

Anti-fibrillating and defibrillating capability of atorvastatin, melatonin and omega-3 fatty acids demonstrated in acute conditions on isolated heart model

Antifibrilačná a defibrilačná schopnosť atorvastatínu, melatonínu a omega-3 mastných kyselín preukázaná pri akútnych podmienkach na modeli izolovaného perfundovaného srdca

Egan Beňová T¹, Knezl V², Vicenczová C¹, Szeiffova Bačová B¹, Radošinská J^{1,3}, Tribulová N¹

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

Egan Benova T, Knezl V, Vicenczova C, Szeiffova Bacova B, Radosinska J, Tribulova N. **Anti-fibrillating and defibrillating capability of atorvastatin, melatonin and omega-3 fatty acids demonstrated in acute conditions on isolated heart model.** Cardiology Lett. 2016;25(5):376–383

Abstract. *Objectives:* Cardioprotective compounds, atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DPA) show antiarrhythmic effects in clinical as well as in experimental studies, but their acute effects are less examined.

The aim of the study was to further our understanding of the effects of monitored antiarrhythmic agents and their ability to defibrillate the heart.

Methods: Experiments were performed on the isolated Langendorff perfused heart model. The effects of atorvastatin, EPA and DHA were studied in the heart of adult male and female rats with hereditary hypertriglyceridaemia (HTG) and the effects of melatonin were studied in the heart of old male and female laboratory guinea pigs. The threshold for electrically induced ventricular fibrillation was examined on the heart without treatment and following 10 min of exposure to atorvastatin (15 µmol), EPA (15 µmol), DHA (15 µmol) and melatonin (50 µmol). Moreover, a bolus of atorvastatin (150 µmol), EPA (150 µmol) and DHA (150 µmol) was applied to fibrillating hearts to test their defibrillating effects.

Results: Sustained ventricular fibrillation was induced in all untreated HTG rat hearts. In contrast, its incidence was reduced to 30% and 60% by atorvastatin; 70% and 75% by EPA, 60% and 60% by DHA in both male and female rat hearts respectively. Moreover, a bolus of EPA and DHA applied directly to the fibrillating heart restored sinus rhythm in 6 of 6 hearts and a bolus of atorvastatin in 4 of 6 hearts of HTG rats. The threshold to induce sustained ventricular fibrillation was 21.7 ± 3.8 mA in male and 38.3 ± 2.9 mA in female laboratory guinea pig hearts. Melatonin administration prevented the induction of persistent ventricular fibrillation regardless of the sex and even when exposed to the strongest (50 mA) stimulus.

Conclusion: The results clearly indicate acute antiarrhythmic effects of atorvastatin, EPA, DHA and melatonin. These findings bring new information for clinical cardiologists and encourage experimental cardiologists to study mechanisms of their acute effects. Fig. 4, Tab. 1, Ref. 43, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: ventricular fibrillation – atorvastatin – melatonin – eicosapentaenoic acid – docosahexaenoic acid

Z ¹Ústavu pre výskum srdca, Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, ²Ústavu experimentálnej farmakológie a toxikológie, Slovenská Akadémia Vied, Bratislava a ³Fyziologického ústavu Lekárskej fakulty UK v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 5. augusta 2016; prijaté dňa 8. augusta 2016

Adresa pre korešpondenciu: RNDr. Tamara Egan 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:

Benova T, Knezl V, Vicenczova C, Bacova BS, Radosinska J, Tribulova N. Acute anti-fibrillating and defibrillating potential of atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid demonstrated in isolated heart model. J Physiol Pharmacol 2015;66:83–89.

Egan Beňová T, Knezl V, Vicenciová C, Szeiffová Bačová B, Radošinská J, Tribulová N. **Antifibrilačná a defibrilačná schopnosť atorvastatínu, melatonínu a omega-3 mastných kyselín preukázaná pri akútnych podmienkach na modeli izolovaného perfundovaného srdca.** *Cardiology Lett.* 2016;25(5):376–383

Abstrakt. *Zámer:* Kardioprotektívne látky, atorvastatín, melatonín, kyselina eikozapentaénová (EPA) a dokozahexaénová (DPA) vykazujú antiarytmické účinky, tak v klinických, ako aj experimentálnych štúdiách, avšak ich akútne účinky sú menej známe.

Ciel: Z dôvodu prehĺbenia poznatkov o antiarytmických účinkoch sledovaných látok je cieľom predkladanej štúdie sledovať ich akútne antiarytmické účinky a schopnosť defibrilácie.

Metódy: Experimenty sa uskutočnili na Langendorffovom modeli izolovaného perfundovaného srdca. Účinky atorvastatínu, EPA a DHA sa sledovali na srdci dospelých samcov a samíc potkanov s hereditárnou hypertriacylglycerolémiou (HTG) a účinky melatonínu na srdci starších samcov a samíc laboratorného morčata. Citlivosť voči elektricky indukovanej pretrvávajúcej komorovej fibrilácii (KF) sa testovala na srdciach bez pôsobenia a po predchádzajúcom 10-minútovom pôsobení atorvastatínu (15 μ mol), EPA (15 μ mol), DHA (15 μ mol) a melatonínu (50 μ mol). Okrem toho sa aplikoval bolus atorvastatínu (150 μ mol), EPA (150 μ mol) a DHA (150 μ mol) počas fibrilácie srdca na testovanie defibrilačných účinkov týchto látok.

