

The role of melatonin in protecting the heart against malignant arrhythmias

Význam melatonínu pri ochrane srdca pred malígnymi arytmiami

Beňová T¹, Viczenczová C¹, Radošinská J^{1,2}, Szeiffová Bačová B¹, Knezl V³, Dosenko V⁴, Weismann P⁵, Zeman M⁶, Navarová J³, Tribulová N¹

¹Ústav pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, Slovenská republika

Benova T, Viczenczova C, Radosinska J, Szeiffova Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarova J, Tribulova N. **The role of melatonin in protecting the heart against malignant arrhythmias.** Cardiology Lett. 2015;24(2):60–69

Abstract. *Objectives:* It is very well known from experimental as well as clinical studies that the pineal hormone, melatonin, which regulates circadian rhythms, exhibits cardioprotective effects.

The goal of the study was to confirm our hypothesis and to explore the antiarrhythmic effects of the supplementation of melatonin in hypertensive and normotensive rats. Additionally, we aimed to discover the supposed mechanisms of these effects, i.e. the cooperation of cardiac connexin-43 (Cx43), which provides electrical signal transmission, and the effect of protein kinase C epsilon (PKCε), which modulates Cx43.

Methods: We used spontaneously hypertensive rats (SHR, n=24) and normotensive Wistar rats (n=24) fed with a standard laboratory diet and situated in standard laboratory light conditions (12 hours light/12 hours dark). Melatonin (40 µg/mL) was administered daily to drinking water during the night phase for a duration of five weeks to both hypertensive (n=12) and normotensive (n=12) rats. Systolic blood pressure, biometrical and biochemical parameters were registered at the beginning and at the end of the experiment. The tissue from the left ventricle was used for the analysis of Cx43 and PKCε. The threshold to induce ventricular fibrillation (VF) was tested on an isolated perfused heart setup.

Results: At the onset, plasma levels of melatonin were lower in hypertensive compared to normotensive rats. The exogenous supplementation of melatonin to hypertensive rats resulted in increased plasma levels of melatonin. Moreover, melatonin decreased blood pressure and normalized the level of triglycerides in hypertensive rats, while it decreased body weight and visceral fat in normotensive rats. Heart and left ventricular weight were not affected by melatonin in any of the rat groups. The threshold to induce VF was significantly lower in hypertensive compared to the normotensive rats and significantly increased after the treatment with melatonin. Increased gene expression of Cx43 as well as the expression of Cx43 protein and that of its phosphorylated (functional) forms in the heart of rats exposed to melatonin were also found. Furthermore, the application of melatonin reduced abnormal (proarrhythmic) myocardial localization of Cx43 in hypertensive rats and increased the expression of PKCε in both groups.

Z ¹Ústavu pre výskum srdca, SAV, Bratislava, ²Fyziologického ústavu Lekárskej fakulty UK v Bratislave, ³Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Bratislava, ⁴Fyziologického ústavu Bogomoletz, Kyjev, Ukrajina, ⁵Anatomického ústavu Lekárskej Fakulty UK, Bratislava a ⁶Prírodovedeckej fakulty UK, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 29. januára 2015; prijaté dňa 2. februára 2015

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Tamara Beňová, PhD., Ústav pre výskum srdca SAV, Dúbravská cesta 9, P.O.Box 104, 840 05 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: benova.tamara@gmail.com

Primárna práca bola publikovaná v plnom rozsahu v: Benova T, Viczenczova C, Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarova J, Tribulova N. Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. Can J Physiol Pharmacol 2013; 91(8):633-639.

Conclusions: Our findings reveal clear antiarrhythmic effects of melatonin supplementation in normotensive and, even more so, in hypertensive rats. Melatonin induced up-regulation of cardiac Cx43 could lead to protection against malignant arrhythmias, especially in individuals with melatonin deficiency. Fig. 6, Tab. 2, Ref. 47, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: hypertensive rats – melatonin – connexin-43 – ventricular fibrillation

Beňová T, Vicenciová C, Radošinská J, Szeiffová Bačová B, Knežl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarová J, Tribulová N. **Význam melatonínu pri ochrane srdca pred malígnymi arytmiami.** *Cardiology Lett.* 2015;24(2):60–69

Abstrakt. Zámer: Z experimentálnych a klinických štúdií je známe, že epifyzáry hormón melatonín, regulujúci cirkadiánne rytmy, má kardioprotektívne účinky.

Cieľ: Cieľom štúdie bolo overiť našu hypotézu a preskúmať antiarytmické účinky suplementácie melatonínom u hypertenzných a normotenzných potkanov. Okrem toho bolo cieľom zistiť predpokladané mechanizmy týchto účinkov, t. j. účasť srdcového konexínu-43 (Cx43), ktorý zabezpečuje prenos elektrického signálu a účasť proteínkinázy C epsilon (PKCε), ktorá moduluje Cx43.

Metódy: V experimente boli použité spontánne hypertenzné potkany (SHR, n = 24) a normotenzné Wistar (WIS) potkany (n = 24), ktoré boli kŕmené štandardnou laboratórnou stravou a situované pri štandardných laboratórnych svetelných podmienkach (12 h svetlo/12 h tma). Melatonín (40 µg/mL) sa aplikoval v pitnej vode počas tmavej fázy dňa počas piatich týždňov hypertenzným (n = 12) a normotenzným (n = 12) potkanom. Tlak krvi, biometrické a biochemické parametre sa registrovali na začiatku a na konci experimentu. Tkanivo z ľavej komory srdca sa použilo na analýzy Cx43 a PKCε. Prah na vyvolanie komorovej fibrilácie (KF) sa testoval na izolovanom perfundovanom srdci.

Výsledky: Plazmatické hladiny melatonínu boli nižšie u hypertenzných v porovnaní s normotenznými potkanmi a suplementácia melatonínom ich zvýšila. Melatonín znížil tlak krvi a normalizoval hladinu triacylglycerolov u hypertenzných potkanov, kým u normotenzných potkanov znížil hmotnosť tela a viscerálny tuk. Hmotnosť srdca a hmotnosť ľavej komory neboli melatonínom ovplyvnené v žiadnej skupine. Prah na vyvolanie KF bol významne nižší u hypertenzných v porovnaní s normotenznými potkanmi a významne zvýšený po suplementácii melatonínom. V srdci potkanov ovplyvnených melatonínom sa zistila zvýšená expresia Cx43 tak na úrovni génovej, ako aj proteínovej a taktiež zvýšené hladiny fosforylovaných (funkčných) foriem Cx43. Okrem toho aplikácia melatonínu zmiernila abnormálnu (proarytmogénnu) myokardiálnu lokalizáciu Cx43 u hypertenzných potkanov a zvýšila expresiu PKCε u oboch skupín.

