Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Pohlavní rozdíly v apoptóze v myokardu u pacientů po transplantaci srdce

MUDr. Michal Smetana

2018

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor**:**

Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady:

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školicí pracoviště:

Klinika kardiovaskulární chirurgie IKEM Praha

Školitel:

doc. MUDr. Ondrej Szárszoi, PhD.

Souhrn

Pohlavní rozdíly v apoptóze v myokardu u pacientů po transplantaci srdce

Úvod: Mnoho metabolických i strukturálních funkcí kardiovaskulárního systému je ovlivněno pohlavím jedince. Cílem naší práce bylo zjistit citlivost dárcovského ženského a mužského myokardu k perioperační ischémii, jak organizmus ovlivňuje dárcovský myokard druhého pohlaví (sledovaným faktorem byla apoptóza) po transplantaci srdce a zda sledované biomarkery mohou predikovat primární selhání srdečního štěpu (PGD**). Materiál a metodika:** Výzkum byl rozdělen do třech prospektivních studií. Studie 1 zahrnovala 81 pacientů, kteří podstoupili transplantaci srdce od září 2010 do ledna 2013 a byli rozděleni do dvou skupin podle pohlaví dárce. K průkazu myokardiální nekrózy jsme použili metodu „high sensitive cardiac TnT" (hs-cTnT). Apoptóza byla stanovována imunohistochemickou detekcí kaspázy-3, Bcl-2 a metodou TUNEL z bioptických vzorků. Studie 2 zahrnovala 58 pacientů rozdělených do čtyř skupin podle pohlaví příjemce a dárce. Během dvouletého sledování byla analyzována apoptóza (kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL) v jednotlivých skupinách. Ve Studii 3 bylo 64 pacientů. Pomocí uvedených biomarkerů jsme zjišťovali souvislost s rozvojem PGD po transplantaci. **Výsledky:** U dárců ženského pohlaví byla hladina hs-cTnT významně vyšší již před transplantací (P=0,025). Hladiny hs-cTnT byly významně vyšší i po transplantaci ve skupině s ženskými allografty. Ve Studii 2 nebyly významné rozdíly mezi skupinami v expresi kaspázy-3, Bcl-2 a četnosti TUNEL pozitivních buněk. Ve všech skupinách jsme pozorovali významný nárůst apoptózy detekované metodou TUNEL oproti předoperačním hodnotám (P<0,001). V souboru pacientů ve Studii 3 se u osmi (14%) pacientů rozvinulo PGD. Nezjistili jsme rozdíly mezi skupinou pacientů s PGD a bez PGD v plazmatických hladinách hs-cTnT, ani v apoptóze. **Závěr:** U dárců srdce ženského pohlaví jsme zjistili větší nekrotické poškození myokardu. Při dvouletém sledování apoptózy v transplantovaných srdcích jsme nepozorovali rozdíly v závislosti na pohlaví příjemce a dárce. Sledované biomarkery není možné jednoznačně použít jako prediktory PGD.

Klíčová slova: Transplantace srdce, apoptóza, pohlavní rozdíly

Summary

Gender differences in myocardial apoptosis of the patients after heart transplantation

Background: Many functions of the cardiovascular apparatus are influenced by gender. The aim of our study was to find out the sensitivity to perioperative ischemia of the donor female and male myocardium; and determine how the organism affects the donor myocardium of the other sex after heart transplantation (apoptosis was monitored), and whether the investigated biomarkers can predict primary graft dysfunction (PGD). **Methods:** The research was divided into three prospective studies. The Study 1 included 81 patients undergoing heart transplantation from September 2010 to January 2013. Patients were divided into two groups according to male allograft and female allograft. In order to prove myocardial necrosis the high-sensitive cardiac troponin T (hs-cTnT) method was used. Apoptosis was determined by immunohistochemical detection of caspase-3, Bcl-2 and by the TUNEL method as apoptosis markers. The Study 2 includeded 58 patients divided into four groups according to gender; both of the recipient and the donor. Apoptosis (caspase-3, Bcl-2, TUNEL) was analysed in these groups during the two-year follow-up. Into Study 3 64 patients were involved. We investigated the relationship in between these biomarkers and the development of PGD after transplantation. **Results:** We observed a significantly higher level of hs-cTnT in female donors before transplantation (P=0,025); as well as in the female allograft group after transplantation throughout the monitored period. In the Study 2, there were no differences in apoptosis between the groups. All groups showed a significant increase of TUNEL-positive myocytes after transplantation (P<0,001). In the third study, 14 % of transplant recipients developed PGD. We did not find differences between the groups in regard to hs-cTnT serum levels. There were also no differences in apoptosis between PGD and without PGD groups. **Conclusions:** We found out greater necrotic damage of the myocardium of female donors. During the two year period of time, we observed no differences in apoptosis in transplanted hearts which could be attributed to gender of the recipient and the donor. The monitored biomarkers were not PGD predictors.
Key words: Heart transplantation, apoptosis, gender differences

Obsah

1. **ÚVOD** 6
2. **HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE** 7
2.1. Dílčí cíle práce 7
3. **METODIKA A VÝSLEDKY** 8
3.1. Stanovení vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT) 8
3.2. Detekce apoptózy 8
3.3. **Studie 1** 9
3.3.1. Pacienti a sběr dat 9
3.3.2. Výsledky Studie 1 10
3.4. **Studie 2** 12
3.4.1. Pacienti a sběr dat 12
3.4.2. Výsledky Studie 2 12
3.5. **Studie 3** 14
3.5.1. Pacienti a sběr dat 14
3.5.2. Výsledky Studie 3 14
4. **DISKUZE** 15
5. **ZÁVĚR** 19
6. **POUŽITÁ LITERATURA** 20
7. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA 22

1. Úvod

Celosvětově počet pacientů se srdečním selháním roste. Konečné stadium srdečního selhání je spojeno s významnou morbiditou, sníženou kvalitou života a mortalitou. Transplantace srdce je nejúčinnější léčbou terminální fáze srdečního selhání. V České republice je provedeno 6 až 7 srdečních transplantací na 1 000 000 obyvatel za rok (Pirk a spol. 2008). Obrovské pokroky v oblasti imunosuprese zásadně zlepšily výsledy této léčby. Největším problémem současné transplantologie je nedostatek vhodných dárců. Proto je kladen velký důraz na zefektivnění a zpřesnění dárcovského programu. Snaha zajistit vhodný srdeční štěp s pravděpodobností dlouhodobě dobré funkce se stává jedním s nosných programů transplantační medicíny (Lund a spol. 2017).

Vzhledem k tomu, že transplantace srdce je akutním výkonem, není často pohlaví příjemce shodné s pohlavím dárce získaného štěpu. A tak se v praxi relativně běžně setkáváme s pacienty, jimž bylo transplantováno srdce jiného pohlaví.

