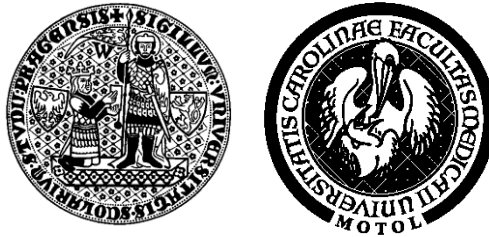


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Jan Doul

Protektce ischemického myokardu v časných fázích ontogenetického vývoje

Protection of the ischemic myocardium during early stages of the
ontogenetic development

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Zuzana Charvátová, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 8.4.2019

JAN DOUL

Podpis

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat své školitelce MUDr. Zuzaně Charvátové, Ph.D. za vedení mé experimentální práce v průběhu celého postgraduálního studia. Můj dík patří i prof. Bohuslavu Ošťádalovi, DrSc. a jeho manželce MUDr. Ivaně Ošťádalové, CSc. za odborný dohled a cenné rady týkající se našeho výzkumu. Nedílnou součástí našeho týmu byli Ing. Marcela Rašková, RNDr. Dana Miková a MUDr. Matej Kohutiar, Ph.D., bez nichž by nevznikly biochemické části našeho projektu. Děkuji také vedení našeho ústavu reprezentovanému doc. MUDr. Hanou Maxovou, Ph.D. a prof. MUDr. Martinem Vízkem, CSc. za konzultace a pomoc při přípravě publikací a dizertační práce. V neposlední řadě děkuji celému našemu Ústavu patologické fyziologie 2. LF UK za zázemí poskytnuté pro vědeckou práci.

Identifikační záznam:

DOUL, Jan. *Protektce ischemického myokardu v časných fázích ontogenetického vývoje. [Protection of the ischemic myocardium during early stages of the ontogenetic development]*. Praha, 2018. 70 s., 0 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie 2. LF UK. Vedoucí závěrečné práce Charvátová, Zuzana.

OBSAH

1. ABSTRAKT	10
2. ABSTRACT	11
3. ÚVOD	12
4. LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
4.1 ODOLNOST SRDCE K ISCHEMII	14
4.1.1 Kardioprotektivní intervence	15
4.1.1.1 <i>Adaptace na chronickou hypoxii</i>	15
4.1.1.2 <i>Ischemický preconditioning</i>	15
4.1.1.3 <i>Ischemický postconditioning</i>	16
4.1.1.4 <i>Remote ischemic conditioning</i>	16
4.1.1.5 <i>Farmakologické protekce</i>	16
4.1.2 Stavby přirozeně se vyskytující zvýšené odolnosti myokardu k ischemii	17
4.1.2.1 <i>Neonatální srdce</i>	17
4.1.2 <i>Samičí srdce</i>	19
4.2 MECHANIZMY KARDIOPROTEKTIVNÍCH INTERVENČÍ	20
4.2.1 Mitochondrie	20
4.2.1.1 <i>Mitochondrial permeability transition pore</i>	20
4.2.1.2 <i>Mitochondriální ATP senzitivní draselný kanál (mito-K-ATP)</i>	22
4.2.1.3 <i>Vztah mPTP a mito-K-ATP</i>	23
4.2.1.4 <i>Kyslíkové radiály</i>	25
4.2.1.5 <i>Efekt NO v mitochondrii</i>	25
4.2.1.6 <i>Mitochondriální membránový potenciál</i>	26
4.2.1.7 <i>Mitochondriální enzymy</i>	27
4.2.1.8 <i>Mitochondriální kalcium</i>	28
4.2.1.9 <i>Další mitochondriální iontové přenašeče</i>	29
4.2.2 Vliv extramitochondriálního kalcia a pH na kardioprotektivní intervence	30
4.2.2.1 <i>Extramitochondriální kalcium</i>	30
4.2.2.2 <i>Vliv pH na kardioprotekci</i>	31
4.2.3 Signalizační dráhy	31
4.2.3.1 <i>Dráha RISK – PI3K/Akt</i>	32
4.2.3.2 <i>Dráha RISK – MEK1,2/ERK</i>	33
4.2.3.3 <i>Glykogen-syntáza-kináza 3 beta (GSK3β)</i>	34
4.2.3.4 <i>Skupina PKC</i>	34
4.2.3.5 <i>Dráha NO/PKG</i>	35
4.2.3.6 <i>Dráha SAFE (JAK/STAT3)</i>	35
4.2.3.7 <i>Shrnutí signalizačních drah</i>	35
4.2.4 Signalizační molekuly	36

4.2.5 Metabolické faktory	37
4.3 SHRNU TÍ LITERÁRNÍHO PŘEHLEDU	38
5. HYPOTÉZY A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	40
6. METODIKA	41
6.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL	41
6.2 STANOVENÍ LDH	43
6.3 BLOKÁDA MITO-K-ATP KANÁLU U NEONATÁLNÍHO SRDCE	44
6.4 STANOVENÍ SÉROVÝCH NITRÁTŮ A NITROTYROZINU V NEONATÁLNÍCH SRDCÍCH	45
6.4.1 Odběr vzorků	45
6.4.2 Stanovení sérových nitrátů	45
6.4.3 Stanovení nitrotyrozinu	45
6.5 STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ	46
7. VÝSLEDKY	48
7.1 VÝVOJ ODOLNOSTI K ISCHEMICKO-REPERFUZNÍMU POŠKOZENÍ	48
7.2 ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING	49
7.2.1 10. den	49
7.2.2 Vliv délky globální ischemie	50
7.2.3 Vývoj efektu ischemického postconditioningu	51
7.2.4 Protokol 5 x 10 sekund	52
7.3 STANOVENÍ LDH U ISCHEMICKÉHO POSTCONDITIONINGU	52
7.4 VLIV PODÁNÍ BLOKÁTORU MITO-K-ATP NA ODOLNOST NEONATÁLNÍCH SRDCÍ	54
7.5 VLIV PODÁNÍ BLOKÁTORU MITO-K-ATP NA ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING	56
7.6 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ SÉROVÝCH NITRÁTŮ A NITROTYROZINU	57
8. DISKUZE	58
8.1 METODY MĚŘENÍ ÚČINNOSTI POSTCONDITIONINGU	58
8.1.1 Měření síly kontrakce (DF)	58
8.1.2 Stanovení enzymu laktátdehydrogenázy (LDH)	59
8.1.3 Použité protokoly ischemického postconditioningu	59
8.2 ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING	60
8.3 MITOCHONDRIÁLNÍ K-ATP KANÁL	61
8.3.1 Použitá metoda blokády mito-K-ATP kanálu	61
8.3.2 Efekt blokády mito-K-ATP kanálu	61
8.4 OXID DUSNATÝ	62
8.4.1 Stanovení sérových nitrátů	62
8.4.2 Stanovení nitrotyrozinu v neonatálních srdcích	63
8.5 OSTATNÍ MECHANIZMY ODOLNOSTI NEONATÁLNÍHO SRDCE	63
8.5.1 Možná propojení kardioprotektivních mechanismů	63
8.5.2 Kardioprotektivní dráha Wnt	64
8.5.3 Uplatnění kardioprotektivních mechanismů u srdečního selhání	65
9. SOUHRN	67

10. SUMMARY	69
11. LITERATURA	71

SEZNAM ZKRATEK

3-NT	3-nitrotyrozin
5-HD	5-hydroxydekanoát
AIM	Akutní infarkt myokardu
AMPK	AMP-kináza
ANP	Atriální natriuretický peptid
ANT	Adeninnukleotid translokáza
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Bovine serum albumin
CMP	Cévní mozková příhoda
Cs-A	Cyklosporin-A
Cyp-D	Cyklophilin-D
DF	Síla kontrakce (developed force)
DM	Diabetes Mellitus
ECT	Extracelulární tekutina
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
GLUT 4	Glucose transporter type 4
GSK-3 β	Glykogen-syntéza kináza 3 beta
HK II	Hexokináza 2
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IGF-1	Inzulin like growth factor 1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase

IP3	Inositol-trifosfát
IP3R	Receptor pro inositol-trifosfát
IPC	Ischemický preconditioning
IPoC	Ischemický postconditioning
LDH	Laktátdehydrogenáza
L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
mABC1	Mitochondrial ATP-binding cassette protein 1
MAM	Mitochondria associated membranes
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
mito-K-ATP	Mitochondriální ATP-senzitivní draselný kanál
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NO	Oxid dusný
NOA	NO analyzátor
NOS	NO syntáza
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
Pi	Anorganický fosfát
PiC	Mitochondriální fosfátový přenašeč
PKC	Proteinkináza C
PKG	Proteinkináza G
PLC	Fosfolipáza C
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid
PPAR	Peroxisomal proliferator activated receptor
PVP	Polyvinylpyrrolidon

ROS	Kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
RYR	Ryanodinový receptor
SAFE	Survival activating factor enhancement
SDH	Sukcinátdehydrogenáza
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
Sf-A	Sanglifehrin-A
SNO	S-nitrosylace
SR	Sarkoplazmatické retikulum
TBS	Tris-buffered saline
TNF α	Tumor necrosis factor α
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
TOM20	Translocase of outer mitochondrial membranes 20kDa
UCP	Uncoupling protein
VDAC	Voltage-dependent anion channel

1. ABSTRAKT

Neonatální srdce se vyznačují vysokou odolností k ischemicko-reperfuznímu (I/R) poškození a nemohou být dále chráněna pomocí ischemického preconditioningu (IPC). O ischemickém postconditioningu (IPoC) u neonatálních srdcí není doposud nic známo. Potkaní srdce izolována ve stáří 1., 4., 7. a 10. postnatální den byla perfundována dle Langendorffa. Srdce byla vystavena 40-ti nebo 60-ti minutové ischemii a reperfuzi do maxima obnovy síly kontrakce. IPoC byl navozen protokoly 3x10s, 3x30s, 3x60s a 5x10s. Odolnost k ischemii se nezměnila mezi dny 1 a 4, ale klesla ve dnech 7 a 10. 10. den ani jeden z protokolů IPoC 3x10s, 3x30s a 3x60s nevedl k signifikantní protekci, ani při prodloužení délky ischemie na 60 min. Protokol 3x30s (nejúčinnější z předchozích) byl poté aplikován ve dnech 1, 4 a 7 bez signifikantního účinku. Ovšem v další sérii pokusů protokol 5x10s signifikantní protektivní účinek 10. den už měl. IPC a IPoC v dospělých srdcích působí prostřednictvím mito-K-ATP kanálu a oxidu dusnatého (NO). Blokátor mito-K-ATP kanálu (5-HD) podaný 5 min před ischemií a prvních 20 minut reperfuze ovšem neměl efekt na odolnost neonatálních srdcí ani na IPoC 10. den. Další srdce byla použita pro analýzu 3-nitrotyrozinu (3-NT) a byly odebrány vzorky séra pro měření sérových nitrátů. Signifikantní rozdíl byl nalezen v sérových nitrátech mezi dny 1 a 10, avšak nikoliv v množství tkáňového 3-NT. Zjistili jsme, že neonatální srdce v období své vysoké odolnosti nemohou být chráněna pomocí IPoC. Byl nalezen rozdíl v produkci NO, ovšem ani mito-K-ATP kanál ani ROS zřejmě nehrají roli v odolnosti neonatálních srdcí k I/R poškození.

2. ABSTRACT

Neonatal hearts exhibit higher resistance to ischemia-reperfusion (I/R) injury and cannot be further protected by ischemic preconditioning (IPC). Nothing is known about ischemic postconditioning (IPoC) in neonatal hearts yet. Rat hearts isolated on postnatal days 1, 4, 7 and 10 were perfused according to Langendorff. Hearts were exposed to 40 or 60 min of ischemia and reperfusion up to the maximum recovery of developed force. IPoC was induced by protocols 3x10s, 3x30s, 3x60s and 5x10s. Tolerance to ischemia did not change from day 1 to day 4 but decreased to days 7 and 10. On day 10, none of the IPoC protocols 3x10s, 3x30s and 3x60s led to significant protection, not even when the ischemia was prolonged to 60 min. The 3x30s protocol (the most effective from the previous) was also applied on days 1, 4 and 7 without any significant effect. However, in the next series of experiments, protocol 5x10s had significant protective effect on day 10. IPC and IPoC in adult hearts act through mitochondrial-K-ATP channels and nitric oxide (NO). Surprisingly mito-K-ATP blocker (5-HD) administered 5 min before ischemia and during first 20 min of reperfusion had no effect on neonatal resistance or on IPoC on day 10. Another group of hearts was used for analysis of 3-nitrotyrosine (3-NT) and serum samples were taken to measure serum nitrates. Significant difference was found in serum nitrates between days 1 and 10 but not in tissue 3-NT amount. We found that neonatal hearts during the period of their high resistance cannot be further protected by IPoC. Difference in NO production was found, however neither mito-K-ATP nor ROS seem to play role in the neonatal resistance to I/R injury.

3. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční představuje nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělém světě. Pro srdeční svalovinu je důležitý neustálý přísun kyslíku a živin a odvod odpadních metabolitů. Myokard může být postižen jak omezením průtoku krve koronárním řečištěm (ischemií), tak nedostatkem kyslíku v krvi (hypoxickou nebo anemickou hypoxií). Koronární řečiště je již v klidových podmínkách typické svojí vysokou extrakcí kyslíku z krve, zvýšení dodávky kyslíku je tedy možné pouze zvýšením průtoku krve koronárním řečištěm. Ischemická choroba srdeční vzniká při nepoměru mezi myokardiální potřebou kyslíku a průtokem okysličené krve koronárním řečištěm. Na vzniku tohoto nepoměru se mohou podílet i zvýšené nároky myokardu, např. při hypertrofii myokardu.

Příčinou vzniku ICHS je většinou aterosklerotické postižení koronárních tepen. Toto postižení je komplikováno nejčastěji trombózou a následným uzávěrem postižené tepny. Výsledkem je přechod postižené oblasti na anaerobní metabolismus, což spolu s hromaděním odpadních produktů metabolismu a porušením iontové rovnováhy vede v určitém časovém odstupu k zániku kardiomyocytů v postižené oblasti. Ačkoliv se ukazuje, že kardiomyocyty jsou i v dospělosti schopny omezeného dělení, tato schopnost není dostatečná k reparaci poinfarktového ložiska, postižení je tedy trvalé.

Klinický popis infarktu myokardu je již více než 100 let starý, jeho léčba se však rozvíjela postupně. Po dlouhou dobu léčba obsahovala pouze klidový režim. Zavedení koronárních jednotek a aktivní léčba arytmií v roce 1961 znamenaly první významný posun ve výsledcích léčby. Teprve zavedení reperfučních terapií však znamenalo skutečně účinnou léčbu a tyto jsou nyní úspěšně klinicky aplikovány jako angioplastika, trombolýza nebo koronární bypassy.

Rozsah ischemického poškození ovšem nezávisí pouze na intenzitě a trvání ischemického inzultu, ale také na odolnosti myokardu k ischemii. Cílem výzkumu je tedy zvýšit odolnost srdečních buněk k ischemii. Toho lze dosáhnout kardioprotektivními intervencemi, jako je ischemický preconditioning nebo postconditioning. Kromě toho existují i přirozeně se vyskytující stavy se zvýšenou odolností myokardu k ischemii: 1) Vyšší odolnost neonatálního myokardu (u

laboratorního potkana je přítomen pokles původní vysoké odolnosti do 10. postnatálního dne). 2) Vyšší odolnost ženského myokardu (samice před menopauzou mají vyšší odolnost myokardu než samci).

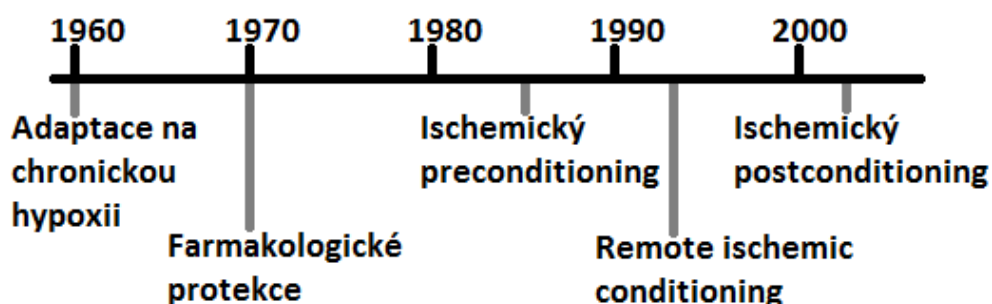
Mechanismy uvedených změn citlivosti myokardu k ischemii a kardioprotektivních intervencí nebyly dosud zcela objasněny. Ukázalo se například, že ischemický preconditioning není v období časně neonatální odolnosti myokardu vůbec účinný. Studium vývoje ischemického postconditioningu v prvních 10 dnech postnatálního vývoje je předmětem této dizertační práce.

4. LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 ODOLNOST SRDCE K ISCHEMII

Výsledný rozsah postižené oblasti u akutního infarktu myokardu závisí, kromě velikosti postižené oblasti, také na odolnosti myokardu k ischemii. V minulosti bylo popsáno celkem pět kardioprotektivních mechanismů. Prvním objevem bylo zvýšení odolnosti k ischemii u zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii. Následovaly experimenty s farmakologickým ovlivněním odolnosti myokardu. Dále přišly objevy kardioprotektivních intervencí ischemického preconditioningu, remote ischemic conditioning a ischemického postconditioningu (obr. 1). Objev ischemického postconditioningu upozornil na pravděpodobně důležitý význam reperfučního poškození. Kardiomyocyty postižené ischemií nezanikají pouze v důsledku vlastní ischemie, ale mohou odumírat i v důsledku probíhající reperfúze.