Záver: Naše zistenia poukazujú na antiarytmické účinky suplementácie melatonínom u normotenzných, a ešte výraznejšie u hypertenzných potkanov. Melatonínom indukovaná „up-regulácia“ srdcového Cx43 by mohla významne prispievať k ochrane pred malígnymi arytmiami, najmä u jedincov s deficienciou melatonínu. Obr. 6, Tab. 2, Lit. 47, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: hypertenzné potkany – melatonín – konexín-43 – komorová fibrilácia

Medzibunková komunikácia tvorí základ pre správnu funkciu všetkých orgánov. Priamu medzibunkovú komunikáciu, t. j. prenos elektrického impulzu a molekulových signálov medzi susediacimi kardiomyocytmi zabezpečujú proteínové kanály lokalizované v špecializovaných úsekoch interkalárneho disku, v tzv. gap junctions (GJ) (1, 2). V staršej literatúre sa tieto spojenia nazývali nexy a boli považované za nízkoodporové miesta pre prenos elektrického vzruchu. Až neskôr sa zistilo, že v GJ sa nachádzajú aj početné medzibunkové kanály tvorené proteínmi nazývanými konexíny (Cx). V srdci je dominantný Cx43, ktorý je exprimovaný v komorách a predsieňach. Cx40 sa nachádza v predsieňach a Cx45 je v špecializovanom prevodovom systéme srdca. Klinické aj experimentálne štúdie, vrátane našich prác, poukazujú na skutočnosť, že zmeny v štruktúre myokardu vyvolané systémovým ochorením, hemodynamickou záťažou, ale aj vekom sú sprevádzané zmenami Cx43, ktoré sa významne podieľajú na tvorbe arytmogénneho substrátu (2 – 11). Takýmto substrátom je narušená komunikácia medzi jednotlivými kardiomyocytmi

spôsobená dysfunkciou Cx43 kanálov v dôsledku zmien v expresii (znížená tvorba alebo zvýšená degradácia Cx43) a lokalizácii Cx43 (redistribúcia z interkalárneho disku na laterálne steny kardiomyocytu). Tieto zmeny sa prejavujú spomalením (až blokom) šírenia elektrického vzruchu v postihnutých oblastiach, čím sa podporuje vznik malígnych arytmií (2, 3, 12). Na základe týchto poznatkov bola vyslovená hypotéza, že Cx43 kanály by mohli byť cieľové štruktúry v prevencii malígnych arytmií (6, 13).

V súvislosti s ochranou voči život ohrozujúcim arytmiám je potrebné spomenúť skutočnosť pozorovanú u viacerých cicavcov, ale aj u človeka, a to schopnosť srdca spontánne konvertovať malígnu arytmiu do sínusového rytmu (14). Ďalšou zaujímavosťou je, že u hibernujúcich zvierat (pred alebo počas prebudenia sa z hibernácie) zmeny v teplote tela neindukujú vznik malígnej arytmie, ku ktorej dochádza pri teplotných zmenách u nehibernujúcich jedincov (vrátane človeka) (15). Na uvedených vlastnostiach srdca sa môže okrem iných faktorov podieľať aj úroveň medzibunkovej ko-

munikácie sprostredkovej Cx43 (15, 16). U hibernujúcich zvierat bola v období spánku zistená zvýšená expresia Cx43 v srdci (17). Vzhľadom na tento poznatok sme vyslovili predpoklad, že melatonín (hormón produkovaný najmä epifýzou počas tmavej fázy dňa) by mohol hrať úlohu v „endogénnej“ ochrane srdca pred malígnou arytmiou.

Melatonín sa uvoľňuje v závislosti od cirkadiálneho rytmu. Svetlo (prirodzené aj umelé) jeho tvorbu inhibuje. Biosyntéza melatonínu výrazne klesá po 40. roku života človeka a viaceré práce poukázali na to, že pacienti s koronárnou chorobou majú znížené hladiny melatonínu (18, 19). Hypertenzní pacienti „non-dipper“ sa odlišujú od „dipperov“ zníženou sekréciou melatonínu (20, 21). Pretrvávajúca deficiencia melatonínu sa spája s chronodisrupciou, čím sa závažne narušuje homeostáza organizmu najmä v dôsledku zmien v metabolizme, vnútrobunkovej a medzibunkovej signalizácii, humorálnej regulácii, zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a iniciáciou zápalového procesu. Zápal a ROS sú dôležité faktory, ktoré ohrozujú medzibunkovú komunikáciu v srdci tým, že zvyšujú degradáciu Cx43 a môžu tiež ovplyvniť jeho expresiu tak na génovej, ako i proteínovej úrovni. Na druhej strane sa preukázal benefit suplementácie melatonínom u jedincov s hypertenziou, pričom jeho kardioprotektívne účinky sa pripisujú najmä jeho antioxidačným a radikály vychytávajúcim vlastnostiam (22, 23).

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo zistiť a preskúmať účinky suplementácie hypertenzných potkanov melatonínom na expresiu a distribúciu Cx43 v myokarde ľavej komory a na citlivosť srdca na vznik komorovej fibrilácie.

Materiál a metódy

V experimente boli použité dospelé (päťmesačné) samce spontánne hypertenzných potkanov, predstavujúce najčastejšie používaný model imitujúci esenciálnu hypertenziu u ľudí. Zároveň sa použili rovnako staré normotenzné Wistar potkany. SHR aj WIS potkany sa rozdelili do štyroch skupín. V každej skupine bolo 12 jedincov: 1. kontrolné SHR a WIS potkany, označené SHRc a WISc; 2. potkany, ktorým sa v pitnej vode a počas tmavej fázy dňa podával melatonín (Sigma) v dávke 40 µg/ml/deň, počas piatich týždňov, označené SHRm a WISm. Melatonín sa rozpustil v etanole a pripravil sa zásobný roztok, ktorý sa udržiaval v tme pri 4 °C.

Zvieratám sa v priebehu experimentu registroval systolický tlak krvi manžetovou pletyzmografickou metódou a hmotnosť tela. Na konci päťtýždňového pokusu sa potkanom v celkovej anestéze odobrali krvné vzorky na stanovenie hladín melatonínu (RIA metódou) (24), glukózy (glukomerom), triacylglycerolov (TAG), cholesterolu (CHOL), trijódtyronínu (T3) a tetrajódtyronínu (L-tyroxínu, T4) použitím komerčných kitov. Po otvorení hrudníka sa srdce rýchlo excidovalo a vložilo do ľadového fyziologického roztoku (aby sa urýchlila

asystolia), následne sa odvážilo, rozdelilo na jednotlivé časti, ktoré sa pred zamrazením v tekutom dusíku tiež odvážili. Na konci experimentu sme taktiež zaznamenali hmotnosť epididymálneho a retroperitoneálneho tuku u jednotlivých potkanov a vyhodnocovali adipozitu (pomer hmotnosti tuku ku hmotnosti tela). Tkanivo z ľavej komory srdca sa použilo na nasledovné analýzy: 1. stanovenie expresie Cx43 na úrovni mRNA pomocou metódy real-time PCR; 2. stanovenie expresie Cx43 na úrovni proteínu pomocou Western blot metódy; 3. stanovenie expresie proteín kinázy C epsilon (PKCε), ktorá fosforyluje Cx43, pomocou Western blot metódy; 4. topológiu Cx43 pomocou in situ imunofluorescenčnej metódy na kryostatových rezoch a intezitu fluorescenčného signálu pomocou kvantitatívnej analýzy mikroskopického obrazu.

