

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0607**

**Dynamika srdcového poškodenia: úloha nekroptotickej bunkovej smrti a prežívania kardiomyocytov.**

Zodpovedný riešiteľ **prof. PharmDr. Adriana Duriš Adameová, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Farmaceutická fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta - hlavný riešiteľ  
Slovenská Akadémia vied, Centrum experimentálnej medicíny  
Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a.s. Bratislava

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Semmelweis University in Budapest, Hungary  
University in Bristol, UK,  
Česká akadémia vied, Czechia,  
St. Boniface Research Centre, Asper Institute in Winnipeg, Canada,  
University of Nebraska Medical Center, USA  
International Academy of Cardiovascular Science (IACS), Canada

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

NA

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Publikácie:

1. Adameova A, Goncalvesova E, Szobi A, and Dhalla NS. Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. Heart Fail Rev 21: 213-221, 2016.
2. Adameova A, Hrdlicka J, Szobi A, Farkasova V, Kopaskova K, Murarikova M, Neckar J, Kolar F, Ravingerova T, and Dhalla NS. Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults. Can J Physiol Pharmacol 95: 1163-1169, 2017.
3. Adameova A, Shah AK, Dhalla NS. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Ventricular Arrhythmias. Int J Mol Sci. 21: 4200, 2020.
4. Davidson SM, Adameova A, Barile L, Cabrera-Fuentes HA, Lazou A, Pagliaro P, Stenslokken KO, Garcia-Dorado D, and Action E-CC. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. J Cell Mol Med 24: 3795-3806, 2020.
5. Lichy M, Szobi A, Hrdlicka J, Horvath C, Kormanova V, Rajtik T, Neckar J, Kolar F, and Adameova A. Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation. J Cell Mol Med 23: 6429-6441, 2019.
6. Lichy M, Szobi A, Hrdlicka J, Neckar J, Kolar F, and Adameova A. Programmed Cell

Death in the Left and Right Ventricle of the Late Phase of Post-Infarction Heart Failure. *Int J Mol Sci* 21: 2020.

7. Mikus P, Pecher D, Rauova D, Horvath C, Szobi A, and Adameova A. Determination of Novel Highly Effective Necrostatin Nec-1s in Rat Plasma by High Performance Liquid Chromatography Hyphenated with Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules* 23: 2018.

8. Mishra PK, Adameova A, Hill JA, Baines CP, Kang PM, Downey J, Narula J, Takahashi M, Abbate A, Pirstine HC, Kar S, Su S, Higa JK, Kawasaki NK, and Matsui T. Guidelines for evaluating myocardial cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019.

9. Rajtik T, Goncalvesova E, Varga ZV, Leszek P, Kusmierczyk M, Hulman M, Kyselovic J, Ferdinandy P, Adameova A. Posttranslational modifications of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  and its downstream signaling in human failing hearts. *Am J Transl Res.* 2017 Aug 15;9(8):3573-3585. eCollection 2017.

10. Tappia PS, Adameova A, Dhalla NS. Attenuation of Diabetes-induced Cardiac and Subcellular Defects by Sulphur-containing Amino Acids. *Curr Med Chem.* 2018 Jan 30;25(3):336-345.

11. Ravingerova T, Kindernay L, Bartekova M, Ferko M, Adameova A, Zohdi V, Bernatova I, Ferenczyova K, and Lazou A. The Molecular Mechanisms of Iron Metabolism and Its Role in Cardiac Dysfunction and Cardioprotection. *Int J Mol Sci* 21: 2020.

12. Ravingerova T, Farkasova V, Griecsova L, Murarikova M, Carnicka S, Lonek L, Ferko M, Slezak J, Zalesak M, Adameova A, Khandelwal VKM, Lazou A, and Kolar F. Noninvasive approach to mend the broken heart: Is "remote conditioning" a promising strategy for application in humans? *Can J Physiol Pharmacol* 95: 1204-1212, 2017.

13. Szobi A, Farkasova-Ledvenyiova V, Lichy M, Murarikova M, Carnicka S, Ravingerova T, and Adameova A. Cardioprotection of ischaemic preconditioning is associated with inhibition of translocation of MLKL within the plasma membrane. *J Cell Mol Med* 22: 4183-4196, 2018.

