

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA RAKOVEC

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA RAKOVEC

**UČINKI AKUTNEGA IN KRONIČNEGA ZAVIRANJA IN  
AKTIVACIJE SIGNALNE POTI WNT NA ISHEMIČNO-  
REPERFUZIJSKE POŠKODBE IZOLIRANEGA SRCA PODGANE**

**EFFECTS OF ACUTE AND CHRONIC INHIBITION AND  
ACTIVATION OF THE WNT SIGNALLING PATHWAY ON  
ISCHEMIA-REPERFUSION INJURIES IN ISOLATED RAT HEART**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom viš. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

#### *ZAHVALE*

*Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju viš. znan. sod. dr. Gorazdu Drevenšku, univ. dipl. biol. za vso pomoč in usmerjanje ob magistrski nalogi. Hvala tudi delovni mentorici Ireni Marin, dr. med. za vso pomoč in družbo v laboratoriju ter njene nasvete pri nastajanju magistrske naloge.*

*Največja zahvala pa gre mojim staršem in bratu, ker me spremljate in spodbujate na vsaki moji poti ter Ianu, ker si bil ob meni in verjel vame. Hvala tudi ostalim sorodnikom, prijateljem in sošolkam, brez vas mi ne bi uspelo. Hvala!*

#### *IZJAVA*

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom viš. znan. sod. dr. Gorazda Drevenška, univ. dipl. biol.

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Član komisije: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Ljubljana, 2016

Tea Rakovec

# VSEBINA

POVZETEK .....	VII
ABSTRACT .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XI
1. UVOD.....	1
1.1. Srce .....	1
1.2. Ishemična bolezen srca .....	2
1.2.1. Ishemija miokarda .....	2
1.2.2. Ishemično-reperfuzijske poškodbe.....	2
1.3. Signalna pot Wnt .....	4
1.3.1. Proteini Wnt in njihovi receptorji.....	4
1.3.2. Wnt-signaliziranje ima dve različni poti .....	5
1.3.3. GSK-3 $\beta$ .....	6
1.3.4. $\beta$ -Katenin.....	7
1.3.5. Endogeni modulatorji poti Wnt.....	8
1.3.6. Srce in pot Wnt po miokardnem infarktu.....	9
1.3.7. Terapevtski vpliv na pot Wnt.....	11
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	14
3. MATERIALI IN METODE .....	15
3.1. Poskusne živali .....	15
3.2. Reagenti in raztopine pri poskusih na izoliranih srcih podgan.....	15
3.3. Pribor, aparature in programska oprema pri poskusih na izoliranih srcih podgan ...	16
3.4. Izolacija srca podgan po Langendorff-u .....	17
3.4.1. Potek poskusov na izoliranih srcih podgan .....	18
3.4.2. Tretiranje podgan v poskusih za določitev kroničnega učinka .....	18
3.4.3. Merjene spremenljivk.....	19

3.5. Obdelava podatkov .....	20
4. REZULTATI .....	21
4.1. Koronarni pretok po dodajanju modulatorjev poti Wnt.....	21
4.1.1. Koronarni pretok pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt .....	21
4.1.2. Koronarni pretok pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt.....	23
4.2. Hitrost sproščanja LDH po dodajanju modulatorjev poti Wnt.....	25
4.2.1. Hitrost sproščanja LDH pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt.....	25
4.2.2. Hitrost sproščanja LDH pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt .....	26
4.3. Moč kontrakcij levega ventrikla po dodajanju modulatorjev poti Wnt.....	28
4.3.1. Moč kontrakcij levega ventrikla pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt....	28
4.3.2. Moč kontrakcij levega ventrikla pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt	30
4.4. Frekvenca srčnih utripov po dodajanju modulatorjev poti Wnt .....	32
4.4.1. Frekvenca srčnih utripov pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt.....	32
4.4.2. Frekvenca srčnih utripov pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt.....	33
4.5. Aritmije po dodajanju modulatorjev poti Wnt.....	35
4.5.1. Trajanje ekstrasistol ali ventrikularnih prezgodnjih utripov .....	35
4.5.2. Trajanje ventrikularnih fibrilacij .....	36
4.5.3. Trajanje ventrikularnih tahikardij.....	37
4.5.4. Trajanje vseh aritmij skupaj .....	38
5. RAZPRAVA.....	41
5.1. Razprava o materialih in metodah .....	41
5.1.1. Aktivator BHQ880 .....	41
5.1.2. Zaviralec OMP-18R5 .....	42
5.1.3. Metoda izoliranega srca po Langendorff-u .....	42
5.2. Razprava o rezultatih .....	43
5.2.1. Koronarni pretok .....	43
5.2.2. Hitrost sproščanja laktat-dehidrogenaze (LDH) .....	44

5.2.3. Moč kontrakcij levega ventrikla.....	47
5.2.4. Frekvenca srčnih utripov.....	48
5.2.5. Pojav in trajanje aritmij.....	50
6. ZAKLJUČEK.....	52
7. LITERATURA.....	54

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Kanonična pot Wnt ob odsotnosti (A) in prisotnosti proteina Wnt (B). Povzeto po (21). .....	6
<b>Slika 2:</b> Endogeni modulatorji poti Wnt; A: zaviralci signaliziranja Wnt, B: aktivatorji signaliziranja Wnt. Povzeto po (29). .....	9
<b>Slika 3:</b> Spremembe v izražanju proteinov kanonične poti Wnt po MI. Povzeto po (15). .	10
<b>Slika 4:</b> Učinek posameznih komponent poti Wnt na srce. Povzeto po (30). .....	11
<b>Slika 5:</b> Koronarni pretok (mL/min) izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	22
<b>Slika 6:</b> Površina pod krivuljo (AUC) koronarnega pretoka izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	23
<b>Slika 7:</b> Koronarni pretok (mL/min) izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	24
<b>Slika 8:</b> Površina pod krivuljo (AUC) koronarnega pretoka izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	24
<b>Slika 9:</b> Hitrost sproščanja LDH ( $\mu\text{kat/g min}$ ) iz izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	25
<b>Slika 10:</b> Površina pod krivuljo (AUC) hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	26
<b>Slika 11:</b> Hitrost sproščanja LDH ( $\mu\text{kat/g min}$ ) iz izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	27
<b>Slika 12:</b> Površina pod krivuljo (AUC) hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	28
<b>Slika 13:</b> Moč kontrakcij levega ventrikla (mm Hg) izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	29
<b>Slika 14:</b> Površina pod krivuljo (AUC) moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	30
<b>Slika 15:</b> Moč kontrakcij levega ventrikla (mm Hg) izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	31
<b>Slika 16:</b> Površina pod krivuljo (AUC) moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	31

<b>Slika 17:</b> Frekvenca srčnih utripov izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	32
<b>Slika 18:</b> Površina pod krivuljo (AUC) frekvence srčnih utripov izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	33
<b>Slika 19:</b> Frekvenca srčnih utripov izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	34
<b>Slika 20:</b> Površina pod krivuljo (AUC) frekvence srčnih utripov izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	34
<b>Slika 21:</b> Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	35
<b>Slika 22:</b> Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	36
<b>Slika 23:</b> Graf trajanja VF pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	37
<b>Slika 24:</b> Graf trajanja VF pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	37
<b>Slika 25:</b> Graf trajanja VT pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	38
<b>Slika 26:</b> Graf trajanja VT pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	38
<b>Slika 27:</b> Graf trajanja vseh vrst aritmij pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	39
<b>Slika 28:</b> Graf trajanja vseh vrst aritmij pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. ....	40



## POVZETEK

Signalna pot Wnt ima pomembno vlogo v embrionalnem razvoju srca in drugih organov, v organih odraslih oseb pa potihne. Ponovno se aktivira ob različnih patoloških pogojih, na primer v srcu po miokardnem infarktu, kjer uravnava procese ob remodelaciji miokarda. Do sedaj so vlogo poti Wnt preučevali predvsem pri različnih tumorjih, kjer je pot Wnt preveč aktivna, in pri degenerativnih boleznih kosti, kjer je pot Wnt premalo izražena. Vplivi uravnavanja signalne poti Wnt pri miokardnem infarktu so bili do sedaj preučevani zelo malo, zato je bil namen magistrske naloge ugotoviti možne učinke aktivacije poti Wnt z aktivatorjem BHQ880 in zaviranja z zaviralcem OMP-18R5 na poškodbe izoliranega srca podgane, katerih vzrok je ishemično-reperfuzijska okvara.

Z metodo po Langedorff-u smo na modelu izoliranega podganjega srca simulirali ishemijo s sledečo reperfuzijo. Za oceno obsega poškodb smo merili koronarni pretok, hitrost sproščanja laktat-dehidrogenaze, moč kontrakcij levega ventrikla, frekvenco bitja srca in aritmije. Na Langedorff-ovi aparaturi smo srca najprej 30 minut perfundirali s Krebs-Henseleitovo raztopino, ki sta ji sledili 40-minutna popolna ishemija in 60-minutna reperfuzija. Skupinam, kjer smo določali akutne učinke, smo aplicirali testni spojini v zadnjih 10 minutah ishemije in celoten čas reperfuzije, medtem ko smo skupinam, kjer smo določali kronične učinke, aplicirali testni spojini štiri tedne in nato izvedli poskuse.

Naši rezultati so pokazali, da je aktivator BHQ880 le delno zmanjšal ishemično-reperfuzijske poškodbe srca po miokardnem infarktu, saj je po eni strani značilno znižal hitrost sproščanja laktat-dehidrogenaze, po drugi strani pa povzročil pojav aritmij. Za zaviralec OMP-18R5 v nižji koncentraciji (1,5 mg/L) smo ugotovili, da je to verjetno premajhna koncentracija za zmanjšanje obsega poškodb srca, ker so bile vrednosti spremenljivk zelo podobne kontrolnim. Zaviralec OMP-18R5 v višji koncentraciji (15 mg/L) pa je bil tisti, ki je najbolj ohranil srčno funkcijo in zmanjšal poškodbe na srcu, saj je imel najmanj aritmij in je najbolj znižal hitrost sproščanja laktat-dehidrogenaze. Pokazali smo, da akutna modulacija poti Wnt vpliva na ishemično-reperfuzijske poškodbe srca, pri kronični pa so učinki ob nastopu ishemije s sledečo reperfuzijo manj izraženi.

Na osnovi teh rezultatov lahko zaključimo, da akutno zaviranje signalne poti Wnt z OMP-18R5 v višji koncentraciji (15 mg/L) lahko zmanjša obseg ishemično-reperfuzijskih poškodb in aritmij po miokardnem infarktu in tako posreduje najbolj zaščitne učinke na

srce. Vendar bi bile za potrditev potrebne še dodatne preiskave, prav tako pri aktivatorju BHQ880, ki je pokazal tako zaščitno delovanje kot tudi povzročitev veliko aritmij. Kronična modulacija signalne poti Wnt pa ne doseže ustrezne zaščite srca pred ishemično-reperfuzijskimi poškodbami.

Ključne besede: miokardni infarkt, ishemično-reperfuzijske poškodbe, signalna pot Wnt, zaviralec signalne poti Wnt OMP-18R5, aktivator signalne poti Wnt BHQ880.

## ABSTRACT

The Wnt signalling pathway has an important role in embryonal development of heart and other organs, but in organs of adults it shuts down. Various pathological conditions can re-activate the Wnt pathway, in heart for example after myocardial infarction, where it regulates processes at remodeling of myocardium. Until now, the role of Wnt modulation has been studied mainly in a variety of tumours, where the Wnt pathway is overly active and in degenerative bone diseases, where it is not expressed sufficiently. The effects of Wnt modulation in myocardial infarction have not been studied much. That is why the intention of our work was to determine possible effects of Wnt activation with activator BHQ880 and inhibition with inhibitor OMP-18R5 on injuries of isolated rat heart caused by ischemia-reperfusion.

With Langendorff's method, we simulated ischemia with following reperfusion on an isolated rat heart model. To assess extent of injuries we measured coronary flow, lactate dehydrogenase release rate, left ventricular pressure, frequency of heartbeats and arrhythmias. We first perfused hearts for 30 minutes with Krebs-Henseleit solution on Langendorff's apparatus followed by 40-minute ischemia and 60-minute reperfusion. For groups, where we monitored acute effects, we added tested substances for the last 10 minutes of ischemia and throughout the reperfusion. For groups, where we monitored chronic effects, we were adding tested substances for 4 weeks and then we conducted experiments.

Our results indicated that activator BHQ880 decreased ischemia-reperfusion injuries after myocardial infarction only partially. It decreased lactate dehydrogenase release rate significantly, but on the other hand it caused many arrhythmias. For inhibitor OMP-18R5 at lower concentration (1,5 mg/L) we found that this concentration was probably too low for decreasing the extent of injuries and for protective effects on heart, because values of its parameters were very similar to control values. The inhibitor OMP-18R5 at higher concentration (15 mg/L) preserved heart function and reduced injuries on heart the most, as it produced the most antiarrhythmic effect and decreased the lactate dehydrogenase release rate most. We showed that the acute modulation of the Wnt signalling pathway affects on ischemia-reperfusion injuries, while in chronic modulation effects are less expressed.

Based on these results we concluded, that acute inhibition of the Wnt signalling pathway with OMP-18R5 at higher concentration (15 mg/L) can reduce extent of ischemia-

reperfusion injuries and arrhythmias after myocardial infarction. And that is why it mediates the most protective effects on heart. However, to prove these arguments further investigations are needed, as well as with BHQ880, which showed protective effect but also caused many arrhythmias. The chronic modulation of the Wnt signalling pathway does not achieve the adequate protection of heart against ischemia-reperfusion injuries.

Key words: myocardial infarction, ischemia-reperfusion injuries, Wnt signalling pathway, Wnt pathway inhibitor OMP-18R5, Wnt pathway activator BHQ880.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat (ang. adenosine triphosphate)
AUC	površina pod krivuljo (ang. area under the curve)
AV vozal	atrioventrikularni vozal
CK-1 $\alpha$ oz. -1 $\gamma$	kazein kinaza-1 $\alpha$ oz. -1 $\gamma$
Dvl	Dishevelled
EKG	elektrokardiogram
Fzd	transmembranski receptor Frizzled
GSK-3 $\beta$	glikogen-sintaza-kinaza-3 $\beta$
I-R	ishemija-reperfuzija
K-H raztopina	Krebs-Henseleitova raztopina
LDH	laktat-dehidrogenaza
LRP-5/6	LDL receptorju-soroden protein-5/6 (ang. LDL receptor-related protein-5/6)
MI	miokardni infarkt
MMP	mirovni membranski potencial
MPTP	prehodne mitohondrijske permeabilne pore (ang. mitochondrial permeability transition pore)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SA vozal	sinoatrialni vozal
TRIS	trihidroksimetil aminometan
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (ang. vascular endothelial growth factor)
VF	ventrikularna fibrilacija
VT	ventrikularna tahikardija
WIF-1	zaviralni dejavnik Wnt-1 (ang. Wnt-inhibitory factor-1)

# 1. UVOD

## 1.1. Srce

Srčno-žilni sistem našega telesa omogoča prenos nujno potrebnih snovi za celice in hkrati odstranjuje presnovke, pomembno vlogo ima tudi v različnih homeostatskih mehanizmih (1).

Normalni ritem bitja srca pri človeku znaša približno 70 utripov/min. Srce je mišica, ki se ne krči pod vplivom naše volje, oživčujeta ga avtonomno simpatično in parasimpatično živčevje. Poleg tega pa je sposobno tudi samostojno začeti akcijski potencial, kar mu omogočajo vlakna prevodnega sistema srca, ki ga tvorijo: sinoatrialni (SA) vozle, atrioventrikularni (AV) vozle in prevodni sistem v ventriklih (Hisov snop in Purkinjejev sistem). SA vozle, ki se nahaja v desnem atriju, je sposoben samostojnega začetka impulzov, zato je glavni ritmovnik ali »pacemaker« srca. Akcijski potencial nato potuje po atrijskih celicah, kar omogočajo presledkovni stiki in specializirana prevodna vlakna do levega atrija in AV vozla. Pot preko AV vozla nadaljuje do ventriklov, potem pa preko ventriklov po specializiranih prevodnih poteh: Hisov snop in Purkinjejev sistem. Prevajanje impulzov po srcu je hitro, kar omogoča skoraj sinhrono krčenje srčno-mišičnih celic (1, 2, 3).

Vzdraženje srčno-mišičnih celic in nastanek akcijskega potenciala v srcu so povezani s spremembami v prepustnosti membrane za  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$  ione. Vsak signal, ki spremeni mirovni membranski potencial (MMP) do vzdraženega praga povzroči nastanek akcijskega potenciala. Le-ta se začne s fazo 0, ki je faza hitre depolarizacije, kjer se membrana celice depolarizira do praga vzdraženja in se odprejo hitri napetostno odvisni  $\text{Na}^+$ -kanali,  $\text{Na}^+$  vstopi v celico. Sledi faza 1 ali faza delne repolarizacije: odprejo se prehodno odprti  $\text{K}^+$ -kanali in pride do kratkega toka  $\text{K}^+$  iz celice. V fazi 2 ali fazi platoja  $\text{Ca}^{2+}$  vstopa v celico preko počasnih  $\text{Ca}^{2+}$ -kanalov. Tok  $\text{Ca}^{2+}$  navznoter uravnovesi enak tok  $\text{K}^+$  navzven, kar vzdržuje membranski potencial blizu vrednosti 0 mV. Ko iztekanje  $\text{K}^+$  iz celice preseže tok  $\text{Ca}^{2+}$  v celico, se začne faza 3 ali faza repolarizacije.  $\text{Ca}^{2+}$ -kanali se zaprejo in prehajajo le še  $\text{K}^+$  ioni, celica preide nazaj v MMP (faza 4) (1, 2).

## **1.2. Ishemična bolezen srca**

### **1.2.1. Ishemija miokarda**

Pretok krvi skozi koronarno žilje srca se uravnava glede na potrebe srčne mišice po kisiku. Ob zmanjšani dostavi ali preveliki porabi kisika, pride do ishemije srčne mišice, kar je stanje nezadostne prekrvavljenosti miokarda. Celicam v ishemičnem tkivu primanjkuje kisika in hranil, kar vodi do okvare tkiva ali organa. Ishemična bolezen srca je najpogostejši vzrok obolenja in umrljivosti v razvitih deželah. Akutni klinični pojavi bolezní so angina pectoris, akutni miokardni infarkt (MI), aritmije, srčno popuščanje ali nenadna srčna smrt (4, 5). V večini primerov je vzrok zanjo koronarna ateroskleroza, ki zaradi akutnih in kroničnih zapletov vodi do ishemije. Ateroskleroza je kronična bolezen velikih in srednje velikih arterij, za katero je značilen nastanek aterosklerotičnih leh ali ateromov, ki so omejene zadebelitve v intimi arterij (5, 6). Ateromi lahko ožijo lumen žil in ovirajo pretok krvi, odvisno od stopnje zožitve. Zožitev postane pomembna pri zapolnjenju 75 % preseka žile, kar povzroči ishemijo srčne mišice pri večji porabi kisika pri fizičnem naporu ali psihičnem stresu. To imenujemo stabilna angina pectoris, kar pacient občuti kot topo, stiskajočo bolečino za prsnico. Ob zoženju več kot 90 % preseka žile se bolečina pojavi tudi v mirovanju in to je nestabilna angina pectoris, kar je lahko opozorilni znak na možnost pojava akutnega MI, kjer pride do popolne zapore pomembnih koronarnih arterij (4, 5).

### **1.2.2. Ishemično-reperfuzijske poškodbe**

Pri ishemično-reperfuzijskih (I-R) poškodbah srca v sosledju potekata dva procesa: ishemija in reperfuzija. Posledica miokardne ishemije je tudi energetski stres, reperfuzijo pa spremljajo nenaden premik ionov in oksidativni stres (7).

Pri MI se med ishemijo srca zaradi zaustavitve pretoka krvi in posledično izgube kisika mitohondrijska oksidativna fosforilacija hitro zaustavi, kar povzroči zastoj nastajanja glavnega vira energije za kardiomiocite adenozin trifosfata (ATP). Zato se ob ishemiji začne anaerobni proces glikolize za produkcijo ATP, to pa vodi do kopičenja protonov in laktata, ki povzročijo acidozo v celici. Zaradi delovanja  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -izmenjevalca se  $\text{Na}^+$  v celici nakopiči. Zmanjšan gradient  $\text{Na}^+$  in depolarizacija membrane obrne delovanje  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -izmenjevalca in posledično pride do kopičenja  $\text{Ca}^{2+}$  v celici. Povišan  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira fosfolipaze in proteaze, ki poškodujejo citoskelet. Večina ATP, ki nastane med

glikolizo, se porabi za vzdrževanje MMP, kar povzroči vstop  $\text{Ca}^{2+}$  v mitohondrij, kjer aktivira prehodne mitohondrijske permeabilne pore (MPTP, ang. mitochondrial permeability transition pore). MPTP zaradi nizkega pH niso aktivne med ishemijo, aktivne postanejo tekom reperfuzije, kjer se obnovi fiziološki pH. Ob dalj časa trajajoči ishemiji se zaradi acidoze zaustavi glikoliza, kar povzroča ireverzibilne poškodbe celic (8, 9, 10).