Kromě výše popsaných umělých kardioprotektivních intervencí existují i dva stavy přirozeně se vyskytující zvýšené odolnosti myokardu k ischemii. Neonatální srdce potkana je první postnatální týden zvýšeně odolné k ischemii a jeho odolnost nelze dále zvýšit aplikací ischemického preconditioningu (Ostadalova et al., 1998). Naskýtá se proto otázka, zda alespoň některé mechanismy odolnosti neonatálního srdce nejsou analogické mechanismům kardioprotektivních intervencí v dospělých srdcích. Druhým stavem je zvýšená odolnost srdce samic před menopauzou. Všechny uvedené kardioprotektivní intervence a stavy zvýšené odolnosti myokardu k ischemii budou dále popsány.



Obr. 1: Vývoj kardioprotektivních intervencí v čase (upraveno podle: (Ostadal, 2009)).

4.1.1 Kardioprotektivní intervence

4.1.1.1 *Adaptace na chronickou hypoxii*

První pozorování, že lidé žijící ve vyšších nadmořských výškách mají nižší incidenci infarktu myokardu, pochází již z 60. let minulého století. Protektivní efekt byl lineárně závislý na nadmořské výšce. Experimentální práce poté potvrdily vyšší obnovu kontraktilní funkce po anoxii u srdcí exponovaných chronické hypoxii. Efekt je spjat přímo s redukcí ischemického poškození, jelikož zmenšuje rozsah nekrózy.

Analýza kardioprotektivních mechanismů asociovaných s chronickou hypoxií navrhla řadu komponent, mezi něž patří např. mitochondrial permeability transition pore (mPTP), mitochondriální K-ATP kanál (mito-K-ATP), kyslíkové radikály (ROS), oxid dusný (NO) nebo protektivní kinázy. Jak bude dále rozvedeno, tyto mechanismy se téměř dokonale překrývají s mechanismy popsány u dalších kardioprotektivních intervencí (viz přehled (Ostadal a Kolar, 2007)).

4.1.1.2 *Ischemický preconditioning (IPC)*

Ischemický preconditioning (podrobně viz přehled (Bolli, 2007)) je aplikace krátkého neletálního ischemického inzultu před vlastní ischemií. Výsledný rozsah infarktu lze takto snížit až o 75%. Protektivní efekt IPC je rozdělen na dvě fáze, přičemž časná nastupuje ihned a trvá cca 2-3 hodiny. Pozdní se objevuje po 12-24 hodinách a její efekt trvá 2-3 dny. Protektivní efekt IPC byl potvrzen v řadě orgánů u různých živočišných druhů, včetně člověka. Kombinace adaptace na chronickou hypoxii a IPC zvyšuje celkový protektivní efekt (Ostadalova et al., 2002). Pro klinickou praxi je ovšem limitující nutnost aplikace před vlastním ischemickým inzultem a tedy možnost aplikace pouze u kardiochirurgických výkonů. Analýza kardioprotektivních mechanismů IPC ukázala zapojení všech výše jmenovaných komponent (mPTP, mito-K-ATP, ROS, NO, protektivních kináz), nicméně existuje několik rozdílů, např. v subtypech proteinkinázy C (PKC), které budou rozvedeny v kapitole týkající se mechanismů kardioprotektivních intervencí.

4.1.1.3 Ischemický postconditioning (IPoC)

Reperfuční terapie jsou jedinou kauzální léčbou u akutního infarktu myokardu. Bohužel reperfuze je sama spjata s dalším poškozením tkání a řízená reperfuze ovlivňuje rozsah infarktu. Bylo prokázáno, že ischemický postconditioning (tři cykly 30-ti sekundových reokluzí v reperfuzi) zmenší rozsah infarktu (viz přehled (Ovize et al., 2010)). Ovlivnění reperfučního poškození může být také mechanismem účinku IPC, který výrazně zlepšuje schopnost syntézy ATP v reperfuzi (Fryer et al., 2000).

I IPoC byl úspěšně vyzkoušen na zvířecích modelech i u člověka. Na rozdíl od IPC, u postconditioningu existuje řada různých protokolů. Mechanizmy popsané u IPoC jsou analogické mechanismům popsaným u chronické hypoxie a IPC (mPTP, mito-K-ATP, ROS, NO, i protektivní kinázy). Objev IPoC je klinicky významný, jelikož jej lze aplikovat po proběhlém akutním infarktu myokardu (viz přehled (Ovize et al., 2010)).

4.1.1.4 Remote ischemic conditioning

Preconditioning jedné oblasti myokardu chrání i zbylou část myokardu, kde protektivní stimul nebyl proveden. Tento jev, zvaný „remote conditioning“ byl poprvé popsán již v roce 1993 (viz přehled (Xiong et al., 2011)). Uvedenou protekci myokardu lze vyvolat i ischemií jiných orgánů než srdce (např. končetiny) a je možné ji navodit před nebo na počátku reperfuze, což je opět velmi důležité pro klinické využití. Z mechanismů se předpokládá účast nervových drah, nebo vznik molekul, které aktivují protektivní dráhy v cílovém orgánu. Protektivní efekt lze přenést dokonce i mezi různými zvířaty transfuzí krve (Dickson et al., 2000). Mechanizmy opět zahrnují mPTP, mito-K-ATP, ROS, NO a protektivní kinázy.

4.1.1.5 Farmakologické protekce

Již v 70. letech existovaly snahy zasáhnout do odolnosti myokardu k ischemii farmakologicky. Experimentální studie na zvířatech prokázaly efekt např. propranololu (β -blokátor) a poukázaly na význam neurohumorálního pozadí infarktu (Maroko et al., 1971). V klinické praxi ale farmakologické ovlivnění odolnosti myokardu k ischemii nebylo úspěšné.

Farmakologicky lze ovlivňovat komponenty uplatňující se v mechanismech kardioprotektivních intervencí. Klíčová komponenta mPTP, cyklophilin-D, je farmakologicky inhibovatelný pomocí známého imunosupresiva cyklosporinu-A (nebo sanglifehrinu-A), na kalcineurinu nezávislým mechanismem (Lim et al., 2007; Piot et al., 2008). Stejně tak lze aktivovat mito-K-ATP podáním diazoxidu nebo aktivovat příslušné protektivní kinázy (např. podáním ligandů jejich drah, jako je adenosin).

4.1.2 Stavy přirozeně se vyskytující zvýšené odolnosti myokardu k ischemii

4.1.2.1 Neonatální srdce

Zvýšená odolnost neonatálních zvířat k anoxii byla poprvé popsána již v roce 1941. Experimentální práce na izolovaných srdcích neonatálních králíků a psů později potvrdily zvýšenou odolnost neonatálního myokardu k anoxii i ischemii, odolnost může být ale druhově specifická (viz přehled (Ostadal et al., 2009b)). Neonatální srdce měla vyšší produkci laktátu, což naznačovalo jejich schopnost udržet dostatečnou produkci ATP pomocí glykolýzy. Podrobnější studie neonatálního období u potkanů ukázaly pokles odolnosti v časném neonatálním období mezi 1. až 7. dnem (Ostadalova et al., 1998) a následný vzestup odolnosti do 23. postnatálního dne (Riva a Hearse, 1993). Odolnost poté do dospělosti klesá u samců, u samic zůstává zvýšená (viz odolnost samičího srdce).

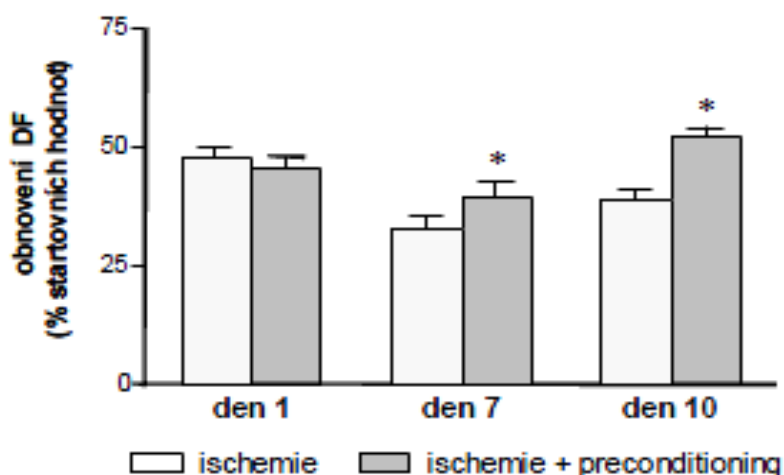
Fetus žije v hypoxickém prostředí a je na něj adaptován (fetální hemoglobin, polycytémie). Možným mechanismem neonatální odolnosti myokardu by mohla být schopnost „vrátit se“ do prenatálního stavu hypometabolické adaptace na hypoxii. Dalšími možnými mechanismy jsou utilizace aminokyselin (ta ovšem klesá do normy již druhý postnatální den), lepší schopnost anaerobní glykolýzy, schopnost využívat aminokyseliny transaminací, či lepší výbava k syntéze ATP. V průběhu vývoje se také významně mění kapilární zásobení neonatálního myokardu (po narození je jednou kapilárou zásobováno cca 16 myocytů, zatímco 28. postnatální den už pouze jediný myocyt).

V myokardu existuje kalcium indukované uvolnění kalcia ze sarkoplazmatického retikula, avšak jeho vliv se v průběhu ontogeneze významně mění.

Neonatální srdce je výrazně závislejší na přísunu kalcia z extracelulárního prostoru a je výrazně citlivější na efekt kalciových blokátorů. Vývoj je bifázický, inotropní efekt kalcia nejprve klesá mezi prvním až čtvrtým postnatálním dnem a následně roste až do sedmého dne. Citlivost ke kalciovému blokátoru verapamilu má opačný průběh (Ostadalova et al., 1993).

V neonatálním srdci dále dochází ke změnám exprese enzymů. Jsou zde přítomny izoformy PKC α , δ a ζ . Zatímco izoforma α je přítomna již první postnatální den, izoforma δ byla pozorována až sedmý den po narození. Dále je zde velká zásoba inaktivní Akt (Liaw et al., 2013). V průběhu vývoje také dochází ke zvyšování objemové frakce mitochondrií. Specifický tkáňový aerobní metabolický obrat je vyšší u neonatálního srdce, avšak pokles metabolického obratu v ischemii je nižší. Postnatálně se do 20. - 30. dne v mitochondriích zvyšuje exprese cytochromů, ANT (adenine nucleotide translocase), UCP 1-3 a PPAR α , která poté opět klesá. V jednodenních srdcích byla nalezena jediná populace mitochondrií s relativně vysokým membránovým potenciálem, zatímco v době odstavu byla popsána přítomnost druhé subpopulace s nižším membránovým potenciálem (Skarka et al., 2003). Blokáda mPTP, protektivní u dospělých srdcí, je u neonatálních srdcí bez efektu. Do 14. postnatálního dne je přítomna vysoká odolnost mitochondrie kardiomyocytů ke kalcium indukovanému bobtnání, která poté klesá (Milerova et al., 2010).

V období vysoké odolnosti neonatálního myokardu jsou některé kardioprotektivní zásahy neúčinné. Postupný nástup protekce ischemickým preconditioningem je spjat s poklesem přirozené odolnosti neonatálního myokardu (obr. 2). Alespoň některé mechanismy uvedených protektivních intervencí mohou být stejné i v neonatálním období (přehled (Ostadal et al., 2009b)). Protekci nelze navodit zesílením protektivního stimulu. Efekt protekce chronickou hypoxií byl u potkana obdobný vývoji IPC (Ostadalova et al., 2002). Nutno ovšem dodat, že žádný z mechanismů vysoké odolnosti neonatálního srdce, časově neodpovídá vývoji kardioprotektivních intervencí. Mohou zde však být také mezidruhové rozdíly, např. u neonatálních králíků lze uchovat produkci ATP a limitovat akumulaci Ca²⁺ pomocí preconditioningu sevofluranem (Liu et al., 2005).



Obr. 2: Vývoj citlivosti k ischemii a IPC u neonatálního potkana (obnovení síly kontrakce vyjádřené jako procento startovních hodnot – DF, developed force). (CHARVÁTOVÁ Zuzana. *Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku*. Praha, 2008 Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta).

4.1.2.2 Samičí srdce

Premenopauzální ženy mají nižší riziko výskytu kardiovaskulárních chorob (ICHS, hypertenze, arytmie, srdeční selhání), po menopauze se však toto riziko rychle vyrovnává mužům. Původní předpoklad o protektivním vlivu ženských pohlavních hormonů se nepodařilo prokázat, hormonální substituční terapie přinesla rozporuplné výsledky, včetně možnosti zvýšeného rizika vzniku ICHS a CMP (Rossouw et al., 2002).

U ischemicko-reperfuzního poškození byla zvýšená odolnost samičího myokardu experimentálně prokázána. Prenatální hypoxie snižuje výskyt arytmií u samic, výsledky u samců jsou nejednotné (srovnej (Netuka et al., 2006; Netuka et al., 2010; Ostadal et al., 2009a)). Estrogeny mají přímý protektivní efekt na rozsah infarktového ložiska a na některé mechanismy popsané u kardioprotektivních intervencí např. mito-K-ATP nebo Akt (Simoncini et al., 2000).

Údaje o možnosti protekce ženského myokardu dalšími stimuly jsou konfliktní, závisí pravděpodobně na věku a rozsahu ischemického inzultu (viz přehled (Ostadal et al., 2009a)).

4.2 MECHANIZMY KARDIOPROTEKTIVNÍCH INTERVENČÍ

Mechanismy uvedených kardioprotektivních intervencí a stavů zvýšené odolnosti myokardu jsou složité. Zjednodušeně se dají shrnout jako aktivace protektivních signalizačních drah, vedoucí k ovlivnění koncentrací intracelulárních iontů (zejména kalcia) a ovlivnění mitochondrií nebo apoptózy obecně. V další části budou podrobně rozebrány procesy probíhající v mitochondriích, vliv extramitochondriálního kalcia a pH, signalizační dráhy a metabolické faktory uplatňující se v patogenezi ischemicko-reperfuzního poškození.

4.2.1 Mitochondrie

V souvislosti s ischemicko-reperfuzním poškozením postupem času vynikl význam dvou klíčových struktur v mitochondriální vnitřní membráně, a sice tzv. mitochondrial permeability transition pore (mPTP) a mitochondriálního K-ATP kanálu.

4.2.1.1 Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP)

mPTP je velký, neselektivní kanál propojující obě mitochondriální membrány a způsobující jejich permeabilitu viz přehled (Hausenloy et al., 2009). Otevření mPTP vede ke kolapsu mitochondriálního potenciálu a k bobtnání až ruptuře mitochondrie. Současně dochází k uvolnění proapoptotických proteinů z intermembránového prostoru (např. cytochrom c), což v konečném efektu vede k zániku buňky. V ischemii mPTP zůstává zavřený a otevírá se až v reperfuzi. Knockout klíčové komponenty mPTP cyklophilinu-D (Cyp-D) chrání před ischemicko-reperfuzním poškozením (Lim et al., 2007).

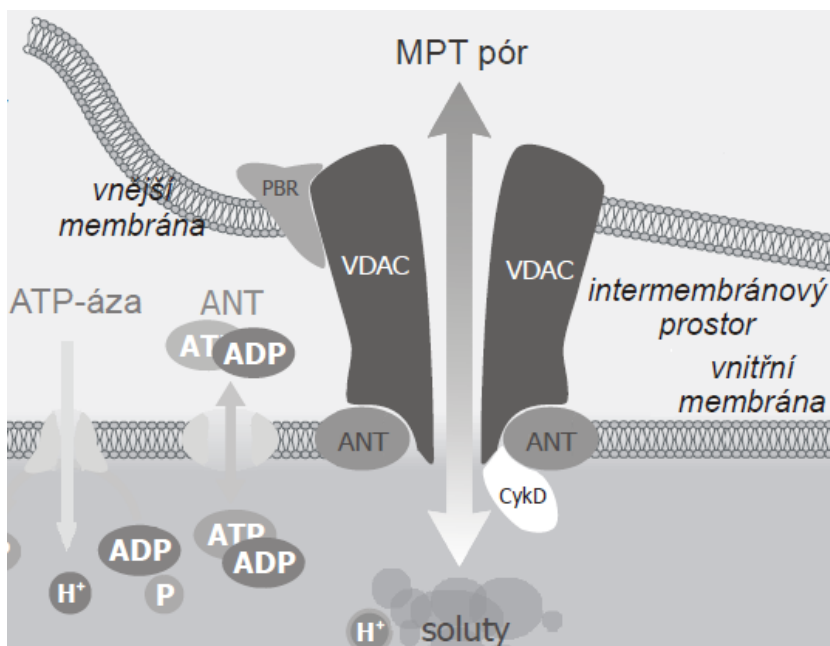
Původní popis molekulární struktury mPTP obsahuje tři základní komponenty: voltage-dependent anion channel (VDAC), adenine nucleotide translocase (ANT) a cyklophilin D (Cyp-D). VDAC je strukturou zevní mitochondriální membrány, ANT vnitřní mitochondriální membrány a Cyp-D se vyskytuje v matrix mitochondrie. Společnou interakcí jsou schopny vytvořit kalcium senzitivní kanál, propojující obě membrány (obr. 3). Farmakologická inhibice Cyp-D (cyklosporinem A (Cs-A),

sanglifehrinem A (Sf-A)) má kardioprotektivní efekt. Ligandy ovlivňující konformaci ANT ovlivňují mPTP i kardioprotektivní intervence (Fang et al., 2009). Jako další možnou komponentu mPTP některé zdroje ještě přiřazují mitochondriální fosfátový přenašeč (PiC), jelikož interaguje s Cyp-D, ANT1 a VDAC1 a anorganický fosfát ovlivňuje mPTP (Leung et al., 2008).

mPTP je ovlivněn řadou faktorů měnících se v průběhu ischemie a reperfuze, jako jsou kalciový overload (kalcium přímo otevírá mPTP), mitochondriální membránový potenciál, produkce ROS nebo změny pH. Uvedené faktory ovšem mohou být na sobě vzájemně závislé.