14. Szobi A, Lichy M, Carnicka S, Pancza D, Svec P, Ravingerova T, and Adameova A. Pleiotropic Effects of Simvastatin on Some Calcium Regulatory and Myofibrillar Proteins in Ischemic/Reperfused Heart: Causality of Statins Cardioprotection? *Curr Pharm Des* 22: 6451-6458, 2016.

15. Szobi A, Rajtik T, and Adameova A. Effects of necrostatin-1, an inhibitor of necroptosis, and its inactive analogue Nec-1i on basal cardiovascular function. *Physiol Res* 65: 861-865, 2016.

16. Szobi A, Gonçavesová E, Varga ZV, Leszek P, Kuśmierczyk M, Hulman M, Kyselovič J, Ferdinandy P, Adameová A. Analysis of necroptotic proteins in failing human hearts. *J Transl Med.* 2017 Apr 28;15(1):86.

17. Horvath A, Szobi A, Ravingerova T, and Adameova A. A comparative study of RIP1 inhibitors: pleiotropic with cell death not associated effects of RIP1? *Mol Cell Biochem*, v revíznom konaní, Major revision

18. Szabolcs Hambalkó, Csilla Pelyhe, Csenger Kovácsházi, Bence Kenyeres, Bernadett Kiss, Bence Ágg, Éva Ságh, Tamás Gergely, Bennet Weber, András Makkos, Gábor B Brenner, Tímea Komlódi, László Tretter, Csaba Horváth, Izabela Jarabíková, Adriana Adameová, Anikó Görbe, Attila Oláh, Tamas Radovits, Zoltán V. Varga, Béla Mekerly, Gary F. Baxter, Rainer Schulz, Péter Ferdinandy and Zoltán Giricz. Reduction in cardiac mitochondrial ROS production by MAO-B inhibition is blunted in moderate obesity. *FRBM*, v revíznom konaní

Pozvané prednášky:

Adameova A: Necroptosis in diseased heart. IACS North American Section Meeting, 22-25. september, 2016, Sherbrooke, Kanada

Adameova A: Nekroptóza – moderné vnímanie odumierania buniek srdca? Komisia experimentálnej kardiológie, 17-19. 10. 2016, Stará Lesná, Slovensko

Adameova A: the 5th conference of IACS-ES - Advances in cardiovascular research: from basic mechanisms to therapeutic strategies, 23-26. máj, 2018, Smolenice, Slovakia

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Projekt bol inovatívny z viacerých hľadísk. Riešil tému - nekroptózu, o ktorej v srdcovom tkanive nebolo takmer nič známe a tiež bol významný z hľadiska použitých molekulárnych metód, rôznorodých metodík štúdií (in vitro, in vivo, ex vivo), použitia ľudských vzoriek, princípov translačnej medicíny a pod.. Mal ambície popísať signalizáciu nekroptózy v

určitých ochoreniach srdca a tak poukázať na úlohu dôležitých proteínov, ktoré by mohli byť farmakologicky ovplyvniteľné. Tieto ambície boli naplnené a teda dá sa konštatovať, že výsledky majú široké uplatnenie, t.j. prispievajú k pochopeniu nekroptotickej bunkovej smrti v srdci ako aj k porozumeniu patogenézy mnohých srdcových ochorení. Rovnako možno konštatovať, že projekt prispel k tvorbe medzinárodného metodického listu - guideline pre hodnotenie bunkovej smrti v srdci, podľa ktorého by mali postupovať všetky laboratória zaoberajúce sa detekciou bunkovej smrti v srdci, čím sa zabezpečí rigidita a dobrá reprodukcia, homogenita výsledkov. Projekt tiež poukázal na viacero aspektov farmakologického ovplyvnenia proteínov asociovaných s nekroptózou. Ich identifikácia naznačila, ktoré konkrétne miesta nekroptotickej signalizácie je možné inhibovať s cieľom limitácie poškodenia srdca, prípadne naopak potenciovat' s cieľom navodenia kardioprotekcie. Jedná sa o i) naznačenie úlohy RIP1 pri regulácii excitačno-kontrakčného prepojenia a oxidačného stresu v srdci, ii) úlohy RIP3 pri mitochondriálnej regulácii, iii) a poukázanie na duálnu úlohu RIP3 pri exekúcii nekroptózy a zápalu. Z terapeutického hľadiska by látky - potenciálne liečivá, ktoré aktivujú RIP1 mohli byť použité pri stavoch asociovaných s poklesom tlaku krvi a oslabenej kontraktilite srdca, zatiaľčo látky inhibujúce RIP3 by mohli priniesť viacero benefitov v terapii srdcového zlyhávania, fibrilácii predsiení, ischemickej choroby srdca a pod. Vzhľadom na pôsobenie RIP3 je možné predpokladať, že z terapeutického hľadiska by v prípade inhibície tejto kinázy mohlo ísť o moduláciu zápalu, fibrózy a následnej kontraktilnej dysfunkcie a remodelácie. V súvislosti s RIP1 je možné tiež poznamenať, že projekt bol prínosom aj z hľadiska zadefinovania farmakokinetických vlastností RIP1 inhibítora, čo umožňuje správne stanovenie terapeutického dizajnu a zhodnotenie dávkovacieho režimu za účelom zabezpečenia potrebnej ustálenej koncentrácie tejto látky.