Čeprav ponovna vzpostavitev pretoka ali reperfuzija reši ishemične kardiomiocite pred nekrozo, po drugi strani lahko povzroči tako imenovane miokardne reperfuzijske poškodbe, kot so vnetje, oslABLJENA srčna funkcija, aritmije, pospešena celična smrt v kritično poškodovanih celicah, poškodbe mikrocirkulacije. Reperfuzija lahko kardiomiocite, ki so bili reverzibilno poškodovani med ishemijo, vodi v ireverzibilne poškodbe, kar povzroči smrt celic, ki so bile pred reperfuzijo žive (8, 9, 11). Glavni mediatorji reperfuzijskih poškodb so reaktivne kisikove zvrsti (ROS), previsoka koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  v celici in nevtrofilci. ROS, ki nastanejo ob ponovnem dotoku kisika, poškodujejo membrane z lipidno peroksidacijo, poškodujejo DNA, privabljajo nevtrofilce in še dodatno zvišujejo  $\text{Ca}^{2+}$  (7, 8, 9, 11). Previsoka koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  odpira MPTP in povzroča hiperkontraksije kardiomiocitov. Nevtrofilci se akumulirajo v mikrocirkulaciji in povzročajo mašitev žil, sproščanje encimov in ROS. Ireverzibilne poškodbe izvirajo iz številnih poškodb membrane zaradi izgube fosfolipidov, lipidne peroksidacije in poškodb citoskeleta (8, 9, 11). Zaradi kopičenja metabolitov in anorganskih fosfatov v celici naraste osmotski tlak, kar povzroči nabrekanje celice, naraščanje  $\text{Ca}^{2+}$  pa skupaj z oslABLJENIM krčenjem s stalno električno aktivnostjo privede do ventrikularnih aritmij. S  $\text{Ca}^{2+}$  aktivirane proteaze spremenijo kontraktilne proteine, zmanjšajo občutljivost na  $\text{Ca}^{2+}$ , kar vodi do trajne oslABLITVE kontraktilnosti srca kljub povišani koncentraciji citosolnega  $\text{Ca}^{2+}$  (8, 9, 11). Zaradi hitre obnove fiziološkega pH tekom reperfuzije, ter zaradi izgube ATP, ROS in povišanega  $\text{Ca}^{2+}$  v mitohondriju se odprejo MPTP. Odprtje teh por vodi v porušitev potenciala mitohondrijske membrane in oksidativne fosforilacije, kar povzroči izgubo ATP, hkrati pa pride tudi do otekanja mitohondrija in vse skupaj vodi v nekrotično celično smrt, še preden se zaključi apoptoza, zaradi energetskega kolapsa in nekontroliranih encimatskih procesov (7, 9, 11). Kardiomiociti začnejo apoptozo kot odgovor na ishemijo, a zaradi energetskih zahtev apoptoze, ki jih celica ne more izpolniti, apoptoza zastane. Zato med dolgotrajno ishemijo kardiomiociti preklopijo iz začete apoptoze v nekrozo, če pa ishemiji sledi reperfuzija, ki vzpostavi ponoven dotok kisika in



energije, pa se apoptoza lahko zaključi. Ključ odločitve o usodi celice je torej raven ATP, dejavnik, ki je potreben za dokončanje apoptoze v celici (12).

Za pravilno delovanje kardiomiocitov je potrebno veliko število mitohondrijev, ki so sposobni produkcije ATP in sodelovanje v homeostazi  $\text{Ca}^{2+}$ , ob ishemični srčni bolezni pa so mitohondriji lahko povzročitelj poškodb. Mitohondrij se na akutne ishemično-reperfuzijske poškodbe odzove s spremembo v produkciji ATP, homeostazi  $\text{Ca}^{2+}$ , produkciji ROS in v najslabših primerih tudi s spremenjeno prepustnostjo membrane. Mitohondrij je sposoben sprožiti celično smrt preko aktivacije apoptotičnih in nekrotičnih poti ali sekundarne poti, ki vključuje MPTP (7).

### **1.3. Signalna pot Wnt**

Signalne poti Wnt igrajo pomembne vloge v kardiovaskularnem in živčnem sistemu tako med embrionalnim razvojem celic kot tudi v homeostazi tkiva odraslih posameznikov. Uravnavajo proliferacijo, diferenciacijo, orientacijo, adhezijo, preživetje in apoptozo celic. V srcu je signalna pot Wnt potrebna za normalen razvoj srčnega tkiva, v zdravem odraslem srcu pa naj bi potihnila. A med različnimi poškodbami srca se pot Wnt ponovno aktivira in ima vlogo uravnavanja pri popravljalnem remodeliranju srca. Modulacija signalne poti Wnt lahko pod določenimi pogoji spodbuja ali pa zavira zgodnje in pozne faze apoptotičnih poškodb v nevronih, endotelnih celicah, žilnih gladko-mišičnih celicah in kardiomiocitih. Signalna pot Wnt lahko sodeluje pri nevrodegenerativnih in kardiovaskularnih boleznih, zato je pomembno njeno poznavanje pri odkrivanju novih terapevtskih možnosti pri omenjenih boleznih (13, 14, 15, 16).

Eden od prvih razvitih organov v embrionalnem razvoju je srce, njegov razvoj je pomemben za rast zarodka z dovolj hranili in kisika. Aktivacija poti Wnt je pomembna med razvojem srca in je predpogoj za normalen razvoj kardiovaskularnega sistema, tako kanonična in nekanonična pot sta zato nepogrešljivi za normalen srčni razvoj (17).

#### **1.3.1. Proteini Wnt in njihovi receptorji**

Proteini Wnt predstavljajo veliko družino s cisteinom bogatih hidrofobnih glikoproteinov, ki se zaradi svoje hidrofobnosti vežejo na celične membrane in zunajcelični matriks. Proteini Wnt se ob sprostitvi vežejo na svoje receptorje, to so transmembranski receptorji Frizzled (Fzd) na površini celic. Vezavno mesto za vezavo proteina Wnt je s cisteinom

bogata domena in je različna za kanonično in nekanonično pot. Za aktivacijo kanonične poti Wnt je potreben še en koreceptor, LDL receptorju-soroden protein LRP-5/6 (ang. LDL receptor-related protein). Pri človeku poznamo 19 proteinov Wnt in 10 receptorjev Fzd (13, 15).

### **1.3.2. Wnt-signaliziranje ima dve različni poti**

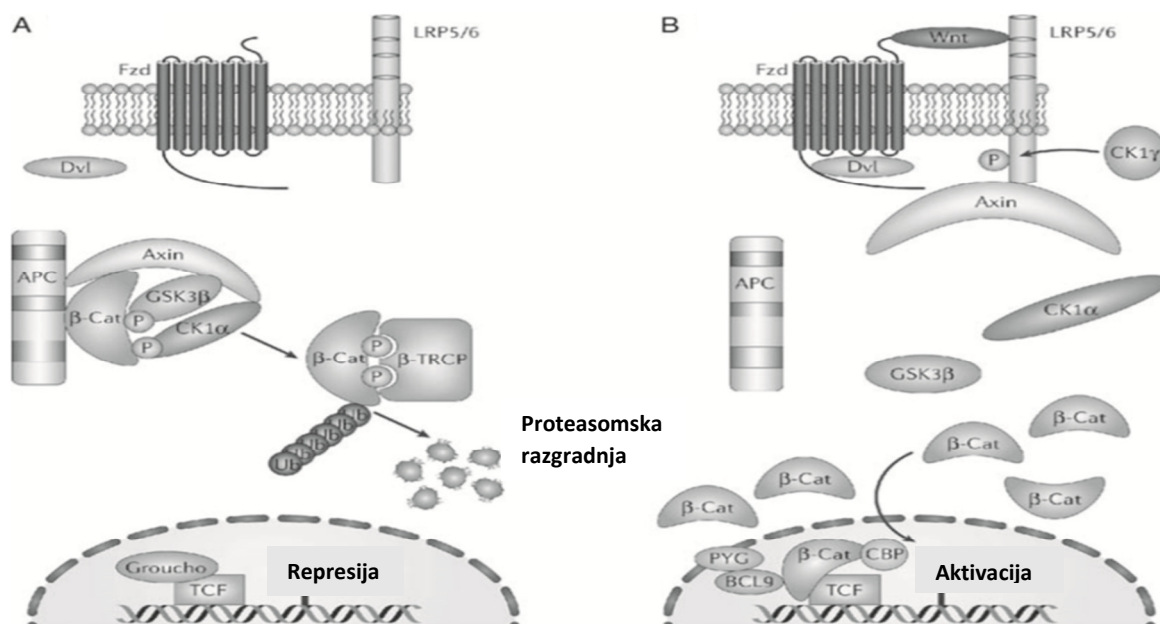
Z vezavo proteina Wnt na Fzd ali kompleks Fzd + LRP-5/6, se v celici lahko sprožita dve signalni poti. Prva je kanonična, od  $\beta$ -katenina odvisna pot, ki kontrolira gensko transkripcijo in vključuje Wnt-1, -2, -3, -3a, -8 in -8a (13, 14). Učinki različnih proteinov kanonične poti Wnt so lahko različni, npr. Wnt-3a deluje pro-apoptotično (18), medtem ko Wnt-1 izkazuje anti-apoptotične učinke (19). Druga signalna pot pa je ne-kanonična pot, ki vključuje Wnt-4, -5a, -5b, -6, -7a in -11 in je neodvisna od  $\beta$ -katenina. Ta pot se deli na pot planarne celične polarnosti (PCP) in Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pot.

Pri kanonični in nekanonični poti se vsak signal najprej začne z vezavo na receptor Fzd in prenese naprej preko Dishevelled (Dvl), citoplazemskega multifunkcionalnega proteina (13, 14).

#### **Kanonična signalna pot Wnt**

Imenuje se tudi signalna pot Wnt/ $\beta$ -katenin, saj preko  $\beta$ -katenina regulira tarčne gene. Aktivira se ob vezavi proteina Wnt na receptor Fzd in koreceptor LRP-5/6, kar prikazuje slika 1B. Nastane trimolekulski kompleks, ki vodi do fosforilacije in vezave Dvl na receptor Fzd, nastane kompleks Dvl/Fzd. To spodbudi vezavo LRP-5/6 na kompleks Dvl/Fzd, kar fosforilira LRP-5/6 s kazein kinazo-1 $\gamma$  (CK-1 $\gamma$ ). Posledično se nanj veže aksin, kar onemogoči nastanek destruktivnega kompleksa, sestavljenega iz glikogen-sintaza-kinaze-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), kazein kinaze-1 $\alpha$  (CK-1 $\alpha$ ), aksina in APC (ang. adenomatous polyposis coli), ki bi razgradil  $\beta$ -katenin.  $\beta$ -Katenin se zato nakopiči v citoplazmi in prenese v jedro, kjer aktivira transkripcijska dejavnika Tcf (ang. T-cell transcription factor) in Lef (ang. lymphoid enhancer binding factor) in posledično izražanje tarčnih genov, kot sta c-Myc in ciklin D, kar aktivirata proliferacijo. Če pa proteina Wnt ni, se  $\beta$ -katenin fosforilira, kar prikazuje slika 1A. Fosforilacijo  $\beta$ -katenina izvede destruktivski kompleks. CK-1 $\alpha$  in GSK-3 $\beta$  fosforilirata treonin in serin na N-koncu  $\beta$ -katenina in tako ustvarita vezavno mesto za ubikvitin ligazo  $\beta$ -TRCP (ang.  $\beta$ -transducin repeat-containing protein). Posledica ubikvitacije  $\beta$ -katenina je razgradnja v proteasomu.  $\beta$ -katenina zato v jedru ni in

na transkripcijske dejavnike Tcf/Lef so vezani transkripcijski zaviralci, zato ni transkripcije tarčnih genov Wnt (13, 15, 20, 21, 22).



**Slika 1:** Kanonična pot Wnt ob odsotnosti (A) in prisotnosti proteina Wnt (B). Povzeto po (21).

### 1.3.3. GSK-3β

Glikogen-sintaza-kinaza-3 (GSK-3) je multifunkcionalna serin/treonin kinaza, ki poleg metabolizma glikogena uravnava številne signalne poti, med drugim tudi pot Wnt. Je nenavaden encim, ker je v celicah stalno aktiven in je uravnavan preko zaviranja njegove aktivnosti. GSK-3β uravnava ali natančneje zavira kanonično signalno pot Wnt, kar vodi do preprečitve aktivacije transkripcijskih dejavnikov Tcf/Lef (20).

V srcu je GSK-3β pomembna pri hipertrofiji, nekrozi in apoptozi kardiomiocitov (23). Pri celični apoptozi ima GSK-3β tako pro- kot tudi anti-apoptotično vlogo. Učinek GSK-3β na apoptozo v celici je odvisen od tipa celice, stopnje celične transformacije in specifičnih signalnih poti, ki so v tistem trenutku aktivirane (24). Pro-apoptotična vloga GSK-3β se kaže pri apoptozi zaradi zvišanih rastnih dejavnikov, poškodb DNA, ishemije, oksidativnega stresa. Ob I-R nastanejo ROS, povišan  $Ca^{2+}$  in anorganski fosfati, izguba ATP; takrat povečano delovanje GSK-3β sproži odpiranje MPTP, to pa posledično vodi do apoptoze. Zaviranje GSK-3β prepreči hidrolizo ATP z zmanjšanjem transporta ATP iz citoplazme v mitohondrij, to pa bi med ishemijo lahko preprečilo izčrpanje ATP in kopičenje anorganskih fosfatov, kar sta dva dejavnika, ki spodbujata odpiranje MPTP (23).

GSK-3 $\beta$  tvori kompleks z jedrnim tumor-supresorskim dejavnikom p53 in s tem spodbuja s p53-sproženo apoptozo (23, 24). GSK-3 $\beta$  signaliziranje pa hkrati lahko deluje tudi zaviralno na p53, saj preveliko izražanje  $\beta$ -katenina poviša raven p53. Med p53 in  $\beta$ -kateninom tako obstaja negativna povratna zanka: prekomerno izražen  $\beta$ -katenin povišuje raven p53, aktivacija p53 pa vodi do razgradnje katenina preko GSK-3 $\beta$  (24). Na ta način se v telesu lahko prepreči preveliko kopičenje  $\beta$ -katenina, ki je lahko škodljivo (20). GSK-3 $\beta$  je tako dobra tarča pri zaščiti srčnih celic pred I-R poškodbami, saj zaviranje GSK-3 $\beta$  z različnimi farmakološkimi zaviralci, dodanimi pred ishemijo ali reperfuzijo, omeji velikost infarkta (23). Zaviralce GSK-3 $\beta$  danes uporabljamo za zdravljenje številnih bolezni, kot so Alzheimerjeva bolezen in druge nevrodegenerativne bolezni, diabetes, rak; pozitivne regulatorje GSK-3 $\beta$  pa za povečanje pro-apoptotičnega učinka GSK-3 $\beta$  pri kemoterapiji rakavih obolenj (24).

#### **1.3.4. $\beta$ -Katenin**

$\beta$ -katenin je transkripcijski regulator številnih genov, udeleženih pri preživetju in proliferaciji celic. V našem telesu ima dve vlogi. Eno vlogo ima  $\beta$ -katenin, ki vezan na celične membrane ohranja arhitekturo tkiva in celično polarnost s pomočjo adherentnih povezav. Pomanjkanje  $\beta$ -katenina v adherentnih stikih med kardiomiociti vodi do oslabiljene strukturne celovitosti srca. Drugo vlogo pa ima citoplazemski  $\beta$ -katenin, ki po premiku v jedro tvori komplekse s transkripcijskimi dejavniki Tcf/Lef in na ta način sodeluje v aktivaciji genov, udeleženih pri celičnem preživetju in proliferaciji.  $\beta$ -katenin preko delovanja na povečano izražanje survivina in Bcl-2 vodi do zmanjšanja apoptoze v kardiomiocitih in srčnih fibroblastih, poveča izražanje žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) in sintezo kontraktilnih proteinov, spodbudi diferenciacijo srčnih fibroblastov v miofibroblaste, kar prispeva k ohranitvi sistolične funkcije srca, poveča hipertrofijo kardiomiocitov, kar nadomesti izgubljene celice v miokardu in poveča delež celic v S-fazi preko povečanega izražanja ciklina D1 in E2. V infarktne območju zmanjša velikost MI in ohranja sistolično funkcijo srca preko modulacije preživetja/apoptoze, hipertrofije, diferenciacije srčnih celic in angiogeneze preko spodbujanja izražanja VEGF (25, 26). Težave pa lahko povzroča mutiran  $\beta$ -katenin, ki ga GSK-3 $\beta$  ne more fosforilirati in so ga našli pri raku kože, debelega črevesja, prostate in ledvic (20).

### 1.3.5. Endogeni modulatorji poti Wnt

V telesu se lahko ob različnih fizioloških ali patoloških pogojih sprostijo endogene molekule, ki delujejo kot aktivatorji ali zaviralci signalne poti Wnt. Delujejo lahko znotrajcelično, kjer modulirajo komponente signalnega transdukcijskega kompleksa ali zunajcelično, kjer uravnavajo interakcije med receptorjem in ligandom. Med zaviralce poti Wnt sodijo: **Dkk proteini** (ang. Dickkopf proteins), **zaviralni dejavnik Wnt-1 (WIF-1**, ang. Wnt-inhibitory factor 1), **proteini sFRP** (ang. secreted Frizzled-related proteins), **proteini Wise/SOST, Shisa** in drugi (27, 28). Kako delujejo nekateri zaviralci, prikazuje slika 2A.

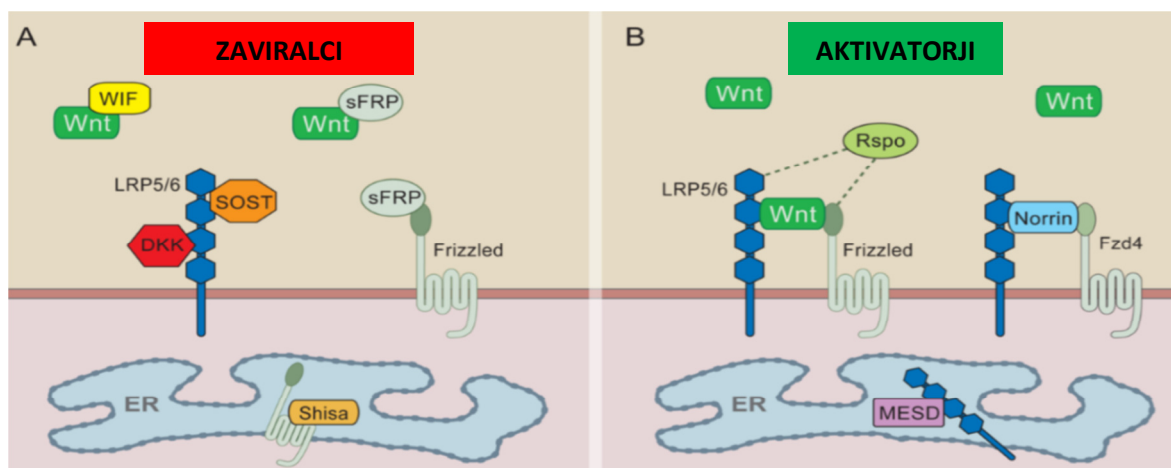
**Norin** in **R-spondin (Rspo)** pa sta proteina iz družine alternativnih ligandov za aktivacijo kanonične poti Wnt. Norrin je specifičen ligand za Fzd-4 in deluje preko vezave na Fzd-4 in LRP-5/6, Rspo protein pa poveča sinergijo med Fzd, Wnt in LRP-5/6 (14, 27, 29). Mesto delovanja obeh prikazuje slika 2B.

#### Zaviralci poti Wnt

Proteini **Dickkopf** ali **Dkk** so močni endogeni zaviralci, ki uravnavajo pot Wnt. Najbolj poznan med njimi je Dkk-1, odkriti pa so še Dkk-2, -3 in -4. Dkk-1 je sam tarčni gen signalne poti Wnt, zato je del negativne povratne zanke. Sestavljen je iz dveh s cisteinom bogatih domen na N- in C-koncu; C-končna domena je tista, ki je odgovorna za zaviranje poti Wnt. Dkk-1 z vezavo na LRP-6 prepreči nastanek kompleksa LRP-6, receptor Fzd in protein Wnt (slika 2A), zato je specifični zaviralec kanonične poti Wnt. Poleg tega se Dkk-1 veže lahko tudi na druge receptorje, kot je Kremen-1/2. Le-ta potencira sposobnost Dkk-1 za zaviranje kanonične poti Wnt in ob prisotnosti Kremena-2, Dkk-1 in LRP-6 nastane kompleks, ki spodbudi endocitozo in odstranitev LRP-6 receptorja iz membrane (14, 15, 28).