Nyní je již dobře známo, že pohlaví ovlivňuje řadu onemocnění. Ženy jsou více ohroženy např. depresemi, osteoporózou, astmatem, kuřáckým karcinomem plic a autoimunními chorobami (Leinwand 2003). Dále je u žen častější výskyt některých chorob pojivové tkáně či nemocí, jejichž podkladem je abnormální reaktivita cév, jako jsou migrény nebo Raynaudův syndrom; častější jsou u žen i vaskulitidy (Mathur a spol. 2015). Z klinických i experimentálních pozorování vyplývá, že kardiovaskulární aparát je systémem, kde se pohlavní dimorfismus uplatňuje výraznou měrou (Regitz-Zagrosek 2006). Obecně je mužská populace ve stejné věkové kategorii více ohrožena než populace ženská před nástupem menopauzy. Toto srovnání platí nejenom pro ICHS, ale i pro další kardiovaskulárních onemocnění jako jsou arteriální hypertenze, arytmie a srdeční selhání (Vaccarino a spol. 1995, Dubey a spol. 2002, Duwall 2003, Roger a spol. 2011). Pohlavní odlišnosti v kardiovaskulárním systému jsou však patrné u normálních jedinců již za fyziologických podmínek. Srdeční frekvence u žen je o 3-5 tepů za minutu rychlejší než u mužů, délka sinusového cyklu je kratší (Burke a spol. 1997) a krevní tlak je do menopauzy taky nižší o 6-7 mmHg (Dubey a spol. 2002). Můžeme je pozorovat např. v hmotnosti srdce, která se v dětství u chlapců a děvčat prakticky neliší. Nástupem puberty dochází k nárůstu absolutní i relativní hmotnosti srdce u mužů, rozdíl může dosáhnout 15-30%. Stárnutím se však relativní hmotnost srdce u mužů opět snižuje, zatímco u žen zůstává konstantní (Olivetti a spol. 1995), což souvisí i s počtem myocytů v srdci. Startovní počet myocytů se u obou pohlaví neliší. Avšak zatímco u žen se počet myocytů prakticky nemění, u mužů dochází mezi
17. a a 89. rokem života k úbytku myocytů o 64 milionů/rok (Olivetti a spol., 1995). Zde se nesporně uplatňuje i odlišnost v přítomnosti apoptózy. Četnost výskytu tohoto procesu byla sledována na normálních lidských srdcích různého stáří v myokardu (Mallat a spol., 2001) i ve stěně koronárních arterií (Boddaert a spol., 2005). U obou sledování došli autoři k poznatku, že výskyt tohoto typu buněčné smrti je u mužů 3x vyšší než u žen; věk jedinců tento poměr neovlivnil. Ztráta buněčné tkáně je u mužů kompenzována zvětšováním přežívajících myocytů, což znamená, že hypertrofický růst je u nich podstatně vyšší. Tuto představu podporuje pozorování Zhanga a spol. (2007), který na příčných řezech myocytů různě starých opic zjistil, že zatímco u samců dochází ke zvětšení o 51 %, pak u samic je

tento růst pouze 8 %. Pohlavní rozdíly pozorujeme také na subcelulární úrovni: rozdíly v množství beta-adrenergních receptorů, vápníkových kanálů L-typu, ryanodinových receptorů, proteinů Na^+ /Ca^{2+} výměníku, nebo metabolizmu mitochondrií (Ošťádal a spol., 2009). Liší se i mechanismus buněčné smrti; Guerra a spol. (1999) prokázali, že nekróza a apoptóza je v mužském selhávajícím myokardu 2x větší než v myokardu ženském. Apoptóza, energeticky dependentní programovaná smrt buňky, je přítomná v průběhu života ve všech orgánech. V srdci je přítomná jednak za fyziologických podmínek v průběhu stárnutí myokardu (Mallat a spol., 2001), jednak za patofyziologických podmínek jako je ischémie myokardu, srdeční selhání nebo rejekce u transplantovaného srdce (Chen a spol. 2002). I když existují ojedinělé studie zabývající se otázkou apoptózy v lidském myokardu u pacientů po transplantaci srdce při akutní rejekci (Koch a spol. 2008), které hodnotí vztah mezi stupněm rejekce a sérovými ukazateli apoptózy (Sanchéz a spol. 2012), neexistují zatím studie, které by porovnávaly rozdíly v odolnosti k ischémii u mužského a ženského dárcovského myokardu. Také doposud není nic známo o chování myokardu za nestandardních podmínek, jako je transplantace ženského srdce mužskému příjemci a naopak transplantace mužského srdce ženskému příjemci. Lze předpokládat, že výskyt i průběh apoptózy může být v těchto případech odlišný v porovnání s případy, kdy dárce i příjemce jsou stejného pohlaví.

Primární selhání srdečního štěpu (primary graft dysfunction – PGD) je život ohrožující komplikací po transplantaci srdce. I když patogeneze PGD je stále nejasná, ischemicko-reperfuzní poškození je považováno za hlavní faktor vyvolávající selhání myokardu po transplantaci (Iyer a spol. 2011). Nekróza i apoptóza přispívají ke ztrátě kardiomyocytů během ischemicko-reperfuzního poškození (Birks a spol. 2000), což může nakonec vést k PGD. Proto jsme si položili otázku, zda ukazatele buněčné smrti mohou predikovat PGD.

2. Hypotézy a cíle práce

Hypotéza: Chování ženského a mužského srdečního štěpu u pacientů po transplantaci srdce se výrazně liší v krátkodobém i dlouhodobém horizontu.

Cílem práce je přispět k objasnění patofyziologických pochodů probíhajících v dárcovském myokardu po transplantaci do těla příjemce opačného pohlaví.

2.1. Dílčí cíle práce

Na základě studia dostupných literárních údajů a zvážení naších metodických možností jsme si stanovili tyto jednotlivé cíle disertační práce:

i. Zjistit citlivost k ischémii u dárcovského mužského a ženského myokardu. Do jaké míry ovlivňuje apoptózu v časném pooperačním období ischémie štěpu a zda i za těchto podmínek (ochrana myokardu pomocí kardioplegie) se uplatňují pohlavní rozdíly v odolnosti k ischémii - Studie 1.
Hypotéza: Ženské srdce (srdeční štěp) je odolnější k ischemii než srdce mužské.

ii. Jak se bude chovat (sledovaným faktorem je apoptóza) mužské srdce v těle ženy a obráceně ženské srdce v těle muže u pacientů po transplantaci srdce - Studie 2.
Hypotéza: Ženský myokard podléhá apoptóze méně než myokard mužský.

iii. Zjistit, jestli markery buněčné smrti (nekrózy a apotózy) přítomné v dárcovském myokardu můžou predikovat primární selhání srdečního štěpu po transplantaci - Studie 3.
Hypotéza: Ukazatele buněčné smrti v dárcovském štěpu predikují selhání srdce po transplantaci.

3. Metodika a výsledky

V období od začátku září roku 2010 do konce ledna roku 2015 jsme u pacientů, kteří podstoupili ortotopickou transplantaci srdce v IKEM Praha, prováděli sběr krevních a bioptických vzorků. Podle charakteru studie byli pacienti zařazováni v daných časových obdobích do příslušných studií. Tyto studie spolu navzájem úzce souvisely a aplikované laboratorní a imunohistochemické metody byly pro všechny tři studie společné.

Výběr vhodných dárců se prováděl podle standardních doporučených postupů akceptovaných v IKEM Praha. Studie byla schválena etickou komisí, informovaný písemný souhlas byl získán od všech pacientů. Všichni pacienti byli léčeni podle současných platných doporučených postupů pro léčbu srdečního selhání a transplantaci srdce. Srdeční zástava a ochrana myokardu byla iniciována studenou krystaloidní kardioplegií St. Thomas (1500 ml, pH 7,4; 4-10 °C). Pro transport byl srdeční štěp rovněž uskladněn v tomto roztoku a obklopen ledem. Během operace byla ochrana srdečního štěpu zajištěna studenou krevní kardioplegií (4°C) opakující se v pravidelných intervalech po 20 minutách.

3.1. Stanovení vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT)

Byly analyzovány dva základní typy buněčné smrti buněk myokardu: nekróza a apoptóza. Preferovaným markerem ischemického postižení myokardu v klinické praxi je srdeční troponin, respektivě jeho kardiální izoforma (cTnT). Nedávný vývoj testu vysoce citlivého kardiálního troponinu T (hs-cTnT) umožňuje detekci velmi nízkých hladin cTnT. Proto jsme jej zvolili jako marker nekrotického poškození kardiomyocytu. Detekce hs-cTnT byla uskutečněna pomocí elektrochemiluminiscenčního imunostanovení „ECLIA“ na analyzátoru firmy Roche Cobas e411 (T hs STAT, Cobas e411,Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) podle doporučení výrobce v akreditované laboratoři.

3.2. Detekce apoptózy

Apoptóza byla analyzována z bioptických vzorků pravé komory srdeční. Přítomnost apoptózy byla hodnocena imunohistochemickou detekcí proapoptotických proteinů kaspázy-3 a antiapoptotických proteinů Bcl-2 a pomocí metody TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling).

