

Necroptosis-mediated damage of atrial myocardium – another proarrhythmic factor of atrial fibrillation?

Nekroptózou sprostredkované poškodenie atriálneho myokardu – ďalší proarytmogénny faktor vzniku fibrilácie predsiení?

Horváth C¹, Jarabíková I¹, Beňa M², Beňačka O³, Hulman M^{2,4}, Hlivák P^{3,5}, Hatala R^{3,5}, Duriš Adameová A¹

¹Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

Horvath C, Jarabikova I, Bena M, Benacka O, Hulman M, Hlivak P, Hatala R, Duris Adameova A. **Necroptosis-mediated damage of atrial myocardium – another proarrhythmic factor of atrial fibrillation?** Cardiology Lett. 2021;30(3–4):159–167

Abstract. Atrial fibrillation (AF) is the most common heart rhythm disorder worldwide, with a dominant position in the epidemiology of cardiovascular diseases. In spite of a number of various therapeutic approaches for the restoration and/or maintenance of sinus rhythm, the mortality of patients with AF is twice as high as in patients with sinus rhythm. This suggests that other, so far unknown, factors are likely responsible for atrial damage, and that targeting such factors might be more beneficial in the management of AF. It is known that besides electrical and contractile remodelling, structural remodelling of atria, particularly due to inflammation-related fibrosis, also plays an important role in the complex pathophysiology of AF. Inflammatory response is also closely associated with recently discovered necroptotic cell death, which is defined as a RIP3–MLKL-driven cell death modality with a necrosis-like phenotype. It has been shown that necroptosis is implemented in the pathogenesis of ischemic heart disease as well as heart failure. In this study, we present a hypothesis about a plausible role of necroptosis in the atrial damage and its linkage with inflammation which may result in AF. The individual premises of our hypothesis are based on the results of a pilot study and on the basis of them we indicate future direction of research in this field of cardiology. Fig. 4, Ref. 62, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: atrial fibrillation – necroptosis – inflammation

Horváth C, Jarabíková I, Beňa M, Beňačka O, Hulman M, Hlivák P, Hatala R, Duriš Adameová A. **Nekroptózou sprostredkované poškodenie atriálneho myokardu – ďalší proarytmogénny faktor vzniku fibrilácie predsiení?** Cardiology Lett. 2021;30(3–4):159–167

Abstrakt. Fibrilácia predsiení (FP) je celosvetovo najrozšírenejšia srdcová arytmia dospelých populácie. Má dominantné postavenie v epidémii kardiovaskulárnych chorôb. Napriek rozmanitým terapeutickým prístupom používaným na navodenie a/alebo udržanie sínusového rytmu, je mortalita pacientov s FP dvojnásobná oproti pacientom so zachovaným sínusovým rytmom. Táto skutočnosť naznačuje, že pravdepodobne existujú ďalšie faktory, ktoré sú zodpovedné za poškodenie predsiení, a že ich moduláciou by mohla byť terapia FP podstatne účinnejšia. Je známe, že v komplexnej patofyziológii FP má dôležitú úlohu okrem elektrickej a kontraktilnej aj štrukturálna remodelácia predsiení v dôsledku fibrotizácie funkčného tkaniva, na ktorej sa

Z ¹Katedry farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava, ²Oddelenia kardiokirurgie, NÚSCH, a. s., Bratislava, ³Oddelenia arytmií a kardiostimulácie, NÚSCH, a. s., Bratislava, ⁴Kardiokirurgickej kliniky LFUK a NÚSCH, a. s., Bratislava a ⁵Kliniky kardiológie a angiológie Lekárskej fakulty Slovenskej zdravotníckej univerzity a NÚSCH, a. s., Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 16. júna 2021; prijaté dňa 30. júna 2021

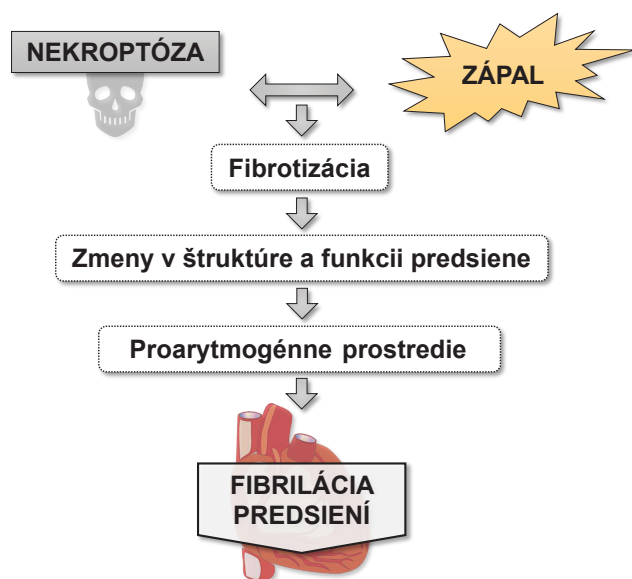
Adresa pre korešpondenciu: prof. PharmDr. Adriana Duriš Adameová, PhD., Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika; e-mail: adriana.duris.adameova@uniba.sk

významne podieľa aj zápal. Zápalová odpoveď je prítomná aj pri novoobjavenej nekroptotickej bunkovej smrti, ktorá je definovaná ako bunková smrť závislá od RIP3–MLKL signalizácie s fenotypom podobným nekróze. Úloha nekroptózy je nespochybniteľná v patogenéze ischemickej choroby srdca a zlyhávajúceho srdca. V tejto práci prezentujeme hypotézu o poškodení predsiení srdca v dôsledku nekroptózy a jej prepojenia so zápalom, čo môže vyústiť do FP. Jednotlivé premisy našej hypotézy vychádzajú z výsledkov pilotnej štúdie a na ich základe navrhujeme ďalšie smerovanie výskumu v tejto oblasti kardiológie. Obr. 4, Lit. 62, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: fibrilácia predsiení – nekroptóza – zápal

