo  $\beta$ -katenina (21).

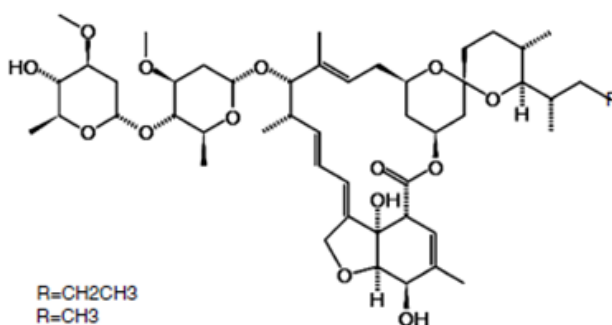
#### **1.3.4. Zdravila, ki delujejo na signalno pot Wnt**

Signalna pot Wnt je ključna pot, ki uravnava embrionalni razvoj in mnoga patološka stanja pri človeku. Nepravilna aktivacija kanonične poti Wnt lahko vodi v razvoj rakavih obolenj in pripomore k drugim fibroproliferativnim boleznim (25). Njena vloga v odrasli dobi je manj pomembna, vendar ima kljub temu velik biološki pomen. V primerih tkivnih poškodb se signalna pot Wnt/ $\beta$ -katenin reaktivira in zato nezadostna aktivacija poti vodi v neuspešno regeneracijo in nato v degeneracijo tkiva (26). Zato je ta pot potencialna tarča za zdravljenje bolezni različnih organov, vključno z kožo, jetri, ledvicami, črevesjem, prostato in dojkami. Pri številnih boleznih (rak, fibroproliferativne bolezni) so opazili okrepljeno delovanje poti Wnt, zato so razvili ustrezne zaviralce, ki bi zmanjšali signalizacijo. Zaviralci delujejo na različne tarče: zaviranje proizvodnje in sproščanja proteinov Wnt, preprečitev interakcij med proteini Wnt in njihovimi receptorji na celičnih membranah, motnjo Fz receptorsko posredovane aktivacije DVL proteinov, krepitev izražanja aksina, ciljanje izoform CK-I in zaviranje  $\beta$ -kateninske signalizacije. Na drugi strani pri nekaterih boleznih (npr. osteoporoza, KOPB) opazimo oslABLJENO (kanonično) pot Wnt. Doslej so razvili aktivatorje poti Wnt, ki krepijo signalizacijo Wnt. Ti delujejo tako, da lahko zavirajo modulatorje signalne poti Wnt (npr. Dkk-1 oslabi kanonično

signalizacijo Wnt, kar vodi v hudo izgubo kostne mase), aktivirajo signalizacijo  $\beta$ -katenina ali zavirajo GSK-3 $\beta$  (25).

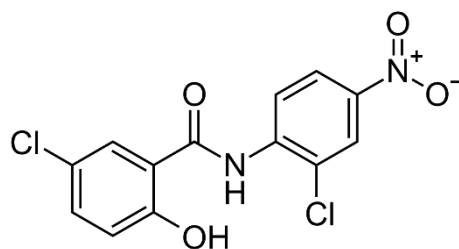
**OMP-18R5 (vantictumab)** je monoklonsko protitelo, ki se veže s petimi Fz receptorji: Fz-1, -2, -5, -7 in -8. Blokira vezavo proteinov Wnt na Fz receptor in s tem zavira signalno pot Wnt/ $\beta$ -katenin, kar so ugotovili z proteinom Wnt-3a, ki je aktivator kanonične poti Wnt. Znižuje akumulacijo  $\beta$ -katenina, povzročeno z vezavo proteina Wnt-3a na Fz receptor in zmanjša fosforilacijo LRP 6. Ugotovili so, da zavira rast mnogih rakov, predvsem pljučnega raka, raka na dojkah, raka debelega črevesja in raka trebušne slinavke. OMP-18R5 učinkovito deluje sam, še večjo učinkovitost pa pokaže v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki, predvsem z taksolom (27).

**Ivermektin** je na trgu registriran kot antiparazitik, ki ga uporabljajo predvsem za zdravljenje rečne slepote (*lat.* Onchocerciasis). Pri Ameriški agenciji za hrano in zdravila (FDA) in Evropski agenciji za zdravila so ivermektin klinično odobrili kot specifičen zaviralec signalne poti Wnt-TCF pri zdravljenju raka. Zavira proliferacijo in poveča apoptozo celic pri več vrstah rakavih obolenj. Dokazali so, da deluje že v mikromolarnih koncentracijah (28).



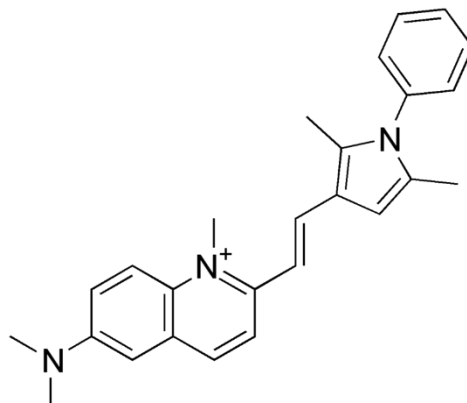
**Slika 4:** Ivermektin. Povzeto po (28).

**Niklozamid** je FDA odobrila kot zdravilo za zdravljenje trakulje. Ugotovili so, da je močan zaviralec signalne poti Wnt/ $\beta$ -katenin, ki je povečana predvsem pri raku jajčnikov. Niklozamid selektivno deluje na rakave celice jajčnikov. Razgradi LRP 5/6 koreceptor, torej preprečuje proliferacijo in povzroča apoptozo rakavih celic. Rezultati so pokazali sinergistično delovanje niklozamida skupaj z karboplatinom, saj sta skupaj v kombinaciji povzročila smrt 10 % celic več, kot niklozamid sam. Raven  $\beta$ -katenina se je znižala v tumorjih, ki so jih zdravili z niklozamidom. Prav tako je zaviral sekundaren nastanek oz. razvoj tumorjev (29).



**Slika 5:** Niklozamid. Povzeto po (30).

**Pirvinium** je FDA odobrila kot antihelmintik. Ugotovili so, da je pirvinium zaviralec poti Wnt v kulturi sesalskih celic in da stabilizira  $\beta$ -katenin in preprečuje razgradnjo aksina. Njegova tarča je CK-I $\alpha$ , na katero se veže in jo aktivira. Pri raziskavi vpliva pirviniuma na poškodbe miokarda in remodelacijo oz. regeneracijo tkiva po sami poškodbi so ugotovili, da je zgodnja remodelacija prilagoditev miokarda, da vzdržuje normalno srčno funkcijo, vendar napredna remodelacija postane škodljiva in povzroči napredovanje srčne bolezni. Poskusi na miših so pokazali, da je le ena intramuskularna aplikacija spojine preprečila napredujočo remodelacijo miokarda, medtem ko na apoptozo celic miokarda ni imel vpliva (31). V drugi raziskavi so odkrili, da pirvinium spodbuja samoobnovo mezenhimskih izvornih celic (MSC), tako da stabilizira  $\beta$ -katenin in s tem poveča proliferacijo MSC *in vitro*. Spojina zavira pot Wnt v MSC, tako zavira diferenciacijo MSC in posledica tega je povečana proliferacija MSC *in vitro* in boljša umestitev celic *in vivo* (32).



**Slika 6:** Pirvinium. Povzeto po (33).

**UM206** je homologni peptidni fragment Wnt-3a/Wnt-5a, ki blokira aktivacijo Fz-1 in Fz-2 receptorjev. Ta dva receptorja imata povečane ravni predvsem v srcu po infarktu. Zato je uporaba UM206 pospešila celjenje po infarktu, povečalo se je število miofibroblastov in krvnih žil v infarktne območju. Preprečila je širitev infarktne območja, izboljšala se je srčna funkcija in popolnoma je preprečila umrljivost, povezana s srčnim popuščanjem (24).

**OMP-54F28** je fuzijski protein, ki vsebuje cisteinsko domeno Fz-8 receptorja in imunoglobulinsko Fc domeno, ki tekmuje z naravnim Fz-8 receptorjem za naravne proteine in tako blokira signalno pot Wnt. Ugotovili so, da je učinkovit kot samostojna spojina ali pa v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki. Znižuje rast tumorjev in preprečuje njihov ponoven razvoj (34).

### 1.3.5. Aktivatorji in zaviralci signalne poti Wnt naravnega izvora

**Flavonoidi** so polifenolne spojine, ki jih lahko najdemo v celotnem rastlinskem svetu. Ugotovili so, da lahko flavonoidi po številnih mehanizmih vplivajo na proces karcinogeneze. Apigenin je prvi flavonoid, ki so mu dokazali vpliv na pot Wnt zaradi selektivnega zaviranja kazein kinaze II. V celicah tumorja dojke je apigenin znižal ravni  $\beta$ -

katena in DVL proteinov. Kvercetin je zaviral ekspresijo ciklina D1, survivina in zaviral signalno pot Wnt/ $\beta$ -katena. Fisetin, tudi kot zaviralec poti Wnt/ $\beta$ -katena, je znižal izražanje proteinov Wnt in njihovih koreceptorjev in povečal izražanje endogenih zaviralcev Wnt. Genistein je povzročil povečanje ravni GSK-3 $\beta$  in tako pospešil fosforilacijo in razgradnjo  $\beta$ -katena (35).

**Hidnokarpin** je lignin, izoliran iz nadzemnih delov japonskega kovačnika (*Lonicera japonica*). Ugotovili so, da selektivno zavira endogeno aktivirano pot Wnt/ $\beta$ -katena v celicah raka debelega črevesja. S povečevanjem koncentracije hidnokarpina je fosforilirana oblika  $\beta$ -katena naraščala in s tem tudi njegova razgradnja (36).

**Emodin**, izoliran iz korenin in lubja mnogih rastlin, kot sta krhlika in rabarbara, spada med antrakinone. Ima antiproliferativne in antitumorne učinke na mnoge vrste *in vitro* tumorjev in tumorjev pri miših. Emodin zavira signalno pot  $\beta$ -katena/TCF v celičnih kulturah, prav tako zavira izražanje ključnih akterjev poti Wnt (37).

**Kardamonin** je halkon, ki se nahaja v različnih rastlinah iz rodu *Alpinia*. Zavira pigmentacijo v melanocitih preko zaviranja signalne poti Wnt/ $\beta$ -katena in vzpodbuja razgradnjo  $\beta$ -katena. Preko zniževanja ravni  $\beta$ -katena zavira diferenciacijo melanocitov sproženo s proteinom Wnt-3a. Tako bi lahko kardamonin predstavljal potencialno učinkovino za zdravljenje pigmentnih nepravilnosti, saj se je izkazal kot močan zaviralec pigmentacije v humanih melanocitih (38).

### 1.3.6. Signalna pot Wnt med razvojem srca

En izmed prvih funkcionalnih organov v razvijajočem se embriju je srce. Razvoj cirkulacije je ključnega pomena za nastajajoči zarodek, saj ga oskrbuje s hranili in s kisikom. Signalna pot Wnt je vpletena v več procesov razvoja srca, kot je razvoj srčnih votlin, zaklopk, uvihavanje sten srca ter oblikovanje septumov. Razvoj srca pri sesalcih se začne s pretvorbo miokardnih prekursorjskih celic v zarodni plasti mezoderma, ki postane področje zarodnih srčnih pol. Proces nastanka srca imenujemo kardiogeneza, za katero so potrebni številni rastni dejavniki in proteini Wnt. V kokošnjih in mišjih zarodkih so našli številne proteine Wnt: Wnt-3a, -5a, -5b in -8c. Prav tako so določili še 4 člane družine Wnt, izražene v srčni zasnovi piščančjih zarodkov: Wnt-2b, -5a, -7a in -14 (ali -9). Poleg številnih proteinov Wnt so našli veliko Fz receptorjev v mezodermu srčnih zarodnih pol,



srčnega nevralnega grebena ali v odraslem srcu, vključno mišje Fz-2, -4 in -9, žabje Fz-7, -8, -10a in -10b vrste *Xenopus* in človeške Fz receptorje: Fz-1, -2, -7, -8 in -9 (39, 40).