Družina **sFRP 1-5** (ang. secreted Frizzled-related proteins 1-5) so proteini, ki imajo veliko homologijo z vezavnim mestom na receptorjih Fzd. Zato lahko vežejo proteine Wnt in z njimi tudi tekmujejo za vezavo na Fzd. Tako preprečijo vezavo proteinov Wnt na svoje receptorje in delujejo kot zaviralci kanonične in nekanonične poti (slika 2A). SFRP-ji imajo več vezavnih mest za proteine Wnt in različne afinitete. Odkrili so, da sFRP 1-4 lahko vežejo protein Wnt-3a, sFRP-1 in 2 pa lahko vežeta le Wnt-5a (14, 15, 28).

**Zaviralni dejavnik Wnt-1** ali **WIF-1** (ang. Wnt inhibitory factor-1) se prav tako veže na protein Wnt in s tem prepreči njegovo zmožnost vezave na receptor Fzd, zato deluje kot zaviralec kanonične in nekanonične poti Wnt (slika 2A). Veže se na proteine Wnt kanonične in nekanonične poti: Wnt-3a, -4, -5a, -7a, -9a in -11. Vloga WIF-1 v kardiovaskularnih boleznih je neznan, WIF-1 lahko zavira CTGF (= connective tissue growth factor). Le-ta aktivira fibroblaste in povzroča hipertrofijo v kardiomiocitih podgan (14, 15, 28, 29).



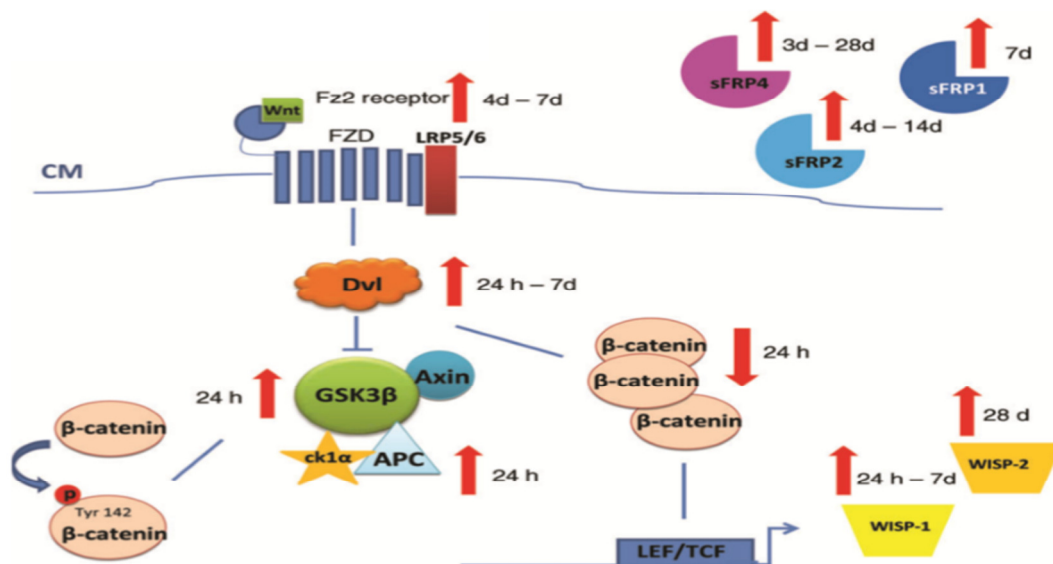
**Slika 2:** Endogeni modulatorji poti Wnt; A: zaviralci signaliziranja Wnt, B: aktivatorji signaliziranja Wnt. Povzeto po (29).

### 1.3.6. Srce in pot Wnt po miokardnem infarktu

Po akutni poškodbi miokarda zaradi MI poškodbe vodijo do nekroze kardiomiocitov, ki sprožijo vnetni odziv. Vnetne celice sproščajo proteolitične encime, ROS in vnetne citokine, ki še dodatno prispevajo k smrti kardiomiocitov ter citokine, ki spodbujajo fibrozo. Protivnetni citokini sproščajo različne dejavnike, ki spodbudijo diferenciacijo fibroblastov v miofibroblaste. Kontraktilne sposobnosti in organizacija miofibroblastov prispevajo k ohranitvi srčne funkcije in preprečijo dilatacijo območja. Kasneje miofibroblasti izločajo proteine zunajceličnega matriksa, ki oblikujejo zrelo brazgotino. Tri do štiri dni po MI pride do oblikovanja novih žil na infarktne območju, proces se imenuje angiogeneza (15, 16, 30).

V študijah so udeležnost poti Wnt po MI ugotavljali na živalskim modelih in sicer mišjih ali podganjih srcih. Zdravo mišje srce ima signaliziranje Wnt slabo izraženo, omejeno je na endotelijske in žilne gladko-mišične celice velikih žil in zaklopk. Po MI pa začne signaliziranje Wnt naraščati predvsem v epikardu, celicah iz epikarda (ang. epicardial

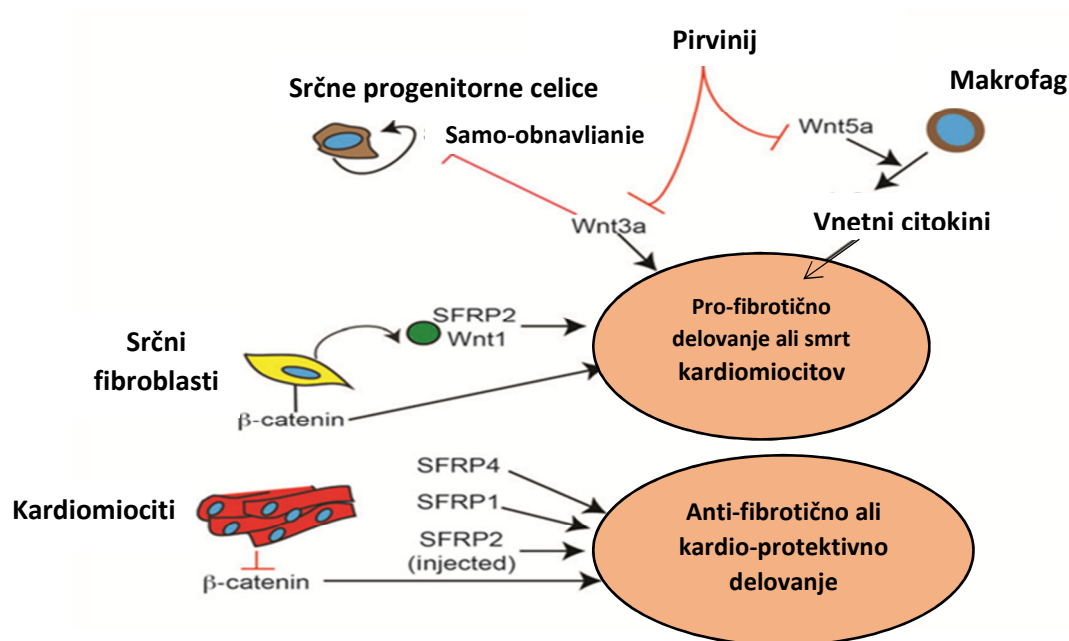
derived cells), fibroblastih, endotelijskih celicah in gladko-mišičnih celicah na infarktnem območju. Po štirih dneh je signaliziranje raztreseno, po sedmih dneh je večinoma omejeno na infarktno in ob-infarktno območje, po treh tednih pa signaliziranje Wnt skoraj v celoti potihne (15, 26, 30).



**Slika 3:** Spremembe v izražanju proteinov kanonične poti Wnt po MI. Povzeto po (15).

Spremembe v izražanju proteinov udeleženih v signalni poti Wnt prikazuje slika 3. Izražanje sFRP1 je povišano v infarktnem območju sedem dni po MI, v normalnem tkivu mišk pa je nizko. sFRP1 je udeležen v vnetnem odzivu, povečano izražanje lahko zmanjša velikost infarkta, kot prikazuje slika 4. sFRP2 naraste štiri dni po MI in sodeluje pri nastajanju kolagena, izražajo ga srčni fibroblasti na poškodovanem območju. Izražanje sFRP4 pa je najvišje tri do pet dni po MI. sFRP4 uravnava odlaganje zunajceličnega matriksa (deluje proti-fibrotično) in celično preživetje po MI (slika 4).

Kot prikazuje slika 4 ima Wnt-3a *in vitro* pro-apoptotske učinke in zmanjšuje samo-obnovo srčnih matičnih celic, Wnt-5a pa naraste v makrofagih in poveča sproščanje vnetnih citokinov. Antagonizem Wnt-3a in -5a z učinkovino UM206 zato zavira fibrozo, zmanjša širjenje infarkta in prepreči popuščanje srca. Pirvinij preko aktivacije CK-1α in s tem pospeševanjem razgradnje β-katenina zavira pot Wnt. Spojina je bila v študiji aplicirana v infarktno območje po MI in prišlo je do izboljšanja srčne funkcije. Zato bi lahko antagonizem pro-apoptotskih proteinov Wnt *in vivo* prispeval k zaščitnim učinkom na srce (15, 30, 31, 32, 33).



**Slika 4:** Učinek posameznih komponent poti Wnt na srce. Povzeto po (30).

Endotelijske celice izražajo Fzd-1, -2, -4, -5, -6, -7, -9 in -10 ter Wnt-1, -3a in -5a, ki uravnavajo proliferacijo in migracijo endotelijskih celic. Po ishemični poškodbi epikard začne izražati Wnt-1, ki poskrbi, da se epikard razširi in oblikuje celice, dobljene in epikarda, ki tvorijo nove srčne fibroblaste in miofibroblaste. V miofibroblastih je povišano izražanje Fzd-2 štiri dni po MI in Dvl-1 24 ur po MI kot kaže tudi slika 3; Fzd-2 je pomemben za migracijo miofibroblastov, Dvl-1 pa za migracijo in proliferacijo po MI (16, 26, 30). Signalna pot Wnt ima sposobnost modulacije angiogeneze, ki omogoča obnovo krvnega pretoka na prizadetem območju in skupaj s proliferacijo in migracijo pomaga pri remodelaciji prizadetega tkiva po MI. Stimulacija oblikovanja novih žil je močno odvisna od VEGF, ki pa ga regulira  $\beta$ -katenin (14, 26).

### 1.3.7. Terapevtski vpliv na pot Wnt

Številne študije govorijo o farmakološki modulaciji poti Wnt kot mogočem pristopu k zdravljenju različnih bolezni. Na eni strani najdemo zaviranje poti Wnt, ki se kot terapevtski pristop uporablja predvsem pri zdravljenju raka, kjer je delovanje poti Wnt povečano. Bolezni kot so osteoporoza in druge degenerativne kostne bolezni, pa so povezane z zmanjšanim delovanjem kanonične poti Wnt. Zato se v terapevtske namene uporabljajo učinkovine za povečanje delovanja poti Wnt (34).

#### Aktivacija poti Wnt



Farmakološko aktivacijo poti Wnt kot terapevtski pristop večinoma najdemo pri različnih kostnih degenerativnih boleznih, nekaj študij aktivacije poti Wnt pri MI na živalih pa kaže izboljšanje srčne funkcije po MI in zmanjšanje I-R poškodb.

V študiji ishemičnega prekondicioniranja (IPC; to so prehodna obdobja ishemije in reperfuzije med trajno ishemijo) izoliranih mišjih src so dokazali povečano odpornost miokarda pri letalni ishemiji. IPC namreč sproži številne signalne poti, ki vodijo do zaščite srca. Ena od teh poti naj bi bila tudi aktivacija poti Wnt in posledično zaviranje GSK-3 $\beta$ , kar naj bi imelo pozitivne učinke za srce (35). Podobno dokazuje tudi druga študija na podganjih srcih, kjer je dodatek sevoflurana pred ishemijo (prekondicioniranje s sevofluranom = SP) zaščitil miokard pred I-R poškodbami. Rezultati so pokazali, da je zaščita srca zaradi SP posredovana preko kanonične signalne poti Wnt. Izražanje Wnt-3a, fosfo-GSK-3 $\beta$  in  $\beta$ -katenina je močno naraslo pri SP v primerjavi z drugimi skupinami, pri SP sta bila tudi sproščanje laktat-dehidrogenaze (LDH) in obseg infarkta nižja kot pri ostalih skupinah (36). V študiji učinka propofola na perfundirano izolirano srce so ugotovili njegove zaščitne učinke predvsem preko zaviranja GSK-3 $\beta$ . Propofol je povečal okrevanje srca in zmanjšal obseg infarkta (37). Študija učinka farmakološke aktivacije kanonične poti Wnt v jetrih pa je pokazala, da aktivacija kanonične poti Wnt preko pospeševanja proliferacije in zaviranja apoptoze varuje jetra pred I-R poškodbami. Agonist Wnt je normaliziral jetrne encime po I-R, med drugim tudi LDH, povečala se je celična proliferacija in zmanjšala apoptoza. Hkrati je agonist Wnt zmanjšal celični stres, nastal v hepatocitih zaradi I-R (38).

### **Zaviranje poti Wnt**

Farmakološko zaviranje poti Wnt pa se večinoma uporablja v terapiji raka. Raziskave zaviranja poti Wnt na srcu so pokazale tako škodljive učinke na srce in poslabšanje I-R poškodb po MI, na drugi strani pa zaščito srca po MI.

V študiji poti Wnt v možganih so dokazali, da po ishemiji v možganih hitro pride do povečanega izražanja Dkk-1, kar ima za posledico znižanje  $\beta$ -katenina in poškodbe nevronov. Ob zmanjšanem izražanju Dkk-1 pa je ostala koncentracija  $\beta$ -katenina visoka, obseg infarkta pa je bil zmanjšan. To dokazuje, da zaviranje kanonične poti Wnt in znižanje  $\beta$ -katenina v možganih povzroča poškodbe nevronov (39). sFRP-1 je antagonist Wnt, ki lahko zmanjša fosforilacijo in posledično zaviranje GSK-3 $\beta$ . V študiji je povečano izražanje sFRP-1 zaviralo povečano fosforilacijo GSK-3 $\beta$  in na ta način preprečilo

zaviranje delovanja GSK-3 $\beta$ , citoplazemski  $\beta$ -katenin je ostal nespremenjen. Povečal se je tudi obseg infarkta pri miškah in poslabšala se je srčna funkcija. Zato povečano izražanje sFRP-1 v srcu ogroža zaščito srca, ki jo nudi pot Wnt (40). A po drugi strani zaviranje poti Wnt lahko izboljša srčno funkcijo po MI. V študijah so dokazali, da pirvinij preko povečanja delovanja CK-1 $\alpha$  in s tem povečane razgradnja  $\beta$ -katenina ter zaviranjem poti Wnt, lahko izboljša škodljivo preoblikovanje levega ventrikla in srčno funkcijo (31, 32). Antagonizem Wnt-3a in -5a poti z učinkovino UM206 kaže na zmanjšano fibrozo in širjenje infarkta, prepreči tudi srčno popuščanje (33). Tudi dokazi iz drugih študij govorijo, da ima zaviranje poti Wnt pozitivne učinke pri zdravljenju srca in preprečuje srčno popuščanje po MI (15, 30). Nasprotje med enim in drugimi dokazi je lahko posledica različnih dejavnikov, kot so biološka raznolikost med živalmi, različen čas in mesto uporabe učinkovine po MI, napake pri poskusih.

## 2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Do sedaj objavljene študije dokazujejo, da ima aktivacija poti Wnt v srcu po MI pozitivne učinke na srčno funkcijo in izboljšanje I-R poškodb. Medtem pa na drugi strani zaviranje poti Wnt v nekaterih študijah izboljša, v drugih pa poslabša izide po MI. Zato je namen magistrske naloge ugotoviti in izmeriti učinke aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 signalne poti Wnt na poškodbe izoliranega srca podgane po akutnem MI ter ugotoviti, ali obstaja razlika med akutno in kronično uporabo teh dveh spojin.

V ta namen bomo po izolaciji srca iz podgane le-tega namestili na aparaturu po Langendorff-u in ga perfundirali s sveže pripravljeno oksigenirano Krebs-Henseleitovo raztopino (K-H raztopina). Imeli bomo dve skupini aktivatorja BHQ880 z akutno koncentracijo 10 mg/L in kronično 10 mg/kg ter tri skupine zaviralca OMP-18R5: akutno s koncentracijama 1,5 mg/L in 15 mg/L ter kronično s 15 mg/kg. Pri tem bomo akutno aktivator BHQ880 oziroma zaviralec OMP-18R5 dodajali 10 minut pred popolno ishemijo ter celotno reperfuzijo, za kronične učinke pa bomo podganam intraperitonealno dajali aktivator BHQ880 oziroma zaviralec OMP-18R5 štiri tedne in nato izvedli poskuse. Med vsakim poskusom bomo merili koronarni pretok, hitrost sproščanja LDH, moč kontrakcij levega ventrikla, frekvenco srčnih utripov ter trajanje aritmij; zadnji dve spremenljivki bomo odčitali iz elektrokardiograma (EKG). S pomočjo teh spremenljivk bomo poskušali ugotoviti akutne in kronične učinke aktivatorja BHQ880 oziroma zaviralca OMP-18R5 poti Wnt na I-R poškodbe in delovanje srca po MI.

V nalogi želimo preveriti naslednje hipoteze:

- Aktivator signalne poti Wnt BHQ880 ima zaščitne učinke na srce, ki se bodo pokazali kot manjša hitrost sproščanja LDH, manj aritmij ter ohranitev koronarnega pretoka, moči kontrakcij srca in frekvence.
- Zaviralec OMP-18R5 ima v različnih koncentracijah različne učinke, vendar se bodo I-R poškodbe v primerjavi z učinki aktivatorja BHQ880 poslabšale: hitrost sproščanja LDH bo večja, aritmij bo več, koronarni pretok, moč kontrakcij srca in frekvenca se bodo spremenile.
- Aktivator BHQ880 in zaviralec OMP-18R5 signalne poti Wnt akutno vplivata na nastanek in obseg I-R poškodb v izoliranih srcih, medtem ko je kronični učinek manjši.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. Poskusne živali

Za poskusne živali smo uporabili podgane tipa Wistar, vzrejene na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih številka 34401-14/2011/12 je izdala Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Vse podgane so bile moškega spola, stare 20-24 tednov in tehtale od 270 do 420 g. Podgane so imele konstantne pogoje za bivanje: klimatsko vzdrževanje temperature med 23 in 25 °C, tema in svetloba sta se menjali na 12 ur, na voljo so imele dovolj vode, hranjene so bile z briketi Altromin 1324 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Nemčija).

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

**Uretan** (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija): Za anestezijo podgan smo uporabili 20 % raztopino uretana in sicer 0,7 ml raztopine na 100 g telesne teže podgane. Uretan ali kemijsko etil karbamat je anestetik, ki ga v humani medicini ne uporabljamo več zaradi potencialne kancerogenosti; na podganah pa smo ga uporabili, ker ima minimalen vpliv na srce.

**Heparin** (Krka, Novo mesto, Slovenija; v obliki vial, ki vsebujejo po 5 ml raztopine, kar je 25000 i.e. natrijevega heparinata): Podganam smo tik pred izolacijo srca vbrizgali 0,3 ml heparina intraperitonealno (to je približno 1500 i.e. natrijevega heparinata) za preprečitev nastanka krvnih strdkov. Heparin je antitrombotik, sulfatni glukozaminoglikan, ki ima sposobnost vezave antitrombina III in ga na ta način aktivirati, ta pa se potem veže na koagulacijske dejavnike II, XII, XI, IX, X, jih inaktivira in prepreči pretvorbo protrombina v trombin.

**Raztopina Krebs-Henseleit (K-H raztopina):** Po izolaciji podganjih src smo le-te perfundirali s fiziološko raztopino K-H, ki smo jo pripravili iz naslednjih reagentov, raztopljenih v bidestilirani vodi:

118,5 mmol/L **NaCl** (Merck, Darmstadt, Nemčija), 4,7 mmol/L **KCl** (Merck, Darmsadt, Nemčija), 11,1 mmol/L **glukoze** (Kemika, Zagreb, Hrvaška), 25,0 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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmsadt, Nemčija) in 2,52 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  (Kemika, Zagreb, Hrvaška).

**Raztopina OMP-18R5** (OncoMed Pharmaceuticals, ZDA): OMP-18R5 ali vantiktumab je monoklonsko protitelo, ki ima sposobnost vezave na zunajcelično domeno 5 od 10 receptorjev Fzd-1, -2, -5, -7 in -8 in deluje kot zaviralec poti Wnt (45, 46, 47). Protitelo OMP-18R5 je bilo shranjeno v steklenički in sicer 100 mL raztopine v koncentraciji 10 mg/mL. Shranjevati ga je bilo potrebno v hladilniku pri temperaturi 2-8° C. Za pripravo raztopine OMP-18R5, ki smo jo dajali zadnjih 10 min perfuzije in celotno reperfuzijo, smo preračunali količino, ki smo jo iz stekleničke dali K-H raztopini, da smo dobili končno koncentracijo 1,5 mg/L oziroma 15 mg/L in sicer: 0,15 mL oziroma 1,5 mL raztopine OMP-18R5 v 1 l K-H.