Je známe, že fibrilácia predsiení (FP) môže negatívne ovplyvniť homeostázu organizmu. Môže byť zodpovedná za menej závažné stavy, ktoré sú pre pacienta takmer asymptomatické, ale aj za stavy, ktoré výrazne zhoršujú kvalitu života alebo dokonca môžu viesť až k invalidizácii chorého (1). Tento typ supraventrikulárnej arytmie sa vyskytuje až u 3 % dospeléj populácie (2, 3) a má rastúcu prevalenciu u oboch pohlaví, hoci u žien je absolútne číslo väčšie vzhľadom na vyšší vek dožitia (4). Preto je pochopiteľné, že FP vzbudzuje nielen medicínsky, ale aj socio-ekonomický záujem. Hoci nepravidelný rytmus srdca je klinikom stáročia známy ako „arrhythmia perpetua vera“, exaktná diagnóza FP bola možná až po objavení elektrokardiografie Willemom Einthovenom na začiatku minulého storočia. V súčasnosti už vedecká a klinická komunita disponujú veľkým množstvom poznatkov o jednotlivých klinických formách FP, o mechanizmoch jej vzniku, o rizikových faktoroch, ktoré vedú k jej vzniku a progresii, a tiež o jej spojitosti s inými ochoreniami srdca, či ďalších orgánov, predovšetkým mozgu (2, 4 – 6). Aj na základe toho bolo identifikovaných niekoľko efektívnych

farmakologických a nefarmakologických intervencií pre liečbu FP (2, 3). Avšak aj napriek tomu, u mnohých pacientov s FP dnes dostupná terapia nevedie k navodeniu alebo udržaniu sínusového rytmu. Nedostatočná dlhodobá efektívnosť všetkých súčasných terapií preto evokuje otázku, či v arytmogénnej FP nehrajú významnú úlohu aj doposiaľ málo známe mechanizmy poškodenia atriálneho myokardu. V predloženej publikácii predstavujeme hypotézu o možnej úlohe nekroptózy – bunkovej smrti podobnej nekróze a jej prepojení so zápalom (**obrázok 1**). V rámci tejto paradigmy prezentujeme tiež pilotné výsledky štúdie, ktorá bola schválená Etickou komisiou Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb, a. s. (NÚSCH, a. s.). Molekulárne analýzy boli vykonané na vzorkách ušíek ľavých predsiení odobratých od pacientov podstupujúcich chirurgický zákrok v NÚSCH, a. s. v Bratislave, a to na základe vopred podpísaného informovaného súhlasu. Do štúdie boli zahrnutí pacienti so známou fibriláciou predsiení podstupujúci revaskularizáciu myokardu pre závažnú koronárnu chorobu srdca. Exklúznymi kritériami bola prítomnosť srdcového zlyhávania, dysfunkcie ľavej komory, diabetes mellitus a závažné ochorenia srdcových chlopní.



Obrázok 1 Schematické znázornenie prepojenia nekroptózy a zápalu s patomechanizmami fibrilácie predsiení

Základná charakteristika a patomechanizmy FP

FP predsiení vzniká najčastejšie v kontexte prítomného štrukturálneho ochorenia srdca, nezriedka však môže ísť aj o prvý prejav takého postihnutia, ktoré nemusí byť ešte manifestné – v týchto prípadoch hovoríme o „idiopatickej“ FP (v anglickej terminológii tzv. „lone“ FP). Týmto sprievodným ochorením je najčastejšie artériová hypertenzia, ktorá je prítomná až u 80 – 90 % pacientov s FP (3). Medzi rizikové faktory pre vznik FP patria popri takmer všetkých kardiovaskulárnych ochoreniach aj choroby iných orgánových systémov (obezita, pľúcne ochorenia, obštrukčné spánkové apnoe, chronické obličkové zlyhávanie, hypertyreóza a iné) (1 – 3, 7). Okrem týchto rizikových faktorov sa podarilo identifikovať aj niekoľko genetických variácií súvisiacich so zvýšenou náchylnosťou pre vznik FP (8). Vzhľadom na trvanie a klinickú charakterizáciu môžeme FP rozdeliť na niekoľko typov: **paroxyzmálnu** (pxFP; arytmičné epizódy, ktoré spontánne vymiznú zvyčajne do 48 hodín), **perzistentnú**

(pzFP; arytmičné epizódy trvajúce > 7 dní bez spontánneho vymiznutia) a **permanentnú** (pFP; pokračujúce, dlhotrvajúce arytmie). Vývoj FP najčastejšie začína tichými a nediagnostikovanými arytmiickými periódami, ktoré postupne prechádzajú do pxFP a následne do dlhotrvajúcich chronických typov FP (pz-/pFP) (9). Okrem toho sa na klinikách ešte stretávame s tzv. postoperačnou FP, ktorá vzniká po kardiálnom chirurgickom zákroku a spôsobuje dlhší čas hospitalizácie, ako aj zvýšenú morbiditu či mortalitu (10, 11).

Patofyziológia FP je vysokokomplexný proces a aj napriek veľkému úsiliu klinikov a vedcov z rôznych vedeckých oblastí, nie je úplne objasnená. Zvyčajne sa uvažuje, že dochádza k dysregulácii autonómneho nervového systému a/alebo abnormálnej Ca^{2+} dynamike, čo vedie k elektrickým, kontraktilným a štrukturálnym zmenám v predsieňovom tkanive (12, 13). Z elektrofyziológického hľadiska sú kľúčovými faktormi arytmogénny pri FP re-entry a abnormálna ektoická aktivita, pričom tieto patologické procesy sú ďalej podporované štrukturálnymi zmenami – fibrotizáciou a dilatáciou predsiení srdca (14). Z vedeckých dát je zjavné, že na procese predsieňovej fibrotizácie sa spolupodieľa niekoľko patogenetických mechanizmov, vrátane oxidačného stresu (OS) a zápalu (15, 16). Napriek tomu sa ich potenciálna implikácia do patofyziológie FP pomerne často prehliada a zanedbáva.