Funkčné parametre a citlivosť srdca na elektricky indukovanú komorovú fibriláciu sa registrovali na izolovanom preparáte srdca použitím Langendorffovej metódy perfúzie okysličovaným Krebs-Henseleitovým roztokom. Všetky použité metódy sú podrobne opísané v pôvodnej publikácii (11). Namerané hodnoty sme vyhodnotili ako aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka (SD). Nepárový Studentov t-test sme použili na vyhodnotenie signifikantných rozdielov medzi sledovanými skupinami potkanov. Chi-kvadrát test sme použili na vyhodnotenie percenta fibrilujúcich srdiec. Štatisticky signifikantné rozdiely sú: *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; †, $p < 0,05$ v porovnaní SHRc. Normalita rozdelenia údajov bola overená použitím Shapiro-Wilk(ovho) testu.

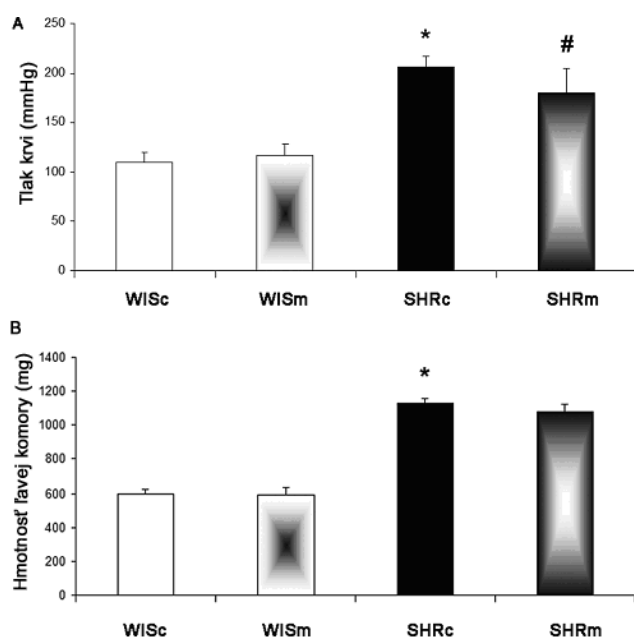
Výsledky

Biometrické a biochemické parametre u sledovaných potkanov

Plazmatická hladina melatonínu bola signifikantne nižšia u hypertenzných v porovnaní s nehypertenznými potkanmi a suplementácia melatonínom jeho hladinu významne zvýšila u hypertenzných potkanov. Melatonín spôsobil mierny, ale signifikantný pokles systolického tlaku krvi (TK) u hypertenzných potkanov (**obrázok 1A**), neovplyvnil však u nich zvýšenú hmotnosť srdca (**tabuľka 1**) a hmotnosť ľavej komory (**obrázok 1B**), ale významne zvýšil, respektíve normalizoval nižšie hladiny triacylglycerolov (**tabuľka 1**). Aplikácia melatonínu nehypertenzným potkanom mala za následok významné zníženie hmotnosti tela a viscerálneho tuku. Výsledky sú zhrnuté v **tabuľke 1**.

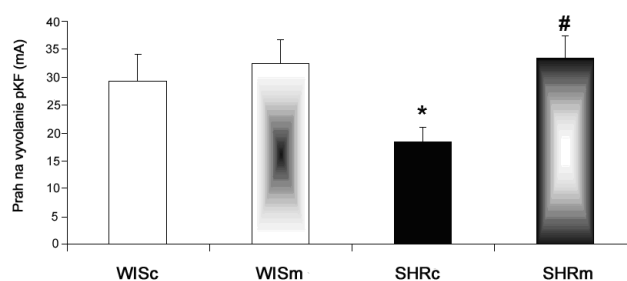
Funkčné parametre srdca a indukovateľnosť komorovej fibrilácie u experimentálnych potkanov

Počas perfúzie srdca sa registrovali jeho funkčné parametre monitorovaním koronárneho prietoku, EKG a tlaku v ľavej komore. Hodnoty pozitívnej a negatívnej derivá-



Obrázok 1A, 1B Systolický tlak krvi a hmotnosť ľavej komory kontrolných a melatonínom suplementovaných samcov SHR a WIS

Figure 1A, 1B Systolic blood pressure and left ventricular weight in untreated and melatonin-treated spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar (WIS) rat hearts. WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty $\pm$ SD zo šiestich sŕdc. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a #, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (WISc – untreated WIS rats; WISm – WIS rats treated with melatonin; SHRc – untreated SHR; and SHRm – SHR treated with melatonin. Results are the mean $\pm$ SD of 6 hearts. *, $p < 0.05$ compared with WISc; #, $p < 0.05$ compared with SHRc).



Obrázok 2 Prah na vyvolanie pretrvávajúcej komorovej fibrilácie (pKF) u kontrolných a melatonínom suplementovaných samcov SHR a WIS

Figure 2 Threshold to induce sustained ventricular fibrillation (sVF) in untreated and melatonin-treated spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar (WIS) rat hearts. WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty $\pm$ SD zo šiestich sŕdc. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a #, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (WISc – untreated WIS rats; WISm – WIS rats treated with melatonin; SHRc – untreated SHR; and SHRm – SHR treated with melatonin. Results are the mean $\pm$ SD of 6 hearts. *, $p < 0.05$ compared with WISc; #, $p < 0.05$ compared with SHRc).

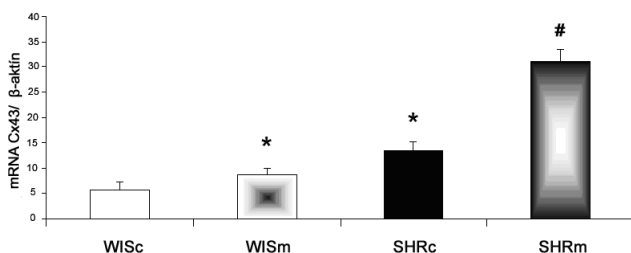
cie tlaku ľavej komory, t. j. $+dP/dt$ (mm Hg/s) a $-dP/dt$ (mm Hg/s) predstavujú ukazovatele kontrakčnej a relaxačnej schopnosti srdca. Nezistili sme signifikantné rozdiely bazálnych hodnôt registrovaných funkčných parametrov medzi hypertenznými a nehypertenznými potkanmi. Pozorovala sa však tendencia k poklesu frekvencie srdca a kontraktility po suplementácii hypertenzných potkanov melatonínom (tabuľka 2).

