

Uloga mitohondrijske dinamike u ishemijskoreperfuzijskom oštećenju i anestetičkom prekondicioniranju srčanih mišićnih stanica

Žaja, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:057529>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

Ivan Žaja

**ULOGA MITOHONDRIJSKE DINAMIKE U ISHEMIJSKO-
REPERFUZIJSKOM OŠTEĆENJU I ANESTETIČKOM
PREKONDITIONIRANJU SRČANIH MIŠIĆNIH STANICA**

Doktorska disertacija

Split, 2017

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje matičnih stanica, Klinike za anesteziologiju, Medical College of Wisconsin, Wisconsin, SAD.

Mentor prof.dr.sc. Željko J. Bošnjak

Zahvala

Zahvaljujem svom mentoru i svim kolegama koji su mi svojim znanjem i trudom omogućili da uspješno završim ovu disertaciju.

Zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju i podršci koju su mi pružili tijekom svih godina mogega školovanja.

Lektorica

Dubravka Puljiz, prof. hrvatskog jezika i kniževnosti

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje srca	2
1.2.	Reaktivne kisikove vrste (ROS)	4
1.3.	Mitohondrijska permeabilizacijska pora (mPTP)	6
1.4.	Mitohondrijska dinamika	7
1.5.	Anesteticima inducirano prekondicioniranje	10
1.6.	Kardiomiociti diferencirani iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM)	13
1.7.	Sažetak specifičnih ciljeva i hipoteza	16
2.	Cdk1, PKC δ i kalcineurin uzrokuju smrt kardiomiocita putem Drp1 posredovane fisije mitohondrija	18
2.1.	Uvod	19
2.2.	Materijali i metode	21
2.3.	Rezultati	26
2.4.	Rasprava	38
3.	Hiperglikemija uzrokuje smanjenje anestetičkog prekondicioniranja u kardiomiocitima diferenciranim iz matičnih stanica: uloga mitohondrijske fisije i reaktivnih kisikovih vrsta	41
3.1.	Uvod	42
3.2.	Materijali i metode	44
3.3.	Rezultati	51
3.4.	Rasprava	61

4.	Rasprava	64
4.1.	Povezanost između povećanog stvaranja ROS i mitohondrijske fisije tijekom I/R oštećenja kardiomiocita	66
4.2.	iPSC-CM kao model proučavanja APC-a	68
4.3.	Mitohondrijska fisija uzrokuje nemogućnost kardiomiocita da budu prekondicionirani anestheticima	69
4.4.	Ograničenja istraživanja	71
4.5.	Zaključci	73
5.	Sažetak	74
6.	Summary	76
7.	Literatura	78
8.	Životopis	95

Popis kratica

mPTP	Mitohondrijska permeabilizacijska pora (<i>eng.</i> mitochondrial permeability transition pore)
I/R	Ishemija i reperfuzija
$\Delta\psi_m$	Mitohondrijski membranski potencijal
CaMK	Ca ²⁺ /kalmodulin ovisna protein kinaza (<i>eng.</i> Ca ²⁺ /calmoduline dependent protein kinase)
ROS	Reaktivne kisikove vrste (<i>eng.</i> reactive oxygen species)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PKC	Protein kinaza C
VDAC	Anionski kanal ovisan o naponu (<i>eng.</i> voltage dependent anion channel)
ANT	Adenin nukleotid translokaza (<i>eng.</i> adenine nucleotide translocase)
CypD	Ciklofilin D
Drp1	Dinamin sličan protein 1 (<i>eng.</i> dynamin related protein 1)
Fis1	Mitohondrijski fisijski protein 1 (<i>eng.</i> mitochondrial fission 1 protein)
OMM	Vanjska mitohondrijska membrane (<i>eng.</i> outer mitochondrial membrane)
Cdk1	Ciklin ovisna kinaza (<i>eng.</i> cyclin-dependent kinase 1)
MFN 1,2	Mitofusini 1,2 (<i>eng.</i> mitofusin 1,2)
OPA1	Optička atrofija 1 (<i>eng.</i> optic atrophy 1)
APC	Anestetičko prekondicioniranje (<i>eng.</i> anesthetic preconditioning)
IPC	Ishemijsko prekondicioniranje (<i>eng.</i> ischemic preconditioning)
ETC	Lanac prijenosa elektrona (<i>eng.</i> electron transport chain)
mitoK _{ATP}	ATP ovisni mitohondrijski kalijevi kanali
5-HD	5-hidroksidekanoat
sarcK _{ATP}	ATP ovisni sarkolemalni kalijevi kanali

Kir6.2	<i>eng.</i> Potassium channel, inwardly rectifying
Sur2A	Sulfonilureja receptor 2A
COX-2	Ciklookisigenaza-2
PI3K/Akt	Fosfatidil inozitol 3 kinaza/Akt
hESC	Ljudske embrionalne matične stanice (<i>eng.</i> human embryonal stem cells)
iPSC	Inducirane pluripotentne matične stanice (<i>eng.</i> induced pluripotent stem cells)
FBS	Fetalni goveđi serum (<i>eng.</i> fetal bovine serum)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medij
LDH	Laktat dehidrogenaza
siRNA	Mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> small interfering RNA)
TMRE	Tetrametilrodamin etil ester, perklorat
AR	Omjer dužine (<i>eng.</i> aspect ratio)
FF	Faktor oblika (<i>eng.</i> form factor)
DCF	Diklorfluorescin diacetat
SDS/PAGE	Natrijdodecilsulfat/poliakrilamid gel elektroforeza
BSA	Albumin goveđeg seruma (<i>eng.</i> bovine serum albumin)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
mdivi-1	Inhibitor mitohondrijskog dijeljenja-1 (<i>eng.</i> mitochondrial division inhibitor-1)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medij
PBS	Otopina fosfatnog pufera (<i>eng.</i> phosphate buffered saline)
eGFP	Zeleni fluorescentni protein (<i>eng.</i> enhanced green fluorescent proteine)
MAC	Minimalna alveolarna koncentracija (<i>eng.</i> minimum alveolar concentration)
NCX-1	Na ⁺ /Ca ²⁺ izmjenjivač-1
DHE	Dihidroetidij (<i>eng.</i> dihidroethidium)

Poglavlje 1

Uvod

1.1. Ishemijsko-reperfuzijsko (I/R) oštećenje srca

Ishemijska bolest srca jedna je od vodećih uzroka smrti i invalidnosti u cijelom svijetu. Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom pod rizikom su nastanka ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja (I/R) miokarda⁽¹⁾. Srce je oksidativan organ te stoga i ne čudi da je više od 90% srčanog metabolizma aerobno. Tijekom ishemije prevladava anaerobni metabolizam koji dovodi do smanjenja unutarstaničnog pH⁽²⁾. Kako bi se smanjio porast unutarstanične koncentracije vodikovih iona, Na⁺/H⁺ izmjenjivač izlučuje višak vodikovih iona u izvanstanični prostor što dovodi do povećanja koncentracije unutarstaničnog natrija^(3, 4). Ishemija uzrokuje potrošnju unutarstaničnih zaliha ATP-a što dovodi do smanjenja aktivnosti ATPaza (Na⁺/K⁺ ATPaze), smanjenja aktivnog izbacivanja iona Ca²⁺, ograničene resorpcije Ca²⁺ u endoplazmatski retikulum (ER) i uzrokuje obrnuti smjer rada Na⁺/Ca²⁺ izmjenjivača. Svaki od ovih zbivanja u konačnici uzrokuje preopterećenje kardiomiocita kalcijem^(5, 6). Te značajne promjene metabolizma Ca²⁺ aktiviraju različite enzimske sustave koji pojedinačno ili zajedno uzrokuju smrt stanice nakon I/R oštećenja^(7, 8). Jedan od načina kojim stanice pokušavaju ublažiti ovaj negativan utjecaj porasta citoplazmatske koncentracije Ca²⁺ jest translokacija Ca²⁺ unutar mitohondrijskog matriksa preko mitohondrijskog Ca²⁺ uniportera⁽⁹⁾. Međutim, ako povećanje koncentracije mitohondrijskog Ca²⁺ postane pretjerano, dolazi do otvaranja mitohondrijske permeabilizacijske pore (mPTP)⁽¹⁰⁻¹²⁾. Osim toga, I/R izazvano povećanje unutarstaničnog Ca²⁺ dovodi i do patološke aktivacije Ca²⁺/kalmodulin ovisne protein kinaze (CaMK) i kalcineurina koji pridonose staničnoj smrti i disfunkciji organa nakon ishemije⁽¹³⁾. Iako reperfuzija dovodi do ponovne uspostave tkivne oksigenacije i normaliziranja unutarstaničnog pH odstranjivanjem akumuliranih vodikovih iona, sama reperfuzija uzrokuje značajno tkivno oštećenje⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Ulazak kisika u ishemično tkivo, iako potrebno za obnavljanje aerobnog metabolizma i stvaranje ATP-a, rezultira značajnim porastom proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Zbog svoje reaktivne prirode, ROS

proizvedeni tijekom i nakon reperfuzije mogu oštetiti sve vrste biomolekula u stanicama, čime se paradoksalno izaziva stanična disfunkcija (paradoks kisika)⁽¹⁷⁾. Zbog nedostatka kisika tijekom ishemije protok elektrona kroz respiratorni lanac je inhibiran. Prema tome, F1F0 ATPaza više ne može fosforilirati ADP u ATP. Osim toga, u pokušaju da se održi uredan $\Delta\psi_m$ tijekom inhibicije protoka elektrona, ATP sintaza zapravo radi u obrnutom smjeru čime hidrolizira preostali ATP⁽¹⁸⁾. Ova dva procesa izazivaju nagli pad razine ATP-a nakon početka ishemije. Selektivna inhibicija aktivnosti ATPaze usporava brzinu gubitka ATP-a i štiti srce tijekom I/R oštećenja. I/R oštećenje uzrokuje staničnu smrt apoptozom ili nekrozom, iako je udio stanične smrti apoptozom znatno niži nego onaj koji nastaje nekrozom. Aktiviranje proapoptotičkih BCL-2 proteina kao što su Bax, Bak, Bid te njihova translokacija i integracija u mitohondrijske membrane prisutni su kod ishemijskog oštećenja tkiva, međutim stupanj zaštite koju pruža inhibicija BCL-2 proteina veća je nego što bi se očekivalo s obzirom na udio stanične smrti apoptozom⁽¹⁹⁾. Ovi proteini zasad nepoznatim mehanizmima uzrokuju permeabilizaciju vanjske mitohondrijske membrane (OMM) čime se otpuštaju proapoptotički proteini iz međumembranskih prostora među kojima su najvažniji citokrom c i SMAC/Diablo⁽²⁰⁾. Citokrom c aktivira kaspazu 9 i 3 koje uzrokuju proteolizu unutarstaničnih proteina. Nekroza je morfološki karakterizirana staničnim edemom, disfunkcijom mitohondrija, rupturom stanične membrane i curenjem unutarstaničnog sadržaja. Za razliku od programirane stanične smrti i autofagije, nekroza nastaje kao posljedica slučajnog, značajnog oštećenja stanice i njezina mikrookoliša kakav je i prisutan kod ishemijske bolesti srca^(21,22).

1.2. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Reaktivne kisikove vrste (ROS) metabolički su produkti kisika koji imaju nesparene elektrone, što pridonosi njihovoj visokoj razini reaktivnosti. Fiziološke koncentracije ROS-a imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i održavanju homeostaze^(23, 24). Međutim, povišene razine ROS-a mogu uzrokovati oksidativno oštećenje staničnih proteina, lipida i DNK. ROS su velika skupina molekula koja uključuje superoksid, vodikov peroksid, hidroksilni radikal i druge. Superoksid je najzastupljeniji oblik i prekursor većine ROS-a. Većina ROS-a koja nastaje tijekom I/R oštećenja dolazi iz lanca prijenosa elektrona (ETC)⁽²⁵⁾. Dodatni izvori superoksida su NADPH oksidaza, membranska ksantin oksidaza, citokrom P ovisna oksigenaza, NO sintetaza i lipooksigenaza⁽²⁶⁻²⁸⁾. Mitohondrijski ETC glavno je mjesto proizvodnje ROS-a u srčanim mišićnim stanicama. Superoksid se većinom stvara na kompleksu I i III ETC-a. Visoki $\Delta\Psi_m$ preko mitohondrijske membrane inducira proizvodnju ROS-a zbog inhibicije prijenosa elektrona te dovodi do nakupljanja elektrona ili izravnog prijenosa elektrona na kisik čime nastaje superoksid⁽²⁸⁾. Proizvodnja ROS-a u fiziološkim uvjetima pod kontrolom je endogenih antioksidativnih mehanizama, kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Međutim, u patološkim stanjima, kao što su oni koji su prisutni tijekom I/R oštećenja srčanih mišićnih stanica, prekomjerne količine ROS-a uzrokuju oksidativni stres i nadvladavaju stanične antioksidativne mehanizme⁽²⁹⁾. Povećana proizvodnja ROS-a tijekom hiperglikemije prepoznata je kao jedan od glavnih uzroka mikro i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti⁽³⁰⁾. Nishikawa i sur. pokazali su kako hiperglikemija uzrokuje značajan porast proizvodnje ROS-a u goveđim aortalnim endotelnim stanicama, a prekomjerna ekspresija superoksid dismutaze učinkovito sprječava hiperglikemijom inducirano stvaranje superoksida⁽³¹⁾. Druga grupa istraživača pokazala je da povećano stvaranje ROS-a tijekom hiperglikemije ovisi o aktivaciji protein kinaze C (PKC), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze i mitohondrijskog elektronskog

gradijenta⁽³²⁾. Dinamičke promjene u morfologiji mitohondrija tijekom hiperglikemije također su povezane s povećanim stvaranjem ROS-a. Mitohondriji se u uvjetima hiperglikemije fragmentiraju uz istovremeno povećano stvaranje ROS-a. Ni povećano stvaranje ROS-a ni mitohondrijska fragmentacija nisu uočeni nakon inkubacije stanica s nemetabolizirajućim stereoizomerom L-glukozom⁽³³⁾.

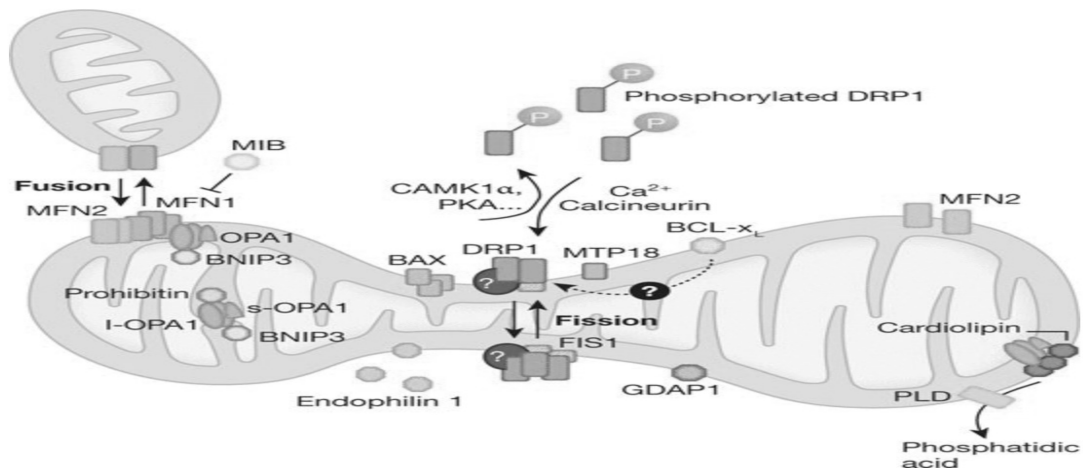
1.3. Mitohondrijska permeabilizacijska pora (mPTP)

Mitohondrijska permeabilizacijska pora (mPTP) otkrivena je prije više od trideset godina, no detaljna struktura mPTP-a ni dan-danas nije poznata. Većina istraživanja pokazala je kako se mPTP sastoji od anionskog kanala ovisnog o naponu (VDAC) smještenog na vanjskoj mitohondrijskoj membrani (OMM), adenin nukleotid translokaze (ANT) na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani (IMM) te ciklofilina-D (CypD) koji igra regulatornu ulogu. U fiziološkim uvjetima mPTP je zatvorena⁽³⁴⁾. Tijekom I/R oštećenja mPTP se otvara i uzrokuje značajno povećanje permeabilnosti mitohondrijske membrane za unutarstanične tvari veće molekularne mase⁽³⁵⁾. Međutim, nedavna istraživanja koja su koristila knock-out tehnologiju pokazala su kako se mPTP i dalje otvara i u VDAC knock-out mišjem modelu⁽³⁶⁾. Najnoviji strukturni model mPTP-a sastoji se od CypD, koji i dalje ima regulatornu ulogu te od mitohondrijskog nosača fosfata⁽³⁷⁻³⁹⁾. Iako je struktura mPTP-a i dalje nepoznata, postoji opća suglasnost o ulozi mPTP-a u staničnoj smrti⁽⁴⁰⁾. I dalje postoji snažna korelacija između blokade otvaranja mPTP-a i smanjenja stanične smrti^(41, 42). Blokada otvaranja mPTP-a ciklosporinom A koji inhibira ciklofilin D dovodi do smanjenja stanične smrti nakon I/R oštećenja srca. Oksidativni stres, mitohondrijska fisija, visoki ili niski pH i drugi faktori mogu izazvati otvaranje mPTP-a i staničnu smrt^(43, 44). Otvaranjem mPTP-a dolazi do depolarizacije $\Delta\Psi_m$ što uzrokuje prestanak proizvodnje ATP-a, rupturu OMM i oslobađanje citokroma c koji dovodi do aktivacije kaspaza i programirane stanične smrti⁽⁴⁵⁾.

1.4. Mitohondrijska dinamika

Mitohondriji neprestano mijenjaju svoj oblik fisijom, fuzijom i kretanjem duž citoskeleta. Dužinu mitohondrija i stupanj stvaranja međusobno povezanih mitohondrijskih mreža određuje ravnoteža između fisije i fuzije mitohondrijskih membrana^(46, 47). Ove promjene pod utjecajem su fizioloških metaboličkih i različitih patoloških procesa unutar samih mitohondrija i njihova okruženja. Fisija i fuzija mitohondrija važni su za rast i dijeljenje stanica, za adekvatnu mitohondrijsku preraspodjelu i za održavanje bioenergetski zdravih mitohondrijskih struktura^(48, 49). Osim toga, mitohondrijska fisija i fuzija igraju važnu ulogu u patološkim stanjima poput dijabetesa, apoptoze i mitofagije^(50, 51). Hiperglikemijom uzrokovano povećanje proizvodnje ROS-a uzrokuje mitohondrijsku fragmentaciju, a fragmentirani mitohondriji postaju mjesto dodatnog stvaranja ROS-a⁽⁵²⁾. Fisiju mitohondrijskih membrana uzrokuje dinamin, enzim koji stvara uske spiralne strukture oko mitohondrija koje zatim mehanički cijepa. Homologni dinamin proteinu u stanicama sisavaca je Drp1 (dinamin sličan protein 1) koji dijeli gotovo istovjetnu strukturu s mitohondrijskim fisijskim proteinom Dnm1 u stanicama kvasca. Drp1 se u inaktiviranom stanju nalazi u citoplazmi, a nakon aktivacije translocira se na mitohondrijsku membranu. Funkcionalna područja u Drp1 uključuju amino-terminalnu GTPaza domenu i karboksi-terminalnu GTPaza izvršnu domenu koja sudjeluje u međumolekularnoj interakciji i regulaciji GTPazne aktivnosti. Drp1 se translocira iz citoplazme na mitohondrije djelovanjem adapterskih proteina među kojima je najvažniji transmembranski protein vanjske mitohondrijske membrane, Fis1 (mitohondrijski fisijski protein 1)⁽⁵³⁾. Dva glavna fosforilacijska mjesta pronađena su u Drp1. Kad je Drp1 fosforiliran na Ser616 aminokiselinskom ostatku djelovanjem ciklin ovisne kinaze 1 (CDK1), dolazi do mitohondrijske fisije, dok fosforilacije na Ser637 djelovanjem protein kinaze A (PKA) blokira mitohondrijsku fisiju te dolazi do fuzije i elongacije mitohondrija⁽⁵⁴⁾. Mitohondrijska fuzija, kao suprotan fenomen, uključuje

nekoliko GTPaza proteina koji su uglavnom lokalizirani na mitohondrijskoj membrani. Mitofusini (MFN1 i MFN2) i optička atrofija 1 (OPA1) glavni su mitohondrijski fuzijski proteini^(55, 56). Mitohondrijska morfologija usko je povezana s apoptozom na dva načina. Prvo, u ranoj fazi apoptoze (u trenutku otpuštanja citokroma c), Drp1 se translocira na mitohondrije što uzrokuje njihovu fragmentaciju. Mala interferirajuća RNK (siRNA) usmjerena na Fis1 i Drp1 sprječavaju fragmentaciju mitohondrija i otpuštanje citokroma c, čime se apoptoza u značajnoj mjeri može smanjiti⁽⁵⁷⁻⁶²⁾. S druge strane, pretjerana ekspresija OPA1 također sprječava oslobađanje citokroma c održavanjem uskih spojeva između mitohondrijskih krista što dovodi do inhibicije otpuštanja citokroma c iz međumembranskog prostora⁽⁶³⁾. Druga veza između mitohondrijske morfologije i stanične smrti je preko Bcl-2 obitelji apoptotičkih proteina. Bcl-2 obitelj sadrži antiapoptotičke protein, uključujući Bcl-2 i Bcl-XL, i proapoptotičke proteine kao što Bax i Bak. Bcl-2, Bcl-XL i Bak normalno se nalaze na vanjskoj mitohondrijskoj membrani dok se Bax u zdravim stanicama nalazi u citoplazmi. Međutim, proapoptotički signali uzrokuju istovremenu translokaciju Bax i Drp1 na isto mjesto vanjske mitohondrijske membrane. Translokacija Bax, mitohondrijska fragmentacija i oslobađanje citokroma c događa se gotovo istovremeno, što sugerira kako je mitohondrijska fisija uistinu nužan korak u procesu programirane stanične smrti⁽⁶⁴⁾.