Analize piščančjih in žabjih zarodkov vrste *Xenopus* so pokazale zaviralno vlogo kanonične signalne poti Wnt/ $\beta$ -katenin med miokardno diferenciacijo. Pri žabah *Xenopus* je zaviranje kanonične poti z zaviralcem Dkk ali drugim zaviralcem poti Wnt povzročilo ektopično nastajanje kardiomiocitov. Prav tako je zaviranje te poti nujno za kardiogenezo v piščančjih zarodkih. V mišjih zarodkih je tkivno pomanjkanje  $\beta$ -katenina privedlo do nastanka številnih dodatnih src. Prekomerno izražanje Wnt-3a ali Wnt-8 pri žabah *Xenopus* zavira kardiogenezo in podobno je pri piščančjih zarodkih, ko pot Wnt/ $\beta$ -katenin zavira nastajanje kardiomiocitov. Torej je zaviranje poti Wnt/ $\beta$ -katenin pomembno med diferenciacijo kardiomiocitov (39).

Številne študije so ugotovile, da tudi nekanonična pot Wnt igra pomembno vlogo med razvojem srca. Pri ribah zebrih je izguba nekanonične poti Wnt povzročila okvarjen razvoj srca («cardia bifida»), kar se kaže v okvari srčnih zarodnih pol. Torej kanonična pot Wnt zavira kardiogenezo, zato se mora zavirati za pravilen razvoj srca. Medtem ko nekanonična pot Wnt pripomore k zaviranju signalne poti Wnt/ $\beta$ -katenin in spodbuja diferenciacijo miokarda ter je vpletena v srčno morfogenezo preko regulacije od kadherinov odvisne adhezije celic in celične polarnosti (39).

V poznejših fazah razvoja srca je signalna pot Wnt vpletena v razvoj srčnih zaklopk, prevodnega sistema srca in iztisnih votlin srca. Nekanonična pot Wnt je pomembna v teh fazah predvsem zaradi razvoja iztisnih votlin in nepravilno delovanje te poti vodi v hude okvare. Signalna pot Wnt/ $\beta$ -katenin je pomembna najprej za razvoj endokardialnih blazinic, iz katerih se naprej razvijajo srčne zaklopke. Med diferenciacijo kardiomiocitov zarodka v fenotip purkinjevih vlaken, kar lahko povzroča tudi endotelin-1, so opazili zvišane ravni Wnt-7a in Wnt-11. Torej sta kanonična in nekanonična pot nepogrešljivi za pravilen razvoj srca (39, 40).

V odraslem tkivu je signalna pot Wnt pomembna predvsem pri nadzoru homeostaze in preživetja celic (14). Glavni mediator te poti je GSK-3 $\beta$ , ki med drugim vpliva na odprtje mPTP por (12) in se povezuje s proteinom p53 (13). Pot Wnt vpliva na odpiranje in zapiranje K<sup>+</sup> kanalov v srcu in nastanka ROS (41). Glavni protein kanonične poti Wnt  $\beta$ -katenin je tudi nepogrešljiv del medcelične povezave  $\beta$ -katenin/kadherin, ki je ključna za prevajanje električnega signala v srcu (42).

## 2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V naši raziskavi želimo ugotoviti direkten vpliv zaviralca signalne poti Wnt OMP-18R5 (vantictumab) na poškodbe srca, povzročene z I-R na izoliranih srcih podgan Wistar. Izolirana srca bomo namestili na napravo po Langendorff-u in jih perfundirali z oksigenirano raztopino Krebs-Henseleit (K-H). Raztopini bomo dodali zaviralec OMP-18R5 v treh različnih koncentracijah: 1,5 mg/L, 15 mg/L in 150 mg/L. S popolnoma prekinjenim dotokom perfuzijske raztopine bomo v srcih podgan povzročili ishemijo in nato po reperfuziji ocenili stopnje poškodbe miokarda. V magistrski nalogi želimo ugotoviti, kako zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5 vpliva na I-R poškodbe srca in pojavljanje srčnih aritmij. Med poskusom bomo spremljali in merili spremenljivke, ki so pokazatelj delovanja srca in možnih srčnih okvar: koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, sproščanje laktatne dehidrogenaze (LDH) in elektrokardiogram (EKG), iz katerega bomo določili frekvenco srčnih utripov in ugotovili pojavljanje aritmij.

Delovne hipoteze:

1. OMP-18R5 vpliva na nastanek poškodb izoliranega srca, povzročenih z I-R.
2. OMP-18R5 bo zmanjšal poškodbe srca, povzročene z I-R ob optimalni koncentraciji tako, da se bodo zmanjšali označevalci poškodb (LDH, aritmije) in ohranile vitalne funkcije srca (srčna frekvenca, koronarni pretok in kontraktilnost srca).
3. OMP-18R5 bo imel pomemben vpliv na prevodnost in kontraktilnost srca z značilnimi razlikami pri različnih koncentracijah.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Poskusne živali

Za poskus smo izbrali podgane moškega spola tipa Wistar, težke od 270 do 320 g in stare okrog 4 mesece (Lastnik živali je Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Dovoljenje za izvajanje poskusov št. 34401-14/2011/12 je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.). Živali smo vzgajali pri konstantnih klimatskih pogojih s temperaturo zraka med 23 in 25 °C, 12-urnim intervalom dnevno-nočne svetlobe in 24-urnim dostopom do hrane in vode. Živali smo hranili z briketi za podgane Altromin 1324 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Nemčija).

#### 3.2. Reagenti in raztopine pri poskusih na izoliranih srcih podgan

- **Raztopina Krebs-Henseleit**

Izolirana srca podgan smo perfundirali s fiziološko raztopino K-H naslednje sestave:

- 118,5 mmol/L NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 4,7 mmol/L KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 11,1 mmol/L glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- 25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 1,66 mmol/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- 1,2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 2,52 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

- **Raztopina zaviralca signalne poti Wnt OMP-18R5 (OncoMed Pharmaceuticals, ZDA)**

Zaviralec OMP-18R5 (vantictumab) je monoklonsko protitelo, ki ga shranjujemo v hladilniku na temperaturi 2-8 °C. Preiskovana snov je bila v obliki raztopine v 100 mL vsebnikih s koncentracijo 10 mg/mL. En vsebnik vsebuje 1000 mg te snovi. V 1 L raztopine K-H smo dodali raztopino zaviralca v treh različnih količinah in sicer 0,15 mL, 1,5 mL in 15 mL in dobili naslednje koncentracije protitelesa v raztopini K-H: 1,5 mg/L, 15 mg/L in 150 mg/L.

- **Uretan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)**

Uretan se pogosto uporablja kot anestetik pri terminalnih študijah z živalmi, saj ima minimalne učinke na srčno-žilni in respiratorni sistem. Uporabili smo 20 % raztopino uretana v odmerku 0,7 mL na 100 g telesne teže podgane.

- **Heparin (Krka, Novo Mesto, Slovenija)**

Heparin je visoko sulfatiran glikozaminglikan, fiziološki antikoagulant, ki preprečuje nastajanje krvnih strdkov. Aktivira antitrombin III, ki inaktivira trombin in druge serinske proteaze, predvsem faktor Xa. Anestezirani živali smo ga aplicirali v trebušno votlino pred izolacijo srca in sicer 0,3 mL, kar ustreza 1500 i. e. natrijevega heparinata. Ena viala vsebuje 5 mL raztopine za injiciranje, kar predstavlja 25000 i. e. natrijevega heparinata.

- **LDH reagent**

LDH reagent sestavlja piruvat (9,7 mmol/L) in NaDH (0,24 mmol/L), ki sta raztopljena v TRIS pufru. Piruvat (Boehringer, Mannheim, Nemčija) je spojina z dvojno ogljikovo vezjo, ki jo cepi encim LDH. Na takšen način lahko določimo količino prisotne LDH v efluentu. NaDH (Roche, Švica) je donor H<sup>+</sup> ionov, ki se vežejo na prosto vez po cepitvi dvojne ogljikove vezi v piruvatu. Zato ga uporabimo pri določanju LDH.

- **Karbogen (Messer, Ruše, Slovenija)**

Karbogen je plinska zmes 95 % kisika in 5 % ogljikovega dioksida, ki smo jo uporabili za preprihovanje raztopine K-H.

### **3.3. Pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih srcih podgan**

- Male in velike kirurške pincete,
- male in velike kirurške škarje,
- kirurška prijemalka,
- kanila,
- sukanec,
- parafilm,
- tehnica,
- injekcijske brizge,

- čaše, epruvete, bučke, merilni valji,
- tipsi,
- polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska),
- aparatura po Langendorff-u (Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani),
- srebrove elektrode (Ag/AgCl) s predojačevalnikom za merjenje EKG, 100x predojačitev signala (Dewetron, Slovenija),
- tlačna kateterska sonda MILLAR Micro-tip SPR-524 (Millar Instruments, Inc., ZDA),
- kontrolna enota tlačne sonde MILLAR PCU 2000 (Millar Instruments, Inc., ZDA),
- termostat LAUDA E 100 z grelcem in črpalko LAUDA ecoline 003 (Lauda dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Nemčija),
- napetostni ojačevalnik DAQP-V (Dewetron, Slovenija),
- analogno digitalni (AD) pretvornik PCI-6013, 200 K-Hz, 16 bit (National Instruments, ZDA),
- spektrofotometer (Eon-One Chemistry analyser, Vital diagnostics, Italija),
- računalnik,
- GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, ZDA),
- Dewesoft 6.1b14 Prof (Dewetron, Slovenija).

### **3.4. Izolacija src podgan po Langendorff-u**

Podganam smo v trebušno votlino najprej injicirali ustrezen odmerek 20 % raztopine uretana in nato še 0,3 mL raztopine heparina proti strjevanju krvi. Po nastopu globoke anestezije smo živali odprli prsni koš, prerezali aorto in vanjo vstavili kanilo, napolnjeno z ohlajeno raztopino K-H, ki je segala nad aortno zaklopko. Med samo izolacijo smo srce ves čas hladili z omenjeno raztopino, da smo umirili srčne kontrakcije. Srce smo nato ustrezno namestili v aparaturo po Langendorff-u in zagotovili pretok oksigenirane raztopine K-H. V levi ventrikel smo preko levega atrija vstavili Millarjevo tlačno katetersko sondo, s katero smo merili tlak v levem ventriklu. V smeri električne osi srca smo namestili še srebrove elektrode za merjenje EKG. Ustrezno temperaturo celotne

aparature in raztopin za perfuzijo smo vzdrževali s termostatom na 38°C. Prav tako smo srce pred zunanjimi vplivi in ohlajanjem dodatno zaščitili s stekleno posodo in parafilmom.

### **3.4.1. Potek poskusov na izoliranih srcih podgan**

Ko smo srce ustrezno namestili v aparaturo po Langendorff-u, smo lahko pričeli s 130 minutnim poskusom. Najprej je sledila 20 minut dolga perfuzija srca z oksigenirano raztopino K-H, nato pa smo srce 10 minut perfundirali še z raztopino K-H, ki je vsebovala raztopljen zaviralec OMP-18R5 v treh različnih koncentracijah (1,5 mg/L, 15 mg/L ali 150 mg/L). Temu je sledila 40 minut dolga globalna ishemija, ko smo prekinili dotok perfuzijske raztopine. Nato smo ponovno vzpostavili pretok oksigenirane raztopine K-H, v kateri je bil raztopljen zaviralec OMP-18R5 v koncentracijah 1,5 mg/L, 15 mg/L ali 150 mg/L. Reperfuzija srca je trajala 60 minut.

### **3.4.2. Merjene spremenljivke**

Med samim poskusom smo merili naslednje spremenljivke (razen v času 40 minutne ishemije): koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, hitrost sproščanja LDH in EKG, iz katerega smo na koncu določili frekvenco srčnih utripov in trajanje 4 vrst aritmij (ventrikularne fibrilacije (VF), ventrikularne tahikardije (VT), asistolije in ekstrasistole oz. ventrikularnega prezgodnjega utripa).

- **Koronarni pretok**

Srce smo perfundirali z oksigenirano K-H raztopino skozi kanilo, vstavljeno v aorto. Spodnji del kanile je segal nad semilunarno zaklopko, nad katero se nahajajo tudi vhodi v obe koronarni arteriji. Raztopina je tekla skozi desno in levo koronarno arterijo, v desni atrij in nato ven iz srca skozi prerezane žile. Koronarni pretok (mL/min) smo merili tako, da smo v določenih časovnih intervalih zbirali perfuzijsko raztopino v epruveto z merilno skalo.