Protektivní kaskády, spouštěné kardioprotektivními mechanizmy, vedou k inhibici mPTP. Farmakologická inhibice mPTP (Cs-A, Sf-A) nebo knockouty Cyp-D jsou kardioprotektivní i bez aktivace příslušných kardioprotektivních drah a mj. interferují s ischemickým preconditioningem i postconditioningem, chronickou hypoxií (Zhu et al., 2006) i farmakologickými protekcemi viz přehled (Hausenloy et al., 2009). Mitochondrie z neonatálního srdce jsou výrazně méně citlivé ke kalcium indukovanému bobtnání a Sf-A je u nich bez efektu (Milerova et al., 2010). Neonatální srdce se ovšem od dospělého neliší v množství Cyp-D (Milerova et al., 2016).

Fyziologická funkce mPTP není zcela jasná. Je známo, že mírné a přechodné otevření mPTP má fyziologický význam pro eflux kalcia z mitochondrie (Altschuld et al., 1992). mPTP je asociován s metabolicky významnými enzymy, jako je hexokináza nebo kreatinkináza (Beutner et al., 1996). Absence Cyp-D (knockouty u myši) má významné metabolické efekty v dospělosti (mj. rozvoj inzulinové rezistence (Devalaraja-Narashimha et al., 2011)) a zhoršuje průběh srdečního selhání (Elrod et al., 2010)).



Obr. 3: Tradiční popis struktury mPTP obsahující tři základní komponenty: cyklophilin-D, ANT a VDAC. (ŠKÁRKA Libor. *Ontogenetický vývoj mitochondrií srdečního svalu a jejich úloha v odolnosti k nedostatku kyslíku*. Praha, 2006 Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta).

4.2.1.2 Mitochondriální ATP senzitivní draselný kanál (mito-K-ATP)

Role K-ATP kanálů v kardioprotekci byla poprvé navržena po zjištění, že blokáda těchto kanálů ruší efekt ischemického preconditioningu. Ačkoliv K-ATP kanály jsou přítomny v cytoplazmatické membráně, sarkoplazmatickém retikulu i v mitochondrii, za klíčové pro kardioprotekci jsou považovány mitochondriální K-ATP kanály (viz přehled (Gross a Fryer, 1999)). Tyto kanály jsou inhibovány ATP přítomným v matrix mitochondrie.

Existuje několik navržených mechanismů účinku mito-K-ATP. Jejich otevření snižuje mitochondriální membránový potenciál, což snižuje elektrickou sílu pro akumulaci kalcia v mitochondriální matrix. Dále vede k produkci ROS. Otevření K-ATP kanálu způsobuje expanzi objemu matrix nezávislou na ostatních veličinách (např. ovlivnění respirace) (Holmuhamedov et al., 1999).

Protektivní efekt K-ATP kanálu byl potvrzen u ischemického preconditioningu, chronické hypoxie, ischemického postconditioningu, IPC v srdcích neonatálních králíků

a remote conditioning. Estrogeny otevírají mito-K-ATP kanál u psa (Lee et al., 2000). Další studie týkající se IPC v neonatálních srdcích efekt blokátoru mito-K-ATP (5-hydroxydekanoátu, 5-HD) neprokázala (Ostadalova et al., 2002). Vysvětlení uvedeného nálezu je nejasné. Je možné, že se jedná o mezidruhový rozdíl (králík vs. potkan), nebo rozdíl v protokolu aplikace či délce ischemie. 5-HD má krátký biologický poločas (7 minut u psa (Garlid et al., 2003)) a vzhledem k možné nutnosti ovlivnit reperfuzi aplikace před ischemií nemusela být dostatečná.

Fyziologická funkce mito-K-ATP také není zcela známá. Samotné podání inhibitoru mito-K-ATP přímo funkci myokardu nezhoršuje, brání však vzestupu kontraktility v odpovědi na inotropní stres (Garlid et al., 2006). Otevření K-ATP kanálu v mitochondrii vede k poklesu membránového potenciálu, zvýšení mitochondriální respirace a poklesu mitochondriální syntézy ATP. Dále uvolňuje Ca^{2+} z mitochondrie, zvyšuje objem matrix a uvolňuje některé mitochondriální proteiny, např. cytochrom c, adenylátkinázu (Holmuhamedov et al., 1998)).

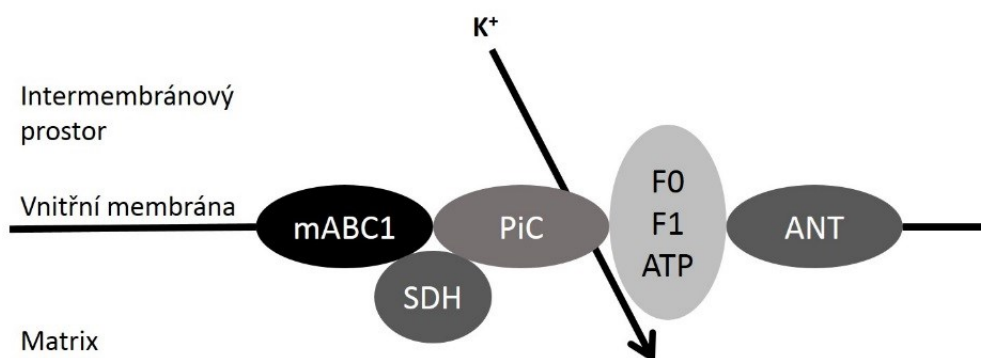
4.2.1.3 Vztah mPTP a mito-K-ATP

Tradiční koncept, popsáný v předchozích dvou kapitolách, však byl v poslední době zpochybněn. Knockouty ANT (Kokoszka et al., 2004) a VDAC (Baines et al., 2007) otevření mPTP nebrání. Ačkoliv většina studií s knockouty Cyp-D popisuje nemožnost otevření mPTP, existují minimálně dvě studie, které popsaly přítomnost mPTP i v nepřítomnosti Cyp-D, byť s nutností vyšší dávky Ca^{2+} pro jeho otevření, které se zároveň stalo necitlivé k Cs-A (Basso et al., 2005; De Marchi et al., 2006). Studie popisující vliv fosfátu na mPTP jsou konfliktní (Basso et al., 2008; McGee a Baines, 2012). Studie s knockoutem PiC zatím nebyly provedeny.

Objevily se i názory, že součástí mPTP je i mitochondriální F₀/F₁ ATPáza (Chinopoulos a Adam-Vizi, 2012). Podotýkáme, že průkaz kauzální role ve formaci mPTP vyžaduje knockout (v minulosti podobná role byla popsána pro ANT a VDAC – samotný průkaz, že molekula je schopna tvořit kanál v mitochondriální membráně tedy nestačí). Knockout celé F₀/F₁ ATPázy je z pochopitelných důvodů nemožný. Recentně se ovšem objevila studie pracující s knockouty podjednotek e a g F₀/F₁ ATPázy. Tento knockout zabránil otevření mPTP, čímž se F₀/F₁ ATPáza stala druhou pravděpodobně potvrzenou komponentou mPTP (Carraro et al., 2014).

Vlastní struktura K-ATP kanálu je další neznámou. Knockouty genů pro komponenty tradičně popisované jako součásti membránových K-ATP kanálů otevření mito-K-ATP nebrání (Miki et al., 2002). Objev, že mito-K-ATP kanál je schopen inhibovat aktivitu sukcinátdehydrogenázy (SDH) vedl k pokusu o koimunoprecipitaci proteinů interagujících s SDH, jehož výsledkem byl komplex mitochondrial ATP-binding cassette protein-1 (mABC1), ATP-syntáza, ANT a PiC. Tyto proteiny vykazovaly aktivitu mito-K-ATP kanálu a byly ovlivněny aktivátory a inhibitory mito-K-ATP (Ardehali a O'Rourke, 2005) (obr. 4). Nelze si nevšimnout, že ANT, PiC a F0/F1 ATPáza jsou současně navrhovány jako komponenty mPTP. Další studie zjistila odlišnosti v charakteru protekce proti Ca^{2+} overloadu: zatímco otevření mito-K-ATP (diazoxid) oddálilo nástup mitochondriálního bobtnání, ale neovlivnilo jeho progresi, Cs-A (blokátor mPTP) neovlivnil nástup mitochondriálního bobtnání, avšak zpomalil jeho progresi. Charakter protekce inhibitorem ANT byl ovšem analogický protekci diazoxidem a nikoliv Cs-A (Akao et al., 2003). Uvedené nálezy zpochybňují roli ANT jako komponenty mPTP a naznačují možnou funkci ANT jako komponenty mito-K-ATP kanálu.

Vyloučení některých proteinů ze struktury mPTP neznamena, že nemohou mít regulační funkci. Např. VDAC je přímo fosforylován protektivními kinázami (např. Akt (Steenbergen et al., 2009)) a podílí se na transpotech Ca^{2+} . Asociace mPTP s hexokinázou je ovlivněna kardioprotektivními enzymy (např. Akt (Majewski et al., 2004)) a metabolické faktory jsou popsány i u kardioprotektivních intervencí.



Obr. 4: Možné komponenty mito-K-ATP kanálu (upraveno podle: (Ardehali a O'Rourke, 2005)).

4.2.1.4 Kyslíkové radikály (ROS)

Mitochondrie při své činnosti produkuje kyslíkové radikály (ROS), které mohou přímo poškozovat cílové mitochondriální struktury. Ženské srdce má nižší produkci ROS ve srovnání s mužským srdcem (Borras et al., 2003). Existují popisy přímé aktivace mPTP pomocí ROS. Původně se tak předpokládalo jejich škodlivý efekt. Tento koncept ovšem dostal zásadní trhliny zjištěním, že samotné kyslíkové radikály se podílejí na protekcích IPC (přehled (Matsuzaki et al., 2009)), IPoC (Penna et al., 2006b) i chronickou hypoxií (Kolar et al., 2007). Uvedené kardioprotektivní intervence byly (alespoň částečně) zrušitelné aplikací antioxidantů.

Mito-K-ATP kanál a produkce ROS jsou navzájem propojeny (přehled (Matsuzaki et al., 2009)). Podání diazoxidu vedlo k inhibici respirace a produkci kyslíkových radikálů. Valinomycin, látka neselektivně zvyšující permeabilitu pro K^+ , vykazoval bifázický vliv na produkci ROS, s maximem produkce při stejné permeabilitě membrány pro K^+ jakou normálně dosahuje mito-K-ATP kanál, což implikuje, že produkce ROS by přímo mohla být cílem otevření mito-K-ATP kanálu. Bohužel vztah je dále komplikován nálezem, že některé ROS (superoxid) způsobují otevření mitochondriálního K-ATP kanálu v bovinním srdci (Zhang et al., 2001). Pokud se nejedná o mezidruhový rozdíl je tedy možné, že mezi mito-K-ATP kanálem a produkcí kyslíkových radikálů existuje pozitivní zpětnovazebný okruh.

Oproti tomu existují práce, které popisují pokles produkce alespoň některých ROS v důsledku otevření mito-K-ATP kanálu (hydroxylové radikály (Lu et al., 2006)). Je možné, že se efekt ROS liší v závislosti na typu (superoxid vs. hydroxylový radikál), koncentraci (nízká vs. vysoká) nebo době působení (před reperfuzí vs. v reperfuzi). Adaptace na chronickou hypoxii byla zrušitelná antioxidanty pouze částečně a u kontrol antioxidanty samy mírně snížily rozsah infarktu (Kolar et al., 2007). Studie specificky zaměřené na tyto rozdíly ovšem chybí.

4.2.1.5 Efekt NO v mitochondrii

S kyslíkovými radikály může úzce souviset i efekt NO. NO je dobře známá kardioprotektivní molekula (IPC (Muscarelli et al., 2004), IPoC (Penna et al., 2006a)), nicméně s nejasným mechanismem působení. Jednou z možností je působení přes

protektivní kinázy (Protein kináza G - PKG). Existují práce prokazující kardioprotektivní efekt NO nezávislý na PKG (Sun et al., 2013). Nejčastěji se vyskytujícím vysvětlením je takzvaná S-nitrosylace (SNO) proteinů s možným vlivem na jejich funkci (včetně Cyp-D). Existuje ovšem i druhé vysvětlení. Je známo, že NO je slabým inhibitorem cytochromů, převážně cytochromů a3 (cytochrom oxidáza). Podání NO spolu se superoxidem vede k výrazné inhibici komplexů I a II, která je zrušitelná podáním superoxididismutázy, což naznačuje pravděpodobné působení přes peroxynitrit (Jekabsone et al., 2003). S tím se shoduje nález, že přímá inhibice komplexu I vyvolala blokádu mPTP dokonce ještě silnější, než jakou docílila aplikace Cs-A (Chauvin et al., 2001).

Zde je však zřejmý nesoulad s prací popisující nárůst mitochondriální respirace v důsledku otevření K-ATP kanálu, který by měl vést k produkci superoxidu při současné aktivaci protektivních kináz (např. Akt), která zároveň vyprodukuje NO (přes eNOS) (Holmuhamedov et al., 1998). Dále bylo popsáno otevření mPTP způsobené peroxynitritem (analogický konflikt jako u kyslíkových radikálů) a tento efekt byl blokovatelný Cs-A. Podíl ovlivnění mitochondriálních cytochromů oxidem dusnatým v kardioprotektivních mechanismech tedy nelze jednoznačně rozhodnout.

4.2.1.6 Mitochondriální membránový potenciál

U mitochondriálního membránového potenciálu existují asi nejzásadnější rozpory. Tradičně je popisována depolarizace jako efekt mPTP a protektivní intervence jsou spjaty se zabráněním kolapsu mitochondriálního potenciálu (Xu et al., 2001). V průběhu postnatální ontogeneze byla popsána nejprve přítomnost jedné populace mitochondrií s vysokým membránovým potenciálem a později druhé populace s nízkým membránovým potenciálem (Skarka et al., 2003). Oproti tomu, jako přímý následek otevření mito-K-ATP kanálu nebo IPC, je současně popisován pokles mitochondriálního membránového potenciálu (Holmuhamedov et al., 1998). Studie kontinuálně měřící membránový potenciál v průběhu reperfúze popsala nejprve nárůst potenciálu následovaný po určité době poklesem, který se vyskytl pouze u variabilního počtu mitochondrií (Juhászova et al., 2004).

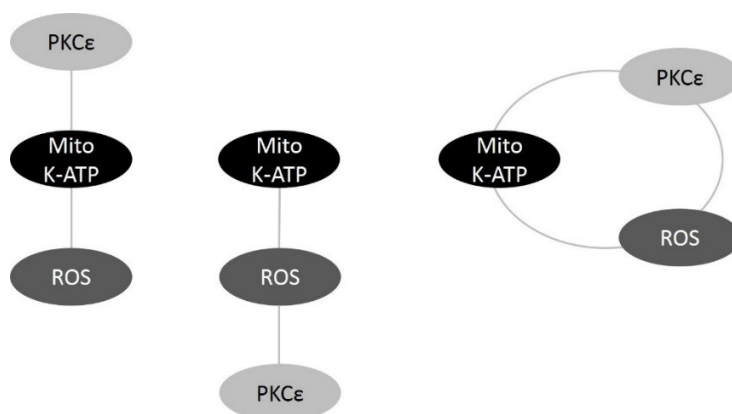
Pravděpodobné vysvětlení spočívá v nerozlišování příčiny a důsledku. mPTP může neselektivní permeabilizací membrány způsobit kolaps membránového

potenciálu, což ovšem nevypovídá o hodnotách potenciálu před otevřením mPTP, kdy naopak protektivní může být nízký potenciál (např. v důsledku otevření mito-K-ATP). Vysoký membránový potenciál naopak může fungovat jako hnací síla pro transport kalcia do mitochondrie.

4.2.1.7 Mitochondriální enzymy

Do mitochondrie jsou translokovány některé molekuly pomocí přenašečů v membráně mitochondrie. Jedním z nich je přenašeč TOM20. Tento přenašeč translokuje některé kardioprotektivní enzymy (např. PKC ϵ (Budás et al., 2010)). Blokáda tohoto přenašeče ruší efekt protekce diazoxidem, ačkoliv neruší efekt protekce preconditioningem (Rodríguez-Sinovas et al., 2006).

Existují popisy účinku protektivních kináz v mitochondrii (např. PKC ϵ (Costa et al., 2006)) downstream od mito-K-ATP. Aktivace kináz v mitochondrii může být způsobena ROS a tyto mohou přímo fosforylovat cílové proteiny. Zde je však nutná opatrnost. Existují kolidující popisy PKC ϵ jako upstream od mito-K-ATP (Korge et al., 2002) a je možné, že PKC ϵ má sama bazální aktivitu nedostatečnou pro otevření mito-K-ATP, avšak její blok zabrání otevření mito-K-ATP např. pomocí diazoxidu. Nelze vyloučit ani pozitivní zpětnovazebný okruh mezi PKC ϵ , mito-K-ATP a ROS. Existuje studie prokazující závislost efektu mito-K-ATP na ROS i PKC (Juhászová et al., 2004). Možná vysvětlení viz obr. 5.



Obr. 5: Možná zapojení mito-K-ATP, ROS a PKC ϵ . Ve všech případech blok PKC ϵ zruší efekt aktivátorů mito-K-ATP (v prvním posunutím prahu pro otevření mito-K-ATP, v druhém přerušením signálu downstream od mito-K-ATP a ve třetím přerušením zpětnovazebného okruhu).