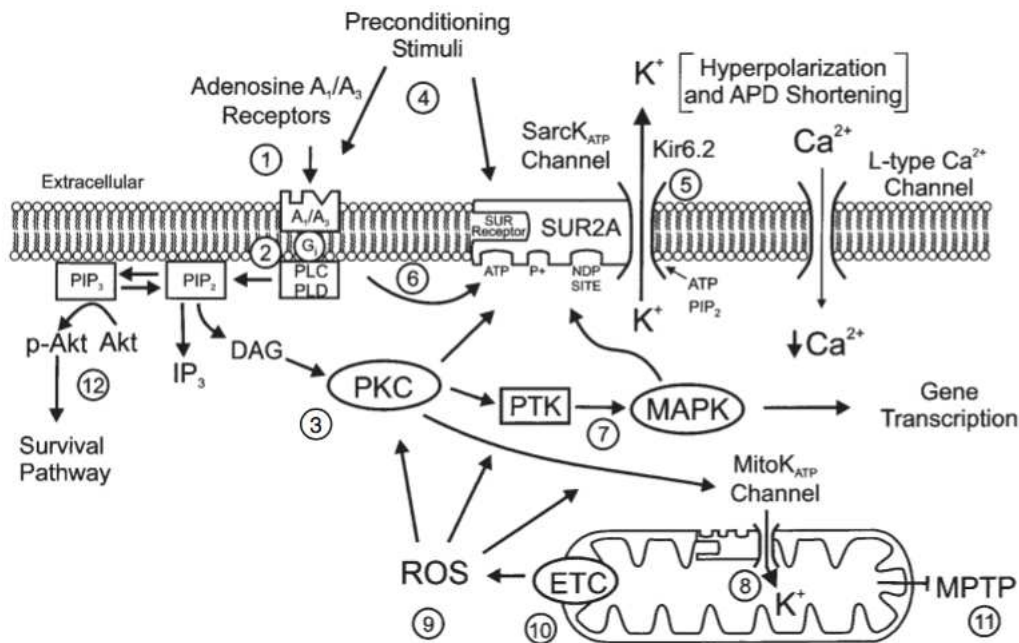
Slika 1.1. *Mitohondrijska dinamika.* Glavni proteini uključeni u regulaciju mitohondrijske fuzije i fisije. Nakon aktivacije Drp1 se translocira na OMM pomoću adapterskog proteina hFis1. Nakon što se oko mitohondrija formiraju spiralne strukture, dolazi do konstrikcije i mitohondrijske fragmentacije. Pro-fuzijski proteini MFN1, MFN2 i OPA1 se oligomeriziraju na OMM nakon čega dolazi do fuzije i elongacije mitohondrija. Različite kinaze i fosfataze reguliraju mitohondrijsku fisiju i fuziju. BAX; BCL2-povezani X protein, Drp1; dinaminsličan protein 1, MFN1,2; mitofusin 1,2, OPA1; optička atrofijski protein 1, CAMK1; kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza 1, Fis1; mitohondrijski fisijski protein 1, GDAP1; gangliozydima inducirani diferencijacijski protein 1, MIB; mitofusin vežući protein, PLD; fosfolipaza D, MTP18; mitohondrijski protein 18 kDa. (slika preuzeta od *Campello S., Scorrano L., EMBO Rep., 2010.*)⁽⁶⁵⁾

1.5. Anesteticima inducirano prekondicioniranje

Prije trideset godina Murry i sur. uspjeli su prekondicionirati srce ponavljanim kratkim razdobljima okluzije koronarnih arterija prije nastupa duže ishemijske epizode⁽⁶⁶⁾. Ishemijsko prekondicioniranje (IPC) dijeli su u dvije faze: prva, odmah nakon samog podražaja koji uzrokuje prekondicioniranje i koja traje nekoliko sati, i druga dodatna faza koja obično nastupa 24 sata poslije podražaja i traje nekoliko dana. Neposredni prozor zaštite tijekom ishemijskog prekondicioniranja (IPC) odvija se putem postranslacijskih izmjena različitih proteina i preko mitohondrija. Druga faza zaštite postiže se ekspresijom različitih proteina među kojima su najvažniji enzimi koji sudjeluju u uklanjanju ROS-a^(67, 68). Anesteticima inducirano prekondicioniranje (APC) je fenomen kojim izlaganje hlapljivim anestheticima u značajnoj mjeri smanjuje ozljedu miokarda nakon I/R oštećenja^(69, 70). APC je po prvi puta u psećem srcu opisala Judy Kersten sa suradnicima⁽⁷⁰⁾. Izlaganje srčanog mišića izofluranu dovodi do značajno manjeg oštećenja miokarda u usporedbi s kontrolnom skupinom bez izoflurana⁽⁷¹⁾. Stupanj zaštite koju proizvodi APC sličan je onom koji je prisutan nakon IPC-a. Hlapljivi anestetici su malene hidrofobne molekule koje brzo prolaze kroz stanične membrane i mogu značajno smanjiti mitohondrijsku respiraciju. Smanjenje mitohondrijske respiracije u početnim fazama uzrokuje oslobađanje manjih količina ROS-a. Mnoštvo istraživanja sugerira da ROS igraju središnju ulogu u APC-u^(72, 73). ROS čistači primijenjeni prije izlaganja izofluranu u značajnoj mjeri smanjuje prekondicioniranje miokarda. Nekoliko istraživanja pokazuje da je kompleks III mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona (ETC) odgovoran za proizvodnju male količine ROS-a koja je potrebna za APC^(73, 74). Kompleks III inhibitor myxothiazol značajno smanjuje izofluranom inducirano APC. Izgleda kako su male količine ROS-a kritične za signalne mehanizme APC-a, ali pretjerano stvaranje ROS-a igra važnu ulogu u patofiziologiji I/R oštećenja. Hlapljivi anestetici također uzrokuju i smanjenje ukupne količine ROS-a na kraju reperfuzije, što dodatno doprinosi smanjenju oštećenja

miokarda na kraju I/R oštećenja. Proizvodnja malih količina ROS-a koji pokreću APC uzrokuje aktivaciju protein kinaze C (PKC), mitohondrijskih ATP-osjetljivih kalijevih kanala ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) i drugih komponenti endogenih signalnih kaskada koje dovode do očuvanja miokarda. Mitohondrijski ATP-osjetljivi kalijevi kanali izrazito su važni u procesu APC-a⁽⁷⁵⁾. $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$ aktivnost smanjuje se kada dođe do značajnog pada unutarstaničnog ATP-a i kada opskrba kardiomiocita energijom postane insuficijentna. Diazoksid, koji uzrokuje otvaranje $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanala, inducira sličnu razinu kardioprotekcije kao i onu koja je uočena tijekom APC i IPC. Blokada otvaranja $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanala 5-hydroxydekanoatom (5-HD) dovodi do nemogućnosti kardiomiocita da budu prekondicionirani izofluranom, što dodatno potvrđuje ulogu $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanala u procesu APC-a^(76, 77). Dugo se vjerovalo kako su sarkolemalni ATP-ovisni kalijevi kanali ($\text{sarcK}_{\text{ATP}}$) ključni u procesu prekondicioniranja kardiomiocita ishemijom, hlapljivim anestheticima i drugim spojevima koji uzrokuju otvaranje K_{ATP} kanala. Srčani $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ kanali su heterooktameri koji se sastoje od četiri Kir6.2 podjedinice i četiri SUR2A podjedinice. Istraživanja na Kir6.2 knockout miševima pokazale su da su $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ kanali uključeni u mehanizme stanične zaštite od metaboličkog stresa te da su također potrebni za IPC. Dakle, različiti eksperimenti ukazuju na to da hlapljivi anestetici moduliraju aktivnost i $\text{sarcK}_{\text{ATP}}$ i $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanala u različitim stupnjevima⁽⁷⁸⁾. Kasna faza ili drugi prozor IPC-a i APC-a javlja se između 24 i 72 sata od početka ishemijskog podražaja i čini se da značajnu ulogu imaju ciklooksigenaza-2 (COX-2), dušični oksid (NO) i PI3K/Akt⁽⁷⁹⁾. Nekoliko kliničkih istraživanja potvrdilo je povoljan učinak APC-a u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću⁽⁸⁰⁾. Međutim, zaštita miokarda u stupnju kakvog vidimo u laboratorijskim uvjetima nije u potpunosti moguća u kliničkim uvjetima budući da različite bolesti i stanja mogu u potpunosti poništiti učinke APC-a. Kod starijih ljudi uočeno je kako se kardiomiociti ne mogu zaštititi anestheticima te kako je kod bolesnika sa šećernom bolešću APC u potpunosti odsutan⁽⁸¹⁾. Hiperglikemija povećava stvaranje mitohondrijskih ROS-a, što pridonosi ozljedi

miokarda i onemogućava APC⁽⁸²⁻⁸⁶⁾. Cilj ove disertacije jest utvrditi na koji način mitohondrijska dinamika doprinosi smanjenju kardioprotektivnih učinaka anestetika te pronaći dodatne strategije zaštite miokarda u bolesnika sa šećernom bolešću.



Slika 1.2. Anesteticima inducirano prekonicioniranje. Anestetici djeluju na komplekse I i III mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona te uzrokuju blago povećanje stvaranja ROS-a. Ovaj porast u stvaranju ROS-a uzrokuje otvaranje mitoK_{ATP} i sarcK_{ATP} kanala što rezultira kasnijim otvaranjem mPTP-a tijekom I/R oštećenja miokarda. APC također djeluju putem PI3K/Akt, PKC, NO i uzrokuje promjene u transkripciji različitih gena. ROS; reaktivne vrste kisika, mPTP; mitohondrijska permeabilizacijska pora, ETC; lanac prijenosa elektrona, PKC; protein kinaza C, PIP₃; fosfatidilinozitol trifosfat, Akt; protein kinaza B, DAG; diacilglicerol, IP₃; inozitol trifosfat, MAPK; mitogen aktivirana protein kinaza, SUR2A; sulfonilureja receptor 2A. (slika preuzeta od *Stadnicka A. i sur., J. Anesth., 2007.*)⁽⁸⁷⁾

1.6. Kardiomiociti diferencirani iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM)

Godine 1998. Thomson i sur. u časopisu Science objavili su otkriće ljudskih embrionalnih matičnih stanica (hESC) iz blastociste i na taj način zapravo pokrenuli polje istraživanja matičnih stanica⁽⁸⁸⁾. Matične stanice su nediferencirane stanice koje imaju sposobnost beskonačne diobe i diferencijacije u gotovo sve stanice ljudskog organizma. Općenito, matične stanice dijele se na embrionalne matične stanice i adultne matične stanice. Etička pitanja manipulacije ljudskim blastocistama zahtijevala su da se pronađu alternativni izvori matičnih stanica. Otkriće da se somatske stanice mogu reprogramirati u pluripotentno stanje iz temelja je promijenilo istraživanje matičnih stanica i dr. Yamanaki donijelo Nobelovu nagradu za medicinu 2012. god^(89, 90). Izvorno otkriće Yamanake opisivalo je način na koji se mišji i ljudski fibroblasti mogu reprogramirati u inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC) preko nekoliko specifičnih transkripcijskih čimbenika koji se u stanicu unose putem virusnih vektora. Dr. Yamanaka inicijalno je u reprogramiranju somatskih stanica koristio četiri transkripcijska faktora: OCT-4 SOX-2, KLF-4 i c-myc, koji su stanicama dopremljeni putem virusnog vektora, a rezultirajuće iPSC su izražavale sve markere pluripotentnosti. Ove reprogramirane iPSC neograničeno se dijele i imaju sposobnost diferenciranja i stvaranja sva tri embrionalna zametna sloja: mezoderm, ektoderm i endoderm. Osim što iPSC generiraju sva tri zametna sloja, također generiraju i teratome kada se injiciraju imunodeficientnim miševima⁽⁹¹⁾. Ove osobine potvrđuju kako su iPSC sposobne diferencirati se u bilo koji tip stanica, slično kao što to mogu i ljudske embrionalne matične stanice, ali bez dodatnih etičkih dilema manipulacije hESC.

Eksperimentalni modeli bolesti, koristeći iPSC tehnologiju, omogućuju i definiranje različitih staničnih i molekularnih mehanizama koji su u podlozi same bolesti, kao i razvoj specifičnog liječenja. Dostupnost ljudskih pluripotentnih matičnih stanica koje su sposobne za

beskonačno samoobnavljanje i koje imaju potencijal da se diferenciraju u gotovo bilo koju vrstu stanica može nam pomoći u ograničenjima sadašnje uporabe različitih životinjskih modela. Mogućnost da su ljudske stanice također i model različitih bolesnih stanja, zapravo je revolucija u načinu na koji proučavamo monogenske, poligenske i epigenetske poremećaje⁽⁹²⁻⁹⁷⁾.

Najbolji primjer modela bolesti je sindrom dugog QT intervala. Kardiomiociti diferencirani iz iPSC bolesnika sa sindromom dugog QT intervala imaju elektrofiziološke sličnosti s kardiomiocitima oboljelih osoba⁽⁹⁸⁾. Druga grupa istraživača generirala je dopaminergičke neurone iz iPSC te ih injicirala u štakorski model Parkinsonove bolesti, što je u konačnici pokazalo kako će u bliskoj budućnosti ove stanice biti u središtu regenerativne medicine⁽⁹⁹⁾.

Inducirane pluripotentne matične stanice predstavljaju idealan izvor stanica za staničnu terapiju i regenerativnu medicinu, naročito kod bolesnika s infarktom miokarda, jer se mogu diferencirati u potpuno funkcionalne kardiomiocite koji pokazuju uredne transmembranske akcijske potencijale i odgovore na autonomne agoniste i antagoniste^(100, 101). Gherghiceanu i sur. uspoređivali su ultrastrukturalna svojstva kardimiocita koji su diferencirani iz iPSC i hESC. Pokazali su kako ne postoje funkcionalne razlike između ove dvije stanične linije te kako ne postoji niti značajna razlika između diferenciranih kardiomiocita i adultnih kardiomiocita osim što adultni kardiomiociti imaju značajno gušće mreže mitohondrija^(102, 103).

Brojna pretklinička i klinička istraživanja su pokazala potencijal diferenciranih kardiomiocita u bolesnika s infarktom miokarda, ali rezultati svih dosada provedenih istraživanja u najboljem su slučaju skromni. Samo nekolicina *in vivo* studija pokazuje da postoji određena razina oporavka oštećenog miokarda nakon liječenja matičnim stanicama. Jedno od mogućih objašnjenja ovako slabih rezultata je neadekvatna mikrookolina i zrelost diferenciranih stanica.

Većina istraživanja u našem laboratoriju obavljala se na različitim životinjskim modelima, poput izoliranog srca, izoliranih ventrikularnih kardiomiocita i izoliranih srčanih mitohondrija. Kardiomiociti diferencirani iz matičnih stanica pružaju sasvim novi i uzbudljivi model proučavanja APC-a.

Ovo je jedno od prvih istraživanja APC-a koje koristi kardiomiocite diferencirane iz matičnih stanica i prvo istraživanje koje ispituje ulogu hiperglikemijom induciranog smanjenja kardioprotektivnih učinaka anestetika i mitohondrijske dinamike. Rezultati ovog istraživanja pružiti će nam uvid u mehanizame kojim hiperglikemija smanjuje APC u relevantnom ljudskom modelu. Ovi rezultati pridonijet će i razvijanju boljih strategija zaštite kardiomiocita tijekom I/R oštećenja u bolesnika sa šećernom bolešću.

1.7. Sažetak specifičnih ciljeva i hipoteza

Istraživanje 1. Cilj prvog dijela istraživanja jest utvrditi molekularne mehanizme kojim ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje (I/R) srčanih mišićnih stanica dovodi do aktivacije Drp1, glavnog proteina mitohondrijske fisije. Specifično, istraživat ćemo kako porast reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) uzrokuje aktivaciju kinaza (Cdk1, PKC δ) i fosfataze (kalcineurina) koje uzrokuju aktivaciju Drp1 fosforilacijom Ser616 i defosforilacijom Ser637 aminokiselinskih ostataka. Sekundarni cilj jest dokazati kako blokiranje bilo kojeg od ovih signalnih putova dovodi do redukcije mitohondrijske fisije i stanične smrti nakon I/R oštećenja.

Hipoteze

- Ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje (I/R) s posljedičnim porastom proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (ROS) uzrokuje mitohondrijsku fisiju u srčanim mišićnim stanicama fosforilacijom/defosforilacijom proteina Drp1 djelovanjem ciklin ovisne kinaze-1 (CDK1), protein kinaze C δ (PKC δ) i kalcineurina.
- Inhibicija Drp1 dovodi do očuvanja strukture mitohondrija i smanjenja stanične smrti nakon I/R oštećenja.
- Blokada CDK1, PKC δ i kalcineurina, pojedinačno ili zajedno, dovodi do očuvanja strukture mitohondrija i smanjenja stanične smrti u istoj mjeri kao i blokada mitohondrijske fisije.

Istraživanje 2. Cilj drugog dijela istraživanja jest utvrditi na koji način povećano stvaranje ROS-a kod hiperglikemije uzrokuje mitohondrijsku fisiju u srčanim mišićnim stanicama (iPSC-CM) i dovodi li to povećanje do nemogućnosti prekondicioniranja srčanih stanica anestheticima. Sekundarni cilj jest utvrditi može li se mogućnost prekondicioniranja vratiti bilo blokiranjem ROS-a ili blokiranjem mitohondrijske fisije.

Hipoteze

- Hiperglikemijom inducirano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) uzrokuje mitohondrijsku fisiju što dovodi do nemogućnosti kardiomiocita da budu prekondicionirani anestheticima.
- Blokada stvaranja ROS ili inhibicija mitohondrijske fisije vratit će mogućnost anestetičkog prekondicioniranja u uvjetima hiperglikemije.

Poglavlje 2

**Cdk1, PKC δ i kalcineurin uzrokuju smrt kardiomiocita putem Drp1
posredovane fisije mitohondrija**

2.1. Uvod

Srčana ishemija uzrokuje pad unutarstanične razine ATP-a i dovodi do povećanja koncentracije unutarstaničnog kalcija dok reperfuzija uzrokuje prekomjerno stvaranje ROS-a što u konačnici uzrokuje i otvaranje mPTP-a^(16, 104). Nekoliko istraživanja pokazalo je da je mitohondrijska fisija važan korak u apoptozi kardiomiocita. Nakon I/R oštećenja kardiomiocita, značajan porast mitohondrijske fisije uočen je kod izoliranih adultnih kardiomiocita, a inhibicija mitohondrijske fisije dovodi do smanjenja stanične smrti^(105, 106). Međutim, molekularni mehanizmi nisu u potpunosti jasni. Mitohondriji su dinamične organele. Mitohondriji se kontinuirano gibaju, spajaju i dijele. Mitohondrijska fuzija i fisija rezultiraju promjenama mitohondrijskih oblika od izduženih, cjevastih, međusobno povezanih u mitohondrijske mreže ili malenih, fragmentiranih, razdvojenih struktura. Više proteina sudjeluje u kontroli mitohondrijske dinamike. Najvažniji protein mitohondrijske fisije je dinamin sličan protein 1 (Drp1) koji se uglavnom nalazi u citosolu, ali nakon aktivacije premješta se na mitohondrije i uzrokuje cijepanje mitohondrijskih membrana⁽¹⁰⁷⁾. Dva glavna fosforilacijska mjesta pronađena su u Drp1. Kad je Drp1 fosforiliran na Ser616, dolazi do mitohondrijske fisije, dok fosforilacija na Ser637 blokira fisiju i potiče fuziju mitohondrija⁽⁵⁴⁾. Mitohondrijska fuzija, kao suprotna pojava, uključuje nekoliko GTPaza proteina koji su uglavnom lokalizirani na mitohondrijskim membranama. Mitofusini (MFN 1,2) i optička atrofija 1 (Opa1) glavni su mitohondrijski fuzijski proteini.

Promjene u morfologiji mitohondrija povezane su sa staničnom smrću⁽¹⁰⁸⁾. Fragmentirani mitohondriji ne mogu osigurati dovoljne energetske potrebe stanice. Frank i sur. pokazali su da se dodavanjem staurosporina, aktivatora apoptoze, mitohondriji mijenjaju od međusobno povezanih mitohondrijskih mreža do malih točkastih struktura u procesu koji je ovisan o aktivaciji i translokaciji Drp1. Ong i sur. utvrdili su da se pojačanom ekspresijom Drp1K38A, dominantno negativne mutacije Drp1 značajno može smanjiti smrt HL-1 stanica nakon I/R

oštećenja. Osim toga, blokiranjem Drp1 može se značajno smanjiti veličina infarkta nakon I/R oštećenja srca što sugerira da je Drp1 posrednik u oštećenju kardiomiocita. Međutim, temeljni molekularni mehanizmi kojim I/R oštećenje uzrokuje porast aktivnosti Drp1 ostaju nejasni. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi molekularne mehanizme mitohondrijske fisije u kardiomiocitima tijekom ishemije i reperfuzije kako bi se bolje razumjela važnost ovog procesa u staničnoj smrti. Hipoteza našeg istraživanja jest da I/R oštećenje uzrokuje aktivaciju Drp1 i mitohondrijsku fisiju u kardiomiocitima putem ciklin ovisne kinaze 1 (CDK1), protein kinaze C δ (PKC δ) i kalcineurina.

2.2. Materijali i metode

2.2.1. Stanična kultura

HL-1 stanična linija su kardiomiociti iz AT-1 mišjih atrijskih tumorskih stanica. Kultivirane su u Claycomb mediju, uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 100 U/ml penicilin-streptomicina, 0.1 mM noradrenalina, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u vlažnom inkubatoru za kulturu tkiva (20% O₂, 5% CO₂). Medij je mijenjan svakih 48 sati, a nakon postizanja 100% konfluentnosti stanice su pasažirane s 0,05% tripsin-EDTA⁽¹⁰⁹⁾. Stanice od 45-55 pasaže su korištene za ovo istraživanje.

2.2.2. Ishemijsko-reperfuzijsko (I/R) oštećenje kardiomiocita

Prije premještanja u hipoksičnu komoru kardiomiociti iz svih eksperimentalnih skupina stavljeni su u medij koji je sadržavao 10 mM glukozu i 2% FBS u trajanju od jednog sata. Nakon toga, kardiomiociti podvrgnuti su ishemiji tijekom 2 sata u hermetički zatvorenoj komori s 5% CO₂ i 95% N₂ (Biospherix hipoksična komora, Lacona, NY, SAD) u DMEM bez dodatka FBS-a uz 10 mM 2-deoksiglukozu kako bi se inhibirala glikoliza. Tijekom reoksigenacije, stanice su prebačene u DMEM s 2% FBS i 10 mM glukozom tijekom jednog sata. Roscovitin, FK506 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), mdivi1 (Drp1 inhibitor, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, SAD) i Trolox (čistač ROS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) dodani su prije ishemije u koncentracijama od 5, 1, 50 i 250 μM.

2.2.3. Laktat dehidrogenaza (LDH) test

Kao pokazatelj oštećenja stanične membrane, mjerili smo LDH u staničnom mediju. Kardiomiociti su kultivirani u posudicama sa 6 jamica (200.000 stanica/jamici), a I/R je izvedena nakon postizanja 80% konfluentnosti. Nakon reperfuzije, spektrofotometrijski je analiziran LDH u mediju u skladu s uputama proizvođača (Sekisui diagnostic, San Diego,

CA, SAD) na valnoj duljini od 340 nm. Otpuštanje LDH izraženo je jedinicama u minuti (U/min).

2.2.4. TUNEL test

Fragmentacija DNK kao marker apoptoze i u određenom stupnju nekroze određena je TUNEL testom (Cell Death Detection Kit, Roche, Indianapolis, IN, SAD) prema uputstvima proizvođača. Pokrovna stakalca bojana su s Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD) kako bi se označile stanične jezgre. Na svakom pokrovnom stakalcu određivao se prosječan broj TUNEL pozitivnih stanica na pet vidnih polja. Apoptotični indeks izračunat je kao postotak prema sljedećoj formuli: broj TUNEL pozitivnih stanica/ukupan broj stanica.

2.2.5. Transfekcija male interferirajuće RNK (siRNA)

Kako bi se postigao genetski knock-out kinaze koja fosforilira Drp1, koristili smo malu interferirajuću RNK (siRNA) usmjerenu na PKC δ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD). Nakon postizanja 60% konfluentnosti, kardiomiociti su transfektirani sa siRNK ili kontrolom pomoću transfekcijskog reagensa (Santa Cruz). Nakon 72 sata stanični lizati su prikupljeni i učinkovitost PKC δ knock-outa je potvrđena Western blotom. Učinkovitost knock-outa bila je oko 80%. Korištena je siRNA kako bi se povećala specifičnost inhibicije jer komercijalno dostupan inhibitor PKC-a nije u potpunosti specifičan na δ izoformu enzima i ovisno o dozi može utjecati na aktivnost CamK III.

2.2.6. Analiza mitohondrijske morfologije

Četrdeset tisuća stanica postavljeno je na pokrovna stakalca koja su prethodno obložena Matrigelom (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Kako bi se vizualizirale mitohondrijske mreže, stanice su inkubirane s 30 nM tetrametilrodaminetilesterom (TMRE). TMRE

selektivno se nakuplja unutar mitohondrija. Na kraju svakog eksperimentalnog protokola slike su snimljene s Nikon TE2000 konfokalnim mikroskopom (Nikon, Melville, NY, SAD), (514 nm ekscitacija/585 nm emisija) pomoću 60x uljnog objektivna (NA 1.4) i analizirane pomoću ImageJ (NIH, Wayne Rasband, Bethesda, MD, SAD)⁽¹¹⁰⁾. Kao što je i ranije opisano, slike su kontrastno pojačane s 0,5% razine zasićenja. Uporabom filtera uklonjene su strukture ispod granice optičke rezolucije od 0.2 μm . Nakon uklanjanja struktura ispod granice optičke rezolucije, slike su segmentirane thresholdingom i binarizirane. Morfologija svakog mitohondrija opisana je pomoću dva faktora: omjer dužine (AR, omjer duže i kraće osi) i faktorom oblika (FF, $\text{opseg}^2/4\pi \times \text{površina}$). Oba faktora imaju minimalnu vrijednost 1 što predstavlja savršeni krug. Veće vrijednosti AR i FF predstavljaju duže i razgranate mitohondrijske strukture⁽¹¹¹⁾. Za svaku skupinu analizirano je pet stanica u četiri neovisna pokusa.

2.2.7. Mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u kardiomiocitima

Stanice su inkubirane u 2 μM 5- (i 6) -klorometil-2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat acetil esterom (CM-H2DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, SAD) koji je otopljen u DMEM tijekom 30 minuta. Nakon cijepanja acetatne grupe intracelularnom esterazom i oksidacijom, nefluorescentni H2DCFDA prelazi u visoko fluorescentni 2', 7'-diklorofluorescein (DCF). Argonskim laserom DCF se ekscitirao na 488 nm, a emitirana svjetlost prolazi kroz filter od 515 do 530 nm. Slike su analizirane pomoću ImageJ. Nakon oduzimanja intenziteta pozadine fluorescencija je prikazana u arbitrarnim jedinicama (a.u).

2.2.8. Western blot

Na kraju svakog eksperimentalnog protokola stanice su isprane u otopini fosfatnog pufera (PBS) i lizirane pomoću ultrazvuka i RIPA pufera za lizu stanica i tkiva (Cell Signaling,

Danvers, MA, SAD). Lizati su zatim centrifugirani 20 min na 14,000 g. Nakon centrifugiranja odvojio se supernatant i odredila koncentracija proteina u supernatantu pomoću Bradfordovog testa (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Proteini (30 µg/liniji gela) su odvojeni na SDS/PAGE i zatim preneseni na nitroceluloznu membranu. Membrane su blokirane s 5% nemasnim mlijekom ili 5% albuminima goveđeg seruma (BSA) kroz 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim inkubirane tijekom noći s primarnim antitijelima usmjerenim na pSer616 Drp1 i pSer637 Drp1 (Cell Signaling, Danvers, MA, SAD), Drp1 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, SAD), β-aktin, MFN1, MFN2, OPA1 (Abcam, Boston, MA, SAD) i PKCδ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD). Nakon ispiranja viška primarnog protutijela membrane su inkubirane sa sekundarnim protutijelom koje sadrži konjugiranu peroksidazu. Vrpce su na nitroceluloznoj membrani vizualizirane pomoću kemiluminiscencije (Pierce, Rockford, IL, SAD), a intenziteti su analizirani pomoću ImageJ 1,41. Podaci su prikazani u arbitrarnim jedinicama (a.u).