V prípade OS, ktorý často koexistuje spolu so zápalom, sa v kontexte FP prikladá dôraz na dva dôležité zdroje reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v myokarde – NADPH oxidázu (NOX) a NO syntázu (17, 18). Zvýšená aktivita NOX, napríklad angiotenzínom II sprostredkovanou indukciou (18), vedie k stimulácii transformačného rastového faktora beta (TGF- β) a následnej aktivácii signalizácie zodpovednej za fibrotizáciu, ktorá, ako už bolo uvedené, podporuje predsieňovú arytmogénu (19, 20). Ďalším „downstream“ substrátom ROS, ktorý priamo súvisí so zvýšeným rizikom vzniku pro-arytmogénneho prostredia pri FP, sa zdá byť od Ca^{2+} /kalmodulínu závislá proteínkináza II (CaMKII). Bolo navrhnuté, že jej oxidaatívna modifikácia na metionínových zvyškoch (oxMet281/282-CaMKII) spôsobuje elektrickú, kontraktilnú aj štrukturálnu remodeláciu predsiení (21, 22). Medzi ďalšie proarytmogénne mechanizmy súvisiace s OS patrí oxidaatívna modifikácia katecholamínov, ktoré spúšťajú viacero patologických signalizácií, napríklad zvýšenú stimuláciu beta-adrenergných receptorov, apoptózu, štrukturálnu remodeláciu, ale aj ďalšiu tvorbu ROS, čím sa bludný kruh OS ešte viac amplifikuje (23, 24). Napriek týmto zisteniam však naďalej jestvujú pochybnosti o mechanizme implikácie OS do patogenézy FP, keďže vo viacerých klinických štúdiách sa nepodarilo dokázať benefit antioxidačnej terapie v manažmente FP (25). Z tohto dôvodu európske odporúčania pre diagnózu a manažment FP nezaraďujú antioxidačnú terapiu do armamentária pre prevenciu a liečbu tejto arytmie (2, 3). Dlhodobo sa vedie diskusia o tom, čo je príčinou zlyhania antioxidačnej terapie pri FP. Istým vysvetlením môže byť

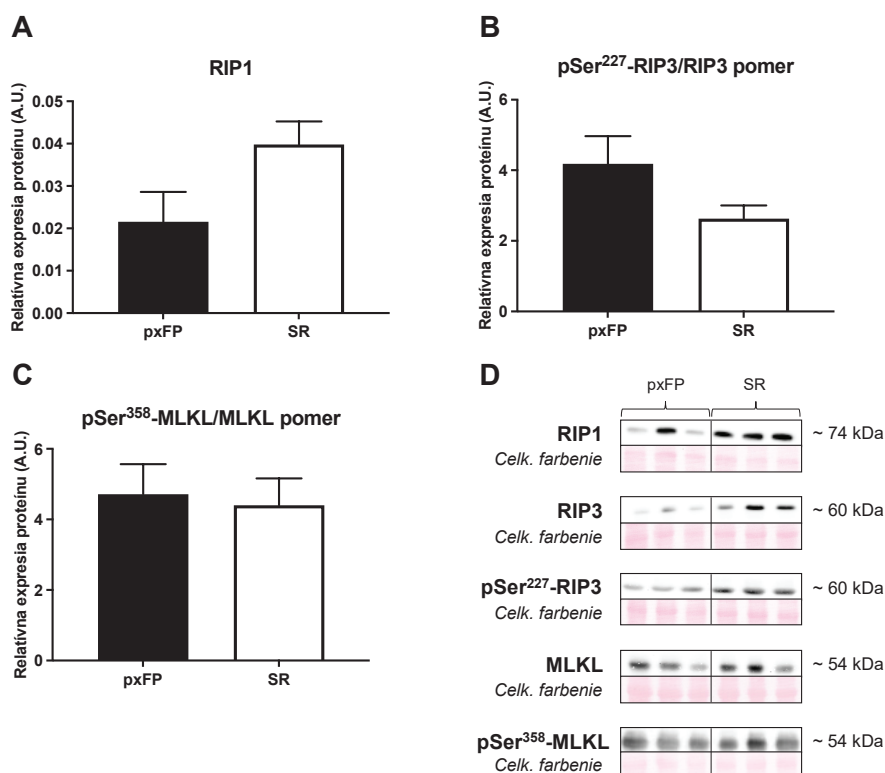
skutočnosť, že intervencie zmierňujúce OS nie sú nasmerované na tie celulórne/subcelulórne zdroje ROS v myokarde, ktoré sú v daných podmienkach zodpovedné za zmenu redoxnej rovnováhy. V tejto súvislosti možno spomenúť aj skutočnosť, že jednotlivé typy FP môžu byť charakterizované rozličnými formami OS (akútnym/chronickým), ktoré vedú k prechodným alebo trvalým molekulárnym a celulórnym zmenám (25, 26). Antioxidačné intervencie sa preto v súčasnosti nepovažujú za overený antiarytmický prístup vhodný pre klinické použitie.

Čo sa týka vzťahu zápalu a FP, nedávna štúdia s relatívne veľkým počtom pacientov odhalila asociáciu medzi prevalenciou FP a zvýšenými hladinami prozápalových markerov – c-reaktívneho proteínu (CRP) a interleukínu (IL)-6, a to rovnako tak u pacientov trpiacich kardiovaskulárnym ochorením, ako aj u zdánlivo zdravých pacientov (27). Rovnako sa našla pozitívna korelácia medzi zvýšenou hladinou cirkulujúceho IL-1 β (28) a IL-18 (29) a progresiou pxFP na pFP. Iná štúdia pri progredujúcej FP poukázala na zvýšenú expresiu aj aktivitu tzv. NLRP3 inflamazómu (NACHT, LRR and PYD domain containing protein 3) (30). Výsledkom uvedenej aktivácie NLRP3 je zvýšené štiepenie jeho hlavného „downstream“ substrátu – kaspázy-1 (30) a následná tvorba prozápalového IL-1 β (31). Je vhodné poznamenať, že signalizácia sprostredkovaná NLRP3 inflamazómom je úzko prepojená aj s bunkovou smrťou – **nekroptózou** (32). Tento typ „necrosis-like“ bunkovej smrti vykazuje fenotyp nekrózy, avšak na rozdiel od nej je striktné regulovaný a je závislý od signalizácie sprostredkovejanej s receptorom interagujúcou proteínkinázou 3 (RIP3) a MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein; pozn.: pre túto molekulu zatiaľ neexistuje slovenský názov) (33). V „typickej“ kanonickej nekroptotickej signalizácii vytvárajú aktívne, fosforylované molekuly RIP3 proteínový komplex amyloidnej štruktúry, tzv. nekrozóm, ktorého súčasťou môže byť aj RIP1 (34), čo následne aktivuje cytotoxickú MLKL (35). Takto stimulovaná MLKL tvorí oligoméry, ktoré translokujú do cytoplazmatickej membrány a navodzujú jej ruptúru prostredníctvom permeabilizácie a/alebo tvorby nešpecifických pórov či neselektívnych iónových kanálov (36 – 38). Morfologicky tieto zmeny vykazujú nekrotický fenotyp. Od samotného objavenia nekroptózy v roku 2005 (39) výskum v tejto oblasti pokročil a dnes už vieme, že táto forma bunkovej smrti predstavuje integrovanú súčasť patogenézy mnohých kardiovaskulárných ochorení, vrátane tých, ktoré sprevádza ischemicko-reperfúzne poškodenie myokardu (40, 41) a srdcového zlyhávania (42 – 44). Nekroptóza sa zdá byť dôležitá aj pri ďalších ochoreniach, napríklad neurodegeneratívne ochorenia, intra-artikulárna trauma s následným vývojom osteoartritydy, infekčné ochorenia – cytomegalovírusová infekcia, HIV infekcia a podobne. Tieto poznatky zdôrazňujú potrebu ďalšieho štúdia nekroptózy a to aj v kontexte jej systémových dôsledkov, ktoré môžu sekundárne indukovať nekroptotickú