Výsledky: KF bola vyvolaná vo všetkých srdciach HTG potkanov, ktoré neboli ovplyvnené testovanými látkami. V porovnaní s tým sa jej výskyt znížil u samcov a samíc vplyvom atorvastatínu na 30 % a 60 %; vplyvom EPA na 70 % a 75 % a vplyvom DHA na 60 % a 60 %. Bolus EPA a taktiež DHA, aplikovaný počas fibrilácie srdca, obnovil sínusový rytmus u šiestich zo šiestich a bolus atorvastatínu u štyroch zo šiestich srdiec testovaných HTG potkanov. Prah na vyvolanie KF bol $21,7 \pm 3,8$ mA u samcov a $38,3 \pm 2,9$ mA u samíc laboratorného morčata. Podávanie melatonínu zabránilo vyvolaniu pretrvávajúcej KF nezávisle od pohlavia a pri použití maximálneho stimulačného prúdu (50 mA).

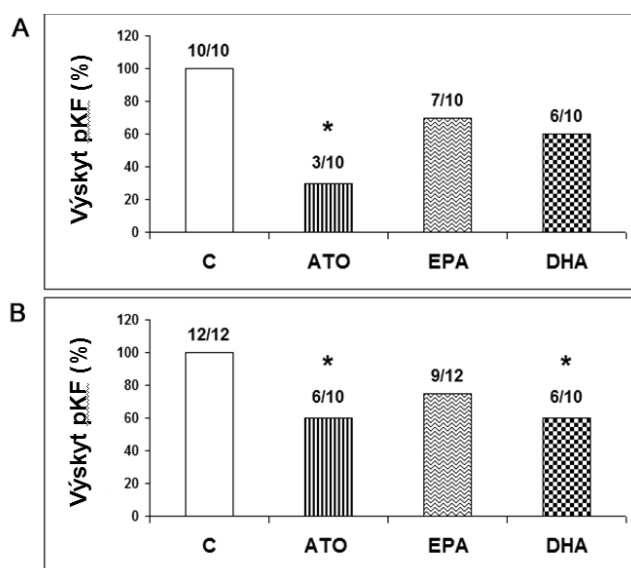
Záver: Výsledky jednoznačne poukazujú na akútne antiarytmické účinky atorvastatínu, EPA, DHA a melatonínu. Tieto zistenia prinášajú novú informáciu pre klinických kardiológov a podnecujú experimentálnych kardiológov k ďalšiemu skúmaniu mechanizmov ich akútnych účinkov. Obr. 4, Tab. 1, Lit. 43, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: komorová fibrilácia – atorvastatín – melatonín – kyselina eikozapentaénová – kyselina dokozahexaénová

Rýchle šírenie elektrického impulzu v srdcovom svalu je dôležité pre jeho synchronnú a koordinovanú činnosť. V tomto procese je dôležitý medzibunkový elektrický kontakt, ktorý zabezpečujú konexínové kanály tvorené najmä konexínom-43 (Cx43) (1). Naše predchádzajúce práce a taktiež štúdie iných poukazujú na to, že poruchy v medzibunkovej komunikácii spôsobené zmenou v expresii a fosforylácii Cx43, ako i v jeho abnormálnej lokalizácii prispievajú ku rozvoju arytmogénneho substrátu (2 – 5). K tvorbe arytmogénneho substrátu dochádza pri kardiovaskulárnych ochoreniach, ako i pri akútnom poškodení myokardu, čím sa zvyšuje riziko vzniku malígnych arytmií a náhlejšej srdcovej smrti. Napriek úspešnosti invazívnych intervencií (implantovateľný kardioverter-defibrilátor, ablačné techniky) je v manažmente malígnych arytmií stále potrebné preskúmanie nových, menej radikálnych a na prevenciu výskytu zameraných prístupov a látok s antiarytmickými účinkami (6). Benefit prevencie by mohol byť dokonca podstatnejší než včasná diagnostika a terapia rizikových pacientov (7). V súlade s týmto konceptom je potrebné poukázať na tzv. upstream terapiu, t. j. využitie potenciálu niektorých kardioprotektívnych liekov a endogénnych látok v prevencii alebo v obmedzení vzniku arytmogénneho substrátu (8). Túto predstavu podporuje zistenie, že atorvastatín a omega-3 mastné kyseliny (EPA a DHA), ktoré sa používajú v liečbe dyslipidemií, majú antiarytmické účinky tak u pacientov,

ako i v pokusoch na zvieratách (9 – 12). Mechanizmy ich účinku nie sú zatiaľ dostatočne objasnené, avšak je známe, že chránia pred poškodením myokardu vplyvom zápalu a oxidačného stresu (13, 14). Oba tieto procesy sa podieľajú na vzniku arytmogénneho substrátu vyvolaním zmien v expresii a lokalizácii Cx43 (15). Liečba hypertriacylglycerolemických a spontánne hypertenzných potkanov uvedenými látkami redukovala incidenciu KF, pričom antiarytmické účinky sa pripisovali významnej eliminácii abnormálnej distribúcie a expresie myokardiálneho Cx43 (16, 17). Ako prví sme taktiež zistili antiarytmické účinky melatonínu (18), cirkadiálneho hormónu, ktorý sa používa nielen pri liečbe nespavosti a chronodisrupcii, ale aj v kombinácii s antihypertenzívami. Medzi pleiotropné účinky melatonínu patria antioxidačné, radikály vychytávajúce a antifibrotické účinky (19, 20). Tieto sa veľmi pravdepodobne podieľali na zvýšenej expresii myokardiálneho Cx43 u hypertenzných potkanov, kým znížená expresia a abnormálna lokalizácia u melatonínom neovplyvnených zvierat prispievala ku zvýšenej incidencii KF.