Tabuľka 1 Vybrané biometrické a biochemické parametre kontrolných a melatonínom suplementovaných samcov SHR a WIS

Table 1 Main characteristics of melatonin-treated and untreated SHR and Wistar rats

	WISc	WISm	SHRc	SHRm
MEL (pg/ml)	22,26 $\pm$ 3,4	24,08 $\pm$ 3,9	11,42 $\pm$ 3,5*	18,57 $\pm$ 3,9#
BW (g)	329,2 $\pm$ 8,95	306,2 $\pm$ 5,7*	336,3 $\pm$ 9,4	328,3 $\pm$ 11,3
HW (g)	0,85 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,05	1,35 $\pm$ 0,04*	1,38 $\pm$ 0,03
HW/BW (mg/g)	2,58 $\pm$ 0,09	2,67 $\pm$ 0,17	4,02 $\pm$ 0,164*	4,2 $\pm$ 0,17
LVW/BW (mg/g)	1,82 $\pm$ 0,074	1,93 $\pm$ 0,16	3,36 $\pm$ 0,145*	3,3 $\pm$ 0,18
BG (mmol/l)	5,9 $\pm$ 0,6	6,4 $\pm$ 0,7	5,07 $\pm$ 0,21*	5,1 $\pm$ 0,99
TG (mmol/l)	0,604 $\pm$ 0,09	0,51 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,02*	0,56 $\pm$ 0,09#
CHOL (mmol/l)	1,11 $\pm$ 0,34	1,27 $\pm$ 0,34	0,95 $\pm$ 0,19	1,05 $\pm$ 0,27
T3 (ng/ml)	0,4 $\pm$ 0,1	0,33 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,12
T4 (ng/ml)	21,8 $\pm$ 5,8	18,24 $\pm$ 5,4	18,19 $\pm$ 3,2	17,06 $\pm$ 2,5
EPI/BW	1,31 $\pm$ 0,17	1,05 $\pm$ 0,19*	0,97 $\pm$ 0,09*	0,93 $\pm$ 0,1
RET/BW	0,896 $\pm$ 0,32	0,91 $\pm$ 0,31	0,99 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,12

MEL – melatonin; WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín; BW – hmotnosť tela; HW – hmotnosť srdca; LVW – hmotnosť ľavej komory srdca; BG – hladina glukózy v krvi; TG – triacylglyceroly v plazme; CHOL – celková hladina cholesterolu v plazme; T3 – trijódtyronín; T4 – tetrajódtyronín; EPI – epididymálny tuk; RET – retroperitoneálny tuk. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty $\pm$ SD z dvanástich potkanov v každej skupine. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a #, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (MEL – melatonin; WISc – control group of Wistar rats; WISm – Wistar rats supplemented with melatonin; SHRc – control group of spontaneously hypertensive rats; SHRm – SHR supplemented with melatonin; BW – body weight; HW – heart weight; LVW – left ventricular weight; BG – blood glucose; TG – triglycerides; CHOL – cholesterol; T3 – triiodothyronine; T4 – thyroxine; EPI – epididymal adipose tissue; and RET – retroperitoneal adipose tissue. Values are the mean $\pm$ SD of 12 rats in each group. *, $p < 0.05$ compared with WISc; and #, $p < 0.05$ compared with SHRc).



Obrázok 3 Expresia Cx43 na úrovni mRNA normalizovaná ku β-aktínu v myokarde ľavej komory kontrolných a melatoninom suplementovaných samcov SHR a WIS

Figure 3 Connexin-43 (Cx43) mRNA expression normalized to β-actin in the left ventricles of untreated and melatonin-treated spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar (WIS) rat hearts

WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty ± SD zo šiestich srdc. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a #, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (WISc – untreated WIS rats; WISm – WIS rats treated with melatonin; SHRc – untreated SHR; and SHRm – SHR treated with melatonin. Results are the mean ± SD of 6 hearts. *, $p < 0.05$ compared with WISc; #, $p < 0.05$ compared with SHRc).

V porovnaní s nehypertenznými potkanmi bol prah na vyvolanie komorovej fibrilácie významne nižší v srdciach hypertenzných zvierat ($29,2 \pm 5$ mA vs. $18,3 \pm 2,6$ mA). V protiklade s tým, suplementácia týchto potkanov melatonínom signifikantne zvýšila fibrilačný prah. Zvýšené hodnoty fibrilačného prahu v dôsledku aplikácie melatonínu u nehypertenzných potkanov nedosiahli štatistickú významnosť (obrázok 2).

Expresia a distribúcia Cx43 v myokarde ľavej komory srdca

Expresia mRNA pre Cx43 v ľavej komore srdca u hypertenzných potkanov bola vyššia v porovnaní s nehypertenznými (obrázok 3). Na rozdiel od toho expresia Cx43 na úrovni proteínu bola signifikantne znížená (obrázok 4). Okrem toho boli

znižené aj fosforylované (funkčné) formy Cx43 v myokarde hypertenzných potkanov (obrázok 4). Suplementácia potkanov melatonínom mala za následok zvýšenie tak mRNA, ako aj hladín proteínu a fosforylovaných foriem pre Cx43 (obrázky 3, 4). Toto zvýšenie bolo zjavné u hypertenzných a v menšej, ale signifikantnej miere u nehypertenzných potkanov. Imunofluorescenčná detekcia odhalila uniformnú distribúciu Cx43 v ľavej komore srdca nehypertenzných potkanov (obrázok 5). Cx43-pozitívny signál bol viditeľný najmä v oblasti interkalárnych diskov kardiomyocytov a zriedkavo na laterálnych stenách kardiomyocytov. V protiklade s touto normálnou lokalizáciou Cx43 sa pozorovali rôzne abnormality v srdciach hypertenzných potkanov (obrázok 5). Tieto abnormality boli charakterizované zvýšeným výskytom Cx43 na laterálnych stenách kardiomyocytov a neusporiadanou lokalizáciou Cx43 v ohniskách začínajúcich fibrotických zmien. Suplementácia hypertenzných potkanov melatonínom tieto abnormality výrazne potlačila (obrázok 5). Kvantitatívna analýza intenzity imunofluorescenčného signálu poukázala na signifikantné zníženie expresie Cx43 v ľavej komore srdca hypertenzných potkanov v porovnaní s nehypertenznými a na tendenciu jej zvýšenia po aplikácii melatonínu (11).

Expresia PKCε v myokarde ľavej komory srdca

V ľavej komore srdca hypertenzných potkanov bola expresia PKCε signifikantne znížená v porovnaní s jej expresiou u normotenzných zvierat. Suplementácia potkanov melatonínom expresiu PKCε signifikantne zvýšila u nehypertenzných a normalizovala u hypertenzných zvierat (obrázok 6).

Diskusia

V tejto štúdii sme ako prví zistili antiarytmické účinky melatonínu u spontánne hypertenzných potkanov, o ktorých je známe, že sú náchylné na výskyt malígnych arytmií (10, 11,

Tabuľka 2 Funkčné parametre izolovaných perfundovaných srdc kontrolných a melatoninom suplementovaných samcov SHR a WIS

Table 2 Baseline values of isolated perfused heart of melatonin-treated and untreated SHR and Wistar rats

	WISc	WISm	SHRc	SHRm
HR (tepová frekvencia/min)	248 ± 20	254 ± 46	216 ± 31	205 ± 22
CF (ml/min)	11,5 ± 2,7	11,9 ± 2,8	11,5 ± 2,4	8,6 ± 1,5
LVP (mmHg)	97,1 ± 12,1	72,1 ± 15,9	113,9 ± 17,3	80,1 ± 15,5
+dP/dt	2035 ± 551	1924 ± 451	2050 ± 364,6	1632 ± 244,3
-dP/dt	1204 ± 264	1047 ± 244	1225 ± 163	1012 ± 168