**Raztopina BHQ880** (Novartis, Cambridge): BHQ880 je humano nevtralizirajoče IgG1 anti-Dkk-1 monoklonsko protitelo, ki deluje kot agonist kanonične poti Wnt (41, 42, 43, 44). BHQ880 je bil v viali v obliki liofilizata, ki ga je bilo potrebno shranjevati v hladilniku pri temperaturi 2-8° C. Za pripravo raztopine BHQ880, ki smo jo dajali zadnjih 10 min perfuzije in celotno reperfuzijo smo preračunali količino, ki smo jo iz vial dali K-H raztopini, da smo dobili končno koncentracijo 10 mg/L in sicer: liofilizatu smo dodali 5 mL bidestilirane vode in dobili raztopino s koncentracijo 20 mg/mL; od tega smo vzeli 0,5 mL in dali v 1 L K-H.

**LDH-reagent:** Reagent za določanje aktivnosti oziroma količine LDH v tkivu miokarda je bil sestavljen iz 9,7 mmol/L **piruvata** (Boehringer Mannheim, Nemčija) in 0,24 mmol/L **NADH** (Roche, Švica), ki smo ju raztopili v TRIS-pufri. LDH je encim, ki katalizira reakcijo redukcije piruvata do laktata. Pri tem se porablja NADH, ki absorbira UV-svetlobo in nastaja  $\text{NAD}^+$ , ki je ne absorbira. Na podlagi te encimske kinetične reakcije merimo padec absorbance in tako lahko posredno določimo aktivnost oziroma količino prisotne LDH v vzorcu.

**Karbogen** (Messer, Slovenija): Med poskusom smo s plinsko mešanico, sestave 95 %  $\text{O}_2$  in 5 %  $\text{CO}_2$  preprihovali K-H raztopino, ki je perfundirala srce.

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

- Male in velike kirurške pincete,

- škarje različnih velikosti,
- kirurška prijemalka,
- sukanec,
- kanila,
- steklovina: čaše, epruvete, bučke, merilni valji,
- injekcijske brizge,
- parafilm,
- nastavki za pipetiranje,
- polavtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska),
- tehtnica,
- aparatura po Langendorff-u (Laboratorij za eksperimentalno srčno-žilno farmakologijo, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana),
- srebrove elektrode (Ag/AgCl) s predojačevalnikom za merjenje EKG, 100x predojačitev signala (Dewetron, Slovenija),
- napetostni ojačevalniki DAQP-V (Dewetron, Slovenija),
- termostat LAUDA E 100 z grelcem in črpalko LAUDA ecoline 003 (Lauda dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Nemčija),
- tlačna kateterska sonda MILLAR Micro-tip SPR-524 (Millar Instruments, Inc., ZDA) in kontrolna enota tlačne sonde MILLAR PCU 2000 (Millar Instruments, Inc., ZDA),
- analogno digitalni (AD) pretvornik PCI-6013, 200 K-Hz, 16 bit (National Instruments, ZDA),
- spektrofotometer (Eon-One Chemistry analyser, Vital diagnostics, Italija),
- osebni računalnik,
- programska oprema GraphPad Prism 6.00 za Windows (GraphPad Software, ZDA),
- programska oprema Dewesoft 6.6.7. (Dewetron, Slovenija).

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

Pred izolacijo smo podgani intraperitonealno vbrizgali anestetik 20 % uretan, količino smo preračunali glede na telesno težo podgane; tik pred samo izolacijo pa še 0,3 ml heparina proti strjevanju krvi. Ko smo se prepričali, da je podgana v globoki komi (odsotnost kornealnega refleksa), smo ji odprli prsni koš in takoj začeli s hlajenjem srca z ohlajeno K-

H, da smo umirili hitro bitje srca. Nato smo prerezali aorto in vanjo vstavili kanilo, napolnjeno z K-H raztopino. Po odstranitvi srca iz podgane smo ga namestili na aparaturu po Langendorff-u, v levi ventrikel smo vstavili Millarjevo tlačno sondo, ki je merila moč kontrakcij levega ventrikla, na srce v smeri električne osi srca pa namestili še dve srebrovi elektrodi, ki sta merili EKG. Srce je bilo pred zunanjimi vplivi zaščiteno z ogrevanim steklenim plaščem in parafilmom. Raztopino K-H in raztopino K-H z dodano substanco smo ves čas poskusa vzdrževali pri 38 °C. Čas od prereza diafragme do namestitve srca na aparaturu po Langendorff-u je bil okoli 2 min oziroma čim hitrejši, da smo se izognili prevelikim poškodbam zaradi same izolacije srce.

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

Takoj ko smo srce namestili na aparaturu po Langendorff-u, smo ga začeli perfundirati s K-H raztopino, v katero smo uvajali zrak (mešanico 95 % O<sub>2</sub> in 5 % CO<sub>2</sub>). Ko smo namestili še sondo in obe elektrodi, smo začeli s 130-minutnim poskusom: 30 minut perfuzije, 40 minut ishemije in 60 minut reperfuzije. Kontrolo in kronične poskuse smo izvajali s 30 minut perfuzije z oksigenirano in termostatirano K-H raztopino, nato smo ustvarili ishemijo in za 40 minut popolnoma prekinili pretok hranil in kisika, na koncu pa smo 60 minut srce ponovno perfundirali z isto raztopino kot pri 30-minutni perfuziji na začetku. V primeru K-H raztopine z dodanim BHQ880 oziroma OMP-18R5 pa smo srce perfundirali 20 min z oksigenirano in termostatirano K-H raztopino, nato pa 10 min z oksigenirano in termostatirano K-H raztopino z dodanim BHQ880 oziroma OMP-18R5. Sledila je 40 minutna ishemija in nato 60 min reperfuzije z isto raztopino kot zadnjih 10 min začetne perfuzije.

#### **3.4.2. Tretiranje podgan v poskusih za določitev kroničnega učinka**

Pri teh poskusih smo imeli tri skupine: kontrolno, ki ji nismo dajali ničesar, skupino aktivatorja BHQ880, ki smo ji trikrat tedensko dajali 10 mg/kg BHQ880 intraperitonealno in skupino zaviralca OMP-18R5, ki smo ji dvakrat tedensko dajali 15 mg/kg OMP-18R5 intraperitonealno. Živali smo tretirali štiri tedne z aktivatorjem BHQ880 oziroma zaviralcem OMP-18R5 in natančno po enem dnevu od zadnjega odmerka naredili poskuse, ki smo jih izvedli enako kot pri kontrolni skupini.

### 3.4.3. Merjene spremenljivk

Med poskusom smo merili različne spremenljivke v točno določenih časovnih točkah: koronarni pretok, hitrost sproščanja LDH, moč kontrakcij levega ventrikla in EKG, iz katerega smo odčitali frekvenco srca ter odčitali in sešteli čas trajanja štirih vrst aritmij.

- **Koronarni pretok:** S pomočjo kanile, vstavljene v aorto, smo perfundirali srce s K-H raztopino. Kanila je segala nad semilunarno zaklopko, kjer se nahajajo vhodi v koronarne arterije, zato smo perfundirali srce skozi koronarke. K-H raztopina je tekla skozi desno in levo koronarko v desni atrij, potem pa jo je srce iztisnilo skozi prerezane žile in to perfuzijsko tekočino smo lovili v merilno epruveto v točno določenih časovnih točkah. Koronarni pretok smo izrazili v mL/min.
- **Hitrost sproščanja LDH:** Od vsake perfuzijske tekočine, ki smo jo odvzeli v točno določenih časovnih točkah, smo odpipetirali 50  $\mu$ L in jih dodali k 800  $\mu$ L LDH-reagenta. Zmes smo mešali ročno in po točno 20 s izmerili absorbanco pri valovni dolžini 340 nm, s čimer smo določili porabo NADH. Na ta način smo posredno določili aktivnost encima LDH v vzorcu. Hitrost sproščanja LDH smo izrazili v  $\mu$ kat  $g^{-1} min^{-1}$ . En katal (kat) predstavlja količino encima, ki pretvori 1 mol substrata v produkt v 1 sekundi.
- **Moč kontrakcij levega ventrikla** je merila Millarjeva tlačna kateterska sonda, ki smo jo vstavili preko levega atrija in mitralne zaklopke v levi ventrikel. Sonda MILLAR Micro-tip SPR-524 je bila priklopljena na ojačevalnik preko Millarjeve kontrolne enote in je merila razliko med diastolnim in sistolnim tlakom s frekvenco 500 Hz. Ojačane signale smo preko analogno-digitalnega pretvornika ves čas poskusa shranjevali na računalnik preko programske opreme Dewesoft. Moč kontrakcij smo izrazili kot spremembo tlaka v levem ventriklu v mm živega srebra (mm Hg).
- **Elektrokardiogram (EKG)** smo snemali s srebrovimi (Ag/AgCl) elektrodami, ki smo jih namestili na srce v smeri električne osi. Signal smo 100x ojačili s predojačevalnikom (Dewetron, Slovenija) in nato s pomočjo ojačevalnika DAQP-V (Dewetron, Avstrija) in analogno-digitalnega pretvornika podatke shranjevali na računalnik. Iz EKG-ja smo odčitali frekvenco srca in štiri vrste aritmij.
- **Frekvenco srčnih utripov** smo odčitali iz EKG-ja v istih časovnih točkah, kot smo zbirali perfuzijsko tekočino za merjenje koronarnega pretoka in LDH. V primeru



aritmij v teh časovnih točkah, frekvence nismo mogli odčitati. Izrazili smo jo v številnih utripov na minuto.

- **Aritmija** ali motnja srčnega ritma je vsaka sprememba srčnega ritma, ki ni normalen sinusni ritem med 60 in 100 utripi/min. Aritmije smo odčitavali tekom celotnega trajanja poskusa in izrazili trajanje posamezne vrste aritmije v sekundah (s). Določali smo štiri različne vrste aritmij.

**Asistolija** je stanje brez električne aktivnosti srca, srčna frekvenca je nič, na elektrokardiogramu vidimo ravno črto. **Ekstrasistole** ali **ventrikularni prezgodnji utripi** so prezgodnje kontrakcije ventrikla, ki jih prepoznamo po prezgodnjih kompleksih QRS glede na val P. **Ventrikularna fibrilacija** (VF) je stanje, kjer ne moremo ločiti posameznih kompleksov QRS in zato tudi ne moremo določiti frekvence. **Ventrikularna tahikardija** (VT) je nenormalno hiter ritem srca s širokimi kompleksi QRS. Pri človeškem srcu je to več kot 150 utripov/min, pri podganjem srcu pa 500-600 utripov/min.

### 3.5. Obdelava podatkov

Z računalniškim programom GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software, ZDA) smo dobljene podatke statistično in grafično obdelali. Rezultate pri vsaki posamezni skupini smo povprečili in jih izrazili kot aritmetične sredine s standardnimi napakami ocen aritmetičnih sredin (SEM). Izračunali smo tudi površine pod krivuljo (AUC, ang. area under the curve) ter s pomočjo enofaktorske in dvofaktorske analize variance (one-way in two-way ANOVA) in Bonfferonijevim post-hoc testom primerjali skupine med seboj. Med primerjanjem rezultatov je statistično značilno razliko predstavljala vrednost  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

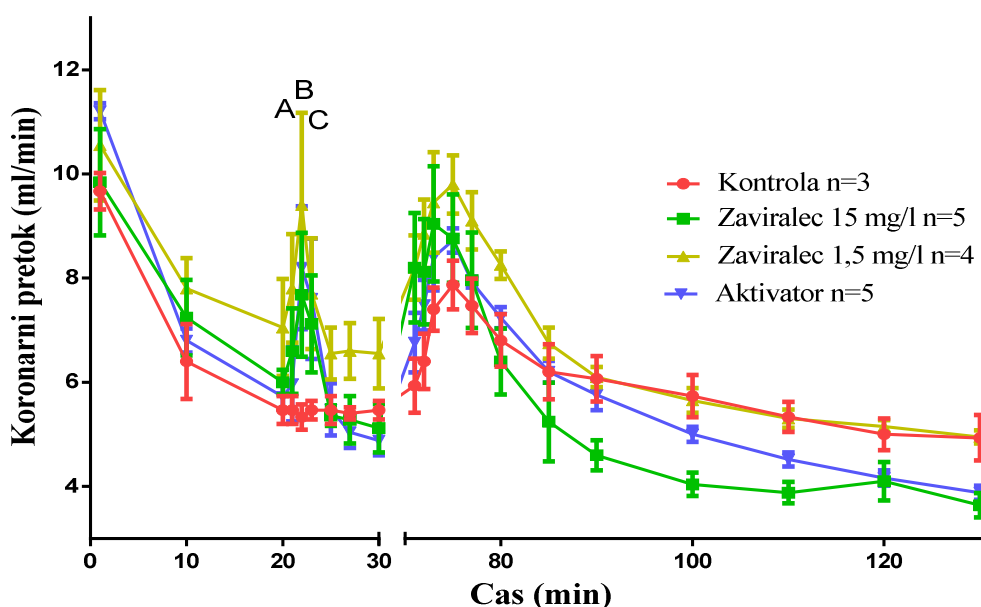
Srca podgan smo po njihovi izolaciji tretirali z aktivatorjem signalne poti Wnt BHQ880 akutno v koncentraciji 10 mg/L in kronično v koncentraciji 10 mg/kg ter z zaviralcem signalne poti Wnt OMP-18R5 v akutnih koncentracijah 1,5 mg/L in 15 mg/L ter kronični koncentraciji 15 mg/kg. Pri poskusih smo za določanje akutnih učinkov uporabili od tri do pet živali, za določanje kroničnih učinkov pa od štiri do šest živali. Posamezen poskus je trajal 130 minut in v tem času smo v določenih časovnih točkah merili spremenljivke: koronarni pretok, hitrost sproščanja LDH, moč kontrakcij levega ventrikla, frekvenco srčnih utripov in čas trajanja aritmij. Poskus se je začel takoj po izolaciji, ko smo srce perfundirali z oksigenirano K-H raztopino 30 minut, da se je umirilo in stabiliziralo. Pri akutno tretiranih skupinah smo zadnjih 10 minut perfuzije dodajali oksigenirano K-H raztopino z dodanim aktivatorjem BHQ880 oziroma zaviralcem OMP-18R5, pri kronično tretiranih skupinah in kontroli pa smo nadaljevali z oksigenirano K-H raztopino. Nato smo pri vseh skupinah za 40 minut prekinili perfuzijo z oksigenirano K-H raztopino, ustvarili smo popolno ishemijo. Le-tej je sledilo 60 minut reperfuzije, pri kroničnih poskusih in kontroli je bila reperfuzija z oksigenirano K-H raztopino, pri akutnih pa z oksigenirano K-H raztopino z dodanim aktivatorjem BHQ880 oziroma zaviralcem OMP-18R5. Kronično tretiranim skupinam smo aktivator BHQ880 oziroma zaviralec OMP-18R5 dajali štiri tedne in po enem dnevu od zadnjega odmerka izvedli poskuse.

### **4.1. Koronarni pretok po dodajanju modulatorjev poti Wnt**

#### **4.1.1. Koronarni pretok pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt**

Pri poskusih za oceno akutnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt je bil koronarni pretok do 20. minute pri vseh štirih skupinah zelo podoben, na začetku višji, potem se je stabiliziral. Pri 21. minuti je prišlo do dviga pretoka pri vseh treh tretiranih skupinah, vrh je bil pri 23. minuti, pri 25. minuti pa se je pretok ponovno normaliziral. Dvig je bil pri vseh treh skupinah zelo podoben. Ker pri kontrolni skupini tega dviga ni bilo, so se pojavile statistično značilne razlike med kontrolno skupino in skupinami aktivatorja BHQ880 ter obeh koncentracij zaviralca OMP-18R5 v 22. minuti (slika 5: na grafu točke A, B, C). Po ishemiji, v času reperfuzije, je pretok do 73. minute pri vseh skupinah narastel. Vrednost pretoka je bila pri vseh treh tretiranih skupinah višja od kontrolne vrednosti, najvišja je bila vrednost skupine zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L. Po 75. minuti je začel pretok upadati, po

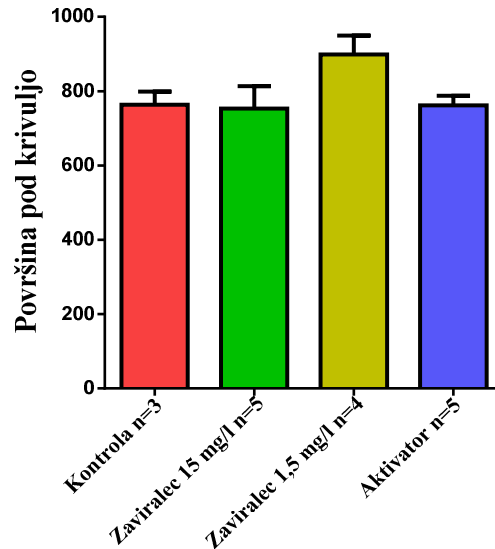
80. minuti je bil upad vedno bolj položen. Po 85. minuti sta bili vrednosti pretoka v skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 15 mg/L pod kontrolnim pretokom, najnižje je bila vrednost v skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L, vrednost pretoka v skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L pa je bila skoraj enaka kot kontrolna vrednost. Vrednosti pretoka vseh skupin so si bile precej podobne, zato med njimi niso nastale statistično značilne razlike, kar kaže tudi graf površine pod krivuljo koronarnega pretoka (slika 6).



**Slika 5:** Koronarni pretok (mL/min) izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

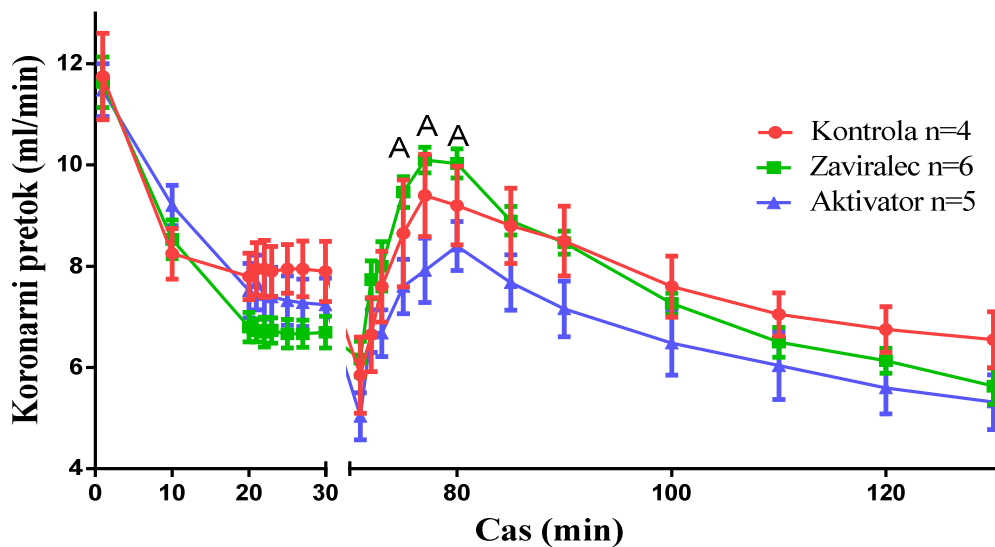
A = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 15 mg/L. B = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 1,5 mg/L. C = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino aktivatorja.



**Slika 6:** Površina pod krivuljo (AUC) koronarnega pretoka izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

#### 4.1.2. Koronarni pretok pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt

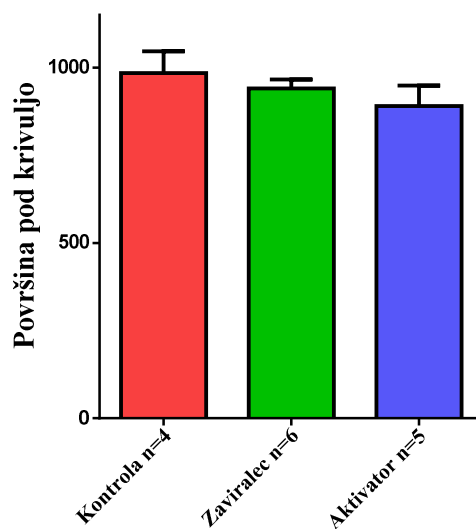
Pri poskusih za oceno kroničnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt je bil koronarni pretok pred ishemijo pri vseh treh skupinah zelo podoben. Na začetku je bil visok, tekom perfuzije pa se je stabiliziral. V času reperfuzije je bil pretok vseh treh skupin takoj po ishemiji nižji kot pred njo, nato je začel postopoma naraščati do 77. minute in v 80. minuti upadati. Najvišja je bila vrednost pretoka v skupini zaviralca OMP-18R5, najnižja pa v skupini aktivatorja BHQ880. Do konca kroničnega poskusa so vrednosti pretoka vseh treh skupin postopoma upadale, po 100. minuti je bila najvišja vrednost v kontrolni skupini, najnižja pa v skupini aktivatorja BHQ880. Ker pa je bil pretok tekom celotnega poskusa med vsemi tremi skupinami zelo podoben, med njimi ni bilo statistično značilnih razlik, kar kaže tudi graf površine pod krivuljo koronarnega pretoka (slika 8).