Zámerom tejto štúdie bolo preskúmať antiarytmický potenciál atorvastatínu, EPA, DHA a melatonínu v akútnom experimente. Sledovali sme ich účinky po ich krátkodobej aplikácii na výskyt elektricky vyvolanej KF, ako aj ich schopnosť ukončiť fibriláciu s následnou obnovou sínusového rytmu.



Obrázok 1 Výskyt pretrvávajúcej komorovej fibrilácie (pKF) v srdciach samcov (A) a samíc (B) hypertriglyceridických potkanov v prítomnosti atorvastatínu (ATO), eikozapentaénovej kyseliny (EPA), dokozahexaénovej kyseliny DHA a u kontrolných srdc bez testovaných látok (C)

Figure 1 Incidence of sustained VF (sVF) in male (A) and female (B) hypertriglyceridemic rat hearts pretreated with atorvastatin (ATO), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and without pretreatment (C)

Materiál a metódy

Pre účely experimentov sa použili staršie zvieratá, ktoré sú náchylnejšie k malígnym arytmiám (5). Okrem toho je starnutie sprevádzané znížením plazmatických hladín melatonínu a omega-3 mastných kyselín.

Akútne účinky atorvastatínu, omega-3 mastných kyselín a melatonínu sa testovali použitím Langendorffovej metódy perfúzie izolovaného srdca okysličovaným Krebsovým-Henseleitovým roztokom (21). Bipolárne EKG, ľavokomorový tlak a indexy kontrakcie a relaxácie sa počas experimentu kontinuálne elektronicky zaznamenávali a uložené údaje sa vyhodnocovali príslušným počítačovým programom.

Akútne účinky atorvastatínu a esenciálnych omega-3 mastných kyselín (EPA a DHA) sa testovali na srdciach päťmesačných samcov (n = 40) a samíc (n = 44) HTG potkanov so zvýšeným systolickým tlakom krvi. Tento kmeň bol v predchádzajúcej štúdii použitý na testovanie chronických účinkov omega-3 mastných kyselín a atorvastatínu (16). Akútne účinky melatonínu boli v práci testované na 24-mesačných samcoch (n = 12) a samiciach (n = 12) laboratórnych morčiat (GP).

Experimentálny protokol perfundovaných srdc HTG potkanov podľa Langendorffa v skratke

1. Stabilizácia perfundovaného srdca (20 min); 2. Perfúzia srdca s testovanou látkou v koncentrácii 15 μ M (10 min)

alebo bez nej; 3. Elektrická „burst“ (100 pulzov/s) stimulácia srdca na vyvolanie pretrvávajúcej KF; 4. Pretrvávajúca KF (2 min); 5. Zastavenie perfúzie až po následné obnovenie sínusového rytmu.

Okrem tohto protokolu bol aplikovaný bolus (150 μ M) atorvastatínu, EPA alebo DHA počas fibrilácie srdca (n = 6/ pre každú látku) na testovanie defibrilačných účinkov.

Experimentálny protokol perfundovaných srdc laboratórneho morčáťa podľa Langendorffa v skratke

1. Stabilizácia perfundovaného srdca (20 min); 2. Perfúzia srdca s 50 μ M melatonínom (10 min) alebo bez neho; 3. Elektrická „burst“ (100 pulzov/s) stimulácia srdca na vyvolanie pretrvávajúcej KF stúpajúcou intenzitou prúdu od 10 mA do 50 mA (na zistenie fibrilačného prahu).

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Namerané hodnoty sme vyhodnotili ako aritmetický priemer $\pm$ smerodajná odchýlka (SD). Normalita rozdelenia údajov bola overená použitím Shapiroho-Wilkovho testu. Nepárový Studentov t-test sme použili na vyhodnotenie signifikantných rozdielov medzi sledovanými skupinami potkanov. Chi-kvadrát test sme použili na vyhodnotenie percenta fibrilujúcich srdc. Štatisticky signifikantné rozdiely sú: $p < 0,05$.

Výsledky

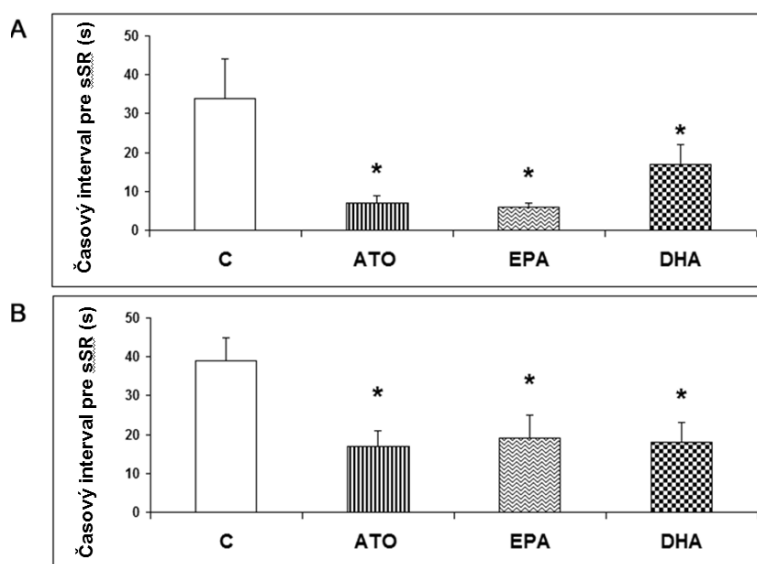
Vyhodnotením experimentov sa zistilo, že komorová fibrilácia bola vyvolaná v srdciach všetkých samcov (n = 10) a samíc (n = 12) kontrolných HTG potkanov (**obrázky 1A a 1B**). U samcov boli potrebné 3 – 4 stimuly na vyvolanie pretrvávajúcej komorovej fibrilácie, pričom u samíc bolo potrebných až 9 – 10 stimulov. Z uvedeného vyplýva, že citlivosť srdc voči vyvolaniu komorovej fibrilácie bola vyššia u samíc v porovnaní so samcami.