2.2.9. Imunoprecipitacija

Stanice su isprane u hladnom PBS-u te lizirane pomoću RIPA pufera. Lizati su potom centrifugirani 20 min na 14,000 g. Koncentracija proteina u lizatu je određena pomoću Bradfordovog testa (Bio-Rad). Proteini (200 µg) su inkubirani s CDK1 ili PKCδ antitijelom (Santa Cruz) 3 sata na 4 ° C, nakon čega su inkubirani s protein A/G kuglicama (Santa Cruz) preko noći na 4° C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani kroz 5 min na 500 g, a potom, nakon uklanjanja supernatanta, centrifugat je zagrijavan 5 min na 95° C kako bi se razbile veze između kuglica i imunokompleksa. Imunokompleksi su razdvojeni putem SDS/PAGE i preneseni na nitroceluloznu membranu. Membrana je inkubirana s primarnim antitijelom usmjerenim na Drp1, a potom i odgovarajućim sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom.

2.2.10. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD; n označuje broj neovisnih eksperimenata.

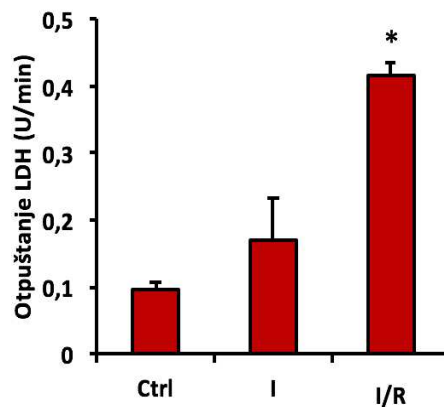
Statistička usporedba izvedena je pomoću Studentovog t-testa ili jednosmjerne analize varijance sa Tukey post-hoc testom ukoliko je to bilo potrebno. Vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajne.

2.3. Rezultati

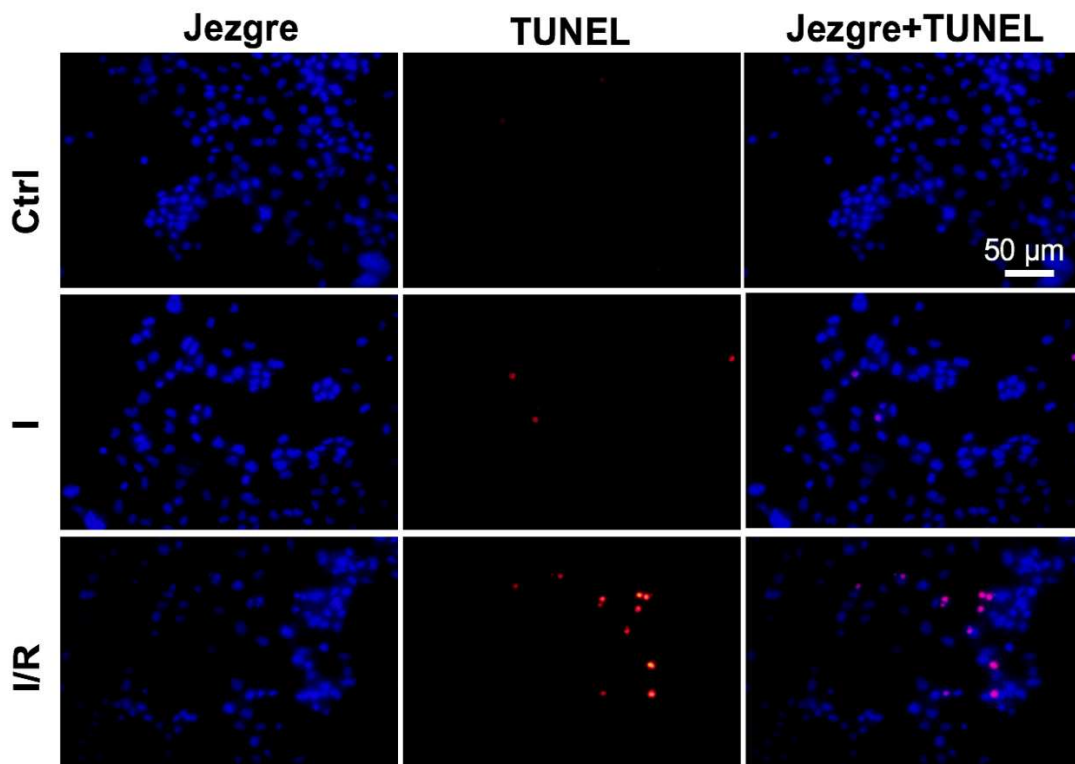
2.3.1. I/R oštećenje uzrokuje smrt kardiomiocita

Stanice su izložene ishemiji tijekom dva sata i reoksigenaciji tijekom jednog sata. I/R oštećenje značajno poveća smrt kardiomiocita što je i vidljivo iz porasta otpuštanja LDH i većeg broja TUNEL-pozitivnih stanica. Sama ishemija ne uzrokuje značajno veću smrt kardiomiocita u usporedbi sa kontrolnim uvjetima.

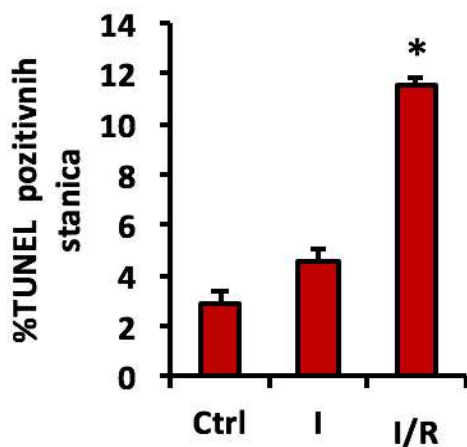
A



B



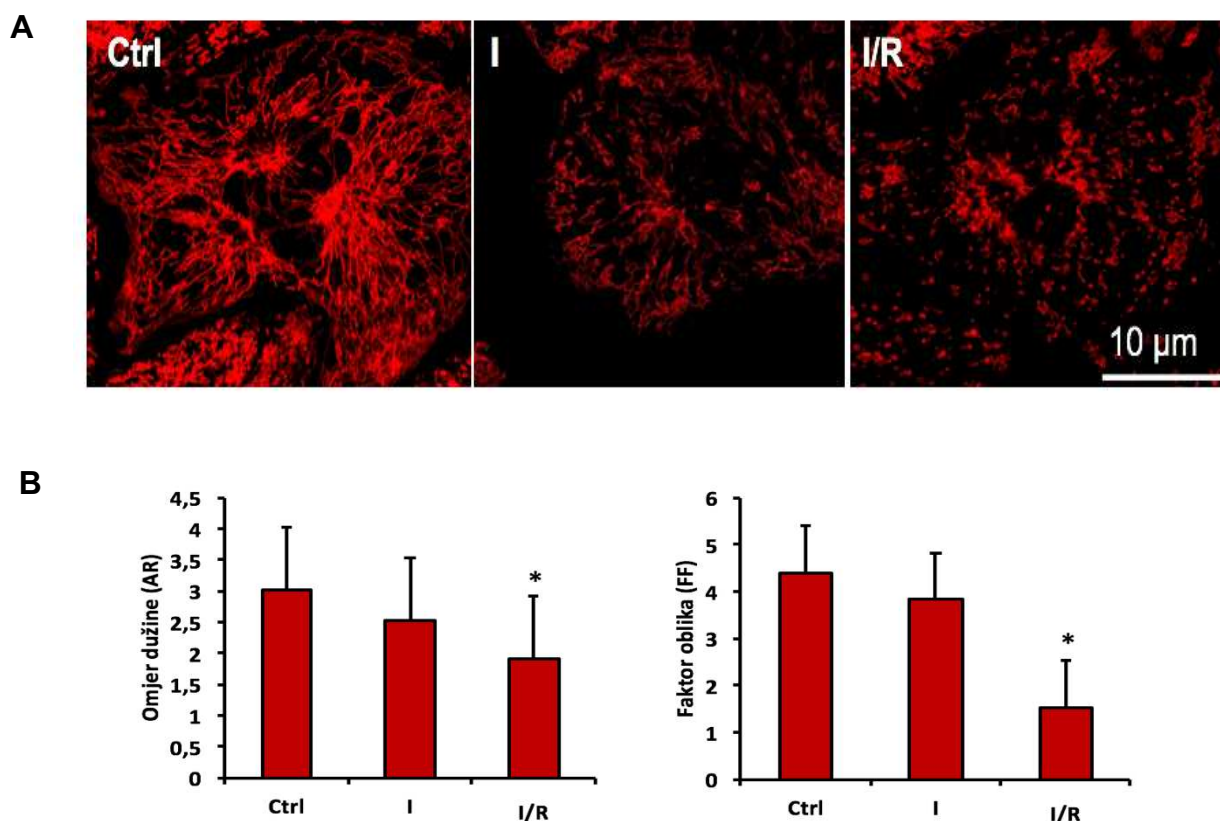
C



Slika 2.1. *I/R oštećenje uzrokuje smrt kardiomiocita.* (A) I/R značajno povećava smrt kardiomiocita što je vidljivo iz porasta otpuštanja laktat dehidrogenaze (LDH) iz stanica. (B, C) Konfokalna mikroskopija TUNEL bojanih stanica (crveno) je korištena za identifikaciju oštećenja DNK nakon I/R. Hoechst 33342 boja jezgre stanica (plavo). Zbirne slike pokazuju da je većina TUNEL pozitivnih stanica bila u I/R grupi. Sama ishemija ne povećava otpuštanje LDH kao ni broj TUNEL pozitivnih stanica u usporedbi sa kontrolnim uvjetima. ($P < 0,001$ vs Ctrl, $n=3$ neovisna eksperimenta). Ctrl=kontrola, I=ishemija, I/R=ishemija-reperfuzija

2.3.2. I/R oštećenje uzrokuje mitohondrijsku fisiju

Kako bi se vizualizirale promjene u morfologiji mitohondrija tijekom I/R, mitohondriji su bojani sa TMRE. Konfokalnom mikroskopijom ustanovili smo da su izduženi, razgranati i međusobno povezani mitohondriji prisutni u kardiomiocitima u kontrolnim uvjetima. Tijekom ishemije, nije bilo značajnog povećanja mitohondrijske fragmentacije, međutim, mali okrugli mitohondriji dominantno su prisutni u kardiomiocitima nakon I/R oštećenja. Za kvantificiranje strukturnih promjena mitohondrija korištena su dva faktora; AR i FF. I/R oštećenje značajno smanjuje vrijednosti AR i FF, što ukazuje da I/R izaziva pomak ravnoteže fuzija-fisija i mitohondrijska fisija postaje prevladavajući proces.

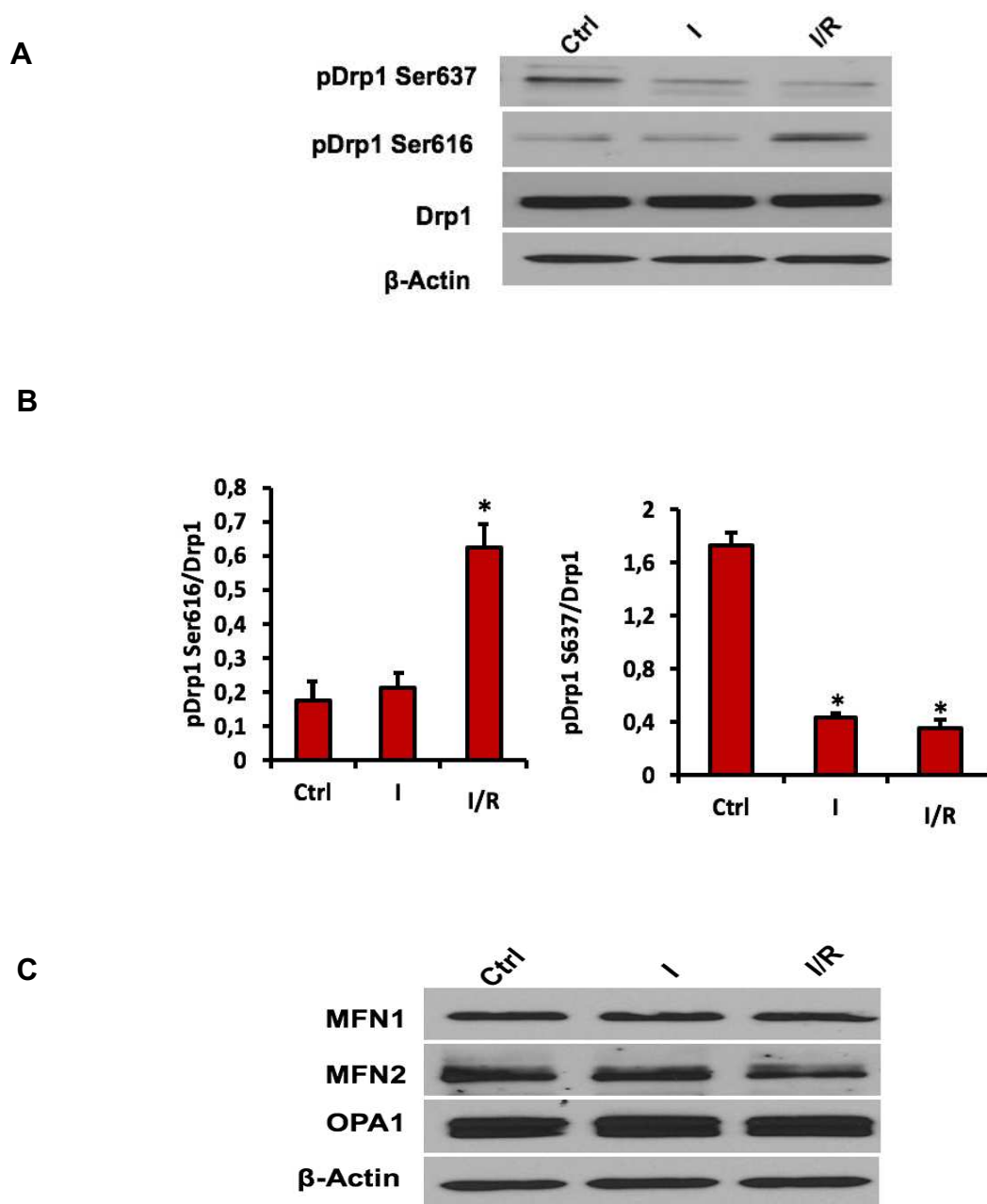


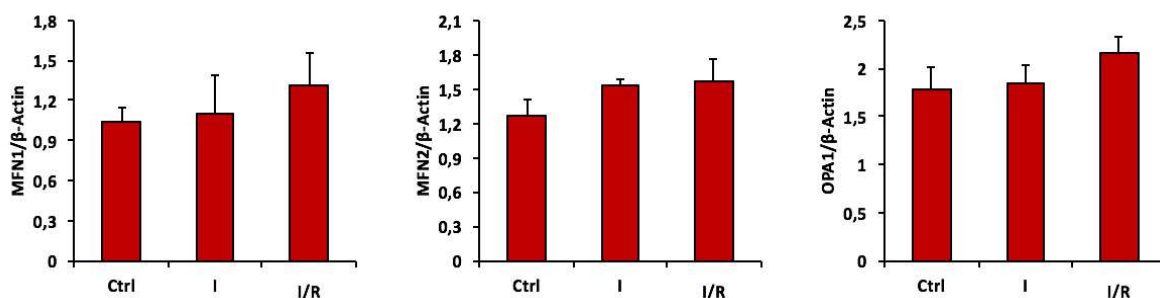
Slika 2.2. Mitohondrijska fisija tijekom I/R oštećenja (A) Konfokalna mikroskopija mitohondrija obojenih s TMRE prikazuje izdužene, razgranate i međusobno povezane mitohondrijske mreže u kontrolnim uvjetima u usporedbi s kardiomiocitima izloženim I/R u kojima su mitohondriji okrugli, punktiformni, mali fragmenti. (B) Kvantifikacija dužine mitohondrija i grananja na temelju konfokalne mikroskopije pokazuje značajno manje vrijednosti AR i FF u usporedbi s kontrolnim uvjetima ($P < 0,001$ vs Ctrl, $n = 5$ neovisnih eksperimenata). Ctrl=kontrola, I=ishemija, I/R=ishemija-reperfuzija

2.3.3. I/R oštećenje uzrokuje mitohondrijsku fisiju putem Drp1 aktivacije, ali ne dovodi do promjene mitohondrijskih fuzijskih proteina

Western blotom pokazali smo da tijekom I/R dolazi do aktivacije proteina Drp1 putem povećanja ekspresije aktiviranog pSer616 Drp1 i smanjenja ekspresije inaktiviranog pSer637 Drp1. Značajan porast pSer616 Drp1 uočen je krajem reoksigenacije, dok je smanjenje ekspresije inaktiviranog pSer637 uočeno krajem ishemijske i krajem reoksigenacije.

Mitochondrijska fuzija uključuje nekoliko velikih GTPaza proteina koji se nalaze na mitohondrijskoj vanjskoj i unutarnjoj membrani (MFN1, MFN2 i OPA1). Ekspresija ovih proteina nije se značajno promijenila tijekom I/R.

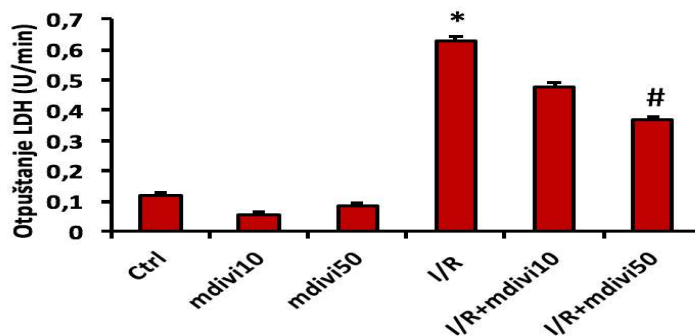


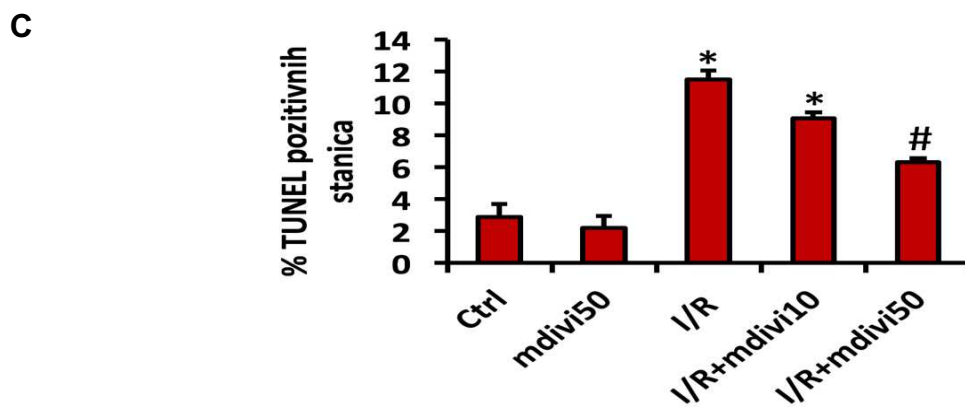
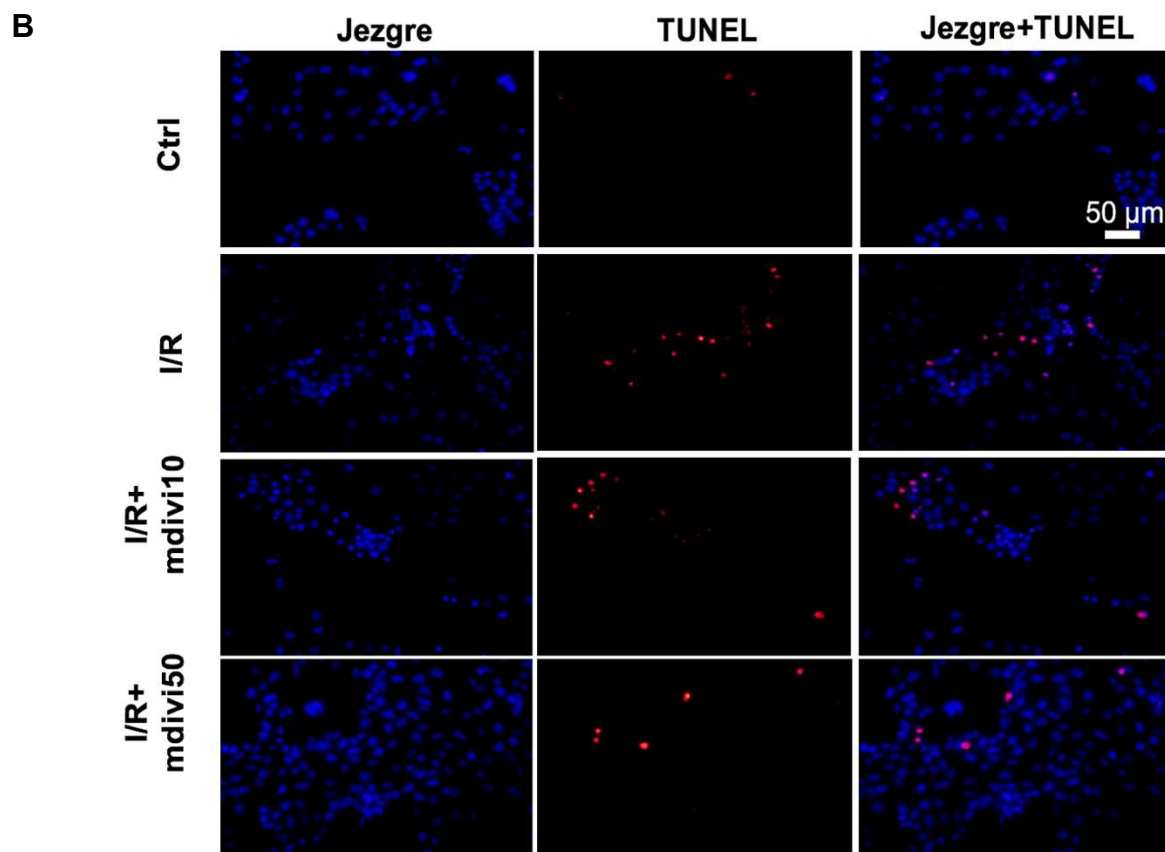
D

Slika 2.3. Ekspresija fuzijskih i fisijskih proteina tijekom I/R (A, B) Western blotom ustanovili smo značajno smanjenje ekspresije inaktiviranog Drp1 (pSer637 Drp1) tijekom I i krajem I/R dok porast ekspresije aktiviranog Drp1 (pSer616 Drp1) je ustanovljen samo nakon I/R ($P < 0.05$ vs. Ctrl, $n = 4$ neovisna eksperimenta). (C, D) Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji fuzijskih proteina između eksperimentalnih grupa (MFN1, MFN2 i OPA1). Ctrl=kontrola, I=ishemija, I/R=ishemija-reperfuzija

2.3.4. Blokada mitohondrijske fisije smanjuje smrt kardiomiocita nakon I/R oštećenja

Prije nego što su izloženi I/R oštećenju, kardiomiociti su tretirani sa Drp1 specifičnim inhibitorom, inhibitor mitohondrijskog dijeljenja 1, mdivi-1, tijekom jednog sata. Značajno smanjenje oslobađanja LDH i broja TUNEL pozitivnih stanica uočeno je u 50 μ M mdivi-1 grupi, što sugerira da Drp1-ovisna mitohondrijska fisija sudjeluje u smrti kardiomiocita tijekom I/R oštećenja.

A

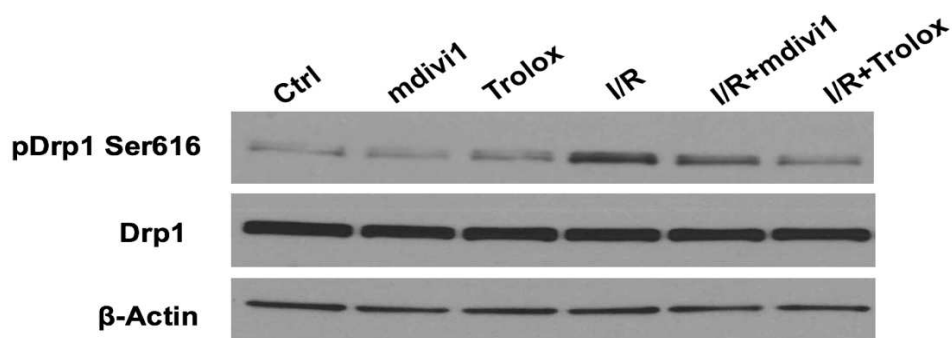


Slika 2.4. Inhibiranje mitohondrijske fisije smanjuje smrt kardiomiocita nakon I/R oštećenja. (A) Mdivi-1, Drp1 inhibitor, ovisno o dozi, smanjuje oslobađanje LDH nakon I/R. (B and C) Značajan porast u broju TUNEL-pozitivnih stanica nakon I/R oštećenja smanjen je u 50 μ M mdivi-1 grupi ($P < 0.001$ vs. Ctrl, $\#P < 0.05$ vs. I/R, $n=4$ neovisna eksperimenta).

