

Lea Andjelković¹, Jasna Kupljen²

Vpliv spola in spolnih hormonov na nastanek akutnih ishemičnih poškodb pri izoliranem podganjem srcu³

Effects of Sex Hormones on Postischemic Damage of Isolated Rat Hearts

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: miokardna reperfuzijska poškodba, estradiol, testosteron, laktatna dehidrogenaza, podgane

Spol je pomemben dejavnik pri pogostnosti nekaterih ishemičnih bolezni srca. Želeli smo ugotoviti vpliv dajanja estradiola in testosterona podganam ter vpliv brejosti podgan na nastanek miokardnih okvar, povzročenih z akutno ishemijo/reperfuzijo pri izoliranih srcih teh živali. Poskuse smo izvajali na izoliranih srcih spolno zrelih podgan (230–330 g) obeh spolov, ki smo jih 30 minut aerobno perfundirali in jih nato izpostavili 40-minutni vsesplošni ishemiji, čemur je sledila 55-minutna reperfuzija.

Za oceno stopnje okvare miokarda smo uporabili naslednje merjene spremenljivke: pretok skozi koronarne arterije, stopnjo sproščanja laktatne dehidrogenaze, tlak v levem prekatu, frekvenco utripov srca in pogostnost pojavljanja prekatnih fibrilacij v času reperfuzije.

Ugotovili smo, da je bil postishemični koronarni pretok višji pri srcih podgan, ki smo jim dajali estradiol oziroma testosteron, kot pri kontrolnih skupinah. Stopnja sproščanja LDH je po ishemiji narasla pri vseh poskusnih skupinah. Najvišje vrednosti smo izmerili pri skupini samic po kotitvi. Frekvenca srčnih utripov je bila najvišja pri skupini samic po kotitvi. Trajanje fibrilacij je bilo pri skupinah z dodanima hormonoma neznačilno krajše kot pri kontrolnih skupinah. Razlike v postishemičnih spremembah merjenih spremenljivk pri različnih poskusnih skupinah kažejo na zaščitno vlogo spolnih hormonov pri nastanku okvar na izoliranih podganjih srcih med ishemijo/reperfuzijo.

ABSTRACT

KEY WORDS: myocardial reperfusion injury, estradiol, testosterone, lactate dehydrogenase, rats

Sex might be an important factor in the development of certain ischemic diseases of the heart. We tried to assess the effects of treating rats with estradiol or testosterone on the development of myocardial damage caused by ischemia/reperfusion. Experiments were carried out on the isolated hearts of sexually mature rats of both sexes (230–330 g) which were perfused with aerated Krebs-Henseleit solution for 30 minutes and then subjected to 40 minutes zero-flow ischemia followed by 55 minutes of reperfusion.

The severity of myocardial damage was assessed based on postischemic changes in the following registered parameters: coronary blood flow, lactate dehydrogenase release rate, left ventricular pressure, heart rate and duration of ventricular fibrillation during reperfusion.

¹ Lea Andjelković, štud. med. (dr. med. od leta 2004), Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

² Jasna Kupljen, štud. med. (dr. med. od leta 2004), Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

³ Objavljeno delo je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado študentom za leto 2001.

The coronary flow was higher in the hearts of rats treated with estradiol or testosterone than in those from the control groups. Postischemic LDH values were elevated in all groups, but the highest values were observed in the postgravid group. Postischemic heart rate values were lower than before ischemia. The highest values were observed in the postgravid group. In our experiment a protective role of sex hormones regarding development of ischemic/reperfusion damage in isolated rat hearts has been shown.

UVOD

Ishemična bolezen srca je glavni vzrok smrti v razvitih državah pri moških in pri ženskah nad 60. letom starosti. Pri ženskah do menopavze je manj boleznih srca in ožilja kot pri enako starih moških, po menopavzi pa se stopnja obolevnosti in smrtnosti obeh spolov izenači (1).

ISHEMIČNA IN REPERFUZIJSKA POŠKODBA SRCA

Ishemija prizadene tkivo na celičnem nivoju na več načinov: spremeni zgradbo celičnih membran, onemogoči celično dihanje, zavre sintezo proteinov in poškoduje genetski aparat. Povzroči porabo zalog adenozin trifosfata (ATP), zato se poruši delovanje ionskih črpalk, sledi nabrekanje celic. Zaradi pomanjkanja ATP se zviša stopnja anaerobne glikolize. Zmanjšana sinteza proteinov vodi v motnje delovanja citoskeleta. Če traja ishemija dovolj dolgo, pride do nepovratnih sprememb.

Ob ponovni vzpostavitvi krvnega obtoka obilno nastajajo kisikovi prosti radikali, ki dodatno prispevajo k celični poškodbi (2, 3).

Spolni hormoni verjetno vplivajo na potek ishemične/reperfuzijske poškodbe v srčno-žilnem sistemu (KVS) na več nivojih:

1. Vpliv na dejavnike tveganja za obolenja KVS.
2. Vpliv na koronarno žilje in s tem na prekrvljenost srca.
3. Vpliv na srčno mišico na celičnem nivoju.

Estrogen in estrogenski receptor v srčno-žilnem sistemu

Estrogeni so skupina steroidnih spolnih hormonov, ki se sintetizirajo v jajčnikih in posteljici, v manjših količinah v drugih tkivih, tudi v srcu. V človeškem telesu nastajajo tri-

je glavni endogeni estrogeni, od katerih je estradiol najbolj dejaven (4).

Estrogen deluje na tarčna tkiva prek specifičnega estrogenskega receptorja (ER), ki ima α in β obliko. Obe z visoko afiniteto vezeta estradiol in se nahajata v človeškem miokardu in koronarnih arterijah pri obeh spolih, v miocitih, fibroblastih, endotelijskih in gladkih mišičnih celicah (5–8).

Dokazano je, da estrogen akutno vpliva na KVS preko receptorja na celični membrani in spremembe v fosforilaciji proteinov ter spremenjenega nivoja cikličnega adenozin fosfata (cAMP) v celici (9).