Perfúzia srdca s pridaním atorvastatínu významne znížila výskyt pretrvávajúcej KF u samcov (o 30 %) aj samíc (o 60 %) potkanov (**obrázky 1A a 1B**), t. j. KF nebola vyvolaná u siedmich z desiatich srdc samcov a u štyroch z desiatich srdc samíc.

Perfúzia srdca s pridaním DHA spôsobila signifikantné zníženie výskytu KF na 60 % u oboch pohlaví HTG potkanov (**obrázky 1A a 1B**).

Aplikácia EPA síce zabránila výskytu komorovej fibrilácie u troch z desiatich samcov a u troch z dvanástich samíc, avšak tento rozdiel nebol významný v porovnaní so srdcami bez aplikácie EPA (**obrázky 1A a 1B**).

Schopnosť srdc s vyvolanou komorovou fibriláciou navrátiť sínusový rytmus manévrom „stop-flow“ bola determinovaná časom od zastavenia perfúzie po registráciu sínusového EKG signálu. Obnova sínusového rytmu bola signifikantne



Obrázok 2 Časový interval potrebný na obnovenie sínusového rytmu (sSR) fibrilujúceho srdca u samcov (A) a samíc (B) hypertriglycerolemických potkanov v prítomnosti atorvastatínu (ATO), eikozapentaénovej kyseliny (EPA) a u kontrolných srdc (C) bez testovaných látok

Figure 2 Time to sinus rhythm restoration (sSR) in male (A) and female (B) hypertriglyceridemic rat hearts pretreated with atorvastatin (ATO), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and without pretreatment (C)

rýchlejšia tak u samcov, ako aj samíc potkanov vystavených atorvastatínu, EPA alebo DHA v porovnaní s kontrolnými skupinami potkanov (**obrázky 2A a 2B**).

Aplikácia bolusu tak EPA, ako aj DHA defibrilovala šesť zo šiestich srdc a atorvastatínový bolus defibriloval štyri zo šiestich srdc HTG potkanov.

Na **obrázku 3** sú znázornené reprezentatívne záznamy z experimentu. (A) Indukcia pretrvávajúcej komorovej fibrilácie „burst“ stimuláciou; (B) Ukončenie KF manévrom „stop flow“ a následné obnovenie sínusového rytmu; (C) Ukončenie KF bolusom DHA a následné obnovenie sínusového rytmu.

Perfúzia srdc HTG potkanov počas desiatich minút s testovanými látkami významne neovplyvnila funkčné parametre, ako sú srdcová frekvencia, koronárny prietok, tlak v ľavej komore a indexy kontrakcie a relaxácie.

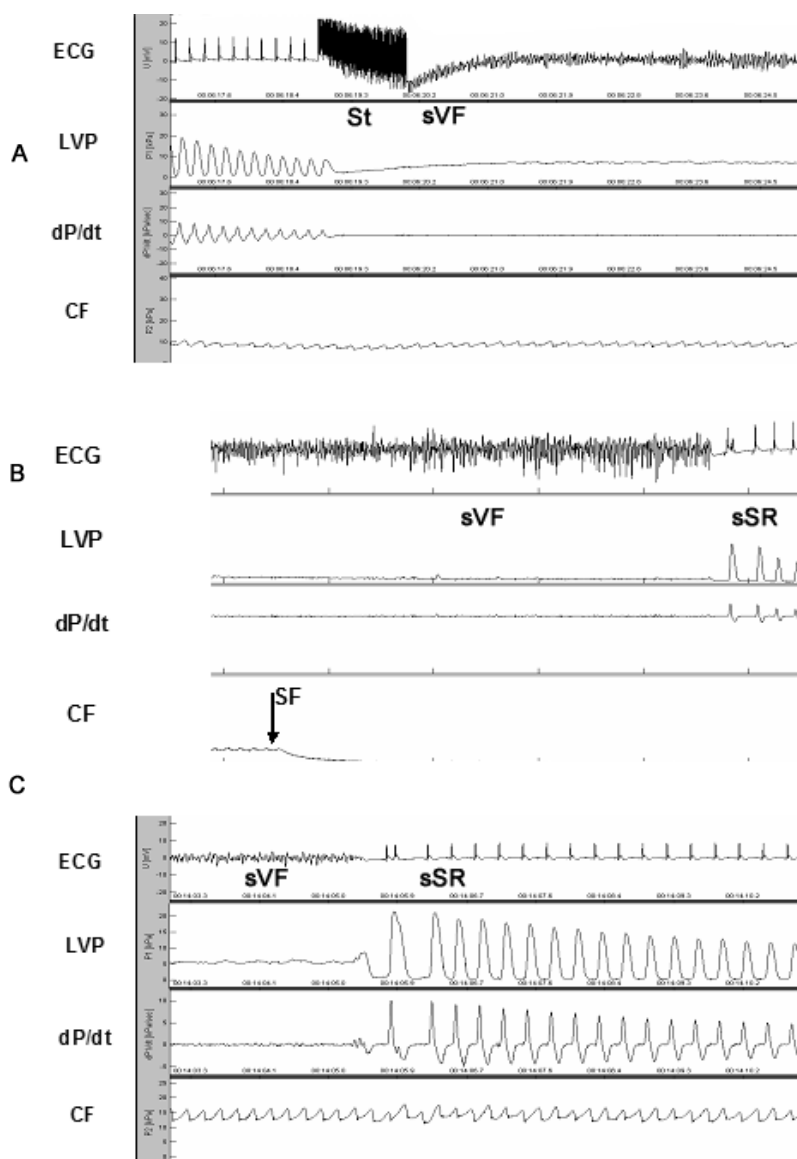
Experimenty na srdciach laboratórnych morčiat ukázali, že prah na vyvolanie pretrvávajúcej komorovej fibrilácie bol $21,7 \pm 3,8$ mA u samcov a $38,3 \pm 2,9$ mA u samíc. Ak sa aplikoval do perfúzneho roztoku melatonín, pretrvávajúca KF nebola vyvolaná ani pri maximálnom testovanom elektrickom stimule so silou prúdu 50 mA tak v srdciach samcov, ako ani samíc GP (**obrázok 4**). Perfúzia srdc melatonínom pred začatím elektrickej stimulácie nespôsobila zmeny v bazálnych hodnotách funkčných parametrov, ako je srdcová frekvencia, ľavokomorový tlak a indexy kontrakcie a relaxácie.