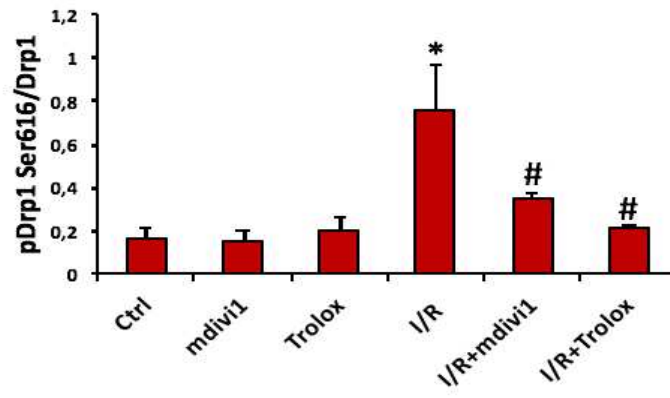
2.3.5. Povećanje proizvodnje ROS-a uzrokuje povećanu ekspresiju aktiviranog Drp1, a aktivacija kalcineurina dovodi do smanjenja ekspresije inaktiviranog Drp1 tijekom I/R oštećenja

Tijekom reoksigenacije dolazi do prekomjerne proizvodnje ROS-a. Kako bi se utvrdio redoslijed događaja između povećanja proizvodnje ROS-a i mitohondrijske fisije tijekom I/R oštećenja, kardiomiociti su tretirani s mdivi-1 i čistačem ROS-a, Troloxom. I mdivi-1 i Trolox smanjuju ekspresiju pSer616 Drp1. Trolox smanjuje proizvodnju ROS-a tijekom reoksigenacije, dok mdivi-1 nije imao nikakav utjecaj na ROS proizvodnju. Kako bismo utvrdili razlog smanjenja ekspresije inaktiviranog Drp1 (pSer637 Drp1), kardiomiociti su tretirani sa FK506, blokatorom kalcineurina. FK506 značajno smanjuje I/R-inducirano smanjenje u ekspresiji pSer637 Drp1. Konfokalnom mikroskopijom pokazano je kako je u mdivi-1, Trolox i FK506 tretiranim eksperimentalnim grupama, mitohondrijska građa bila slična onoj u kontrolnim uvjetima (slike nisu prikazane). I/R-inducirano smanjenje u AR i FF vrijednostima atenuirano je s mdivi-1, Trolox i FK506. Ovi podaci ukazuju na to da ovi blokatori sprječavaju povećanje mitohondrijske fisije nakon I/R i dodatno potvrđuju da su ROS i kalcineurin inicijatori aktivacije Drp1.

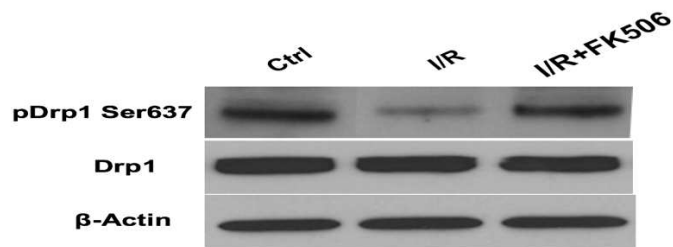
A



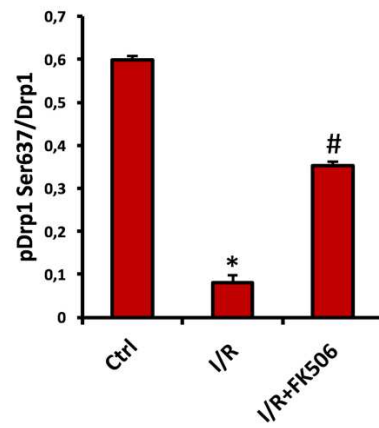
B



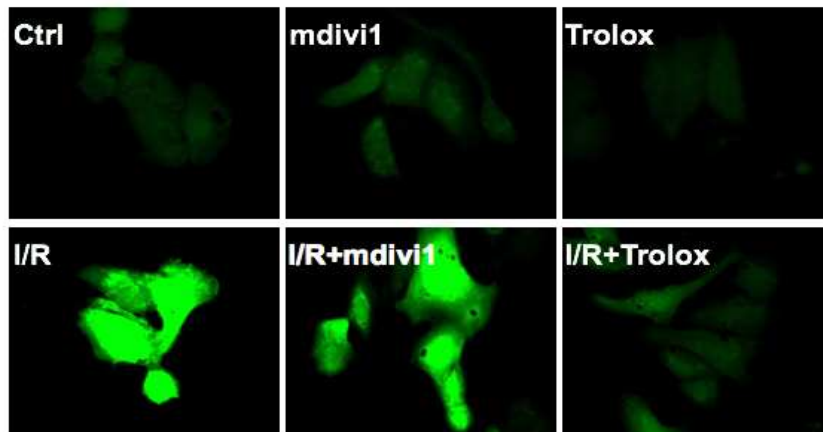
C



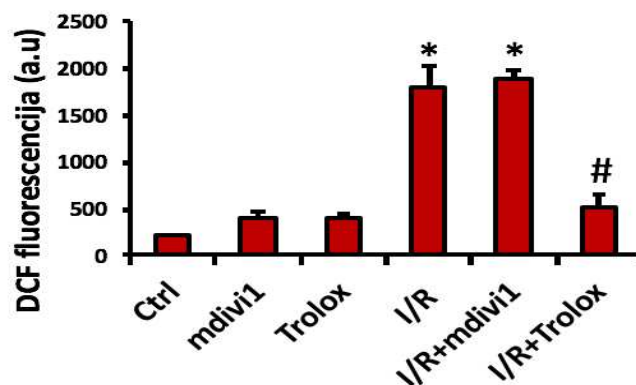
D



E



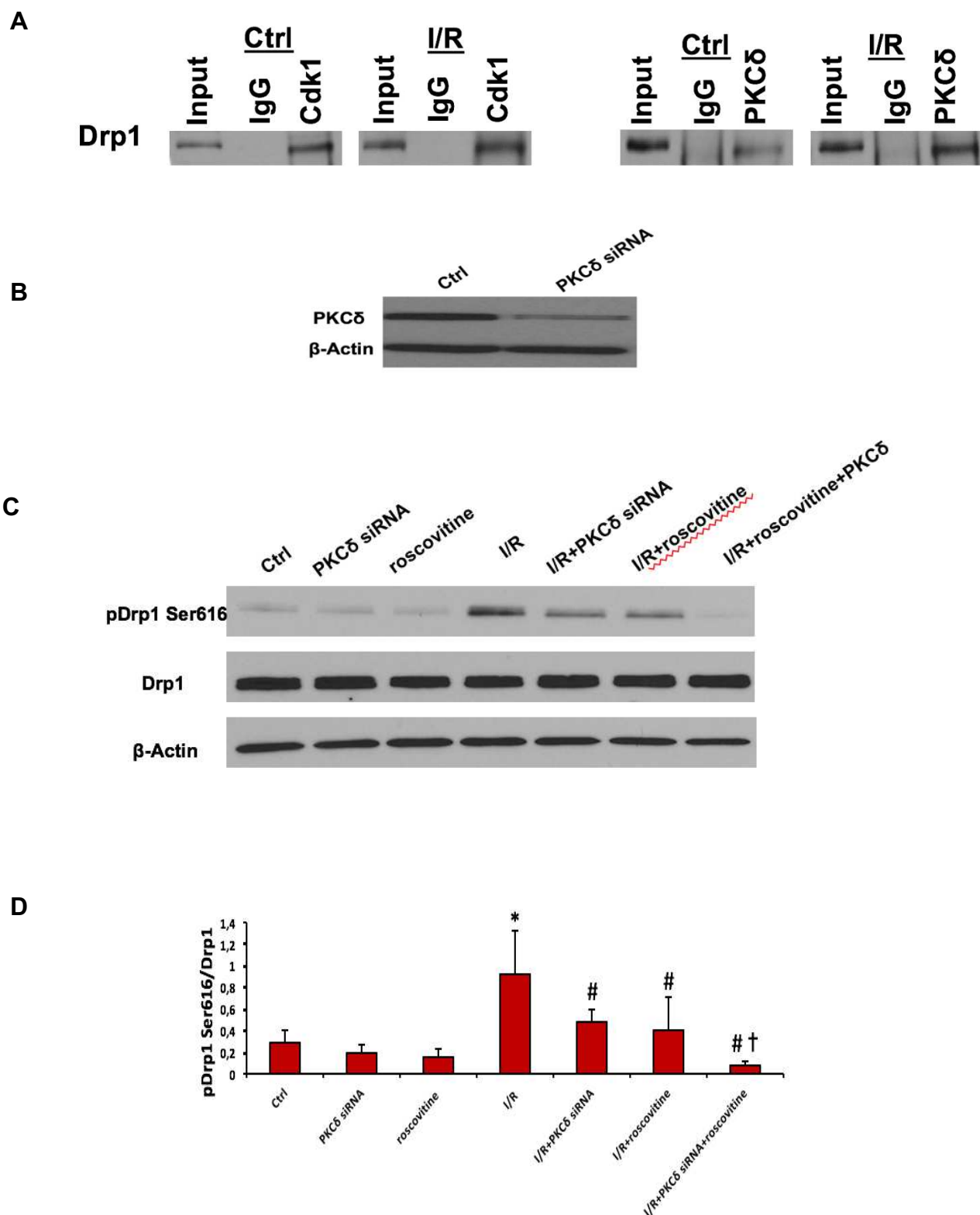
F



Slika 2.5. Povećanje proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) tijekom reoksigencije uzrokuje aktiviranje Drp1. (A i B) Western blotom uočen je značajan porast ekspresije pSer616 Drp1 nakon I/R u usporedbi s kontrolnim uvjetima. Mdivi-1 djelomično, a Trolox potpuno smanjuje povećanje razine pSer616 Drp1 nakon I/R ($P < 0,001$ vs Ctrl # $P < 0,05$ u odnosu na I/R, $n=3$ neovisna eksperimenta). (C i D) Ekspresija pSer637 Drp1 smanjena je nakon I/R u odnosu na kontrolne uvjete. Inhibitor kalcineurina FK506 značajno blokira smanjenje ekspresije pSer637 Drp1 nakon I/R ($n=3$ neovisna eksperimenta). (E, F) Proizvodnja ROS-a analizirana je konfokalnom mikroskopijom pomoću CM-H2DCFDA. Značajan porast DCF fluorescencije (ukazujući na proizvodnju ROS-a) u I/R grupi umanjuje se ukoliko su kardiomiociti prethodno tretirani sa čistačem ROS-a, Troloxom ($P < 0,001$ vs Ctrl, # $P < 0,001$ vs I/R, $n=4$ neovisna eksperimenta).

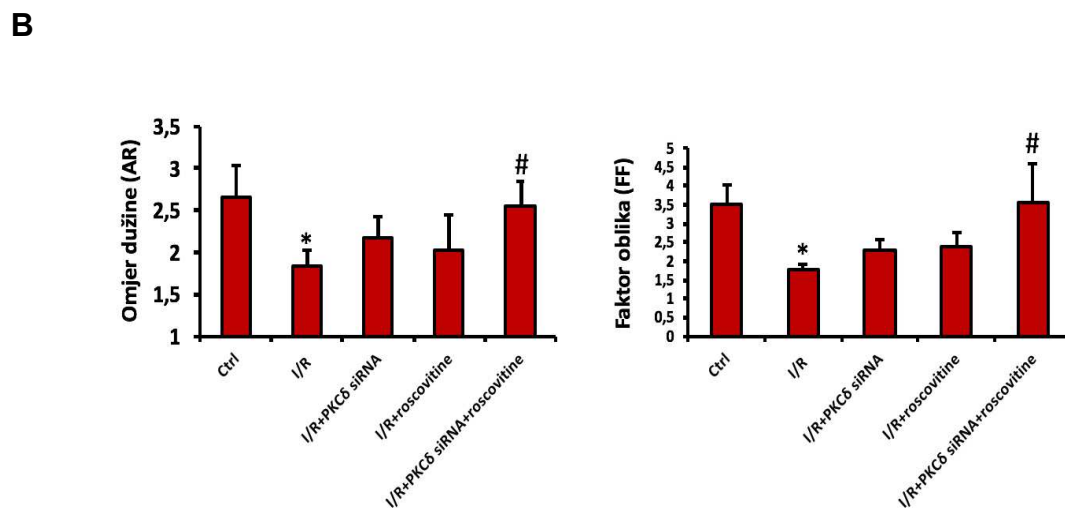
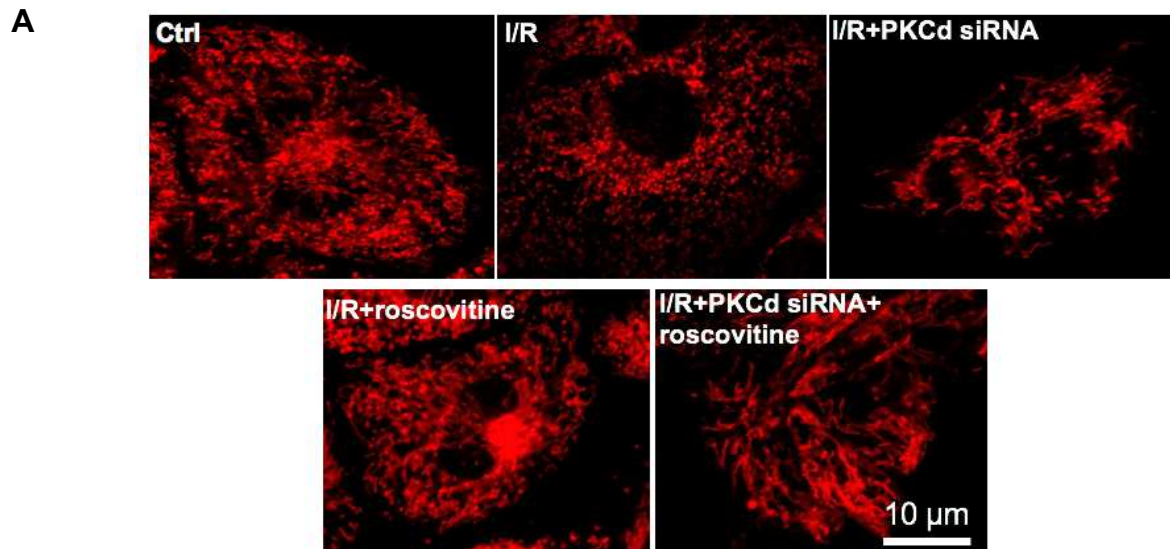
2.3.6. PKC δ i Cdk1 uzrokuju fosforilaciju Drp1, mitohondrijsku fisiju i smrt kardiomiocita tijekom I/R oštećenja

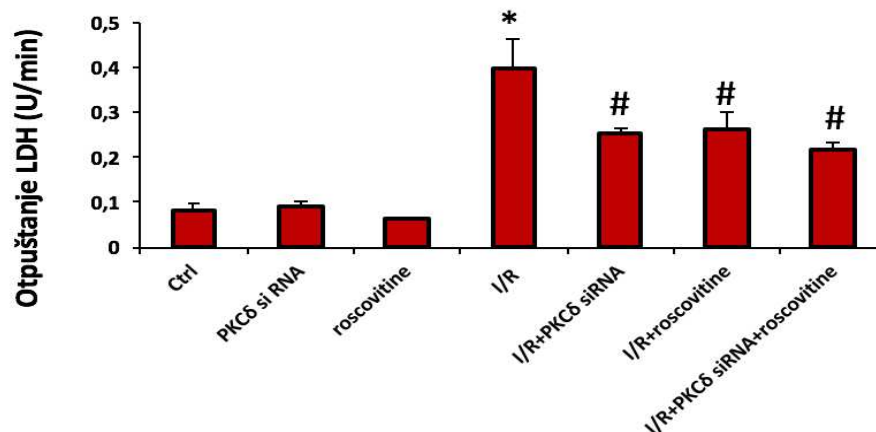
Rezultati imunoprecipitacije pokazali su da su i CDK1 i PKC δ u interakciji s Drp1 i da je ta interakcija povećana tijekom I/R oštećenja. Blokiranje PKC δ s PKC δ siRNA ili CDK1 s roscovinom djelomično smanjuje povećanje ekspresije pSer616 Drp1 tijekom I/R oštećenja. Blokiranje i PKC δ i CDK1 tijekom I/R u potpunosti smanjuje ekspresiju pSer616 Drp1 i mitohondrijsku fisiju, potvrđujući da su PKC δ i CDK1 glavne kinaze odgovorne za Drp1 aktivaciju tijekom I/R.



Slika 2.6. *I/R* inducira povećanje ekspresije pSer616 Drp1 putem PKC δ i CDK1. (A) Input, nespecifični IgG, ko-immunoprecipitirani PKC δ ili CDK1 detektirani su pomoću Western blota uz upotrebu anti-Drp1. I CDK1 i PKC δ su u interakciji s Drp1 i ova interakcija povećana je u

I/R oštećenju (B) Učinkovitost PKC δ siRNA u kardiomiocitima bila je oko 80%. (C, D) Značajno povećanje ekspresije pSer616 Drp1 nakon I/R u odnosu na kontrolne uvjete. Kada se dodaju odvojeno, PKC δ siRNA ili roscovitine, dolazi do djelomičnog smanjenja ekspresije pSer616 Drp1. Dodavanje i PKC δ siRNA i roscovitina tijekom I/R potpuno smanjuje povećanje ekspresije pSer616 Drp1 ($P < 0,001$ vs. Ctrl # $P < 0,05$ vs. I/R, † $P < 0,05$ vs. I/R+PKC δ siRNA i I/R+roscovitine, $n = 5$ neovisnih eksperimenata).



C

Slika 2.7. Mitohondrijska fisija analizirana je konfokalnom mikroskopijom u kardiomiocitima inkubiranim s TMRE. (A, B) Značajno smanjenje u vrijednostima AR i FF uočeno je nakon I/R oštećenja, što ukazuje na povećanu mitohondrijsku fisiju. Tretiranje kardiomiocita s PKCδ siRNA, roscovitinom ili oba značajno smanjuju povećanje mitohondrijske fisije i smanjenje u vrijednostima AR i FF u usporedbi s I/R ($P < 0,05$ vs. Ctrl, $\#P < 0,05$ vs. I/R, $n=3$ neovisna eksperimenta). (C) PKCδ siRNA ili CDK1 inhibitor roscovitin značajno smanjuje otpuštanje LDH u kardiomiocitima nakon I/R ($P < 0,001$ vs. Ctrl $\#P < 0,05$ vs. I/R, $n=3$ neovisna eksperimenta).

2.4. Rasprava

U ovom istraživanju pokazali smo da I/R oštećenje inducira mitohondrijsku fisiju u kardiomiocitima. Konkretno, utvrdili smo da blokada Drp1 s mdivi-1 u značajnoj mjeri smanjuje smrt kardiomiocita nakon I/R ozljede. Osim toga, prvi put smo pokazali da je (1) I/R oštećenjem inducirana mitohondrijska fisija povezana s Drp1 aktivacijom putem povećanja ekspresije aktiviranog pDrp1 Ser616 i smanjenja ekspresije inaktiviranog pDrp1 Ser637. Aktivacija Drp1 djelomično je blokirana s mdivi-1 i potpuno s Troloxom; i (2) povećanje u ekspresiji pDrp1 Ser616 nakon I/R oštećenja regulirano je s dvije glavne serin-treonin kinaze: CDK1 i PKC δ . Isto tako, defosforilacija Ser637 Drp1 tijekom I/R može biti blokirana s inhibitorom kalcineurina FK506. Nedavna istraživanja pokazala su da je povećanje mitohondrijske fisije povezano s različitim patološkim procesima, uključujući i ishemijsku bolest srca gdje je Drp1 igrao ključnu ulogu u oštećenju kardiomiocita. Primjerice, Cribbs, Stack i sur. utvrdili su da β -adrenergička stimulacija izoproterenolom uzrokuje aktivaciju mitohondrijske fisije promjenama u fosforilacijskom statusu Drp1 u odraslom mišjem srcu⁽⁵⁴⁾. U našem istraživanju opazili smo sličan mehanizam I/R-induciranog oštećenja kardiomiocita koje je bilo povezano s istovremenim povećanjem mitohondrijske fragmentacije. Povećanje mitohondrijske fisije tijekom reoksigenacije dobro je povezano s povećanjem ekspresije aktiviranog Drp1 pSer616 i smanjenjem ekspresije inaktiviranog Drp1 pSer637(112). I povećanje pDrp1 Ser616 i smanjenje pDrp1 Ser637 induciraju Drp1 translokaciju na vanjsku mitohondrijsku membranu u HeLa stanicama. Zbog svega navedenog jasno je kako je povećanje pDrp1 Ser616 i smanjenje pDrp1 Ser637 uključeno u I/R-inducirano oštećenje srčanih mišićnih stanica. Iako je dokazano kako povećanje ekspresije mitohondrijskih fuzijskih proteina povećava otpornost na I/R oštećenje, naše istraživanje pokazalo je da se razina ekspresije glavnih proteina uključenih u ovaj proces; MFN1, MFN2 i OPA; nije značajno promijenila nakon I/R, što sugerira da fuzijski proteini najvjerojatnije ne igraju

značajnu ulogu u I/R ozljedi. Međutim, blokiranje aktivacije mitohondrijskog fisijskog proteina Drp1 s mdivi-1 značajno smanjuje smrt srčanih mišićnih stanica, dodatno potvrđujući važnost mitohondrijske fisije u I/R ozljedi kardiomiocita. Rezultati prethodnih istraživanja pokazuju kako je reperfuzija nakon produljene ishemije potrebna za spašavanje preostalog ishemijski oštećenog miokarda, ali paradoksalno izaziva hiperprodukciju ROS-a zbog povećane aktivnosti mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona i poremećaja unutarstaničnog gradijenta Ca^{2+} . Naši podaci pokazali su važnost ROS-a u I/R ozljedi srčanih mišićnih stanica. Značajno povećanje proizvodnje ROS-a uočeno je nakon reperfuzije. Trolox, vitamin E analog i antioksidans, potpuno reducira ROS hiperprodukciju, pDrp1 Ser616 ekspresiju i mitohondrijsku fisiju. Mdivi-1 je neučinkovit u smanjenju proizvodnje ROS-a tijekom reoksigenacije, ali, ovisno o dozi, smanjuje mitohondrijsku fisiju i staničnu smrt što upućuje da ROS posreduje u povećanju mitohondrijske fisije kroz Drp1. Slični signalni putovi su također opisani i u endotelnim stanicama gdje ROS čistači blokiraju Drp1 ovisnu mitohondrijsku fisiju nakon I/R ozljede endotelnih stanica⁽¹¹³⁾.

Prethodne studije ukazuju na to da δ izoforma PKC, kalcij-neosjetljiv PKC izoenzim, aktivira se tijekom reperfuzije i da ROS prethodi PKC δ aktivaciji^(114, 115). CDK, ključna protein kinaza u regulaciji staničnog ciklusa i apoptozi, aktivira se pod utjecajem ROS-a i tijekom ishemije⁽¹¹⁶⁾. Aktivacija PKC δ i CDK rezultira fosforilacijom silaznih efektor, što otvara pitanje međudjelovanja ovih kinaza s Drp1 aktivacijom i njihovom ulogom u mitohondrijskoj fragmentaciji. Nedavno objavljeno istraživanje sugerira utjecaj PKC δ u fosforilaciji Drp1 na Ser616 tijekom oksidacijskog stresa u neuronima⁽¹¹⁷⁾. Međutim, ne postoje istraživanja o utjecaju ovih kinaza na Drp1 u kardiomiocitima tijekom I/R oštećenja. U našem istraživanju, utvrdili smo izravnu interakciju između PKC δ i Drp1, kao i CDK1 i Drp1 u HL1 kardiomiocitima. Osim toga, PKC δ siRNA i CDK inhibitor roscovitin značajno smanjuju porast u fosforilaciji Drp1 na Ser616, Drp1 posredovanu mitohondrijsku fisiju i smrt

kardiomiocita, što sugerira da nakon reperfuzije ROS inducira fosforilaciju Ser616 putem serin-treonin kinaza: CDK1 i PKC δ .

Smanjenje ekspresije pDrp1 Ser637 posredovano je kalcineurinom, ali ne i ROS-om. Nedavna studija pokazala je važnost kalcineurin posredovane mitohondrijske fisije u tubularnim stanicama bubrega. Fosforilacija na Ser637 putem protein kinaze A uzrokuje inaktivaciju Drp1 i blokira translokaciju Drp1 na vanjsku mitohondrijsku membranu, dok defosforilacija Ser637 djelovanjem kalcineurina uzrokuje Drp1 ovisnu mitohondrijsku fisiju. Blokiranje kalcineurina smanjuje defosforilaciju Drp1 Ser637 kod pada razine ATP-a u tubularnim stanicama bubrega⁽¹¹⁸⁾.

Ukratko, strukturni integritet mitohondrija igra važnu ulogu u smrti kardiomiocita tijekom I/R oštećenja. Prvi put smo pokazali da I/R oštećenje inducira mitohondrijsku fisiju putem porasta proizvodnje ROS-a i aktivacije PKC δ , CDK1 i kalcineurina što zatim dovodi do povećane ekspresije aktiviranog Drp1 i smanjenja ekspresije inaktiviranog Drp1. Ovi rezultati pridonose boljem razumijevanju temeljnih molekularnih mehanizma oštećenja srčanih mišićnih stanica preko fragmentacije mitohondrija i pružaju korisnu strategiju zaštite srčanih mišićnih stanica putem interferencije Drp1-ovisne mitohondrijske fisije.

Poglavlje 3

**Hiperglikemija uzrokuje smanjenje anestetičkog prekondicioniranja
u kardiomiocitima diferenciranim iz matičnih stanica: uloga
mitohondrijske dinamike i reaktivnih kisikovih vrsta**

3.1. Uvod

Šećerna bolest uzrokuje više od 240.000 smrtnih slučajeva godišnje u SAD-u, a oko 70% bolesnika umire zbog kardiovaskularnih bolesti⁽¹¹⁹⁾. Hlapljivi anestetici su kardioprotektivni u okruženju raznih stresora, ali dijabetes je iznimka, stresor u kojem hlapljivi anestetici nisu kardioprotektivni⁽¹²⁰⁾. Brojne kliničke studije potvrdile su učinkovitost anestetičkog prekondicioniranja srca kod pacijenata^(121, 122). Međutim, kardioprotektivni učinci hlapljivih anestetika značajno su smanjeni u prisustvu hiperglikemije putem još nedovoljno poznatih mehanizama.