**Slika 7:** Koronarni pretok (mL/min) izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

A = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino aktivatorja in skupino zaviralca.

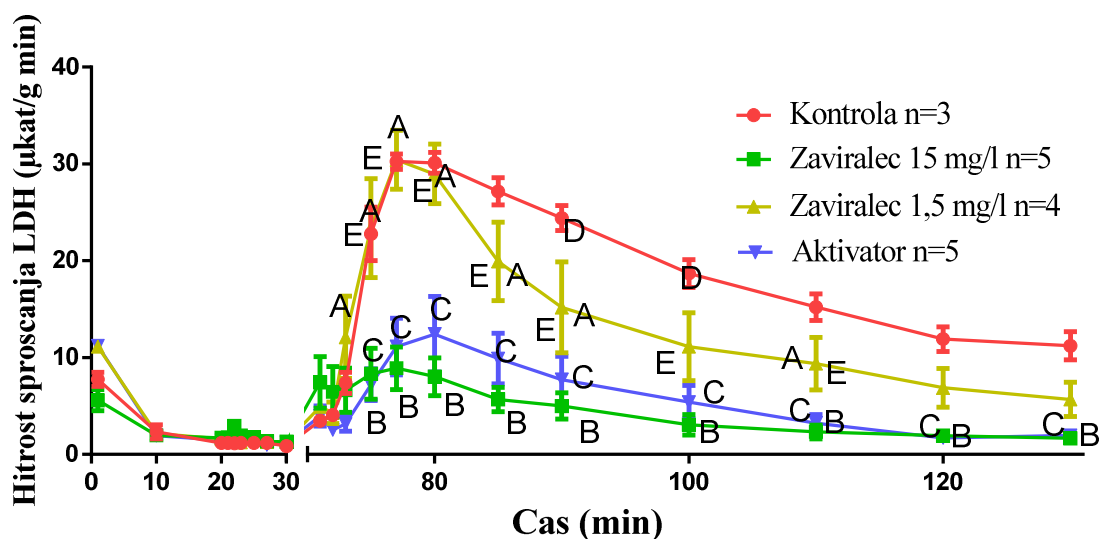


**Slika 8:** Površina pod krivuljo (AUC) koronarnega pretoka izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

## 4.2. Hitrost sproščanja LDH po dodajanju modulatorjev poti Wnt

### 4.2.1. Hitrost sproščanja LDH pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt

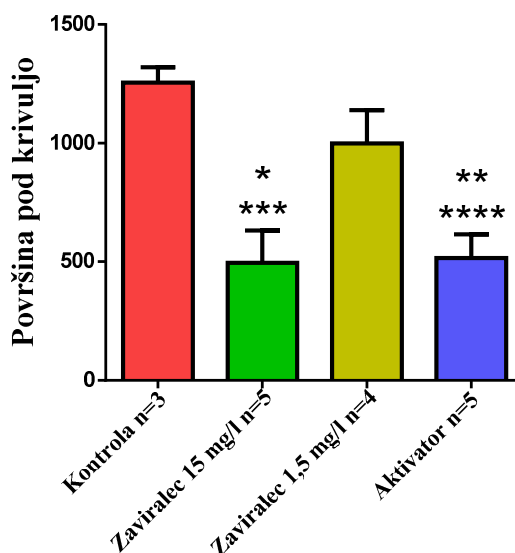
Vrednosti LDH so bile pri vseh štirih skupinah v času ishemije skoraj enake, na začetku perfuzije višje, nato so upadle. Po ishemiji, v času reperfuzije pa so se vrednosti LDH razlikovale (slika 9: na grafu točke A, B, C, D in E). Najvišje so bile vrednosti LDH v kontrolni skupini in skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in sicer so dosegle vrh pri 77. minuti, potem pa so se po 80. minuti vrednost LDH skupine zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L začele spuščati pod vrednost kontrolne skupine in bile nižje vse do konca poskusa. Vrednost LDH v skupini aktivatorja BHQ880 je bila ves čas precej pod kontrolnimi vrednostmi, vrh je dosegla pri 80. minuti in nato upadala do konca poskusa. Zaviralec OMP-18R5 15 mg/L pa je najbolj znižal LDH vrednost; ta je bila ves čas nizka, majhen vrh je bil pri 77. minuti. Graf površine pod krivuljo hitrosti sproščanja LDH kaže, da so statistično značilne razlike nastale med kontrolno skupino in skupino zaviralca OMP-18R5 15 mg/L, kontrolno skupino in skupino aktivatorja BHQ880, skupino zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in skupino zaviralca OMP-18R5 15 mg/L ter skupino zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in skupino aktivatorja BHQ880 (slika 10).



**Slika 9:** Hitrost sproščanja LDH ( $\mu\text{kat/g min}$ ) iz izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

A = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino aktivatorja in skupino zaviralca 1,5 mg/L. B = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 15 mg/L. C = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino aktivatorja. D = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 1,5 mg/L. E = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino zaviralca 1,5 mg/L in skupino zaviralca 15 mg/L.



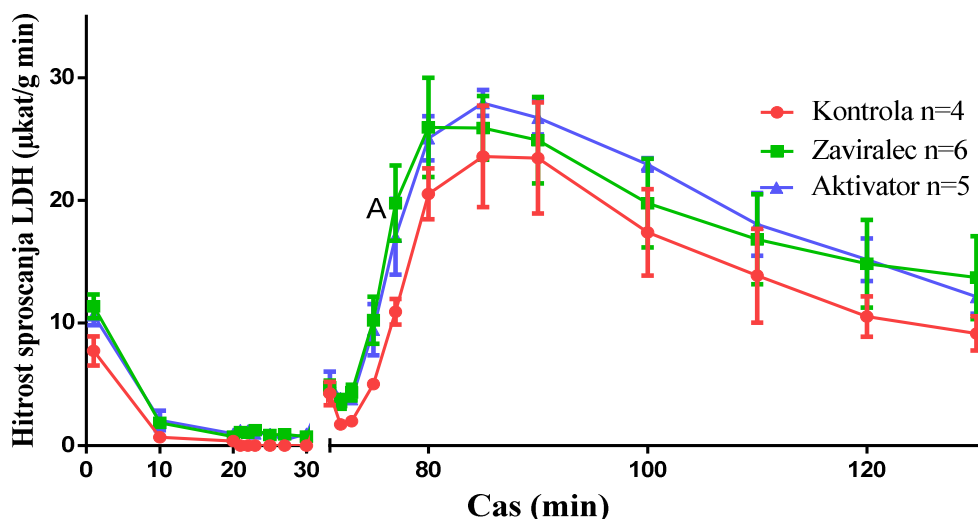
**Slika 10:** Površina pod krivuljo (AUC) hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 15 mg/L. \*\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino aktivatorja. \*\*\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino zaviralca 1,5 mg/L in skupino zaviralca 15 mg/L. \*\*\*\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino aktivatorja in skupino zaviralca 1,5 mg.

#### 4.2.2. Hitrost sproščanja LDH pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt

Pri poskusih za oceno kroničnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt so bile vrednosti hitrosti sproščanja LDH pri vseh treh skupinah v času ishemije skoraj enake, na začetku prav tako višje in so nato upadle. Po ishemiji, v času reperfuzije pa so vrednosti hitrosti sproščanja LDH močno narasle pri vseh treh skupinah. Vrh je bil v 85. minuti, nato pa upad vrednosti do konca poskusa. V 77. minuti se je pojavila statistično značilna razlika med kontrolno skupino in skupino zaviralca OMP-18R5 (slika 11: na grafu točka A).

Vrednosti LDH v kontrolni skupini so bile ves čas pod vrednostmi v skupinah zaviralca OMP-18R5 in aktivatorja BHQ880. Do 80. minute je bila LDH v skupinah zaviralca OMP-18R5 in aktivatorja BHQ880 skoraj enaka, potem pa je bil LDH v skupini zaviralca OMP-18R5 nižji. Zaradi velike podobnosti vrednosti hitrosti sproščanja LDH ni nastalo nič statistično značilnih razlik, kar kaže tudi graf površine pod krivuljo hitrosti sproščanja LDH (slika 12).

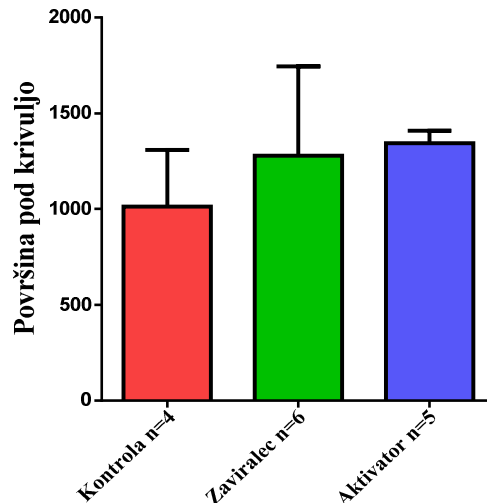


**Slika 11:** Hitrost sproščanja LDH ( $\mu\text{kat/g min}$ ) iz izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

A = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca.





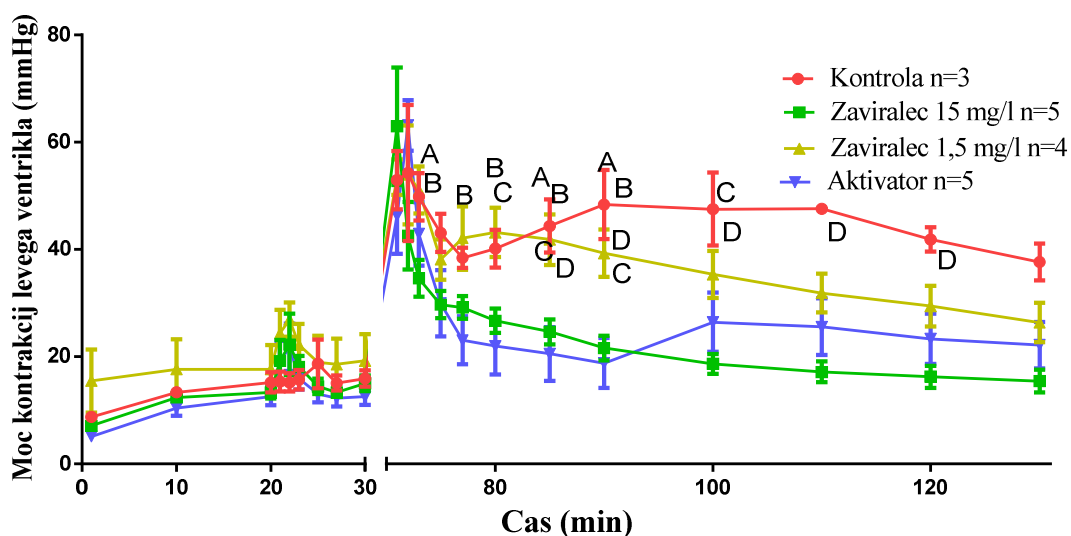
**Slika 12:** Površina pod krivuljo (AUC) hitrosti sproščanja LDH iz izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

### 4.3. Moč kontrakcij levega ventrikla po dodajanju modulatorjev poti Wnt

#### 4.3.1. Moč kontrakcij levega ventrikla pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt

Moč kontrakcij je bila do 20. minute pri vseh štirih skupinah precej podobna in se je gibala od 5 do 20 mm Hg. Razlika se je pojavila pri 21. minuti, in sicer se je moč kontrakcij ob dodatku aktivatorja BHQ880 in obeh koncentracij zaviralca OMP-18R5 nekoliko dvignila do 25. minute, kjer se je spet normalizirala. Pri kontrolni skupini tega dviga ni bilo opaziti. Na začetku reperfuzije, v 71. minuti, je moč kontrakcij pri vseh skupinah močno narasla, najbolj pri skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L. Pri tej skupini je nato moč kontrakcij strmo upadala do 80. minute in je bila po 85. minuti najnižja od vseh. Moč kontrakcij v skupini aktivatorja BHQ880 je imela vrh v 72. minuti in potem do 77. minute strmo upadala; med 75. in 85. minuto je bila celo nižja v primerjavi s skupino zaviralca OMP-18R5 15 mg/L, po 90. minuti pa se je nekoliko dvignila nad njegovo vrednost. Skupina zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L je imela vrh vrednosti moči kontrakcij v 72. minuti, vrednosti so nato padle do 75. minute podobno kot pri kontrolni skupini, nato so se stabilizirale in bile nižje od kontrolnih. Kontrolna skupina je imela vrh v 72. minuti, padala do 77. minute, se rahlo dvigala do 90. minute in bila do konca poskusa najvišje od vseh skupin. Statistično značilne razlike so med skupinami pojavile med 73. in 120. minuto

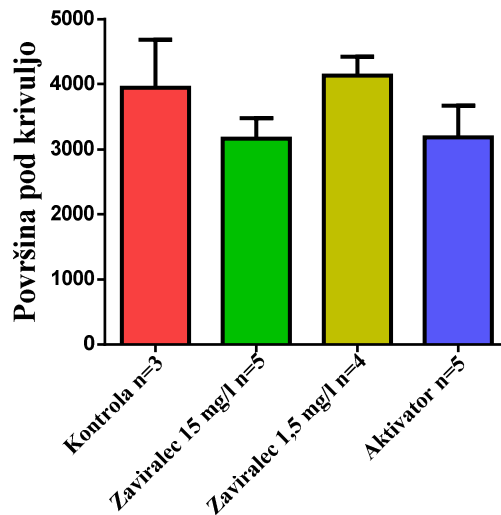
(slika 13: na grafu točke A, B, C in D). Graf AUC moči kontrakcij značilnih razlik med posameznimi skupinami sicer ne pokaže (slika 14), a na grafu posameznih vrednosti moči kontrakcij skupin (slika 13) lahko vidimo veliko značilnih razlik.



**Slika 13:** Moč kontrakcij levega ventrikla (mm Hg) izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

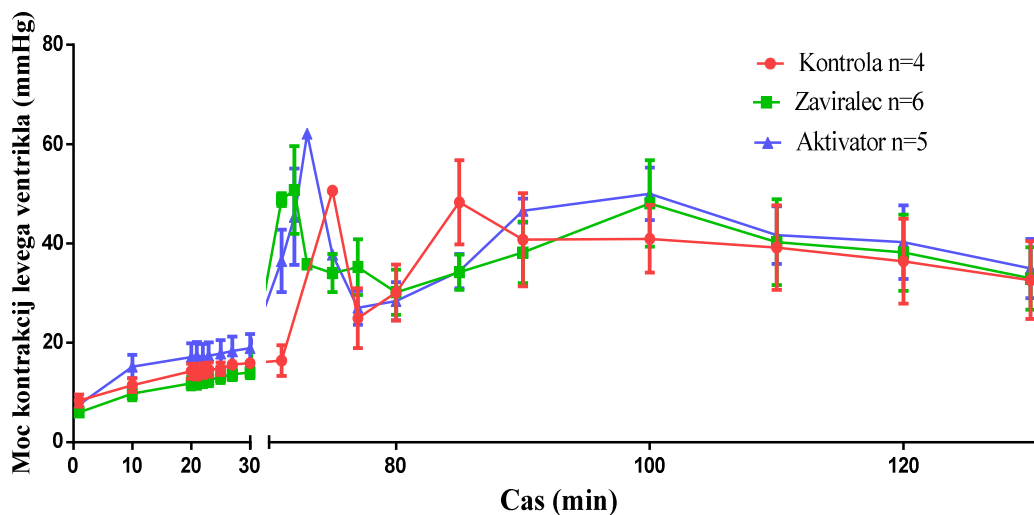
A = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino zaviralca 1,5 mg/L in skupino zaviralca 15 mg/L. B = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med skupino zaviralca 1,5 mg/L in skupino aktivatorja. C = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino aktivatorja. D = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 15 mg/L.



**Slika 14:** Površina pod krivuljo (AUC) moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

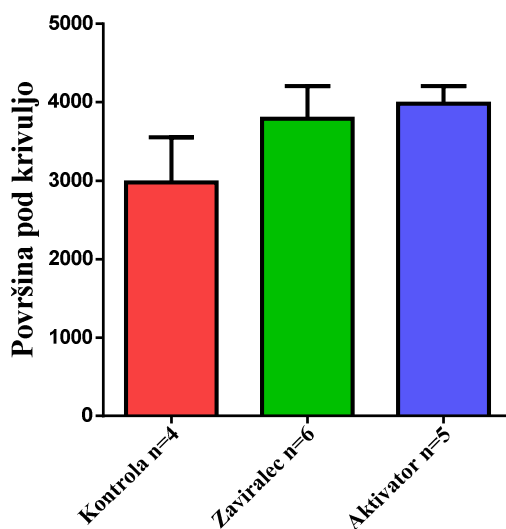
#### 4.3.2. Moč kontrakcij levega ventrikla pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt

Pri poskusih za oceno kroničnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt je bila vrednost moči kontrakcij vseh treh skupin pred ishemijo precej podobna; na začetku nekoliko nižja, potem se je zvišala. Po ishemiji je bila moč kontrakcij kontrolne skupine v 71. minuti enaka kot pred ishemijo, v 75. minuti se je močno dvignila in v 77. spet spustila. V 85. minuti je imela še en vrh in se potem tekom poskusa stabilizirala in gibala okoli 40 mm Hg, bila je nižja od vrednosti v skupinah zaviralca OMP-18R5 in aktivatorja BHQ880, a višja kot pred ishemijo. Vrednosti moči kontrakcij v skupinah zaviralca OMP-18R5 in aktivatorja BHQ880 so bile takoj po ishemiji višje kot pred ishemijo. Pri skupini zaviralca OMP-18R5 je imela moč kontrakcij vrh v 72. minuti, potem upadla in nihala okoli 40 mm Hg do konca poskusa; vrednost je bila med kontrolno vrednostjo in vrednostjo v skupini aktivatorja BHQ880. Moč kontrakcij v skupini aktivatorja BHQ880 pa je imela vrh pri 73. minuti, v 77. je močno upadla in do 90. spet narasla, potem pa do konca poskusa postopoma upadala. Po 90. minuti je imela moč kontrakcij v skupini aktivatorja BHQ880 najvišjo vrednost. Statistično značilnih razlik med skupinami ni bilo, kar kaže graf površin pod krivuljo moči kontrakcij (slika 16). Nekatere vrednosti med 71. in 80. minuto niso bile zabeležene, ker so bile tam prisotne aritmije.