Diskusia

V tejto štúdii sme ako prví poukázali na akútne antiarytmické účinky melatonínu v srdciach starých samcov a samíc laboratórneho morčľa a na akútne antiarytmické účinky atorvastatínu v srdciach samcov a samíc hypertriglycerolemických potkanov. Melatonín významne zvyšoval stimulačný prah na vyvolanie pretrvávajúcej komorovej fibrilácie, testovaný v izolovanom perfundovanom srdci morčľa. Atorvastatín, podobne ako EPA a DHA, významne redukoval výskyt elektricky vyvolanej komorovej fibrilácie. Okrem toho sme zistili, že EPA, DHA a atorvastatín napomáhajú fibrilujúcemu srdcu navrátiť sínusový rytmus, čím poukazujú na ich defibrilačnú schopnosť. Bolo by zaujímavé preskúmať aj defibrilačný potenciál melatonínu. Výsledky tejto štúdie jednoznačne poukazujú na antiarytmické účinky látok, ktoré nepatria medzi klasické antiarytmické lieky. Na rozdiel od antiarytmik, ktoré môžu byť v istých situáciách pro-arytmické, takéto účinky sa nezistili pri nami testovaných látkach.

V súlade s našimi výsledkami ochranu proti komorovej fibrilácii vplyvom akútnej aplikácie EPA alebo DHA zistili aj iní autori v srdci kráľika (22), u psa s ischemiou indukovanou náhlou srdcovou smrťou (23) a u pacientov počas elektrofyziologického testovania rizika výskytu malígnej arytmie (24).

Mechanizmy antiarytmických účinkov tak akútnej, ako aj chronickej aplikácie omega-3 mastných kyselín nie sú však stále dostatočne objasnené. Akútne podávanie omega-3



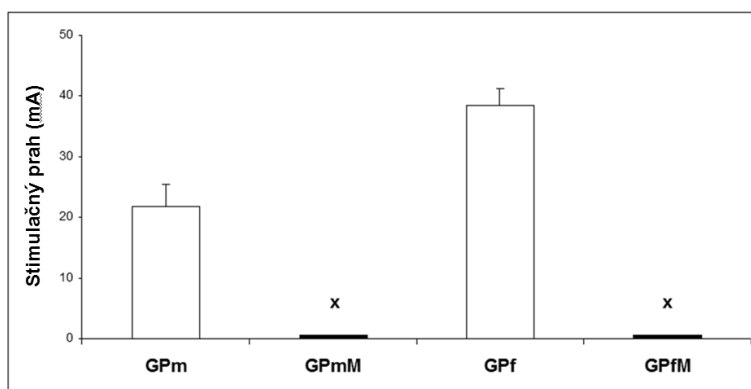
Obrázok 3 Reprezentatívne záznamy znázorňujúce A – elektrickou stimuláciou indukovanú pretrvávajúcu komorovú fibriláciu; B – ukončenie komorovej fibrilácie (sVF) a obnovenie sínusového rytmu zastavením perfúzie (SF) na < 40 s; C – ukončenie komorovej fibrilácie a obnovenie sínusového rytmu po aplikácii bolusu DHA počas fibrilácie srdca

Figure 3 Representative recordings showing electrical stimulation-induced sustained VF (A), stop perfusion-induced termination of sustained VF (B), restoration of sinus rhythm after bolus of DHA infused to the fibrillating heart (C)

ECG – elektrokardiogram (bipolar electrocardiogram); LVP – tlak v ľavej komore (left ventricular pressure); dP/dt – kontraktilita srdca (derivation of LVP development); CF – koronárny prietok (coronary flow); SF – zastavenie perfúzie srdca; St – burst elektrických stimulov (burst stimuli); sVF – pretrvávajúca komorová fibrilácia (sustained ventricular fibrillation); sSR – návrat sínusového rytmu (sinus rhythm restoration)

masných kyselín (25) spomalilo prúdy a) napäťovo riadených rýchlych sodíkových kanálov (I_{Na}), ktoré sú zodpovedné za rýchlosť šírenia akčného potenciálu (AP) a ovplyvňujú tak vedenie elektrických impulzov v myokarde, b) L-typ vápníkových kanálov, ktorý je zodpovedný za fázu plató AP a c) draslíkové (I_K) kanály, ktoré sú zodpovedné za repolarizáciu. Okrem toho omega-3 masné kyseliny ovplyvňujú

elektrofyziológiu srdca širokým spektrom rozličných vplyvov, a tak môžu pôsobiť antiarytmicky. Tieto účinky boli zohľadnené v štúdiu akútnych antiarytmických účinkov týchto látok v srdci kráľika (22). Pro-arytmické účinky omega-3 masných kyselín sú však zriedkavé (25). Omega-3 masné kyseliny tiež modulujú vápníkovú homeostázu v bunke, pričom zabránenie Ca^{2+} preťaženiu je veľmi dôležité v prevencii proti arytmiám