Kaspáza-3 byla stanovována pomocí monoklonální protilátky (klon JHM 62, Novocastra, Leica Microsystems, UK) s použitím automatizovaného imunohistochemického

barvícího systému VENTANA BenchMark ULTRA (Tucson, AZ, USA) a detekční sady ultraView Universal DAB Detection Kit. Detekce aktivní kaspázy-3 a prokaspázy-3 ve Studii 3 byla provedena pomocí protilátky (clone 31A1067, Abcam, UK).

Imunohistochemická detekce Bcl-2 monoklonální protilátkou (klon 3.1, Novocastra, Leica Microsystems, UK) byla taktéž provedena použitím dvoustupňové nepřímé metody. Po doporučené přípravě vzorku byla aplikována primární protilátka (30 minut) a detekce protilátky byla prováděna pomocí *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) - univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králičí. V konečné fázi byly vzorky vizualizovány chromogenním substrátem Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System (Dako, Glostrup, Denmark) a kontrastně dobarveny Harrisovým hematoxylinem.

Průkaz apoptózy metodou TUNEL, kdy se enzymem terminální deoxynukleotidyl-transferázou (TdT) naváže na 3'OH konce dvouvláknových fragmentů DNA, typických pro apoptózu, označený deoxyuridintrifosfát (dUTP), byl proveden pomocí soupravy TUNEL peroxidase apoptosis detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

Konečné hodnocení vzorků všech uvedených imunohistochemických metod (kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL) bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu (Olympus BX41). Počet pozitivních buněk byl počítán v 10 zorných polích vysokého rozlišení (HPF – high power field) a pro statistickou analýzu byl použit průměrný počet pozitivních buněk na 1 HPF.

3.3. Studie 1

3.3.1. Pacienti a sběr dat

První studie zahrnovala 81 po sobě jdoucích pacientů, kteří podstoupili od září 2010 do ledna 2013 ortotopickou transplantaci srdce na našem pracovišti. Pacienti byli podle pohlaví dárce rozděleni do dvou skupin: mužský štěp (n = 49) a ženský štěp (n = 32). Vzorky krve pro stanovení hs-cTnT byly odebrány v předem určených intervalech: před otevřením perikardu u dárce a před provedením stereotomie u příjemce, 2h po transplantaci (2h po uvolnění příčné aortální svorky), 1. pooperační den (1. POD, 24h po uvolnění příčné aortální svorky), 3. POD a 7. POD.

V praxi se pro výběr vhodného dárce používá poměr hmotnostní mezi příjemcem a dárcem (rozdíl by neměl přesáhnout 20%). Je známo, že hmotnost jedince s velikostí srdce nemusí souviset, navíc se velikost a hmotnost srdce u mužů a žen liší (Ošťádal a spol. 2009). Abychom eliminovali zmíněné skutečnosti, přepočítali jsme naměřené hodnoty hs-TnT na jednotku hmotnosti srdeční tkáně. Vážení dárcovských srdcí během transplantace nebylo prakticky proveditelné, proto byla hmotnost obou srdečních komor vypočtena pomocí vzorců uvedených v literatuře. Pro levou komoru jsme použili následující rovnici: Masa myokardu levé komory (g) = $a \cdot$ výška ^{0,54} (m) $\cdot$ Hmotnost^{0,61} (kg). Při výpočtu hmotnosti LK u žen byla hodnota a = 6.82, u mužů a = 8.25. Pro výpočet hmotnosti pravé komory byl použit jiný vzorec: Masa myokardu pravé komory (g) = $a \cdot$ věk$^{-0,32}$ (roky) $\cdot$ výška ^{1,135} (m) $\cdot$ Hmotnost^{0,315} (kg), kde a = 10,59 pro ženy a 11,25 pro muže (Reed a spol. 2014).

Apoptóza byla hodnocena z bioptických vzorků odebraných přímou biopsií z pravé komory srdeční: před samotným odběrem dárcovského štěpu, dvacet minut po uvolnění příčné aortální svorky a jeden týden po transplantaci endomyokardiální biopsií (EMB).

3.3.2. Výsledky Studie 1

V základních demografických datech sledovaného souboru nebyly významné rozdíly mezi skupinou mužských a ženských dárců s výjimkou příčiny úmrtí; u ženských dárců byl vyšší výskyt intracerebrálních hemorhagií. Průměrná doba studené ischémie dárcovského srdce se u obou skupin významně nelišila: 146 ± 7,8 minut u skupiny s mužským štěpem a 141 ± 9,0 minut u skupiny se ženským allograftem. Jediným rozdílem v demografických datech mezi skupinami příjemců byl větší počet pacientů v terminálním stádiu onemocnění některé ze srdečních chlopní ve skupině příjemců ženského allograftu.

Před transplantací byla plazmatická koncentrace hs-cTnT přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně signifikantně vyšší u dárců ženského pohlaví: 2,6 [0,2 - 7,2] vs. 1,4 [0,8 - 3,3], P=0,025 (graf č. 1). V markerech apoptózy (Bcl-2, kaspáza-3, TUNEL) v dárcovském srdci před transplantací nebyly rozdíly mezi oběma skupinami.

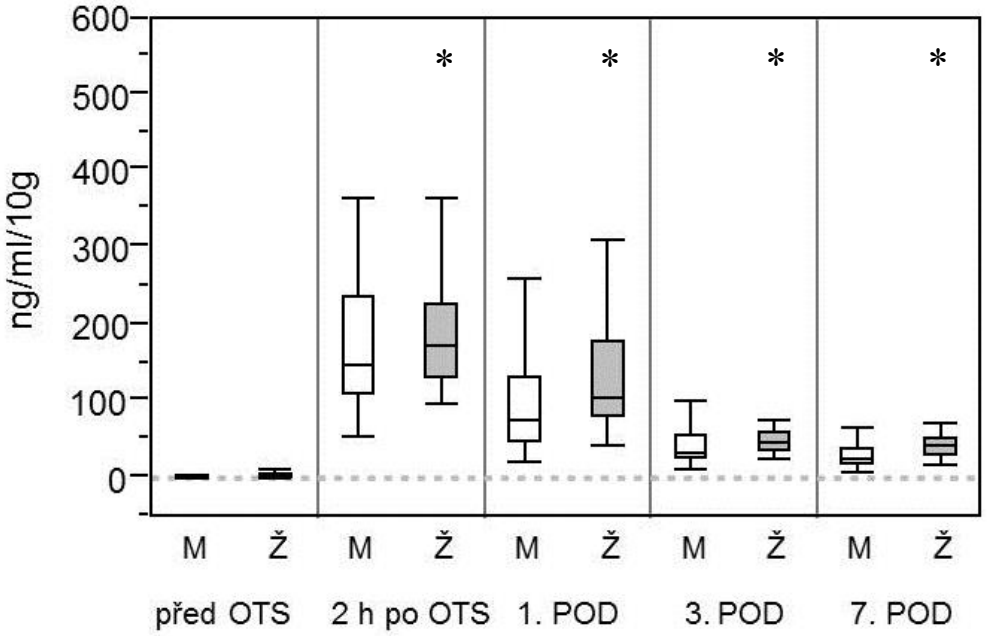
*Graf č. 1. Plazmatická koncentrace high-sensitive troponinu T (hs-TnT) přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u dárce srdce před transplantací. *P=0,025 ženy vs. muži.*

V celém sledovaném období po transplantaci jsme pozorovali významně vyšší plazmatické koncentrace troponinu T přepočtené na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u srdcí od ženských dárců: dvě hodiny po OTS 172,4 [130,4 - 228,6] vs. 148,2 [109,3 - 237,6], P=0,039; 24 hodin po OTS 106,9 [79,7 - 181,9] vs. 76,7 [47,2 -135,0], P=0,007; třetí den po OTS 47,9 [36,4 - 61,9] vs. 34,6 [25,0 -57,2], P=0,019; týden po OTS 43,6 [29,8 - 56,4] vs. 26,6 [20,1 - 39,6], P<0,001. Největšího rozdílu mezi skupinami bylo dosaženo 24 hodin po ukončení ischémie srdečního štěpu a týden po transplantaci (graf č. 2).