- **Moč kontrakcij levega ventrikla**

Moč kontrakcij v levem ventriklu (razlika med sistolnim in diastolnim tlakom) smo merili tako, da smo Millarjevo tlačno katetersko sondo vstavili preko levega atrija, skozi mitralno zaklopko v levi ventrikel. Sondo MILLAR Micro-tip SPR-524 smo priklopili na ojačevalnik preko Millarjeve kontrolne enote in merili tlačno razliko med sistolnim in

diastolnim tlakom s frekvenco 500 Hz. Ojačane signale smo preko analogno-digitalnega pretvornika shranjevali na računalnik s pomočjo programa Dewesoft. Razlike tlakov smo izrazili v mm živega srebra (mmHg).

- **Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)**

Iz efluentov, ki smo jih zbrali v določenih časovnih intervalih in jih predhodno pretresli, smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  vzorca in mu dodali 800  $\mu\text{L}$  LDH reagenta. Zmes smo ročno mešali točno 20 sekund in pri valovni dolžini 340 nm s spektrofotometrom pomerili porabo NaDH. Tako smo posredno določili aktivnost encima LDH v vzorcu. Hitrost sproščanja LDH smo izrazili v  $\mu\text{kat g}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

- **Frekvenca srčnih utripov**

Srčno frekvenco (število utripov na minuto) smo odčitali iz EKG v enakih časovnih točkah, kot smo zbirali perfuzijsko raztopino za merjenje koronarnega pretoka in LDH. Frekvence nismo mogli odčitati, če so bile v teh točkah prisotne aritmije.

- **Elektrokardiogram (EKG)**

Za snemanje EKG smo uporabili srebrove elektrode (Ag/AgCl), ki smo jih namestili v smeri električne osi srca. Signal smo 100x ojačali s predojačevalnikom (Dewetron, Slovenija) in nato podatke shranjevali s pomočjo ojačevalnika DAQP-V (Dewetron, Slovenija) in analogno-digitalnega pretvornika na računalnik. Iz EKG smo nato odčitali srčno frekvenco (utripi/min) in določili trajanje 4 vrst aritmij.

Aritmije smo odčitali čez cel poskus. Motnja ritma srca ali aritmija je vsak srčni ritem, ki ni fiziološki sinusni ritem v razponu frekvenc med 60 in 100 utripi/min. Trajanje posamezne vrste aritmije smo izrazili v sekundah (s).

**Ventrikularna fibrilacija (VF)** je stanje, ko posamezne QRS komplekse ne moremo ločiti od drugih, zato ne moremo odčitati srčne frekvence.

**Ventrikularna tahikardija (VT)** predstavlja nenormalno hiter srčni ritem s širokimi QRS kompleksi. Število utripov/min običajno presega 150 pri ljudeh, pri podganah pa se številka giblje med 500-600 utripi/min.

**Asistolija** je stanje brez električne aktivnosti srca, pri čemer na elektrokardiogramu vidimo ravno črto.

**Ekstrasistola** predstavlja prezgodnjo kontrakcijo ventrikla, ki jo na elektrokardiogramu prepoznamo kot prezgodnji QRS kompleks, glede na P val.

### **3.5. Obdelava podatkov**

Dobljene podatke smo obdelali s pomočjo programa GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, ZDA). Rezultate za vsako skupino smo povprečili in jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Določili smo površine pod krivuljo (AUC, area under the curve) in s pomočjo enofaktorske in dvofaktorske analize variance (one-way ANOVA in two-way ANOVA) in Bonferronijevim post-hoc testom primerjali skupine med seboj. Med primerjanjem rezultatov je značilno razliko predstavljala vrednost  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI

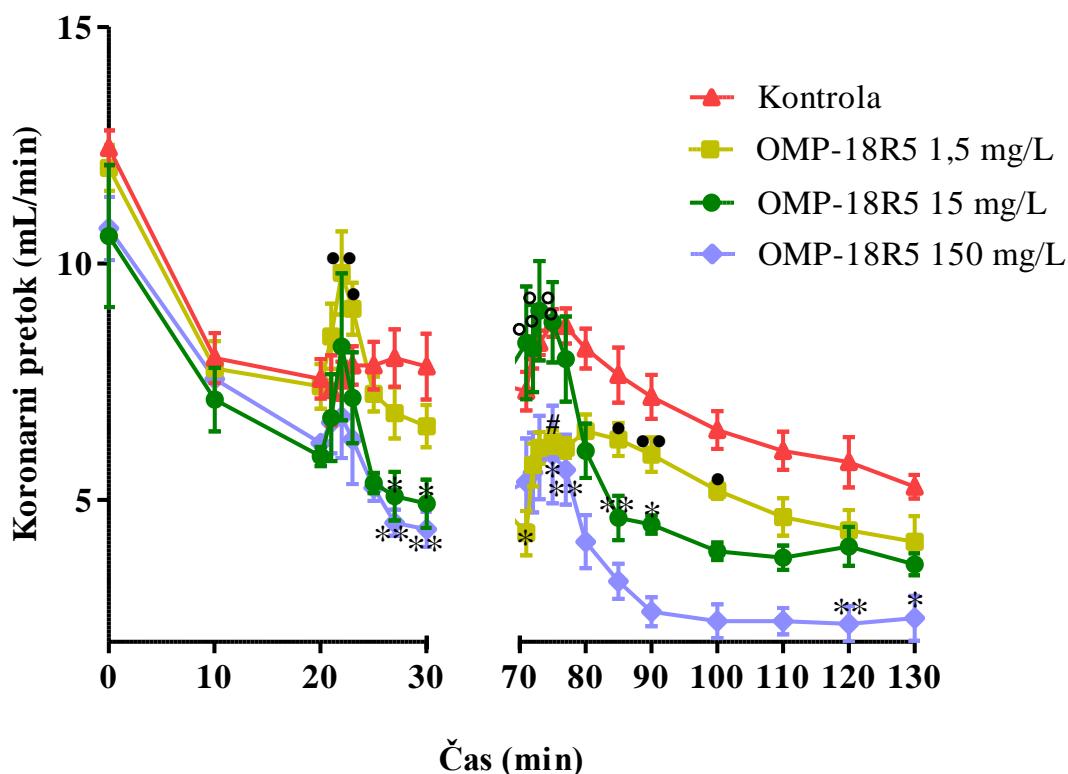
Izolirana srca podgan smo tretirali z zaviralcem signalne poti Wnt OMP-18R5 (vantictumab) v treh različnih koncentracijah (1,5 mg/L, 15 mg/L in 150 mg/L). Za vsako koncentracijo in kontrolno skupino smo uporabili po štiri do pet živali. Vsak poskus je bil dolg 130 minut. Najprej smo pričeli z 30 minut dolgo stabilizacijo srca. Pri kontrolni skupini smo izolirana srca perfundirali s predhodno pripravljeno raztopino K-H. V tretiranih skupinah pa smo zadnjih 10 minut stabilizacije srca perfundirali z raztopino K-H, ki je imela dodano preiskovano spojino. Pri vseh skupinah smo nato prekinili dotok raztopine K-H in srca izpostavili 40 minut dolgi ishemiji. Sledila je 60 minutna reperfuzija, kjer smo srca še naprej perfundirali s raztopino K-H z dodanim zaviralcem, kontrolna srca pa le z raztopino K-H brez dodanega zaviralca. Pri vseh štirih skupinah smo merili spremenljivke (koronarni pretok, moč kontrakcij levega ventrikla, hitrost sproščanja LDH, frekvenca srčnih utripov in EKG) skozi ves poskus v določenih časovnih intervalih, razen v času ishemije.

### 4.1. Koronarni pretok

Od začetka poskusa pa vse do 20. minute je koronarni pretok primerljiv med vsemi štirimi skupinami. V 21. minuti smo začeli dovajati raztopino K-H z raztopljenim zaviralcem OMP-18R5. Pretok se je pri vseh skupinah z dodano spojino hitro povečeval do 22. minute, kjer je dosegel vrh, nato pa postopoma upadal in se okrog 27. minute ustalil. Najbolj se je povečal pri koncentraciji zaviralca 1,5 mg/L, najmanj pa pri koncentraciji 150 mg/L. Pri kontrolni skupini ni bilo povečanja pretoka, ta se je okrog 10. minute ustalil in bil vse do začetka ishemije na približno enaki vrednosti.

V 71. minuti poskusa po vzpostavitvi pretoka perfuzijske raztopine je pretok naglo narastel pri vseh štirih skupinah, dosegel vrh v 73.-75. minuti in nato začel počasi upadati. Najbolj je narastel pri koncentraciji zaviralca 15 mg/L, nato pa hitro padal do 85. minute in se nato ustalil in bil približno enak do konca poskusa. Pretok je najbolj padel pri največji koncentraciji 150 mg/L, padal je do 90. minute in se nato ustalil. Pri najmanjši koncentraciji 1,5 mg/L je pretok začel upadati v 80. minuti in se nato počasi zmanjševal do konca poskusa, vendar se ni zmanjšal tako izrazito kot pri koncentracijah 15 mg/L in 150 mg/L. Najvišji pretok v času reperfuzije je bil prisoten v kontrolni skupini, saj je bil ves čas višji od preostalih skupin, kjer smo dovajali zaviralec.

Iz grafa površine pod krivuljo lahko razberemo, da je na koronarni pretok najbolj vplivala koncentracija 150 mg/L, saj se je ta vidno zmanjšal v primerjavi z ostalima koncentracijama, kjer je bil pretok prav tako zmanjšan glede na kontrolo, vendar ni bilo statistično značilnih razlik. Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so se pojavile pri 150 mg/L glede na kontrolno skupino in skupino s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L, ter razlike pri 150 mg/L ( $p < 0,01$ ) glede na kontrolno skupino.



**Slika 7:** Koronarni pretok v mL/min izoliranih src podgan.

Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

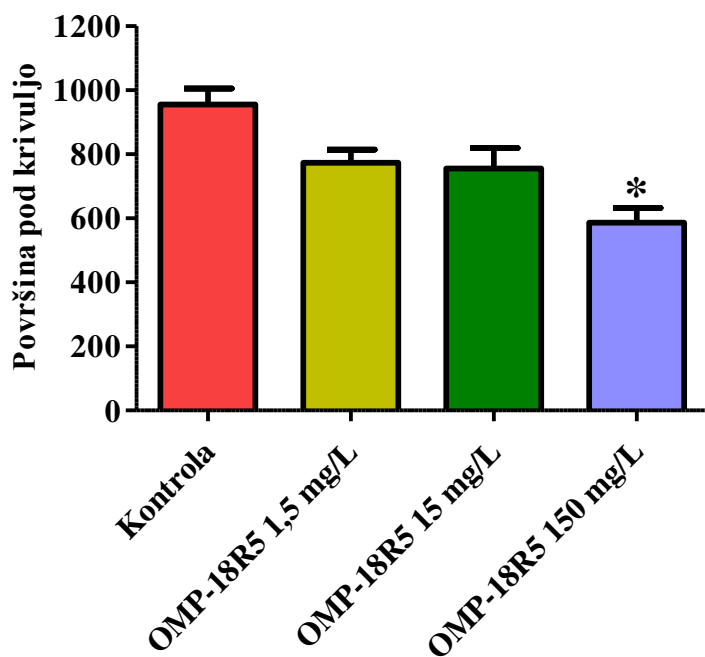
\* - Značilne razlike glede na kontrolno skupino (\* -  $p < 0,05$  in \*\* -  $p < 0,01$ )

# - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 15 mg/L (# -  $p < 0,05$  in ## -  $p < 0,01$ )

• - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 150 mg/L (• -  $p < 0,05$  in •• -  $p < 0,01$ )

° - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 150 mg/L (° -  $p < 0,05$  in °° -  $p < 0,01$ )

Število živali (N): 19



**Slika 8:** Površina pod krivuljo koronarnega pretoka izoliranih src podgan.

\* - Značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v skupini s koncentracijo zaviralca 150 mg/L glede na kontrolno skupino ter skupino s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L in značilne razlike ( $p < 0,01$ ) glede na kontrolno skupino.