**Slika 15:** Moč kontrakcij levega ventrikla (mm Hg) izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).

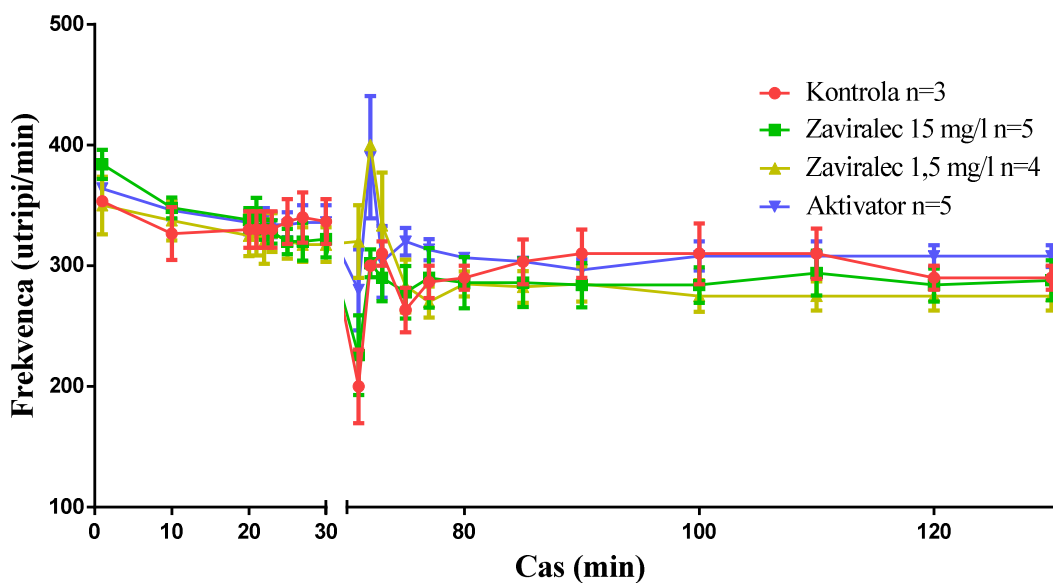


**Slika 16:** Površina pod krivuljo (AUC) moči kontrakcij levega ventrikla izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

## 4.4. Frekvenca srčnih utripov po dodajanju modulatorjev poti Wnt

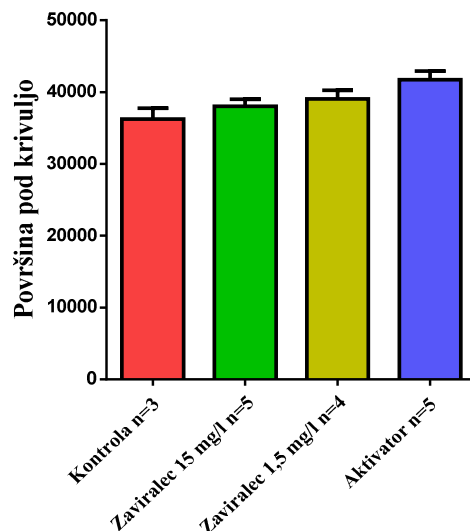
### 4.4.1. Frekvenca srčnih utripov pri akutnih učinkih modulatorjev poti Wnt

Pri poskusih za oceno akutnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt je bila v času pred ishemijo frekvenca srčnih utripov vseh štirih skupin precej podobna in se je gibalala med 300 in 400 utripi/min; na začetku perfuzije je bila nekoliko višja, potem se je rahlo zmanjšala. Po ishemiji, v času reperfuzije, so bila med 71. in 80. minuto opazna nihanja frekvenc in sicer so bile takoj po ishemiji frekvence nižje kot pred ishemijo v vseh skupinah. V 72. minuti sta se frekvenci v skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L dvignili do 400 utripov/min, pri kontrolni skupini in skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L pa do 300 utripov/min. Nato je pri vseh skupinah frekvenca spet rahlo upadla, se do 80. minute stabilizirala in do konca akutnega poskusa gibala okoli 300 utripov/min pri vseh skupinah. Najvišje sta bili frekvenci v skupinah aktivatorja BHQ880 in kontrole, nekje vmes je bila frekvenca v skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L, najnižje pa v skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L. Razlike med skupinami so bile, a ne statistično značilne, kar dokazuje graf površin pod krivuljo frekvence srca (slika 18).



**Slika 17:** Frekvenca srčnih utripov izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

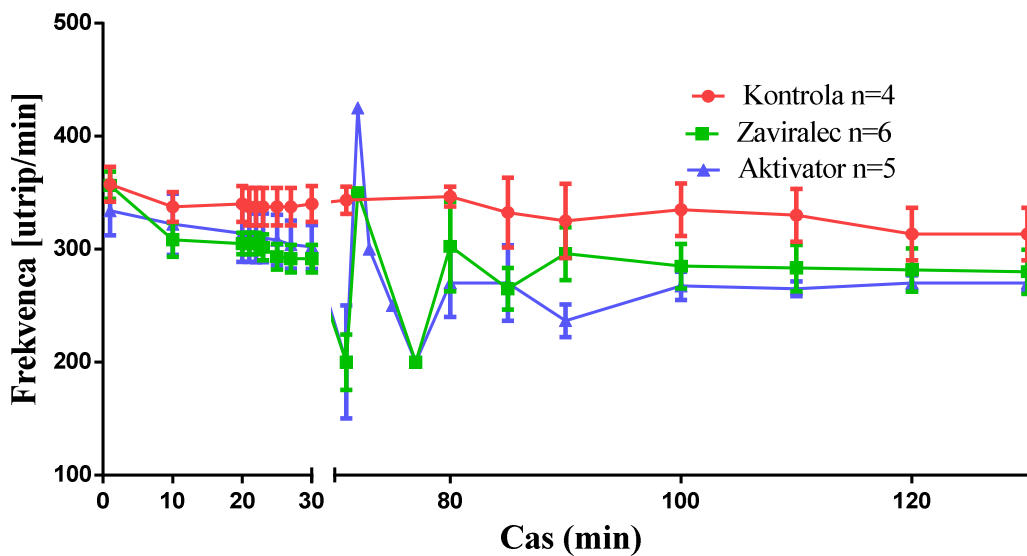
Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).



**Slika 18:** Površina pod krivuljo (AUC) frekvence srčnih utripov izoliranih podganjih src pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

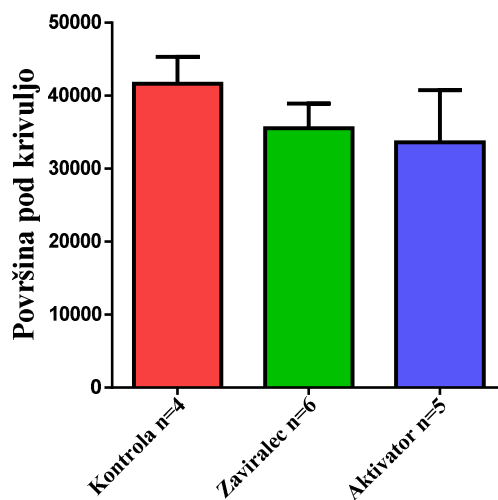
#### 4.4.2. Frekvenca srčnih utripov pri kroničnih učinkih modulatorjev poti Wnt

Pri poskusih za oceno kroničnih učinkov izbranih modulatorjev poti Wnt so bile frekvence pred ishemijo prav tako precej podobne, gibale so se med 300 in 400 utripi/min. Frekvenci v skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 sta bili nižji od frekvence kontrole. Po ishemiji se frekvenca kontrolne skupine skoraj ni spreminjala, vrednosti med 71. in 80. minuto niso bile zabeležene, ker so bile tam prisotne aritmije. Frekvenci v skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 pa sta do 85. minute precej nihali: v 71. minuti sta upadli na 200 utripov/min, v 72. minuti sta se dvignili do 350 oziroma 400 utripov/min, se v 77. minuti spet spustili in nekje do 85. minute normalizirali. Do konca poskusa sta bili frekvenci v skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 nižji od kontrole, najnižje je bila frekvenca v skupini aktivatorja BHQ880. A ker razlike med njimi niso bile velike, tudi niso bile statistično značilne (slika 20).



**Slika 19:** Frekvenca srčnih utripov izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

Vrednosti predstavljajo aritmetične sredine posamezne skupine skupaj s standardno napako ocen aritmetičnih sredin (SEM).



**Slika 20:** Površina pod krivuljo (AUC) frekvence srčnih utripov izoliranih podganjih src pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

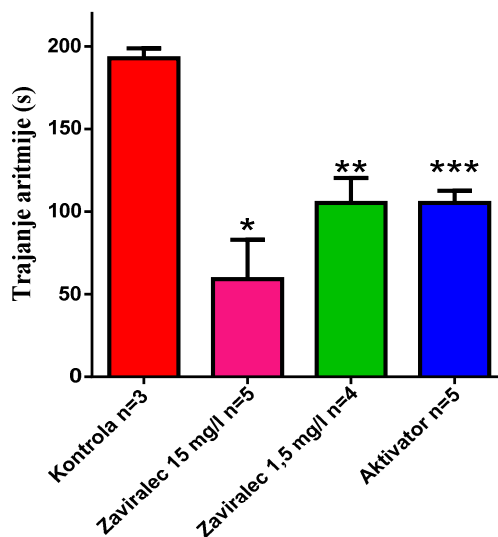
## 4.5. Aritmije po dodajanju modulatorjev poti Wnt

Iz EKG, ki smo ga merili tekom celotnega poskusa, smo določili trajanje štirih vrst aritmij, in sicer asistolije, ekstrasistole ali ventrikularnega prezgodnjega utripa, ventrikularne fibrilacije (VF), ventrikularne tahikardije (VT), ter trajanje vseh vrst aritmij skupaj. Za vsako skupino posebej smo izrazili trajanje v sekundah (s). Asistolije tekom poskusov nismo opazili.

### 4.5.1. Trajanje ekstrasistol ali ventrikularnih prezgodnjih utripov

Pri akutnih učinkih izbranih modulatorjev je bil čas trajanja ekstrasistol najdaljši v kontrolni skupini, najkrajši pa v skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L. Ekstrasistole pri skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L so trajale podobno dolgo. Pojavile so se statistično značilne razlike med kontrolno in vsemi tremi tretiranimi skupinami.

Pri kroničnih učinkih izbranih modulatorjev med trajanji ekstrasistol ni nastalo značilnih razlik. Najdlje so ekstrasistole trajale pri skupini aktivatorja BHQ880, najkrajše pa so bile pri skupini zaviralca OMP-18R5, a razlike niso bile velike.

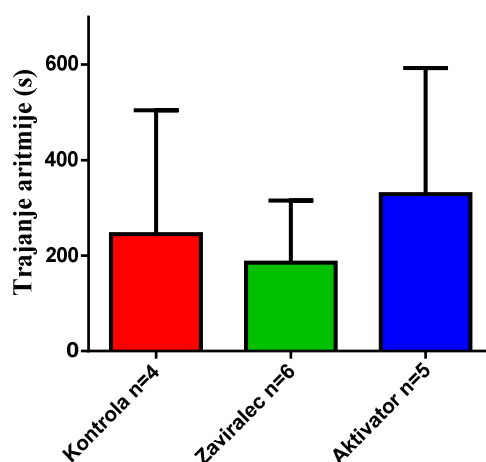


**Slika 21:** Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino zaviralca 15 mg/L. \*\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino



zaviralca 1,5 mg/L. \*\*\* = Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) med kontrolno skupino in skupino aktivatorja.

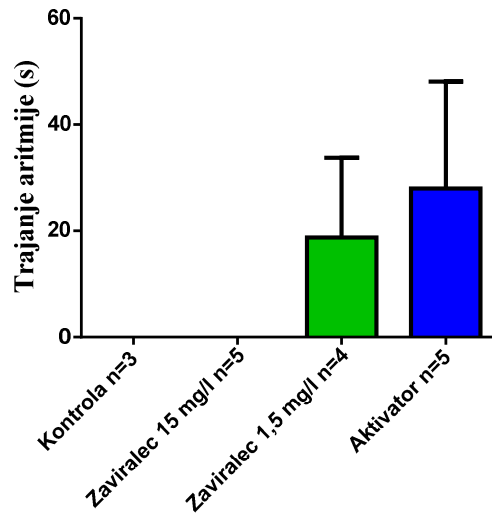


**Slika 22:** Graf trajanja ekstrasistol pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

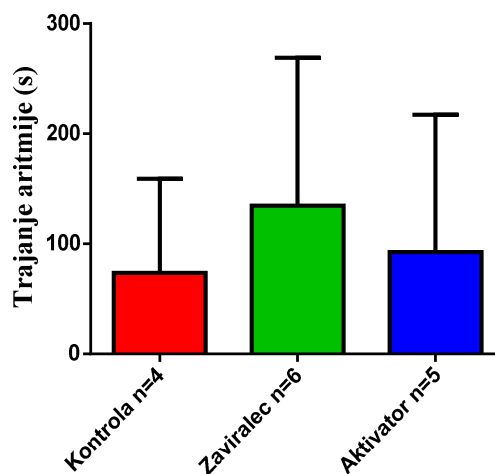
#### 4.5.2. Trajanje ventrikularnih fibrilacij

VF pri akutnih učinkih izbranih modulatorjev so bile prisotne le pri skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L, najdaljše so bile pri aktivatorju BHQ880. Program nam značilnih razlik med skupinami sicer ni pokazal, a je že dovolj velik pokazatelj razlik dejstvo, da pri kontrolni skupini in skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L VF sploh ni bilo.

Pri kroničnih učinkih izbranih modulatorjev so bile VF prisotne pri vseh skupinah, a razlike med skupinami so bile majhne. Najdlje so trajale pri skupini zaviralca OMP-18R5, pri kontrolni in skupini aktivatorja BHQ880 pa so trajale malo manj. Značilnih razlik med skupinami ni bilo prisotnih.



**Slika 23:** Graf trajanja VF pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.

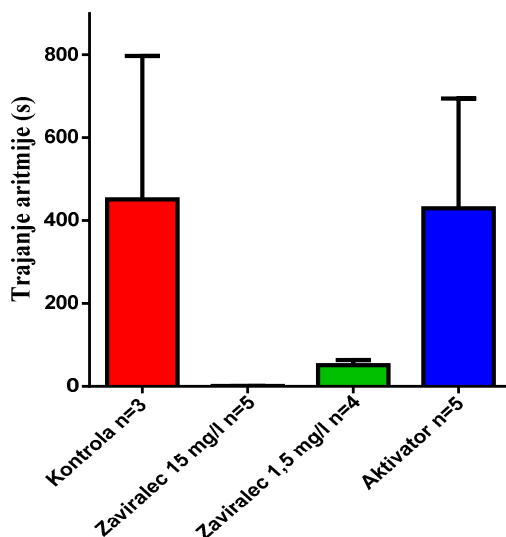


**Slika 24:** Graf trajanja VF pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

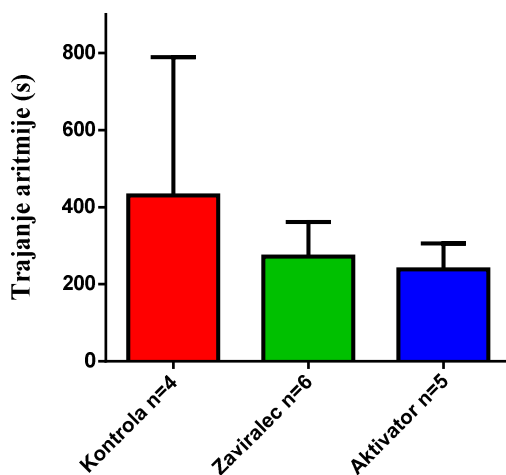
#### 4.5.3. Trajanje ventrikularnih tahikardij

VT so bile pri akutnih učinkih izbranih modulatorjev najdaljše pri kontrolni skupini in skupini aktivatorja BHQ880, pri skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L jih je bilo malo, pri skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L pa skoraj nič. Program nam značilnih razlik sicer ni pokazal, a na grafu (slika 25) vidimo precej velike razlike med skupinami.

Pri kroničnih učinkih izbranih modulatorjev ni bilo značilnih razlik med skupinami. VT so bile najdaljše pri kontrolni skupini, skupina zaviralca OMP-18R5 je imela VT krajše od kontrolne skupine, skupina aktivatorja BHQ880 pa najkrajše.



**Slika 25:** Graf trajanja VT pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.



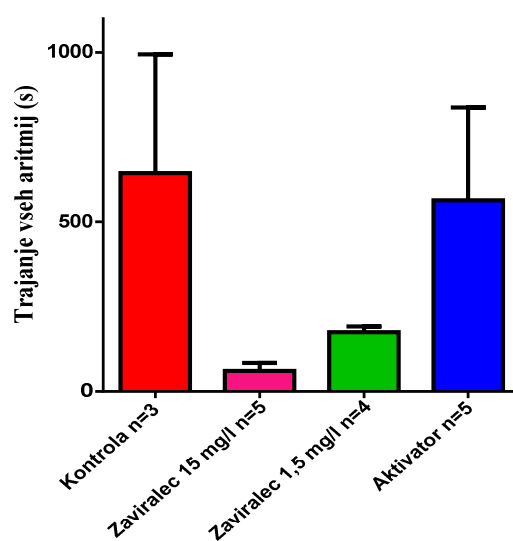
**Slika 26:** Graf trajanja VT pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

#### 4.5.4. Trajanje vseh aritmij skupaj

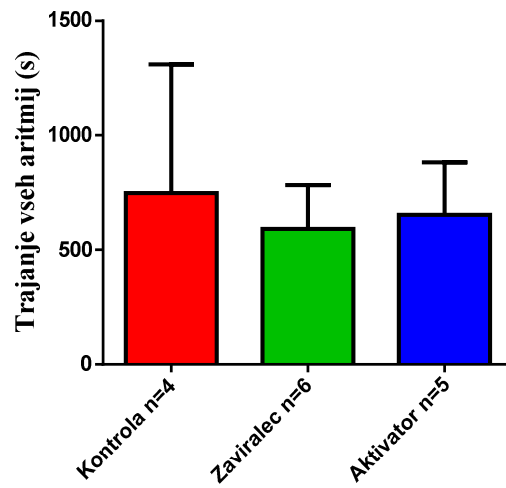
Pri akutnih učinkih izbranih modulatorjev so celokupno gledano aritmije najdlje trajale pri kontrolni skupini, takoj za tem so bile aritmije pri skupini aktivatorja BHQ880, ki so bile

pri primerjavi s skupinama zaviralcev OMP-18R5 precejšnje. Med skupinama zaviralcev OMP-18R5 je najmanj aritmij imela skupina s koncentracijo 15 mg/L, skupina s koncentracijo 1,5 mg/L pa malo več. Statistično značilnih razlik nam program ni pokazal, na grafu (slika 27) pa vidimo zelo veliko razlike v skupnem trajanju aritmij med posameznimi skupinami.

Pri kroničnih učinkih izbranih modulatorjev je bila skupna vsota trajanja vseh aritmij med skupinami zelo podobna, zato tudi ni nastalo značilnih razlik. Najdlje so trajale aritmije pri kontrolni skupini, najmanj pa pri skupini zaviralca OMP-18R5.



**Slika 27:** Graf trajanja vseh vrst aritmij pri izoliranih podganjih srcih pri akutnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5.



**Slika 28:** Graf trajanja vseh vrst aritmij pri izoliranih podganjih srcih pri kroničnih učinkih aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Med skupinami ni statistično značilnih razlik.

## **5. RAZPRAVA**

V naši magistrski nalogi smo preiskovali vpliv dveh spojin, ki modulirata signalno pot Wnt in njune morebitne učinke na I-R poškodbe po ishemiji s sledečo reperfuzijo na izoliranem srcu podgane. Uporabili smo aktivator signalne poti Wnt BHQ880 in z njim tretirali podgane akutno in kronično. Druga uporabljena spojina pa je bil zaviralec poti Wnt OMP-18R5 v dveh akutnih koncentracijah in eni kronični. Ker je pot Wnt udeležena v embrionalnem razvoju srca, v odraslem srcu pa se aktivira po MI in ima različne vplive na procese po MI, smo z aktivatorjem BHQ880 in zaviralcem OMP-18R5 preverili, kako aktivacija oziroma zaviranje signalne poti Wnt akutno in kronično vpliva na I-R poškodbe in aritmije v podganjem srcu.

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

#### **5.1.1. Aktivator BHQ880**

Za aktivacijo signalne poti Wnt smo uporabili BHQ880, ki je humano nevtralizirajoče IgG1 anti-Dkk-1 monoklonsko protitelo. Zaradi sposobnosti vezave na Dkk-1 prepreči zaviranje kanonične poti Wnt in je zato posreden aktivator kanonične poti Wnt (41, 42, 43). Študije učinkovitosti BHQ880 so bile do sedaj izvedene le na kostnini in sicer pri multiplem mielomu (MM) in osteosarkomu. V teh študijah je BHQ880 povečal raven  $\beta$ -katenina v citoplazmi celic kostnega mozga pri MM oziroma v osteosarkomskih celicah miši in hkrati zmanjšal raven fosforiliranega  $\beta$ -katenina (41, 44). MM je bolezen, ki jo spremlja osteoliza - razgradnja kosti zaradi zmanjšane aktivnosti osteoblastov; pri pacientih z MM so ugotovili, da imajo povišan Dkk-1. Ta prispeva k zaviranju aktivnosti osteoblastov, zato so dokazali, da njegovo zaviranje z BHQ880 ponovno obnovi diferenciacijo osteoblastov, zavira rast celic MM, poveča raven osteokalcina in količino trabekularne kostnine, ima anaboličen učinek na kostnino (41, 42, 43). Pri osteosarkomu, malignem tumorju kosti pa so ugotovili, da ima signalna pot Wnt proti-tumorski učinek, Dkk-1 pa pospeši rast osteosarkoma. Zato so s tretiranjem z BHQ880 dosegli zmanjšano rast osteosarkoma in omejili njegovo metastaziranje (44). Ker so bile do sedaj objavljene le študije uporabe BHQ880 pri različnih boleznih kosti, smo mi želeli preveriti njegovo potencialno uporabnost pri MI.