Većina laboratorijskih podataka sakupljenih na različitim životinjskim modelima pokazuje da hiperglikemija potiče stvaranje ROS-a u mitohondrijima što pridonosi atenuaciji kardioprotektivnosti anestetika⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Istovremeno, drugi podaci ukazuju na to da primjena antioksidansa može obnoviti kardioprotektivne učinke hlapljivih anestetika tijekom hiperglikemije⁽¹²³⁻¹²⁵⁾. Također, hiperglikemijom inducirano stvaranje ROS-a i Drp1 posredovana mitohondrijska fisija dovode do otvaranja mPTP-a i posljedične smrti kardiomiocita⁽³³⁾.

Mitohondriji se neprekidno gibaju i dijele. Normalna ravnoteža fuzije i fisije mitohondrijske membrane potrebna je kako bi se održala stanična homeostaza. Neuravnotežena fisija i fuzija mogu uzrokovati različite patološke procese, kao što su apoptoza, mitofagija i nekroza. Najvažniji mitohondrijski fisijski protein je Drp1, koji se uglavnom nalazi u citosolu, ali nakon aktivacije, dolazi do njegove oligomerizacije i translokacije na mitohondrijsku membranu. Kad je Drp1 fosforiliran na Ser616, dolazi do mitohondrijske fisije. Mitohondrijska dinamika ima ključnu ulogu i u mitohondrijskoj bioenergetici. Nedavno provedeno istraživanje ukazuje na povezanost između mitohondrijske dinamike i oksidativne fosforilacije. Inhibicija mitohondrijske fuzije rezultirala je smanjenom potrošnjom kisika. Gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala i smanjenje endogene respiracije ili

sposobnosti da se poveća respiracija zabilježeni su u fibroblastima⁽¹²⁶⁾. Promjene u jednoj od mitohondrijskih membranskih fuzijskih proteina također pogađaju mitohondrijski metabolizam na sličan način⁽¹²⁷⁾. Druga istraživanja pokazuju da promjene u mitohondrijskim fuzijskim proteinima mogu utjecati na mitohondrijski metabolizam. Genski knock-out Drp1 u HeLa stanicama dovodi do pada bazalne potrošnje kiska i sinteze ATP-a. Također, hiperglikemijom izazvana mitohondrijska fisija i inhibicija mitohondrijske fisije dominantno negativnom mutacijom Drp1 značajno umanjuju mitohondrijsku sposobnost da se poveća brzina respiracije.

Većina istraživanja koja su proučavala nemogućnost anestetičkog prekondicioniranja tijekom hiperglikemije provedena su na različitim prekliničkim modelima. Iako su ova istraživanja značajna, važno ih je provesti na ljudskim kardiomiocitima jer mogu postojati značajne razlike među vrstama. Na temelju nedavnog napretka u reprogramiranju induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC) iz somatskih stanica, ljudski kardiomiociti mogu se diferencirati pomoću različitih protokola⁽¹²⁸⁻¹³²⁾. Ovi iPSC diferencirani kardiomiociti (iPSC-CM) slične ljudskim kardiomiocitima u mnogim aspektima i osiguravaju *in vitro* ljudski eksperimentalni model^(100, 133). Prethodna istraživanja pokazala su sličnu razinu kardioprotekcije izofluranom u kardiomiocitima diferenciranim iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica i iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica kao i u stanicama ljudskog miokarda⁽¹³⁴⁾. Osim toga, hiperglikemija smanjuje kardioprotektivne učinke izoflurana i u iPSC-CM. Međutim, temeljni molekularni mehanizmi do danas je nepoznat.

Dakle, cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu hiperglikemije u smanjenju izofluranom inducirane kardioprotektivnosti u relevantnom ljudskom modelu. Koristeći iPSC-CM, pretpostavili smo da hiperglikemijom uzrokovano povećano stvaranje ROS-a i mitohondrijska fisija doprinose slabljenju kardioprotektivnih učinaka izoflurana. Osim toga, pretpostavili smo

da će uklanjanje ROS-a ili inhibicija mitohondrijske fisije tijekom hiperglikemije vratiti izofluranom induciranu zaštitu u iPSC-CM.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Ljudske inducirane pluripotentne matične stanice i diferencijacija kardiomiocita

Sve eksperimente na ljudskim stanicama odobrilo je Etičko povjerenstvo Medical College of Wisconsin. Ljudski fibroblasti prepucija reprogramirani su na način kako je to i prethodno opisano^(90, 135). iPSC bile su dar dr. Stephena Duncana. (Pročelnik Stanične biologije, neurobiologije i anatomije i Zavoda za regenerativnu medicinu i biologiju matičnih stanica, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, SAD). iPSC su uzgajane kao što je to i prethodno opisano⁽¹²⁸⁾. Postupak diferencijacije kardiomiocita iz iPSC samo je ukratko opisan. Prije početka diferencijacije, iPSC su od hranidbene podloge odvojene s akutazom (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, SAD) i postavljene na posudicu koja je prethodno obložena s Matrigelom (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) u mTeSR1 mediju (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) s dodatkom 10 μ M ROCK inhibitora Y-27632 (EMD Millipore, Billerica, MA, SAD). Stanice su uzgajane svakodnevnim izmjenama medija četiri dana u hipoksičnom inkubatoru (4% O₂, 5% CO₂). Kad se dosegla 90% konfluentnost stanica, mTeSR1 medij je zamijenjen mTeSR1 medijem s dodatkom Matrigela, a potom su stanice inkubirane 24 sata u normoksičnom inkubatoru (20% O₂, 5% CO₂). Na dan 0, Roswell Park Memorial Institute Medij (RPMI), uz B27 dodatka (RPMI/B27) bez inzulina (Life Technologies, Carlsband, CA, SAD) i s Matrigelom i aktivinom A (100 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD) korišten je tijekom 24 sata. Na dan 1, medij je zamijenjen sa RPMI/B27 bez inzulina s dodatkom bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (5 ng/mL) (Life Technologies) i koštanog morfogenetskog proteina-4 (BMP-4) (5 ng/ml) (R&D

Systems). Stanice su kultivirane u normoksičnom (20% O₂, 5% CO₂) inkubatoru tijekom 4 dana. Petog dana medij je zamijenjen s RPMI/B27 s inzulinom i mijenjan je svaka dva dana. Stanice su se obično počele kontrahirati nakon 12-14 dana.

3.2.2. Mikrodisekcija i disocijacija stanica

Mjesec dana nakon početka diferencijacije kontrahirajući kardiomiociti mehanički su disocirani pomoću 27 G igle pod svjetlosnim mikroskopom (SMZ1000; Nikon, Tokyo, Japan). Nakon toga, veće nakupine stanica su enzimski disocirani u manje nakupine i individualne stanice pomoću 0.05% tripsin-EDTA (Invitrogen) tijekom pet minuta. Tripsin je inaktiviran s Dulbecco Modificiranim Eagle Medijem (DMEM) uz dodatak 20% FBS-a, a nakon toga pojedinačne stanice stavljene su na Matrigelom obložena pokrovna stakalca ili posude (25 000 stanica/cm²).

3.2.3. Imunofluorescencija

Pojedinačne stanice na Matrigel obloženim pokrovnim stakalcima fiksirane su s 1% paraformaldehidom (PFA) tijekom 30 minuta i permeabilizirane s 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) te inkubirane s 10% magarećim serumom tijekom 30 minuta, kako bi se smanjilo nespecifično bojenje. Stanice su zatim inkubirane s primarnim protutijelima za sarkomerni α -actinin (1:100 razrjeđenje, Sigma-Aldrich) i anti-srčano-specifičnim troponinom T (1:100; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) tijekom 1 sat na 37°C. Nakon tri ispiranja s otopinom fosfatnog pufera (PBS), stanice su inkubirane s fluorescentno označenim sekundarnim protutijelima Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen, Waltham, MA, SAD) tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Jezgre su bojane s TOPRO-3 (1:1000; Invitrogen). Pokrovna stakalca su zatim postavljena na konfokalni mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon, Tokyo, Japan).

3.2.4 Genetsko obilježavanje iPSC-CM sa lentivirusnim vektorom

Genetsko obilježavanje iPSC-CM provedeno je na sličan kao i u našem prethodnom istraživanju. NCX-1 eGFP subkloniran je u lentivirusni plazmid pHR(+).c.Ub.MCSoligo.R(-)W(+). NCX-1 promotor specifičan je za ventrikularne kardiomiocite. Jedan dan nakon diferencijacije kardiomiociti su transducirani s lentivirusnim vektorom koji kodira humani natrij-kalcij izmjenjivač 1 (NCX-1) sa zelenim fluorescentnim proteinom (eGFP: multiplicitet infekcije, $1,8 \times 10^4$) (pNCX-1/eGFP) (dar od dr. Eduardo Marbán, MD, Ph.D., pročelnik Zavoda za bolesti srca, Cedars-Sinai u Los Angeles, CA, SAD)⁽¹³⁶⁾.

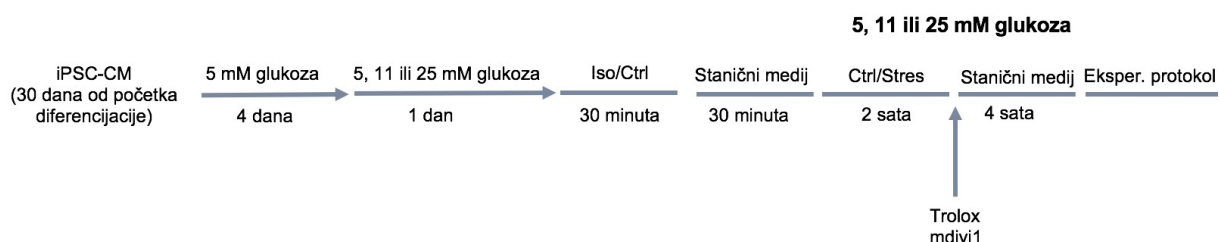
3.2.5. Eksperimentalni protokol

Dvadeset četiri sata nakon lentivirusne transdukcije, RPMI/B27 medij s 11 mM glukozom zamijenjen je s RPMI/B27 medijem koji sadržava 5 mM glukozu. Stanice su kultivirane tijekom 4 dana s dnevnim izmjenama medija. Pokrovna stakalca zatim su postavljena u posudicu s 12 jažica i podijeljena u tri skupine: prva skupina s 5 mM glukozom uz 20 mM manitol, druga 11 mM glukozu uz 14 mM manitol i treća s 25 mM glukozom, kako bi sve otopine bile osmotski uravnotežene. iPSC-CM kultivirane su u svakoj od ovih otopina glukoze tijekom 24 sata.

Odgovarajuće količine otopine izoflurana (Baxter, Deerfield, IL, SAD) obrađene su ultrazvukom u staničnom mediju kako bi se postigla 0,5 mM (~ 1 minimalna alveolarna koncentracija, MAC) koncentracija kao što je to i učinjeno u prethodnim istraživanjima^(134, 137). MAC označava onu koncentraciju anestetika koja je potrebna da bi se u potpunosti prekinuo motorički odgovor na kirurški (bolni) stimulans u 50% ispitanika. Kontrolni medij bez izoflurana istovremeno je tretiran ultrazvukom kao i medij s izofluranom. Na kraju svakog eksperimenta, koncentracija izoflurana analizirana je plinskom kromatografijom.

iPSC-CM u svakoj su skupini podvrgnuti ili 0,5 mM izofluranu ili kontrolnom mediju (bez izoflurana) kroz 30 minuta.

iPSC-CM su zatim podvrgnuti kontrolnim uvjetima ili stanju oksidativnog stresa sa 100 μM H_2O_2 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) i 10 mM 2-deoksi-glukoza (Sigma Aldrich), inhibitorom glikolize. Oksidativni stres primijenjen je tijekom dva sata. Trolox (250 μM ; Sigma Aldrich) ili mdivi1 (50 μM , Sigma Aldrich), inhibitor Drp1 (inhibitor mitohondrijskog dijeljenja 1), dodan je odmah nakon dvosatnog perioda oksidativnog stresa. iPSC-CM su zatim vraćene u svoje skupine glukoze tijekom četiri sata prije različitih eksperimentalnih protokola. Testovi staničnog oštećenja, stvaranje ROS-a i mitohondrijska fisija provedeni su za sve skupine. Eksperimentalni protokoli provedeni su kao što je prikazano na slici 3.1.



Slika 3.1. Eksperimentalni protokol. Kardiomiociti diferencirani iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM) kultivirani su u mediju s različitim koncentracijama glukoze (5, 11 i 25 mM). Nakon toga, stanice su izložene izofluranu i oksidativnom stresu, a svi eksperimentalni protokoli izvedeni su u različitim koncentracijama glukoze. Iso=izofluran, Ctrl=kontrola, Stres= H_2O_2 .

3.2.6. Laktat dehidrogenaza (LDH) test

Laktat-dehidrogenaza (LDH) test je korišten kao test citotoksičnosti. Četrdeset tisuća iPSC-CM je stavljeno po jažici u posudu od 96 jažica s 100 μl RPMI/B27 medija uz odgovarajuće koncentracije glukoze. Otpuštanje LDH mjereno je kolorimetrijski prema uputama proizvođača (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, SAD).

3.2.7. Konfokalna mikroskopija u određivanju mitohondrijskog membranskog potencijala i otvaranja mPTP

Četiri dana nakon transdukcije s lentivirusnim vektorom, slike su snimljene s konfokalnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE2000-U). Živi iPSC-CM identificirani su pomoću NCX 1-eGFP ekspresije. Tetrametilrodaminetilester (TMRE 30 nM; Invitrogen) korišten je za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$). Određivanje otvaranja mPTP-a procijenjeno je na temelju metode koja je i prije korištena u našem laboratoriju, a koja se temelji na indukciji otvaranja mPTP-a fotoekscitacijom generiranim oksidativnim stresom. Otvaranje mPTP-a definirano je brzim padom $\Delta\Psi_m$ što se vidi kao gubitak TMRE fluorescencije koja je osjetljiva na inhibiciju mPTP-a⁽¹³⁸⁾. Podaci su analizirani s ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD)

3.2.8. Western blot

Na kraju svakog eksperimentalnog protokola stanice su isprane u otopini fosfatnog pufera (PBS) i lizirane pomoću ultrazvuka i RIPA pufera za lizu stanica i tkiva (Cell Signaling, Danvers, MA). Lizati su zatim centrifugirani 20 min na 14,000 g. Nakon centrifugiranja odvojio se supernatant i odredila koncentracija proteina u supernatantu pomoću Bradfordovog testa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteini (30 μ g/liniji gela) su odvojeni na SDS/PAGE i zatim preneseni na nitroceluloznu membranu. Membrane su blokirane s 5% nemasnim mlijekom ili 5% albuminom goveđeg seruma (BSA) kroz 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim inkubirane tijekom noći s primarnim antitijelima usmjerenim na pSer616 Drp1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Drp1 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), β -aktin (Abcam, Boston, MA, USA). Nakon ispiranja viška primarnog protutijela, membrane su inkubirane sa sekundarnim protutijelom s peroksidazom. Vrpce na nitroceluloznoj

membrani vizualizirane su pomoću kemiluminiscencije (Pierce, Rockford, IL, USA) i intenziteti su analizirani pomoću ImageJ 1,41. Podaci su prikazani u arbitrarnim jedinicama (a.u).

3.2.9. Analiza mitohondrijske morfologije

Četrdeset tisuća stanica je postavljeno na pokrovna stakalca koja su prethodno obložena Matrigelom (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Kako bi se vizualizirale mitohondrijske mreže, stanice su inkubirane s 30 nM tetrametilrodaminetilesterom (TMRE). TMRE se selektivno nakuplja unutar mitohondrija. Na kraju svakog eksperimentalnog protokola, slike su snimljene s Nikon TE2000 konfokalnim mikroskopom (Nikon, Melville, NY, USA), (514 nm ekscitacija/585 nm emisija) upotrebom 60x uljnog objektiva (NA 1.4) i analizirane pomoću ImageJ (NIH, Wayne Rasband, Bethesda, MD, USA)⁽¹¹⁰⁾. Kao što je i ranije opisano, slike su kontrastno pojačane sa 0,5% razine zasićenja. Uporabom filtera uklonjene su strukture ispod granice optičke rezolucije od 0.2 μm . Nakon uklanjanja struktura ispod granice optičke rezolucije, slike su segmentirane thresholdingom i binarizirane. Morfologija svakog mitohondrija opisana je pomoću dva faktora: omjer dužine (AR, omjer duže i kraće osi) i faktorom oblika (FF, $\text{opseg}^2/4\pi \times \text{površina}$). Oba faktora imaju minimalnu vrijednost 1, što predstavlja savršen krug. Veće vrijednosti AR i FF predstavljaju duže i razgranate mitohondrijske strukture⁽¹³⁹⁾. Za svaku skupinu analizirano je barem 50 stanica.

3.2.10. Mjerenje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u iPSC-CM

Razina proizvodnje ROS-a u iPSC-CM određena je pomoću fluorescentne probe difidroetidij (DHE) (Molecular probe, Grand Island, NY, SAD). Stanice su inkubirane s 5 μM DHE 25 minuta na sobnoj temperaturi u RPMI mediju. Slike su analizirane s konfokalnim mikroskopom i pomoću ImageJ softvera.

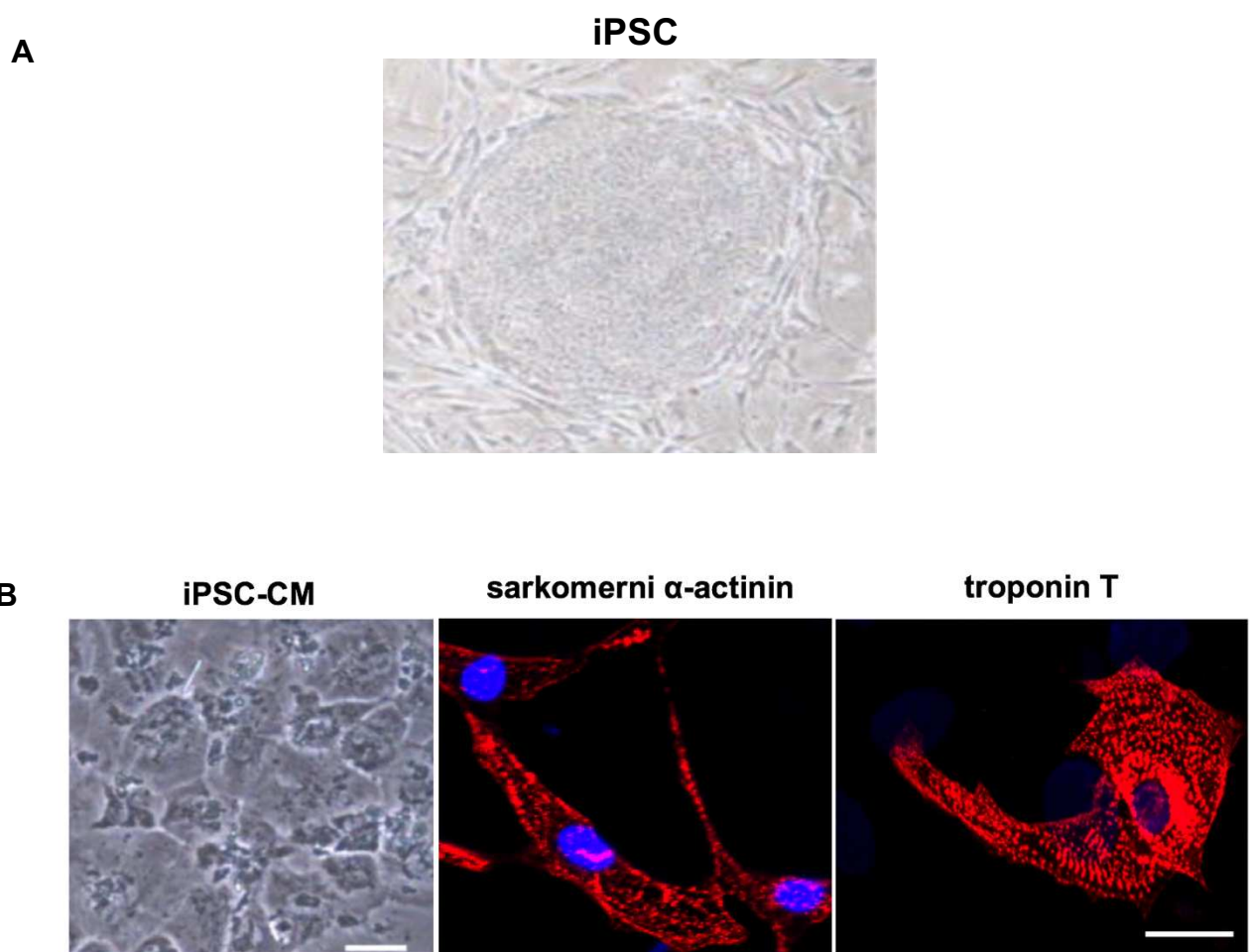
3.2.11. Statistička analiza

Podaci su prikazani kao $SV \pm SD$. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od iPSC-CM iz najmanje tri odvojene diferencijacije. Za statističku analizu, koristio se SigmaStat 3.0 softver (Systat Software, Inc, San Jose, CA). Statistička usporedba izvedena je primjenom jednosmjerne analize varijance. $P < 0.05$ je smatrana značajnom.

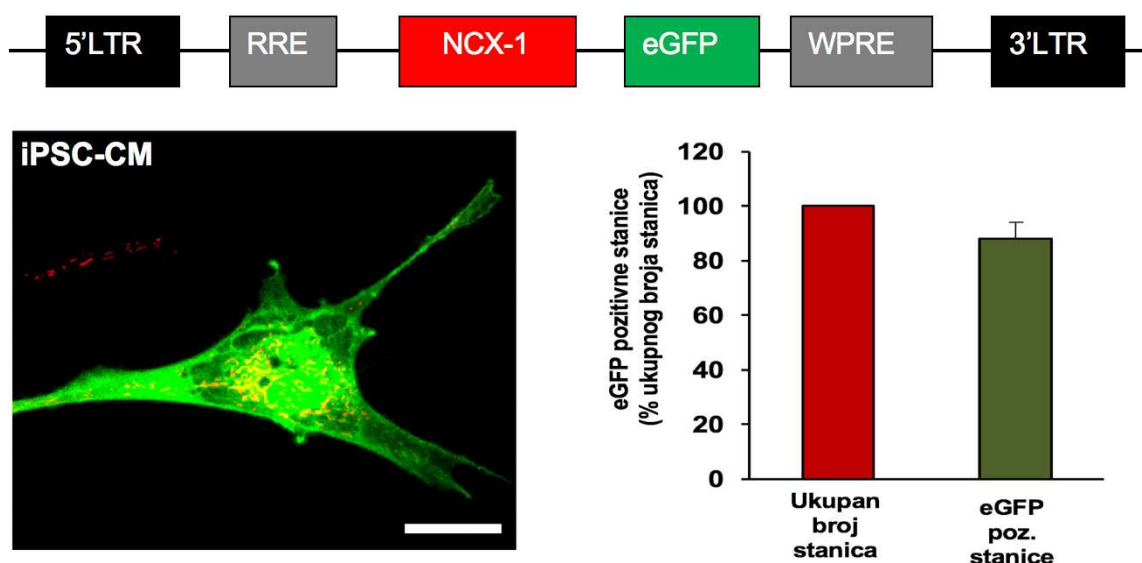
3.3. Rezultati

3.3.1. Karakterizacija kardiomiocita diferenciranih iz iPSC

iPSC-CM kontrahirali su se nakon dva tjedna od početka diferencijacije. Imunohistokemijski je potvrđena prisutnost specifičnih srčanih proteina: srčani troponin T i sarkomerni α -actinin. Disocirani kardiomiociti obilježeni su lentivirusnim vektorom koji eksprimira eGFP. Oko 80 do 90% disociranih stanica izražava eGFP, što ukazuje na visoku učinkovitost diferencijacije iz iPSC. Živi, eGFP pozitivni kardiomiociti korišteni su za daljnje eksperimente na konfokalnom mikroskopu.