smrť v myokarde a tak ovplyvniť jeho morfológiu a funkciu srdca (45, 46). Na rôznych modeloch ischemicko-reperfúzneho poškodenia srdca (akútny aj chronický) a modeloch srdcového zlyhávania (ischemická kardiomyopatia, polievkové srdcové zlyhávania, dilatčná kardiomyopatia a podobne) bolo dokumentované zvýšenie hladín hlavných nekroptotických markerov v srdci (RIP1, RIP3 a MLKL) (40 – 43, 47). Uvažuje sa, že zvýšené cirkulujúce hladiny RIP3 v krvi môžu byť významným diagnostickým a prognostickým markerom poškodenia myokardu (48, 49). Na druhej strane, limitácia nekroptotického odumierania podaním látok podobných chemickej štruktúre hydantoínov – nekrostatínov, môže byť významným kardioprotektívnym nástrojom (40, 50 – 52). Prostredníctvom inhibície nekroptotickej signalizácie na úrovni RIP1 alebo RIP3 došlo jednak k zlepšeniu obnovenia postischemickej srdcovej činnosti, ale aj k redukcii veľkosti infarktového ložiska a nežiaducej srdcovej remodelácie u potkanov (41, 53), myši (54, 55), morských prasiat (51) i prasiat (52).

O implikácii nekroptózy do patomechanizmov FP neboli doposiaľ publikované žiadne štúdie, hoci známe poznatky

o jej signalizácii a jej prepojení so zápalom môžu indikovať istú úlohu. Na overenie tejto hypotézy sme uskutočnili pilotnú štúdiu, kedy sme tkanivo odobraté počas operácie srdca pri otvorenom hrudníku z uška ľavej predsene pacientov s pxFP podrobili molekulárnej analýze pomocou SDS-PAGE a Western Blotting. Množstvo ani aktivácia RIP1 kinázy, ktorá môže slúžiť ako aktivátor RIP3 (33), neboli zmenené u pacientov s pxFP v porovnaní s pacientmi so sínusovým rytmom (**obrázok 2A**). Vzhľadom na stimuláciu nekroptotického odumierania sa však v súčasnosti kladie väčší dôraz na samotnú RIP3 kinázu (34, 43), práve na základe ktorej sa našlo prepojenie aj medzi nekroptotickou signalizáciou a zápalovými procesmi (32). Zaujímavosťou bolo, že aktivácia RIP3 vo forme jej fosforylácie bola mierne zvýšená pri pxFP, avšak tieto hodnoty nedosahovali štatistický význam (**obrázok 2B**). Súčasne ale nedošlo k zmene miery fosforylácie cytotoxického, pór-formujúceho proteínu MLKL, ktorý je zodpovedný za dokonanie nekroptózy (36) (**obrázok 2C**). Dosiahnuté výsledky teda priamo nenaznačujú aktiváciu kanonickej nekroptotickej dráhy u pacientov trpiacich pxFP, avšak naznačujú potenciálnu stimuláciu RIP3