Upravljanje ER prek liganda je torej tkivno specifična (10). Estradiol in estrogenski prekursorji so spodbudili izražanje ER α in ER β v miocitih podganjih src. Jakost spodbude izražanja ER je bila odvisna od spola (11).

Učinki estrogena na srčno-žilni sistem

Učinki estrogena na dejavnike tveganja za bolezen srca in ožilja

Estrogen v fizioloških koncentracijah zmanjšuje učinke β -adrenergične spodbude na srce, zmanjša diastolni tlak in frekvenco izoliranega podganjega srca prek zavrtja toka Ca²⁺ v miokard in v sinoatrialni vozeli (12). Estrogen tudi zvišuje raven lipoproteinov z visoko gostoto (angl. *high density lipoprotein*, HDL) in znižuje raven neugodnih lipoproteinov z nizko gostoto (angl. *low density lipoprotein*, LDL) v krvi (slika 1) (13–15).

Učinki estrogena na nastajanje aterosklerotičnih poškodb in njihovih posledic

Eden od varovalnih učinkov estrogena na srce bi lahko bilo zaviranje proliferacije gladkih mišičnih celic in s tem upočasnjeno nastajanje aterosklerotičnih poškodb (slika 1) (6, 13).

Estrogen posredno vpliva tudi na trombotične dogodke in na vnetje prek spreminjanja kopičenja trombocitov in migracije levkocitov (14, 15).

Dilatatorni učinki estrogena na žilje

V fizioloških koncentracijah je glavni akutni učinek estrogena odprtje od Ca^{2+} odvisnih kanalčkov K^+ v gladkih mišičnih celicah žil prek sproščanja dušikovega oksida (NO) (slika 1). Estrogen poveča izražanje genov za encime prostaciklinsko sintazo in NO-sintazo (7).

Učinki estrogena na srce

V študijah ishemične/reperfuzijske poškodbe je estradiol izrazilo zmanjšal miokardno nekrozo in pojavnost prekatnih aritmij ter ohranil prekatno funkcijo. Zaščitni učinek se je pojavil neodvisno od izboljšanja koronarnega pretoka (5, 6, 16). Primerjava posledic vsesplošne miokardne ishemije na izoliranih srcih podgan, ki so jim odvzeli jajčnike z dodajanjem estradiola ali brez, je pokazala, da se je v kontrolni skupini kopičilo več znotrajceličnega Ca^{2+} in poškodbe mitohondrijev so bile izrazitejšje (17).

Estrogen deluje zaščitno neposredno na srce na več načinov:

- Preko ER varuje strukturo mitohondrijev in s tem ščiti miocite pred reperfuzijsko poškodbo (17).
- Zavira apoptotične procese. Po akutnem miokardnem infarktu so v miocitih zasledili aktivacijo apoptotičnih procesov (18). Srčni miociti predmenopavzalnih žensk kažejo večjo dejavnost proteinske kinaze B (PKB) kot miociti moških in žensk po menopavzi. PKB ima osrednjo vlogo pri odpornosti celic na apoptozo (19).
- Vpliva na sestavo izvenceličnega matriksa. S tem uravnava preoblikovanje izvenceličnega prostora in vpliva na neokrnjenost miokardne funkcije (20).
- Ima antioksidacijske učinke. Po 14-dnevnem dodajanju estradiola se je v izoliranem podganem srcu povišala koncentracija glutationa, ki preprečuje lipidno peroksidacijo celičnih membran (21).

- Zmanjša občutljivost srčnih miofilamentov podgan na ione Ca^{2+} (22). Predhodno dajanje estradiola je zmanjšalo obseg s hipoksijo sproženega kopičenja znotrajceličnega Ca^{2+} pri ženskah, ne pa pri moških, kar kaže na od spola odvisno zaščitno delovanje estradiola (23).
- Vpliva na delovanje ionskih črpalk. Estradiol je povečal dejavnost Na^+ , K^+ -ATPaze v sarkolemi srčnih miocitov (24).

Delovanje estrogena na molekularnem nivoju je manj raziskano. Družino receptorjev za steroidne hormone spodbujajo steroidni ligandi. Konformacijska sprememba in jedrna translokacija, ki sledita, privedeta do vezave z DNK (25–28).

Možen mehanizem delovanja estrogena je prek vezave ER s toplotnimi stresnimi proteini (angl. *heat stress protein*, HSP), ki so pomembna družina endogenih zaščitnih proteinov in imajo varovalno vlogo le ob hkratni prisotnosti škodljivih dejavnikov (29–31). Njihovi varovalni učinki na srce se kažejo na mikrofilamentih, mikrotubulih, aktinu in z zavrtjem apoptoze (29).