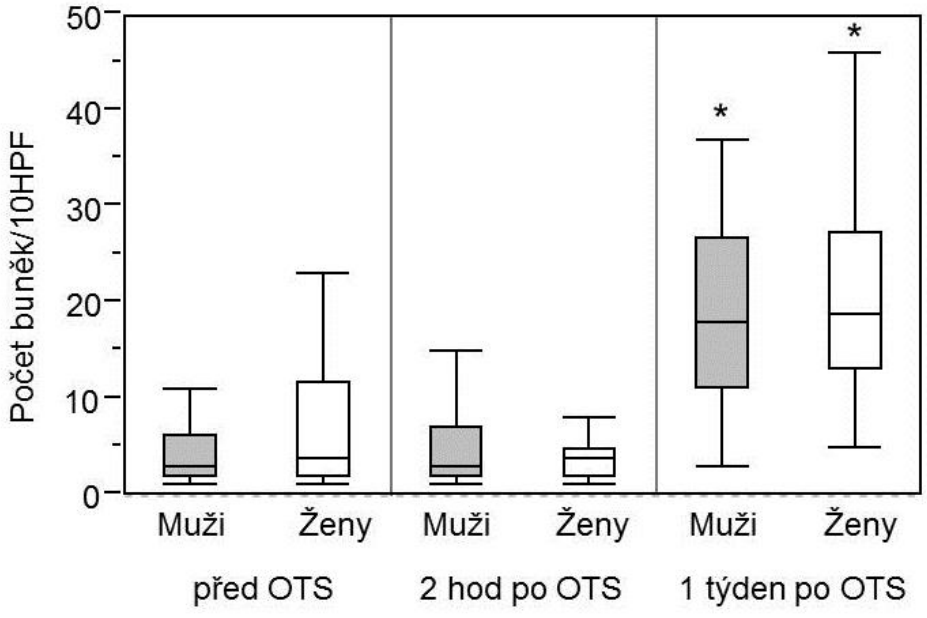
Při detekci apoptózy metodou TUNEL jsme pozorovali významně vyšší počet TUNEL pozitivních myocytů v dárcovských srdcích obou pohlaví 7 dní po transplantaci ve srovnání s počtem před transplantací: mužské allografty 18,0 [11,0 – 27,0] vs 3,0 [2,0 – 6,3], P<0,001; ženské allografty 19,0 [13,0 – 27,5] vs. 4,0 [2,0 – 12,0], P<0,001; rozdíl v počtu TUNEL pozitivních myocytů (obrázek č. 11) mezi mužskými a ženskými allografty v průběhu sledování nebyl pozorován (graf č. 3).

Ve sledovaném období jsme nenalezli rozdíly v expresi kaspázy-3 a Bcl-2 v srdcích od ženských a mužských dárců před a po transplantaci.

*Graf č. 2. Plazmatická koncentrace high-sensitive troponinu T (hs-TnT) přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně u pacientů po transplantaci srdce (OTS) s mužským štěpem (M) a ženským štěpem (Ž). V celém sledovaném období byla signifikantně vyšší hladina u pacientů s ženským štěpem (*P<0,05) s největšími rozdíly 24 hodin (1. pooperační den – POD) a týden po transplantaci.*



*Graf č. 3. Počet TUNEL pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v mužských (M) a ženských (Ž) allograftech. *P<0,001, počet TUNEL pozitivních buněk u allograftů obou pohlaví 7 dní po OTS vs. před OTS.*



3.4. Studie 2

3.4.1. Pacienti a sběr dat

Studie zahrnovala celkem 58 pacientů. Vytvořili jsme čtyři pracovní skupiny podle pohlaví příjemce a dárce: *skupina **1*** (příjemce muž – dárce muž), *skupina **2*** (příjemce žena – dárce žena), *skupina **3*** (příjemce muž – dárce žena), *skupina **4*** (příjemce žena – dárce muž). Po předchozím prostudování transplantačních registrů IKEM a s ohledem na časové možnosti výzkumu, jsme za ideální počet pacientů v každé skupině stanovili 15 pacientů. Abychom i do čtvrté skupiny mohli zařadit srovnatelný počet pacientů, neboť najít vhodného mužského dárce pro ženského příjemce je časově náročnější než pro ostatní skupiny, probíhal sběr dat déle než ve Studii 1 a to od září 2010 do ledna 2015. Za uvedené časové období jsme zařadili 15 pacientů do *skupiny 1*, 15 pacientů do *skupiny 2*, 16 pacientů do *skupiny 3* a 12 pacientů do *skupiny 4*. Kromě pěti pacientů *skupiny 4*, kteří byli zařazeni mezi lednem 2013 a lednem 2015, byly všechny skupiny tvořeny pacienty účastnící se i předchozí studie. Bioptické vzorky byly odebírány v určených termínech (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Časové rozložení odběru bioptických vzorků.

Číslo vyšetření	Doba odběru vzorku	Vyšetření
1.	Biopsie před odběrem štěpu	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
2.	Biopsie 20 min po uvolnění svorky	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
3.	EMB v 1. týdnu po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
4.	EMB v 1. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2
5	EMB v 6. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2
6.	EMB v 12. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL
7.	EMB ve 24. měsíci po transplantaci	kaspáza-3, Bcl-2, TUNEL

3.4.2. Výsledky Studie 2

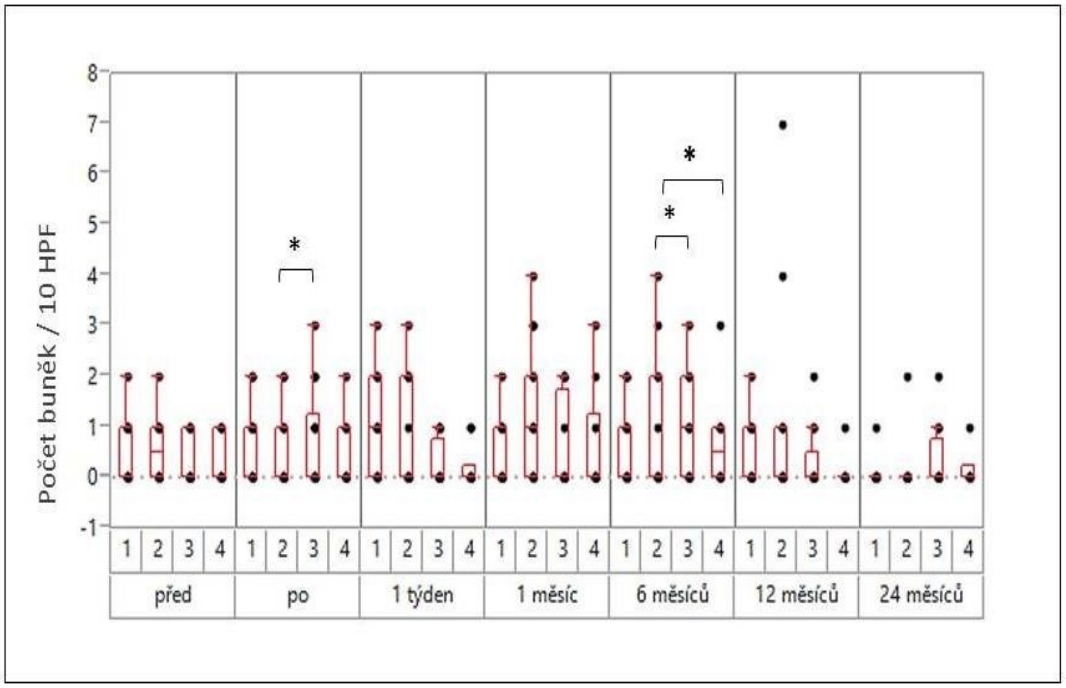
V základních demografických a předoperačních datech nebyl významný rozdíl mezi skupinami zkoumaného souboru; a to jak pro charakteristiku příjemců, tak i dárců.