Obrázok 4 Stimulačný prah na vyvolanie pretrvávajúcej komorovej fibrilácie v srdciach samcov a samíc laboratórneho morčľa

Figure 4 Thresholds to induce sustained VF (sVF) in male and female guinea pig hearts

GPm – srdcia samcov bez aplikácie melatonínu (males GP heart without pretreatment); GPmM – srdcia samcov v prítomnosti melatonínu (males GP heart pretreated with melatonin); GPf – srdcia samíc bez aplikácie melatonínu (females GP heart without pretreatment); GPfM – srdcia samíc v prítomnosti melatonínu (females GP heart pretreated with melatonin)

Poznámka: Pretrvávajúca komorová fibrilácia nebola indukovaná v srdciach samcov a samíc GP (x) ani pri maximálnej testovanej intenzite elektrického prúdu (50 mA). (Note that sustained VF was not induced in male and female GP hearts (x) even after the highest stimulus strength 50 mA).

(5, 25). Zvýšené cirkulujúce hladiny omega-3 mastných kyselín vplyvom infúzie vedú k rýchlej inkorporácii do srdcovej fosfolipidovej membrány, kde môžu vykonávať svoj antiarytmický potenciál. To môže zohrávať úlohu v prevencii ischémie indukovanej komorovej fibrilácie akútnou infúziou omega-3 mastných kyselín do srdca psov (23). Berúc do úvahy uvedené informácie je veľmi pravdepodobné, že DHA a EPA môžu efektívne modulovať aj vodivosť Cx43 kanálov, a tak následne aj rýchlosť vedenia v myokarde. Predpokladáme, že funkcia Cx43 kanálov (elektrický kontakt „coupling“ a ich vodivosť) by mohla byť ovplyvnená membránovým lipidovým mikroprostredím a fosforyláciou Cx43, na ktorú poukazujú naše chronické experimenty (15). Pre overenie tejto hypotézy sú však potrebné ďalšie štúdie.

Na rozdiel od EPA a DHA nejstávajú údaje o tom, či môže melatonín ovplyvniť funkciu špecifických iónových kanálov. Je to však pravdepodobné, keďže melatonín je schopný predĺžiť trvanie akčného potenciálu (26). Melatonín je okrem iného schopný aj modulovať redoxný stav a bunkovú signalizáciu, vrátane aktivácie proteínkinázy C (PKC) (27). Tieto účinky sa prejavili aj up-reguláciou Cx43 po dlhodobom podávaní tohto hormónu hypertenzným potkanom (18). Melatonín bol schopný zabrániť reoxygénácii indukovanému medzibunkovému „un-couplingu“ a redistribúci Cx43 v kultivovaných astrocytoch potkanov (28). Z toho môžeme usudzovať, že melatonín by mohol akútne ovplyvniť elektrické vedenie sprostredkované myokardiálnymi Cx43 kanálmi cez Cx43 fosforyláciu. V tomto kontexte by bolo zaujímavé zistiť, či sú s melatonínom spojené akútne antiarytmické účinky sprostredkované cez melatonínové receptory, alebo nezávisle od nich. Zaujímavosťou je taktiež schopnosť melatonínu

ovplyvniť medzibunkový „coupling“ aj prostredníctvom modulácie fibroblastovej aktivity a premenou proteínov extracelulárnej matrix (29).

Čo sa týka akútnych antiarytmických účinkov atorvastatínu, môžeme sa zamýšľať, že podobne ako omega-3 mastné kyseliny, atorvastatín môže pravdepodobne modulovať zloženie a vlastnosti bunkovej membrány (ako je aj fluidita) prostredníctvom inhibície syntézy cholesterolu a jeho dostupnosti. Akútne podávanie simvastatínu sa prejavilo schopnosťou zlepšiť postischemickú reperfúziu indukovanú kontraktilnú dysfunkciu (30), čo možno čiastočne pripisovať k zlepšeniu myokardiálnej synchronizácie cez medzibunkový „coupling“. Predpokladáme, že antiarytmický účinok cirkulujúceho atorvastatínu, EPA a DHA je pravdepodobne spôsobený moduláciou funkcie Cx43 kanálov vplyvom zmeny membránového zloženia v blízkosti kanálov a/alebo fosforyláciou konexínu. Toto tvrdenie je podporené aj našou predchádzajúcou štúdiou (16), ako aj súčasným zistením, že statíny zabraňujú elektrickému remodelingu v srdciach diabetických potkanov (31) a modulujú PKC signalizáciu u spontánne hypertenzných potkanov (32). Atorvastatín bol navyše schopný inhibovať sekréciu proinflamačných mediátorov, ako sú cytokíny (IL-6, IL-8, MCP-1) a taktiež adhézných molekúl (sICAM-1) a proteínov extracelulárnej matrix (33). Tieto faktory môžu taktiež ovplyvniť medzibunkovú komunikáciu sprostredkovanú Cx43 kanálmi.