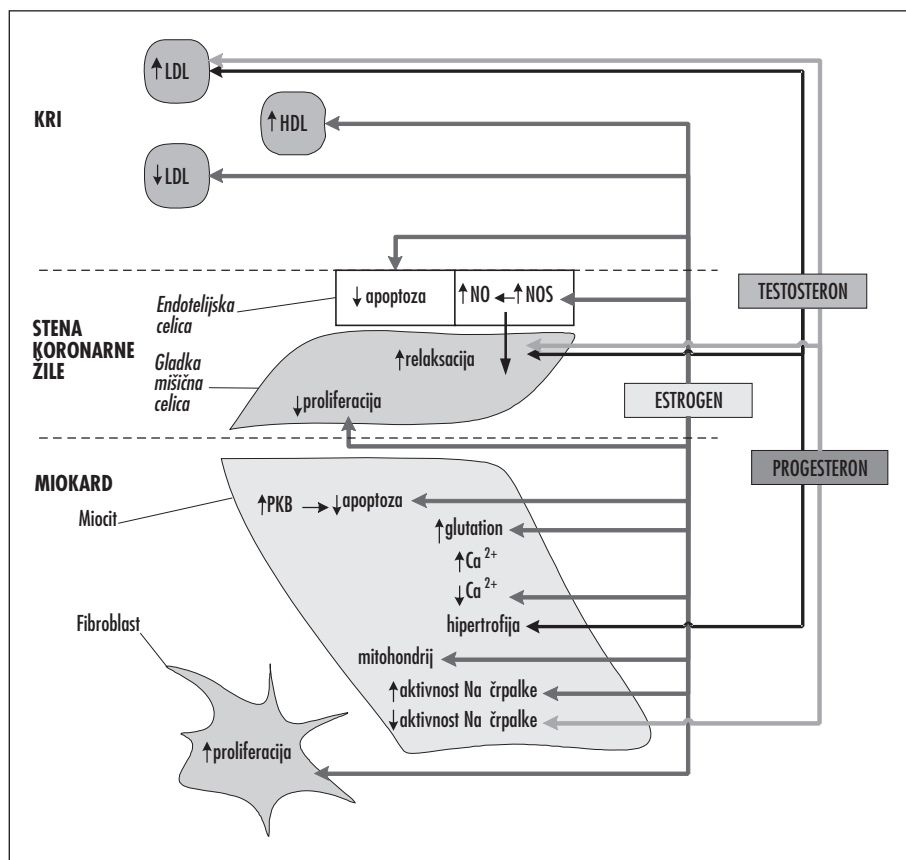
Testosteron in androgenski receptor

Testosteron je glavni predstavnik skupine androgenih hormonov. Nastaja v intersticijskih celicah testisov, v manjših količinah ga izločajo tudi nadledvične žleze obeh spolov in jajčniki pri ženskah. V tarčnih celicah se pretvori v dihidrotestosteron (4).

Testosteron se v tkivih (miokardu, gladki mišici žil, aortnem, pljučnem in perifernem žilju) veže na specifični androgenski receptor (AR) (32–34). Konformacijsko spremenjeni kompleks androgen + AR se veže na odzivne elemente na DNK (34).

Učinki testosterona na srčno-žilni sistem

Študije so pokazale, da imajo moški z ishemično srčno okvaro in z napredujočim koronarnim ateromom nižje vrednosti testosterona kot kontrolne skupine. Kastracija pri živalih pospeši aterosklerozo, medtem ko jo androgensko zdravljenje zavira (35). Nadomestno zdravljenje z androgeni izboljša funkcijo srca in žil, poveča moč in trajanje krčivte srca ter zavre



Slika 1. Vpliv spolnih hormonov na strukture srčno žilnega sistema. NOS – NO sintaza.

aktivacijo citokinov (35). Androgeni znižujejo razmerje HDL/LDL (slika 1) (36).

Študije so pokazale, da lahko testosteron selektivno zavre izvennevronske privzem nevrominov in poveča žilni odgovor na noradrenalin (34). Druge raziskave ugotavljajo, da pri podganah androgensko zdravljenje izboljšuje koronarni pretok in povišuje privzem kisika v miokardu (35).

AR so v miokardu prisotni v tolikšni meri, da lahko vnešeni androgeni uravnavajo hipertrofijo srca. To je vzrok za različno težo src pri ženskah in moških (32). Testosteron deluje tudi na negenomski način, tako da spreminja izmenjevanje Ca^{2+} med celico in zunajceličnim prostorom, kar naj bi bil eden od vzrokov za hipertrofijo. Ob prisotnosti testosterona so opazili hitro slabšanje medceličnih stikov v miocitih zaradi neposredne interakcije med testosteronom in proteolipid-

no strukturo v membrani. Prekinitev komunikacije celica-celica preko tesnih stikov je bila odvisna od odmerka (37).

Učinki anabolnih androgenih steroidov so povečano kopičenje trombocitov in dejavnost trombina ter zvišane vrednosti HDL in LDL (34). Pri zlorabi anabolnih androgenih steroidov so dokazali neposredne poškodbe na miokardnih celicah. Pretrgal se je celični monosloj v celični kulturi in povečala se je apoptoza (38).

Progesteron in progesteronski receptor

Progesteron je glavni predstavnik skupine progestinskih hormonov. Sprošča se predvsem iz rumenega telesa v drugi polovici spolnega cikla in tudi posteljice med nosečnostjo (4).

Učinki progesterona na srčno-žilni sistem

Nekateri progestini, ki jih uporabljajo v kombiniranem nadomestnem hormonskem zdravljenju (estrogeni in progestini) pri ženskah po menopavzi, ne vplivajo znatno na krvni lipidni profil. Lahko celo zmanjšujejo zaščitne učinke estrogena zaradi androgen-ske dejavnosti progestinov. Možno je, da nastali kompleks progesteron + AR neposredno zavira ER, tako da se veže z njim (39).

Progesteron vpliva negativno inotropno na srce in zavira koronarni vazospazem, ki ga povzroči vazopresin ter zviša bazalni tonus koronark pri kuncu (slika 1) (40).

Pri kroničnem dajanju progesterona se je pri sovah znižal srednji arterijski tlak in povečala prostornina plazme (41).

Ugotovili so tudi, da progesteron odpira napetostno odvisne kanalčke K^+ in tako povzroča širjenje koronarnih arterij (42). Progesteronski derivat klormadinin acetat zavre izolirano Na^+ , K^+ -ATPazo, posledično se zniža moč miokardne krčivke pri budri (43).

Na molekularnem nivoju je možno, da se po vezavi progesterona na receptor, kompleks progesteron + PR + HSP 90 prestavi iz citoplazme v jedro in aktivira se prosti HSF-1 (25).

Namen raziskave

Raziskati smo želeli vpliv spola poskusnih živali in vpliv dodanih spolnih hormonov na nastanek okvar po akutni ishemiji pri izoliranem srcu.

Utemeljitev raziskave

Razlika v stopnji obolevnosti KVS med spoloma kaže na pomen spolnega hormonskega statusa pri poteku ishemičnih in reperfuzijskih poškodb srca. Spolni hormoni učinkujejo na KVS na več nivojih. Ti učinki so odvisni od spolnega hormona, njegove koncentracije, prisotnosti specifičnega receptorja in njegove uravnave ter od samega spola.