Předoperačně nebyl rozdíl mezi skupinami v expresi kaspázy-3. Nicméně pooperačně jsme pozorovali významný rozdíl mezi *skupinou 2* (příjemce žena – dárce žena) a *skupinou 3* (příjemce muž – dárce žena) 20 minut po transplantaci, *ve skupině 3* byla exprese kaspázy-3 významně vyšší než ve *skupině 2*: 9,0 [5,0 – 17,3] vs. 3,0 [2,5 – 4,5]; P=0,017. Měsíc po operaci tento rozdíl dosahoval hranice významnosti (P=0,056) a šest měsíců po operaci byla naopak exprese kaspázy-3 významně vyšší *ve skupině 2* než ve *skupině 3:* 14,0 [7,00– 21,0] vs. 3,0 [2,0 – 7,0]; P=0,024. Dále jsme detekovali v šestém měsíci po transplantaci významně vyšší expresi kaspázy-3 ve *skupině 2* (příjemce žena – dárce žena) v porovnání se *skupinou 4* (příjemce žena – dárce muž): 14,0 [70 – 21,0] vs. 5 [2,8 – 7,0]; P=0,029. V ostatních časových obdobích jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami (graf č. 4).

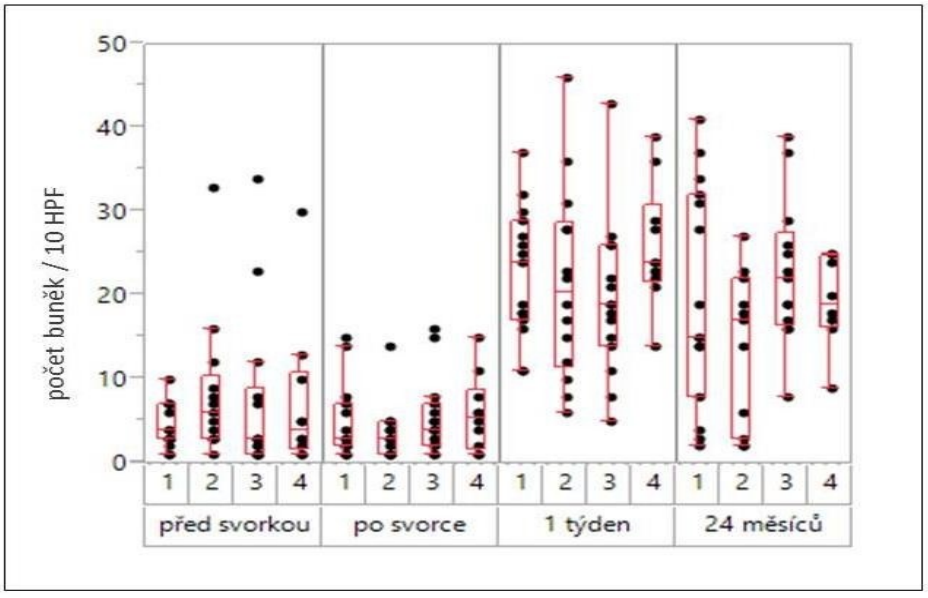
Během sledovaného období jsme mezi skupinami nezjistili významný rozdíl v expresi proteinu Bcl-2.

Metodou TUNEL jsme nedetekovali ve sledovaných obdobích statisticky významný rozdíl v apoptóze mezi skupinami, nicméně jsme zjistili významný nárůst TUNEL pozitivních buněk ve všech skupinách oproti předoperačním hodnotám jak týden, tak i 12 a 24 měsíců po transplantaci (P<0,001, graf č. 5).

Graf č. 4. Počet kaspáza-3 pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v myokardu pacientů rozdělených do čtyř skupin dle pohlaví příjemce a dárce.
**P<0,05, počet kaspáza-3 pozitivních buněk: skupina 2 vs. skupina 3 20 min a šest měsíců po OTS; skupina 2 vs. skupina 4 šest měsíců po OTS.*



Graf č. 5. Počet TUNEL pozitivních buněk na 10 HPF (high-power field) před a po OTS v myokardu pacientů rozdělených do čtyř skupin dle pohlaví příjemce a dárce.



3.5. Studie 3

3.5.1. Pacienti a sběr dat

V průběhu získávání dat pro předchozí studie jsme shromáždili soubor 64 po sobě jdoucích pacientů, kteří podstoupili transplantaci srdce v období od září 2010 do ledna 2013. Znalost všech klinických dat pacientů nás vedla k vytvoření studie, ve které jsme zkoumali, zda vybrané ukazatele buněčné smrti mají případnou souvislost s primárním selháním srdečního štěpu (PGF) po transplantaci. K průkazu myokardiální nekrózy jsme použili metodu detekce hs-cTnT. Vzorek krve dárce byl odebrán těsně před otevřením perikardu a následně byl odebrán bioptický vzorek dárcovského myokardu za účelem průkazu apoptózy (kaspáza-3, aktivní + prokaspáza-3, Bcl-2 a TUNEL).

3.5.2. Výsledky Studie 3

Po transplantaci došlo k rozvoji primárního selhání srdečního štěpu (PGD) u osmi pacientů (14%). Mezi skupinou pacientů, u nichž došlo k rozvoji PGD a skupinou bez této komplikace, nebyly rozdíly z hlediska věku dárce (40,4 ± 1,8 vs. 39, 8 ± 5,8 let) a pohlaví dárce (M/Ž 36/20 vs. 3/5). Nelišila se ani délka ischémie (141 ± 7,3 vs. 157 ± 16,7 min.). Rovněž jsme nepozorovali významné rozdíly mezi skupinami ve věku příjemce, pohlaví příjemce, příčině srdečního selhání a v četnosti pacientů s mechanickou podporou oběhu (u příjemce). U pacientů s výskytem PGD po transplantaci srdce byla převaha mužských příjemců (6/8), zatímco mezi dárci převažovaly ženy (5/8). Za povšimnutí stojí, že u tří pacientů z této skupiny došlo k transplantaci ženského allograftu mužskému příjemci (3/8). Selhání levé komory bylo pozorováno u 4 pacientů, selhání pravé komory u 6 pacientů; ve dvou případech se tedy jednalo o oboustranné srdeční selhání. Navzdory výskytu této obávané komplikace bylo 30-denní přežití pacientů 100%. Údaje o pacientech s PGD uvádí tabulka č. 2.

Tabulka č. 2. Údaje o pacientech s výskytem primárního selhání štěpu (plicní arteriální resistence - PAR uvedena ve Woodových jednotkách, přítomnost selhání levé/pravé komory označena +, nepřítomnost označena -), doba studené ischémie uvedena v minutách.

Pacient	Pohlaví dárce	Pohlaví příjemce	Doba ischémie	PAR (WU)	Selhání LK	Selhání PK
1	M	M	83	1,3	+	+
2	M	M	168	1,8	-	+
3	M	M	178	1,9	-	+
4	Ž	Ž	179	1,2	-	+
5	Ž	Ž	140	1,2	-	+
6	Ž	M	225	3,3	+	+
7	Ž	M	188	1,8	+	-
8	Ž	M	100	2,9	+	-

Nezjistili jsme významný rozdíl plazmatické hladiny hs-cTnT u skupiny s PGD (57.4 ± 22.9 ng/L) a hladiny hs-cTnT u skupiny pacientů bez dysfunkce štěpu (68.4 ± 10.8 ng/L. Nelišil se ani výskyt a stupeň apoptózy mezi skupinou s PGD a skupinou, u které k primárnímu selhání štěpu po transplantaci nedošlo. Ve studovaném souboru nebyly markery buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) prediktorem rozvoje primárního selhání štěpu po transplantaci srdce.

4. Diskuze

Vzhledem k faktu, že transplantace srdce patří v kardiochirurgii k výkonům s nejdelší dobou ischemie myokardu, je snaha o minimalizaci délky ischémie základním předpokladem úspěchu srdeční transplantace. Kilic a spol. (2012) ve své práci uvádí, že čím kratší je doba studené ischémie, tím lepší je dlouhodobé přežívání po transplantaci srdce. Z největšího mezinárodního transplantačního registru ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) vyplývá, že ischémie štěpu delší než 200 minut představuje nezávislý rizikový faktor pro jednoroční mortalitu a má významný negativní vliv na 5-leté a dokonce i na 15-leté přežití po transplantaci srdce (Stehlik 2012). Ve studii, která vznikla na našem pracovišti a analyzovala výsledky pacientů transplantovaných pro vrozenou srdeční vadu v IKEM, byla identifikována doba ischémie delší než 4 hodiny jako silný prediktor perioperační i jednoroční mortality (Bešík a spol. 2016). Protože do celkové doby ischemie je třeba zahrnout i dobu transportu, snažíme se pro očekávaně komplikované výkony dobu transportu zkrátit na maximum a pro takové výkony se pacienti transportují do IKEM.