4.2.1.8 Mitochondriální kalcium

V průběhu ischemie dochází ke kalciovému overloadu mitochondrií. Mitochondrie obsahuje složitý systém transportu kalcia, obsahující minimálně tři prvky:

1) mitochondriální kalciový uniportér (MCU), který je odpovědný za pasivní import kalcia

2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník (NCX), odpovědný za sekundárně aktivní eflux Ca^{2+}

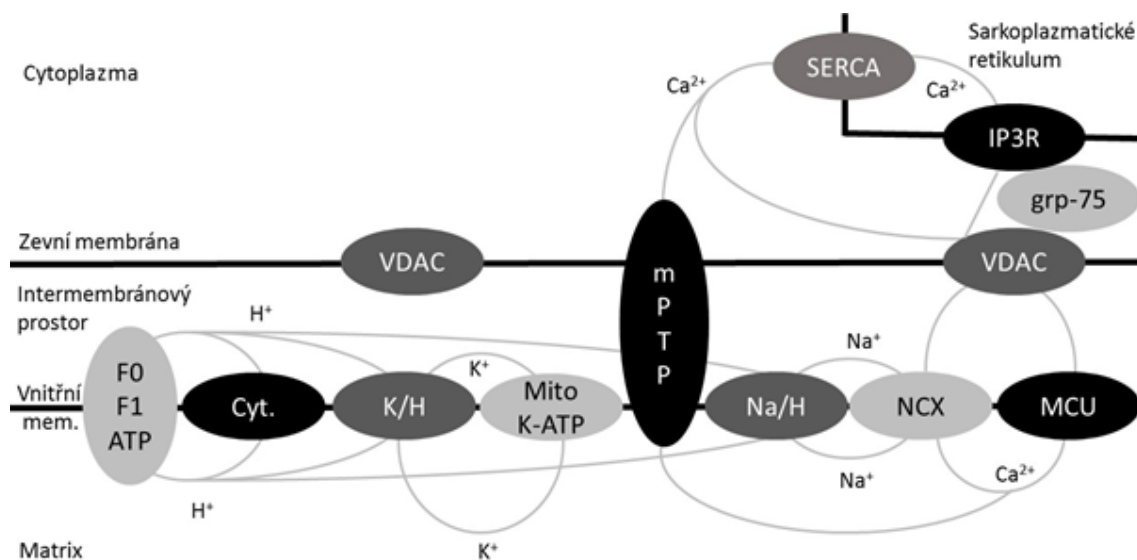
3) na Na^+ nezávislý eflux

Tento eflux může být fyziologickou funkcí mPTP, které je otevíráno kalcem a vede k jeho efluxu a při nižších hodnotách kalciového overloadu mPTP může ve skutečnosti mitochondrii chránit právě před excesivní akumulací kalcia (přehled (Rizzuto et al., 2009)). Všechny transportní mechanismy v mitochondrii a SR jsou zobrazeny na obr. 6.

Samotná blokáda MCU je pro kardioprotektivní efekt dostatečná, což naznačuje nutnost ovlivnění kalcia v mitochondriální matrix (Cao et al., 2006). Efekt IPC byl ztracen aktivátorem MCU a kardioprotekce po jeho aplikaci byla obnovena aplikací Cs-A (Zhang et al., 2006). Mitochondrie ze samičího srdce mají nižší uptake kalcia (Arieli et al., 2004). Mitochondrie z neonatálního srdce jsou výrazně méně citlivé ke kalcem indukovanému bobtnání a rychlost jeho nástupu je cca poloviční oproti dospělému srdci (Milerova et al., 2010).

Kalcium aktivuje dehydrogenázy Krebsova cyklu a může tedy ovlivňovat mitochondriální respiraci (při růstu srdeční frekvence roste koncentrace Ca^{2+} v cytosolu a následkem toho produkce ATP v mitochondrii (Jouaville et al., 1999)). Matrixové kalcium také otevírá mPTP. Byla popsána inhibice mitochondriální respirace v součinnosti s NO (Jekabsone et al., 2003), avšak není jasné, zda se nejedná o důsledek ztráty cytochromů v důsledku mPTP.

Transport kalcia do mitochondrie je pravděpodobně veden přes VDAC. VDAC je neselektivní kanál, permeabilní pro kationty i anionty při nízkém membránovém potenciálu, výrazně zvyšující svoji selektivitu pro kationty při vysokém membránovém potenciálu (přehled (Rizzuto et al., 2009)). Samotná overexprese VDAC zvyšuje transport kalcia do mitochondrie. Do tohoto transportu je pravděpodobně zapojeno sarkoplazmatické retikulum, což bude rozvedeno dále.



Obr. 6: Transпорты ионů в митохондрии и саркоплазматическом ретикулу (SR). Cytochromy vytvoří gradient H^+ , který je použit pro činnost ATPázy a elektroneutrálních výměníků K^+/H^+ a Na^+/H^+ . Kalium proudí do matrix přes mito-K-ATP kanál a je zpětně pumpováno ven K^+/H^+ výměníkem. Natrium pohání Na^+/Ca^{2+} výměník (NCX), který slouží jako fyziologický eflux pro Ca^{2+} , které se do matrix dostane přes MCU. Při excessu matrixového Ca^{2+} dochází k otevření mPTP. Ca^{2+} se do mitochondrie dostává ze sarkoplazmatického retikula cestou IP3R a VDAC.

4.2.1.9 Další mitochondriální iontové přenašeče

Za tvorbu gradientu K^+ by měl být odpovědný mitochondriální K^+/H^+ exchanger na vnitřní membráně mitochondrií (obr. 6). Tento antiport je elektroneutralní a je řízen pouze koncentracemi uvedených iontů (s možným tokem oběma směry).

Možné vysvětlení mitochondriálního transportu kalia je následující. K^+/H^+ exchanger vytvoří K^+ gradient na vnitřní membráně mitochondrie. Tento gradient je zkratován otevřením mito-K-ATP kanálu, což způsobí pokles mitochondriálního potenciálu a zvýšenou spotřebu kyslíku, pravděpodobně v důsledku uncouplingu (Ardehali a O'Rourke, 2005). Samotná aplikace uncoupleru (2,4-dinitrofenolu) má kardioprotektivní efekt (Minners et al., 2000). Existují sice názory, že efekt diazoxidu je nezávislý na mito-K-ATP (protože je nezávislý na koncentraci K^+), toto je ovšem výrazně zpochybňuje. Mitochondrie také obsahuje Na^+/H^+ výměník, který by mohl být

odpovědný za tvorbu gradientu Na^+ , potřebného pro $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (Numata et al., 1998).

4.2.2 Vliv extramitochondriálního kalcia a pH na kardioprotektivní intervence

4.2.2.1 Extramitochondriální kalcium

V cytosolu je udržována nízká hladina kalcia činností $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku (NCX) a Ca-ATPázy (PMCA) na plazmatické membráně. Zvýšení může být způsobeno přestupem Ca^{2+} z extracelulárního prostoru nebo ze SR (cestou receptoru pro inositol-tri-fosfát – IP3R, dihydropyridinového receptoru nebo ryanodinového receptoru). Zpětná resorpce kalcia jde cestou kalciových ATPáz sarkoplazmatického retikula – SERCA.

IP3R sarkoplazmatického retikula se po aktivaci spojuje do clusterů uvolňujících Ca^{2+} . Bylo popsáno spojení IP3R ze SR a VDAC zevní mitochondriální membrány pomocí grp75 (Szabadkai et al., 2006) a těsná asociace mitochondrií a SR, zprostředkovaná pomocí tzv. mitochondria-associated ER membranes (MAM) (přehled (Rizzuto et al., 2009)). Blokáda inhibitoru SERCA (phospholamban) zvyšuje ischemicko-reperfuční poškození po 30 minutách, přičemž blok MCU a mPTP stále má protektivní efekt (Shintani-Ishida et al., 2012). Zvýšení poškození lze vysvětlit jedinež tak, že Ca^{2+} způsobující mPTP se do mitochondrie dostane přes SR (aktivace SERCA zvýší Ca^{2+} v SR a následkem toho i v mitochondrii). Schéma přenosu Ca^{2+} mezi SR a mitochondrií je součástí obr. 6.

Tradiční cesta přestupu kalcia z ECT jde přes Ca^{2+} kanály, v ischemicko-reperfučním poškození však byla popsána jiná cesta. Ischemie vede k influxu Na^+ do buňky, který je následně spojen s influxem Ca^{2+} přes membránový $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX). Při reperfuzi pak dochází k efluxu Na^+ přes tento přenašeč a normalizace intracelulárního Na^+ je spjata s dalším overloadem Ca^{2+} se všemi z toho vyplývajícími důsledky pro mPTP, viz přehled (Ovize et al., 2010). Samotná blokáda NCX má kardioprotektivní efekt analogický IPoC, ovšem při současné aplikaci s IPoC se jejich efekt vzájemně vyruší (Kaljusto et al., 2010). Ačkoliv vysvětlení uvedeného nálezu je

komplikované, je zřejmé, že membránový NCX hraje roli v ischemicko-reperfuzním poškození.

Na základě uvedených nálezů se dá uvažovat o mechanismu kalciového overloadu, obsahujícímu influx Ca^{2+} přes membránový NCX, jeho akumulaci v SR přes SERCA, následný transport do mitochondrie přes komplex IP3R-grp75-VDAC a MCU a následné otevření mPTP. U neonatálního srdce je však nutné si všimnout, že ačkoliv absence Ca^{2+} v SR by byla elegantním vysvětlením vysoké odolnosti neonatálního myokardu, popsáný vývoj citlivosti ke kalciovým blokátorům (růst citlivosti do 4. dne a následný pokles do 7. dne (Ostadalova et al., 1993)) a vývoj efektu IPC (bez efektu 1. i 4. den a počátek efektu 7. den a zjevný efekt 10. den (Ostadalova et al., 1993; Ostadalova et al., 1998)) si neodpovídají.

4.2.2.2 Vliv pH na kardioprotekci

Acidotická reperfuze má protektivní efekt srovnatelný s kardiprotektivními intervencemi (Inserete et al., 2008). Alkalická reperfuze (bikarbonát, pH 7,7) ruší protekci IPC (Hausenloy et al., 2007). Mechanismem může být ovlivnění iontových přenašečů viz přehled (Ovize et al., 2010). Blokáda Na^+/H^+ exchangeru je kardioprotektivní, avšak je výrazně efektivnější při aplikaci před ischemií než v reperfuzi, což naznačuje možné ovlivnění intracelulární akumulace Ca^{2+} v ischemii (Bugge a Ytrehus, 1995).

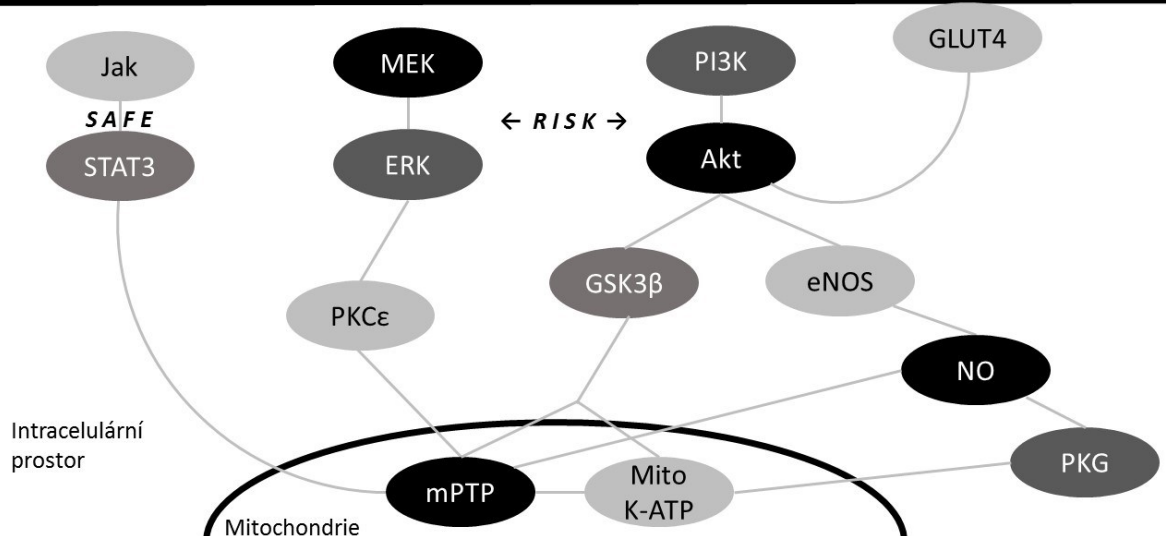
Acidóza zároveň přímo blokuje aktivaci apoptotických enzymů. V ischemii dochází k translokaci calpainu, avšak jeho aktivace nastane až v reperfuzi po normalizaci pH. Zároveň je možné, že acidóza samotná aktivuje protektivní dráhy (protektce byla zrušitelná aplikací scavengerů ROS, blokátory protein kinázy C (PKC) a antagonistou mito-K-ATP (5-HD) (Cohen et al., 2007)). Nízké pH také inhibuje mPTP viz přehled (Ovize et al., 2010).

4.2.3 Signalizační dráhy

Protektivní signál se musí k cílovým strukturám (mitochondrie, SR) dostat až z cytoplazmatické membrány. Za přenos kardioprotektivního vlivu jsou odpovědné intracelulární signalizační dráhy (obr. 7).

Extracelulární
prostor

Adenosin, bradykinin, opioidy, inzulin, estrogeny, erythropoetin



Obr. 7: Schéma kardioprotektivních drah.

4.2.3.1 Dráha RISK – PI3K/Akt

První a zřejmě nejvýznamnější dráhou účastníci se kardioprotekce je tzv. dráha RISK (reperfusion injury salvage kinase). Tato dráha je složena ze dvou komponent, kterými jsou dráhy PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) – Akt – GSK3 β (glykogensyntáza-kináza 3 Beta) a dráha MEK1,2 – ERK, která patří k MAPK (MAP-kinázám).

Dráha PI3K/Akt je aktivována řadou signálních molekul, mj. inzulinem a IGF-1. Akt přímo inhibuje některé apoptotické proteiny (BAX), aktivuje eNOS a produkuje NO, ovlivňuje další proteinkinázy (např. GSK3 β) a ovlivňuje transkripční faktory (NF- κ B). Akt dále fosforyluje GLUT 4 a má tedy metabolické účinky. Za nejvýznamnější však lze považovat objev závislosti protektivního vlivu Akt na mito-K-ATP a mPTP viz přehled (Hausenloy a Yellon, 2004). Vzhledem k rychlosti efektu protekce IPOC je mechanismus protekce závislý na transkripčních faktorech nepravděpodobný a zřejmě se musí jednat o přímý vliv na cílové mitochondriální struktury.

Existují však další možnosti popsané mimo kardioprotekci. Z onkologických studií víme, že Akt fosforyluje IP3R a tím blokuje uvolnění Ca²⁺ ze SR a jeho transport

do mitochondrií, což je mechanismem rezistence některých nádorů k apoptotickým stimulům (Szado et al., 2008), ovšem s evidentními možnými implikacemi pro kardioprotekci.

IPoC brání otevření mPTP a tento efekt je závislý na PI3K/Akt (Tsang et al., 2004). Analogická závislost byla nalezena také u IPC a remote conditioningu. Nejasná zůstává role u protekce chronickou hypoxií, kde jsou v popředí popisovány jiné kinázy (např. PKC δ), avšak inhibice Akt způsobila částečnou ztrátu protekce, byť nižší než u IPC, jehož efekt kompletně zrušila (Ravingerova et al., 2007). Akt zároveň může být odpovědná za protekci ženského srdce, jelikož je aktivována estrogeny (Simoncini et al., 2000). V neonatálním srdci je přítomna velká zásoba inaktivní Akt (Liaw et al., 2013).

4.2.3.2 *Dráha RISK – MEK1,2/ERK*

S protekcí způsobenou Akt úzce souvisí některé MAPK (mitogen activated protein kinase), konkrétně dráha MEK1,2/ERK. Tato dráha je aktivována některými růstovými faktory, např. TGF- β a je funkčně spjata s dráhou Akt, což potvrzují nálezy z onkologie, kdy u nádorů závislých na jedné z uvedených kináz (Akt, ERK) při její inhibici druhá převezme její funkci (Sunayama et al., 2010). Z onkologických studií dále víme, že ERK blokuje otevření mPTP, zřejmě mechanismem závislým na GSK3 β a fosforylaci Cyp-D (Rasola et al., 2010). Protektivní vliv ERK byl také popsán u řady protektivních intervencí (např. IPoC (Darling et al., 2005)).

Pro roli ostatních MAPK (JNK a p38) existují konfliktní údaje. Je možné, že slouží k adaptaci na chronickou hypoxii (u králíků byla spojena s jejich aktivací a inhibicí PKC ϵ , JNK nebo p38 vedla k zrušení protektivního efektu (Rafiee et al., 2002)). Na druhou stranu reoxygenace po akutní hypoxii vede k aktivaci JNK a p38, IPoC byl spojen s jejich inhibicí a jejich farmakologická aktivace vedla k zrušení protekce IPoC (Sun et al., 2006). MAPK by s výjimkou ERK měly sloužit jako adaptace na stresové podněty. ERK může ve skutečnosti sloužit jako odbočka od jinak potenciálně škodlivých drah (možná ostatní MAPK, cAMP, PLC-Ca²⁺), které její aktivací zpětnovazebně omezují svoje účinky. Kromě toho v astrocytech aktivátor mito-K-ATP zvýšil úroveň fosforylace ERK, což implikuje další pozitivní zpětnovazebný okruh (Wang et al., 2013).

4.2.3.3 Glykogen-syntáza-kináza 3 beta (GSK3 β)

Další kinázou je glykogen-syntáza-kináza 3 beta (GSK3 β). Tento enzym má kromě fosforylace a inhibice glykogen-syntázy řadu dalších funkcí. V kardioprotekci je protektivní její inhibice. Knockout GSK3 β je protektivní i bez další intervence a diazoxid a inzulin nevyvolávají protekci u myši s konstitutivně aktivní GSK3 β (Juhaszova et al., 2004). U onkologických studií byla popsána GSK3 β dependentní fosforylace Cyp-D (Rasola et al., 2010). Bohužel studie týkající se inhibice GSK3 β přímo u IPoC jsou opět konfliktní. První studie prokázala pouze efekt Cs-A a ztrátu protektivního efektu inhibice GSK3 β i IPoC u knock-in GSK3 β (Gomez et al., 2008). Krátce nato ovšem byla publikována studie, kdy IPC i IPoC měly efekt u knock-inu GSK3 β a její inhibitory byly bez efektu i u kontrol, zatímco Cs-A protektivní efekt stále měl (Nishino et al., 2008). Neonatální srdce vykazuje vysoký stupeň inhibice GSK3 β v prvním postnatálním týdnu (Liaw et al., 2013).