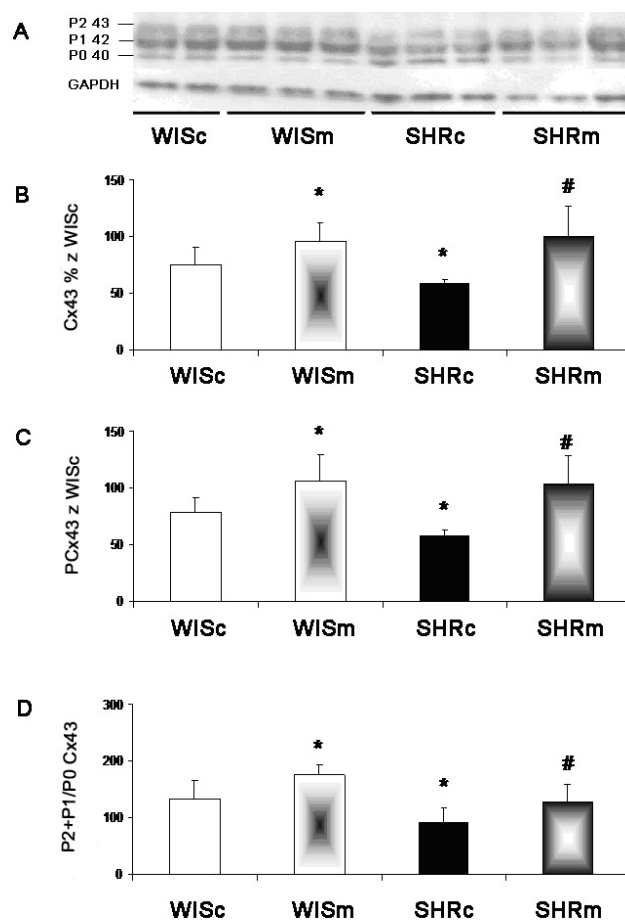
HR – tepová frekvencia; CF – koronárny prietok; LVP – tlak v ľavej komore; +dP/dtmax – index kontraktility; -dP/dtmax – index relaxácie; WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. 1 mmHg = 133.322 Pa. Priemerné hodnoty ± SEM zo šiestich potkanov v každej skupine. Žiadne signifikantné rozdiely neboli medzi skupinami zistené. (HR – heart rate; CF – coronary flow; LVP – left ventricular pressure; +dP/dtmax, index of contractility; -dP/dtmax – index of relaxation; WISc – control group of Wistar rats; WISm – Wistar rats supplemented with melatonin; SHRc – control group of spontaneously hypertensive rats; and SHRm – SHR supplemented with melatonin. 1 mmHg = 133.322 Pa. Values are the mean ± SD of 6 rats in each group. There were no significant differences among the groups).

25). Tiež sme ukázali, že majú znížené plazmatické hladiny melatonínu v porovnaní s nehypertenznými potkanmi. Zvýšené riziko vzniku malígnej arytmie dokumentované v tejto štúdií sa prejavilo znížením stimulačného prahu na vyvolanie komorovej fibrilácie v porovnaní so zdravými potkanmi. Naopak, viactýždňová suplementácia hypertenzných potkanov melatonínom významne znižovala toto riziko v dôsledku zvýšenia fibrilačného prahu.

Pozoruhodná je skutočnosť, že antiarytmické účinky melatonínu sa spájali so zvýšenou expresiou Cx43 v ľavej komore srdca, a to tak na úrovni génovej, ako aj proteínovej. Okrem toho aplikácia melatonínu mala za následok výrazné zvýšenie fosforylovaných foriem Cx43. Tie sú potrebné pre funkčnosť komunikačných kanálov tvorených Cx43, t. j. pre prenos elektrického vzruchu. Týmto mechanizmami by sa mohlo vysvetliť zvýšenie fibrilačného prahu u melatonínom suplementovaných potkanov. Túto domnienku podporuje aj skutočnosť, že znížená expresia a fosforylácia Cx43, zistená u neliečených hypertenzných potkanov aj v predchádzajúcich štúdiách (10, 26), sa veľmi pravdepodobne podieľa na poruchách prenosu elektrického impulzu, a tým na zvýšenej náchylnosti (preukázanej aj znížením fibrilačného prahu) k malígnej aritmii. Jednou z proteínkináz, ktorá fosforyluje Cx43, je PKCε a jej expresia bola v srdci melatonínom suplementovaných hypertenzných potkanov významne zvýšená. Domnievame sa, že práve táto PKC by sa mohla podieľať na zlepšení fosforylácie Cx43.

Zvýšenú expresiu myokardiálneho Cx43 sme zistili u melatonínom suplementovaných hypertenzných potkanov aj kvantitatívnou analýzou mikroskopického obrazu. Fluorescenčná mikroskopia okrem toho odhalila menej abnormalít v lokalizácii (distribúcii) Cx43 pozitívnych GJ, tzn. zaznamenali sme znížený výskyt Cx43 na laterálnych stenách kardiomyocytov a menej častý výskyt výrazne neusporiadanej lokalizácie Cx43, najmä v oblastiach fibróz. V tejto súvislosti je potrebné poznamenať, že abnormálna distribúcia Cx43 v myokarde taktiež ovplyvňuje elektrické vlastnosti srdca, najmä zvýšením anizotropie (27), a tým významne prispieva k tvorbe arytmogénneho substrátu.