Dalšími faktory, které mají negativní vliv na jednoroční mortalitu po transplantaci srdce, jsou vyšší věk dárce a významný nepoměr hmotnosti dárce a příjemce. Z faktorů, týkajících se pouze příjemce, pak porucha funkce ledvin s elevací hodnot sérového kreatininu u příjemce, vysoká plicní rezistence, diabetes mellitus, předchozí transplantace, implantace mechanické srdeční podpory a transplantace pro vrozenou srdeční vadu (Stehlik 2012).

V průběhu transplantace je tedy srdce vystaveno řadě překážek, které mohou zhoršit ischemicko-reperfuzní poškození myokardu a ovlivnit tím funkci srdečního štěpu. V délce ischemie jsme nepozorovali významný rozdíl mezi skupinami pacientů rozdělených podle pohlaví dárce. S výjimkou příčiny úmrtí nebyl žádný rozdíl v dalších předoperačních datech; u ženských dárců byl vyšší výskyt intracerebrálních hemorhagií.

Mozková smrt je provázena řadou patofyziologických dějů, které mohou způsobit závažné poškození srdečního štěpu (Ranasinghe a Bonser 2011). Srdeční selhání, které může progredovat až do kardiogenního šoku a zvýšený výskyt arytmií jako důsledek dysbalance autonomního nervového systému v souvislosti s poraněním mozku popisuje i Mierzewska-Schmidt a Gawecka (2015). Tento jev se vyskytuje taky u subarachnoidálního krvácení, jež je častou příčinou úmrtí u dárců srdce. Ve sledovaném souboru však nebyl zvýšený výskyt této příčiny mozkové smrti ani u jedné skupiny. Zhang a spol. (2015) dokonce zjistili, že plazmatická hladina kardiospecifického troponinu T koreluje s poškozením myokardu a závažností poškození mozku. Souvislost plazmatické koncentrace hs-cTnT s příčinou mozkové smrti dárce jsme v naší práci nepozorovali. Předpokládáme že, mozková smrt je mnohem rozsáhlejší a komplexnější proces bez ohledu na jeho příčinu.

V odborné literatuře existuje jen pár studií zkoumajících vztah plazmatických hladin hs-cTnT v souvislosti s potransplantačními výsledky. Erbel a spol. (2013) analyzovali prediktivní sílu hs-TnT u 141 pacientů po transplantaci srdce. Zjistili, že u pacientů, kteří zemřeli do jednoho roku od transplantace, byly plazmatické hladiny hs-cTnT v šestém týdnu po transplantaci významně vyšší; určili hladinu hs-cTnT v šestém týdnu jako prediktivní faktor jednoroční mortality. Stanovení hs-cTnT může užitečné pro vyloučení či potvrzení akutní rejekce po transplantaci srdce (Méndez a spol. 2014).

Mezi faktory negativně ovlivňující přežívání po transplantaci někteří autoři zahrnují i ženské pohlaví dárce (Solomon a spol. 2004). Nicméně v dostupné literatuře dosud nebyla uvedena žádná práce, která by se věnovala problematice pohlavních rozdílů ve výskytu nekrózy a apoptózy v dárcovském srdci při transplantaci srdce. Přitom rozdílná odpověď srdečního svalu na ischémii v závislosti na pohlaví dárce může být jednou z příčin rozdílných výsledků po transplantaci srdce (Iyer a spol. 2011).

Naše výsledky ukazují na větší subklinické poškození ženského dárcovského srdce již před odběrem. Vyšší plazmatické koncentrace hs-cTnT, přepočtené na jednotku hmotnosti srdeční tkáně, jsme detekovali nejen těsně před odběrem srdečního štěpu, ale i po celé sledované období po transplantaci srdce; s maximálními rozdíly 24 hodin a týden po transplantaci.

Vliv perioperační ischemie jsme mohli pozorovat i v nárůstu apoptotických buněk detekovaných pomocí metody TUNEL u obou pohlaví. Počet TUNEL pozitivních buněk byl týden po transplantaci významně vyšší než před transplantací. Nicméně se nám nepodařilo prokázat rozdíl ve výskytu apoptózy mezi mužskými a ženskými dárci srdečního štěpu.

Z experimentálních prací vyplývá, že samičí srdce je odolnější k ischemicko-reperfuznímu poškození než samčí srdce (Ošťádal a spol. 2009, Fukumuto a spol. 2012, Kolář a Ošťádal 2013). Nicméně z našich výsledků se zdá, že je ženský myokard při transplantaci citlivější k ischemicko-reperfuzními poškození než myokard mužský. Tato skutečnost by mohla přispět k vysvětlení horších potransplantačních klinických výsledků při použití ženského srdečního štěpu.

Experimentální práce byly prováděny na zvířatech bezprostředně uvedených do anestezie, případně okamžitě po usmrcení pokusného zvířete (např. dekapitací), tedy na srdcích, které nebyly vystaveny pochodům probíhajících při mozkové smrti. Podobně je tomu i u klinických studií, které zahrnující pacienty, u nichž nedošlo k mozkové smrti. Transplantace srdce je tak jedinou situací, kdy se setkáváme se srdcem poškozeným v rámci patofyziologických změn, jež probíhají při smrti mozku. Se zřetelem k tomu, že vyšší plazmatická koncentrace srdečního troponinu T, přepočtená na jednotku hmotnosti srdeční tkáně, je u dárců ženského pohlaví přítomna již před odběrem srdce, můžeme předpokládat odlišné poškození ženského dárcovského myokardu při smrti mozku. Z tohoto důvodu by se další výzkum měl zaměřit na hledání pohlavních rozdílů v poškození srdečního štěpu při mozkové smrti.

Odlišnost pohlaví příjemce a dárce jako nepříznivého faktoru pro krátkodobé, ale i dlouhodobé přežívání po transplantaci, je čím dál více zřetelnější. Horší výsledky u mužů, kterým bylo při transplantaci implantováno ženské srdce, byly popsány z různých transplantačních center a podpořeny závěry velkých multicentrických studií (Stehlik a spol. 2012, Lund a spol. 2015)

V transplantační literatuře jsou diskutovány i genetické a hormonální faktory, které mohou, alespoň částečně, vysvětlovat uvedené rozdíly. Jak bylo uvedeno, u dospělých mužů dochází za jeden rok k úbytku přibližně 64 miliónů myocytů s kompenzatorní hypertrofií zbývajících srdečních buněk, zatímco u žen se počet myocytů v průběhu života prakticky nemění (Olivetti 1995). Je-li tato skutečnost podmíněna hormonálně, pak se lze domnívat, že po transplantaci ženského srdce do mužského těla, může k obdobným změnám docházet i v transplantovaném orgánu. Tyto změny by mohly být vyjádřeny dokonce s ještě větší intenzitou, neboť srdce je nejen zbaveno protektivního vlivu ženských pohlavních hormonů, ale současně je zároveň vystaveno působení mužských pohlavních hormonů (Al-Khaldi a spol. 2006). Odlišnost v apoptóze zde hraje nesporně významnou roli. Přítomnost apoptózy byla již dříve zkoumána jak v transplantovaných srdcích, tak i v explantovaných srdcích, které nebyly z různých důvodů akceptovány k transplantaci. Birks a spol. (2000) prokázali zvýšenou expresi kaspáz v dysfunkčních srdečních štěpech ve srovnání se štepy s dobrou funkcí obou komor. Výrazně vyšší expresi genů účastnících se apoptózy (BAX, kaspázy-3 a FasL) v dárcovských srdcích ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů popsal také Stoica a spol. (2003). V prospektivní studii kolektivu autorů (Chalabreysse a spol. 2004) byla hodnocena velikost apoptózy z bioptických vzorků pravé komory srdeční u dárců s prokázanou smrtí mozku. Autoři potvrdili, že mozková smrt vyvolává apoptózu v myokardu pravé komory. Ač se uvedené práce zabývají apoptózou v myokardu transplantovaných srdcí, nebyly dosud publikovány žádné studie zkoumající tento proces za modifikovaných podmínek, kdy je ženské srdce transplantováno mužskému příjemci a naopak.