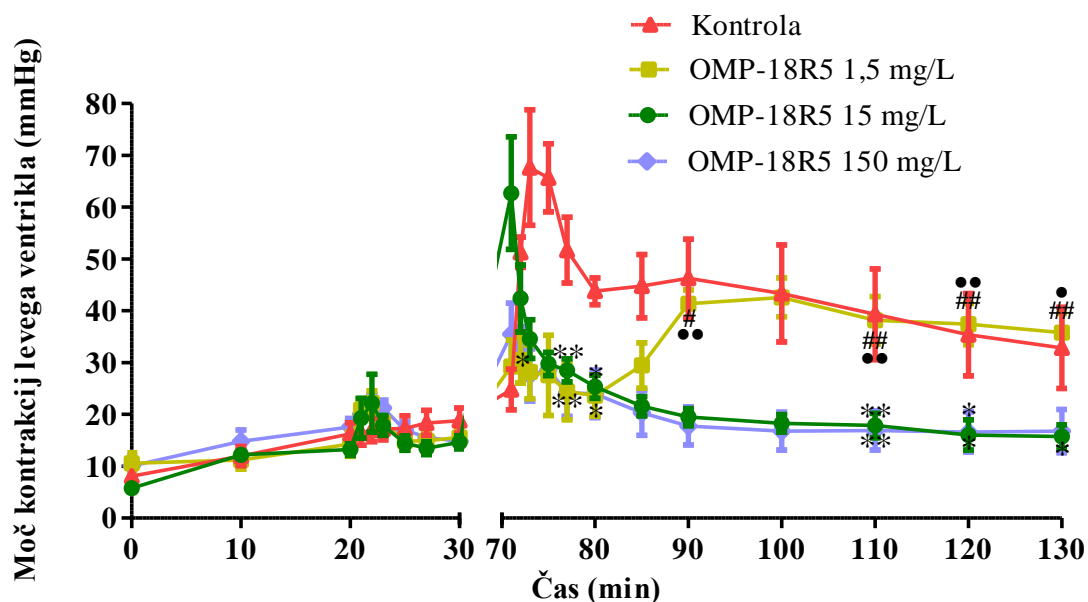
Število živali (N): 19

#### 4.2. Moč kontrakcij levega ventrikla

Moč kontrakcij v levem ventriklu (razlika med sistolnim in diastolnim tlakom) je bila do 20. minute približno konstantna pri vseh 4 skupinah. Po 20. minuti se je pri vseh treh skupinah z dodatkom zaviralca moč kontrakcij nekoliko povečala, dosegla vrh v 22. minuti in nato rahlo padla in se v približno 25. minuti ustalila na približno enaki vrednosti do začetka ishemije. Pri kontrolni skupini se moč kontrakcij zadnjih 10 minut ni spreminjala.

Na začetku reperfuzije je moč kontrakcij najbolj začela naglo naraščati pri kontroli, dosegla vrh v 73. minuti in nato upadala vse do konca poskusa. Pri najnižji koncentraciji zaviralca 1,5 mg/L so vrednosti rahlo upadale do 80. minute, se nato povečevale do 90. minute in nato bile vse do konca poskusa približno konstantne. Pri koncentraciji 15 mg/L in 150 mg/L so bile vrednosti od 75. minute dalje skoraj popolnoma enake, le da pri največji koncentraciji niso tako naglo upadale na začetku reperfuzije kot pri koncentraciji 15 mg/L.

Iz grafa površine pod krivuljo lahko razberemo, da je imela kontrolna skupina najmočnejše kontrakcije levega ventrikla, pri skupinah z dodanim zaviralcem pa so bile kontrakcije šibkejše. Na kontrakcije sta najbolj vplivali koncentraciji 15 mg/L in 150 mg/L, kjer opazimo tudi statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) glede na kontrolno skupino.



**Slika 9:** Moč kontrakcij levega ventrikla v mmHg izoliranih src podgan.

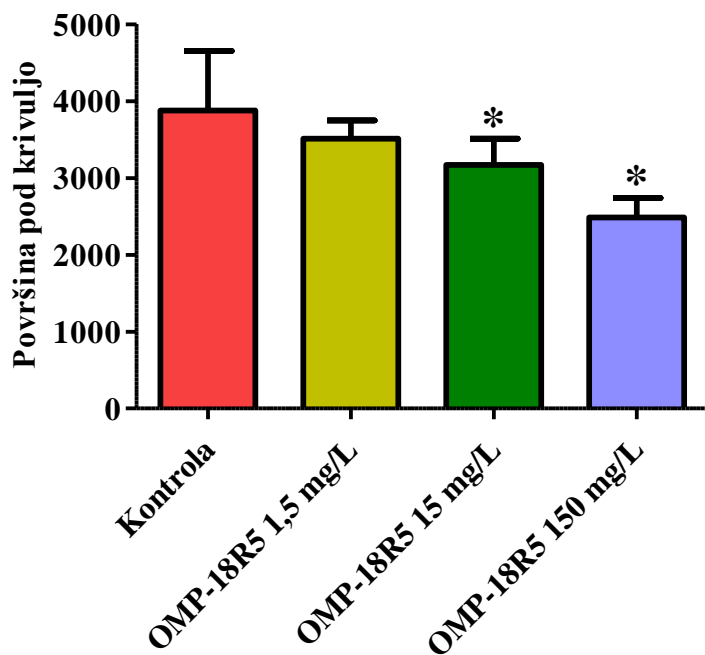
Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

\* - Značilne razlike glede na kontrolno skupino (\* -  $p < 0,05$  in \*\* -  $p < 0,01$ )

# - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 15 mg/L (# -  $p < 0,05$  in ## -  $p < 0,01$ )

• - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 150 mg/L (• -  $p < 0,05$  in •• -  $p < 0,01$ )

Število živali (N): 19



**Slika 10:** Površina pod krivuljo moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih src podgan.

\* - Značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L in 150 mg/L glede na kontrolno skupino.

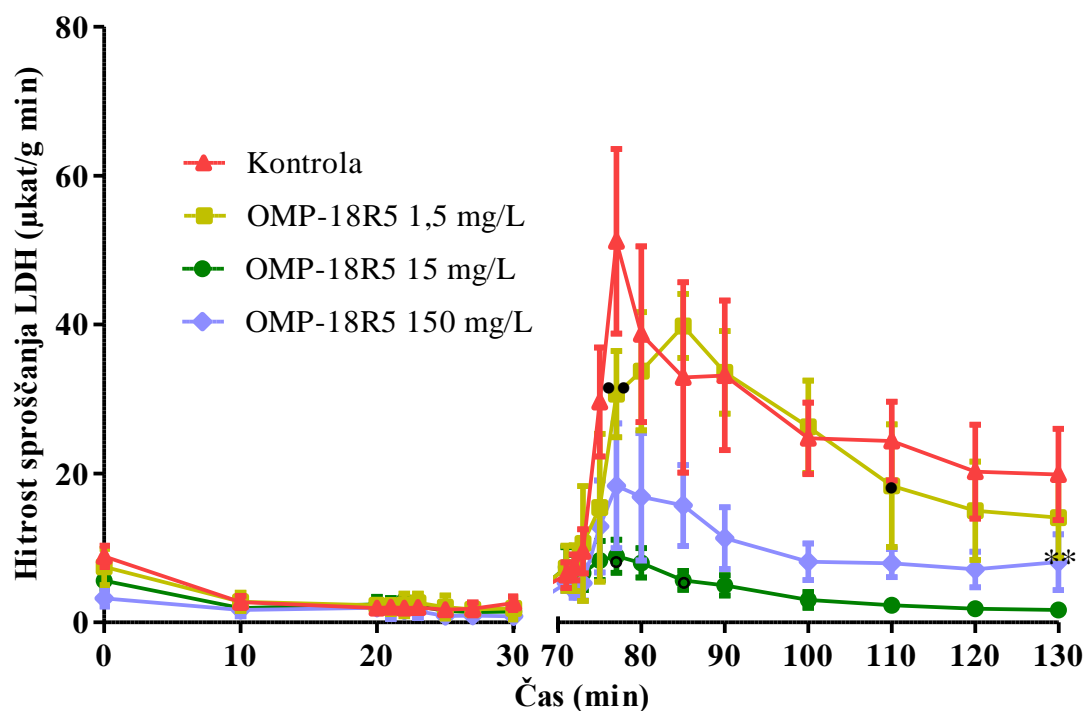
Število živali (N):19

### 4.3. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Vrednosti LDH so bile v času pred ishemijo skoraj popolnoma enake v vseh štirih skupinah. Po ishemiji so vrednosti najbolj naraščale pri kontroli in pri najmanjši koncentraciji zaviralca 1,5 mg/L. Pri kontroli so dosegle vrh v 77. minuti in nato upadale vse do konca poskusa, medtem ko so pri koncentraciji 1,5 mg/L vrednosti dosegle vrh v 85. minuti in nato podobno upadale kot pri kontrolni skupini. Najmanjše vrednosti LDH so bile izmerjene pri koncentracijah 15 mg/L in 150 mg/L vse do konca poskusa. Pri obeh skupinah so vrednosti dosegle vrh v 77. minuti, nato so začele malo upadati in bile približno konstantne do konca poskusa. Najnižje vrednosti LDH smo zabeležili pri koncentraciji zaviralca 15 mg/L.

Iz grafa površine pod krivuljo lahko razberemo, da koncentraciji 15 mg/L in 150 mg/L statistično značilno ( $p < 0,05$ ) znižata hitrost sproščanja LDH glede na kontrolno skupino, razlika pa je najbolj opazna pri 15 mg/L, kjer imamo najmanjšo hitrost sproščanja LDH.

Prav tako je med koncentracijo 15 mg/L in 1,5 mg/L značilna ( $p < 0,05$ ) razlika in razlika ( $p < 0,01$ ) med koncentracijo 15 mg/L in kontrolno skupino.



**Slika 11:** Hitrost sproščanja LDH v  $\mu\text{kat/g min}$  iz izoliranih src podgan.

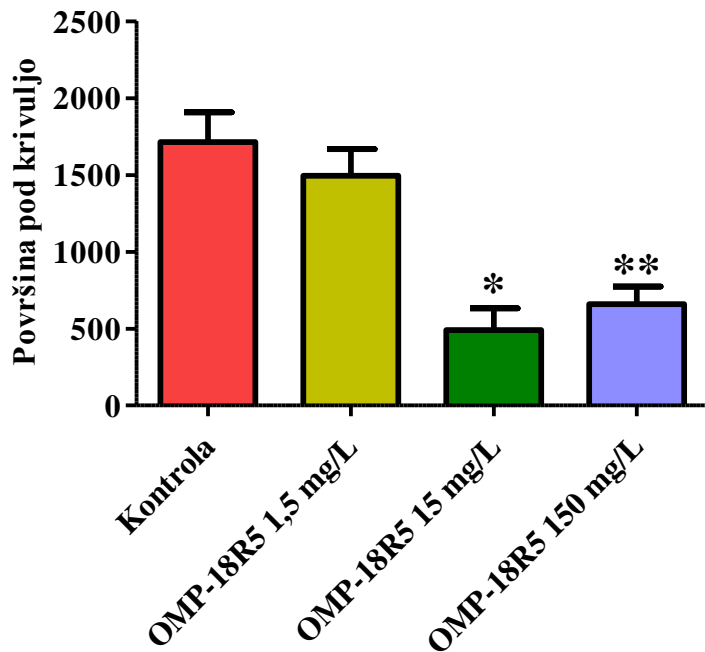
Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin.