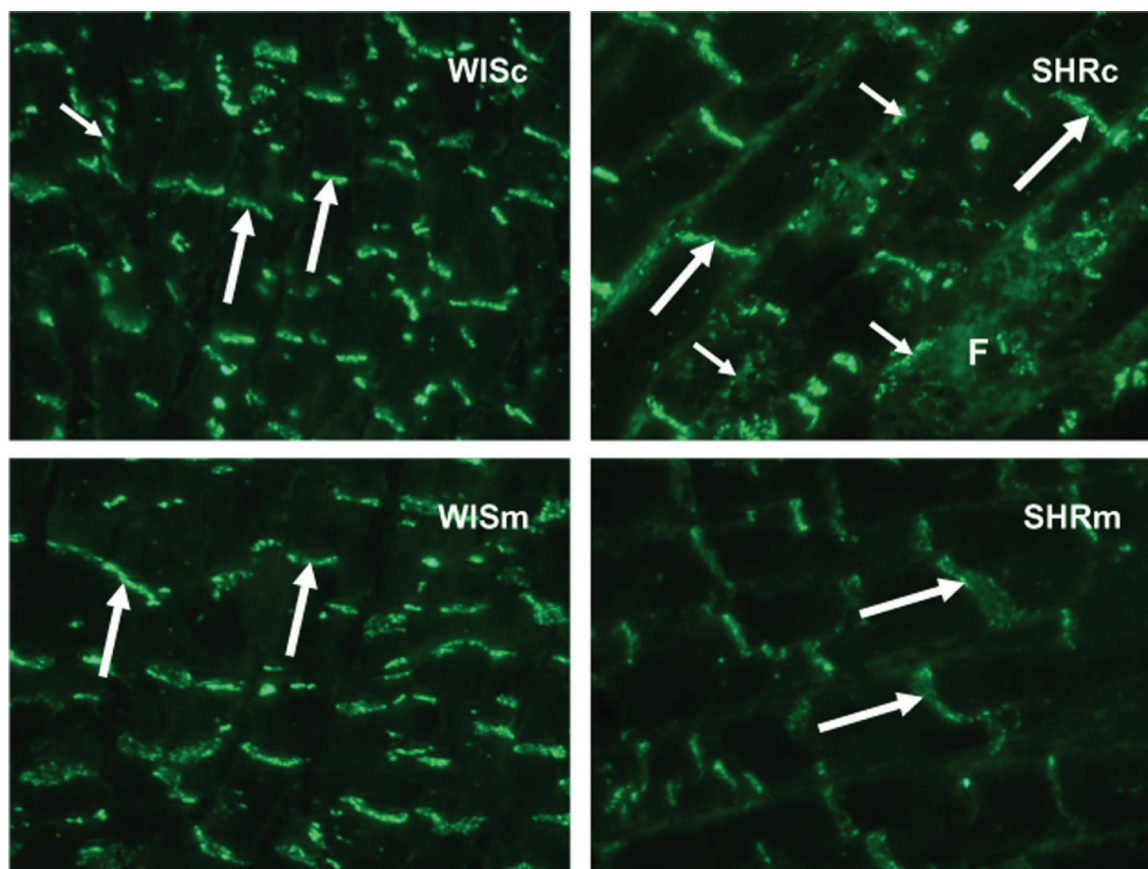
Vzhľadom na skutočnosť, že hypertenzia je sprevádzaná oxidačným stresom, predpokladáme, že proces hypertenzie a jej dôsledkov mohol byť ovplyvnený antioxidantnými a radikály vychytávajúcimi účinkami melatonínu. Tieto účinky by mohli zabrániť zvýšenej degradácii Cx43 a jeho zníženej fosforylácii, a tým aj jeho abnormálnej lokalizácii. Na zvýšenú degradáciu proteínu Cx43 v srdci neliečených hypertenzných potkanov (v porovnaní s potkanmi normotenzného kmeňa Wistar) poukazujú výsledky dokumentujúce znížené hladiny proteínu (**obrázok 4**), a to aj napriek zvýšenej expresii mRNA pre Cx43 (**obrázok 3**). Znížená fosforylácia by tiež mohla súvisieť so zníženou expresiou PKCε zistenej u neliečených hypertenzných potkanov v tejto aj predchádzajúcich štúdiách (11, 25, 28).



Obrázok 4 Reprezentatívny imunoblot ukazujúci tri formy konexínu-43 (Cx43) (A) a denzitometrickú kvantifikáciu celkovej expzie Cx43 (B), jeho fosforylovanej formy (C) a pomeru fosforylovaných ku nefosforylovanej podobe Cx43 (D) normalizovaných ku GAPDH v myokarde ľavej komory kontrolných a melatonínom suplementovaných samcov SHR a WIS

Figure 4 Representative immunoblot showing 3 forms of connexin-43 (Cx43) (A) and densitometric quantification of total Cx43 expression (B), its phosphorylated form (C), and the ratio of phosphorylated to unphosphorylated forms of Cx43 (D) normalized to GAPDH in the left ventricles of untreated and melatonin-treated spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar (WIS) rat hearts. P0 – nefosforylovaná forma Cx43; P1 a P2 – fosforylované formy Cx43; WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty ± SD zo šiestich srdc. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a *, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (P0 – unphosphorylated form of Cx43; P1 and P2 – phosphorylated forms of Cx43; WISc – untreated WIS rats; WISm – WIS rats treated with melatonin; SHRc – untreated SHR; and SHRm, SHR treated with melatonin. Results are the mean ± SD of 6 hearts. *, $p < 0.05$ compared with WISc; #, $p < 0.05$ compared with SHRc).

Antioxidačné a reaktívne voľné radikály vychytávajúce vlastnosti melatonínu veľmi pravdepodobne zohrávajú hlavnú úlohu v antiarytmických účinkoch melatonínu v podmienkach ischemicko-reperfúzneho poškodenia srdca in vivo alebo na



Obrázok 5 Reprezentatívne obrázky imunofluorescenčnej detekcie Cx43 v myokarde ľavej komory kontrolných a melatonínom suplementovaných SHR a WIS. Bežná distribúcia Cx43 u WIS (WISc a WISm) je najmä v oblastiach interkalárnych diskov kardiomyocytov (označené dlhými šípками) a sporadicky aj na laterálnych stenách kardiomyocytov (označené krátkymi šípками), pričom v myokarde ľavej komory SHRC je zvýšený výskyt Cx43 na laterálnych stenách kardiomyocytov. Okrem toho môžeme u SHRC pozorovať aj neorganizovanú lokalizáciu Cx43 v miestach fibrózy (F). Podávanie melatonínu eliminovalo abnormálnu distribúciu Cx43 v srdciach SHR. Zväčšenie, pri ktorom boli zhotovené jednotlivé snímky $\times 40$.

Figure 5 Representative images of connexin-43 (Cx43) immunolabelling in the left ventricles of untreated (WISc and SHRC) and melatonin treated (WISm and SHRm) Wistar (WIS) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. Note the conventional distribution of Cx43-positive gap junctions predominantly at the intercalated discs (long arrows) and sporadically on lateral surfaces (short arrows) of the cardiomyocytes in both groups of WIS. The lateralization is enhanced in SHR hearts that, in addition, exhibit disordered localization of Cx43 at the area of fibrosis (F). Treatment with melatonin apparently eliminated abnormal Cx43 distribution in SHR hearts. Magnification $\times 40$.

WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRC – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín (WISc – untreated WIS rats, WISm – WIS rats treated with melatonin, SHRC – untreated SHR; and SHRm – SHR treated with melatonin)

modeli izolovaného perfundovaného srdca (29 – 34). Aplikácia melatonínu znížila tiež mortalitu spôsobenú komorovou fibriláciou, ktorá bola indukovaná post-ischemickou reperfúziou u pinealektomizovaných potkanov zo 63 % na 25 % (35). Tieto účinky sú veľmi pravdepodobne nezávislé od melatonínových receptorov. Doposiaľ sa všeobecne akceptuje, že tak fyziologické, ako aj farmakologické koncentrácie melatonínu vychytávajú reaktívne formy kyslíka a dusíka, a že melatonín taktiež reguluje antioxidantné a proinflamačné gény epigenetickou „on-off“ cestou (36).