C

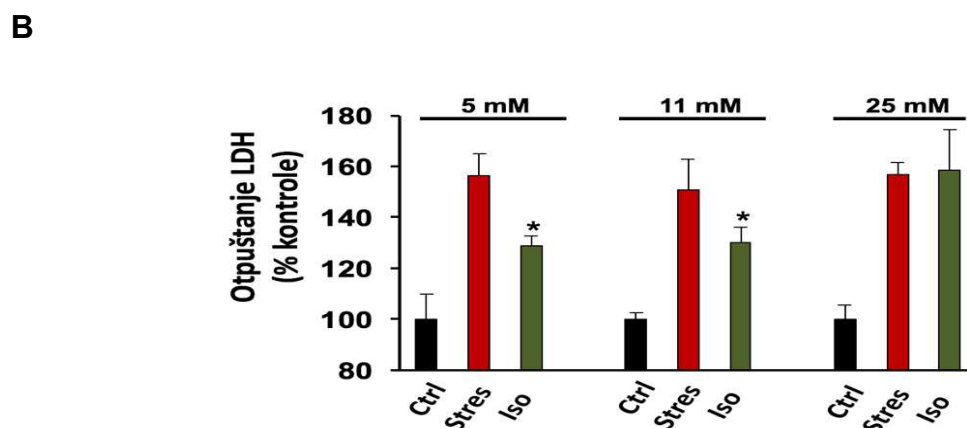
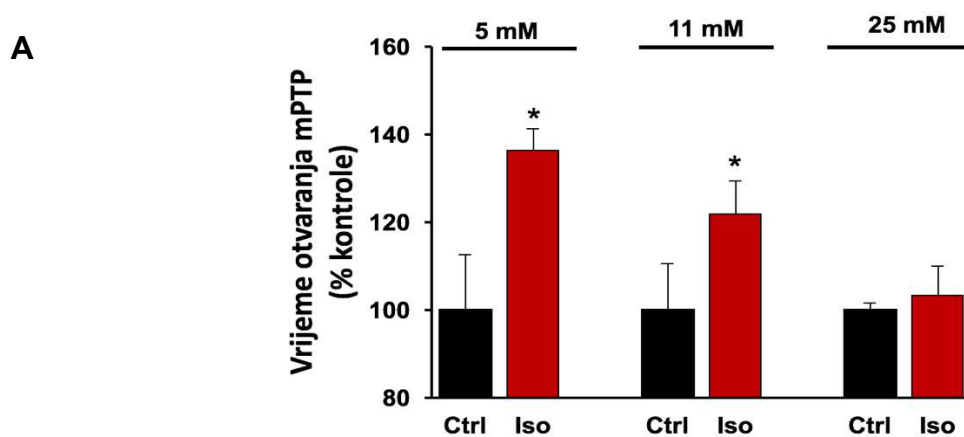


Slika 3.2. *Imunohistokemija i označavanje živih kardiomiocita diferenciranih iz pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM).* Fazno kontrastna mikroskopija iPSC (A). Konfokalna mikroskopija disociranih stanica obojenih specifičnim srčanim proteinima: sarkomerni α -actinin i srčani troponin T (B). Većina pozitivno obilježenih stanica sadržavala je slične strijatne obrasce, bez razlike između diferencijacija. Shematski prikaz lentivirusnim vektorom transduciranog natrij-kalcij izmjenjivača 1 sa eGFP (pNCX-1/eGFP) koji se koristi za označavanje kardiomiocita (C). Za određivanje ukupnog broja stanica, stanice su obojene mitohondrijskim markerom tetrametilrodaminetilester (crveno); eGFP-pozitivne stanice su izbrojene otkrivanjem zelene fluorescencije, što označava broj kardiomiocita deriviranih iz iPSC. Sažeti podaci iz 6 zasebnih diferenciranja pokazuju visok postotak iPSC-CM u kulturi. Oko 80% do 90% iPSC nakon diferencijacije izražava eGFP. Mjerilo=20 μ m. LTR=long terminal repeat; RRE=rev response element; WPRE=woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element.

3.3.2. Izofluran odgađa otvaranje mPTP-a i štiti iPSC-CM od oksidativnog stresa u 5 mM i 11 mM, ali ne u 25 mM glukozi

Izofluranom odgođeno otvaranje mPTP-a izravno korelira sa smanjenjem stanične smrti nakon I/R oštećenja kardiomiocita. Izofluran značajno odgađa otvaranje mPTP-a u iPSC-CM u 5 mM ($P<0,001$) i 11 mM ($P<0,001$) glukozi u odnosu na kontrolnu skupinu bez izoflurana. Međutim, izofluranom odgođeno otvaranje mPTP-a nije primjećeno kod iPSC-CM ako su bili izloženi 25 mM glukozi ($P> 0.99$).

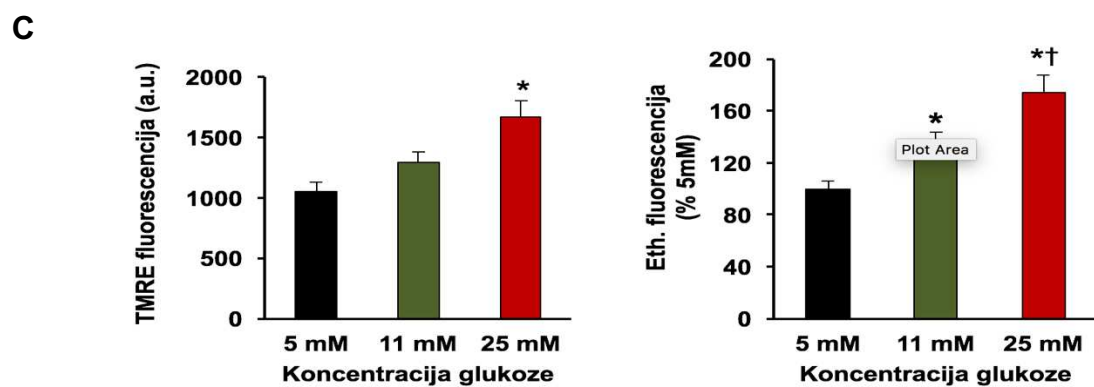
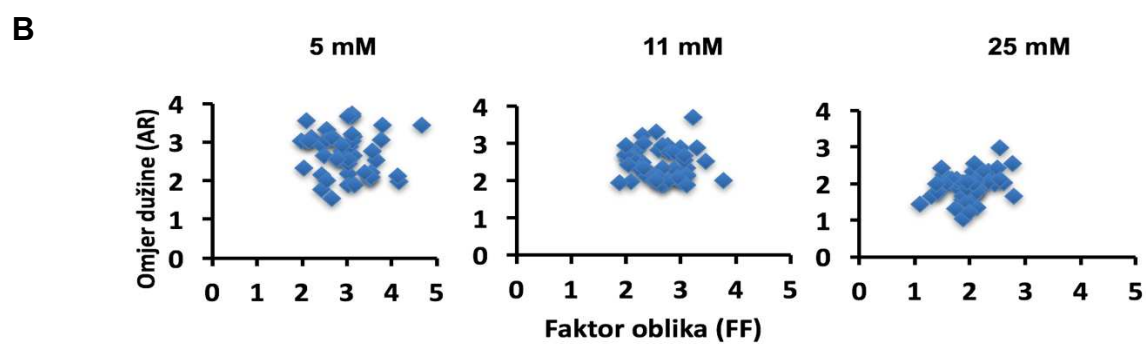
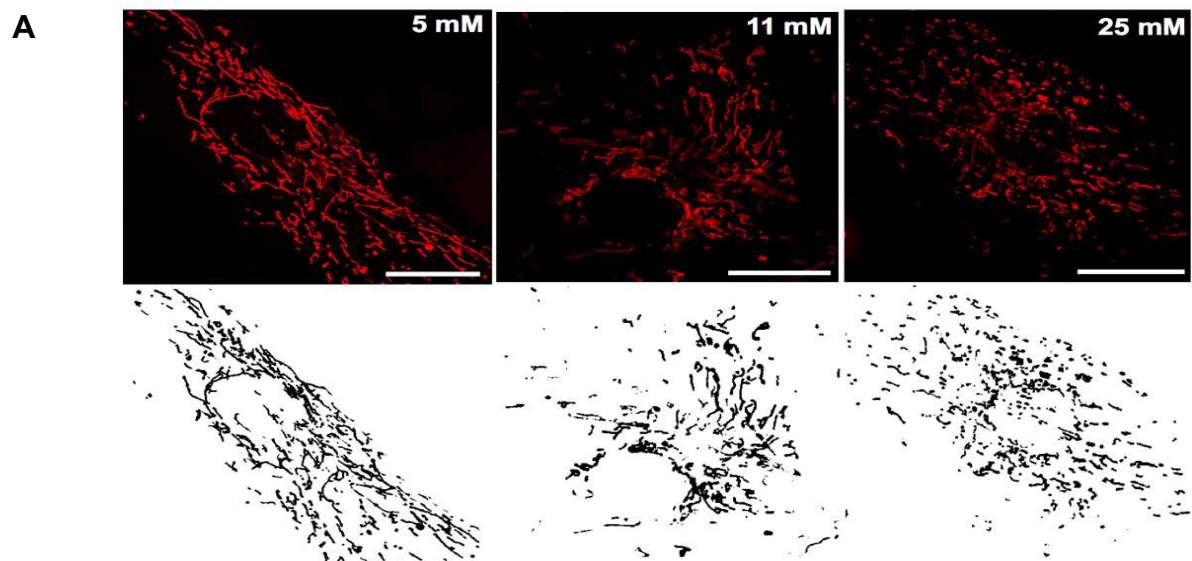
Oksidativni stres induciran je sa 100 μM H_2O_2 uz dodatak 10 mM 2-deoksi-D-glukoze tijekom 2 sata. iPSC-CM koji su tretirani izofluranom prije oksidativnog stresa imali su značajno manje otpuštanje LDH u 5 mM ($P=0.0047$) i 11 mM ($P=0.0189$) skupini u usporedbi s kontrolnim stresnim skupinama. Izofluran nije smanjio otpuštanje LDH u iPSC-CM u 25 mM grupi glukoze u odnosu na kontrolnu stres skupinu ($P=0.8924$).



Slika 3.3. *Izofluranom odgođeno otvaranje mPTP štiti kardiomiocite diferencirane iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM) od oksidativnog stresa u 5 i 11 mM glukozi.* mPTP otvaranje izazvano je fotoekscitacijom generiranim oksidativnim stresom. Izofluran odgađa otvaranje mPTP-a u prisutnosti 5 i 11 mM glukoze (A). Izofluran ne odgađa otvaranje mPTP-a u prisutnosti 25 mM glukoze (A). * $P < 0,001$ u odnosu na kontrolu, $n = 18$ stanica po skupini. H_2O_2 -inducirani oksidativni stres povećava otpuštanje laktat dehidrogenaze (LDH) iz iPSC CM u 5-, 11- i 25 mM glukozi (B). Izofluran smanjuje stresom inducirano smanjenje otpuštanja LDH u 5- i 11-mM skupini glukoze, ali ne i u 25 mM skupini glukoze (B). * $P < 0,05$ u odnosu na stres, $n = 3$ eksperimenata po skupini. Ctrl = kontrola; Iso=izofluran; Stres= H_2O_2 + 2-deoksiglukoza.

3.3.3. Hiperglikemija uzrokuje mitohondrijsku fisiju, hiperpolarizaciju mitohondrijskog membranskog potencijala i pojačano stvaranje ROS-a

Mitohondrijska morfologija vizualizirana je s tetrametilrodaminetilesterom (TMRE). Povećanje mitohondrijske fragmentacije zabilježeno je kada su iPSC-CM bili izloženi 25 mM glukozi što upućuje na mitohondrijsku fisiju. Mitohondrijska fragmentacija uočena je smanjenjem vrijednosti AR i FF, što ukazuje na smanjeno mitohondrijsko grananje i dužinu. Također, primijetili smo da 24 satno izlaganje 25 mM glukozi, ovisno o dozi, dovodi do hiperpolarizacije mitohondrijskog membranskog potencijala. Nadalje, izloženost 25 mM glukozi dovela je do hiperpolarizacije mitohondrijskog membranskog potencijala u usporedbi s 5 mM glukozom ($P < 0,001$). Naši rezultati također su pokazali da 11 mM i 25 mM glukoza povećavaju razinu superoksida u usporedbi s 5 mM glukozom ($P < 0,001$, $P < 0,001$) u iPSC-CM, što je utvrđeno dihidroetidij (DHE) fluorescencijom. Nadalje, izlaganje 25 mM glukozi povećava razinu superoksida u odnosu na 11 mM koncentraciju glukoze ($P < 0,001$).

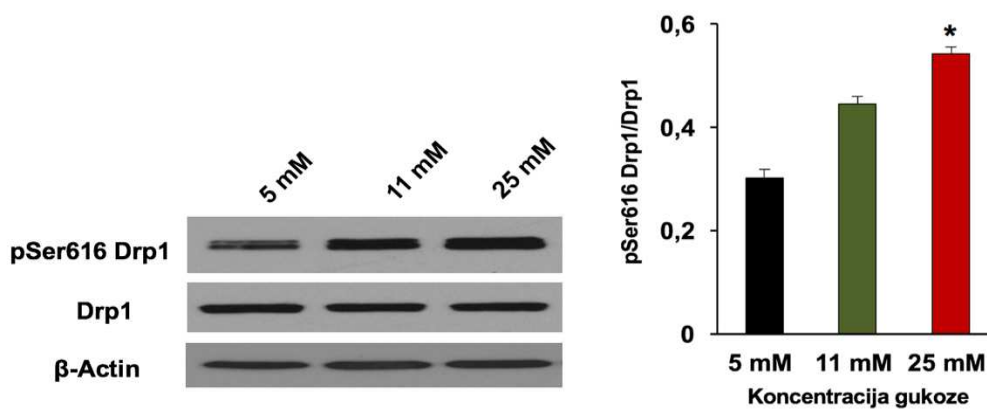


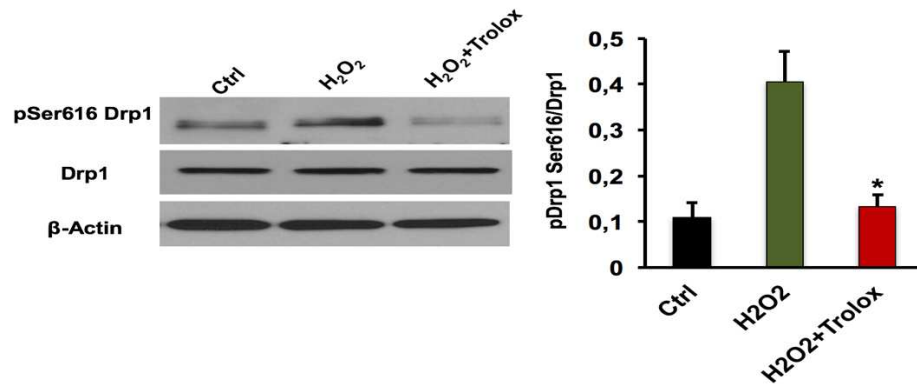
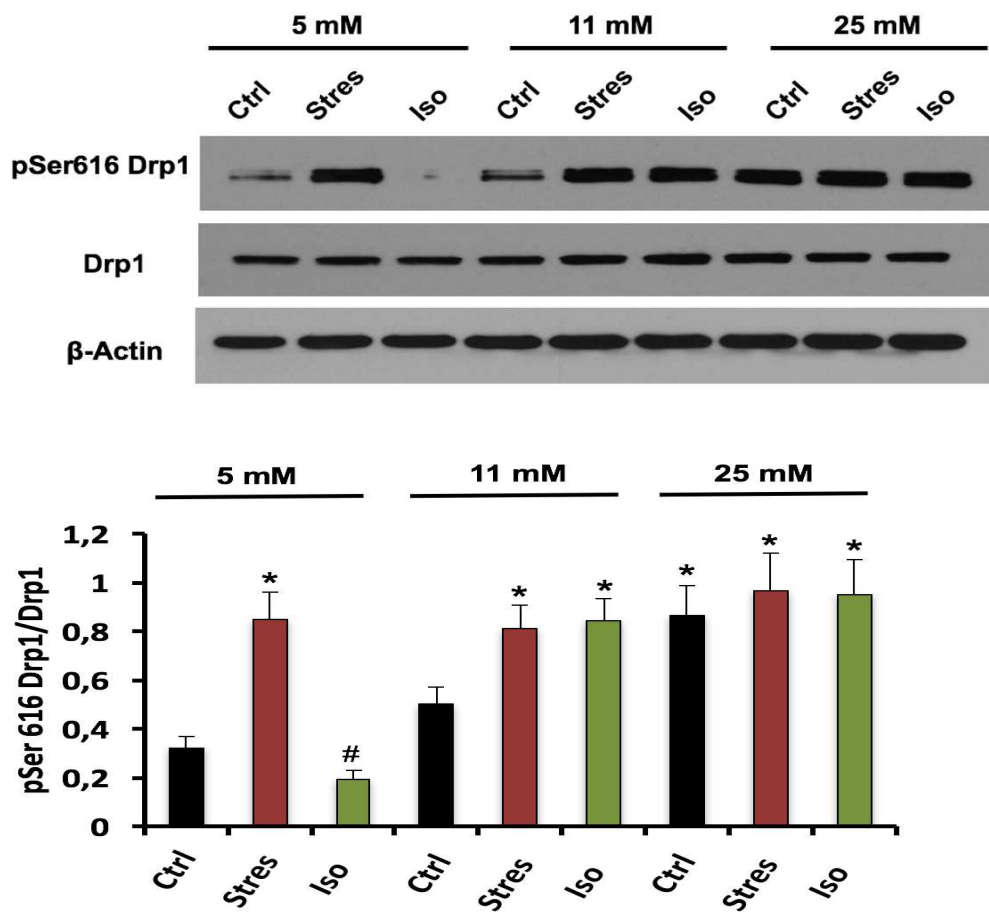
Slika 3.4. Hiperglikemija uzrokuje mitohondrijsku fisiju, hiperpolarizaciju mitohondrijsog membranskog potencijala i povećava stvaranje ROS-a. Slike konfokalne mikroskopije kardiomiocita diferenciranih iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica izložene djelovanju 5, 11 i 25 mM glukoze. Odgovarajuće obrađene slike nalaze se ispod (A); 25 mM glukoza uzrokuje mitohondrijsku fisiju; n=50 stanica po skupini (B). Hiperglikemija, ovisno o koncentraciji, inducira membransku hiperpolarizaciju što je vidljivo povećanjem fluorescencije TMRE. Hiperglikemija uzrokuje povećano stvaranje superoksida što je vidljivo povećanjem fluorescencije DHE (C).

3.3.4. Hiperglikemija uzrokuje pojačanu ekspresiju aktiviranog Drp1

Mitohondrijska fisija primarno je regulirana Drp1 fosforilacijom. Uočili smo da je hiperglikemija povećala razinu pSer616 Drp1 (5 mM vs. 11 mM $P<0,001$; 5 mM vs 25 mM $P<0,001$). Osim toga, u usporedbi s kontrolom, H_2O_2 stres je povećao pSer616 Drp1 ($P<0,001$), dok dodavanje ROS čistača Troloxa dovodi do smanjenja pSer616 Drp1 ($P<0,001$), dodatno potvrđujući povezanost povećane proizvodnje ROS-a i mitohondrijske fisije. Izofluranom inducirano prekondicioniranje smanjilo je H_2O_2 -induciran porast pSer616 Drp1 samo u 5 mM glukozi (5 mM: $P=0,0009$; 11 mM: $P=3,9685$; 25 mM $P=2,6886$).

A

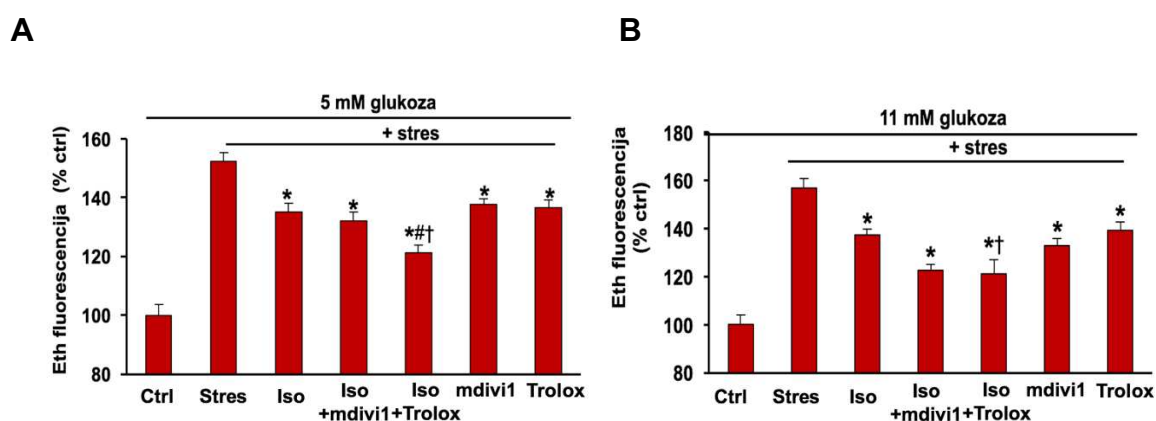


B**C**

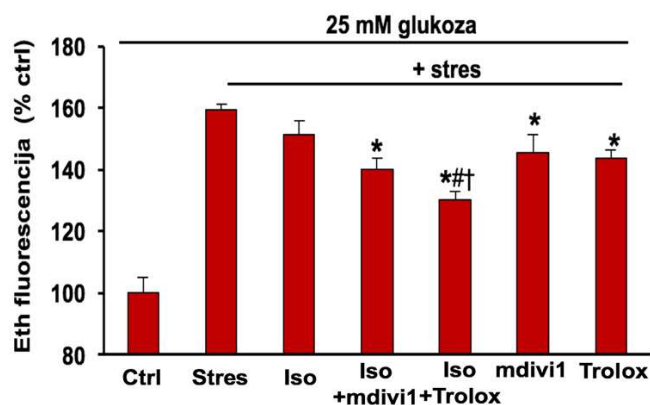
Slika 3.5. *Hiperglikemijom inducirani oksidativni stres povećava ekspresiju pSer616 Drp1 i inhibira kardioprotektivne učinke izoflurana.* Reprezentativne Western blot slike pokazuju da sama hiperglikemija povećava Drp1 fosforilaciju na Ser616 ostatku. Zbirni podaci pokazuju značajno povećanje pSer616 Drp1 ekspresije kada su kardiomiociti bili izloženi 25 mM glukozi u odnosu na 5 mM glukozi (A). Trolox značajno smanjuje oksidativnim stresom inducirano povećanje ekspresije pSer616 Drp (B). Izofluran smanjuje stresom inducirano povećanje pSer616 Drp1 samo u 5 mM glukozi (C). * $P < 0,001$ vs 5 mM/kontrola (Ctrl); # $P < 0,05$ vs 5 mM/H₂O₂. n = 9 diferencijacije po skupini. Iso=izofluran.

3.3.5. Anestetičko prekondicioniranje putem smanjena stvaranja ROS-a je odsutno u uvjetima hiperglikemije

Oksidativni stres mjeren DHE fluorescencijom inducirao je sličnu razinu stvaranja superoksida u 5 mM, 11 mM i 25 mM glukozi u odnosu na kontrolne skupine. Izofluran je uzrokovao smanjenje razine ROS-a u 5 mM i 11 mM glukozi ($P < 0,001$, $P < 0,001$), ali ne i u 25 mM glukozi ($P = 0,1426$). Mdivi1 i Trolox smanjili su proizvodnju ROS-a u svakoj od navedenih skupina. Uočili smo najveće smanjenje proizvodnje ROS-a kada su iPSC-CM izloženi izofluranu i Troloxu u svim eksperimentalnim skupinama.



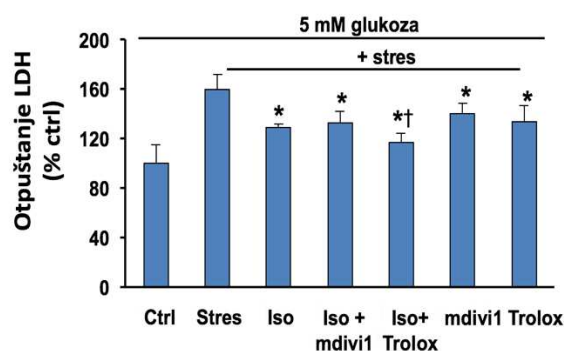
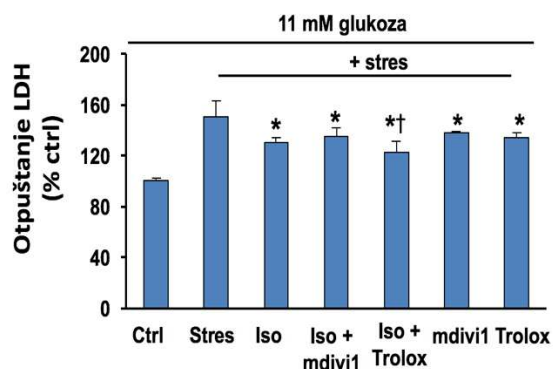
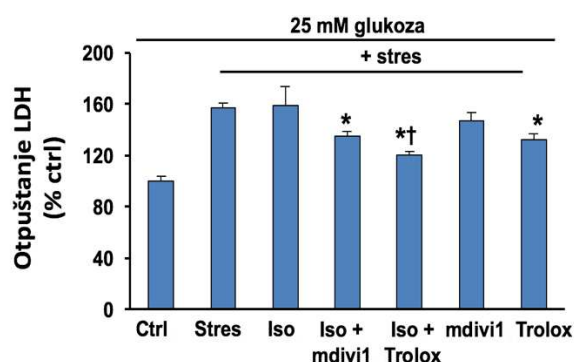
C



Slika 3.6. Izofluran smanjuje stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nakon H_2O_2 u 5 i 11 mM glukozi. H_2O_2 oksidativni stres povećava stvaranje ROS-a u 5-, 11 i 25 mM glukozi u odnosu na svaku od njihovih kontrola. Izofluran smanjuje stresom inducirano stvaranje ROS-a u 5 i 11 mM glukozi, ali ne i u 25 mM glukozi. Mdivi-1 i Trolox smanjuju razinu ROS-a u svakoj eksperimentalnoj grupi. * $P < 0,05$ vs. stres/ † $P < 0,001$ vs Trolox, $n=6$ pokrovnih stakalaca.