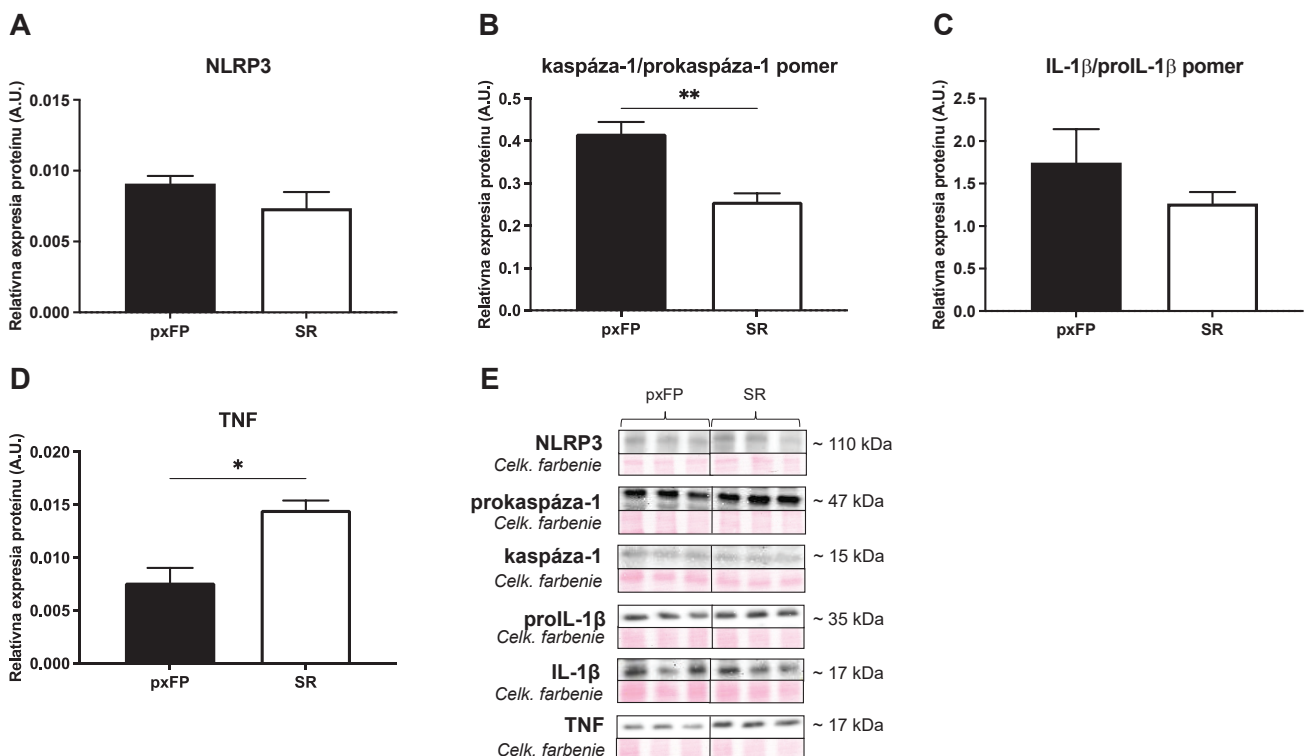


Obrázok 2 Imunoblotová analýza expresie pro-nekroptotických proteínov: A) s receptorom interagujúca proteínkináza 1 (RIP1). B) pomer pSer²²⁷-RIP3/RIP3. C) pomer pSer³⁵⁸-mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)/MLKL u pacientov trpiacich ischemickou chorobou srdca a súčasne paroxysmálnou fibriláciou predsiení (pxFP) alebo so zachovaným sínusovým rytmom (SR). D) Reprezentatívne imunoblotty so znázornením celkového farbenia membrán pre daný proteín. Dáta sú prezentované ako priemer ± SEM, s počtom vzoriek n = 3.

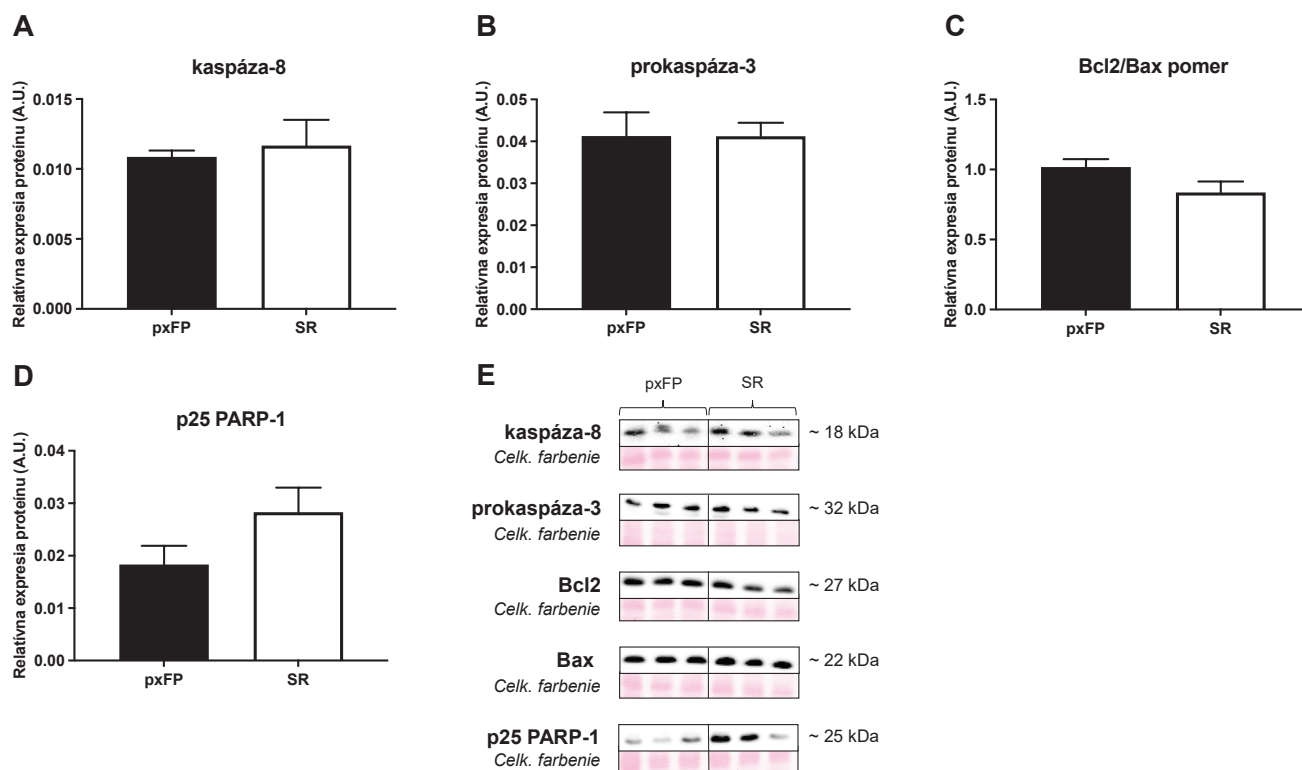
kinázy. Možno poznamenať, že paroxysmálna forma FP je krátkodobá, a teda pravdepodobne existujú zmeny, ktoré nie sú dostatočné na to, aby došlo k úplnému rozvinutiu nekroptotickej signalizácie a samotnému odumieraniu buniek srdca. Naopak, pri dlhšie trvajúcich, závažnejších formách FP by zmeny v predsieniach v dôsledku nekroptózy mohli byť výraznejšie. Dalo by sa tiež uvažovať, že by mohli byť (spolu-) príčinou fibrotizácie predsiení srdca. V súlade s myšlienkou významu zápalu a prepojenia s nekroptózou sme sa zamerali na dráhy súvisiace s NLRP3. U pacientov s pxFP sme identifikovali mierne zvýšenú expresiu NLRP3 (**obrázok 3A**). Pri chronických formách FP, ako bolo uvedené vyššie, bola zaznamenaná zvýšená expresia i aktivita NLRP3 (30). Downstream efektor – kaspáza-1, vykazoval v našich vzorkách s pxFP signifikantne zvýšené štiepenie, a teda aktiváciu (**obrázok 3B**). „Koncový hráč“ tejto signalizácie – IL-1b bol nesignifikantne zvýšený u pacientov s pxFP (**obrázok 3C**). Ďalšou analyzovanou prozápalovou molekulou bolo TNF. Literárne dáta síce naznačujú súvislosť medzi zvýšenými hladinami tohto cytokínu ako ďalšieho pôvodcu predsieňovej štrukturálnej i elektrickej remodelácie (56), avšak prekvapivo bola v našom prípade hladina TNF u pacientov s pxFP znížená. Možno teda konštatovať, že

v prípade NLRP3 asociovanej prozápalovej dráhy sme síce naznačili jej úlohu, avšak jej aktivácia na úrovni jednotlivých signálnych molekúl nebola jednoznačne dokázaná.