S respektováním transplantačních statistik našeho pracoviště z předchozích let jsme vytvořili čtyři pracovní skupiny podle pohlaví příjemce a dárce, do kterých jsme postupně zařazovali transplantované pacienty. Zjišťovali jsme četnost výskytu apoptózy v uvedených skupinách a porovnávali rozdíly mezi jednotlivými skupinami (Studie 2). Skupiny pacientů se nelišily v demografických datech ani v žádném předoperačním parametru, ať už z hlediska charakteristiky dárců či příjemců. Žádná skupina tedy nezahrnovala nějaký rizikový faktor (délka ischémie, vyšší věk dárce, významný nepoměr hmotnosti dárce a příjemce, chronické renální selhání u příjemce, diabetes mellitus, implantace mechanické srdeční podpory či transplantace pro vrozenou srdeční vadu; Stehlik 2012) pro krátkodobé či dlouhodobé přežívání po transplantaci srdce. V podstatě potenciálním jediným rizikovým faktorem byla transplantace dárcovského štepu jednoho pohlaví do těla příjemce druhého pohlaví (*skupina 3*, *skupina 4*). V časném pooperačním období jsme zaznamenali výrazně vyšší expresi kaspázy-3 ve *skupině 3* (příjemce muž – dárce žena) a v porovnání se *skupinou 2* (příjemce žena – dárce žena) byl tento rozdíl statisticky významný. Vzhledem k tomu, že se jednalo o skupinu pacientů, ve které byl použit srdeční štěp ženy pro mužského příjemce, mohla by tato skutečnost potvrzovat klinická pozorování, že je ženský dárce rizikem pro mužského příjemce s ohledem na jednoroční mortalitu (Kittleson a spol. 2011, Lund a spol. 2015). Ovšem je zajímavé, že v dalším průběhu sledování došlo v této skupině (*skupina 3*) k významnému poklesu kaspázy-3 a naopak ve *skupině 2* k významnému nárůstu exprese kaspázy-3, až se tento rozdíl mezi oběma skupinami obrátil v šestém měsíci od transplantace. Což by již nepotvrzovalo uvedenou myšlenku, zvláště bereme-li v úvahu, že apoptóza v myokardu je jednou z příčin horších potransplantačních výsledků. V jednoletém i dvouletém sledování již dále nebyly rozdíly v expresi tohoto proapoptotického proteinu.

Z hlediska dlouhodobých výsledků po transplantaci může být nepříznivá i opačná kombinace, tedy pokud je příjemcem žena a dárcem muž (Kittleson a spol., 2011, Stehlik a spol. 2012). My jsme, na rozdíl od zmíněných faktů, pozorovali půl roku po transplantaci významně menší expresi kaspázy-3 (tedy menší apoptotickou odpověď mužského myokardu v těle ženy) ve skupině, kde byla příjemce žena a dárce muž oproti skupině, kde byla příjemcem i dárcem žena.

Co se týká antiapoptotického proteinu Bcl-2, tak jsme nezjistili významné rozdíly v jeho expresi mezi skupinami v žádném monitorovaném časovém období. Ani pomocí metody TUNEL jsme nedetekovali významné rozdíly mezi skupinami ve výskytu apoptóze podléhajících srdečních buněk. Nicméně jistě stojí za povšimnutí, že apoptóza v myokardu přítomná je, a od jednoho týdne po transplantaci dochází k významnému nárůstu TUNEL pozitivním myocytů ve všech skupinách v porovnání s předtransplantačními hodnotami.

Selhání srdečního štěpu je obávanou komplikací po transplantaci srdce a provází ji vysoká mortalita. Incidence PGD se v literatuře pohybuje od 2,3% do 28,2%. Předpokládá se, že ischemicko-reperfuzní poškození je jednou z hlavních příčin vyvolávající selhání myokardu po transplantaci, zejména při dlouhém trvání ischemie (Iyer a spol. 2011). Diskutován je rovněž vliv mozkové smrti na poškození myokardu dárce (Mierzewska- Schmidt a Gawecka 2015).

Vzhledem k častým fatálním následkům PGD, je snaha identifkovat rizikové faktory korelující s touto komplikací v popředí zájmu transplantační medicíny. Role biomarkerů v predikci PGD je stále nevyjasněna. V literatuře jsou dostupné práce, které zkoumají souvislost zvýšených plazmatických koncentrací srdečních troponinů u dárců a PGD (Potapov a spol. 2001, Boccheciampe a spol. 2009) Srdeční troponiny jsou dnes souhlasně doporučovány k detekci myokardiálního poškození. Jejich citlivější stanovení umožňuje poměrně nová metoda tzv. high sensitive metod, kterou jsme proto použili ke stanovení srdečního troponinu T v naší práci. Vzhledem k nedávnému zavedení této metody do praxe, můžeme v odborné literatuře dohledat jen několik prací (zmíněných výše), které používají vysoce senzitivní stanovení srdečních troponinů u transplantovaných pacientů (např. Méndez a spol. 2014).

Neopominutelnou roli při rozvoji primárního selhání štěpu sehrává i programovaná buněčná smrt. Jak již bylo výše zmíněno, apoptóza je zvýšeně přítomna v dárcovských srdcích (Birks a spol. 2000, Stoica a spol. 2003). Souvislost mezi zvýšenou expresí proapoptotických markerů (kaspázy-3) v dárcovských allograftech a primárním selháním štěpu po srdeční transplantaci dokumentuje pouze jediná studie (Marasco a spol. 2014). Nicméně v našem souboru pacientů jsme nepozorovali souvislost mezi markery obou hlavních typů buněčné smrti (nekrózy a apoptózy) a rozvojem primárního selhání štěpu po transplantaci srdce. Je ovšem třeba zmínit, že na rozdíl od našeho pozorování byly ke stanovení apoptózy ve studii Marasca a kolektivu autorů (2014) použity vzorky ze srdečních síní a nikoliv ze srdečních komor. Nedetekovali tedy apoptózu komorových myocytů, což může znamenat v konečném důsledku i rozdílné závěry.

5. Závěr

Existenci pohlavních rozdílů v myokardu jednoznačně prokazují experimentální i některé klinické studie. Taky v naší práci jsme prokázali odlišnou vnímavost ženského a mužského srdce k ischemii. Nepotvrdili jsme však hypotézu, že ženský srdeční štěp je odolnější k ischemii než mužský štěp. Naopak se ženský štěp jeví jako vnímavější k ischemicko-reperfuznímu poškození. Přesné vysvětlení těchto rozdílů není zatím uspokojivě podáno, avšak prohlubující se výzkum přináší nové poznatky, na které by měl být brán zřetel již i v klinické praxi. Z dlouhodobého hlediska jsme nepozorovali ovlivnění apoptózy v transplantovaném myokardu v závislosti na pohlaví dárce a příjemce. Jednoznačnou souvislost mezi monitorovanými markery buněčné smrti v myokardu dárců a primárním selháním štěpu po transplantaci srdce se nám nepodařilo prokázat.

Transplantace srdce a následná dlouhodobá pooperační péče je jedním z nejsložitějších oborů medicíny. Výsledky práce by mohly přispět k ucelení poznatků a mohou být zároveň zdrojem pro selektivnější výběr vhodných dárců a tím přispět k lepším výsledkům srdečních transplantací.

6. Použitá literatura

AL-KHALDI A, OYER PE, ROBBINS RC: Outcome analysis of donor gender in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2006, 25, p. 461-8.