3.3.6. Blokiranje mitohondrijske fisije i uklanjanje ROS-a dovodi do uspostave anestetičkog prekondicioniranja

iPSC-CM koji su tretirani s izofluranom prije oksidativnog stresa manje otpuštaju LDH u 5 mM i 11 mM glukozi ($P=0.00014$, $P=0,0001$), ali ne i u 25 mM glukozi ($P=0,6167$). U 5 mM i 11 mM glukozi primijetili smo da su mdivi-1 i Trolox pojedinačno kardioprotektivni, međutim, istovremeno tretiranje iPSC-CM sa Troloxom i izofluranom pruža najveću razinu zaštite. Izlaganje izofluranu nije dovelo do smanjenog oslobađanja LDH nakon oksidativnog stresa u 25 mM skupini. Međutim, LDH oslobađanje je bilo slično kontroli kada se koristio izofluran zajedno s mdivi1 ili Troloxom u skupini 25 mM glukoze ($P < 0,001$, $P < 0,001$). Trolox pruža značajnu zaštitu od oksidativnog stresa. Međutim, zaštita je bila znatno veća kada se Trolox koristio u kombinaciji s izofluranom, dok mdivi1 samostalno ne pruža kardioprotekciju.

A**B****C**

Slika 3.7. *Uklanjanje reaktivnih vrsta kisika ili inhibicija mitohondrijske fisije vraća mogućnost anestetičkog prekondicioniranja u 25 mM glukozi.* H₂O₂ inducirani oksidativni stres smanjuje stanično preživljenje u 5, 11, i 25 mM glukozi u usporedbi sa svakom pojedinačnom kontrolom. Izofluran (iso) smanjuje stresom inducirano otpuštanje LDH u 5 i 11 mM glukozi, ali ne i u 25 mM glukozi. Zanimljivo, Trolox i mdivi1 samostalno smanjuju LDH otpuštanje u 5 i 11 mM glukozi. Najveći opseg kardioprotektivnosti zabilježen je kada su iPSC-CM tretirani s izofluranom i Troloxom u svim skupinama glukoze. Kada je korišten mdivi-1 u kombinaciji s izofluranom, došlo je do značajnog smanjenja oslobađanja LDH u usporedbi sa samostalnim izofluranom i mdivi1 u 25 mM glukozi. **P* <0,05 vs. stres/† *P* <0,05 vs. Trolox. n=6 eksperimenata/skupini. Ctrl = kontrola; Stres = H₂O₂; Iso=izofluran.

3.4. Rasprava

Glavni rezultati ovog istraživanja su da hiperglikemija dovodi do slabljenja izofluranom izazvanog prekondicioniranja putem povećanog stvaranja ROS-a i mitohondrijske fisije u ljudskim iPSC-CM. Pokazali smo da hiperglikemija izaziva mitohondrijsku fisiju, mitohondrijsku membransku hiperpolarizaciju i povećano stvaranje ROS-a. Konačno, uklanjanje ROS-a ili blokiranje mitohondrijske fisije vraća mogućnost izoflurana da prekondicionira srčane mišićne stanice u uvjetima hiperglikemije.

Prethodne studije pokazale su da su iPSC-CM održivi model istraživanja temeljnih mehanizma anestheticima inducirane kardioprotektivnosti budući da na podražaj anestheticima reagiraju slično kao i stanice pretklijetke štakora i srčane mišićne stanice diferencirane iz ljudskih embrionalnih matičnih stanica. Potencijal ovog modela matičnih stanica uključuje njihovu dostupnost kao i činjenicu da ove stanice nose genetsku strukturu donora⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾. Osim toga, kultura ljudskih iPSC-CM može biti izložena brojnim uvjetima koji oponašaju razne bolesti. Iako su iPSC-CM generirani kratkom diferencijacijom nezreli, ipak su se pokazali korisnim kao model za proučavanje anestheticima posredovane zaštite srca.

Mitohondriji su dinamične organele koje stalno prolaze fuziju i fisiju u cilju održavanja stanične homeostaze. Fosforilacija Drp1 na Ser616 izaziva mitohondrijsku fisiju putem translokacije Drp1 iz citoplazme na mitohondrijske membrane. Dodatno, povećanje proizvodnje ROS-a u stanjima oksidativnog stresa aktivira Drp1 na Ser616 u ljudskim endotelnim stanicama umbilikalne vene, neurona i kardiomiocita. Otkrili smo da sama hiperglikemija uzrokuje mitohondrijsku fisiju i povećava aktivaciju Drp1 u iPSC-CM. Proizvodnja ROS-a značajan je faktor patogeneze dijabetesa⁽¹⁴³⁾. Osim toga, prekomjerna ROS proizvodnja jedan je od glavnih uzroka stresa u kardiomiocitima nakon I/R oštećenja i igra važnu ulogu u otvaranju mPTP. Mitohondrijski respiratorni lanac najveće je mjesto proizvodnje ROS-a u stanici. Superoksid je nusprodukt normalne mitohondrijske respiracije

putem redukcije molekule kisika. Nekoliko studija, *in vivo* i *in vitro*, pokazalo je povećanje proizvodnje superoksida tijekom hiperglikemije. Mitohondrijski enzim mangan superoksid dismutaza pretvara superoksid u vodikov peroksid koji u prisutnosti željeza ili bakra stvara visoko reaktivni hidroksilni radikal. Vodikov peroksid, s druge strane, može stvoriti hidroksilni radikal (jedan od najjačih prooksidansa) interakcijom s ionima željeza u katalitičkim Fenton reakcijama. Postoji značajna sumnja da se slična reakcija može inducirati u stanicama sisavaca, ali različita istraživanja koja su uključivala H9C2 stanice, endotelne stanice i neurone bez imalo sumnje potvrđuju kako se H₂O₂ može koristiti za indukciju oksidativnog stresa i stanične smrti⁽¹⁴⁴⁾. Kao što je prethodno prikazano, ekscitacija fluorescencije molekula pomoću laserske zrake visoke energije stvara ROS uslijed interakcije pobuđene boje s molekularnim kisikom, što dovodi do otvaranja mPTP-a, depolarizacije mitohondrijske membrane, oslobađanja citokroma c i stanične smrti. Otkrili smo da visoke koncentracije glukoze povećavaju stvaranje ROS-a, a antioksidans Trolox zajedno s izofluranom smanjuje oksidativnim stresom inducirano stvaranje ROS-a u svim skupinama. Ovi rezultati potvrđuju da je stvaranje ROS-a ključni medijator u nemogućnosti prekondicioniranja anestheticima u prisutnosti visokih koncentracija glukoze. Također smo primijetili da je izofluran uspješan u smanjenju oksidativnim stresom izazvanog povećanja ekspresije aktiviranog pSer616 Drp1, ali samo u 5 i 11 mM glukozi. Ovi rezultati, uzeti zajedno, pokazuju snažnu povezanost između ROS generacije i mitohondrijske fisije u iPSC-CM.

Naši rezultati prvi put pokazuju kako uklanjanje ROS-a ili blokiranje mitohondrijske fisije vraća mogućnost prekondicioniranja iPSC-CM nakon oksidativnog stresa. I povećano stvaranje ROS-a i mitohondrijska fisija utječu jedni na druge, a oboje doprinose slabljenju kardioprotektivnosti anestetika u uvjetima hiperglikemije.

Ograničenje ovog istraživanja bilo je način na koji smo inducirali staničnu ozljedu. Generirali smo oksidativni stres visokom koncentracijom H_2O_2 i 2-deoksi-glukozom. Ovi uvjeti stresa izabrani su zbog nemogućnosti izazivanja stresa u uvjetima koji su slični fiziološkim uvjetima hipoksije/reoksigenacije (podaci nisu prikazani). Nadalje, ispitivali smo ulogu 24-satnog izlaganja visokim koncentracijama glukoze u atenuaciji anestetičke kardioprotektivnosti u iPSC-CM. iPSC-CM prilagođavaju se visokim koncentracijama glukoze nakon 48 sati, a poslije toga odgovora u smislu povećanog stvaranja ROS-a i/ili povećanja mitohondrijske fisije nije ni bilo (podaci nisu prikazani). Raspon koncentracija glukoze koje su se koristile u ovom istraživanju izabrane su na temelju prethodnih istraživanja u animalnim modelima. Dodatno, tipični uvjet kultivacije kardiomiocita je 11 mM glukoza, što se smatra iznad fizioloških razina. Dodatne studije su potrebne kako bi se ispitalo učinke hiperglikemije na različite vrste iPSC-kardiomiocita kako bi u potpunosti razumjeli mehanizme prekondicioniranja u humanom modelu. Konačno, u ovom istraživanju fokusirali smo se na učinke visokih koncentracija glukoze na atenuaciju kardioprotektivnosti izoflurana. Bilo bi vrijedno pogledati ostale manifestacije dijabetesa, na primjer, utjecaj masnih kiselina i njihovu ulogu u slabljenju kardioprotektivnih učinaka anestetika.

U zaključku, naše istraživanje pokazuje da 1) se iPSC-CM se mogu koristiti za istraživanje temeljnih mehanizama kojim hiperglikemija slabi zaštitne učinke anestetika; i 2) inhibicija mitohondrijske fisije ili uklanjanje ROS-a obnavlja kardioprotektivna svojstva anestetika u iPSC-CM.

Poglavlje 4

Rasprava

Cilj prvog dijela ove disertacije bio je istražiti molekularne mehanizme uključene u mitohondrijsku fisiju tijekom I/R oštećenja kardiomiocita. Prvi put smo pokazali da I/R oštećenje uzrokuje mitohondrijsku fisiju putem PKC δ , CDK1 i kalcineurina uzrokujući aktivaciju Drp1. Ovi rezultati objašnjavaju molekularnu vezu između povećane proizvodnje ROS-a i strukturnog integriteta mitohondrija.

U drugom dijelu disertacije istraživali smo učinke hiperglikemije na slabljenje APC-a u relevantnom modelu ljudskih kardiomiocita. Naime, istražili smo ulogu hiperglikemijom inducirane povećane proizvodnje ROS-a i mitohondrijske fisije te njenu ulogu u slabljenju kardioprotektivnih učinaka APC-a. Najvažniji rezultat ove disertacije jest da i ROS i mitohondrijska fisija igraju izravnu ulogu u nemogućnosti kardiomiocita da budu prekondicionirani tijekom hiperglikemije. Za proučavanje utjecaja hiperglikemije na APC prvo je bilo potrebno uspostaviti odgovarajući ljudski model. U početku smo istraživali sposobnost diferencijacije kardiomiocita iz iPSC i njihovu sposobnost da budu prekondicionirani u različitim uvjetima glukoze. Nakon toga, istraživali smo mehanizame kojima visoka glukoza smanjuje kardioprotektivne učinke izoflurana. Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje da hiperglikemijom inducirano stvaranje ROS-a i posljedična mitohondrijska fisija uzrokuje nemogućnost kardiomiocita da budu prekondicionirani anestheticima. Osim toga, opazili smo da uklanjanje ROS-a ili inhibicija mitohondrijske fisije vraćaju sposobnost iPSC-CM da budu prekondicionirane u uvjetima hiperglikemije. Ovi rezultati imaju važno kliničko značenje budući da se sposobnost prekondicioniranja kod bolesnika sa šećernom bolešću može uspostaviti bilo blokiranjem mitohondrijske fisije bilo uklanjanjem ROS-a. Naši rezultati također pokazuju da su iPSC-CM pogodan ljudski model za proučavanje APC-a.

4.1. Povezanost između povećanog stvaranja ROS-a i mitohondrijske fisije tijekom I/R oštećenja kardiomiocita

Već je neko vrijeme poznato da povećana mitohondrijska fisija izaziva stvaranje ROS-a i obrnuto da povećana ROS proizvodnja može povećati mitohondrijsku fisiju. Nekoliko različitih studija pokazalo je brzu fragmentaciju mitohondrija kada su stanice izložene uvjetima povećanog stvaranja ROS-a. Malo je poznato kako ROS zapravo izazivaju fragmentaciju mitohondrija. Moguće je da zbog svoje visoke reaktivnosti i interakcije s lipidnim membranama, kao što su one koje nalazimo u mitohondrijima, dolazi do njihove fragmentacije u trenutku kada povećana proizvodnja ROS-a prevlada fiziološku sposobnost stanica za njihovom neutralizacijom. U ovoj disertaciji prvi put smo pokazali da je povećana proizvodnja ROS-a tijekom reperfuzijske ozljede glavni inicijator Drp1 aktivacije putem CDK1, PKC δ i kalcineurina. Slični signalni putevi također su otkriveni u endotelnim stanicama i tubularnim stanicama bubrega štakora gdje ROS čistači ili blokatori kalcineurina smanjuju Drp1 ovisnu mitohondrijsku fisiju i pružaju zaštitu nakon I/R oštećenja.

Prethodna istraživanja također sugeriraju kako se δ izoforma PKC, kalcij-neosjetljiv PKC izoenzim, aktivira pri reperfuziji i da ROS prethode PKC δ aktivaciji. CDK, ključna protein kinaza regulacije staničnog ciklusa i apoptoze pod utjecajem ROS-a aktivira se tijekom ishemije. Aktivacija PKC δ i CDK rezultira fosforilacijom silaznih efektoru kao što je Drp1. U ovom istraživanju pronašli smo izravnu interakciju između PKC δ i Drp1, kao i CDK1 i Drp1 u HL1 kardiomiocitima.

Poznato je da mutacije Drp1 tijekom embrionalnog razvoja rezultiraju ranom embrionalnom smrću i da je Drp1 ovisna mitohondrijska fisija nužan korak mitoze, ali malo se znalo o važnosti mitohondrijske fisije u terminalno diferenciranim stanicama poput kardiomiocita⁽⁵⁶⁾.

Svi navedeni rezultati doprinose boljem razumijevanju temeljnih molekularnih mehanizama mitohondrijskom fisijom posredovane smrti kardiomiocita, što može pružiti korisnu strategiju zaštite miokarda nakon I/R ozljede blokadom Drp1 aktivacije.

4.2. iPSC-CM kao model proučavanja APC-a

Postoji samo nekolicina istraživanja koja pokazuju važnost APC-a u ljudskim kardiomiocitima budući da etički problemi korištenja ljudskog tkiva u istraživanjima ograničavaju njihovu upotrebu. Dostupnost ljudskih kardiomiocita na kojima se mogu provesti istraživanja koja su potrebna da bi se u potpunosti razumjelo mehanizme i signalne puteve koji su uključeni u APC, vrlo je ograničena. Prethodna istraživanja pokazala su kako dob, lijekovi i razne bolesti poput dijabetesa utječu na sposobnost srca da bude farmakološki prekondicionirano^(81, 86). Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi korisnost iPSC-CM kao modela za proučavanje nesposobnosti kardiomiocitima da budu farmakološki prekondicionirani. iPSC-CM su karakterizirani kontrakcijom, specifičnim imunološkim bojenjem i označavanjem živućih kardiomiocita sa eGFP pod kontrolom srčano specifičnog promotora, MLC-2v ili NCX-1.

Diferencijacija kardiomiocita iz iPSC trenutno je vrlo dobro poznata. Međutim, tijekom vremena postojala je značajna varijabilnost u učinkovitosti diferencijacije između staničnih linija (30-85%). Mi smo koristili protokol s aktivinom i koštanim morfogenetskim proteinom, ali uključujući i Matrigel koji je uvelike poboljšao učinkovitost diferencijacije (>90%) (“Matrigel sandwich method”)⁽¹²⁸⁾.

iPSC-CM imaju izvorni genotip stanice domaćina. To dokazuje da ove stanice mogu biti vrlo korisne u razvoju modela ljudskih bolesti. Kako se polje istraživanja matičnih stanica širi, ove stanice uskoro će biti zlatni standard istraživanja lijekova. Biti u mogućnosti koristiti ljudske stanice koje se neograničeno dijele definitivno je značajna prednost nad bilo kojim životinjskim modelom.

4.3. Mitohondrijska fisija uzrokuje nemogućnost kardiomiocita da budu prekondicionirani anestheticima

Prethodna istraživanja pokazala su kako sama hiperglikemija uzrokuje pretjeranu proizvodnju ROS i kako može potaknuti mitohondrijsku fisiju. Naši rezultati pokazuju da produženo izlaganje hiperglikemiji uzrokuje fragmentaciju mitohondrija u iPSC-CM. Također, istraživali smo i fosforilaciju Drp1, ključnog regulatora mitohondrijske fisije. Fosforilacija na Ser616 Drp1 inducira Drp1 posredovanu mitohondrijsku fisiju. Kao i kod prethodnih istraživanja, i naši rezultati upućuju da sama hiperglikemija povećava ekspresiju aktiviranog Drp1, i to ovisno o koncentraciji glukoze, a APC smanjuje fosforilaciju proteina što posljedično uzrokuje smanjenje mitohondrijske fragmentacije i poboljšava preživljavanje kardiomiocita. Nadalje, H₂O₂ inducirani oksidativni stres povećava razinu pSer616 Drp1, a mdivi1 i Trolox smanjuju Drp1 fosforilaciju i mitohondrijsku fisiju. Prethodne studije pokazale su da inhibicija Drp1 odgađa otvaranje mPTP što rezultira povećanjem staničnog preživljenja. Istraživanja su pokazala da mitohondrijska fisija može uzrokovati prekomjernu proizvodnju ROS-a, a da prekomjerna proizvodnja ROS-a može uzrokovati mitohondrijsku fisiju. Naša istraživanja pokazuju da ROS i mitohondrijska fisija reguliraju jedni druge i da su dio mehanizma pozitivne povratne sprege pod kroničnim uvjetima hiperglikemije. Ono što je zanimljivo jest da nismo uspjeli izazvati mitohondrijsku fisiju nakon akutne izloženosti hiperglikemiji. Umjesto toga, dulje razdoblje (24 sata) hiperglikemije bilo je potrebno da se izazove mitohondrijska fisija. Drugi su pokazali da akutna izloženost hiperglikemiji stvara prekomjernu proizvodnju ROS-a i izaziva mitohondrijsku fisiju. Pretjerana ROS proizvodnja potiče otvaranje mPTP-a i staničnu apoptozu. Da bismo utvrdili ulogu akutne hiperglikemijom inducirane ROS proizvodnje, potrebna su dodatna istraživanja. Da bi istražili ulogu mitohondrijske fisije u smanjivanju APC-a, morali smo produžiti trajanje hiperglikemije tijekom 24 sata. Ovi rezultati upućuju na to da mitohondrijska fisija ne mora

imati glavni doprinos u smanjivanju APC-a u uvjetima hiperglikemije, posebno u akutnoj hiperglikemiji. Umjesto toga, mitohondrijska fisija može djelomično doprinijeti smanjenju učinaka APC-a. Blokiranje mitohondrijske fisije i uklanjanje ROS-a u kombinaciji s APC-om vraća mogućnost prekondicioniranja u uvjetima kronične hiperglikemije. Trolox u kombinaciji s APC-om pruža najveću razinu kardioprotekcije, a kronično izlaganje hiperglikemiji i povećana proizvodnja ROS-a je primarni čimbenik atenuiranja kardioprotektivnih učinaka APC-a.

4.4. Ograničenja istraživanja

Ova disertacija ima nekoliko ograničenja.

U prvoj studiji koristili smo HL-1 kardiomiocite koji su zapravo stanična linija kardiomiocita izvedena iz AT-1 mišjeg atrijskog tumora. Iako su ove srčane mišićne stanice prihvaćen model u istraživačkoj zajednici, proučavanje mitohondrijske dinamike u stanicama u kojima je mitozna izrazito brza ima svoja ograničenja.

Kao marker mitohondrijske morfologije koristili smo TMRE koji se akumulira u mitohondrijima ovisno o mitohondrijskom membranskom potencijalu. Tijekom ishemije i reperfuzije mitohondriji se depolariziraju što uzrokuje djelomičan gubitak TMRE iz unutrašnjosti mitohondrija. Korištenje markera koji je neosjetljiv na membranski potencijal bilo bi bolje tijekom I/R oštećenja.

Iako je fosforilacija Drp1 jedan od glavnih puteva aktivacije Drp1, postoje brojni drugi načini aktivacije Drp1 aktivacije poput sumolacije, ubikvitinacije i nitrozilacije koji nisu bili predmet ovog istraživanja⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾.

Svi eksperimenti u drugom istraživanju provedeni su na ljudskim kardiomiocitima diferenciranim iz iPSC. iPSC-CM često su opisivani kao nezrele stanice, ali u našim eksperimentalnim procedurama iPSC CMS odgovarali su na APC slično kao i izolirani odrasli kardiomiociti.

Nadalje, oksidativni stres je induciran s H₂O₂ ili fotoekscitacijom što nije isto kao i stres tijekom I/R ozljede in vivo. Jedini način na koji smo mogli uzrokovati stres stanica je izlaganjem stanica u 100 μM H₂O₂. To potvrđuje kako su ove stanice zapravo nezrele i kao takve su i mnogo otpornije na stres u usporedbi s odraslim kardiomiocitima. Bilo bi važno istražiti mehanizme ove povećane otpornosti na stres. Iako su ove koncentracije H₂O₂ izrazito visoke, H₂O₂ inducirani oksidativni stres je široko prihvaćena metoda oponašanja oksidativnog stresa koji nastaje tijekom I/R.

Koristili smo lasersko skeniranje putem konfokalne mikroskopije za određivanje otvaranja mPTP. Iako je to prihvaćena metoda za određivanje prosječnog vremena otvaranja mPTP, detaljni strukturni identitet mPTP i dalje je nepoznat. Moguće je da se dogodi i izbjeljivanje TMRE tijekom serijskog laserskog snimanja malog područja unutar stanice.

Dalje, sve naše studije su provedena samo na kardiomiocitima. Pokazano je da je interakcija kardiomiocita i endotelne stanice važna u APC. Dodavanje endotelne stanice u kulturu kardiomiocita bi značajno poboljšalo ovo istraživanje⁽¹⁴⁸⁾.

Na kraju, istraživali smo samo utjecaj hiperglikemije na iPSC-CM. Dodatne studije su potrebne kako bi vidjeli utjecaj masnih kiselina budući da hiperglikemija nije jedino obilježje šećerne bolesti.

4.5. Zaključci

Na temelju rezultata ovih istraživanja možemo donijeti sljedeće zaključke:

1. Ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje (I/R) s posljedičnim porastom proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (ROS) uzrokuje mitohondrijsku fisiju u srčanim mišićnim stanicama fosforilacijom/defosforilacijom proteina Drp1 djelovanjem ciklin ovisne kinaze-1 (CDK1), protein kinaze C δ (PKC δ) i kalcineurina.
2. Blokada CDK1, PKC δ i kalcineurina pojedinačno ili zajedno dovodi do očuvanja strukture mitohondrija i smanjenja stanične smrti u istoj mjeri kao i blokada proteina Drp1 ili blokada stvaranja ROS.
3. iPSC se mogu uspješno diferencirati u kardiomiocite s visokom učinkovitošću. Ovi kardiomiociti se kontrahiraju, izražavaju specifične proteine srčanih mišićnih stanica i odgovaraju na adrenergičke podražaje. iPSC-CM se mogu prekondicionirati anestheticima slično kao i drugi stanični i animalni modeli.
4. Hiperglikemijom inducirani porast u proizvodnji ROS uzrokuje pomak ravnoteže fuzija-fisija prema fisiji što uzrokuje nemogućnost iPSC-CM da budu prekondicionirani anestheticima.
5. Blokada Drp1 ili uklanjanje ROS vraćaju mogućnost prekondicioniranja iPSC-CM.

5. Sažetak

Istraživanje 1: Ishemijsko-reperfuzijsko oštećenje miokarda (I/R) je jedan od vodećih uzroka smrti i invalidnosti diljem svijeta. Prethodna istraživanja sugeriraju ulogu mitohondrijske fisije u oštećenju kardiomiocita. Međutim, molekularni mehanizmi mitohondrijske fisije tijekom I/R ozljede još nisu u potpunosti jasni. Cilj istraživanja jest utvrditi molekularne mehanizme koji kontroliraju aktivaciju dynamin sličnog proteina 1 (Drp1, ključnog proteina mitohondrijske fisije) tijekom I/R oštećenja HL-1 kardiomiocita.

I/R oštećenje uzrokuje smrt kardiomiocita koja je praćena povećanjem mitohondrijske fisije, reaktivnih kisikovih radikala (ROS), ekspresije aktiviranog Drp1 (pSer616 Drp1), te smanjenja ekspresije inaktiviranog Drp1 (pSer637 Drp1), dok se ekspresija mitohondrijskih fuzijskih proteina nije značajno promijenila. Blokiranje Drp1 aktivnosti s mdivi1 značajno smanjuje smrt stanica, mitohondrijsku fisiju i aktivaciju Drp1 nakon I/R. Trolox, čistač ROS, smanjuje ekspresiju pSer616 Drp1 i mitohondrijsku fisiju nakon I/R. Imunoprecipitacija ukazuje na to da ciklin ovisna kinaza 1 (CDK1) i protein kinaza C izoforma delta (PKC δ) vežu Drp1, čime se povećava mitohondrijska fisija. Blokiranje CDK1 i PKC δ smanjuje ekspresiju pSer616 Drp1, mitohondrijsku fisiju i smrt kardiomiocita. FK506, inhibitor kalcineurina, blokira smanjenje ekspresije inaktiviranog pSer637 Drp1 i mitohondrijsku fisiju. Naši rezultati prvi put pokazuju nove molekularne mehanizme koji upravljaju mitohondrijskom fisijom tijekom I/R oštećenja kardiomiocita.