Keďže molekulárne signalizácie nekroptózy sú úzko prepojené, a to najmä pri jej iniciácii, s apoptózou (57), preskúmali sme aj niektoré znaky apoptotickej bunkovej smrti. O zapojení apoptózy do patomechanizmov FP jestvuje niekoľko literárnych tvrdení. Primárne sa však tento druh programovanej bunkovej smrti spájal v súvislosti s FP s nadmernou aktiváciou TGF- β cestou zvýšenej hladiny jednotlivých proapoptotických markerov (Bax, kaspáza-3), čo vyúsťuje do spustenia procesu fibrotizácie predsieňového tkaniva (58 – 61). Neskôr však bola táto teória oslabená zistením, že inhibíciou apoptotickej efektorovej kaspázy-3 sa síce, pochopiteľne, znížila miera apoptózy, čo korelovalo so zlepšením elektrofyziologických vlastností predsieňového tkaniva a zníženou incidenciou arytmiických epizód, avšak miera fibrotizácie predsieňového tkaniva nebola ovplyvnená (62). V našich vzorkách bola hladina iniciačnej kaspázy-8, na základe ktorej sa bunka rozhoduje pre voľbu apoptózy alebo nekroptózy (57), v oboch skupinách nezmenená (**obrázok 4A**). V prípade exekučnej kaspázy-3 sme detegovali iba jej neštiepenú, a teda neaktívnu pro-formu, ktorá nevýkazova-



Obrázok 3 Imunoblotová analýza exprese zápalových mediátorov: A) NLRP3. B) kaspáza-1/prokaspáza-1 pomer. C) IL-1b/proIL-1b pomer. D) TNF u pacientov trpiacich ischemickou chorobou srdca a súčasne paroxysmálnou fibriláciou predsiení (pxFP) alebo so zachovaným sínusovým rytmom (SR). E) Reprezentatívne imunoblotty so znázornením celkového farbenia membrán pre daný proteín. Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM, s počtom vzoriek $n = 3$. * $P < 0,05$ s použitím nepárového t-testu.



Obrázok 4 Imunoblotová analýza exprese proapoptotických proteínov: A) kaspáza-8. B) prokaspáza-3. C) Bcl2/Bax pomer. D) p25 fragment enzýmu polymeráza poly-(ADP-ribóza)-1 (PARP-1) u pacientov trpiacich ischemickou chorobou srdca a súčasne paroxysmálnou fibriláciou predsiení (pxFP) alebo so zachovaným sínusovým rytmom (SR). F) Repräsentativne imunoblotty so znázornením celkového farbenia membrán pre daný proteín. Dáta sú prezentované ako priemer $\pm$ SEM, s počtom vzoriek $n = 3$.

la zmenu exprese (**obrázok 4B**). Takisto aj pri porovnaní pomeru antiapoptického Bcl2 a proapoptického Bax (**obrázok 4C**) sme nezistili zmenu vplyvom prítomnosti alebo neprítomnosti FP. Potvrdzujúc opisované výsledky, expresia apoptózu indukovaného p25 fragmentu enzýmu polymeráza poly-(ADP-ribóza)-1 (PARP-1) (**obrázok 4D**) sa neodlišovala medzi vzorkami s pxFP a so sínusovým rytmom. Na základe toho možno konštatovať, že v nami skúmaných vzorkách sme nezistili dôkaz o aktivácii apoptotickej straty buniek v predsieňach srdca pozmenených v dôsledku pxFP. Rozdielnosť výsledkov prezentovaných v tejto pilotnej štúdii a v prácach iných autorov (58 – 62) môžu spôsobovať viaceré faktory. Predovšetkým treba povedať, že náš kolektív analyzoval ľavé predsieňe od pacientov trpiacich pxFP a súčasne koronárnou chorobou srdca (KCHS) a teda príslušné kontroly, s ktorými sa vzorky s pxFP a KCHS porovnávali, boli vzorky od pacientov bez arytmiie, avšak s KCHS. Ideálne by bolo mať k dispozícii vzorky ľavých predsiení s FP bez KCHS a porovnávať ich s „čistými kontrolami“ – vzorkami so sínusovým rytmom a bez KCHS. Takýto metodický prístup je však z mnohých príčin, vrátane etických, limitovaný. Istú nádej nám v tomto poskytujú medzinárodné spolupráce

a biobanky, cez ktoré sa dostupnosť daných vzoriek zdá byť reálnejšia. Ako ďalšiu limitáciu práce možno spomenúť skutočnosť, že ide o vzorky pacientov, ktorí vykazujú prirodzenú intraindividuálnu variabilitu a tiež, že sú liečení rôznymi druhmi liekov v rôznom dávkovaní, čo môže tiež vplyvať na vnútrobunkové signalizácie a teda aj na prezentované výsledky. Napríklad často používané betablokátory ovplyvňujú vápnikovú homeostázu cez riadenie fosforylácie proteínov sarkolémy a sarkoplazmatického retikula. Tým môžu cez reguláciu iónovej homeostázy potenciálne vplyvať aj na signalizáciu nekrotózy. Treba uviesť aj skutočnosť, že ide o pilotnú štúdiu s limitovaným množstvom vzoriek, čo tiež mohlo mať vplyv na silu štatistických analýz (aj keď v niektorých prípadoch boli hladiny štatistickej významnosti jasne dosiahnuté). Bez zreteľa na uvedené limitácie, práca priniesla niekoľko zaujímavých pozorovaní týkajúcich sa patogenézy FP, prezentovala originálne zistenia a nastolila ďalšie nové otázky.