V naši raziskavi smo izpostavili ishemiji izolirana podganja srca netretiranih samic in samcev ter srca samic in samcev, ki smo jim pred poskusom na srcu dali spolna hormona estradiol oziroma testosteron. Ishemiji smo izpostavili tudi srca podgan, ki so pred kratkim skotile mladiče, saj se hormonski status med

brejostjo spremeni. Tako smo ugotavljali vpliv spola in spolnih hormonov neposredno na miokard. Zanimale so nas postishemične spremembe koronarnega pretoka, aktivnosti LDH v srčnem efluentu, spremembe v moči krčivke levega prekata (LVP) in v frekvenci srčnega utripa ter spremembe trajanja prekatnih fibrilacij v času reperfuzije, torej spremenljivk, ki odražajo delovanje in celovitost srčne mišice.

MATERIALI IN METODE

Materiali

Za izvedbo poskusov smo uporabili izolirana srca podgan obeh spolov, ki smo jih perfundirali s fiziološko raztopino Krebs-Henseleit (KH). Izvedli smo pet skupin poskusov: 1. kontrolno skupino samic ($n = 8$), 2. kontrolno skupino samcev ($n = 7$), 3. skupino samic 1–2 dneva po kotitvi ($n = 7$), 4. skupino samic, ki smo jim pred izvedbo poskusa 10–14 dni vsak dan podkožno vbrizgavali 2 mg estradiola ($n = 8$) in 5. skupino samcev, ki smo jim pred izvedbo poskusa 10–14 dni vsak dan podkožno vbrizgavali 1,9 mg testosterona ($n = 8$).

Metode

Izolacija src po Langendorffu

Živalim smo intraperitonealno vbrizgali 0,65 ml 20 % raztopine (2,2 M) uretana na 100 g telesne teže živali. Proti strjevanju krvi smo intraperitonealno vbrizgali heparin. V aorto smo uvedli kanilo, napolnjeno z raztopino KH in heparinom, srce izolirali in ga namestili na aparat po Langendorffu.

Izolirano srce smo perfundirali s fiziološko raztopino KH s stalnim tlakom in temperaturo 38,5 °C. V fiziološko raztopino smo dovajali mešanico kisika in ogljikovega dioksida (= karbogen).

Moč krčitev levega prekata smo merili preko lateksnega balončka, ki smo ga vstavili skozi levi preddvor. Na srce smo namestili dve elektrodi v smeri električne osi srca in merili EKG.

Protokol poskusov

Poskus je trajal 125 minut. Prvih 30 minut smo srca perfundirali s KH-raztopino in jih nato izpostavili 40-minutni vsesplošni ishemiji, ko

smo prekinili dotok raztopine KH. Reperfuzija je trajala 55 minut. Kontrolni skupini poskusov sta zajemali izolirana srca samic in samcev, ki jim predhodno nismo dajali nobenega hormona. Ostale skupine so zajemale samice po kotitvi, samice, ki smo jim dajali estrogen, in samce, ki smo jim dajali testosteron.

Merjene spremenljivke

Koronarni pretok

Koronarne žile smo perfundirali skozi kanilo, ki smo jo uvedli v aorto. Perfuzijska tekočina je iztekala skozi koronarni sinus v desni preddvor in srce jo je iztisnilo skozi odrezane žile. Efluent smo lovili v umerjeno epruveto v minutnih časovnih razmikih ob določenih časih in tako merili koronarni pretok (ml/min).

Laktatna dehidrogenaza (LDH)

S spektrofotometrom smo po nekoliko spremenjeni metodi Wroblewski-LaDue merili aktivnost LDH v tekočini, ki je izhajala iz srca in jo izrazili kot hitrost sproščanja LDH v $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (44).

Moč krčitev levega prekata

Moč krčitev levega prekata (angl. *left ventricular pressure*, LVP) smo merili s pomočjo

lateksnega balončka, ki smo ga uvedli v levi prekat. Spremembo tlaka v katetru smo merili z odvzemnikom tlaka (ISOTEC, HSE, ZRN) in s pomočjo programske opreme izračunali relativno moč kontrakcij srca.

Frekvenca utripov srca

Iz spremembe električne napetosti z odvzema tlaka v levem prekatu smo izračunali frekvenco utripov srca (število utripov na minuto). Izrazili smo jo kot relativno frekvenco utripov.

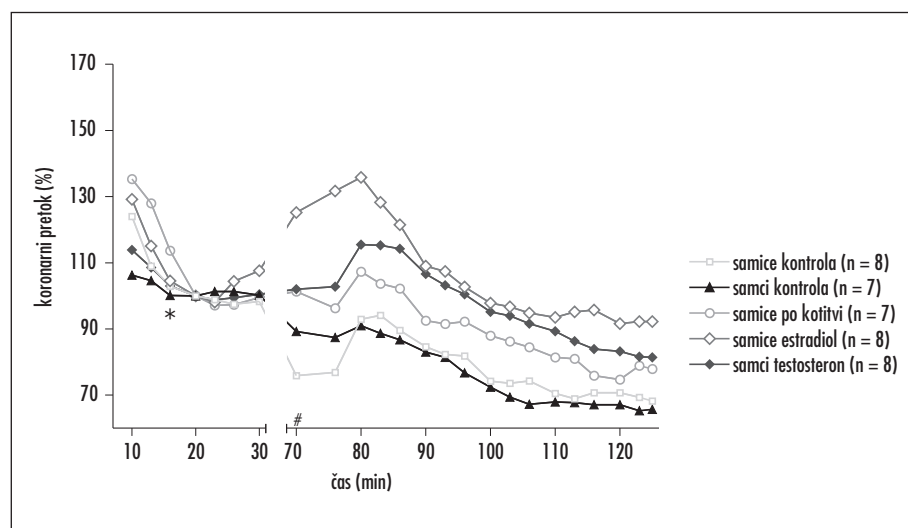
Elektrokardiogram (EKG)

EKG smo snemali s srebrnimi elektrodami, nameščenimi na srce.

Statistična obdelava podatkov

Za izračun statističnih vrednosti smo uporabili program Excel 97, za grafično obdelavo podatkov pa GraphPad Prism 3.1.

Rezultate smo izrazili kot srednje vrednosti spremenljivk in kot standardno napako srednjih vrednosti ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Razlike med skupinami meritev smo izračunali s Studentovim t-testom. Za značilne smo vzeli razlike pri $p < 0,05$.