### 5.1.2. Zaviralec OMP-18R5

Kot zaviralec signalne poti Wnt pa smo uporabili OMP-18R5 ali vantiktumab. To je monoklonsko protitelo, ki ima sposobnost vezave na zunajcelično domeno petih receptorjev Fzd, in sicer na Fzd-1, -2, -5, -7 in -8. Na ta način prepreči vezavo proteina Wnt na receptor Fzd in neposredno zavira kanonično pot Wnt (45, 46, 47). V študiji so dokazali, da OMP-18R5 zavira  $\beta$ -kateninsko signaliziranje pri vezavi proteina Wnt-3a in zmanjša z Wnt-3a spodbujeno akumulacijo  $\beta$ -katenina (45). Do sedaj je bil OMP-18R5 uporabljen za študije udeležnosti v patofiziologiji tumorjev, kjer je bil dokazano učinkovit pri tumorjih dojk, trebušne slinavke, debelega črevesja in pljuč. Rezultati so pokazali padec jedrnega  $\beta$ -katenina, zmanjšano izražanje nekaterih genov Wnt in zmanjšano proliferacijo tumorskih celic po terapiji z OMP-18R5 (45, 46). Trenutno ga preizkušajo za protitumorno terapijo. Zaključili so fazo 1a kliničnih testiranj pri pacientih s trdimi tumorji, kjer so dokazali, da OMP-18R5 zavira pot Wnt in rakave zarodne celice v tumorjih. V letu 2013 so začeli s fazo 1b kliničnih testiranj pri raku dojk (HER-2 negativnem), napredovalem nedrobnoceličnem raku pljuč, napredovalem raku trebušne slinavke in drugih trdnih tumorjih (47, 48). Prav tako kot BHQ880, pa tudi za OMP-18R5 še ni bilo objavljene nobene študije v povezavi z MI.

### 5.1.3. Metoda izoliranega srca po Langendorff-u

Podatke o farmakoloških in toksikoloških lastnostih nove spojine v biomedicinskih študijah lahko pridobimo tako iz *in vivo* poskusov na živalih, kot tudi iz *in vitro* modelov. Problem *in vivo* poskusov je predvsem etične narave, medtem ko so *in vitro* modeli zelo primerni za študije mehanizma biološke aktivnosti, slaba stran pa je odsotnost *in vivo* biokinetike. Zato najbolj relevantne podatke dobimo s kombinacijo obeh vrst poskusov (49).

Ena najbolj uporabljenih *in vitro* metod v modernih kardiovaskularnih in farmakoloških študijah, ki smo jo uporabili tudi mi, je metoda izoliranega perfundiranega srca po Langendorff-u. Metoda obstaja že od leta 1897, a kljub različnim modifikacijam in izboljšavam je splošni princip ostal enak. V metodi lahko uporabimo srca različnih sesalcev, najpogosteje je to srce podgane. Njena velika uporabnost je na račun mnogih prednosti, kot so ponovljivost rezultatov, priprave niso ne časovno zamudne, ne tehnološko zapletene, točnost meritev, nizek strošek z eksperimenti, čeprav je srce izolirano iz telesa,

mu lahko omogočimo fiziološke pogoje, zaradi odsotnosti sistemske cirkulacije in signalov iz centralnega in avtonomnega živčevja pa lahko določamo direkten vpliv učinkovin na srce, brez perifernih vplivov. Zadnje pa je v določenih primerih lahko tudi pomanjkljivost metode, poleg tega pa še potreba po spretnosti in previdnim ravnanjem s srcem, med izolacijo lahko nehoti naredimo prekondicioniranje. Metoda je zelo uporabna za študije ishemije in reperfuzije, omogoča določanje biokemičnih in presnovnih procesov, ki se zgodijo po ishemiji (50).

## **5.2. Razprava o rezultatih**

### **5.2.1. Koronarni pretok**

Pri poskusih za oceno akutnih učinkov modulacije poti Wnt je pri vseh štirih skupinah koronarni pretok po ishemiji do 75. minute naraščal in nato do konca reperfuzije padal. Najvišjo vrednost pretoka je imela skupina zaviralca OMP-18R5 v koncentraciji 1,5 mg/L, ki je po 90. minuti dosegla enak pretok kot kontrolna skupina. Sledile so jima vrednosti skupin zaviralca OMP-18R5 15 mg/L in aktivatorja BHQ880, ki pa so po 80. minuti padle pod kontrolno vrednost; po 80. minuti so bile najnižje vrednosti pri skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L. Graf AUC koronarnega pretoka je pokazal, da značilnih razlik med skupinami ni bilo, najbolj pa so izstopale vrednosti v skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L zaradi visokega pretoka v prvih 10 minutah po ishemiji. Zato iz dobljenih rezultatov ne moremo dokazovati vpliva aktivacije in zaviranja poti Wnt na koronarni pretok, niti ne določati mehanizmov delovanja preko te signalne poti. Za to bi bile potrebne dodatne študije z večjim številom živali, ki bi dokazale prisotnost ali odsotnost vpliva poti Wnt. Vzrok upada koronarnega pretoka tekom celotne reperfuzije pa je verjetno posledica zvišane koncentracije  $Ca^{2+}$  in ROS, ki nastaneta med I-R pri vseh skupinah (8, 9). Povišanje  $Ca^{2+}$  v celici in ROS, ki povzroča disfunkcijo endotelija (51), imata za posledico vazokonstrikcijo in posledično zmanjšanje pretoka. Aktivator BHQ880 in zaviralec OMP-18R5 15 mg/L sta vrnila vrednost pretoka na vrednosti pred ishemijo, delovala sta vazokonstriktorno v primerjavi s kontrolo in zaviralcem OMP-18R5 1,5 mg/L, še posebno zaviralec OMP-18R5 15 mg/L. Ko primerjamo vrednosti pretoka v skupini zaviralca 1,5 mg/L z vrednostmi v skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L ugotovimo, da imajo različne koncentracije zaviralca poti Wnt OMP-18R5 verjetno različen vpliv na signalno pot Wnt in I-R poškodbe. Možen razlog za visok pretok oziroma zelo podoben pretok kontrolnemu pri



zaviralcu OMP-18R5 1,5 mg/L je lahko prenizka uporabljena koncentracija 1,5 mg/L, da bi lahko imela učinke na srce, ki bi spremenili merjene spremenljivke. Ker je OMP-18R5 protitelo, pri prenizki koncentraciji verjetno ni bilo dovolj velike vezave na Fzd-1, -2, -5, -7 in -8 (45, 46). Posledično ni bilo dovolj velikega zaviranja proteinov Wnt, zato je bil učinek premajhen. Zato sklepamo, da je mejna vrednost koncentracije OMP-18R5, ki učinkuje na I-R poškodbe, med 1,5 in 15 mg/L.

Pri poskusih za oceno kroničnega učinka modulacije poti Wnt razlike med skupinami niso bile velike in ne značilne. Aktivator BHQ880 je bil tisti, ki je najbolj znižal koronarni pretok, zaviralec OMP-18R5 je prvih 15 minut reperfuzije sprožil višji pretok glede na kontrolnega, po 90. minuti pa je padel pod njegove vrednosti. Upad pretoka tekom reperfuzije lahko tudi tu pojasnimo s povišanjem  $Ca^{2+}$  in ROS med I-R. ROS povzroča disfunkcijo endotelija (51), skupaj s  $Ca^{2+}$  pa vodita do vazokonstrikcije in posledično do zmanjšane pretoka, kar se pojavi pri vseh skupinah. Kronično tretiranim skupinam smo dajali aktivator BHQ880 oziroma zaviralec OMP-18R5 štiri tedne in ob izvedbi poskusov nobeden ni pokazal večjega vpliva na koronarni pretok. Statistično značilne razlike med skupinama aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 v 75., 77. in 80. minuti so verjetno nastale le naključno. Zato je verjetno, da se je učinek aktivacije in zaviranja poti Wnt izrazil takoj, po štirih tednih, ko smo poskuse izvedli, pa je bil učinek že veliko manjši oziroma je izzvenel. Ker pa še ni objavljenih študij o kronični modulaciji poti Wnt, ne vemo, zakaj se to zgodi, in je zato to dobro izhodišče za nadaljnje raziskave, ki bi ugotovile vzrok zmanjšane učinka.

### **5.2.2. Hitrost sproščanja laktat-dehidrogenaze (LDH)**

Encim laktat-dehidrogenaza (LDH) je normalno prisotna v človeških celicah, med drugim tudi v srčno-mišičnih celicah. Ob njihovi poškodbi se sprošča v kri in ker ga najdemo povišanega med drugim tudi pri MI, je dober diagnostični kazalec te bolezni (52). Vrednosti hitrosti sproščanja LDH so bile pred ishemijo pri vseh skupinah skoraj enake in zelo blizu ničle. Višja vrednost je bila le na začetku, verjetno je zaradi šoka ob izolaciji srca prišlo do nekaj poškodb celic in s tem sproščanja LDH.

Pri poskusih za oceno akutnih učinkov modulacije poti Wnt so nastale značilne razlike med skupinami. Skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L in aktivatorja BHQ880 sta najbolj znižali hitrost sproščanja LDH; vrednost LDH v skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L je

bila enaka kontrolni, po 10 minutah ishemije pa je padla pod kontrolno vrednost, a je bila še vedno precej visoka. **Aktivacija kanonične poti Wnt** je že v različnih študijah pokazala zaščitne učinke na I-R poškodbe v srcu. Prekondicioniranje s sevofluranom na izoliranih podganjih srcih je pri analizi izražanja komponent poti Wnt dokazano povišalo izražanje Wnt-3a, fosfo-GSK-3 $\beta$  in  $\beta$ -katenina v izoliranih srcih, kar kaže na aktivacijo kanonične poti Wnt. Ta aktivacija pa je povzročila, da je bil LDH in obseg infarkta nižji v primerjavi s kontrolo in zaviralcem poti Wnt (36). Podobno je pokazala tudi aktivacija kanonične poti Wnt v jetrih: agonist Wnt je povečal izražanja  $\beta$ -katenina, v jetrih pa je to vodilo do normaliziranja jetrnih encimov, med drugim tudi LDH, povečane celične proliferacije in zmanjšane apoptoze (38). Z aktivacijo kanonične poti Wnt se prepreči nastanek destruktivnega kompleksa in posledično se zavre delovanje GSK-3 $\beta$  (15, 21). GSK-3 $\beta$  tvori kompleks s p53 in tako spodbuja apoptozo povzročeno s p-53 (24). Z aktivatorjem BHQ880, ki nevtralizira delovanje zaviralca kanonične poti Wnt Dkk-1 (41) smo verjetno preprečili delovanje GSK-3 $\beta$  ter tako preprečili apoptozo in sproščanje LDH iz srčno-mišičnih celic. Dokazali so že, da aktivacija kanonične poti Wnt sodeluje v zaščiti srca preko zaviranja GSK-3 $\beta$  (35). Po drugi strani pa z aktivacijo kanonične poti Wnt z BHQ880 pride do povišanja koncentracije  $\beta$ -katenina (41), ki v jedru celic sodeluje pri aktivaciji genov, pomembnih za celično preživetje in proliferacijo.  $\beta$ -katenin preko delovanja na povečano izražanje survivina in Bcl-2 vodi do zmanjšanja apoptoze v srčno-mišičnih celicah in srčnih fibroblastih (25, 26). Vse to lahko pojasni znižan LDH ob uporabi aktivatorja BHQ880, saj se prepreči apoptoza celic in zaščiti srce pred I-R poškodbami. Zakaj pa je potem skupina **zaviralca OMP-18R5 v koncentraciji 15 mg/L** še bolj znižala LDH kot skupina aktivatorja BHQ880? Številne objavljene študije so že dokazale pozitivne učinke zaviranja poti Wnt na srce. Pirvinij, registrirano zdravilo proti parazitom, ki zaradi spodbujanja delovanja CK-1 $\alpha$  poveča razgradnjo  $\beta$ -katenina in zavira kanonično pot Wnt, lahko izboljša škodljivo preoblikovanje levega ventrikla in srčno funkcijo, poveča tudi proliferacijo srčno-mišičnih celic (31, 32). Učinkovina UM206, ki je zaviralec poti Wnt-3a in -5a, deluje z vezavo na receptorja Fzd-1 in 2, ki sta povišana v srcu po MI. Rezultat tega antagonizma je zmanjšan razvoj srčnega popuščanja in širjenje infarkta (33). Za naš zaviralec OMP-18R5 so dokazali, da prepreči  $\beta$ -kateninsko signaliziranje v poti Wnt-3a in zmanjšuje z Wnt-3a spodbujeno akumulacijo  $\beta$ -katenina in fosforilacijo LRP-6 (45). Zhang s sodelavci (46) je ugotovil, da Wnt-3a, ki aktivira kanonično pot Wnt, spodbuja apoptozo preko povišanja aktivnosti kaspaz kot odgovor na

hipoksijo s sledečo reoksigenacijo. Naravni zaviralec poti Wnt sFRP-2 se lahko fizično veže na Wnt-3a, ga zavira in prepreči njegove apoptotične učinke. S tem prepreči tudi prekomerno izražanje  $\beta$ -katenina, ki ima pro-apoptotične učinke (18). Zato smo z zaviralcem OMP-18R5 15 mg/L verjetno zavirali Wnt-3a in preprečili njegove pro-apoptotične učinke, kar je znižalo vrednosti sproščanja LDH. To je eden izmed možnih mehanizmov, a ker ne vemo točno, na katere proteine Wnt naš zaviralec OMP-18R5 in aktivator BHQ880 delujeta, bi za potrditev teh mehanizmov potrebovali analizo proteinov Wnt. Prav tako bi bile potrebne še dodatne študije za ugotovitev učinka posameznih proteinov Wnt. Dokazali so namreč, da Wnt-1 in -3a delujeta nasprotno (18, 19), a pri prekondicioniranju s sevofluranom je ob povečanem izražanju Wnt-3a prišlo do zaščitnih učinkov. Kar pa je obratno, kot je dokazal Zhang s sodelavci (46). Poleg tega je potrebno poudariti še različen nivo delovanja aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5. Aktivator BHQ880 deluje bolj posredno preko zaviranja le enega od naravnih endogenih zaviralcev poti Wnt, zaviralec OMP-18R5 pa z zaviranjem petih receptorjev Fzd deluje bolj neposredno. Če bi aktivator BHQ880 deloval na enakem nivoju kot zaviralec OMP-18R5, bi mogoče prišlo do drugačnih učinkov na I-R poškodbe. Skupina **zaviralca OMP-18R5 v koncentraciji 1,5 mg/L** pa je bila tista, ki je pokazala enak dvig hitrosti sproščanja LDH kot kontrola; po 80. minuti je vrednost sicer padla pod kontrolno, a ostala dokaj visoka. Tako kot pri koronarnem pretoku, tudi pri LDH lahko vidimo, kako različne koncentracije zaviralca poti Wnt OMP-18R5 delujejo različno na signalno pot Wnt in I-R poškodbe. Tudi tu lahko rečemo, da je bila koncentracija 1,5 mg/L verjetno prenizka, da bi lahko imela večje učinke na srce. Vsa ta odprta vprašanja pa dajejo potrebo po nadaljnjih študijah vpliva akutne modulacije poti Wnt na srce po MI. Ena od možnosti je analiza izražanja proteinov z metodo prenos western, kjer bi lahko preverili, kaj se dejansko dogaja s koncentracijo GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -katenina in proteinov Wnt v srčno-mišičnih celicah.

Statistično značilne razlike med akutno tretiranima skupinama (aktivator BHQ880 in zaviralec OMP-18R5 15 mg/L) in kontrolo nam dokazujejo, da signalna pot Wnt vpliva na nastanek poškodb srca že med samo ishemijo. Aktivacija oziroma zaviranje poti Wnt zadnjih 10 minut pred ishemijo je spremenilo delovanje poti Wnt med samo ishemijo, kar je vplivalo na nastanek poškodb. To pa je vidno z zmanjšanimi vrednostmi hitrosti sproščanja LDH pri aktivatorju BHQ880 in zaviralcu OMP-18R5 15 mg/L v prvih minutah po ishemiji v primerjavi s kontrolo, ki se verjetno ne bi veliko spremenile, če bi modulacija poti Wnt vplivala le med reperfuzijo.

Pri kroničnih učinkih modulacije pa razlike med skupinami niso bile velike in ne značilne. Skupini aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 sta bolj zvišali LDH kot kontrolna skupina, najbolj ga je aktivator BHQ880. Tudi pri LDH smo opazili enak pojav kronične modulacije poti Wnt kot pri koronarnem pretoku, in sicer je bil učinek skoraj enak kot pri kontrolni skupini, verjetno je po štirih tednih tretiranja živali že izzvenel. Zato bi bila tudi pri kroničnih poskusih primerna analiza izražanja proteinov s prenosom western, kjer bi lahko preverili GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -katenin in proteine Wnt ob kroničnem tretiranju in ugotovili, kaj se zares dogaja po štirih tednih modulacije poti Wnt.

### **5.2.3. Moč kontrakcij levega ventrikla**

Pri tej spremenljivki smo merili razliko med sistolnim in diastolnim tlakom s tlačno sondo neposredno v levem ventriklu, kar predstavlja moč kontrakcij levega ventrikla. Povečana moč kontrakcij levega ventrikla med reperfuzijo običajno kaže na poškodbe miokarda, saj v poškodovane celice vdre večja količina Ca<sup>2+</sup>, zaradi česar pride do povečane kontraktilnosti miokarda.

Pri poskusih za oceno akutnih učinkov je bila moč kontrakcij najvišja takoj po ishemiji pri vseh skupinah, nato pa je postopoma upadala. Najvišja moč kontrakcij je bila pri kontrolni skupini, nižja od te je bila vrednost skupine zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L, najnižji pa sta bili moči kontrakcij v skupinah zaviralca OMP-18R5 15 mg/L in aktivatorja BHQ880. Čeprav nam program GraphPad Prism ni pokazal statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami, je dvofaktorska ANOVA pokazala značilne razlike pri posameznih točkah med reperfuzijo, predvsem med skupinama aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 15 mg/L v primerjavi s skupinama zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in kontrole (slika 13). Skupini aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 15 mg/L sta bolj znižali moč kontrakcij v primerjavi s kontrolo oziroma sta vrednost skoraj vrnili na vrednosti pred ishemijo. Ena od možnih razlag je povezava moči kontrakcij s koronarnim pretokom. Weintraub s sodelavci je ugotovil, da je pretok krvi skozi koronarno žilje linearno povezan s tlakom v levem ventriklu (53). Ob zmanjšanem pretoku se namreč zmanjša dostava kisika in hranilnih snovi, kar vpliva na moč kontrakcij miokarda. To pa se opazi tudi pri naših poskusih, ker sta aktivator BHQ880 in zaviralec OMP-18R5 15 mg/L najbolj znižala koronarni pretok in hkrati imela tudi najnižjo vrednost moči kontrakcij levega ventrikla. Druga možna razlaga je, da v času reperfuzije pride do poškodbe srčno-mišične celice zaradi nastanka ROS, previsoke koncentracije Ca<sup>2+</sup> v celici, delovanja

nevtrofilcev, odpiranja MPTP (8, 9). Že tako previsok  $\text{Ca}^{2+}$  zaradi poškodb še dodatno vstopa v celico in to lahko vodi do večje moči kontrakcij pri kontrolni skupini in skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L po ishemiji v primerjavi z vrednostmi pred ishemijo. Pri skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 15 mg/L pa moč upade, saj so poškodbe manjše, kar nam kaže nizek LDH pri teh dveh skupinah. A čez čas kontraktilni proteini oslabijo, in kljub povišanemu  $\text{Ca}^{2+}$  moč kontrakcij oslabi, kar pa skupaj s stalno električno aktivnostjo privede do ventrikularnih aritmij (8, 9). Mehanizmov, ki bi povezali aktivacijo in zaviranje poti Wnt s spremenjeno močjo kontrakcij pa ne poznamo, ker študij povezav med potjo Wnt in tlakom ni. Skupina zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L je tudi pri tej spremenljivki podobna kontrolnim vrednostim, in prav tako lahko trdimo, da je koncentracija 1,5 mg/L verjetno premajhna za večje učinke na srce.

Pri določanju kroničnih učinkov med skupinami niso nastale značilne razlike, nekaterih vrednosti prvih 10 minut reperfuzije zaradi aritmij nismo mogli izmeriti. Moč kontrakcij se zviša pri vseh skupinah v primerjavi z vrednostmi pred ishemijo; najvišje vrednosti so pri skupini aktivatorja BHQ880, najnižje pa pri kontrolni skupini, čeprav so si med seboj podobne. Tako kot pri koronarnem pretoku in LDH nam tudi rezultati pri moči kontrakcij levega ventrikla kažejo veliko verjetnost, da signalna pot Wnt potihne po štiri-tedenski modulaciji in tako kronična modulacija poti Wnt nima vpliva na kontraktilno funkcijo srca.

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

Normalna frekvenca bitja srca pri človeku znaša približno 70 utripov/min, pri podganah pa je višja, in sicer od 330 do 480 utripov/min (54). Pri naših poskusih je srčno frekvenco izoliranega srca podgan določal le ritmovnik.