4.2.3.4 Skupina PKC

Další skupinou kináz je skupina PKC, zejména PKC ϵ a PKC δ . V kardioprotekci byl popsán efekt neklasických izoform PKC (δ , ϵ) závislých na DAG a nikoliv Ca²⁺ viz přehled (Budás et al., 2007). Z hlediska reperfuze poškození u IPC a IPoC je protektivní inhibice PKC δ (Inagaki et al., 2003) a aktivace PKC ϵ (Zatta et al., 2006). Ovšem u chronické hypoxie byla popsána upregulace PKC δ a downregulace PKC ϵ (Kolar et al., 2007). Rozpor mezi efekty uvedených izoform PKC by se dal vysvětlit jako analogie situace u MAPK; PKC ϵ a ERK jsou protektivní u akutních intervencí, které zároveň blokují JNK, p38 a PKC δ , kdy tyto jsou naopak protektivní u chronické hypoxie. I zde mohou být pozitivní zpětnovazebné okruhy. Adenovirová infekce neonatálních potkaních kardiomyocytů s expresí PKC ϵ aktivovala ERK pouze s minimálním efektem na JNK, zatímco exprese PKC δ aktivovala JNK bez ovlivnění ERK a spustila apoptózu (Heidkamp et al., 2001). V neonatálním srdci dochází ke změnám exprese izoform PKC, kdy izoforma α je přítomna již první den, zatímco izoforma δ byla přítomna až sedmý postnatální den (Ostadalova et al., 1998).

4.2.3.5 *Dráha NO/PKG*

V souvislosti s popisovanými efekty NO je uvažován efekt PKG. Existují studie dokladující efekt NO nezávislý na PKG (Sun et al., 2013), které byly rozvedeny v kapitole týkající se NO v mitochondrii. Oproti tomu existují práce prokazující závislost IPoC na cGMP a PKG (Costa et al., 2005). Aktivace eNOS je závislá na Akt (Yang et al., 2013). eNOS zároveň ovlivňuje protekci způsobenou chronickou hypoxií (Baker et al., 1999b). Ovšem u lidí s cyanotickými srdečními vadami bylo zjištěno zvýšení exprese iNOS a pokles exprese eNOS (Ferreiro et al., 2001). Je možné, že NO se podílí na zvýšené odolnosti neonatálního srdce, jelikož ta byla snížena inhibitorem NOS (L-NAME (Ostadalova et al., 2002)), neovlivnilo ovšem IPC v neonatálním srdci. Vysvětlení uvedených konfliktů (SNO vs. PKG, eNOS vs. iNOS) je nejasné.

4.2.3.6 *Dráha SAFE (Jak/STAT3)*

Na rozdíl od předchozích drah kardioprotekce drahou SAFE (=Survivor activating factor enhancement, Jak/STAT3) způsobuje pouze malé zvýšení aktivit Akt a ERK a není zrušitelná jejich inhibicí. Tato dráha je aktivována pomocí TNF α , a jejím výsledným efektem by mohlo být přímé ovlivnění komponent apoptózy (Bad, Bcl-2 (Lecour et al., 2005)). STAT 3 se translokuje do mitochondrie a má inhibiční účinek na mPTP (Boengler et al., 2010). Kardioprotekce IPC i IPoC je závislá na STAT 3, avšak u knockoutu STAT 3 stále fungoval IPoC závislý na dráze RISK, což vedlo k hypotéze, že dráha SAFE funguje jako regulátor dráhy RISK (Goodman et al., 2008).

4.2.3.7 *Shrnutí signalizačních drah*

I vliv signalizačních drah v kardioprotekci zřejmě bude komplikovanější. Pravděpodobně se zde budou vyskytovat pozitivní zpětnovazebné okruhy (např. MAPK-PKC). Navíc existuje studie dokládající závislost aktivace Akt na Cyp-D (Hausenloy et al., 2010). IPC vůbec nedocílil fosforylace Akt u Cyp-D knockout myši. Klasickou interpretací by toto znamenalo, že Akt je downstream od Cyp-D. Spíše se domníváme, že by zde mohl existovat velký zpětnovazebný okruh.

4.2.4 Signalizační molekuly

Existence remote conditioningu a fakt, že protekci IPC lze přenést i mezi různými zvířaty transfuzí, upozornil na význam signalizačních molekul v kardioprotekci. V důsledku kardioprotektivních intervencí dochází k vyplavení řady lokálně působících látek spouštějících kardioprotektivní dráhy, mezi něž patří např. adenosin, bradykinin nebo opioidy. Řada dalších látek je schopna farmakologicky navodit kardioprotekci, avšak zatím bez důkazů o jejich přímém vlivu v kardioprotektivních intervencích. Sem patří např. inzulin nebo erythropoetin viz přehled (Ovize et al., 2010).

Intersticiální adenosin se zvyšuje v průběhu ischemie u prasat a jeho odstranění (deaminázou) neovlivňuje rozsah ischemie, avšak ruší efekt IPC. U IPoC zpomaluje vyplavování adenosinu ze srdcí po ischemii. Existuje řada konfliktních nálezů u studií snažících se o určení typu adenosinového receptoru zodpovědného za kardioprotekci viz přehled (Ovize et al., 2010). Za nejrelevantnější nález ovšem považujeme zjištění, že uvedené receptory fungují v součinnosti (kardioprotekce A₁ agonistou byla zrušitelná knockoutem obou podtypů A₂ receptoru (Zhan et al., 2011)), což uvedené konflikty vysvětluje.

Role bradykininu v kardioprotektivních intervencích byla prokázána zjištěním, že efekt IPC u králíků je zrušitelný aplikací antagonistů bradykininových receptorů (Wall et al., 1994). Efekt bradykininu byl potvrzen i u IPoC a byl závislý na popsáných mechanismech kardioprotekce viz přehled (Ovize et al., 2010). Dále byla popsána závislost IPC a IPoC na opioidech. Uvedená data spojuje studie naznačující závislost kardioprotekce bradykininem a opioidy na mito-K-ATP a ROS, což implikuje jejich společný mechanismus účinku. Nutno ovšem podotknout, že uvedená studie nenalezla analogickou závislost u adenosinu (Cohen et al., 2001).

Byl popsán kardioprotektivní efekt kombinace glukóza-inzulin-draslík, následné práce ovšem prokázaly, že za kardioprotektivní efekt je primárně odpovědný inzulin. Inzulin aktivuje protektivní dráhu PI3K/Akt a její downstream efekty a jeho protektivní efekt je zrušitelný inhibitory Akt (Jonassen et al., 2000) a NO (Gao et al., 2002). Analogický kardioprotektivní efekt závislý na Akt má také IGF-I a další růstové faktory.

Za zvýšenou odolnost samičího srdce mohou být odpovědné estrogény. Ačkoliv existují konfliktní údaje ohledně jejich kardioprotektivního efektu (zejména ve vztahu k substitučním terapiím), estrogenové receptory nefungují pouze jako transkripční faktory, nýbrž ovlivňují i intracelulární signalizační dráhy včetně aktivace dráhy PI3K/Akt/eNOS (Simoncini et al., 2000). Byla také popsána aktivace dalších kardioprotektivních struktur estrogény jako je eNOS nebo mito-K-ATP.

Poslední v tomto přehledu popsanou kardioprotektivní látkou je erythropoetin (EPO). Kardioprotekce EPO je závislá na Akt a ERK (Mudalagiri et al., 2008). Vzhledem k tomu, že intermitentní hypoxie zvyšuje hladinu EPO, se tento může podílet na jejím protektivním efektu.

4.2.5 Metabolické faktory

V kardioprotekci se mohou uplatňovat i metabolické faktory. Ačkoliv je kardioprotekce spíše výsledkem aktivace protektivních kináz a původní teorie zkoušející metabolické intervence (např. glukózu nebo draslík) se nepotvrdily, metabolické faktory jsou u kardioprotektivních intervencí popsány a mohly by být důsledkem aktivace příslušných signalizačních drah.

Efekt IPoC je závislý na uchování glykolytické aktivity. IPoC zvýšil translokaci GLUT4 a glykolýzu a inhibice glykolýzy (iodoacetát) zrušila jeho protektivní efekt (Correa et al., 2008). Tento výsledek lze očekávat vzhledem k faktu, že jednou z molekul spouštějících kardioprotekci je inzulin a jeho signalizační dráha PI3K/Akt (Jonassen et al., 2000) a asociaci mPTP s hexokinázou. Potřeba glykolýzy v ischemicko-reperfuzním poškození je navíc logická vzhledem k nedostatku kyslíku pro činnost mitochondrií, nebo v nutnosti generovat dostatek ATP pro vyloučení excessu intracelulárního kalcia. Analogické metabolické efekty byly popsány i u IPC a byl navržen mechanismus jejich účinku přes Akt a AMPK (Ji et al., 2013).

IPC způsobuje pokles zásob ATP před ischemií. IPC ovšem výrazně zpomaluje depleci zásob ATP v po 10 minutách ischemie. Po 40-ti minutové ischemii však mezi nimi nebyl rozdíl (Murry et al., 1990). Ischemie a reperfuze výrazně snížila rychlost syntézy ATP a IPC ji zvýšil téměř na hodnoty kontrol. Blokáda mito-K-ATP způsobila signifikantní omezení účinku IPC (Fryer et al., 2000). Z toho se dá odvodit, že důležitá

je schopnost syntézy ATP v reperfuzi a nikoliv preservace metabolismu v ischemii. Neonatální srdce vykazuje v ischemii pomalejší pokles koncentrací ATP a vyšší produkci laktátu, což naznačuje právě schopnost efektivně využít glykolýzu k syntéze ATP (viz přehled (Ostadal et al., 2009b)).

4.3 SHRUTÍ LITERÁRNÍHO PŘEHLEDU

I přes řadu nejasností provázejících tuto problematiku se ukazuje značná podobnost mechanismů mezi jednotlivými kardioprotektivními stavy. Problémem může být spíše nedostatečná znalost některých mechanismů a strukturálních detailů (např. u mPTP a mito-K-ATP). Proto se domníváme, že existují pouze dva funkční stavy odpovědné za mechanismy odolnosti myokardu k ischemii a tyto stavy se střídají napříč všemi popsányými intervencemi a stavy s vysokou odolností myokardu.

V prvním stavu, kdy je srdce relativně rezistentní k ischemii, jsou kardioprotektivní dráhy aktivní, mito-K-ATP kanál je otevřen, mPTP je zavřen (resp. má vysoký práh pro otevření), transport kalcia do mitochondrie (a zřejmě i SR) je blokován, naopak eflux kalcia z mitochondrie je podporován a zdrojem energie je anaerobní glykolýza. Protekce se pravděpodobně účastní NO a alespoň některé ROS (superoxid). Tyto podmínky zřejmě splňuje vysoce odolné neonatální srdce.

V druhém stavu jsou kardioprotektivní dráhy neaktivní, mito-K-ATP kanál je zavřen, práh pro otevření mPTP je nízký, transport kalcia do mitochondrie je facilitován (možná vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem) a zdrojem energie pro kardiomyocyt bude převážně utilizace mastných kyselin (přehled viz tab. 1.). Nedostatečná schopnost anaerobní glykolýzy může být příčinou vysoké citlivosti srdce k ischemicko-reperfuznímu poškození.

	Stav rezistentní k ischemii	Stav citlivý k ischemii
Práh pro otevření mPTP	vysoký	nízký
Mito-K-ATP kanál	otevřen	zavřen
Tvorba NO (aktivita NOS)	ano	ne
Transport Ca ²⁺ do mitochondrie	tlumen	facilitován
Aktivita protektivních kináz (Akt)	ano / vysoká	ne / nízká
Převažující zdroj ATP	glykolýza	mastné kyseliny

Tab. 1: Shrnutí hypotézy o dvou stavech kardiomyocytu lišících se citlivostí k ischemii.

5. HYPOTÉZY A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Dizertační práce je založena na následujících hypotézách

1) Kardioprotektivní intervence (ischemický preconditioning a postconditioning) jsou účinné u dospělých srdcí. Neonatální srdce jsou k ischemicko-reperfuznímu poškození odolnější a ischemický preconditioning tuto odolnost dále nezvyšuje. Předpokládáme, že odolnost myokardu v časném neonatálním období se nezvýší pomocí ischemického postconditioningu, jehož ontogenetický vývoj bude obdobný již popsanému vývoji ischemického preconditioningu.

2) V mechanismech kardioprotektivních intervencí u dospělých srdcí se uplatňuje mito-K-ATP kanál a protektivní vliv NO. Předpokládáme, že tyto dva mechanismy se budou podílet i na vysoké odolnosti neonatálního srdce.

Cíle dizertační práce:

1) Analýza vývoje účinnosti ischemického postconditioningu v časném neonatálním období pomocí měření obnovy síly kontrakce (DF) po ischemii a uvolnění enzymu (LDH) z poškozeného myokardu.

2) Analýza účinku blokátoru mitochondriálního K-ATP kanálu 5-hydroxydekanoátu na odolnost neonatálních srdcí a ischemický postconditioning u neonatálních srdcí.

3) Měření endogenní produkce NO pomocí analýzy sérových nitrátů a stanovení nitrotyrozinu v neonatálních srdcích.

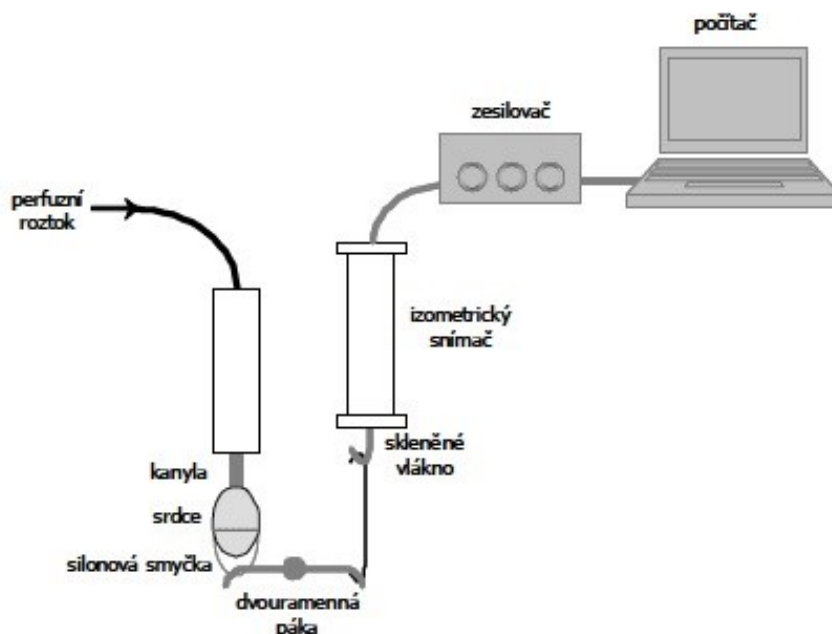
6. METODIKA

Všechny pokusy byly prováděny po schválení odbornou komisí 2. lékařské fakulty UK pro posuzování práce se zvířaty ve výzkumných projektech a v souladu s pravidly *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, publikované US National Institute of Health (NIH číslo 85-23, 1996).