\* - Značilne razlike glede na kontrolno skupino (\* -  $p < 0,05$  in \*\* -  $p < 0,01$ )

• - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 150 mg/L (• -  $p < 0,05$  in •• -  $p < 0,01$ )

° - Značilne razlike v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 150 mg/L (° -  $p < 0,05$  in °° -  $p < 0,01$ )

Število živali (N): 19



**Slika 12:** Površina pod krivuljo hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih src podgan.

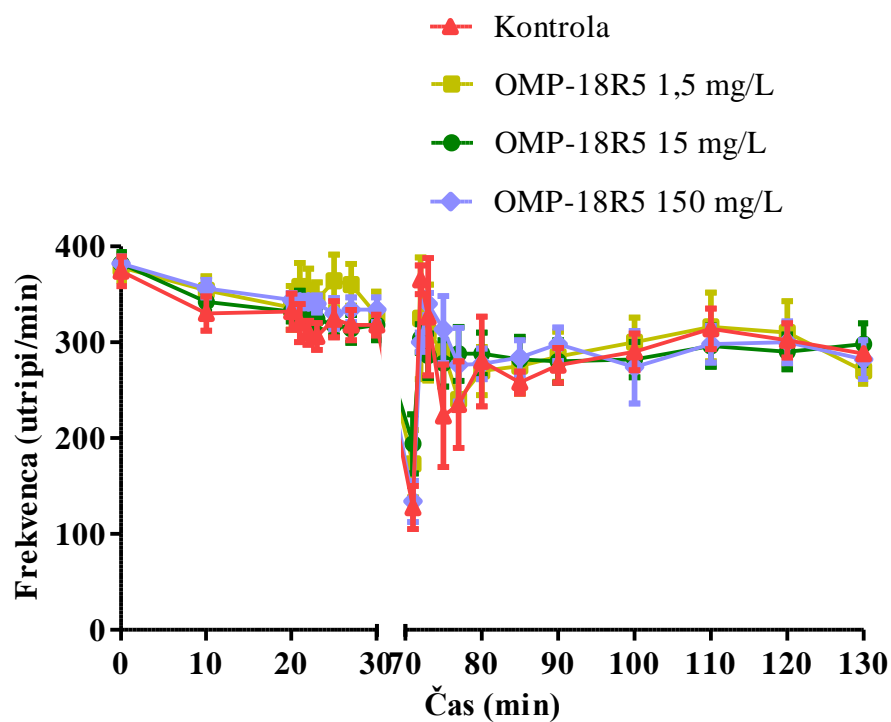
\* - Značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L glede na kontrolno skupino ter skupino s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L in značilne razlike ( $p < 0,01$ ) glede na kontrolno skupino.

\*\* - Značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v skupini s koncentracijo zaviralca 150 mg/L glede na kontrolno skupino.

Število živali (N): 19

#### 4.4. Frekvenca srčnih utripov

Srčna frekvenca je bila v času pred ishemijo pri vseh štirih skupinah skoraj enaka in se je gibala približno med 350 in 400 utripi/min. V času reperfuzije tudi ni bilo velikih razlik med skupinami. V vseh skupinah so bila med 70. in 80. minuto poskusa manjša nihanja v frekvenci, ki je v 71. minuti nekoliko narasla, nato upadla in se stabilizirala pri podobni vrednosti skoraj do konca poskusa. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik, kar lahko vidimo tudi iz grafa površine pod krivuljo srčne frekvence.

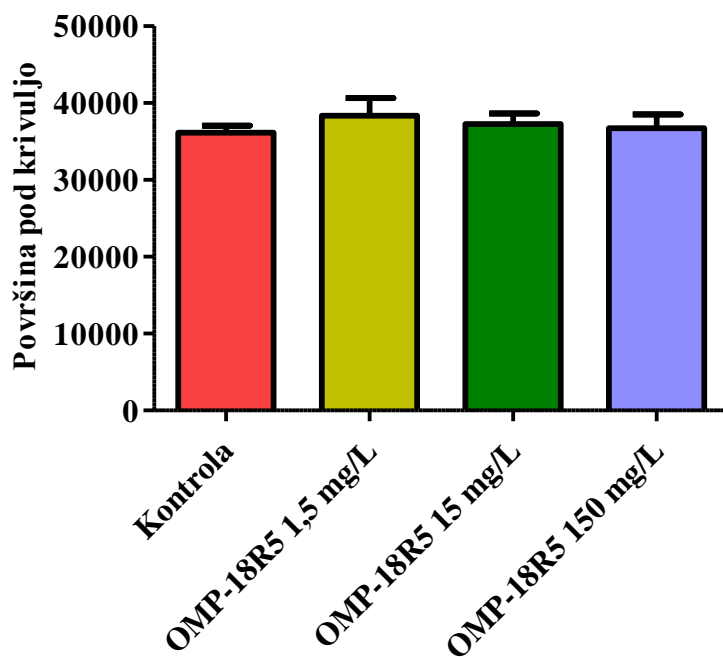


**Slika 13:** Srčna frekvenca izoliranih src podgan.

Vrednosti so izražene kot aritmetične sredine, dobljene s povprečjem rezultatov meritev pri posamezni skupini. Vključena je standardna napaka ocen aritmetičnih sredin. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Število živali (N): 19





**Slika 14:** Površina pod krivuljo srčne frekvence izoliranih src podgan.

Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

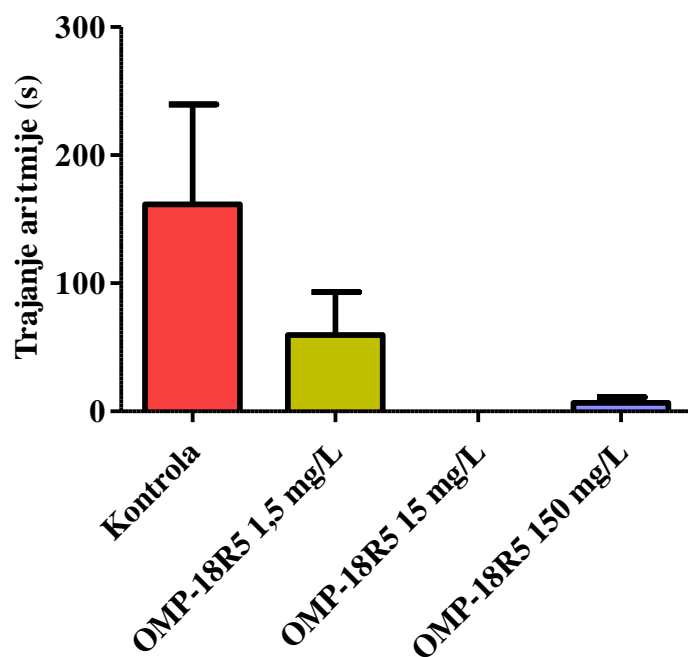
Število živali (N): 19

#### 4.5. Aritmije

Trajanje posameznih vrst aritmij smo ovrednotili s pomočjo EKG, ki smo ga snemali skozi celoten poskus. Ovrednotili smo 4 vrste aritmij in sicer ventrikularno fibrilacijo (VF), ventrikularno tahikardijo (VT), asistolijo in ekstrasistoloz. ventrikularni prezgodnji utrip. Trajanje vsake posamezne aritmije in celokupno trajanje aritmij smo izrazili v sekundah za vsako skupino posebej.

#### 4.5.1. Ventrikularna fibrilacija

VF se je najbolj pojavljala pri kontrolni skupini in v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L. Pri največji koncentraciji 150 mg/L se je pojavila le za nekaj sekund, pri 15 mg/L pa se sploh ni pojavila. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.



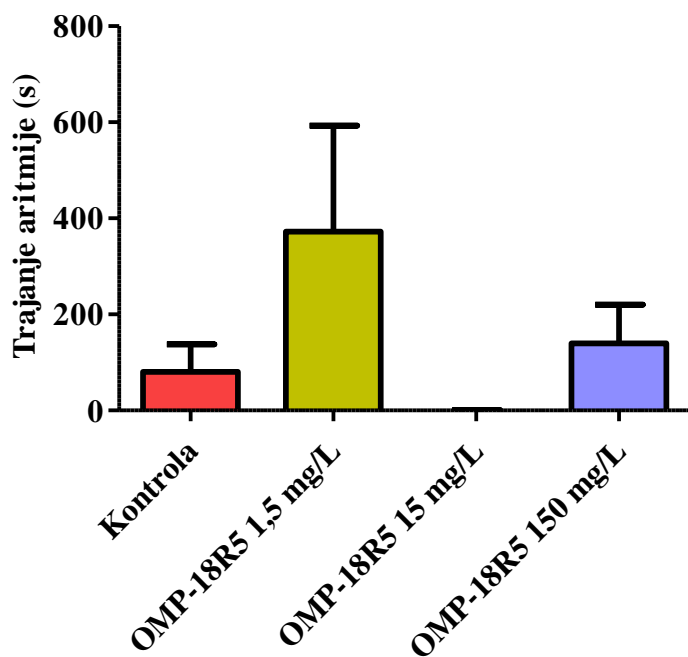
**Slika 15:** Graf trajanja ventrikularne fibrilacije pri izoliranih srcih podgan.

Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Število živali (N): 19

#### 4.5.2. Ventrikularna tahikardija

VT se je najbolj pogosto pojavljala pri srcih, ki smo jih izpostavili koncentraciji zaviralca 1,5 mg/L. Pojavljanje VT smo lahko opazili tudi pri kontrolni skupini in skupini s koncentracijo 150 mg/L, kjer je VT trajala podobno dolgo časa. Pri koncentraciji 15 mg/L VT skoraj ni bilo moč opaziti. Statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo.



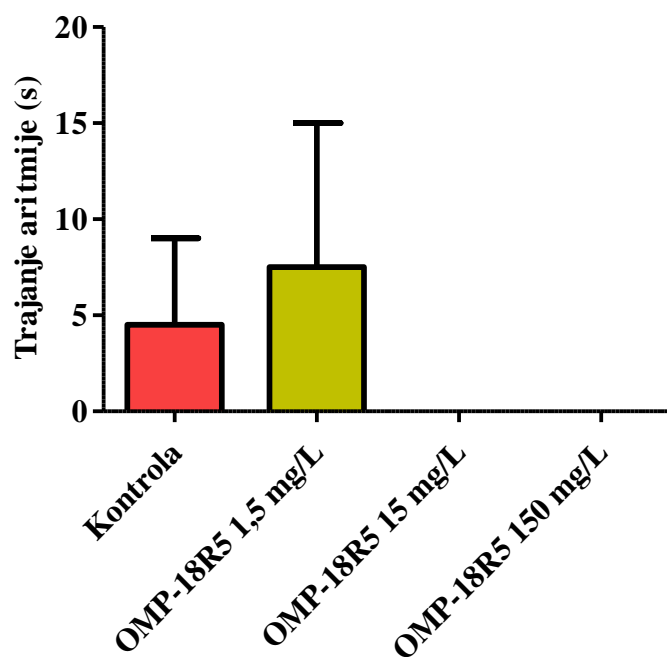
**Slika 16:** Graf trajanja ventrikularne tahikardije pri izoliranih srcih podgan.

Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Število živali (N): 19

### 4.5.3. Asistolija

Asistolija se je pojavila za nekaj sekund le pri kontrolni skupini in pri skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L. Pri drugih dveh skupinah z večjo koncentracijo zaviralca se asistolija ni pojavila, prav tako med skupinami ni bilo opaziti statistično značilnih razlik.



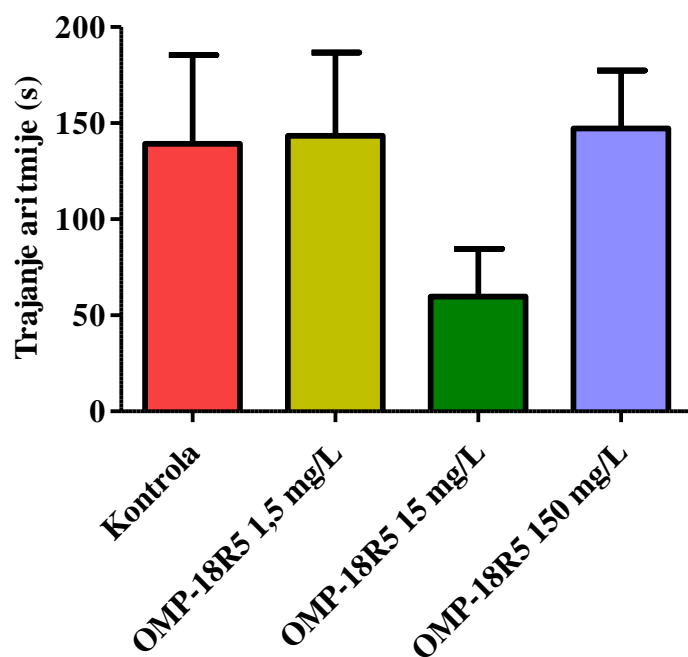
**Slika 17:** Graf trajanja asistolij pri izoliranih srcih podgan.

Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Število živali (N): 19

#### 4.5.4. Ekstrasistola oz. ventrikularni prezgodnji utrip

Najkrajši čas pojavljanja ekstrasistol je bil v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L. V preostalih skupinah nismo opazili nobenih razlik v času trajanja aritmije, prav tako med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik.