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Nekroptóza sa môže významnou mierou podieľať na vývoji zlyhávajúceho srdca rôznej etiológie. Jej kanonická RIP1-RIP3-MLKL signalizácia je zaznamenaná v infarktovej zóne srdca s post-ischemickou kardiomyopatiou, avšak v neinfarktovej zóne nedochádza k exekúcii nekroptózy, iba k RIP3-asociovanému zápalu. Táto kináza teda pôsobí duálne v rôznych častiach takto postihnutého srdca a tým môže podčiarknuť aj vznik rôznych fenotypov. Zdá sa, že v srdciach s postischemickou kardiomyopatiou neexistuje pozitívna ani negatívna asociácia medzi nekroptózou a autofágiou, a že apoptóza nie je majoritnou formou bunkovej smrti, čo zdôrazňuje význam nekroptózy a možnosti farmakologických intervencií na úrovni RIP3 inhibície. Tento prístup má predovšetkým vplyv na limitáciu poškodenia plazmatickej membrány buniek srdca a nie na mitochondriálnu dynamiku. V srdciach adaptovaných na ischemické ataky (ischemický preconditioning - IPC) môže byť kardioprotekcia spôsobená limitáciou nekroptózy - nedochádza k translokácii MLKL, hlavného cytotoxického proteínu, do plazmatickej membrány. Tieto účinky IPC sú porovnateľné s účinkami inhibítora nekroptózy – RIP1 inhibítora látky Nec-1s, avšak presný mechanizmus ich kardioprotektívneho pôsobenia môže byť rozdielny a môže zahŕňať aktiváciu CaMKII, vplyv na tvorbu nekrozómu a pod.. Uvedená kináza má pleiotropné pôsobenie, vedie k modulácii excitácie a kontrakcie kardiomyocytov a má vzťah k oxidačnému stresu, čo naznačuje vnútrobunkové prepojenie nekroptotických a s bunkovou smrťou neasociovaných dráh a teda aj nenekroptotický vplyv RIP1 na mechanickú funkciu srdca.

#### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

Necroptosis plays a significant role in the development of failing heart of various etiologies. Its canonical RIP1-RIP3-MLKL signaling has been found in the infarct zone of hearts with post-ischemic cardiomyopathy, while RIP3-associated inflammation without execution of necroptosis is documented in the non-infarct zone. Thus, this kinase acts dually in different parts of such injured heart and may underline different phenotypes. In addition, in hearts with post-ischemic cardiomyopathy, neither positive nor negative association between necroptosis and autophagy exists, and apoptosis is unlikely the major form of cell death, highlighting the importance of necroptosis and the possibility of pharmacological interventions targeting RIP3. In particular, RIP3 inhibition seems to possess effects on

limiting the cellular damage at the level of the plasma membrane disruption and not on mitochondrial dynamics. In hearts adapted on ischemia (ischemic preconditioning - IPC), cardioprotection may be due to a limitation of necroptosis - there is no translocation of MLKL, the major cytotoxic protein, into the plasma membrane. These effects of IPC are comparable to those of the necroptosis inhibitor RIP1 inhibitor Nec-1s, but the exact mechanism of their cardioprotective action may be different and may include CaMKII activation, influence on necrosome formation, etc. This kinase has also been suggested to have pleiotropic action, to modulate excitation and contraction as well as oxidative stress in cardiomyocytes, suggesting intracellular interconnection of particular necroptotic and non-cell death associated pathways and thus the non-necroptotic effects of RIP1 on mechanical function of the heart.