BESIK J, SZARSZOI O, HEGAROVA M, et al. Non-Fontan Adult Congenital Heart Disease Transplantation Survival Is Equivalent to Acquired Heart Disease Transplantation Survival. *Ann Thorac Surg*, 2016, 101, p. 1768-73.

BIRKS EJ, YACOUB MH, BURTON PS, et al. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation,* 2000*,* 70, p. 1498-1506.

BOCCHECIAMPE N, AUDIBERT G, RANGEARD O, et al. Serum troponin Ic values in organ donors are related to donor myocardial dysfunction but not to graft dysfunction or rejection in the recipients. *Int J Cardiol,* 2009*,* 133, p. 80-86.

BODDAERT J, MALLAT Z, DODNES P, et al. Age and gender effects on apoptosis in the human coronary arterial wall. *Mech Ageing Dev*, 2005, 123, p. 678-684.

BURKE JH, EHLERT FA, KRUSE JT, et al. Gender-specific differences in the QT interval and the effect of autonomic tone and menstrual cycle in healthy adults. *Am J Cardiol,* 1997*,* 79(2), p. 178-8.

DUBEY RK, OPARIL S, IMTHURN B, et al. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res*. 2002, 53, p. 688–708.

DUWALL WL. Cardiovascular disease in women. *Mt Sinai J Med,* 2003, 70(5), p. 293-305.

ERBEL C, TASKIN R, DOESCH A, et al. High-sensitive Troponin T measurements early after heart transplantation predict short- and long-term survival. *Transpl Int,* 2013, 26, p. 267-272.

FUKUMOTO T, YAMASHITA N, TAWA M, et al. Sex differences in postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat heart: the role of estrogen against myocardial ischemia-reperfusion damage via an NO-mediated mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol,* 2012, 60, p. 269-275.

GUERRA S, LERI A, WANG X, et al. Myocyte death in th failing human heart is gender dependent. *Cir Res*, 1999, 85, p. 856-866.

CHALABREYSSE L, LEROUX C, OBADIA JF, et al. Apoptosis in right-ventricle biopsy is not predictive of graft survival. *Transpl Int ,* 2004*,* 17, p. 362-5.

CHEN QM, TU VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2002, 2, p. 43.

IYER A, KUMARASINGHE G, HICKS M, et al. Primary graft failure after heart transplantation. *J Transplant,* 2011*,* 175768.

KILIC A, WEISS ES, GEORGE TJ, et al. What predicts long-term survival after heart transplantation? An analysis of 9,400 ten-year survivors. *Ann Thorac Surg*, 2012, 93, p. 699-704.

KITTLESON MM, SHEMIN R, PATEL JK, et al. Donor-recipient sex mismatch portends poor 10-year outcomes in a single-center experience. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30, p. 1018-22.

KOCH A, ROTH W, STEFFEK TM, et al. Impact of apoptosis in acute rejection episodek after heart transplantation: imunohistochemical examination of right ventricular myocardial biopsie. *Trans Proceed*, 2008, 40, p. 943-946.

KOLAR F, OSTADAL B. Sex differences in cardiovascular function. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 207, p. 584-7.

LEINWAND LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*, 2003, 112, p. 302–304.

LUND LH, EDWARDS LB, KUCHERYAVAYA AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*, 2015, 34(10), p. 1244-54.

LUND LH, KHUSH KK, CHERIKH WS, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2017, 36, p. 1037-1046.
MALLAT Z, DODNES P, COSTAGLIOLA R, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *J Geront*, 2001, 56, p. 719-723.
MARASCO SF, SHEERAN FL, CHAUDHURI K, et al. Molecular markers of programmed cell death in donor hearts before transplantation. *J Heart Lung Transplant,* 2014*,* 33, p. 185-193.
MATHUR P, OSTADAL B, ROMEO F, et al. Gender-Related Differences in Atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther,* 2015, 29, p. 319-27.
MÉNDEZ AB, CARDONA M, ORDÓÑEZ-LLANOS J, et al. Predictive value of high-sensitive troponin T to rule out acute rejection after heart transplantation. *Rev Esp Cardiol,* 2014*,* 67, p. 775-776.
MIERZEWSKA-SCHMIDT M, GAWECKA A. Neurogenic stunned myocardium - do we consider this diagnosis in patients with acute central nervous system injury and acute heart failure? *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2015, 47(2), p. 175-80.
OLIVETTI G, GIORDANO G, CORRAADI D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26, p. 1068-1079.
OSTADAL B, NETUKA I, MALY J, et al. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Exp Biol Med (Maywood)* , 2009, 234(9), p. 1011-9.
PIRK J, MÁLEK I, et al. Transplantace srdce. *Karolinum,* 2008
POTAPOV EV, IVANITSKAIA EA, LOEBE M, et al. Value of cardiac troponin I and T for selection of heart donors and as predictors of early graft failure. *Transplantation*, 2001, 71, p. 1394-400.
RANASINGHE AM, BONSER RS. Endocrine changes in brain death and transplantation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab,* 2011*,* 25, p. 799-812.
REED RM, NETZER G, HUNSICKER L, et al. Cardiac size and sex-matching in heart transplantation : size matters in matters of sex and the heart. *JACC Heart Fail*, 2014, 2, p. 73-83.
REGITZ-ZAGROSEK V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5, p. 425–439.
ROGER VL, GO AS, LLOYD-JONES DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2011, 123, p. e18-e209.
SÁNCHEZ-LÁZARO IJ, ALMENAR-BONET L, ROMERO-PELECHANO A, et al. Serum markers of apoptosis in the early period of heart transplantation. *Biomarkers*, 2012, 17, p. 254-60.
SOLOMON NA, MCGIVEN JR, ALISON PM, et al. Changing donor and recipient demographics in a heart transplantation program: influence on early outcome. *Ann Thorac Surg,* 2004*,* 77, p. 2096-102.
STOICA SC, SATCHITHANANDA DK, ATKINSON C, et al. Heat shock protein, inducible nitric oxide synthase and apoptotic markers in the acute phase of human cardiac transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg,* 2003, 24, p. 932-9.
VACCARINO V, ABRAMSON JL, VELEDAR E, et al. Sex differences in hospital mortality after coronary artery bypass surgery: evidence for a higher mortality in younger women. *Circulation*, 2002, 105, p. 1176–81.
ZHANG L, WANG Z, QI S. Cardiac Troponin Elevation and Outcome after Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24(10), p. 2375–2384.
ZHANG XP, VATNER SF, SHEN YT, et al. Increased apoptosis and myocyte enlargement with decreased cardiac mass; distinctive features of ageing male, but not female monkey heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43, p. 487-491.

7. Seznam publikací doktoranda

Se vztahem k tématu dizertační práce:

1)
Sensitivity to perioperative ischemia/reperfusion injury in male and female donor myocardium.
Smetana M, Besik J, Netuka I, Maly J, Maluskova J, Lodererova A, Hoskova L, Franeková J, Pokorna E, Pirk J, Szarszoi O.
Physiol Res, 2017, 66(6), p. 949-957. **IF 1.461**

2)
Biomarkers of cellular apoptosis and necrosis in donor myocardium are not predictive of primary graft dysfunction.
Szarszoi O, Besik J, **Smetana M**, Maly J, Urban M, Maluskova J, Lodererova A, Hoskova L, Tucanova Z, Pirk J, Netuka I.
Physiol Res, 2016, 65(2), p. 251-7. **IF 1.461**

Další publikace:

3)
Non-Fontan Adult Congenital Heart Disease Transplantation Survival Is Equivalent to Acquired Heart Disease Transplantation Survival.
Besik J, Szarszoi O, Hegarova M, Konarik M, **Smetana M**, Netuka I, Pirk J, Maly J.
Ann Thorac Surg, 2016, 101(5), p. 1768-73. **IF 3.700**

4)
Pulsatile pseudoaneurysm following a bentall procedure.
Smetana M, Pirk J, Kacer P, Szarszoi O.
J Card Surg, 2011, 26(6), p. 641-2. **IF 0.865**