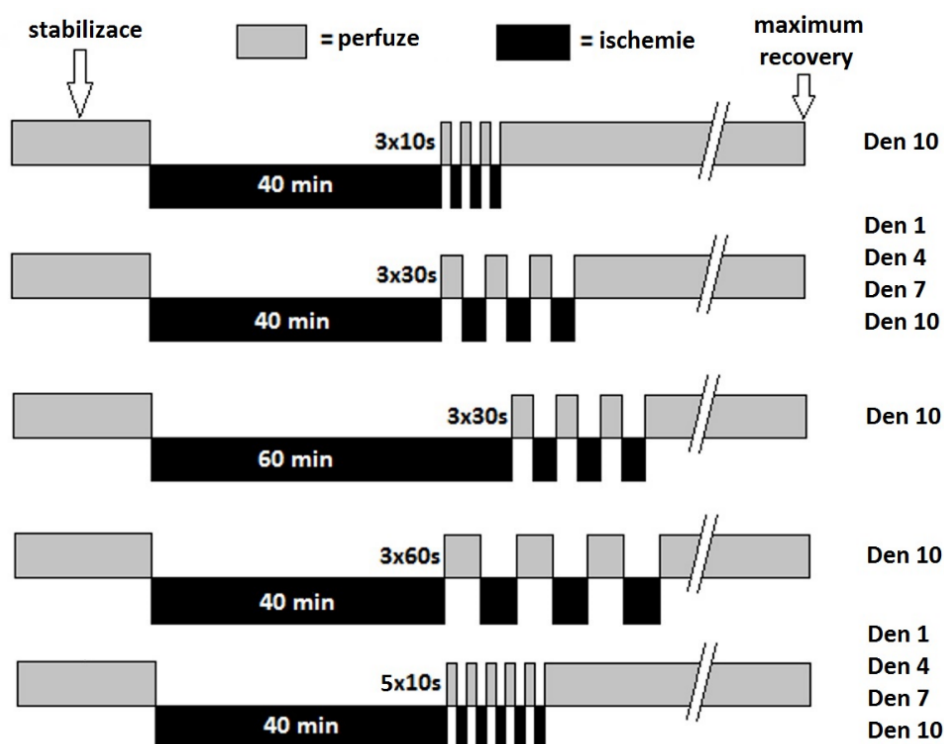
6.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

K pokusům byla použita mláďata laboratorního potkana kmene Wistar ve stáří 1, 4, 7 a 10 dnů. Experimentální a kontrolní skupiny byly složeny z mláďat pocházejících vždy minimálně ze tří hnízd. Mláďata byla zvážena a usmrcena dekapitací. Hrudník byl rychle otevřen a aorta kanylována (nerezovou kanylou s vnějším průměrem 0,45 mm pro 1. a 4. den a 0,8 mm pro 7. a 10. den). Srdce bylo vyjmuto, atria odstraněna a komory byly perfundovány metodou dle Langendorffa za konstantního tlaku, který odpovídal střednímu arteriálnímu tlaku pro dané vývojové stádium (Clubb et al., 1987; Litchfield, 1958) Srdce byla perfundována Krebs–Henseleitovým roztokem, který obsahoval (v mmol/l): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2 a glukózu 7,0. Roztok byl saturován směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂ (pH 7,4); teplota byla udržována na 37 °C. Srdce byla elektricky stimulována frekvencí 200 úderů za minutu s použitím stříbrných elektrod, přiložených na srdeční bazi. Stimulační pulsy měly střídavou polaritu, trvaly 1 ms a jejich voltáž byla oproti prahové hodnotě o polovinu zvýšena. Klidové předpětí bylo pomocí mikrošroubu postupně zvyšováno až na hodnotu, kdy síla kontrakce (DF) dosahuje 80 % maximální síly, dosažené při odpovídajícím preloadu. Síla kontrakce (DF) izolovaného srdce byla měřena pomocí snímače síly kontrakce. Ten byl se srdečním hrotem spojen pomocí silonového úvazu, dvouramenné titanové páky a skleněného vlákna. Kontraktilní parametry byly automaticky vyhodnocovány on-line připojeným počítačem (signál byl patřičně zesílen zesilovačem) obr. 8. Po stabilizaci izolovaného srdce byla zaznamenána startovní hodnota DF. Srdce byla následně vystavena 40 nebo 60 minutám globální ischemie. Srdce, na kterých byl hodnocen účinek ischemického postconditioningu, byla na počátku reperfuze vystavena třem periodám 10, 30 nebo 60 sekundové ischemie nebo

pěti periodám 10 sekundové ischemie oddělené stejně dlouhými periodami perfuze. Protokoly byly voleny na základě přehledu protokolů používaných u dospělých zvířat (Skyschally et al., 2009). Kontrolní srdce byla odpovídající dobu perfundována. Následovala reperfuze do maxima obnovení DF (nejvyšší dosažená hodnota před jejím poklesem, měřeno v tříminutových intervalech) obr. 9. Míra obnovení kontrakce byla vyjádřena jako procento startovní hodnoty.



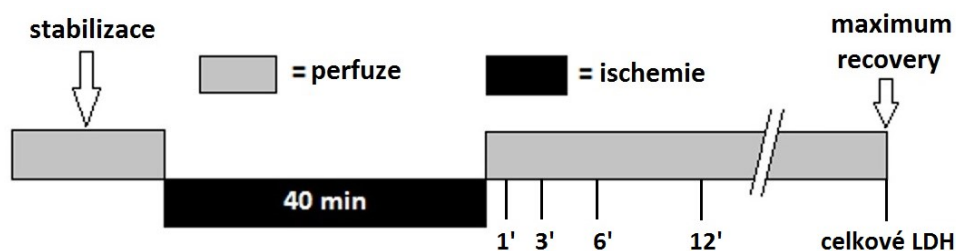
Obr. 8: Schéma měření kontraktility izolovaného neonatálního srdce dle Langendorffa. (CHARVÁTOVÁ, Zuzana. *Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku*. Praha, 2008. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta).



Obr. 9: Přehled experimentálních skupin a protokolů postconditioningu.

6.2 STANOVENÍ ENZYMU LAKTÁTDEHYDROGENÁZY (LDH)

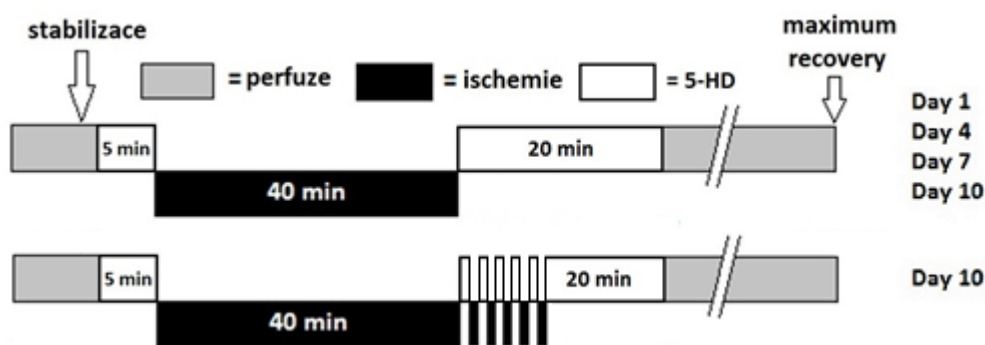
K hodnocení rozsahu poškození srdce byla použita metoda měření obsahu LDH v koronárním efluentu. Vzorke efluentu byly odebírány dle experimentálního protokolu (obr. 10) a množství efluentu bylo zjišťováno zvážením zkumavky před a po odběru. Navíc byl shromažďován veškerý efluent za dobu reperfuze a jeho hmotnost zaznamenávána. Z něho byl odebrán vzorek pro zjištění obsahu celkové LDH uvolněné v průběhu reperfuze. Vzorke určené k měření obsahu LDH byly udržovány při teplotě 4 °C až do doby měření metodou dle (Mukherjee, 2010): 100 µl vzorku bylo inkubováno se 150 µl čerstvě připraveného roztoku NAD^+ (3 mM) a 100 µl laktátu (0,9 M) v TRIS-HCl pufru (0,1 M; pH 9,0) při 37°C po dobu 15 min. Následně bylo přidáno 250 µl 2,4-dinitrofenylhydrazinu (0,1% v 2 M HCl). Reakce byla zastavena 2,5 ml NaOH (0,4 M) a absorbance byla změřena při 505 nm po 20 min. Po kvantitativním určení množství pyruvátu byla vypočtena aktivita LDH. Kalibrace byla provedena standardním roztokem pyruvátu a vyhodnocena pomocí lineární regrese.



Obr. 10: Experimentální protokol pro měření LDH.

6.3 BLOKÁDA MITO-K-ATP KANÁLU U NEONATÁLNÍHO SRDCE

Pro pokusy s blokadou mito-K-ATP kanálu byl použit 5-hydroxydekanoát (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Perfúze dle Langendorffa byla prováděna analogicky pokusům pro ischemický postconditioning. Po stabilizaci byla zaznamenána hodnota DF a srdce byla 5 min perfundována Krebs-Henseleitovým roztokem s 5-HD v 500 μ M koncentraci (Rodrigo a Samani, 2008). Poté byla srdce vystavena 40 minutové ischemii po níž následovalo dalších 20 min perfúze identickým roztokem 5-HD s cílem ovlivnit reperfuční fázi. Další experimentální skupina obdržela současnou aplikaci 5-HD a ischemického postconditioningu 5x10s. Následovala reperfuze standardním Krebs-Henseleitovým roztokem do maxima obnovení DF (analogicky protokolu pro ischemický postconditioning, obr. 11).



Obr. 11: Experimentální protokol pro měření účinku 5-HD.

6.4 STANOVENÍ SÉROVÝCH NITRÁTŮ A NITROTYROZINU V NEONATÁLNÍCH SRDCÍCH

6.4.1 Odběr vzorků

Stanovení množství 3-nitrotyrozinu bylo provedeno ze srdcí a ze séra neonatálních mláďat laboratorního potkana kmene Wistar ve stáří 1. a 10. den. Experimentální a kontrolní skupiny byly složeny z mláďat pocházejících ze tří hnízd. Mláďata byla zvážena a usmrcena dekapitací a byla odebrána smíšená krev. Hrudník byl rychle otevřen, srdce bylo vyjmuto, zváženo a zmrazeno v tekutém dusíku a uchováno při -70°C pro následnou analýzu množství nitrotyrozinu. Krev byla po koagulaci (cca 30min) zcentrifugována při 2900 ot/min po dobu 10 minut. Sérum bylo následně zmrazeno v tekutém dusíku a taktéž uchováno při -70°C pro následnou analýzu.

6.4.2 Stanovení sérových nitrátů

Vzorek séra (25 μl) byl přidán k 5ml 0,1M VCl_3 v 2M HCl s 300 μl protipěněního činidla. Vzorek byl konstantně probubláván He a byl zahříván na 90°C . Nitráty, nitrity a S-nitrososloučeniny byly konvertovány na NO. Uvolněné plyny byly přivedeny do chladiče a plynového probublávače naplněného KOH, což brání poškození NO analyzátoru (NOA) párami HCl. V NOA (Sievers NOA 280i), NO reaguje s O_3 za tvorby excitovaného NO_2^* . Když se nestabilní elektrony NO_2^* vrací do svého základního stavu, tak uvolňují energii. Světelná emise lineárně koreluje s obsahem NO ve vzorku.

6.4.3 Stanovení nitrotyrozinu

Ke stanovení 3 - nitrotyrosinu byly použity vzorky srdečních tkání potkanů ve stáří 1. a 10. postnatální den. 3 - nitrotyrosin byl stanovován v srdeční tkáni po extrakci TBS (tris pufrovaný solný roztok pH 8,3) s inhibitory proteáz (benzamidin, EDTA, PMSF). 100mg tkáně bylo homogenizováno ve 2 ml TBS, extrahováno 30 min při 4°C a centrifugováno (48000 g, 10 min, 4°C). Ve výsledném supernatantu byl stanoven 3 –

nitrotyrosin modifikovanou ELISA metodou pro stanovení 3 - nitrotyrosinu v séru pomocí námi připravené myši monoklonální protilátky (mMAb) NO-60-E3 (vyrobené na zdejší pracovišti) (Fisarkova et al., 2004). 96-jamková polystyrenová destička (Maxisorp, Nunc) byla potažena peroxynitritem nitrovaným BSA v 50 mM uhličitanovém pufru o koncentraci 10 μ g/ml přes noc při 4°C. Blokování nespecifické sorpce bylo provedeno třikrát opakovanou 5 min inkubací s TTBS (TBS s 0,05% Tween-20). Zkoumané vzorky i standardy byly ředěny v TBS pufru s přídavkem 0,1% PVP (polyvinylpyrrolidon) a 0,01% Tween - 20 a napipetováno 50 μ l/jamku takto ředěného standardu či vzorku na blokovanou desku. Následně bylo přidáno 50 μ l/jamku mMAb NO-60-E3 ředěné 1:125 000 v identickém pufru a směs byla inkubována po dobu 60 minut za mírného třepání při laboratorní teplotě (stejná teplota použita i pro všechny následující kroky). Následně byly jamky promyty 3x TTBS a přidáno 100 μ l/jamku anti-myší králičí protilátky konjugované s peroxidázou (Sigma A-8924) naředěné v 1% BSA v PBS v poměru 1:2500. Sekundární protilátka byla na desce inkubována 90 minut za mírného třepání a po následném pětinasobném oplachu PBS s 0,05% Tween-20 byla provedena barevná peroxidázová reakce s o-fenylendiaminem a ukončena po 30 min přidáním 2 M kyseliny sírové. Absorbance byla změřena při 492 nm, standardní křivka a množství 3 - nitrotyrosinu ve vzorcích bylo vypočteno podle Rodbardovy čtyřparametrové rovnice (Rodbard a McClean, 1977). Koncentrace proteinů byla měřena metodou kyseliny bicinchoninové (Smith et al., 1985) a je vyjádřena na gram extrahovaného proteinu.

6.5 STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ

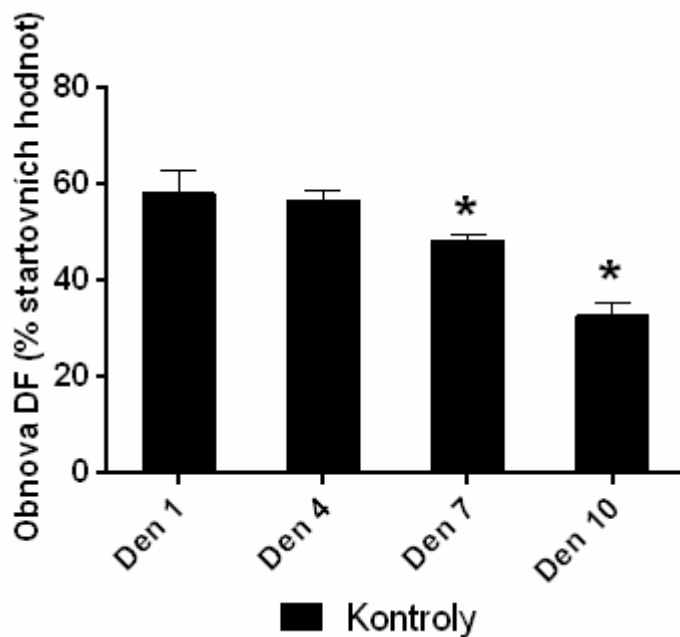
Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (S.E.M.). Výsledky byly získány z nejméně sedmi izolovaných srdcí v každé skupině ischemického postconditioningu a jejich kontrol. U analýzy LDH byly ve skupině vždy nejméně čtyři vzorky. Výsledky pro určení účinku 5-hydroxydekanoátu byly získány z nejméně šesti izolovaných srdcí v každé skupině. Stanovení sérových nitrátů a 3-nitrotyrosinu bylo provedeno z deseti vzorků v každé skupině. Rozdíly v obnově kontraktility mezi jednotlivými skupinami ischemického postconditioningu byly hodnoceny použitím analýzy variace. ANOVA a následný Student-Neuman-Keulsův test byl použit pro analýzu variace uvnitř skupin. Stejným způsobem byl

hodnocen účinek 5-hydroxydekanoátu na neonatální srdce a ischemický postconditioning. LDH bylo analyzováno porovnáním Pearsonova korelačního koeficientu s kritickou hodnotou a následným provedením lineární regrese. Rozdíly mezi skupinami LDH byly hodnoceny pomocí nepárových t-testů. Hodnoty sérových nitrátů a tkáňového 3-nitrotyrozinu byly také hodnoceny pomocí nepárových t-testů. Statistické rozdíly byly považovány za významné při $p < 0,05$. Ke statistickému zpracování výsledků byl použit program Statview 5.0. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 6.07 for Windows.

7. VÝSLEDKY

7.1 VÝVOJ ODOLNOSTI K ISCHEMICKO-REPERFUZNÍMU POŠKOZENÍ

Neonatální srdce se vyznačovala vysokou odolností k ischemicko-reperfuznímu (I/R) poškození (vyjádřenou jako míra obnovení síly kontrakce) 1. a 4. postnatální den, která poté signifikantně poklesla 7. a 10. postnatální den (obr. 12).



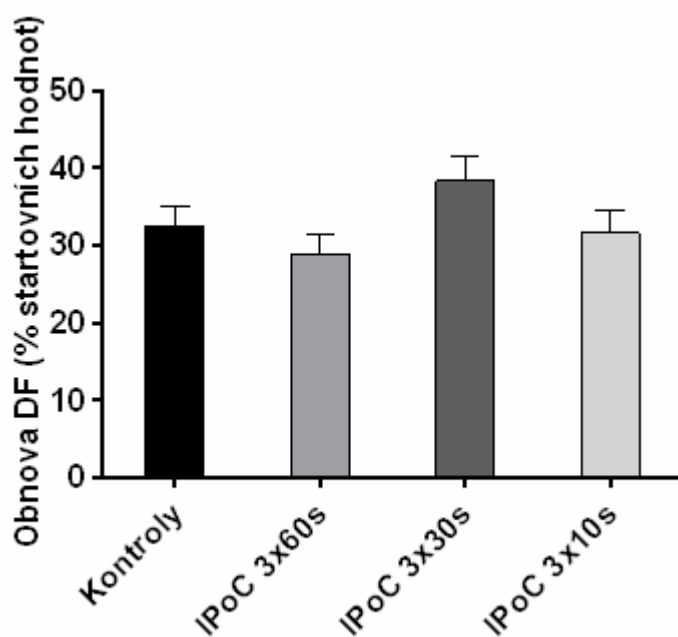
Obr. 12: Vývoj odolnosti neonatálních srdcí k I/R poškození v závislosti na věku.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 1. dni

7.2 ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING

7.2.1 10. den

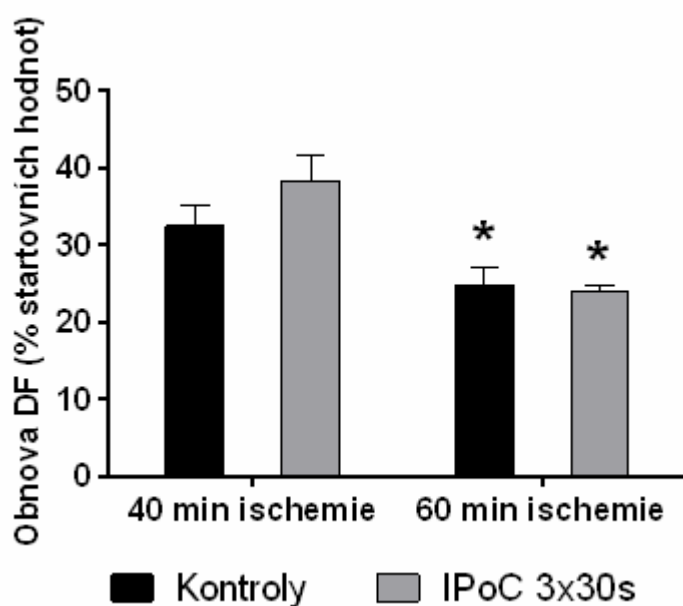
Protektivní efekt IPC není přítomen 1. postnatální den, ale objevuje se až 7. a 10. postnatální den. U IPoC jsme očekávali podobný výsledek. Na základě protokolů používaných u dospělých zvířat jsme zvolili tři protokoly (3x10s, 3x30s a 3x60s) a tyto otestovali 10. postnatální den. Žádný z uvedených protokolů nevykázal signifikantní protektivní efekt (obr. 13).