Slika 2. Koronarni pretok pri izoliranih srcih podgan. Pretok je izražen v % od vrednosti v 20. minuti poskusa.

* $p < 0,05$; samice po kotitvi v primerjavi s kontrolno skupino samic.

$p < 0,05$; samice z dodanim estradiolom v primerjavi s kontrolno skupino samic.

REZULTATI

Poskuse smo izvedli na petih skupinah izoliranih podganjih src. Ves čas poskusa smo merili koronarni pretok, hitrost sproščanja LDH, moč krčitev levega prekata, frekvenco srčnega utripa in trajanje pojavljanja prekatnih fibrilacij.

Koronarni pretok

Pri kontrolnih skupinah samic in samcev je bil koronarni pretok med reperfuzijo ves čas manjši kot pred ishemijo. Pri samicah se je ustalil v 110. minuti poskusa (pri vrednosti $70,5 \pm 5\%$).

Pretok je bil za 9% višji pri samicah po kotitvi kot pri kontrolni skupini samic ($p < 0,05$) pred ishemijo, v 16. minuti poskusa.

Značilna razlika med kontrolno skupino samic in skupino samic z dodanim estradiolom, ki je imela za 39% višje vrednosti koronarnega pretoka, se je pojavila v 70. minuti ($p < 0,05$).

Pri samcih, ki so bili tretirani s testosteronom značilnih razlik med to in ostalimi skupinami ni bilo (slika 2).

Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH)

Vrednosti so bile pri skupini samic po kotitvi značilno višje kot pri samicah z dodanim

estradiolom v 123. minuti za $7,5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in v 125. minuti za $7,7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p < 0,05$). Hitrost sproščanja LDH pri tej skupini samic po kotitvi se ni značilno razlikovala od hitrosti sproščanja LDH pri kontrolni skupini samic (slika 3).

Moč krčitev levega prekata (LVP)

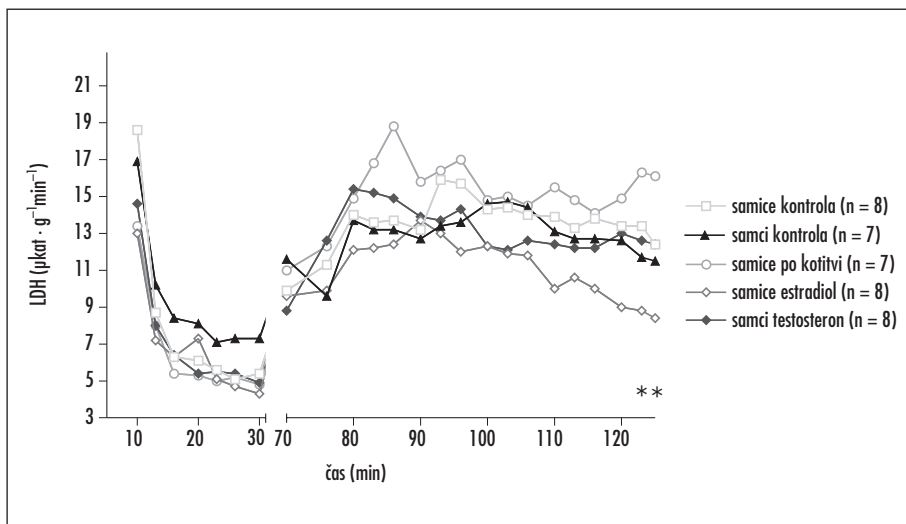
Značilnih razlik v moči kontrakcij levega prekata med skupinami nismo opazali (slika 4).

Frekvenca utripov srca

Pri skupini samic po kotitvi je bila frekvenca značilno višja od kontrolne skupine samic za 23% v 96., 100., 103. in v 106. minuti ($p < 0,05$) in za 19% ($p < 0,05$) v 113. minuti.

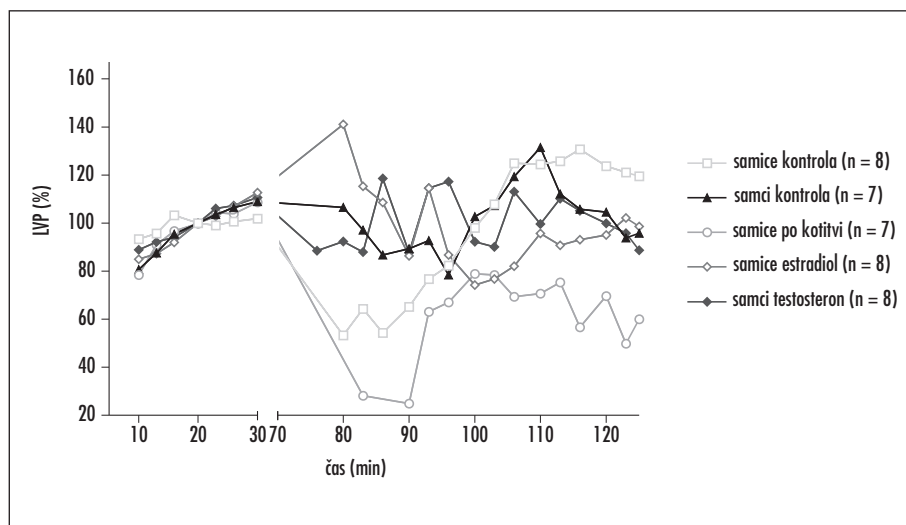
Relativne vrednosti frekvence so bile pri skupini samic z dodanim estradiolom nižje kot pri skupini samic po kotitvi v 96. minuti za 24% ($p < 0,05$), v 100. in 103. minuti za 22% ($p < 0,05$), v 106. minuti za 22% ($p < 0,01$) in v 125. minuti za 16% ($p < 0,05$).

Frekvenca v skupini samcev, ki so pred poskusom dobivali testosteron, je bila značilno nižja od skupine samic po kotitvi v 103. minuti za 24% ($p < 0,05$) in v 106. minuti za 25% ($p < 0,05$) (slika 5).