Fosforylácia Cx43 ovplyvňuje jeho prestup do membrány, zabudovanie do „gap junction“, bunkovú distribúciu, degradáciu a všeobecne aj funkciu Cx43 kanálov (34). Následne môže ovplyvniť celkové vedenie v myokarde (2, 35). Dlhodobé podávanie atorvastatínu, melatonínu a omega-3

Tabuľka 1 Proteínkinázy fosforylujúce myokardiálny konexín-43
Table 1 Protein kinases implicated in phosphorylation of myocardial Cx43

Proteínkinázy	Lokus fosforylácie
Proteínkináza A (PKA)	Serín 364,365,369,373
Proteínkináza C (PKC)	Serín 368
Proteínkináza G (PKG)	Serín 257
Mitogénom aktivovaná proteínkináza (MAPK)	Serín 255,279,282
v-Src tyrozínkináza (v-SrcTK)	Tyrozín 247,265
Kreatínkináza-1 (CK1)	Serín 325,328,330
Kalmodulín-dependentná kináza II (CAMKII)	Serín 269,385

masných kyselín bolo sprevádzané moduláciou fosforylovaného stavu Cx43 (jeho zvýšenie, respektíve normalizácia), čo bolo spojené s útlmom abnormálnej distribúcie Cx43, a tak spojené aj s protekciou voči KF (16, 18). Zmeny vo fosforylácii Cx43 boli pripisované najmä zvýšeniu exprese PKC epsilon (PKCε) aj napriek tomu, že viaceré proteínkinázy sa podieľajú na jeho priamej fosforylácii (tabuľka 1) a ich priamy účinok na vplyv atorvastatínu, melatonínu, EPA a DHA by mal byť cieľom ďalších plánovaných štúdií, keďže niektoré proteínkinázy inhibujú a iné zlepšujú funkciu Cx43 kanálov (36).

Vzhľadom na dostupné údaje, vrátane našich, zdá sa, že ochranu proti malígnym arytmiám možno dosiahnuť buď zlepšením (37), alebo čiastočnou inhibíciou Cx43 sprostredkovanej medzibunkovej komunikácie (38) so zreteľom na aktuálny stav srdca.

Predpokladáme, že ukončenie fibrilačnej aktivity a zno-voobnovenie sínusového rytmu závisí od čiastočného medzibunkového „un-couplingu“ v Cx43 kanáloch vplyvom krátkej ischémie (indukovanej zastavením perfúzie) (39). Podobne môže tento mechanizmus vysvetliť ukončenie KF nasledované obnovením sínusového rytmu indukovaným bolusom s obsahom vysokej koncentrácie atorvastatínu, EPA a DHA. Dôležité je poznamenať, že EPA, DHA, melatonín a atorvastatín vykazujú antiinflamačné, antioxidantné a skven-džerovské účinky, ktoré môžu prispieť k ich antiarytmickému potenciálu počas akútnej aj chronickej liečby. Ochrana Cx43 proti zvýšenému vplyvu voľných kyslíkových radikálov počas KF môže podporiť schopnosť srdca znovu obnoviť sínusový rytmus. Efektívna antioxidantná terapia bola navrhnutá pre manažment arytmií (40). Tieto skutočnosti poukazujú na to, že zdravý životný štýl (41), ktorý v sebe zahŕňa vyhýbanie sa zvýšenému príslu nasýtených masných kyselín, „svetelnému znečisteniu“ a nedostatku cvičenia, môže zlepšiť funkciu srdca a znížiť riziko vzniku arytmií. Táto štúdia poukazuje na medzipohlavné rozdiely v citlivosti srdca potkanov a morčiat proti malígnym arytmiám. Túto skutočnosť možno čiastočne vysvetliť aj zmenami v expresii myokardiálneho Cx43, napríklad vyššie hladiny Cx43 u samíc v porovnaní so samcami, tak ako na to poukazujú naše predchádzajúce štúdie (42, 43). Zaujímavosťou je, že akútne antiarytmické účinky atorvastati-

nu boli zreteľnejšie u samcov v porovnaní so samicami nami sledovaných zvierat. Tieto rozdiely vyžadujú objasnenie príčin tohto rozdielu v budúcich štúdiách.

Na záver môžeme skonštatovať, že zistenia našej štúdie poukazujú na zjavnú ochranu srdca proti letálnym arytmiám vplyvom akútnej aplikácie atorvastatínu, melatonínu, EPA a DHA, ako aj na schopnosť týchto látok navrátiť sínusový rytmus. Tieto výsledky predstavujú výzvu na skúmanie implikácie špecifických proteínkináz v modulácii funkcie Cx43 kanálov akútnym podávaním týchto látok. Výsledky takýchto štúdií by mohli prispieť k pokroku pre vývoj nových anti-arytmických prístupov v klinickej praxi.

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0046/12, 1/0032/14, 2/0167/15, APVV-0241-11, APVV-0348-12, APVV-15-0119 a SKS grantom.