Z našich výsledkov vyplýva, že efekt suplementácie melatonínu na expresiu mRNA Cx43 bol výraznejší u potkanov s de-

ficitom melatonínu, t. j. u spontánne hypertenzných potkanov v porovnaní s nehypertenznými potkanmi. Predpokladáme, že v tom môže zohrávať úlohu množstvo alebo dostupnosť melatonínových receptorov (MT1 a MT2), prostredníctvom ktorých melatonín taktiež pôsobí. Mechanizmy účinku melatonínu na molekulárnej úrovni nie sú dostatočne objasnené a práve preto sú potrebné ďalšie experimentálne štúdie na objasnenie viacerých nezodpovedaných otázok. Nedávno publikované výsledky dokumentujú melatonínom indukovanú „up-reguláciu“ Cx43 a zvýšenie medzibunkového „couplingu“ v ľudských hladkosvalových bunkách myometria cez MT2 receptory a za účasti PKC (37). Autori predpokladajú, že

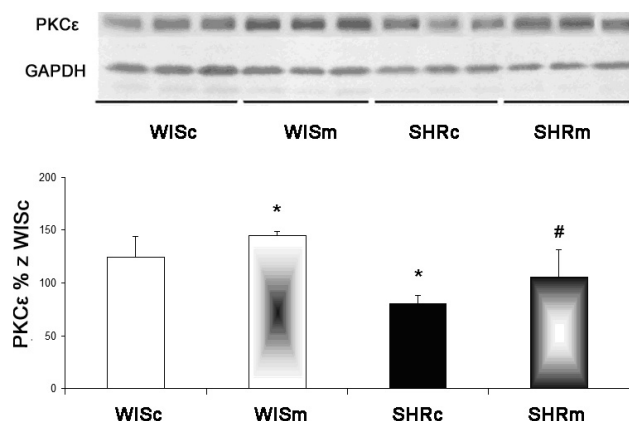
naviazaný melatonín aktivuje fosfolipázu-C a následne zvýši tvorbu inozitoltrifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu. Týmto sa aktivuje PKC, ktorá môže ovplyvniť transkripčné faktory c-fos a c-jun, dôležité v regulácii exprese Cx43 v bunkách myometria (38). Bolo by zaujímavé zistiť, či je táto signálna dráha zakomponovaná do „up-regulácie“ Cx43 v srdcovom svale.

V súvislosti s kardioprotektívnymi a antiarytmickými účinkami melatonínu je potrebné brať do úvahy aj jeho lipofilné vlastnosti a interakcie so špecifickými membránovými a intracelulárnymi proteínmi alebo jadrovými receptormi (39). Melatonín môže primárne regulovať permeabilitu nielen Cx43 kanálov, ale i Ca²⁺ kanálov a Ca²⁺ influx (40), a to pravdepodobne prostredníctvom modulácie jeho fosforylovaného a defosforylovaného stavu. Okrem toho, melatonín zvyšuje cGMP a znižuje cAMP hladiny, inhibuje syntézu prostaglandínov a reguluje metabolizmus fosfolipidov (39). Všetky tieto faktory môžu vplývať aj na funkciu a bunkovú distribúciu Cx43 kanálov (13).

Aplikácia melatonínu zvýšila jeho plazmatické hladiny, čo malo za následok pokles zvýšeného tlaku krvi a normalizáciu znížených hladín triacylglycerolov, ale neovplyvnila funkciu izolovaného perfundovaného srdca za bazálnych podmienok. Vplyv melatonínu na znižovanie tlaku krvi bol rozoberaný vo viacerých experimentálnych prácach a tiež klinických štúdiách (41 – 44). Mierny pokles tlaku však nebol sprevádzaný znížením hmotnosti srdca a ľavej komory, ani pomeru hmotnosti ľavej komory k hmotnosti tela. Toto zistenie sa zhoduje s viacerými štúdiami podporujúcimi tvrdenia, že melatonín pravdepodobne nespôsobuje regresiu hypertrofie ľavej komory, ale podieľa sa na potláčaní fibrózy myokardu (22, 45). V našom experimente sme však výraznejšiu fibrózu v srdci neliečených hypertenzných potkanov nepozorovali. Pozorovali sme iba ojedinelé difúzne lokalizované zmeny v interstíciu, ktoré poukazujú na zvýšenie proteínov medzibunkovej matrix.

Na záver možno zhrnúť, že výsledky tejto štúdie podporujú našu hypotézu a dokumentujú melatonínom vyvolanú „up-reguláciu“ myokardiálneho Cx43, pričom poukazujú na dôležitú úlohu tohto hormónu v modulácii citlivosti srdca vzhľadom na letálne arytmie. Na základe našich výsledkov pripisujeme antiarytmické účinky melatonínu zvýšeniu exprese Cx43 tak na génovej úrovni, ako aj zvýšeniu celkovej hladiny Cx43 na úrovni proteínu a jeho funkčných fosforylovaných foriem. Tieto účinky boli zistené veľmi výrazne u spontánne hypertenzných a v menšej miere u normotenzných potkanov. Treba zdôrazniť, že suplementácia melatonínom výrazne zmiernila negatívne dôsledky hypertenzie na kľúčový proteín v srdci, Cx43, ktorý je dôležitý pre zachovanie elektrických vlastností srdca a jeho funkciu.

Z klinického pohľadu je potrebné poukázať aj na to, že syntéza melatonínu je znížená u pacientov s ischemickou chorobou srdca (46, 47). Ak berieme do úvahy tieto skutočnosti



Obrázok 6 Expresia proteínkinázy C ε (PKCε) normalizovaná ku GAPDH v ľavej komore kontrolných a melatonínom suplementovaných SHR a WIS.

Figure 6 Protein kinase C ε (PKCε) expression normalized to GAPDH in the left ventricles of untreated and melatonin-treated spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar (WIS) rats

WISc – kontrolná skupina Wistar potkanov; WISm – Wistar potkany, ktorým sa podával melatonín; SHRc – kontrolná skupina spontánne hypertenzných potkanov; SHRm – SHR, ktorým sa podával melatonín. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty ± SD zo šiestich srdc. Štatistická významnosť *, $p < 0,05$ v porovnaní s WISc; a #, $p < 0,05$ v porovnaní s SHRc. (WIS – untreated WIS rats; WISm – WIS rats treated with melatonin; SHRc – untreated SHR; and SHRm – SHR treated with melatonin. Results are the mean ± SD of 6 hearts. *, $p < 0.05$ compared with WISc; #, $p < 0.05$ compared with SHRc).

a antiarytmické vlastnosti melatonínu, väčšiu pozornosť by bolo potrebné venovať prevencii deficiencie melatonínu, a to najmä dôsledným dodržiavaním tmavej nočnej fázy dňa.

Práca bola podporená VEGA 2/0046/12, APVV-SK-CZ-2013-0256 a SKS grantom.

Literatúra

1. Dhein S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19(6):229-241.
2. Severs NJ. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med* 2001;5(4):355-366.
3. Liu F, Gutstein DE. The cardiac gap junction: a potential therapeutic target in the treatment of heart disease. *Mt Sinai J Med* 2002;69(6):421-424.
4. Tribulova N, Manóach M. Factors determining spontaneous ventricular defibrillation. *Exp Clin Cardiol* 2001;6(2):109-113.
5. Tribulova N, Okruhlicova L, Imanaga I, Hirosawa N, Ogawa K, Weismann P. Factors involved in the susceptibility of spontaneously hypertensive rats to low K⁺-induced arrhythmias. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22(3):369-382.
6. Tribulová N, Knezl V, Okruhlicova L, Slezák J. Myocardial Gap Junctions: Targets for Novel Approaches in the Prevention of Life-Threatening Cardiac Arrhythmias. *Physiol Res* 2008;57(2):1-13.