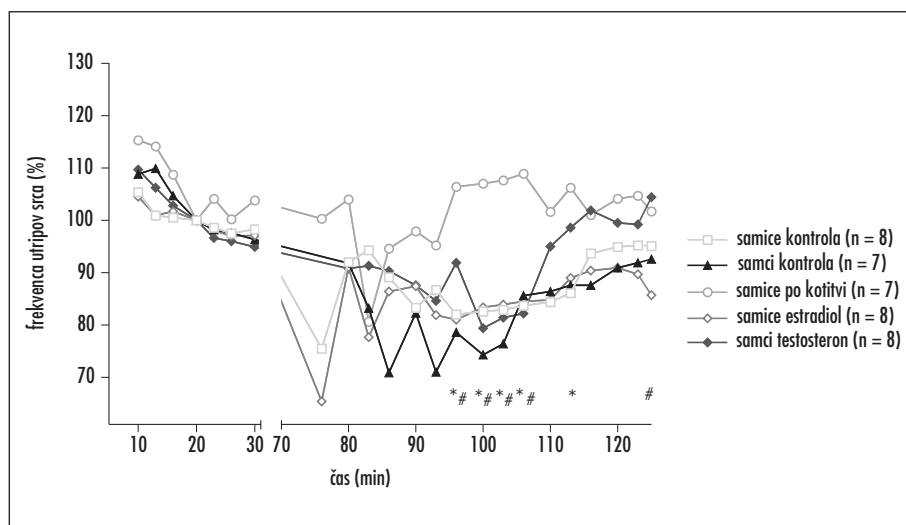


Slika 3. Hitrost sproščanja laktatne dehidrogenaze pri izoliranih srcih podgan.

** $p < 0,05$; samice po kotitvi v primerjavi s samicami z dodanim estradiolom.



Slika 4. Moč krčitev levega prekata (LVP) pri izoliranih srcih podgan. LVP je izražen v % od vrednosti v 20. minuti.



Slika 5. Frekvenca srčnih utripov pri izoliranih srcih podgan.

Frekvenca utripov je izražena v % od vrednosti v 20. minuti.

* $p < 0,05$; skupina samic po kotitvi v primerjavi s kontrolno skupino samic.

$p < 0,05$; skupina samic po kotitvi v primerjavi s samicami z dodajanjem estradiolom.

Pojavljanje prekatnih fibrilacij

Največ fibrilacij v času reperfuzije je bilo pri kontrolni skupini samcev, najmanj pa pri samcih, ki smo jim dajali testosteron. Skupinama samic in samcev, ki smo jim dajali estradiol oz.

testosteron, se je sorazmerno znižala incidenca pojavljanja fibrilacij glede na ustrezni kontrolni skupini, vendar med poskusnimi skupinami ni bilo značilnih razlik v pogostosti pojavljanja in v trajanju prekatnih fibrilacij zaradi

vključitve poskusov, ki so bili narejeni v poletni vročini, ko so srca živali kazala manjšo občutljivost na ishemične poškodbe. Značilne razlike so se pojavile le med skupinami poskusov, ki smo jih opravili pred poletno vročino, ko se ne sproščajo zaščitni toplotni stresni proteini.

RAZPRAVLJANJE

V naši raziskavi smo preučevali vpliv spola, preverjali učinek spolnih hormonov in učinek brejosti samic na izid ishemičnih/reperfuzijskih poškodb srca.

Ugotovili smo, da so pri podganah spolni hormoni, ki smo jih dodajali 10–14 dni pred ishemijo src, sprožili v srcih zaščitne mehanizme. Izrazili so se z izboljšanim koronarnim pretokom, manjšim pojavljanjem aritmij in manjšim sproščanjem LDH v času reperfuzije.

V poskusih smo preizkušali učinke predhodno dodanih hormonov estradiola in testosterona na obseg ishemičnih/reperfuzijskih poškodb pri izoliranih podganjih srcih. Vsem tretiranim podganam smo dajali ustrezne hormone od 10 do največ 14 dni. Ustrezne odmerke smo izbrali na podlagi predhodnih raziskav drugih raziskovalcev (21, 22). Trajanje ishemije, 40 minut, smo določili na podlagi začetnih poskusov s 45 minut trajajočo ishemijo, po kateri je večina src slabo okrevala in je bilo zato težko oceniti razlike med skupinami. Pri krajšem času ishemije od 40 minut so se fibrilacije pojavljale manj enakomerno. Za največjo oviro pri našem delu se je izkazala različna kondicija živali, saj so srca živali pri poskusih, ki smo jih opravili v največji poletni vročini (ko je bila zunanja temperatura 30–33 °C, temperatura v hlevčku pa 32–35 °C), kazala manj poškodb kot srca pri poskusih, opravljenih spomladi.

Spremljali smo naslednje spremenljivke: koronarni pretok, hitrost sproščanja LDH, LVP, frekvenco utripov srca in s pomočjo EKG trajanje prekatnih fibrilacij. Koronarni pretok je primerna spremenljivka za ugotavljanje vpliva hormonov na koronarne žile in njihove gladke mišične celice. Ostale spremenljivke odražajo dejavnost in celovitost srca, zato lahko prek sprememb le-teh ugotavljamo učinke spolnih hormonov neposredno na miokard.

Kontrolna skupina samic je kazala manj okvar pri nekaterih merjenih spremenljivkah kot kontrolna skupina samcev, kar je pokazalo, da je izbran model raziskave na podganah ustrezen za preučevanje delovanja spolnih hormonov na nastanek ishemičnih okvar. Dobili smo dovolj razlik med tretiranimi in netretiranimi skupinami, vendar se razlike niso pojavile pri vseh merjenih spremenljivkah.

Spolni hormoni lahko vplivajo na izid ishemične poškodbe preko genomskih in ne-genomskih mehanizmov (6, 12, 33, 45), katerih rezultat so spremembe koronarnega pretoka, nastajanja kisikovih prostih radikalov in varovalnega delovanja toplotnih stresnih proteinov na srčne miocite (5–7, 21, 25, 46).

Estrogeni sodelujejo pri več procesih, na primer pri ohranjanju kostne mase in zmanjševanju obolevnosti srca in ožilja pri ženskah (1, 45). Iz rezultatov, dobljenih pri poskusih *in vivo* in na izoliranih tkivih živali (1, 5, 6, 16), je razvidno, da estrogen zmanjša ishemične okvare srca, glede zaščitnih učinkov testosterona in progesterona pa avtorji niso enotni (35, 40, 47).