Obr. 13: Odolnost k ischemii a tři protokoly IPoC u 10 denních zvířat.

7.2.2 Vliv délky globální ischemie

V minulosti byla popsána závislost efektu ischemického preconditioningu na délce ischemie, kdy protektivní efekt, nepřítomný u 20 a 30 minutové ischemii, se projevil teprve po 40 a 60 minutové ischemii (CHARVÁTOVÁ Zuzana. *Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku*. Praha, 2008 Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta). Vzhledem k naznačenému, avšak nesignifikantnímu, efektu protokolu 3 x 30 sekund byl tento protokol otestován s délkou ischemie prodlouženou na 60 minut. Protektivní efekt se přesto neprojevil (obr. 14).

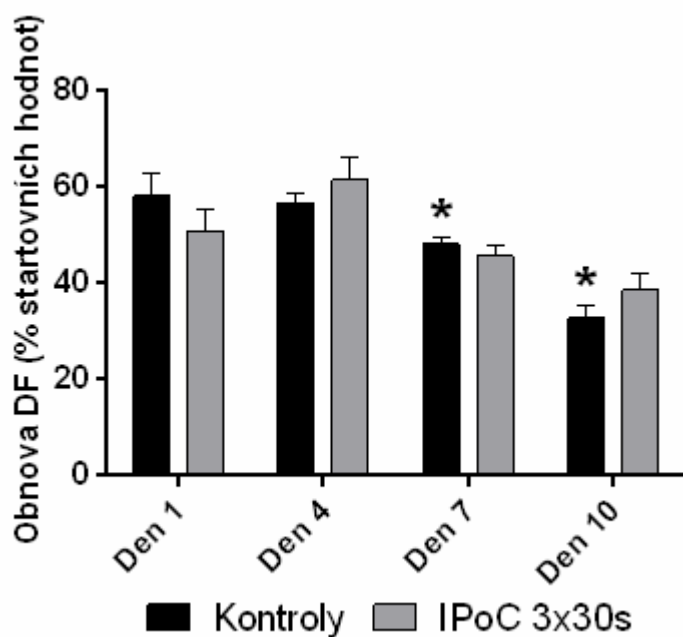


Obr. 14: Vliv délky globální ischemie na účinnost protokolu IPoC 3x30 sekund.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 40 min ischemii

7.2.3 Vývoj efektu ischemického postconditioningu

Protokol ischemického postconditioningu 3 x 30 sekund byl následně otestován v průběhu časného postnatálního vývoje. V žádném z testovaných stáří (1., 4., 7. a 10. postnatální den) se neobjevil signifikantní protektivní účinek (obr. 15).

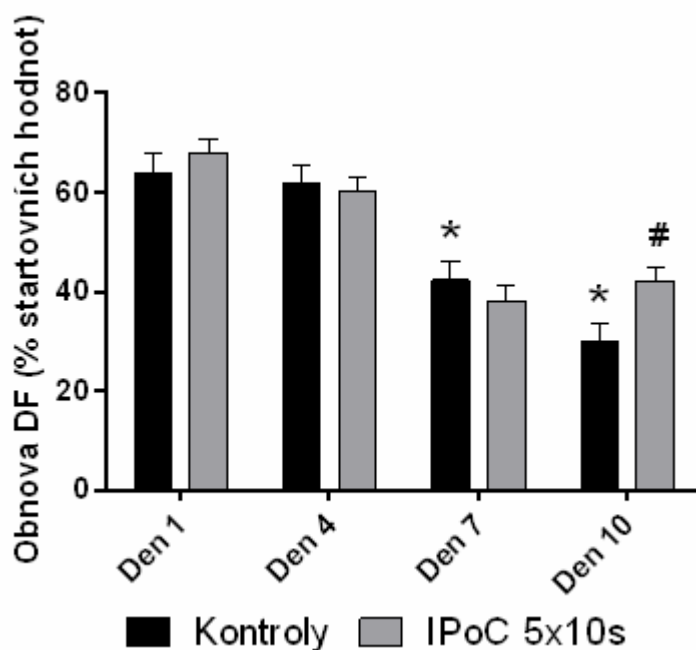


Obr. 15: Ischemický postconditioning v průběhu postnatálního vývoje.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 1. dni

7.2.4 Protokol 5 x 10 sekund

Společně s pokusy týkajícími se efektu 5-hydroxydekanoátu (viz dále) byl otestován další protokol ischemického postconditioningu (5x10s). Tento protokol vykázal signifikantní protektivní efekt u 10 denních zvířat (obr. 16).



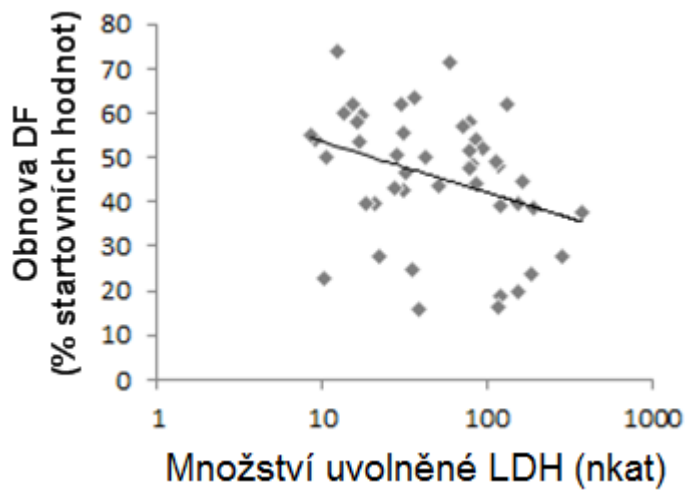
Obr. 16: Protokol ischemického postconditioningu 5 x 10 sekund.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 1. dni

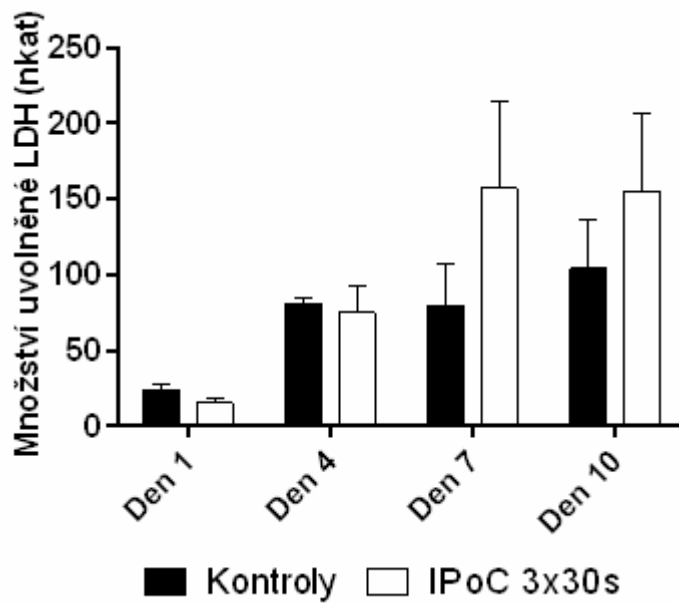
signifikantní ($p < 0,05$) oproti 10 denním kontrolám

7.3 STANOVENÍ LDH U ISCHEMICKÉHO POSTCONDITIONINGU

Metoda stanovení aktivity LDH v koronárním efluentu byla použita jako další způsob určení rozsahu ischemicko-reperfuzního poškození. Míra obnovení síly kontrakce (DF) a množství vyplavené LDH vykazovaly signifikantní negativní korelaci (obr. 17). U protokolu IPoC 3 x 30 sekund nebyl nalezen signifikantní rozdíl v aktivitě LDH ve stářích 1., 4. a 7. postnatální den. Signifikantní rozdíl se nevyskytl ani u výše zmíněného protokolu 60 minutové ischemie 10. postnatální den (obr. 18).



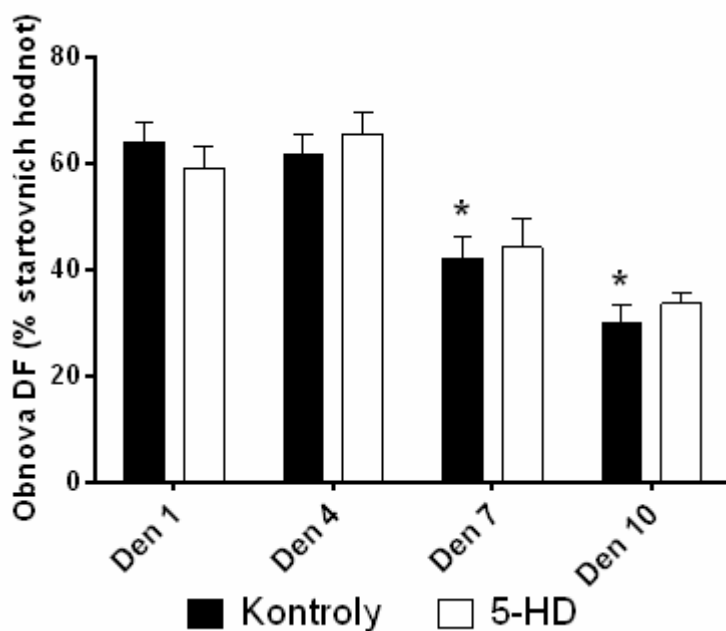
Obr. 17: Statisticky signifikantní ($p < 0,05$) negativní korelace množství uvolněné LDH a obnovy DF.



Obr. 18: Množství uvolněné LDH u kontrol a ischemického postconditioningu v průběhu ontogenetického vývoje (1-7. den měřeno po 40-ti min ischemii, 10. den po 60-ti min ischemii).

7.4 VLIV PODÁNÍ BLOKÁTORU MITO-K-ATP KANÁLU NA ODOLNOST NEONATÁLNÍCH SRDCÍ

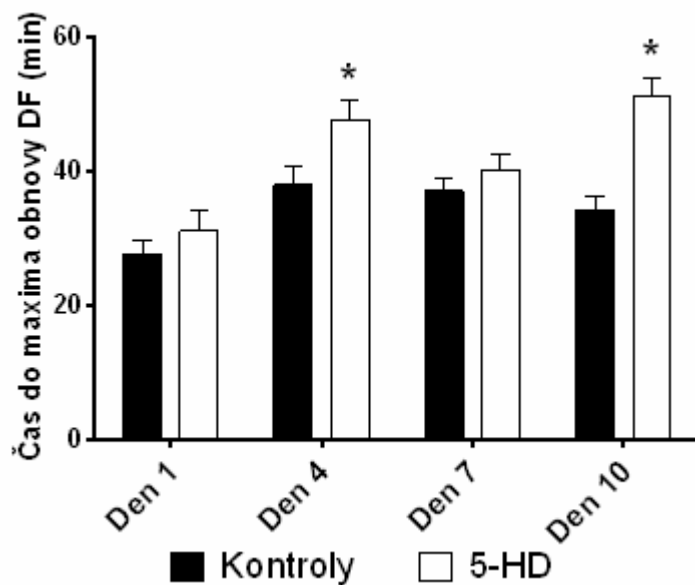
Blokátor mito-K-ATP kanálu podávaný před ischemií odolnost neonatálních srdcí neovlivnil (Ostadalova et al., 2002). 5-HD má ovšem krátký biologický poločas, a proto byla použita aplikace 5-HD před i po globální ischemii s cílem snížit odolnost neonatálního srdce ovlivněním reperfuze. V žádném z testovaných stádií (1., 4. a 10. den) 5-HD neměl signifikantní efekt na odolnost neonatálních srdcí (obr. 19).



Obr. 19: Vliv podání blokátoru mito-K-ATP kanálu 5-HD na odolnost neonatálních srdcí.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 1. dni

Podání 5-HD v uvedeném protokolu vedlo k signifikantnímu prodloužení doby do maximální obnovy DF 4. a 10. postnatální den, ačkoliv konečnou dosaženou hodnotu obnovy DF neovlivnilo (obr. 20). Vývoj u kontrol odpovídá normálnímu vývoji popsanému v předchozích studiích.

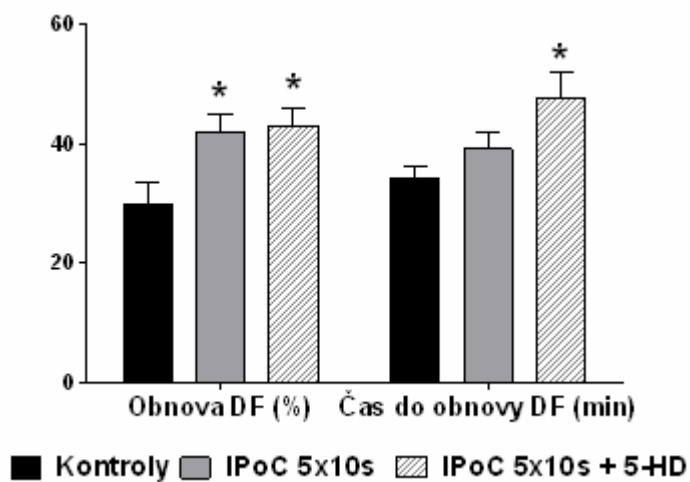


Obr. 20: Vliv podání blokátoru mito-K-ATP kanálu 5-HD na čas do maxima obnovení DF.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti příslušné kontrolní skupině

7.5 VLIV PODÁNÍ BLOKÁTORU MITO-K-ATP KANÁLU NA ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING

Protektivní efekt postconditioningu 5x10s podání 5-HD neovlivnilo. Čas do obnovy DF byl ovlivněn pouze 5-HD a nikoliv postconditioningem (obr. 21).



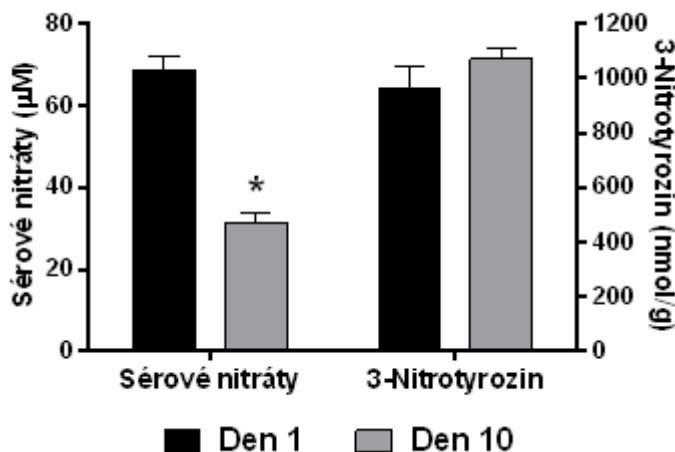
Obr. 21: Vliv podání 5-HD na ischemický postconditioning; obnova DF a čas do maxima obnovení DF.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti příslušné kontrolní skupině

7.6 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ SÉROVÝCH NITRÁTŮ A NITROTYROZINU V NEONATÁLNÍCH SRDCÍCH

L-NAME snížilo odolnost neonatálních srdcí k ischemii (Ostadalova et al., 2002), ale o možné produkci NO u neonatálních zvířat nebylo nic bližšího známo. U 1 denních potkanů jsme našli signifikantně vyšší hladiny sérových nitrátů oproti 10 denním potkanům (obr. 22).

Kyslíkové radikály (ROS) zřejmě hrají důležitou úlohu v kardioprotektivních mechanismech u dospělých srdcí (Matsuzaki et al., 2009) a jejich tvorba byla asociována s mito-K-ATP kanálem (Andrukhiv et al., 2006). 3-nitrotyrozin vzniká interakcí tyrozinu s peroxynitritem, který vzniká z NO a superoxidu. Žádný rozdíl v obsahu 3-NT v neonatálních srdcích mezi 1. a 10. postnatálním dnem jsme ovšem nenalezli (obr. 22).



Obr. 22: Sérové nitráty a 3-nitrotyrozin v neonatálních srdcích u 1. a 10. denních potkanů.

* signifikantní ($p < 0,05$) oproti 1. dni

8. DISKUZE

Naše pokusy potvrdily vysokou odolnost srdcí neonatálních potkanů k ischemicko-reperfuznímu poškození (měřeno jako obnovení síly kontrakce po ischemii a pomocí uvolnění LDH), která v průběhu prvních deseti postnatálních dnů klesá. Kardioprotektivní efekt ischemického postconditioningu se 10. postnatální den podařilo vyvolat pouze pomocí protokolu 5x10s, ostatní protokoly byly neúčinné. Protektivní efekt protokolu 3x30s se neobjevil ani při prodloužení délky ischemie na 60 minut. U vysoce odolných neonatálních srdcí do 7. postnatálního dne se dle očekávání protektivní efekt nepodařilo vyvolat.

Podání blokátoru mito-K-ATP kanálu, 5-hydroxydekanoátu, navzdory našim očekáváním, odolnost neonatálních srdcí nesnížilo. Stejně tak blokáda mito-K-ATP kanálu neovlivnila protektivní efekt protokolu 5x10s ischemického postconditioningu. U tří z pěti pokusných skupin došlo k prodloužení času do maximální obnovy DF, což je neočekávaný nález.

V séru 1-denních neonatálních potkanů byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny sérových nitrátů oproti 10. postnatálnímu dni, což je v souladu s očekávaným kardioprotektivním vlivem NO u neonatálních zvířat. Navzdory tomu nebyl nalezen rozdíl v množství 3-nitrotyrozinu v neonatálních srdcích mezi prvním a desátým postnatálním dnem, což implikuje možnou absenci superoxidu v neonatálních srdcích.