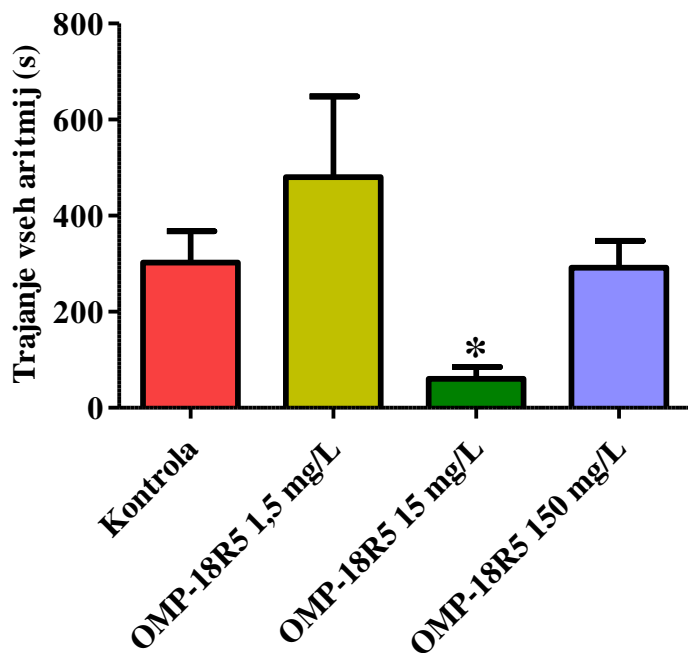
**Slika 18:** Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih srcih podgan.

Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

Število živali (N): 19

#### 4.5.5. Trajanje vseh vrst aritmij

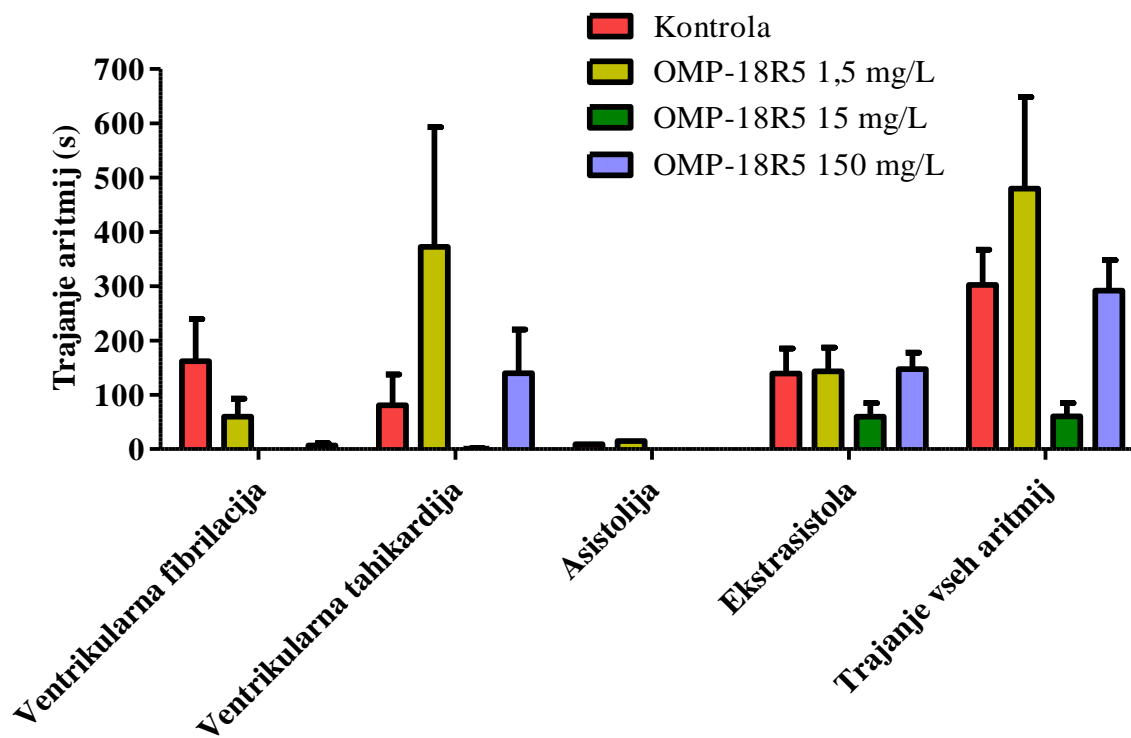
Največ aritmij se je pojavljajo pri najnižji koncentraciji zaviralca 1,5 mg/L, najmanjše pojavljanje pa je bilo moč opaziti pri skupini s koncentracijo 15 mg/L. Med kontrolo in skupino s koncentracijo 150 mg/L je bila dolžina trajanja vseh aritmij približno enaka. Med skupinama s koncentracijami zaviralca 1,5 mg/L in 15 mg/L se je pojavila statistično značilna razlika ( $p < 0,05$ ).



**Slika 19:** Graf vsote trajanja vseh aritmij pri izoliranih srcih podgan.

\* - Značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L glede na skupino s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L.

Število živali (N): 19



**Slika 20:** Graf trajanja vseh aritmij po posameznih skupinah.

## **5. RAZPRAVA**

V magistrskem delu smo preverili, kako zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5 (vantictumab) akutno uporabljen v poskusu, vpliva na poškodbe srca, povzročene z I-R na izoliranem srcu podgan Wistar. Učinek zaviralca smo preverjali v treh različnih koncentracijah, da bi ugotovili, ali se obseg I-R poškodb na srcu spreminja v odvisnosti od koncentracije. Zaviralec OMP-18R5 je monoklonsko protitelo in potencialno novo zdravilo za zdravljenje raka. Deluje na signalno pot Wnt, ki pa ni udeležena le pri rakavih obolenjih, saj ima pomembno vlogo tudi v drugih celičnih procesih, med drugim pomembno vpliva na embrionalni razvoj srca in na potek celičnih procesov po MI. Do sedaj še ni bilo opravljene nobene raziskave z zaviralcem poti Wnt OMP-18R5 na srcu, zato nas je zanimalo, kako modulacija signalne poti Wnt s tem zaviralcem vpliva na obseg I-R poškodb srca.

### **5.1. Razprava o materialih in metodah**

#### **5.1.1. Zaviralec OMP-18R5**

Zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5 (vantictumab) je monoklonsko protitelo in zavira vezavo proteinov Wnt na Fz receptor, kar so ugotovili s pomočjo proteina Wnt-3a, ki je aktivator kanonične poti Wnt. Tako se zmanjša akumulacija  $\beta$ -katenina v celici. Ugotovili so, da se veže s petimi Fz receptorji in sicer Fz-1, -2, -5, -7 in -8. Zdravljenje z OMP-18R5 je ustavilo rast številnih vrst tumorjev, vključno z tistimi na dojkah, pljučih, trebušni slinavki in debelem črevesju. Opazili so sinergistično delovanje z drugimi protitumorinimi učinkovinami, kot sta taksol in irinotekan (27). V različnih raziskavah so preskušali zaviralec OMP-18R5 za protitumorino delovanje kot samostojne terapije ali pa v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki. Vse študije so trenutno v fazi 1b kliničnih testiranj pri bolnikih z metastatskim rakom dojke, rakom trebušne slinavke, nedrobnoceličnim rakom pljuč in raznimi drugimi trdnimi tumorji (43). Ugotovili smo, da so zaviralec OMP-18R5 do zdaj testirali le pri bolnikih z rakavimi obolenji. Doslej še ni bilo objavljene raziskave, ki bi opisovala kakršnekoli druge učinke tega zaviralca pri drugih obolenjih, vključno z MI ali drugimi srčno-žilnimi boleznimi.



### 5.1.2. Metoda po Langendorff-u

Metoda po Langendorff-u se na področju srčno-žilnih in farmakoloških raziskav uporablja že več kot 100 let. Metoda omogoča visoko ponovljive rezultate, priprave so nezahtevne in niso časovno zamudne. Iz enega samega eksperimenta je možno pridobiti fiziološke, morfološke, biokemične in farmakološke parametre, npr. srčno frekvenco, spremembe metabolizma srca in električno aktivnost srca. Ob zagotovitvi primernih pogojev (oksidacija, temperatura in perfuzijska raztopina) lahko izoliranemu organu omogočimo optimalne fiziološke pogoje. Metoda je primerna za uporabo src mnogih vrst sesalcev. Najbolj pogosto se uporablja model izoliranega podganjega srca, saj omogoča enostavno rokovanje, je poceni in ne zahteva posebne opreme. Model omogoča takojšnjo povzročitev ishemije in aritmij, prav tako je možno povzročiti tudi anoksijo in hipoksijo. Je idealna metoda za preučevanje direktnih vplivov zdravilnih učinkovin na srce brez vplivov vegetativnega živčevja in ugotavljanje učinek zdravila v odvisnosti od koncentracije (44).

*In vitro* metode igrajo pomembno vlogo v pregledu in izbiri varnih zdravil za srčno-žilne bolezni. Vendar pa so med *in vitro* in *in vivo* metodami številna neskladja. Pri *in vitro* metodah učinkovine niso podvržene vplivu določenih dejavnikov, kot so vezava na plazemske proteine, tkivna porazdelitev, nastanek aktivnih metabolitov ali nekateri drugi hemodinamski efekti. Pri *in vitro* poskusih obstaja možnost, da dobimo lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate. Farmakodinamiko odziva lahko zato v celoti razumemo le pri kombinaciji interpretacije rezultatov *in vitro* metod z rezultati *in vivo* metod (45).

## 5.2. Razprava o rezultatih

### 5.2.1. Koronarni pretok

Pri vseh treh skupinah poskusov, kjer smo dovajali zaviralec v treh različnih koncentracijah, je po začetku perfuzije v 21. minuti pretok za kratek čas nekoliko narasel in nato začel hitro upadati. V začetku reperfuzije v vseh skupinah pretok začne upadati in sicer upada v odvisnosti od koncentracije, saj večja kot je koncentracija zaviralca, manjši je koronarni pretok. Pretok upada v vseh skupinah skozi celotno reperfuzijo. Eden od vzrokov upada pretoka bi lahko bilo odprtje mPTP por, kar vzpodbuja GSK-3 $\beta$  preko povečane koncentracije Ca<sup>2+</sup> ionov in ROS (12). Tako bi lahko bila vdor Ca<sup>2+</sup> ionov in tudi oksidativni stres, ki povzroča disfunkcijo endotelija (46) ena od vzrokov za konstrikcijo koronarnih arterij. Druga možna razlaga je, da signalna pot Wnt preko GSK-3 $\beta$  vpliva na

odpiranje mitohondrijskih  $K^+$  kanalov. Podoben mehanizem je bil dokazan pri ishemičnem prekondicioniranju srca v študiji avtorja Vigneron in sodelavcev (41). Znižanje ravni GSK-3 $\beta$  bi naj privedlo do konstantnega odpiranja  $K^+$  kanalov (41). Znano je, da odprtje  $K^+$  kanalov povzroča vazodilatacijo (47). V naši raziskavi smo zavirali pot Wnt, kar poveča ravni aktivne GSK-3 $\beta$  (41), kar bi privedlo do zapiranja  $K^+$  kanalov in s tem do konstrikcije koronarnih arterij in posledično zmanjšanja koronarnega pretoka. Za preiskovano spojino lahko predpostavimo, da deluje vazokonstriktorno, saj je pretok pri vseh skupinah z zaviralcem zmanjšan v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako koronarni pretok korelira z močjo kontrakcij levega ventrikla (48), saj se moč krčenja levega ventrikla izrazito zmanjšuje pri večji koncentraciji zaviralca.