Raziskave učinkov estrogena na koronarni pretok pri izoliranem podganjem srcu, prašičjih in kunčjih koronarnih arterijah ter človeških gladkih mišičnih celicah so pokazale, da se koronarni pretok poviša zaradi posrednega in neposrednega vpliva na žilno steno (6, 12, 16, 17, 48, 49). Ugotavljajo, da tudi testosteron vpliva na koronarni pretok, vendar raziskave ugotavljajo tako ugodne kot neugodne učinke testosterona nanj. Pri naših poskusih smo ugotovili, da se koronarni pretok poviša pri skupinah z dodanimi hormonoma glede na ustrezni kontrolni skupini. Podobne rezultate so dobili tudi pri raziskavah *in vivo* pri ljudeh in podganah ter na koronarnih arterijah kuncev (35, 47, 50). Absolutne vrednosti koronarnega pretoka pri skupini samic z dodanim estradiolom so bile pred ishemijo nižje kot pri ostalih skupinah.

Estrogen in progesteron sodelujeta pri odzivu miocitov in prevodnega sistema na stres zaradi vročine ali ishemije. Receptorja obeh hormonov se lahko vežeta na stresni protein HSP 90 in s tem sprožita zaporedje reakcij (25). Stresni proteini, ki se v velikih

količinah sproščajo ob prisotnosti škodljivih dejavnikov, imajo pomembno vlogo tudi pri zaščiti celic med ishemijo. Posledica je lahko manjše pojavljanje aritmij in večja stabilnost struktur v miocitih.

Pri naših poskusih sta predhodno dodana estrogen in testosteron glede na kontrolni skupini skrajšala trajanje prekatnih fibrilacij, ki se značilno pojavljajo pri modelih poskusne ishemije/reperfuzije, vendar razlike niso bile značilne zaradi vključitve poskusov, ki so bili narejeni v poletni vročini, ko so srca bolj zaščitena. Značilne razlike pa so se pojavile pri poskusih, opravljenih pred poletno vročino. Antiaritmični učinek estrogena ugotavljajo tudi v drugih raziskavah (46). V literaturi ni opisanih antiaritmičnih učinkov testosterona.

V času reperfuzije se srčno tkivo dodatno okvari zaradi nastajanja velike količine kisikovih prostih radikalov, ki poškodujejo celične strukture (47, 51). Estrogen deluje zaščitno na KVS prek zvišanja koncentracije glutathiona in zmanjšanja količine prostih radikalov ter s tem omili reperfuzijske poškodbe (5, 21). Ker pri živalih androgensko zdravljenje zavira nastanek aterosklerotičnih leh (35), v katerih imajo vlogo tudi prosti radikali (47), bi lahko posredno sklepali na možen antioksidacijski učinek testosterona, vendar le-ta še ni dokazan.

V naši raziskavi smo merili stopnjo sproščanja LDH, ki je pokazatelj ishemične/reperfuzijske okvare srčnih mišičnih celic. Težnjo po zmanjšanju sproščene LDH glede na kontrolno skupino je kazal le estradiol, vendar so se značilne razlike pojavile le med skupino z dodanim estradiolom in skupino samic po kotitvi, ki je kazala najvišjo stopnjo sproščanja LDH. Ker testosteron ni zmanjšal sproščanja LDH glede na ustrezno kontrolno skupino, ugotavljamo, da androgeni ne delujejo zaščitno neposredno na miokard.

Med skupinami ni bilo značilnih razlik v moči krčitev srca (LVP). Pokazala se je le težnja po zmanjšanju LVP pri skupini z estrogenom glede na kontrolno skupino samic. Naši poskusi so pokazali najnižje reperfuzijske vrednosti LVP v skupini po kotitvi, kar se ujema z rezultati drugih raziskav, ki ugotavljajo zaviralni učinek progesterona na moč krčitev (40, 43).

Med poskusi smo merili tudi frekvenco srčnega utripa. Značilno višja frekvenca v času reperfuzije se je pojavila pri skupini samic po kotitvi glede na ostali skupini samic. Pokazala se je tudi težnja po zvišanju srčne frekvence v skupini samcev s testosteronom glede na kontrolno skupino samcev.

S poskusi na samicah po kotitvi smo želeli ugotavljati vpliv spremenjenega hormonskega statusa brejih samic (zvišani koncentraciji estrogena in predvsem progesterona) na ishemične okvare srca (4).

Skupina samic po kotitvi je imela najvišje reperfuzijske vrednosti frekvence srčnega utripa in sproščanja LDH in najnižje vrednosti LVP, vrednosti koronarnega pretoka pa so bile ves čas reperfuzije neke vmes med skupino samic z dodanim estradiolom in kontrolno skupino samic. Iz dobljenih rezultatov ugotavljamo, da progesteron zmanjšuje moč krčitev srca, kar kažejo tudi druge raziskave (40, 43). Delovanje progesterona na koronarni pretok ni povsem raziskano. Možna je interakcija progesterona z AR in ER in prek tega zaviranje učinkov estrogena (39). Tako bi lahko razložili vrednosti koronarnega pretoka v naši raziskavi, ki so bile sicer višje od vrednosti v kontrolni skupini samic, vendar nižje od vrednosti pri skupini z dodanim estradiolom. Progesteron sodeluje v odzivnosti srca na stres (25), toda v naši raziskavi zaščitnih učinkov na miokard nismo ugotovili. Zaradi možnih medsebojnih delovanj med posameznimi spolnimi hormoni je model samic po kotitvi manj primeren za ugotavljanje učinkov progesterona na ishemične poškodbe srca.