Na záver môžeme konštatovať, že v práci predstavujeme hypotézu o potenciálnej úlohe nekrotózy a jej prepojení so zápalom pri FP. V tkanivových vzorkách atriálneho myokardu od pacientov s pxFP a KCHS sme nezaznamenali

nali aktiváciu kanonickej nekroptotickej dráhy závislej od RIP3-MLKL. Avšak vzhľadom na trend zvýšenia fosforylácie RIP3 nemožno vylúčiť jej potenciálnu interakciu s inými signalizáciami. Rovnako sme nepozorovali ani signifikantné zmeny v hladinách hlavných apoptotických markerov. Naznačili sme skôr úlohu prozápalovej dráhy asociovanej s NLRP3-kaspáza-1-IL-1b. Tým sa teda otvorila otázka relevancie ďalšej novoobjavenej formy bunkovej smrti – pyroptózy, ktorá bude predmetom pokračujúcich štúdií. Okrem detailnejšej analýzy jej dráh, ako aj jej prepojenia s ďalšími formami bunkovej smrti sa tiež plánuje preskúmanie daných molekulárnych dráh v asociácii s podrobnejšou analýzou klinických údajov pacientov. Výsledky takýchto štúdií by tak mohli priniesť originálne a cenné zistenia vzhľadom na smerovanie účinnej farmakologickej intervencie, a to jednak za účelom prevencie odumierania buniek predsiení srdca, ale aj za účelom inhibície ďalšej progresie v dôsledku aktivácie a šírenia prozápalového prostredia.

Podakovanie

Publikácia vznikla s podporou grantu Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (VEGA 1/0271/16) a Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-15-0607, APVV-20-0242).

Autori nemajú žiaden konflikt záujmov.

Literatúra

- Andrade J, Khairy P, Dobrev D, et al. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: Relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res* 2014;114:1453–1468. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303211.
- Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J* 2016;37:2893–2962. doi:10.1093/eurheartj/ehw210.
- Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Association of Cardiothoracic Surgery. *Eur Heart J* 2021;42:373–498. doi:10.1093/eurheartj/ehaa612.
- Heeringa J, Van Der Kuip DAM, Hofman A, et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: The Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006;27:949–953. doi:10.1093/eurheartj/ehi825.
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, et al. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011;91:265–325. doi:10.1152/physrev.00031.2009.
- Svennberg E, Engdahl J, Al-Khalili F, et al. Mass screening for untreated atrial fibrillation: the STROKESTOP Study. *Circulation* 2015;131:2176–2184. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014343.
- Lau DH, Schotten U, Mahajan R, et al. Novel mechanisms in the pathogenesis of atrial fibrillation: Practical applications. *Eur Heart J* 2016;37:1573–1581. doi:10.1093/eurheartj/ehv375.
- Fatkin D, Santiago CF, Huttner IG, et al. Genetics of atrial fibrillation: State of the Art in 2017. *Hear Lung Circ* 2017;26:894–901. doi:10.1016/j.hlc.2017.04.008.
- Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2010;31:2369–2429. doi:10.1093/eurheartj/ehq278.
- Todorov H, Janssen I, Honndorf S, et al. Clinical significance and risk factors for new onset and recurring atrial fibrillation following cardiac surgery – a retrospective data analysis. *BMC Anesthesiol* 2017;17:163. doi:10.1186/s12871-017-0455-7.
- Rezaei Y, Peighambari MM, Naghsbandi S, et al. Postoperative atrial fibrillation following cardiac surgery: from pathogenesis to potential therapies. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2020;20:19–49. doi:10.1007/s40256-019-00365-1.
- Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2335–2345. doi:https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.02.555.
- Denham NC, Pearman CM, Caldwell JL, et al. Calcium in the pathophysiology of atrial fibrillation and heart failure. *Front Physiol* 2018;9:1380.
- Voigt N, Heijman J, Wang Q, et al. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2014;129:145–156. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006641.
- Platonov PG. Atrial fibrosis: An obligatory component of arrhythmia mechanisms in atrial fibrillation? *J Geriatr Cardiol* 2017;14:233–237. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2017.04.008.
- Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, et al. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2017;16:17–20. doi:10.1186/s12933-017-0604-9.
- Reilly SN, Jayaram R, Nahar K, et al. Atrial sources of reactive oxygen species vary with the duration and substrate of atrial fibrillation: Implications for the antiarrhythmic effect of statins. *Circulation* 2011;124:1107–1117. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.029223.
- Youn J-Y, Zhang J, Zhang Y, et al. Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 2013;62:72–79. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.019.
- Erbo Y, Lu W-H, He P, et al. TGF- β 1 signal pathway in the regulation of inflammation in patients with atrial fibrillation. *Asian Pac J Trop Med* 2013;6:999–1003. doi:10.1016/S1995-7645(13)60180-7.
- Babapoor-Farrokhran S, Tarighati Rasekhi R, Gill D, et al. How transforming growth factor contributes to atrial fibrillation? *Life Sci* 2021;266:118823. doi:10.1016/j.lfs.2020.118823.
- Purohit A, Rokita AG, Guan X, et al. Oxidized Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation* 2013;128:1748–1757. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313.
- Liu Z, Finet JE, Wolfram JA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II causes atrial structural remodeling associated with atrial fibrillation and heart failure. *Hear Rhythm* 2019;16:1080–1088. doi:10.1016/j.hrthm.2019.01.013.