Istraživanje 2: Hiperglikemija može smanjiti kardioprotektivne učinke izoflurana tijekom I/R oštećenja kardiomiocita. Prethodna istraživanja ukazuju na to da ROS i povećana mitohondrijska fisija igraju ulogu u smrti kardiomiocita tijekom I/R. Kako bismo istražili ulogu hiperglikemije u povećanoj proizvodnji ROS i mitohondrijskoj fisiji tijekom I/R

koristili smo novi model kardiomiocita deriviranih iz ljudskih induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC-CM).

Kardiomiociti diferencirani iz iPSC okarakterizirani su putem ekspresije CM specifičnih markera imunohistokemijski i mjerenjem kontraktilnosti. iPSC-CM su izloženi različitim uvjetima glukoze (5, 11, i 25 mM) tijekom 24 sata. Otvaranje mitohondrijske permeabilizacijske pore (mPTP), oštećenje stanica i stvaranje ROS su bile krajnje točke korištene za procjenu učinaka različitih eksperimentalnih uvjeta. Mitohondrijska fisija se analizirala pomoću vizualizacije fragmentiranih mitohondrija na konfokalnoj mikroskopiji. Ekspresija aktiviranog Drp1, ključnog proteina odgovornog za mitohondrijsku fisiju, procijenjena je Western blotom.

Kardiomiociti su uspješno diferencirani od iPSC. U uvjetima povišene glukoze (11 i 25 mM) značajno se povećava stvaranje ROS, ali samo 25 mM glukoza uzrokuje mitohondrijsku fisiju i povećava ekspresiju aktiviranog Drp1. Izofluranom odgođeno otvaranje mPTP prisutno je u 5 i 11 mM glukozi, ali ne i u 25 mM glukozi. Čišćenje ROS s Troloxom ili inhibicija mitohondrijske fisije s mdivi1 dovodi do vraćanja anestetičkog prekondicioniranja uvjetima 25 mM glukoze.

6. Summary

Study 1: Myocardial ischemia–reperfusion (I/R) injury is one of the leading causes of death and disability world- wide. Mitochondrial fission has been shown to be involved in cardiomyocyte death. However, molecular machinery involved in mitochondrial fission during I/R injury has not yet been completely understood. In this study, we aimed to investigate molecular mechanisms of controlling activation of dynamin-related protein 1 (Drp1, a key protein in mitochondrial fission) during ischemia-reperfusion (I/R) injury of HL1 cardiomyocytes.

I/R injury induced cardiomyocyte death accompanied by the increases of mitochondrial fission, reactive oxygen species (ROS) production and activated Drp1 (pSer616 Drp1), and decrease of inactivated Drp1 (pSer637 Drp1) while mitochondrial fusion protein levels were not significantly changed. Blocking Drp1 activity with mitochondrial division inhibitor mdivi1 attenuated cell death, mitochondrial fission, and Drp1 activation after A/R. Trolox, a ROS scavenger, decreased pSer616 Drp1 level and mitochondrial fission after I/R. Immunoprecipitation assay further indicates that cyclin dependent kinase 1 (Cdk1) and protein kinase C isoform delta (PKCd) bind Drp1, thus increasing mitochondrial fission. Inhibiting Cdk1 and PKCd attenuated the increases in pSer616 Drp1, mitochondrial fission, and cardiomyocyte death. FK506, a calcineurin inhibitor, blocked the decrease in expression of inactivated pSer637 Drp1 and mitochondrial fission.

Our findings reveal the following novel molecular mechanisms controlling mitochondrial fission during I/R injury of cardiomyocytes.

Study 2: Hyperglycemia can blunt the cardioprotective effects of isoflurane in the setting of ischemia–reperfusion injury. Previous studies suggest that reactive oxygen species (ROS) and increased mitochondrial fission play a role in cardiomyocyte death during ischemia–

reperfusion injury. To investigate the role of high glucose concentration in ROS production and mitochondrial fission during ischemia–reperfusion (with and without anesthetic protection), we used the novel platform of human-induced pluripotent stem-cell (iPSC)–derived cardiomyocytes (CMs).

Cardiomyocyte differentiation from iPSC was characterized by the expression of CM-specific markers using immunohistochemistry and by measuring contractility. iPSC-CMs were exposed to varying glucose conditions (5, 11, and 25 mM) for 24 hours. Mitochondrial permeability transition pore opening, cell viability, and ROS generation endpoints were used to assess the effects of various treatment conditions. Mitochondrial fission was monitored by the visualization of fragmented mitochondria using confocal microscopy. Expression of activated dynamin-related protein 1, a key protein responsible for mitochondrial fission, was assessed by Western blot. Cardiomyocytes were successfully differentiated from iPSC. Elevated glucose conditions (11 and 25 mM) significantly increased ROS generation, whereas only the 25-mM high glucose condition induced mitochondrial fission and increased the expression of activated dynamin-related protein 1 in iPSC-CMs. Isoflurane delayed mitochondrial permeability transition pore opening and protected iPSC-CMs from oxidative stress in 5- and 11-mM glucose conditions to a similar level as previously observed in various isolated animal cardiomyocytes. Scavenging ROS with Trolox or inhibiting mitochondrial fission with mdivi-1 restored the anesthetic cardioprotective effects in iPSC-CMs in 25-mM glucose conditions.

7. Literatura

1. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-360.
2. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85(3):1093-129.
3. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res*. 1989;65(4):1045-56.
4. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res*. 1999;85(9):777-86.
5. Kaplan P, Hendrikx M, Mattheussen M, Mubagwa K, Flameng W. Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *Circ Res*. 1992;71(5):1123-30.
6. Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1995;270(43):25557-63.
7. du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res*. 1992;70(5):960-7.
8. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 2):232-7.
9. Fieni F, Johnson DE, Hudmon A, Kirichok Y. Mitochondrial Ca²⁺ uniporter and CaMKII in heart. *Nature*. 2014;513(7519):E1-2.
10. Ferrera R, Michel P. Protection of the ischemic heart during reperfusion: role of the low flow to avoid calcium overload into the myocardium in a pig model. *Transplant Proc*. 2002;34(8):3265-7.

11. Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol.* 1981;102(2):262-70.
12. Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol.* 2015;172(8):2074-84.
13. Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol.* 2014;5:59.
14. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-35.
15. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol.* 2010;106(3):360-8.
16. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C817-33.
17. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76:99-114.
18. Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C137-47.
19. Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM, Zhou ZN. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 2003;13(5):385-91.
20. Hu XL, Olsson T, Johansson IM, Brannstrom T, Wester P. Dynamic changes of the anti- and pro-apoptotic proteins Bcl-w, Bcl-2, and Bax with Smac/Diablo mitochondrial release after photothrombotic ring stroke in rats. *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1177-88.
21. Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1552-62.

22. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:19-44.
23. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981-90.
24. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
25. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(2):48-54.
26. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* 2006;2006(349):re8.
27. Zanotto-Filho A, Schroder R, Moreira JC. Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells. *Free Radic Res.* 2008;42(6):593-601.
28. Drose S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145-69.
29. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(2):201-9.
30. Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;82 Suppl 1:S42-5.
31. Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(3):343-53.
32. Gopalakrishna R, Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radical Bio Med.* 2000;28(9):1349-61.

33. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(8):2653-8.
34. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 2002;84(2-3):153-66.
35. Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17197-204.
36. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):590-5.
37. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*. 2013;4:95.
38. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434(7033):658-62.
39. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26312-23.
40. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 2):233-49.
41. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38(2):367-74.

42. Kroemer G. The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction. *Curr Med Chem*. 2003;10(16):1469-72.
43. Whelan RS, Konstantinidis K, Wei AC, Chen Y, Reyna DE, Jha S, et al. Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(17):6566-71.
44. Jacobson J, Duchen MR. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes-- requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 6):1175-88.
45. Nicotra A, Parvez S. Apoptotic molecules and MPTP-induced cell death. *Neurotoxicol Teratol*. 2002;24(5):599-605.
46. Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:79-99.
47. Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K. Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(4):389-99.
48. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
49. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(9):1092-7.
50. Wang Q, Zhang M, Torres G, Wu S, Ouyang C, Xie Z, et al. Metformin Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via the Inhibition of Drp1-Mediated Mitochondrial Fission. *Diabetes*. 2017;66(1):193-205.
51. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13843-55.

52. Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):341-51.
53. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No. 2:R283-9.
54. Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep*. 2007;8(10):939-44.
55. Alexander C, Votruba M, Pesch UEA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 2000;26(2):211-5.
56. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 2003;160(2):189-200.
57. Parone PA, Martinou JC. Mitochondrial fission and apoptosis: an ongoing trial. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(5-6):522-30.
58. Sheridan C, Martin SJ. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion*. 2010;10(6):640-8.
59. Zhang Z, Liu L, Wu S, Xing D. Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis. *FASEB J*. 2016;30(1):466-76.
60. Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2005;15(4):179-83.

61. Bossy-Wetzell E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):706-16.
62. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.* 2001;1(4):515-25.
63. Civiletti G, Varanita T, Cerutti R, Gorletta T, Barbaro S, Marchet S, et al. Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metab.* 2015;21(6):845-54.
64. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol.* 2002;159(6):931-8.
65. Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 2010;11(9):678-84.
66. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124-36.
67. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006;70(2):240-53.
68. Downey JM, Cohen MV. Signal transduction in ischemic preconditioning. *Adv Exp Med Biol.* 1997;430:39-55.
69. Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol.* 2005;42(5-6):243-52.
70. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology.* 1997;87(2):361-70.

71. Kwok WM, Aizawa K. Preconditioning of the myocardium by volatile anesthetics. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004;2(3):249-55.
72. Sedlic F, Pravdic D, Ljubkovic M, Marinovic J, Stadnicka A, Bosnjak ZJ. Differences in production of reactive oxygen species and mitochondrial uncoupling as events in the preconditioning signaling cascade between desflurane and sevoflurane. *Anesthesia and Analgesia*. 2009;109(2):405-11.
73. Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2067-74.
74. Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(8):1007-31.
75. Marinovic J, Bosnjak ZJ, Stadnicka A. Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology*. 2006;105(1):98-104.
76. Hanley PJ, Mickel M, Loffler M, Brandt U, Daut J. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol*. 2002;542(Pt 3):735-41.
77. Stadnicka A, Marinovic J, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ. Impact of in vivo preconditioning by isoflurane on adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat heart: lasting modulation of nucleotide sensitivity during early memory period. *Anesthesiology*. 2006;104(3):503-10.
78. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. 2000;92(6):1731-9.

79. Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(4):1023-34.
80. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof E, Fleischmann KE, et al. ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery). *Anesth Analg.* 2008;106(3):685-712.
81. Mio Y, Bienengraeber MW, Marinovic J, Gutterman DD, Rakic M, Bosnjak ZJ, et al. Age-related attenuation of isoflurane preconditioning in human atrial cardiomyocytes: roles for mitochondrial respiration and sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activity. *Anesthesiology.* 2008;108(4):612-20.
82. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology.* 2002;96(1):183-8.
83. Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, Gross ER, Toller WG, Pagel PS, et al. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(4):H1744-50.
84. Kersten JR, Schmeling TJ, Orth KG, Pagel PS, Warltier DC. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am J Physiol.* 1998;275(2 Pt 2):H721-5.
85. Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(4):H1218-24.

86. Tanaka K, Kehl F, Gu WD, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, et al. Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol-Heart C*. 2002;282(6):H2018-H23.
87. Stadnicka A, Marinovic J, Ljubkovic M, Bienengraeber MW, Bosnjak ZJ. Volatile anesthetic-induced cardiac preconditioning. *J Anesth*. 2007;21(2):212-9.
88. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
89. Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
90. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo HG, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-U1.
91. Lensch MW, Schlaeger TM, Zon LI, Daley GQ. Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):253-8.
92. Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, Oettgen P. Is stem cell therapy ready for patients? *Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. Ready for the Next Step*. *Circulation*. 2006;114(4):339-52.
93. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(19):1884-93.
94. Caspi O, Itzhaki I, Kehat I, Gepstein A, Arbel G, Huber I, et al. In vitro electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cells Dev*. 2009;18(1):161-72.

95. Laustriat D, Gide J, Peschanski M. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(4):1051-7.
96. Lengerke C, Daley GQ. Disease Models from Pluripotent Stem Cells Turning Back Time in Disease Pathogenesis? *Ann Ny Acad Sci.* 2009;1176:191-6.
97. Marchetto MC, Brennand KJ, Boyer LF, Gage FH. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises. *Hum Mol Genet.* 2011.
98. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1397-409.
99. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):2344-9.
100. Sepac A, Si-Tayeb K, Sedlic F, Barrett S, Canfield S, Duncan SA, et al. Comparison of Cardiomyogenic Potential among Human ESC and iPSC Lines. *Cell Transplant.* 2012.
101. Krishna KA, Krishna KS, Berrocal R, Rao KS, Sambasiva Rao KR. Myocardial infarction and stem cells. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(2):182-8.
102. Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, et al. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2355-63.
103. Gherghiceanu M, Barad L, Novak A, Reiter I, Itskovitz-Eldor J, Binah O, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: comparative ultrastructure. *J Cell Mol Med.* 2011;15(11):2539-51.
104. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(4):841-60.

105. Ong SB, Hall AR, Hausenloy DJ. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(4):400-14.
106. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-22.
107. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12(8):2245-56.
108. Tanaka A, Youle RJ. A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. *Mol Cell*. 2008;29(4):409-10.
109. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2979-84.
110. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007;43(1 Suppl):25-30.
111. Sarkar P, Zaja I, Bienengraeber M, Rarick KR, Terashvili M, Canfield S, et al. Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306(4):H475-84.
112. Zhang N, Wang S, Li Y, Che L, Zhao Q. A selective inhibitor of Drp1, mdivi-1, acts against cerebral ischemia/reperfusion injury via an anti-apoptotic pathway in rats. *Neurosci Lett*. 2013;535:104-9.
113. Giedt RJ, Yang C, Zweier JL, Matzavinos A, Alevriadou BR. Mitochondrial fission in endothelial cells after simulated ischemia/reperfusion: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(2):348-56.

114. Bouwman RA, Musters RJ, van Beek-Harmsen BJ, de Lange JJ, Boer C. Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. 2004;100(3):506-14.
115. Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szwedda LI, Mochly-Rosen D. Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47985-91.
116. Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, Ono Y, Nozato T, Abe S, et al. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2001;88(4):408-14.
117. Qi X, Disatnik MH, Shen N, Sobel RA, Mochly-Rosen D. Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C{delta} under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell*. 2011;22(2):256-65.
118. Cho SG, Du Q, Huang S, Dong Z. Drp1 dephosphorylation in ATP depletion-induced mitochondrial injury and tubular cell apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(1):F199-206.
119. Fox CS, Coady S, Sorlie PD, D'Agostino RB, Sr., Pencina MJ, Vasan RS, et al. Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;115(12):1544-50.
120. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, et al. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38(4):1007-11.
121. Amour J, Kersten JR. Diabetic cardiomyopathy and anesthesia: bench to bedside. *Anesthesiology*. 2008;108(3):524-30.

122. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):II340-4.
123. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Brit J Anaesth*. 2003;91(4):551-65.
124. Zaugg M, Lucchinetti E, Garcia C, Pasch T, Spahn DR, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications. *Br J Anaesth*. 2003;91(4):566-76.
125. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, An J, Chen Q, Riess ML, et al. Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(1):H44-52.
126. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 5):838-48.
127. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, et al. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain*. 2008;131(Pt 2):352-67.
128. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, et al. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res*. 2012;111(9):1125-36.
129. Seki T, Yuasa S, Kusumoto D, Kunitomi A, Saito Y, Tohyama S, et al. Generation and characterization of functional cardiomyocytes derived from human T cell-derived induced pluripotent stem cells. *Plos One*. 2014;9(1):e85645.

130. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2009;104(4):e30-41.
131. Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, et al. Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2009;120(15):1513-23.
132. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):E1848-57.
133. Sepac A, Sedlic F, Si-Tayeb K, Lough J, Duncan SA, Bienengraeber M, et al. Isoflurane preconditioning elicits competent endogenous mechanisms of protection from oxidative stress in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Anesthesiology*. 2010;113(4):906-16.
134. Canfield SG, Sepac A, Sedlic F, Muravyeva MY, Bai X, Bosnjak ZJ. Marked hyperglycemia attenuates anesthetic preconditioning in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 2012;117(4):735-44.
135. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51(1):297-305.
136. Barth AS, Kizana E, Smith RR, Terrovitis J, Dong P, Leppo MK, et al. Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells. *Molecular Therapy*. 2008;16(5):957-64.
137. Canfield SG, Zaja I, Godshaw B, Twaroski D, Bai X, Bosnjak ZJ. High Glucose Attenuates Anesthetic Cardioprotection in Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes: The Role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Fission. *Anesth Analg*. 2016;122(5):1269-79.

138. Huser J, Rechenmacher CE, Blatter LA. Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophys J*. 1998;74(4):2129-37.
139. Koopman WJ, Visch HJ, Smeitink JA, Willems PH. Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts. *Cytometry A*. 2006;69(1):1-12.
140. Lee J, Kim Y, Yi H, Diecke S, Kim J, Jung H, et al. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R41.
141. Fatima A, Kaifeng S, Dittmann S, Xu G, Gupta MK, Linke M, et al. The disease-specific phenotype in cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of two long QT syndrome type 3 patients. *Plos One*. 2013;8(12):e83005.
142. Beyene R, Boockvar JA. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Neurosurgery*. 2008;63(6):12.
143. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007;583(Pt 1):9-24.
144. Mao CY, Lu HB, Kong N, Li JY, Liu M, Yang CY, et al. Levocarnitine protects H9c2 rat cardiomyocytes from H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1107-15.
145. Nakamura T, Cieplak P, Cho DH, Godzik A, Lipton SA. S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration. *Mitochondrion*. 2010;10(5):573-8.
146. Figueroa-Romero C, Iniguez-Lluhi JA, Stadler J, Chang CR, Arnoult D, Keller PJ, et al. SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J*. 2009;23(11):3917-27.

147. Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol.* 2007;178(1):71-84.
148. Leucker TM, Bienengraeber M, Muravyeva M, Baotic I, Weihrauch D, Brzezinska AK, et al. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2011;51(5):803-11.

8. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Ivan Žaja

Datum rođenja: 17. svibnja 1986.

Adresa: Put Glavice 4, 21 212 Kaštel Sućurac, Hrvatska

Elektronička pošta: ivan.zaja@yahoo.com

Državljanstvo: Hrvatsko

Radno iskustvo:

- 2011. - 2013. - Postdoctoral fellowship, Medical College of Wisconsin, WI, USA
- 2013. - 2014. - liječnik pripravnik, Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije
- 2014. - 2014. liječnik opće medicine u ispostavama Zavoda za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije
- 2014. - liječnik na specijalizaciji iz gastroenterologije u Kliničkom bolničkom centru Split

Izobrazba:

- 2001. - 2005. - IV. gimnazija «Marko Marulić» u Splitu
- 2005. - 2011. - integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

Članstva:

- 2012. - 2014. član American society of anesthesiologists (ASA)
- 2013. - 2014. član American heart association (AHA)
- 2014. - član Hrvatske liječničke komore (HLK)
- 2015. - član Hrvatskog gastroenterološkog društva (HGD)
- 2015. - član Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ)

Nagrade:

- 2010. Rektorova nagrada
- 2011. Dekanova nagrada
- 2011. Nacional Top stipendija za top studente

Recenzije u časopisima:

- Bio Med Research International (Future Medicinine Publishing Group)
- Regenerative Medicine (Hindawi Publishing Group)

Popis radova:

1. Bai X, Yan Y, Canfield S, Muravyeva MY, Kikuchi C, **Zaja I**, et al. Ketamine enhances human neural stem cell proliferation and induces neuronal apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Anesthesia and analgesia*. 2013 Apr;116(4):869-80. PubMed PMID: 23460563. Pubmed Central PMCID: 3606677.
2. Canfield SG, **Zaja I**, Godshaw B, Twaroski D, Bai X, Bosnjak ZJ. High Glucose Attenuates Anesthetic Cardioprotection in Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes: The Role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Fission. *Anesthesia and analgesia*. 2016 May;122(5):1269-79. PubMed PMID: 26991754.
3. Hozo ER, Sucic G, **Zaja I**. Burnout Syndrome among Educators in Pre-School Institutions. *Materia socio-medica*. 2015 Dec;27(6):399-403. PubMed PMID: 26889099. Pubmed Central PMCID: 4733556.
4. Qiao S, Olson JM, Paterson M, Yan Y, **Zaja I**, Liu Y, et al. MicroRNA-21 Mediates Isoflurane-induced Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury via Akt/Nitric Oxide Synthase/Mitochondrial Permeability Transition Pore Pathway. *Anesthesiology*. 2015 Oct;123(4):786-98. PubMed PMID: 26259139. Pubmed Central PMCID: 4573345.

5. Sarkar P, **Zaja I**, Bienengraeber M, Rarick KR, Terashvili M, Canfield S, et al. Epoxyeicosatrienoic acids pretreatment improves amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014 Feb 15;306(4):H475-84. PubMed PMID: 24285116. Pubmed Central PMCID: 3920242.
6. Trgo G, **Zaja I**, Bogut A, Kovacic Vicic V, Meter I, Vucic Lovrencic M, et al. Association of Asymmetric Dimethylarginine With Acute Pancreatitis-Induced Hyperglycemia. *Pancreas*. 2016 May-Jun;45(5):694-9. PubMed PMID: 26390429.
7. Twaroski DM, Yan Y, **Zaja I**, Clark E, Bosnjak ZJ, Bai X. Altered Mitochondrial Dynamics Contributes to Propofol-induced Cell Death in Human Stem Cell-derived Neurons. *Anesthesiology*. 2015 Nov;123(5):1067-83. PubMed PMID: 26352374. Pubmed Central PMCID: 4632973.
8. Vukovic J, Modun D, Budimir D, Sutlovic D, Salamunic I, **Zaja I**, et al. Acute, food-induced moderate elevation of plasma uric acid protects against hyperoxia-induced oxidative stress and increase in arterial stiffness in healthy humans. *Atherosclerosis*. 2009 Nov;207(1):255-60. PubMed PMID: 19457484.
9. **Zaja I**, Bai X, Liu Y, Kikuchi C, Dosenovic S, Yan Y, et al. Cdk1, PKCdelta and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014 Oct 31;453(4):710-21. PubMed PMID: 25445585. Pubmed Central PMCID: 4312217.

Popis kongresnih prezentacija:

1. **Zaja I.** Isoflurane reduces cardiomyocyte death through modulation of mitochondrial dynamics. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (ASA), 2012.
2. Bai X, Yan Y, Canfield S, Muravyeva M, Kikuchi C, **Zaja I**, Bosnjak Z. Ketamine enhances neural stem cell self-renewal and induces neuron apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (ASA), 2012.
3. Ge ZD, Qiao S, Olson J, Paterson M, Yan Y, **Zaja I**, Kersten JR, Warltier DC, Bosnjak ZJ. MicroRNA-21 mediates the cardioprotective effect of isoflurane through Akt/NOS/mPTP pathway. American heart association (AHA) annual meeting, 2014.
4. Sarkar P, **Zaja I**, Bienengraeber M, Terashvili M, Canfield S, Falck JR, Harder DR. EETs pre-treatment improves amyloid β -induced mitochondrial dysfunction in cultured rat hippocampal astrocytes. Experimental Biology Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2012.
5. Twaroski DM, Yan Y, **Zaja I**, Clark E, Bosnjak ZJ, Bai X. Altered Mitochondrial Dynamics Contributes to Propofol-induced Cell Death in Human Stem Cell-derived Neurons. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (ASA), 2015.
6. **Zaja I**, Dogas Z. Vrijednosti bispektralnoga indeksa (BIS) pri razlicitim psihomotorickim testovima. 1. Studentski kongres neuroznanosti, NeuRi, Rijeka, Hrvatska
7. Twaroski D, Yan Y, **Zaja I**, Liu Y, Bosnjak Z, Bai X. The role of mitochondrial dysfunction in propofol-induced cell death in human stem cell-derived neurons. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (ASA), 2014 (late breaking poster abstract).

8. Twaroski D, Yan Y, **Zaja I**, Liu Y, Bosnjak Z, Bai X. Altered mitochondrial dynamics contributes to propofol-induced cell death in human stem cell-derived neurons.
9. Bai X, Canfield S, **Zaja I**, Twaroski D, Yan Y, Olson J, Bosnjak Z. High glucose attenuates anesthetic cardioprotection in human stem cell-derived cardiomyocytes: a role of reactive oxygen species and mitochondrial fission. International Anesthesia Research Society Annual Meeting, 2015.
10. Twaroski D, Yan Y, **Zaja I**, Bosnjak Z, Bai X. Increased mitochondrial fission contributes to the propofol-induced stem cell derived human neuron death through CDK1/DRP1 pathway. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2015. Stockcolm, Sweden.
11. Williams A, Canfield S, **Zaja I**, Olson J, Bai X, Bosnjak Z. Sepiapterin attenuates increased mitochondrial fission and restores anesthetic cardioprotection in human cardiomyocytes exposed to high glucose. International Anesthesia Research Society Annual Meeting, 2016.
12. Yan Y, Twaroski D, **Zaja I**, Bosnjak Z, Bai X. Modeling anesthetic-induced developmental neurotoxicity using human stem cell-derived neurons:the roles of miR-21 and mitochondrial fission. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 13th Annual Meeting, 2016.
13. Bai X, Canfield S, **Zaja I**, Yan Y, Bosnjak Z. High glucose attenuates anesthetic cardioprotection in stem cell-derived cardiomyocytes: a role of reactive oxygen species and mitochondrial fission. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 13th Annual Meeting, 2016.