### **5.2.2. Moč kontrakcij levega ventrikla**

Moč kontrakcij levega ventrikla predstavlja razliko med sistolnim in diastolnim tlakom. V prvih 30. minutah pred nastopom ishemije je bila moč kontrakcij pri vseh skupinah skoraj povsem enaka. Moč se je nekoliko povečala pri vseh treh skupinah z dodanim zaviralcem v 21. minuti. Povišanje je bilo kratkotrajno, saj je moč hitro upadla na začetno vrednost pred začetkom dodajanja zaviralca. V času reperfuzije so se najmočnejše kontrakcije pojavile v kontrolni skupini. Pri srcih tretiranih s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L je moč kontrakcij začela naraščati v 80. minuti in dosegla vrh v 90. minuti in se nato ustalila. Rezultati so bili podobni rezultatom v kontrolni skupini. Pri drugih dveh skupinah s koncentracijama zaviralca 15 mg/L in 150 mg/L so moči kontrakcij na začetku reperfuzije hitro upadle na vrednosti, ki smo jih opazili v času pred ishemijo. Vrednosti za obe skupini so bile značilno manjše v primerjavi s kontrolno skupino v postishemičnem obdobju. Prav tako je padec tlaka premosorazmeren z odmerkom, saj pri večji koncentraciji zaviralca opazimo večji padec tlaka v levem ventriklu. Možen vzrok za manjše moči kontrakcij je tudi vpliv na dostavo hranil in kisika miokardu zaradi zmanjšanja koronarnega pretoka pri vseh skupinah, saj koronarni pretok in moč kontrakcij levega ventrikla korelirata med seboj (48). Zmanjšanje koronarnega pretoka povzroči namreč manjše moči kontrakcij. Iz dosedaj objavljenih člankov smo ugotovili, da aktivacija kanonične poti Wnt preko liganda Wnt-1 poveča preživetje celic med oksidativnim stresom (49). Nismo pa našli nobene objave, ki bi opisovala vpliv te poti na moč srčnih kontrakcij. Ključen mediator v kaskadi kanonične poti Wnt je GSK-3 $\beta$ . V zgodnjih fazah reperfuzije se v celicah med drugim začnejo kopičiti ROS in  $Ca^{2+}$  ioni (9). Ugotovili so namreč, da zaradi povečane koncentracije ROS

in  $\text{Ca}^{2+}$  ionov GSK-3 $\beta$  vzpodbuja odprtje mPTP por, kar vodi v dodatno poškodbo celic ter vdora  $\text{Ca}^{2+}$  ionov v celice (12). To je eden od možnih razlogov za povečano moč kontrakcij v kontrolni skupini in skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L. Podobni rezultati so bili objavljeni v članku avtorice Laeremans in sodelavcev (24). V njihovi študiji so uporabili zaviralec Fz-1 in Fz-2 receptorjev UM206. Rezultati za iztisni delež in končni diastolični volumen, ki so jih dobili z ehokardiografijo, so pokazali, da spojina vpliva na povečano moč kontrakcij v tretirani skupini glede na kontrolno skupino (24). Tudi v skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L smo opazili povečane kontrakcije med reperfuzijo, saj preiskovana spojina zavira iste receptorje kot spojina UM206.

### **5.2.3. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)**

Encim LDH je normalno prisotna v človeških tkivih, najdemo pa jo tudi v kardiomiocitih. Je dober diagnostični označevalec tkivnih poškodb, saj se takrat v večjih količinah sprošča iz poškodovanih celic, npr. ob MI (50). V naših poskusih je bila največja hitrost sproščanja LDH v kontrolni skupini in v skupini z koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L. Pri ostalih dveh skupinah s koncentracijo 15 mg/L in 150 mg/L se je hitrost sproščanja LDH znatno zmanjšala, najmanjšo hitrost sproščanja lahko opazimo pri koncentraciji 15 mg/L. Predpostavljamo, da ti dve koncentraciji delujeta na srce zaščitno, kar pa ne velja za koncentracijo 1,5 mg/L, pri kateri se pojavijo podobne vrednosti kot v kontrolni skupini. Iz tega lahko sklepamo, da najmanjša koncentracija nima vpliva na hitrost sproščanja LDH, medtem ko najbolj zaščitne učinke izkazuje koncentracija 15 mg/L, saj imamo po ishemiji najmanjše poškodbe na srcu, kar lahko zaključimo tudi iz vrednosti LDH. Zaviranje signalne poti Wnt poveča ravni aktivne GSK-3 $\beta$  in zato se zmanjšajo ravni  $\beta$ -katenina (41). V raziskavi na podganjem modelu MI so ugotovili, da visoke ravni  $\beta$ -katenina zmanjšujejo infarktno cono in apoptozo (51). Torej bi pri večjih koncentracijah zaviralca pričakovali večje poškodbe srca, če zaviramo pot Wnt, saj bi ravni  $\beta$ -katenina bile nizke. Vendar imajo večje koncentracije ravno nasproten učinek.

Testiran zaviralec OMP-18R5 preprečuje vezavo proteinov Wnt na Fz receptor, kar je bilo dokazano z uporabo proteina Wnt-3a, ki aktivira kanonično pot. Kasneje so ugotovili, da OMP-18R5 zavira 5 Fz receptorjev in sicer Fz-1, -2, -5, -7 in -8 (27). V prejšnjih raziskavah so ugotovili, da Wnt-3a sproža apoptozo preko aktivacije te poti in da se naravni zaviralec signalne poti Wnt sFRP-2 nanj veže in tako preprečuje proapoptotske

učinke Wnt-3a v kardiomioblastih (52). S tem tudi zavira aktivnost  $\beta$ -katenina in njegovo nalaganje v celicah. Odkrili so, da tudi Dkk-1 preprečuje apoptozo, ki jo sproži Wnt-3a, v odvisnosti od koncentracije med samo hipoksijo in reoksigenacijo celične linije. sFRP-2 torej sproža zaščito celic z zaviranjem kanonične poti (52). Ostali aktivatorji kanonične poti, kot je npr. Wnt-1, imajo obratno delovanje od Wnt-3a. Wnt-1 izkazuje antiapoptotsko delovanje (49). Iz vsega tega lahko sklepamo, da se v našem primeru zaviralec OMP-18R5 veže na Fz receptorje in preprečuje aktivacijo kanonične poti in tako preprečuje apoptozo kardiomiocitov v izoliranih srcih podgan v večjih koncentracijah 15 mg/L in 150 mg/L, kar nam povedo tudi nizke vrednosti LDH. Učinek preiskovane spojine pa ne velja za koncentracijo 1,5 mg/L, kjer opazamo visoke vrednosti LDH.

V raziskavi avtorice Laeremans in sodelavcev so testirali spojino UM206, ki je homologni peptidni fragment Wnt-3a/Wnt-5a in se veže na Fz-1 in Fz-2 receptor, ki imata povečane ravni v srcu, ki ga je prizadel infarkt. UM206 se veže tam, kjer je vezavno mesto za Wnt-3a. Tako se je zmanjšala infarktna cona in izboljšala se je srčna funkcija (24). Druga raziskava avtorja Barandon in sodelavcev je odkrila povečano izražanje naravnega zaviralca poti Wnt, sFRP-1, po MI. Povišane ravni sFRP-1 zmanjšajo infarktno cono in izboljšajo srčno funkcijo (53). Podobne učinke ima tudi zaviralec pri koncentraciji 15mg/L, saj opazimo zaščitno delovanje na miokard, kar vidimo iz rezultatov za LDH in aritmije.

Vrednosti LDH korelirajo z vrednostmi moči kontrakcij levega ventrikla. Pri koncentracijah 15 mg/L in 150 mg/L vrednosti razlike tlakov nekaj minut po začetku reperfuzije padejo na vrednosti, ki smo jih opazili pred začetkom ishemije. Prav tako so vrednosti LDH pri teh dveh koncentracijah bistveno nižje kot pri preostalih dveh skupinah. Glavni razlog bi lahko bil zmanjšanje apoptoze kardiomiocitov.  $\beta$ -katenin namreč povečuje ravni antiapoptotskih proteinov survivina in bcl-2 (51). Zanimivo je, da smo ugotovili parabolično obliko krivulje glede hitrosti sproščanja LDH. Možna razlaga bi lahko bila negativna povratna zanka med  $\beta$ -kateninom in p53. Aktiviran p53, čigar koncentracija se poviša preko povišanih ravni  $\beta$ -katenina, povzroča razgradnjo  $\beta$ -katenina preko GSK-3 $\beta$ . Ugotovili smo, da je škodljivo preveliko in tudi premajhno izražanje  $\beta$ -katenina. Pri prekomernem izražanju pride do povečanih ravni p53, ki sproža apoptozo (13). Premalo  $\beta$ -katenina vpliva tudi na večje poškodbe srca po MI (51). Dodatni učinki, ki bi lahko vplivali na preživetje celic opazimo preko GSK-3 $\beta$ , ki med drugim vpliva na vdor Ca<sup>2+</sup>

ionov skozi mPTP pore, kar vodi v poškodbe celic. Možna je tudi razlaga, da imajo različni odmerki zaviralca drugačen vpliv na signalno pot Wnt in tudi aktivnost GSK-3 $\beta$ . Zaviranje poti Wnt poviša ravni aktivne GSK-3 $\beta$  (41). GSK-3 $\beta$  namreč sproža apoptozo preko p53, hkrati pa jo preko tega proteina tudi zavira. Možno je, da je vpliv zaviralca na raven GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -katenina in obseg poškodb miokarda odvisen od njegove koncentracije. Za ugotovitev, kaj se v kardiomiocitih v resnici dogaja pri različnih koncentracijah zaviralca OMP-18R5, bi bile potrebne še nadaljnje raziskave, kot je npr. analiza proteinov z metodo po Western blotu, iz katere bi lahko pridobili podatke o koncentracijah proteinov GSK-3 $\beta$  in  $\beta$ -katenina v kardiomiocitih.

#### **5.2.4. Frekvenca srčnih utripov**

Srčna frekvenca se med skupinami ne razlikuje, saj je bila ta v času reperfuzije podobna frekvenci pred ishemijo. Normalna srčna frekvenca pri podgani znaša približno 330-480 utripov na minuto (54). Po vzpostavitvi pretoka perfuzijske raztopine lahko v prvi minuti v vseh skupinah opazimo zmanjšano frekvenco srčnih utripov, ki nato začne hitro naraščati. V vsaki skupini je moč opaziti manjša nihanja v frekvenci prvih 10 minut reperfuzije. Takrat se namreč že poškodovano srce trudi vzpostaviti fiziološki ritem, kot je bil pred ishemijo. V kardiomiocitih se kopičijo ROS in Ca<sup>2+</sup> ioni, primanjkuje pa tudi ATP-ja (12). Zaradi ponovne perfuzije in oksigenacije srca po 40 minut dolgi ishemiji celice ponovno dobijo kisik in potrebne ione za delovanje. Mnoge celice sicer podležejo apoptozi, ker so preveč poškodovane, druge pa preživijo zaradi ponovne perfuzije miokarda. Nihanja v frekvenci so lahko torej nastala zaradi poškodb samih celic med ishemijo. Prav tako smo največje pojavljanje aritmij opazili prav v prvih 10 minutah reperfuzije v vseh skupinah. Tudi to bi lahko bil pomemben razlog za nihanje srčne frekvence.

#### **5.2.5. Pojavljanje in trajanje aritmij**

Vrednotili smo 4 vrste aritmij: ventrikularno fibrilacijo (VF), ventrikularno tahikardijo (VT), asistolijo in ekstrasistole. Najbolj nevarni vrsti aritmij sta VF in asistolija, saj sta življenjsko ogrožujoči. Vse vrste aritmij so se najbolj pogosto pojavljale v prvih 10-15 minutah reperfuzije. Ekstrasistole so se pojavljale tudi kasneje, vendar v zelo malem obsegu, saj smo zasledili le posamezne dodatne utripe srca. Opazili smo, da ima skupina s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L in kontrolna skupina podobno dolgo pojavljanje aritmij,

prav tako so se v obeh skupinah največ pojavljale VT, VF in ekstrasistole. Za nekaj sekund se je pri obeh skupinah pojavila tudi asistolija. Temu rečemo "otrplost srca", saj asistolija predstavlja popolno odsotnost električne aktivnosti srca. Pri koncentraciji 150 mg/L je skupno trajanje vseh aritmij tudi podobno kontrolni skupini, vendar vrste aritmij (ekstrasistole in VT), ki so se najbolj pogosto pojavljale, niso življenjsko ogrožujoče. Najmanj aritmij pa je bilo prisotnih v skupini s koncentracijo zaviralca 15 mg/L. Med skupinami opazimo tudi razliko v stopnji resnosti oz. hemodinamičnega pomena aritmij. Prav VF in asistolija, ki sta najbolj življenjsko ogrožujoči, sta se najbolj pogosto pojavili pri kontrolni skupini in skupini s koncentracijo zaviralca 1,5 mg/L. Pri tej koncentraciji opazimo veliko sproščene LDH in pogosto pojavljanje aritmij (največ VT), vendar so rezultati podobni kontrolni skupini, zato predpostavljamo, da spojina v tako nizki koncentraciji nima nobenih učinkov na srčno mišico in nastajanje aritmij. Pri koncentraciji 15 mg/L, ki se je izkazala za najbolj zaščitno koncentracijo, so se pojavljale le ekstrasistole, vendar tudi najkrajši čas, v primerjavi z drugimi skupinami. Prav tako količina sproščene LDH nakazuje na zaščitno delovanje pri višji koncentraciji, zato spojina v takšni koncentraciji verjetno deluje antiaritmogeno. Iz grafa skupnega trajanja aritmij lahko torej zaključimo, da najnižja koncentracija zaviralca nima vpliva na srce, medtem ko koncentracija 15 mg/L izkazuje največ zaščitnih učinkov, saj je vsota trajanja vseh aritmij najkrajša. Kontrolna skupina in skupina s koncentracijo 150 mg/L sta med seboj primerljivi, saj imata obe skupini podobno dolžino trajanja vseh aritmij.