23. Sethi R, Adameova A, Dhalla KS, et al. Modification of Epinephrine-induced arrhythmias by N-Acetyl-L-Cysteine and vitamin E. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2009;14:134–142. doi:10.1177/1074248409333855.
24. Adameova A, Shah AK, Dhalla NS. Role of oxidative stress in the genesis of ventricular arrhythmias. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–16. doi:10.3390/ijms21124200.
25. Gasparova I, Kubatka P, Opatrilova R, et al. Perspectives and challenges of antioxidant therapy for atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2017;390:1–14. doi:10.1007/s00210-016-1320-9.
26. Samman Tahhan A, Sandesara PB, Hayek SS, et al. Association between oxidative stress and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2017;14:1849–1855. doi:10.1016/j.hrthm.2017.07.028.
27. Baek Y-S, Kim T-H, Uhm J-S, et al. Prevalence and the clinical outcome of atrial fibrillation in patients with autoimmune rheumatic disease. *Int J Cardiol* 2016;214:4–9. doi:10.1016/j.ijcard.2016.03.083.
28. Gungor B, Ekmekci A, Arman A, et al. Assessment of interleukin-1 gene cluster polymorphisms in lone atrial fibrillation: new insight into the role of inflammation in atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2013;36:1220–1227. doi:10.1111/pace.12182.
29. Luan Y, Guo Y, Li S, et al. Interleukin-18 among atrial fibrillation patients in the absence of structural heart disease. *Eur Pacing, Arrhythmias, Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing, Arrhythmias, Card Cell Electrophysiol. Eur Soc Cardiol* 2010;12:1713–1718. doi:10.1093/europace/euq321.
30. Yao C, Veleva T, Scott L, et al. Enhanced cardiomyocyte NLRP3 inflammasome signaling promotes atrial fibrillation. *Circulation* 2018. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202
31. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009;10:241–247. doi:10.1038/ni.1703.
32. Lawlor KE, Khan N, Mildenhall A, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat Commun* 2015;6:6282. doi:10.1038/ncomms7282.
33. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ* 2017;24:1184–1195. doi:10.1038/cdd.2017.65.
34. Wu X-N, Yang Z-H, Wang X-K, et al. Distinct roles of RIP1–RIP3 hetero- and RIP3–RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ* 2014;21:1709–1720. doi:10.1038/cdd.2014.77.
35. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:5322–5327. doi:10.1073/pnas.1200012109.
36. Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 2014;54:133–146. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.003.
37. Czabotar PE, Murphy JM. A tale of two domains – a structural perspective of the pseudokinase, MLKL. *FEBS J* 2015;282:4268–4278. doi:https://doi.org/10.1111/febs.13504.
38. Xia B, Fang S, Chen X, et al. MLKL forms cation channels. *Cell Res* 2016;26:517–528. doi:10.1038/cr.2016.26.
39. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of non-apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005;1:112.
40. Adameova A, Hrdlicka J, Szobi A, et al. Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2017;1–29. doi:10.1139/cjpp-2016-0609.
41. Szobi A, Farkašová-Ledvényiová V, Lichý M, et al. Cardioprotection of ischaemic preconditioning is associated with inhibition of translocation of MLKL within the plasma membrane. *J Cell Mol Med* 2018;22:4183–4196. doi:10.1111/jcmm.13697.
42. Szobi A, Gonçalvesová E, Varga ZV, et al. Analysis of necroptotic proteins in failing human hearts. *J Transl Med* 2017;15:86. doi:10.1186/s12967-017-1189-5.
43. Lichý M, Szobi A, Hrdlička J, et al. Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation. *J Cell Mol Med* 2019;23. doi:10.1111/jcmm.14536.
44. Corsetti G, Chen-Scarabelli C, Romano C, et al. Autophagy and oncosis/necroptosis are enhanced in cardiomyocytes from heart failure patients. *Med Sci Monit Basic Res* 2019;25:33–44. doi:10.12659/MSMBR.913436.
45. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2014;35:14–23. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013.
46. Stolberg-Stolberg J, Sambale M, Hansen U, et al. Cartilage trauma induces necroptotic chondrocyte death and expulsion of cellular contents. *Int J Mol Sci* 2020;21:4204. doi:10.3390/ijms21124204.
47. Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, et al. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. *Heart Fail Rev* 2016;21:213–221. doi:10.1007/s10741-016-9537-8.
48. Hu X-M, Chen X, Pang H-Y, et al. Plasma levels of receptor interacting protein kinase-3 correlated with coronary artery disease. *Chin Med J (Engl)* 2019;132:1400–1405. doi:10.1097/CM9.0000000000000225.
49. Hu X, Li H, Chen X, et al. Plasma concentration of receptor-interacting protein kinase-3 as a potential biomarker for diagnosis and prognosis in heart failure. *Clin Chim Acta* 2020;509:273–279. doi:https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.039.
50. Smith CCT, Davidson SM, Lim SY, et al. Necrostatin: A potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:227–233. doi:10.1007/s10557-007-6035-1.
51. Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, et al. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Anesth* 2014;28:235–241. doi:10.1007/s00540-013-1716-3.
52. Koudstaal S, Oerlemans MIFJ, Van der Spoel TIG, et al. Necrostatin-1 alleviates reperfusion injury following acute myocardial infarction in pigs. *Eur J Clin Invest* 2015;45:150–159. doi:10.1111/eci.12391.
53. Dmitriev YV, Minasian SM, Demchenko EA, et al. Study of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors on isolated rat heart subjected to global ischemia-reperfusion. *Bull Exp Biol Med* 2013;155:245–248. doi:10.1007/s10517-013-2124-2.
54. Zhang T, Zhang Y, Cui M, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress – induced myocardial necroptosis. *Nat Med* 2016. doi:10.1038/nm.4017.

55. Lim SY, Davidson SM, Mocanu MM, et al. The cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:467–9. doi:10.1007/s10557-007-6067-6.
56. Ren M, Li X, Hao L, et al. Role of tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of atrial fibrillation: A novel potential therapeutic target? *Ann Med* 2015;47:316–324. doi:10.3109/07853890.2015.1042030.
57. Oberst A, Dillon CP, Weinlich R, et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* 2011;471:363–367. doi:10.1038/nature09852.
58. Han W, Fu S, Wei N, et al. Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2008;130:165–173. doi:10.1016/j.ijcard.2008.02.026.
59. Zhao J, Li J, Li W, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol* 2010;159:1584–1594. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00551.x.
60. Heger J, Warga B, Meyering B, et al. TGF β receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release. *J Cell Physiol* 2011;226:2683–2690. doi:10.1002/jcp.22619.
61. Dzeshka MS, Lip GYH, Snezhitskiy V, et al. Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:943–959. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.1313.
62. Trappe K, Thomas D, Bikou O, et al. Suppression of persistent atrial fibrillation by genetic knockdown of caspase 3: A pre-clinical pilot study. *Eur Heart J* 2013;34:147–157. doi:10.1093/eurheartj/ehr269.