Pri poskusih določanja akutnih učinkov modulatorjev poti Wnt je bila vrednost frekvence med skupinami precej podobna, v času pred ishemijo je bila med 300 in 340 utripi/min, po ishemiji pa nekoliko nižja. Vrednosti frekvenc so se med skupinami razlikovale, a med njimi ni bilo značilnih razlik. Po ishemiji so bila prvih 10 minut opazna nihanja frekvenc pri vseh štirih skupinah: takoj po ishemiji so bile frekvence manjše kot pred ishemijo, nato so narasle in se sčasoma približale vrednostim pred ishemijo. Nihanja v frekvenci lahko pojasnimo s spremembami v srčno-mišičnih celicah, nastalimi zaradi pomanjkanja kisika ob ishemiji. To so predvsem zmanjšana produkcija ATP, kopičenje  $\text{Ca}^{2+}$  in ob ponovnem dotoku kisika ob reperfuziji tudi nastanek ROS (8, 9). Te spremembe pri nekaterih celicah

povzročijo apoptozo ali celo nekrozo, pri drugih pa lahko reperfuzija omogoči preživetje, a zaradi potrebe po ponovni vzpostavitvi fizioloških razmer je lahko v srcih naših podgan prišlo do nihanja v frekvenci. Drugi razlog za nihanja pa bi lahko bile aritmije, ki so se v največji meri pojavljale prvih 10 minut reperfuzije. Zaradi aritmij nekaterih vrednosti frekvence nismo mogli izmeriti.

Pri poskusih ocene kroničnih učinkov prav tako nismo opazili značilnih razlik med skupinami. Frekvenca kontrole je bila po ishemiji rahlo višja kot pri poskusih za oceno akutnih učinkov; nihanj prvih 10 minut reperfuzije nismo opazili, mogoče tudi zato, ker tam vrednosti zaradi aritmij nismo mogli izmeriti. Nihanja prvih 10 minut pri skupinah aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 pa so se pojavila verjetno iz istega razloga kot pri akutnih poskusih. Frekvenci skupin zaviralca OMP-18R5 predvsem pa aktivatorja BHQ880 sta bili nižji od kontrole celoten poskus. Eden od razlogov za to je bilo lahko povišanje frekvence kontrole v primerjavi z akutnim poskusom, po drugi strani pa znižani frekvenci skupin zaviralca OMP-18R5 predvsem pa aktivatorja BHQ880 lahko kažeta na zmanjšano aktivnost ritmovnika zaradi remodelacije ob kronični modulaciji kanonične poti Wnt. Kanonična pot Wnt je nepogrešljiva pri embrionalnem razvoju srca, kjer modulira diferenciacijo in specifikacijo embrionalnih zarodnih celic v različne podtipе srčnih celic, med drugim tudi v celice ritmovnika (55). Ob kronični aktivaciji in zaviranju poti Wnt pa lahko pride do podobnih preoblikovalnih procesov kot pri embrionalnem razvoju. V prekursorskih celicah ritmovnika so dokazali povišanje  $\beta$ -katenina, kar kaže na aktivno poti Wnt in le-ta spodbudi specifikacijo v celice ritmovnika (56). Torej bi aktivacija poti Wnt z aktivatorjem BHQ880 kronično lahko vodila do remodelacije ritmovnika. V razvijajočem se »sinus horn« (iz katerega nastanejo celice ritmovnika), je kanonično signaliziranje Wnt posredovano s proteini Wnt-2 in -10a ter receptorjem Fzd-7 (57), na katerega pa deluje tudi zaviralec OMP-18R5 (45, 46, 47). Ti proteini Wnt in receptor spodbujajo proliferacijo prekursorskih celic ter oblikovanje AV kanala in atrija (57). Zaviranje receptorja Fzd-7 z OMP-18R5 ali pa spodbujanje Wnt-2 in -10a z BHQ880 ima zato lahko učinke na strukturo in delovanje ritmovnika ter posledično spremenjeno frekvenco pri kroničnih poskusih. A ker značilnih razlik med posameznimi skupinami nismo dokazali, bi bilo potrebno vključiti večje število živali, ki bi jih tretirali kronično z aktivatorjem BHQ880 in zaviralcem OMP-18R5 za ugotovitev vpliva poti Wnt na remodelacijo in delovanje ritmovnika.

### 5.2.5. Pojav in trajanje aritmij

Iz posnetkov EKG-ja smo odčitali trajanje štirih vrst aritmij: asistolije, ekstrasistole ali ventrikularne prezgodnje utripe, ventrikularne fibrilacije (VF), ventrikularne tahikardije (VT) ter trajanje vseh vrst aritmij skupaj. Asistolija je najnevarnejša od aritmij, saj gre za stanje popolne odsotnosti električne aktivnosti, srce se ne krči in ne deluje kot črpalka, zato je to stanje življenjsko ogrožajoče. A pri naših poskusih, tako akutnih kot kroničnih, asistolije nismo opazili. Druga najnevarnejša aritmija je VF, ki lahko povzroči nenadno srčno smrt in je zato prav tako življenjsko ogrožajoča. VT in ekstrasistola nista tako nevarni aritmiji, pri VT gre za prehitro bitje srca, pri ekstrasistoli pa za prezgodnje ventrikularne utripe. Tako pri akutnih kot kroničnih poskusih je bila največja frekvenca aritmij prvih 10-15 minut po reperfuziji, pred ishemijo aritmij ni bilo.

Pojavljanje ekstrasistol pri poskusih za določanje akutnih učinkov je bilo največji pri kontrolni skupini in je bilo značilno večje od vseh treh tretiranih skupin. Pri skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L so se pojavile najmanj, vrednosti skupin zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in aktivatorja BHQ880 pa so bile enake in so bile po velikosti med vrednostmi skupin zaviralca OMP-18R5 15 mg/L in kontrole. VT se je najbolj pokazala pri kontrolni skupini in skupini aktivatorja BHQ880, pri skupini zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L jo je bilo malo, pri skupini zaviralca OMP-18R5 15 mg/L pa skoraj nič. Razlike med skupinami so bile velike. Življenjsko ogrožajoča VF se je pojavila le v skupinah zaviralca OMP-18R5 1,5 mg/L in aktivatorja BHQ880 in to v velikem obsegu. Če seštejemo trajanje vseh vrst aritmij pri akutnih poskusih skupaj, lahko povzamemo, da je zaviralec OMP-18R5 v koncentraciji 15 mg/L pokazal največjo zaščito pred aritmijami. Trajanje vseh aritmij je bilo najkrajše, VF in VT skoraj ni bilo, pojavile so se le ekstrasistole, ki pa niso življenjsko ogrožajoče. Če zraven upoštevamo še nizke vrednosti LDH, je to koncentracija zaviralca OMP-18R5, ki je pri naših poskusih pokazala največjo zaščito pred I-R poškodbami srca. Pri koronarnem pretoku, LDH in moči kontrakcij smo ugotovili, da je koncentracija 1,5 mg/L pri zaviralcu OMP-18R5 verjetno prenizka za večje učinke na srce, ker so bile vse spremenljivke zelo podobne kontrolnim vrednostim. Pri aritmijah pa je ta koncentracija pokazala značilno manjše trajanje ekstrasistol od kontrole, precej manjše trajanje VT in večje trajanje VF od kontrole. Pri skupnem trajanju aritmij so bile razlike v primerjavi s kontrolo velike, zato bi bilo potrebno z dodatnimi študijami na večjem številu živali dokazati, ali je koncentracija 1,5 mg/L res prenizka za učinke na srce, ali je v ozadju

nek drug mehanizem. Poskusi z aktivatorjem BHQ880 so imeli največ VF, VT enako kot kontrola, ekstrasistol pa značilno manj od kontrole. Glede na obe koncentraciji zaviralca OMP-18R5 je bilo trajanje aritmij pri aktivatorju BHQ880 precej daljše. Zato ti rezultati govorijo nasprotno od vrednosti aktivatorja BHQ880 pri koronarnem pretoku, LDH in moči kontrakcij, kjer je deloval podobno kot zaviralec OMP-18R5 15 mg/L in pokazal zaščitne učinke na srce.

Pri poskusih za določitev akutnih učinkov nam program kljub velikim razlikam med skupinami ni pokazal statistično značilnih razlik. Eden od možnih razlogov za to je lahko velika variabilnost znotraj skupin pri VF, VT in skupnem trajanju aritmij, zato nam ni izračunalo značilnih razlik. Velike variabilnosti znotraj skupin pa so lahko na račun razlik med živalmi, precej majhnih in različno velikih skupin.

Aritmije v primeru določanja kroničnih učinkov nam lahko potrdijo naše domneve o izzvenelem učinku modulacije poti Wnt ob kroničnem tretiranju. Te rezultate smo opazili že pri koronarnem pretoku, LDH in moči kontrakcij. Trajanjih posameznih vrst aritmij in skupno trajanje je bilo med vsemi tremi skupinami precej podobno, značilnih razlik ni bilo, manjše razlike pri posameznih aritmijah so verjetno le naključne zaradi biološke raznolikosti med živalmi. Kronična modulacija poti Wnt ima verjetno precej zmanjšan učinek na I-R poškodbe srca po MI, saj učinki po štirih tednih terapije že izzvenijo.



## 6. ZAKLJUČEK

Študij in objav o vlogi signalne poti Wnt je veliko, hkrati preizkušajo tudi modulacijo te poti pri različnih boleznih zaradi udeležnosti v patoloških procesih teh bolezni. Pri degenerativnih boleznih kosti, kot je multipli mielom, je delovanje signalne poti Wnt zmanjšano, zato so z uporabo aktivatorja BHQ880, ki smo ga uporabili tudi mi, že dokazali izboljšanje kostne strukture. Obratno vlogo ima pot Wnt pri patoloških procesih v tumorjih, kjer zaradi prevelike aktivnosti testirajo zaviralce poti Wnt, med drugim tudi OMP-18R5, ki je že v fazi kliničnih preizkušanj. V klinični fazi 1a je že dokazal učinkovito delovanje zoper različnim tumorjem. Signalna pot Wnt ima pomembno vlogo tudi v srcu, v še razvijajočem se in v odraslem, kjer se aktivira med drugim tudi po MI in učinkuje na procese, ki mu sledijo. Zato je bil namen naše naloge ugotoviti in izmeriti učinke zaviralca OMP-18R5 in aktivatorja BHQ880 signalne poti Wnt na poškodbe izoliranega srca podgane po akutnem MI ter ugotoviti, ali obstaja razlika med akutno in kronično uporabo teh dveh spojin.

Naši rezultati pri akutno dodanih modulatorjih so pokazali, da le-te nimajo vpliva na koronarni pretok, med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Najbolj vazokonstriktorno sta delovala aktivator BHQ880 in zaviralec OMP-18R5 v višji koncentraciji (15 mg/L). Podobne akutne učinke smo opazili tudi pri moči kontrakcij levega ventrikla, saj je bilo največje znižanje moči oziroma vrnitev na vrednosti pred ishemijsko pri aktivatorju BHQ880 in zaviralcu OMP-18R5 v višji koncentraciji (15 mg/L) verjetno posledica znižanega pretoka. Vrednosti zaviralca OMP-18R5 v nižji koncentraciji (1,5 mg/L) in kontrole so medtem ostale povišane. Hitrost sproščanja LDH je bila najnižja pri akutno dodatnem aktivatorju BHQ880 in zaviralcu OMP-18R5 v višji koncentraciji 15 mg/L, razlike so bile značilno nižje od zaviralca OMP-18R5 v nižji koncentraciji (1,5 mg/L) in kontrole. Ker je zaviralec OMP-18R5 v višji koncentraciji (15 mg/L) pokazal tudi najbolj zaščitno delovanje proti aritmijam smo sklepali, da je to modulator, ki nudi srcu po MI največjo zaščito pred I-R poškodbami. Aktivator BHQ880 je po eni strani značilno znižal LDH, po drugi pa povzročil več aritmij kot oba zaviralca OMP-18R5, zato bi bile potrebne dodatne študije o njegovem dejanskem učinku. Za koncentracijo zaviralca OMP-18R5 v nižji koncentraciji (1,5 mg/L) smo sklepali, da je verjetno prenizka, da bi lahko imela večje učinke na srce, čeprav je imela manj aritmij od kontrole. Akutnih učinkov modulatorjev na frekvenco ni bilo.

Pri kroničnem dodatku aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 signalne poti Wnt so bile vrednosti vseh spremenljivk zelo podobne kontrolnim vrednostim, med njimi ni bilo nobenih značilnih razlik. Zato smo zaključili, da kronična modulacija signalne poti Wnt na izboljšanje I-R poškodb ne vpliva. Opazili pa smo kronični učinek zaviralca OMP-18R5 in predvsem aktivatorja BHQ880 na zmanjšanje frekvence in ju povezali s kronično remodelacijo ritmovnika.

Zaključki magistrskega dela so, da zaviralec OMP-18R5 višji koncentraciji (15 mg/L) ščiti srce pred I-R poškodbami, medtem ko so bile uporabljene koncentracije pri zaviralcu OMP-18R5 v nižji koncentraciji (1,5 mg/L) verjetno prenizke, da bi z njimi lahko vplivali na I-R poškodbe po MI. Za aktivator BHQ880 smo po eni strani dokazali, da deluje zaščitno na srce z značilnim znižanjem LDH, po drugi strani pa povzroča aritmije. Prvi smo dokazali, da aktivacija oziroma zaviranje signalne poti Wnt vpliva na nastanek poškodb srca že med samo ishemijo in ne le med reperfuzijo, kot je bilo dokazano do sedaj. Za bolj trdne dokaze o vseh teh trditvah pa bi morali izvesti dodatne študije z večjim številom živali, saj je že biološka raznolikost med živalmi samimi zelo velika, poleg tega pa bi bilo potrebno učinke aktivatorja BHQ880 in zaviralca OMP-18R5 meriti tudi na *in vivo* živalskih modelih.

## 7. LITERATURA

1. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology, 5th Ed., Mosby, St. Louis, Missouri, 2004; 263-442.
2. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Berne & Levy Principles of physiology, 4th Ed., Elsevier Mosby, Philadelphia, 2006; 178-357.
3. Zorc Pleskovič R, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006; 33-35; 49-53.
4. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, 3. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002; 19-46.
5. Silbernagel S, Lang F: Color atlas of pathophysiology, 5th Ed., Thieme, Stuttgart, 2000; 176-241.
6. Ribarič S, et al.: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011; 163-182.
7. Gottlieb RA: Cell Death Pathways in Acute I/R Injury, J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011; 16: 233-238.
8. Buja LM: Myocardial ischemia and reperfusion injury, Cardiovascular Pathology 14, 2005; 14: 170-175.
9. Murphy E, Steenbergen C: Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury, Physiol Rev, 2008; 88: 581-609.
10. Piper HM, Meuter K, Schäfer C: Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury, Ann Thorac Surg, 2003; 75: S644-8.
11. Yellon DM, Hausenloy DJ: Myocardial reperfusion injury, The New England Journal of Medicine, 2007; 357: 1121-1135.
12. Clarke M, Bennett M, Littlewood T: Cell death in the cardiovascular system, Heart, 2007; 93: 659-664.
13. Li F, Chong ZZ, Maiese K: Winding through the Wnt pathway during cellular development and demise, Histol Histopathol., 2006; 21: 103-124.
14. Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, Koutsilieris M: Wnt signaling in cardiovascular physiology, Trends Endocrinol. Metab., 2012; 23: 628-36.

15. Dawson K, Aflaki M, Nattel S: Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential, *J Physiol*, 2013; 591.6: 1409–1432.
16. Hermans KCM, Daskalopoulos EP, Blankesteyn WM: Interventions in Wnt signaling as a novel therapeutic approach to improve myocardial infarct healing, *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2012; 5:16.
17. 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.
18. 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.
19. Liu J, Wang Y, et al.: Wnt1 inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis in mouse cardiac stem cells, *PLoS ONE*, 2013; 8: 1-12.
20. Doble B, Woodgett JR: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J Cell Sci.*, 2003; 116: 1175–1186.
21. Vincan E: Wnt signaling, Volume 1: Pathway Methods and Mammalian Models, Humana Press, 2008; 5-15.
22. Rao TP, Kühl M: An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways, *Circ Res.*, 2010; 106:1798-1806.
23. Miura T, Miki T: GSK-3 $\beta$ , a Therapeutic Target for Cardiomyocyte Protection, *Circ J* 2009; 73: 1184 – 1192.
24. 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.
25. Hahn JY, Cho HJ, Bae JW, et al.:  $\beta$ -catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, *J Biol Chem*, 2013; 281: 30979-89.
26. Van Gijn ME, Daemen MJAP, Smits JFM, Blankesteyn WM: The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease, *Cardiovascular Research*, 2002; 55: 16–24.
27. Komiya Y, Habas R: Wnt signal transduction pathways, *Landes Bioscience*, 2008; 2: 68-75.
28. Cruciat CM, Niehrs C: Secreted and transmembrane Wnt Inhibitors and activators, *Cold spring harbor perspectives in biology*, 2013; 5: 1-26.

29. MacDonald BT, Tamai K, He X: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Dev Cell*, 2009; 17: 9–26.
30. Deb A: Cell–cell interaction in the heart via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway after cardiac injury, *Cardiovascular Research*, 2014; 102: 214–223.
31. Saraswati S, Alfaro MP, Thorne CA, et al.: Pyrvinium, a Potent Small Molecule Wnt Inhibitor, Promotes Wound Repair and Post-MI Cardiac Remodeling, *PLoS ONE*, 2010; 5(11): e15521.
32. Saraswati S, Deskins DL, Holt GE, Young PP: Pyrvinium, A Potent Small Molecule WNT Inhibitor, Increases Engraftment And Inhibits Lineage Commitment Of Mesenchymal Stem Cells (MSCs), *Wound Repair Regen*, 2012; 20: 185–193.
33. Laeremans H, Hackeng TM, Zandvoort MAMJ, 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.
34. 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.
35. Vigneron F, Dos Santos P, Lemoine S, et al.: GSK-3 $\beta$  at the crossroad in the signalling of the heart preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways, *Cardiovasc Res.*, 2011; 90: 49-56.
36. Liu JD, Deng Q, Tian HH, Pang YT, Deng GL: Wnt/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ / $\beta$ -catenin Signaling Activation Mediated Sevoflurane Preconditioning-induced Cardioprotection, *Chinese Medical Journal*, 2015; 128: 2346-53.
37. Kamada N, Kanaya N, Hirata N, Kimura S, Namiki A: Cardioprotective effects of propofol in isolated ischemia-reperfused guinea pig hearts: role of KATP channels and GSK-3 $\beta$ , *Can J Anesth*, 2008; 55: 595–605.
38. Kuncewitch M, Yang Wl, Molmenti E, et al.: Wnt Agonist Attenuates Liver Injury and Improves Survival after Hepatic Ischemia/Reperfusion, *Shock*, 2013; 39: 3–10.
39. Mastroiacovo F, Busceti CL, Biagioni F, et al.: Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2009; 29: 264–276.

40. Barandon L, Dufourcq P, Costet P, et al.: Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/Frizzled Pathway in Ischemic Preconditioning, *Circulation Research*, 2005; 96: 1299-306.
41. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, et al.: Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma, *Blood*, 2009; 114: 371-379.
42. Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, et al.: Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) Removes Suppression of Bone Formation and Prevents the Development of Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma, *J Bone Miner Res*, 2009; 24: 425–436.
43. Iyer SP, Beck JT, Stewart AK, et al.: A Phase IB multicentre dose-determination study of BHQ880 in combination with anti-myeloma therapy and zoledronic acid in patients with relapsed or refractory multiple myeloma and prior skeletal-related events, *British Journal of Haematology*, 2014; 167: 366–375.
44. Goldstein SD, Trucco M, Guzman WB, Hayashi M, Loeb DM: A monoclonal antibody against the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical mode, *Oncotarget*, 2016; doi: 10.18632/oncotarget.8522.
45. Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, et al.: Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors, *PNAS*, 2012; 29: 11717–11722.
46. Zhang Y, Morris JP, Yan W, et al.: Canonical Wnt signaling Is required for pancreatic carcinogenesis, *Cancer Res.*, 2013; 73: 4909–4922.
47. <http://www.oncomed.com/Pipeline.html> (datum dostopa: 12.10.2015)
48. [http://www.oncomed.com/presentations/Vantictumab\\_Ph1biomarker\\_AACR-NCI-EORTC2013.pdf](http://www.oncomed.com/presentations/Vantictumab_Ph1biomarker_AACR-NCI-EORTC2013.pdf) (datum dostopa 12.10.2015)
49. Blaauboer BJ: In vitro and other non-animal experiments in the biomedical sciences. *Anzccart news*, 1996; 9: 1-4.
50. 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.
51. 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.
52. <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=9997> (datum dostopa: 8.1.2016)

53. 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.
54. <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html> (datum dostopa: 7.1.2016)
55. Ionta V, Liang W, Kim EH, Rafie R, Giacomello A, Marbán E, Cho HC: SHOX2 Overexpression Favors Differentiation of Embryonic Stem Cells into Cardiac Pacemaker Cells, Improving Biological Pacing Ability., *Stem Cell Reports*, 2015; 4(1): 129-42.
56. Bressan M, Liu G, Mikawa T: Early Mesodermal Cues Assign Avian Cardiac Pacemaker Fate-Potential in a Tertiary Heart Field, *Science*, 2013; 340(6133): 744-8.
57. Norden J, Greulich F, Rudat C, Taketo MM, Kispert A: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling maintains the mesenchymal precursor pool for murine sinus horn formation., *Circ Res*, 2011; 109(6): e42-50.