ZAKLJUČEK

Iz rezultatov naše raziskave ugotavljamo, da subkronično tretiranje podgan z estradiolom in testosteronom izzove zaščitne učinke v srcih živali ustreznega spola, ki so v veliki meri posledica posrednega delovanja hormonov na koronarno žilje in se izražajo kot izboljšan koronarni pretok v reperfuziji. Manjši del zaščitnega delovanja predvsem preko ER predstavljajo mehanizmi zaščite neposredno v miokardu, verjetno prek interakcije s HSP in prek antioksidacijskih učinkov, kar se kaže z zmanjšano stopnjo sproščanja LDH in s krajšim trajanjem prekatnih fibrilacij med reperfuzijo.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo mentorici prof. dr. Metki V. Budihna, somentorju dr. Gorazdu Drevišku ter Petri Ponebšek za vso pomoč in spodbudo.

LITERATURA

1. Fraser H, Davidge ST, Clanachan AS. Activation of Ca(2+)-independent nitric oxide synthase by 17beta-estradiol in post-ischemic rat heart. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 111-8.
2. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic pathology. W. B. Saunders Company 1997: 4-11, 310-7.
3. Ribarič S, Bresjanac M, Črne - Finderle N, et al. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. *Inštitut za patološko fiziologijo* 1998: 15-45.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Pharmacology. *Churchill Livingstone* 1999: 436-46.
5. Zhai P, Eurell TE, Cooke PS, Lubahn DB, Gross DR. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-a knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1640-7.
6. Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 28-49.
7. Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 337-43.
8. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997; 416: 107-12.
9. Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender JR. Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *J Biol Chem* 2000; 275: 5026-30.
10. Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 307-14.
11. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 1998; 156: R1-7.
12. Li HY, Bian JS, Kwan YW, Wong TM. Enhanced responses to 17beta-estradiol in rat hearts treated with isoproterenol: involvement of a cyclic AMP-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Therap* 2000; 293: 592-8.
13. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension* 1998; 31: 522-8.
14. Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J. Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2000; 84: 695-700.
15. Oian P, Osterud B. Monocyte-platelet function and protection against cardiovascular disease. *Maturitas* 1996; 23 Suppl: S57-60.
16. Aune B, Oian P, Omsjo I, Osterud B. Hormone replacement therapy reduces the reactivity of monocytes and platelets in whole blood-a beneficial effect on atherogenesis and thrombus formation? *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1816-20.
17. Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2766-75.
18. Scarbelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, et al. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104: 253-6.
19. Sugden PH, Clerk A. Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease. *Circ Res* 2001; 88: 975-7.
20. Lee HW, Eghbali-Webb M. Estrogen enhances proliferative capacity of cardiac fibroblasts by estrogen receptor- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1359-68.
21. Kim YD, Farhat MY, Myers AK, Kouretas P, DeGroot KW, Pacquing A, et al. 17-Beta estradiol regulation of myocardial glutathione and its role in protection against myocardial stunning in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 457-65.
22. Wattanapernpool J, Riabroy T, Preawnim S. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sci* 2000; 66: 533-43.
23. Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK, Terzic A. Low concentrations of 17beta-estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca²⁺ loading. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 948-52.
24. Ziegelhoffer A, Dzurba A, Vrbjar N, Styk J, Slezak J. Mechanism of action of estradiol on sodium pump in sarcolemma from the myocardium. *Bratisl Lek Listy* 1990; 91: 902-10.

25. Knowlton AA, Sun L. Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H455-64.
26. Rollerova E, Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function. *Endocr Regul* 2000; 34: 203-18.
27. Drouin J, Sun YL, Tremblay S, Lavender P, Schmidt TJ, de Lean A, et al. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1299-309.
28. Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Litwack G. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* 1997; 7: 85-98.
29. Kacimi R, Chentoufi J, Honbo N, Long CS, Karliner JS. Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 139-50.
30. Nanasi PP, Jednakovits A. Multilateral in vivo and in vitro protective effects of the novel heat shock protein coinducer, bimoclomol: results of preclinical studies. *Cardiovasc Drug Rev* 2001; 19: 133-51.
31. Devin-Leclerc J, Meng X, Delahaye F, Leclerc P, Baulieu EE, Catelli MG. Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 842-54.
32. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; 98: 256-61.
33. Sheridan PJ, McGill HC Jr, Aufdemorte TB, Triplett RG, Holt RG. Heart contains receptors for dihydrotestosterone but not testosterone: possible role in the sex differential in coronary heart disease. *Anat Rec* 1989; 223: 414-9.
34. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 41: 1-15.
35. Pugh PJ, English KM, Jones TH, Channer KS. Testosterone: a natural tonic for the failing heart? *Q J Med* 2000; 93: 689-94.
36. Winkler UH. Effects of androgens on haemostasis. *Maturitas* 1996; 24: 147-55.
37. Pluciennik F, Verrecchia F, Bastide B, Herve JC, Joffre M, Deleze J. Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J Membr Biol* 1996; 149: 169-77.
38. Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, et al. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol* 2001; 187: 90-5.
39. Croston GE, Milan LB, Marschke KB, Reichman M, Briggs MR. Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinology* 1997; 138: 3779-86.
40. Raddino R, Poli E, Pela G, Manca C. Action of steroid sex hormones on the isolated rabbit heart. *Pharmacology* 1989; 38: 185-90.
41. Roesch DM, Keller-Wood M. Progesterone rapidly reduces arterial pressure in ewes. *Am J Physiol* 1997; 272: H386-91.
42. Jacob MK, White RE. Diazepam, gamma-aminobutyric acid, and progesterone open K(+) channels in myocytes from coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 2000; 403: 209-19.
43. Temma K, Ng YC, Brody TM, Akera T. Effect of progesterone derivatives on sodium pump activity and force of myocardial contraction in isolated guinea pig heart. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1987; 41: 51-63.
44. Wroblewski F, LaDue J. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 90: 210-3.
45. Macgregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998; 20: 151-96.
46. McH McHugh NA, Merrill GF, Powell SR. Estrogen diminishes posts ischemic hydroxyl radical production. *Am J Physiol* 1998; 274: H1950-4.
47. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 1999; 100: 1690-6.
48. Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP. Chronic 17 β -estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation* 2000; 102: 445-51.
49. Farhat MY, Abi-Younes S, Ramwell PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 571-6.
50. Yue Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995; 91: 1154-60.
51. Ceballos G, Figueroa L, Rubio I, Gallo G, Garcia A, Martinez A, et al. Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33: 691-7.