Literatúra

- Severs NJ. Pathophysiology of gap junctions in heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;5:462-475.
- Severs NJ. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med* 2001;5:355-366.
- Kleber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 2004;84:431-488.
- Tribulova N, Manoach M, Varon D, Okruhlicova L, Zinman T, Shainberg A. Dispersion of cell-to-cell uncoupling precedes low K⁺-induced ventricular fibrillation. *Physiol Res* 2001;50:247-259.
- Tribulova N, Seki S, Radosinska J, et al. Myocardial Ca²⁺ handling and cell-to-cell coupling, key factors in prevention of sudden cardiac death. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:1120-1129.
- Lopshire JC, Zipes DP. Sudden cardiac death: better understanding of risks, mechanisms, and treatment. *Circulation* 2006;114:1134-1136.
- Albert CM, Stevenson WG. The future of arrhythmias and electrophysiology. *Circulation* 2016;133:2687-2696.
- Singh BN. Augmenting maintenance of sinus rhythm in the control of atrial fibrillation by antiarrhythmic drug combinations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2010;15:31-35.
- Anderson KP. Lipid-lowering therapy for prevention of ventricular tachyarrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:88-92.
- Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 2003;107:2646-2652.
- Mitchell LB, Powell JL, Gillis AM, Kehl V, Hallstrom AP, AVID Investigators. Are lipid lowering drugs also antiarrhythmic drugs? An analysis of the antiarrhythmics versus implantable defibrillators (AVID) trial. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:81-87.
- London B, Albert C, Anderson ME, et al. Omega-3 fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Dietary Supplements Omega-3

- Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation* 2007;116:e320-e335.
13. Al-Gubory KH. Mitochondria: omega-3 in the route of mitochondrial reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1569-1573.
 14. Chang CL, Deckelbaum RJ. Omega-3 fatty acids: mechanisms underlying „protective effects“ in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:345-350.
 15. Tribulova N, Egan Benova T, Szeiffova Bacova B, Vicenczova C, Barancik M. New aspects of pathogenesis of atrial fibrillation: remodelling of intercalated discs. *J Physiol Pharmacol* 2015;66:625-634.
 16. Bacova B, Radosinska J, Knezl V, et al. 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;61:717-723.
 17. Radosinska J, Bacova B, Knezl V, et al. 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;31:1876-1885.
 18. Benova T, Vicenczova C, Radosinska J, et al. Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. *Can J Physiol Pharmacol* 2013;91:633-639.
 19. Simko F, Paulis L. Antifibrotic effect of melatonin – perspective protection in hypertensive heart disease. *Int J Cardiol* 2013;168:2876-2877.
 20. Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007;42:319-322.
 21. Benova T, Knezl V, Vicenczova C, Bacova BS, Radosinska J, Tribulova N. Acute anti-fibrillating and defibrillating potential of atorvastatin, melatonin, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid demonstrated in isolated heart model. *J Physiol Pharmacol* 2015;66:83-89.
 22. Dhein S, Michaelis B, Mohr FW. Antiarrhythmic and electrophysiological effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; 371:202-211.
 23. Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999;99:2452-2457.
 24. Schrepf R, Limmert T, Claus Weber P, Theisen K, Sellmayer A. Immediate effects of n-3 fatty acid infusion on the induction of sustained ventricular tachycardia. *Lancet* 2004;363(9419):1441-1442.
 25. Den Ruijter HM, Berecki G, Opthof T, Verkerk AO, Zock PL, Coronel R. Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. *Cardiovasc Res* 2007;73:316-325.
 26. Diez ER, Prados LV, Carrion A, Ponce AZ, Miatello RM. A novel electrophysiologic effect of melatonin on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat hearts. *J Pineal Res* 2009;46:155-160.
 27. Strosberg AD, Nahmias C. G-protein-coupled receptor signalling through protein networks. *Biochem Soc Trans* 2007;35:23-27.
 28. Martinez AD, Saez JC. Regulation of astrocyte gap junctions by hypoxia-reoxygenation. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;32:250-258.
 29. Drobniak J, Tosik D, Piera L, et al. Melatonin-induced glycosaminoglycans augmentation in myocardium remote to infarction. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:737-744.
 30. Szarszoi O, Maly J, Osadal P, et al. Effect of acute and chronic simvastatin treatment on post-ischemic contractile dysfunction in isolated rat heart. *Physiol Res* 2008;57:793-796.
 31. Ozturk N, Yaras N, Ozmen A, Ozdemir S. Long-term administration of rosuvastatin prevents contractile and electrical remodelling of diabetic rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 2013;45:343-352.
 32. Qiu Z, Zhang W, Fan F, et al. Rosuvastatin-attenuated heart failure in aged spontaneously hypertensive rats via PKCa/b2 signal pathway. *J Cell Mol Med* 2012;16:3052-3061.
 33. Korybalska K, Kawka E, Breborowicz A, Witowski J. Atorvastatin does not impair endothelial cell wound healing in an in vitro model of vascular injury. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:389-395.
 34. Herve JC. The communicating junctions, composition, structure and characteristics. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:1803-1806.
 35. Meyer R, Schreckenberger R, Kraus D, Kretschmer F, Schulz R, Schlüter KD. Cardiac effects of osteostatin in mice. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:17-22.
 36. Chen VC, Gouw JW, Naus CC, Foster LJ. Connexin multisite phosphorylation: Mass spectrometry-based proteomics fills the gap. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828:23-24.
 37. Dhein S, Hagen A, Jozwiak J, et al. Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010;381:221-234.
 38. Rohr S, Kucera JP, Fast VG, Kleber AG. Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science* 1997;275:841-844.
 39. Radosinska J, Knezl V, Benova T, Urban L, Tribulova N, Slezak 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;16:116-120.
 40. Sovari AA, Bonini MG, Dudley SC. Effective antioxidant therapy for the management of arrhythmia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;9:797-800.
 41. Sakr HF. Modulation of metabolic and cardiac dysfunctions by swimming in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet: possible role of adiponectin. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:231-240.
 42. Tribulova N, Dupont E, Soukup T, Okruhlicova L, Severs NJ. Sex differences in connexin-43 expression in left ventricles of aging rats. *Physiol Res* 2005;54:705-708.
 43. Mitasikova M, Smidova S, Macsaliova A, et al. Aged male and female spontaneously hypertensive rats benefit from n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation. *Physiol Res* 2008;57:39-48.