7. Tribulova N, Seki S, Radosinska J, Kaplan P, Babusikova E, Knezl V, Mochizuki S. Myocardial Ca²⁺ handling and cell-to-cell coupling, key factors in prevention of sudden cardiac death. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87(12):1120-1129.
8. Bacova B, Radosinska J, Knezl V, Kolenova L, Weismann P, Navarova J, Barancik M, Mitasikova M, Tribulova N. Omega-3 fatty acids and atorvastatin suppress ventricular fibrillation inducibility in hypertriglyceridemic rat hearts: implication of intracellular coupling protein, connexin-43. *J Physiol Pharmacol* 2010;61(6):717-723.
9. Radošinská J, Knezl V, Benová T, Urban L, Tribulová N, Slezák J. Alterations of the intercellular coupling protein, connexin-43, during ventricular fibrillation and sinus rhythm restoration demonstrated in male and female rat hearts: A pilot study. *Exp Clin Cardiol* 2011;16(4):116-120.
10. Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Benova T, Zurmanova J, Soukup T, Arnostova P, Slezak J, Gonçalvesova E, Tribulova N. Dietary omega-3 fatty acids attenuate myocardial arrhythmogenic factors and propensity of the heart to lethal arrhythmias in a rodent model of human essential hypertension. *J Hypertens* 2013;31(9):1876-1885.
11. Benova T, Viczenczova C, Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarova J, Tribulova N. Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91(8):633-639.
12. Peters NS. New insight into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci (Lond)* 1996;90:447-452.
13. Salameh A, Dhein S. Pharmacology of Gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005;1719(1-2):36-58.
14. Manoach M, Tribulova N, Voglezang D, Thomas S, Podzuweit T. Transient ventricular fibrillation and myosin heavy chain isoform profile. *J Cell Mol Med* 2007;11:171-174.
15. Johansson BW. The hibernator heart- Nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 1996;31(5):826-832.
16. Tribulova N, Manoach M. Factors determining spontaneous ventricular defibrillation. *Exp. Clin Cardiol* 2001;6(2):109-113.
17. Saitongdee P, Milner P, Becker DL, Knight GE, Burnstock G. Increased connexin43 gap junction protein in hamster cardiomyocytes during cold acclimatization and hibernation. *Cardiovasc Res* 2000;47(1):108-115.
18. Sakotnik A, Liebmann PM, Stoschitzky K, Lercher P, Schauenstein K., Klein W, Eber B. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20(18):1314-1317.
19. Girotti L, Lago M, Ianowsky O, Carbajales J, Elizari MV, Brusco LI, Cardinali DP. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery diseases. *J Pineal Res* 2000;29(3):138-142.
20. Jonas M, Garfinkel D, Zisapel N, Laudon M, Grossman E. Impaired nocturnal melatonin secretion in non-dipper hypertensive patients. *Blood Press* 2003;12:19-24.
21. Simko F, Paulis L. Antifibrotic effect of melatonin – perspective protection in hypertensive heart disease. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2876-2877.
22. Simko F, Pechanova O, Pelouch V, Krajcirovicova K, Mullerova M, Bednarova K, Adamcova M, Paulis L. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 2009;27(6):5-10.
23. Simko F, Pechanova O, Pelouch V, Krajcirovicova K., Celec P, Palffy R, Bednarova K, Vrankova S, Adamcova M, Paulis L. Continuous light and L-NAME-induced left ventricular remodelling: different protection with melatonin and captopril. *J Hypertens* 2010;28(1):13-18.
24. Zeman M, Dulkova K, Bada V, Herichova I. Plasma melatonin concentrations in hypertensive patients with the dipping and non-dipping blood pressure profile. *Life Sci* 2005;76(16):1795–1803.
25. Mitašiková M, Šmidová S, Macsaliová A, Knezl V, Dluhošová K, Okruhlicová L, Weismann P, Tribulová N. Aged Male and Female Spontaneously Hypertensive Rats Benefit from n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation. *Physiol Res* 2008; 57(2):39-48.
26. Radošinská J, Bačová B, Knezl V, Beňová T, Žurmanová J, Soukup T, Arnoštová P, Slezák J, Gonçalvesová E, Tribulová N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids affect arrhythmogenic factors and attenuate susceptibility of the heart to malignant arrhythmias in an experimental model of human essential hypertension. *Cardiology Lett* 2014;23(1):10-16.
27. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De vivie ER, Dhein S. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(3):883-891.
28. Bačová B, Radošinská J, Viczenczová C, et al. Up-regulation of myocardial connexin-43 in spontaneously hypertensive rats fed red palm oil is most likely implicated in its anti-arrhythmic effects. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90:1235-1245.
29. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Moku-no S, Morishima I, Hira K, Toki Y, Ito T, Hayakawa T. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2000;67(2):101-112.
30. Szárszoi O, Asemu G, Vaněček J, Ošťádal V, Kolář F. Effects of Melatonin on Ischemia and Reperfusion Injury of the Rat Heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2001;15:251-257.
31. Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res* 2002;33(2):72-80.
32. Vazan R, Pancza D, Béder I, Styk J. Ischemia-reperfusion injury-antiarrhythmic effect of melatonin associated with reduced recovering of contractility. *Gen Physiol Biophys* 2005;24(3):355-359.
33. Lochner A, Genade S, Davids A, Ytrehus K, Moolman JA. Short-and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J Pineal Res* 2006;40(1):56-63.
34. Diez ER, Prados LV, Carrión A, Ponce ZA, Miatello RM. A novel electrophysiologic effect of melatonin on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts. *J Pineal Res* 2009;46(2):155-160.

35. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can the incidence of sudden cardiac death be reduced? *J Pineal Res* 2002;32(3):194-198.
36. Korkmaz A, Rosales-Corral S, Reiter RJ. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. *Gene* 2012;503(1):1-11.
37. Sharkey JT, Puttaramu R, Word RA, Olcese J. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(2):421-427.
38. Mitchell JA, Lye SJ. Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun Adhes* 2001;8(4-6):299-302.
39. Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 1998;2(3):175-190.
40. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998;78(3):687-721.
41. Cagnacci A, Arangino S, Angiolucci M, Maschio E, Melis GB. Influences of melatonin administration on the circulation of women. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998;274: 335-338.
42. Grossman E, Laudon M, Yalcin R, Zengil H, Peleg E, Sharabi Y, Kamari Y, Shen-Orr Z, Zisapel N. Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J Med* 2006;119(10):898-902.
43. Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007;42(4):319-322.
44. Paulis L, Simko F, Laudon M. Cardiovascular effects of melatonin receptor agonists. *Expert Opin. Investig Drugs* 2012;21(11):1661-1678.
45. Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Krajcirovicova K, Barta A, Pelouch V, Adamcova M, Simko F. Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-L-arginine-methyl ester hypertensive rats. *J Hypertens* 2009;27(6):11-16.
46. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuña-Castroviejo D. Reactive Oxygen Intermediates, Molecular Damage, and Aging. Relation to Melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998;20:410-424.
47. Sakotnik A, Liebmman PM, Stoschitzky K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W, Eber B. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20(18):1314-1317.