## 6. ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo ugotavljali akutni vpliv zaviralca signalne poti Wnt OMP-18R5 (vantictumab) na poškodbe izoliranih src podgan Wistar, povzročene z ishemijo-reperfuzijo z metodo po Langendorff-u. Testirani zaviralec predstavlja potencialno zdravilo za zdravljenje raka, saj so v več raziskavah ugotovili njegovo izrazito protitumorsko delovanje, tudi v kombinaciji z drugimi citostatiki. Pri rakavih obolenjih je signalna pot Wnt okrepljena in zato jo je potrebno zavirati. Pot Wnt je zelo pomembna tudi v drugih celičnih procesih, prav tako ima ključno vlogo pri razvoju srca in pri miokardnem infarktu. Zato nas je zanimalo, kakšen vpliv bo imela preiskovana spojina na I-R poškodbe izoliranega srca.

Zaviralec OMP-18R5 smo testirali v treh različnih koncentracijah (1,5 mg/L, 15 mg/L in 150 mg/L) in opazili, da vsaka koncentracija drugače vpliva na poškodbe srca in merjene spremenljivke. Hitrost sproščanja LDH nam je pokazala, da najmanjša koncentracija 1,5 mg/L nima vpliva na zaščito srčne mišice, saj smo izmerili podobne vrednosti LDH kot v kontrolni skupini. Prav tako so se v obeh skupinah podobno dolgo pojavljale tudi aritmije. Največja koncentracija 150 mg/L je pokazala nekoliko manjše poškodbe srca, vrednosti LDH so bile nižje in pojavnost aritmij manj pogosta. Vmesna koncentracija 15 mg/L pa je pokazala očiten zaščitni učinek, saj so bile vrednosti LDH najnižje in skupen čas trajanja vseh aritmij najkrajši.

Pri rezultatih koronarnega pretoka in moči kontrakcij levega ventrikla smo ugotovili, da je učinek zaviralca odvisen od koncentracije. S povečevanjem koncentracije sta upadli obe merjeni spremenljivki, ki korelirata med seboj, saj z zmanjševanjem pretoka upada tudi moč kontrakcij v levem ventriklu. Moč kontrakcij pri večjih koncentracijah zaviralca se je v času reperfuzije zmanjšala do vrednosti, ki smo jih opazili pred začetkom ishemije. Sklepamo, da zaviralec izkazuje vazokonstriktorne učinke na žile, saj je bil pretok v vseh tretiranih skupinah med reperfuzijo manjši v primerjavi s kontrolno skupino. Ta učinek je še najbolj opazen pri večjih odmerkih (15 mg/L in 150 mg/L), pri katerih je bil koronarni pretok značilno zmanjšan, v primerjavi z ostalima skupinama. Ugotovili smo tudi, da zaviralec nima vpliva na frekvenco srčnih utripov.

Na podlagi vseh rezultatov lahko zaključimo, da koncentracija 1,5 mg/L nima vpliva na I-R poškodbe srca, medtem ko je koncentracija 15 mg/L izkazovala najugodnejše oz.

zaščitne učinke. Naše rezultate smo pridobili z *in vitro* metodami po Langendorff-u, zato ne moremo neposredno sklepati, kakšne rezultate bi dobili z *in vivo* metodami. Potrebne bi bile še raziskave z *in vivo* metodami, ki bi nam dale potrebne podatke npr. o metabolizmu učinkovine, vezavi na plazemske proteine itd., kar *in vitro* metode, med katere spada tudi metoda po Langendorff-u, ne omogočajo.



## 7. LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, 1. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 48, 87-104
2. Patton KT, Thibodeau GA: Anatomy & physiology, 7th Ed., Mosby Elsevier, Missouri, 2010: 612-669
3. Guyton AC, Hall JE: Human physiology and mechanisms of disease, 6th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997: 87-89
4. Levy MN, Stanton BA, Koeppen BM: Berne and Levy principles of physiology, 4th Ed., Elsevier Mosby, Philadelphia, 2005: 208-222
5. Ribarič S, et al: Seminarji iz patološke fiziologije, 1. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2008: 160
6. Sinkovič A: Ishemična bolezen srca, Visoka zdravstvena šola Univerze v Mariboru, Maribor, 2006: 5-13
7. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta in Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 246-278
8. Murphy E, Steenbergen M: Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury, *Physiological Reviews*, 2008; 88: 581-609
9. Buja LM: Myocardial ischemia and reperfusion injury, *Cardiovascular Pathology*, 2005; 14: 170-175
10. Piper HM, Meuter K, Schäfer C: Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury, *The Annals of Thoracic Surgery*, 2003; 75: 644-648
11. Clarke M, Bennett M, Littlewood T: Cell death in the cardiovascular system, *Heart*, 2007; 93: 659-664
12. Tetsuji M, Takayuki M: GSK-3 $\beta$ , a therapeutic target for cardiomyocyte protection, *Circulation Journal*, 2009; 73: 1184-1192
13. Jacobs KM, Bhave SR, Ferraro DJ, et al: GSK-3 $\beta$ : A bifunctional role in cell death pathways, *International Journal of Cell Biology*, 2012: 1-11
14. MacDonald BT, Tamai K, He X: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Developmental Cell*, 2009; 17: 9-26
15. Komiya Y, Habas R: Wnt signal transduction pathways, *Landes Bioscience*, 2008; 2: 68-75

16. Rao TP, Kühl M: An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More, *Journal of the American heart association*, 2010; 106: 1798-1806
17. Kestler HA, Kühl M: From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network, *The Royal Society*, 2008; 363: 1333-1347
18. Mencej Bedrač S, Ostanek B, et al: Sodobni pogled na nastanek osteoporoze, *Farmacevtski vestnik*, 2012; 63: 1-14
19. Cruciat CM, Niehrs C: Secreted and transmembrane WNT inhibitors and activators, *Cold spring harbor perspectives in biology*, 2013; 5: 1-26
20. Kawano Y, Kypta R: Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *Journal of Cell Science*, 2003; 116: 2627-2634
21. Dawson K, Aflaki M, Nattel S: Role of the Wnt-frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential, *The Journal of Physiology*, 2013:1409-1432
22. Van Gijn ME, Daemen MJAP, Smits JFM, et al: The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease, *Cardiovascular Research*, 2002; 55: 16-24
23. Deb A: Cell-cell interaction in the heart via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway after cardiac injury, *Cardiovascular Research*, 2014; 102: 214-223
24. Laeremans H, Hackeng TM, et al: Blocking of frizzled signaling with a homologous peptide fragment of WNT3a/WNT5a reduces infarct expansion and prevents the development of heart failure after myocardial infarction, *Circulation*, 2011; 124: 1626-1635
25. Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R: The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets, *Pharmacology & Therapeutics*, 2013; 138: 66-83
26. Blagodatski A, Poteryaev D, Katanaev VL: Targeting the Wnt pathways for therapies, *Molecular and Cellular Therapies*, 2014; 2: 1-15
27. Gurney A, Axelrod F, et al: Wnt pathway inhibition via the targeting of frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human factors, *PNAS*, 2012; 109: 11717-11722
28. Meloti A, Mas C, Kuciak M, et al: The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer, *EMBO Molecular Medicine*, 2014; 6: 1263-1278

29. Arend RC, Londoño-Joshi AI, et al: Inhibition of WNT/ $\beta$ -catenin pathway by niclosamide: A therapeutic target for ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, 2014; 134: 112-120
30. <https://pl.wikipedia.org/wiki/Niklozamid> (datum dostopa: 27.9.2015)
31. Saraswati S, Alfaro MP, et al: Pyrvinium, a potent small molecule WNT inhibitor, promotes wound repair and post-MI cardiac remodeling, *PLoS ONE*, 2010; 5: 1-10
32. Saraswati S, Deskins DL, et al: Pyrvinium, a potent small molecule WNT inhibitor, increases engraftment and inhibits lineage commitment of mesenchymal stem cells (MSCs), *National institutes of health*, 2012; 20: 185-193
33. <https://en.wikipedia.org/wiki/Pyrvinium> (datum dostopa: 27.9.2015)
34. Le PN, McDermott JD, Jimeno A: Targeting the WNT pathway in human cancers: Therapeutic targeting with focus on OMP-54F28, *Pharmacology & Therapeutics*, 2014: 1-11
35. Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, et al: Flavonoids: Potential Wnt/ $\beta$ -catenin signaling modulators in cancer, *Life Sciences*, 2011; 89: 545-554
36. Lee MA, Kim WK, Park HJ, et al: Anti-proliferative activity of hydnocarpin, a natural lignan, is associated with the suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colon cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; 23: 5511-5514
37. Pooja T, Karunagaran D: Emodin suppresses Wnt signaling in human colorectal cancer cells SW480 and SW620, *European Journal of Pharmacology*, 2014; 742: 55-64
38. Cho M, Ryu M, Jeong Y, et al: Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009; 390: 500-505
39. Brade T, Männer J, Köhl M: The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart, *Cardiovascular Research*, 2006; 72: 198-209
40. Van de Schans VAM, Smits JFM, Blankesteyn WM: The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease: Friend or foe?, *European Journal of Pharmacology*, 2008; 585: 338-345
41. Vigneron F, Dos Santos P, Lemoine S, et al: GSK-3 $\beta$  at the crossroads in the signalling of heart preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways, *Cardiovascular Research*, 2011; 90: 49-56

42. Swope D, Cheng L, Gao E, et al: Loss of cadherin-binding proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis, *Molecular and Cellular Biology*, 2012; 32: 1056-1067
43. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=omp-18R5&Search=Search> (datum dostopa: 27.9.2015)
44. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, et al: Isolated heart perfusion according to Langendorff – Still viable in the new millennium, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2007; 55: 113-126
45. Partridge CR, Johnson CD, Ramos KS: In vitro models to evaluate acute and chronic injury to the heart and vascular systems, *Toxicology in Vitro*, 2005; 19: 631-644
46. Montezano AC, Dulak-Lis M, et al: Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers and novel therapies, *Canadian Journal of Cardiology*, 2015; 31: 631-641
47. Dick GM, Tune JD: Role of potassium channels in coronary vasodilation, *Experimental biology and medicine*, 2010; 235: 10-22
48. Weintraub WS, Hattori S, Agarwal JB, et al: The relationship between myocardial blood flow and contraction by myocardial layer in the canine left ventricle during ischemia, *Circulation Research*, 1981; 48: 430-438
49. Liu J, Wang Y, Du W, Liu W, et al: Wnt1 inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis in mouse cardiac stem cells, *PLoS ONE*, 2013; 8: 1-12
50. <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=9997> (datum dostopa: 26.8.2015)
51. Hahn JY, Cho HJ, Bae JW, et al:  $\beta$ -catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, *The Journal of Biological Chemistry*, 2006; 281: 30979-30989
52. Zhang Z, Deb A, et al: Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt-3a, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009; 46: 370-377
53. Barandon L, Couffignal T, Ezan J, et al: Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA, *Circulation*, 2003; 108: 2282-2289
54. <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html> (datum dostopa: 26.8.2015)