8.1 METODY MĚŘENÍ ÚČINNOSTI POSTCONDITIONINGU

8.1.1 Měření síly kontrakce (DF)

K určení odolnosti neonatálních srdcí k ischemicko-reperfuznímu poškození byla použita metoda měření obnovení síly kontrakce po proběhlé ischemii. Tato metoda nejlépe odpovídá požadavkům naší studie, jelikož nejlépe koreluje s tíží skutečného ischemického poškození (Ostadalova et al., 1998). Kardiomyocyt zaniklý v ischemii se již není schopen dále kontrahovat a při konstantním preloadu bude zánik kardiomyocytů odpovídat poklesu kontraktility a síly kontrakce. Jiné veličiny, jako je například čas do

obnovy síly kontrakce, nemusí korelovat s mírou ischemického poškození. Pokud bychom se dívali pouze na rychlost obnovy síly kontrakce, tak bychom odvodili chybný závěr, že neonatální srdce je ve 4. postnatálním dni méně odolné k ischemicko-reperfučnímu poškození. Přitom 4-denní neonatální srdce svou sílu kontrakce obnovuje sice pomaleji, ale na stejnou procentní hodnotu, jako srdce ve stáří jednoho dne. Z uvedených důvodů tedy reperfúze probíhala tak dlouho, dokud stále docházelo k růstu síly kontrakce. Čas do maxima obnovy síly kontrakce byl analyzován nezávisle na velikosti této obnovy. V minulosti často používaný čas do vzniku kontraktury také nekoreluje s mírou ischemického poškození (Quantz et al., 1992).

8.1.2 Stanovení enzymu laktátdehydrogenázy (LDH)

Jako druhá metoda měření rozsahu I/R poškození bylo použito měření uvolněné LDH v koronárním efluentu. Uvolňování kardiospecifických enzymů je i v klinice dobře známou a používanou metodou zjišťování přítomnosti ischemického poškození. Při pokusech dle Langendorffa navíc odpadá diferenciální diagnostika zdroje této LDH (perfundováno je pouze srdce). Tato metoda byla také použita v předchozích pracích zabývajících se odolností neonatálního srdce a protektivním účinkem Sf-A (CHARVÁTOVÁ Zuzana. *Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku*. Praha, 2008 Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta). Navíc je běžně dostupná a využívána např. i v pokusech na dospělých zvířatech.

8.1.3 Použité protokoly ischemického postconditioningu

Jelikož se jedná o první studii zabývající se IPoC u neonatálních potkanů, dosud nemáme, na rozdíl od dospělých potkanů, k dispozici jiná data týkající se efektu různých protokolů IPoC u neonatálních zvířat. Protokoly IPC jsou odlišné a obvykle používají menší počet delších ischemií (3x3min (Ostadalova et al., 1998)). Naše protokoly byly voleny na základě logické snahy o zkrácení délky ischemií (typické pro protokoly IPoC v dospělém srdci) a na základě přehledu protokolů používaných u dospělých zvířat (Skyschally et al., 2009)). Obecně lze vysledovat určitou tendenci k vyšší účinnosti protokolů s větším počtem kratších ischemií. Na druhou stranu lze

nalézt popsanou účinnost i u protokolu 2x30s na dospělých potkanech (Ferrera et al., 2009). Nelze vyloučit, že jiné protokoly IPoC by měly vyšší účinnost.

8.2 ISCHEMICKÝ POSTCONDITIONING

Neonatální srdce byla v 1. a 4. postnatálním dni signifikantně odolnější k ischemicko-reperfuznímu poškození, tato odolnost 7. a 10. postnatální den klesla. Nález je v souladu s předchozími pracemi týkajícími se IPC (Ostadalova et al., 2002; Ostadalova et al., 1998).

Jedním z hlavních výsledků pozorovaných při našich pokusech je nemožnost zvýšení odolnosti k ischemii u neonatálních srdcí v časném období posnatálního vývoje. Výsledky pokusů s protokolem 3x30s se mírně liší od předchozích výsledků ischemického preconditioningu a adaptace na chronickou hypoxii, kde se objevily známky protekce již koncem prvního postnatálního týdne (Ostadalova et al., 2002; Ostadalova et al., 1998). Oproti tomu výsledky pokusů s protokolem 5x10s již odpovídají těmto předchozím pracím. Možným vysvětlením je vyšší účinnost tohoto protokolu oproti protokolům použitým v předchozích pokusech (3x10s, 3x30s, 3x60s).

Byla také nalezena signifikantní negativní korelace mezi množstvím uvolněné LDH a obnovou DF. Výsledky získané měřením LDH jsou analogické výsledkům měření obnovy DF (byť mají nižší přesnost oproti výsledkům DF). Korekce na množství uvolněného effluentu ani korekce na hmotnost srdcí nevedla ke zvýšení přesnosti výsledku. Vzhledem k absenci signifikantního výsledku v celkové uvolněné LDH nebyla analýza jejího vyplavování v čase dále prováděna.

Nemožnost zvýšit počáteční vysokou odolnost neonatálních srdcí k ischemicko-reperfuznímu poškození implikuje, že se možná jedná o obecnější biologický fenomén. Počáteční vysoká odolnost nemůže být dále zvýšena pomocí další protektivní intervence. Podobnou odolností jako neonatální srdce se vyznačují také vysoce odolná srdce poikilotermních zvířat (Overgaard et al., 2004) nebo srdce premenopauzálních žen (Ostadal et al., 2009a), kdy se uplatňuje vliv estrogenů v aktivaci (Simoncini et al., 2000).

8.3 MITOCHONDRIÁLNÍ K-ATP KANÁL

8.3.1 Použitá metoda blokády mito-K-ATP kanálu

Druhým zásadním výsledkem našich studií bylo zhodnocení efektu blokády mito-K-ATP kanálu pomocí 5-HD aplikovaným před i po reperfuzi v nejvyšším používaném dávkování (Rodrigo a Samani, 2008). Tato aplikace byla volena kvůli minimalizaci rizika neúčinnosti 5-HD kvůli jeho krátkému poločasu. Studie prokazující efekt 5-HD na IPC byly provedeny na jiných zvířatech (králík) a používaly kratší protokoly ischemie (Baker et al., 1999a). Použití 40-ti minutového protokolu ischemie u neonatálních potkanů vyplývá z předchozích studií (kratší protokoly ischemie nepoškodily srdce natolik, aby ischemický preconditioning měl protektivní efekt) (CHARVÁTOVÁ Zuzana. *Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku*. Praha, 2008 Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta).

8.3.2 Efekt blokády mito-K ATP kanálu

Navzdory volenému protokolu podání 5-HD odolnost neonatálních srdcí k ischemicko-reperfuznímu poškození neovlivnilo v žádném z testovaných stádií. Jedním z možných vysvětlení je, že mito-K-ATP kanál se skutečně na vysoké odolnosti neonatálních srdcí nepodílí. Příčina vysoké odolnosti neonatálních srdcí k ischemicko-reperfuznímu poškození tak zřejmě spočívá v jiných mechanismech.

Existuje i jiné možné vysvětlení. Struktura mito-K-ATP kanálu není dobře známa ani u dospělých srdcí a je možné, že 5-HD vůbec nepůsobí na neonatální mito-K-ATP kanál. Skutečně jsou popsány vývojové změny např. ANT (více ANT2 a méně ANT1 v prvním postnatálním týdnu (Skarka et al., 2003)) a ANT je popsáno jako možná komponenta mito-K-ATP (Ardehali a O'Rourke, 2005). Pokud by 5-HD pro svůj efekt vyžadoval přítomnost ANT1, tak by existovalo vysvětlení pro absenci jeho účinku, přičemž funkce mito-K-ATP by v neonatálním srdci stále mohla být zprostředkována přes ANT2. 5-HD má efekt na β -oxidaci mastných kyselin (Hanley et al., 2005) a není jasné, zda toto souvisí s jeho inhibicí mito-K-ATP kanálu. Nelze vyloučit, že působí nepřímo přes jinou komponentu, která také nemusí být v neonatálním srdci přítomna. Použití jiného blokátoru K-ATP kanálů by však nebylo

selektivní (působí i na sarkoplazmatické kanály) a interpretace výsledků by byla podobně složitá.

5-HD jsme následně aplikovali s protokolem ischemického postconditioningu s cílem ovlivnit jeho efekt. Podání 5-HD neovlivnilo IPoC v 10. postnatálním dni, což svědčí spíše o rozdílných mechanismech IPoC v neonatálním a dospělém srdci, než o neúčinnosti 5-HD na neonatální srdce. 10. postnatální den již klesá exprese ANT2, avšak zatím výrazně nestoupá exprese ANT1 (ta je zvýšena až 20. postnatální den). Roli také mohou hrát mezidruhové rozdíly. Existují diskrepance týkající se efektu 5-HD mezi studii na potkanech a králících (Baker et al., 1999a; Ostadalova et al., 2002). U králíků však existují i rozdíly v efektu IPC v neonatálním období (Liu et al., 1998). Neočekávaným výsledkem u některých skupin je ovlivnění času do maxima obnovy DF pomocí 5-HD, což by mohlo být vysvětleno jako efekt na kontraktilitu (popsán v studiích na dospělých zvířatech (Garlid et al., 2006)) a nikoliv jako efekt na ischemicko-reperfuzní poškození. Čas do maxima obnovy DF nevykazuje žádný vztah k velikosti obnovy DF (srovnej obr. 19 a obr. 20).

8.4 OXID DUSNATÝ

8.4.1 Stanovení sérových nitrátů

Dalším cílem našich pokusů bylo určení možného vlivu NO na odolnost neonatálních srdcí. NO má kardioprotektivní efekt v dospělých srdcích (Zhang et al., 2000) a L-NAME redukovalo protektivní efekt IPoC (Penna et al., 2006a). L-NAME také snížilo vysokou odolnost neonatálních srdcí k ischemicko-reperfuznímu poškození (Ostadalova et al., 2002). Náš nálezný zvýšené hladiny sérových nitrátů u 1-denních potkanů naznačuje, že zvýšená produkce NO by mohla hrát roli ve vysoké odolnosti jejich srdcí. Stále však zbývá řada otázek. Zdroj této produkce NO není dostatečně identifikován. V dospělých srdcích je jím pravděpodobně eNOS aktivovaná pomocí Akt (Yang et al., 2013). V neonatálních srdcích je vyšší množství Akt, ale není konstitutivně aktivní (Liaw et al., 2013). Jakým mechanismem se NO podílí na protekci, také není zcela jasné; v dospělých srdcích byla navržena S-nitrosylace (Sun et al., 2013).

8.4.2 Stanovení nitrotyrozinu v neonatálních srdcích

Analogický výsledek nebyl nalezen v případě měření 3-NT. Existují dvě možná vysvětlení. První možností je, že v neonatálních srdcích chybí superoxid nutný pro vznik peroxinitritu (a 3-NT). Toto by mohlo potvrzovat absenci efektu mito-K-ATP kanálu, jelikož jeho otevření je v dospělých srdcích spojeno s produkcí superoxidu (Matsuzaki et al., 2009). Navíc tento nálezn je nezávislý na efektu 5-HD a konfliktních komponentách mito-K-ATP, jelikož se jedná o funkční důsledek otevření mito-K-ATP (a jakéhokoliv jiného zvýšení permeability mitochondriální membrány pro K⁺). Na druhou stranu, nálezn zvýšené hladiny nitrátů v séru nemusí nutně souviset s kardioprotekcí v intracelulárním prostoru myokardu. Oproti tomu v dospělých srdcích je podání donoru NO pro protekci dostatečné (Rakhit et al., 1999).

NO se kromě vysoké odolnosti neonatálního myokardu může také podílet na protektivním působení kardioprotektivních intervencí. Stanovení role NO u IPoC v neonatálním srdci však nebylo předmětem našeho výzkumu. Připomínáme, že podání L-NAME neovlivnilo IPC 10. postnatální den (Ostadalova et al., 2002).

8.5 OSTATNÍ MECHANIZMY ODOLNOSTI NEONATÁLNÍHO SRDCE

8.5.1 Možná propojení kardioprotektivních mechanismů

Naše studie v časném postnatálním období se soustředila pouze na dva mechanismy (mito-K-ATP kanál a NO), které hrají roli v kardioprotekci dospělých srdcí. Je vhodné zde připomenout, že těchto mechanismů je celá řada a nelze tak vyloučit roli jiných procesů ve zvýšené odolnosti.

Neonatální srdce i kardioprotektivní intervence v dospělém srdci jsou závislé na glykolýze. Změny ve vývoji metabolismu kalcia by také mohly těmito intervencím odpovídat, na rozdíl od ontogenetického vývoje kardioprotekce ovšem vykazují bifázický vývoj. Odolnost k otevření mPTP je analogická kardioprotektivním intervencím, není však způsobena absencí Cyp-D. V tuto chvíli není jasné, zda se na ní může podílet NO. Inhibice GSK3 β je popsána, není však jasné její možné zapojení k eNOS (připomínáme, že v kardioprotektivních drahách jsou vysoce pravděpodobně pozitivní zpětnovazebné okruhy). Není také otestován vliv aktivace GSK3 β na odolnost

neonatálních srdcí a metodicky by pravděpodobně byl komplikovaný (byl by potřeba genetický knock-in). Další kinázy či mechanismy kardioprotektivních intervencí (např. vliv pH) nejsou v neonatálním srdci popsány vůbec. Pro plné pochopení mechanismů vysoké odolnosti neonatálního srdce bude nutný detailnější popis časného postnatálního vývoje. Vyvíjející se srdce prochází řadou změn a ne každá musí být odpovědná za jeho vysokou odolnost.

Důležitou informací pro analýzu kardioprotektivních mechanismů je jejich pravděpodobné zapojení do pozitivních zpětnovazebných okruhů. Klasická interpretace analyzující kardioprotektivní dráhy jako analogově fungující izolované řady kináz je sporná. V kardioprotektivních intervencích se nachází velké množství míst, kde inhibice „všeho ruší vše“. Intracelulární kinázy pravděpodobně fungují analogicky jako neuron. První linie kináz (analogie dendritů) zpracovává analogově přicházející informace. Ty se sejdou na pozitivním zpětnovazebném okruhu (analogie iniciálního segmentu), který funguje jako analogově digitální převodník – signály se sečtou. Podle toho, které převáží, pak dojde buď k aktivaci nebo inhibici celého okruhu (analogie axonu – buď vše, nebo nic). Existují studie zpochybňující roli Akt v IPoC (Inserte et al., 2013). Vzhledem k tomu, že Akt patří v kardioprotekci k první linii kináz, je možné, že její aktivace pouze není dostatečná k přebití inhibičních signálů downstream ve zpětnovazebném okruhu.

8.5.2 Kardioprotektivní dráha Wnt

V neposlední řadě je nutné zmínit existenci dalších méně známých signalizačních drah, jako je dráha Wnt/Frizzled/Disheveled. Tato dráha je známa především z embryonálního vývoje a také pro svou roli u kolorektálního karcinomu (Disheveled inhibuje komplex APC/GSK3 β , který degraduje β -katenin. Mutace APC je odpovědná za familiární adenomatózní polypózu a přes β -kateninem stimulované dělení buněk za vznik kolorektálního karcinomu). Dráha Wnt je tedy možným zdrojem inhibice GSK3 β nezávislým na Akt (srovnej s neonatálním srdcem, kde inhibice GSK3 β časově odpovídá vývoji odolnosti myokardu k ischemii (Liaw et al., 2013)). Antagonismus dráhy Wnt ruší kardioprotekci IPC (Vigneron et al., 2011). Dráha Wnt je zřejmě propojena s NO (eNOS) (Bandara et al., 2016). Navíc blokáda Wnt má nežádoucí účinky na střevní sliznici i dospělých zvířat (Valenta et al., 2016), což

implikuje, že se nejedná o dráhu s účinky pouze v embryonálním vývoji. Je možné, že tato dráha je odpovědná za hyperplastické dělení v obecnějším rozsahu (srovnej s neonatálním srdcem, které roste hyperplastickým růstem (Kunes et al., 1997)) a nelze vyloučit, že právě ona aktivuje downstream efekty kardioprotekce v neonatálním srdci, což by mohlo vysvětlit nezávislost odolnosti neonatálních srdcí na Akt a mito-K-ATP kanálu. Existují proto další možná vysvětlení vysoké odolnosti neonatálních srdcí, která mohou být předmětem budoucího výzkumu.

8.5.3 Uplatnění kardioprotektivních mechanismů u srdečního selhání

Naskytá se otázka, proč vůbec srdce obsahuje takto složitý systém komponent ovlivňujících jeho odolnost. Jednoduchá hypotéza o „lepší“ či „horší“ stavu srdce nevysvětluje důvod existence tohoto „horšího“ stavu. Neodpovídají ani představy o „vyzrávání“ neonatálního srdce do dospělosti, jelikož např. kalcium vykazuje bifázický vývoj (proč by neonatální srdce nejprve ztrácelo schopnost akumulace kalcia jen, aby ji poté získalo nazpět?). Uvedené kardioprotektivní mechanismy se mohou uplatňovat i u dalších chorob, mezi něž patří např. srdeční selhání. Popisované mechanismy srdečního selhání jsou podobně složité, jako mechanismy kardioprotektivních intervencí, v následujícím odstavci uvedeme alespoň jejich základní srovnání.

Exprese fetálních genů koreluje se závažností srdečního selhání. U srdečního selhání je popsána dysfunkce mitochondrií ve smyslu poklesu oxidativní fosforylace a tvorby energetický fosfátů (fosfokreatin, ATP). Mitochondrie selhávajícího myokardu ztrácejí svůj kontakt se sarkoplazmatickým retikulem a v důsledku toho lze očekávat defektní transport kalcia do mitochondrií. U srdečního selhání dochází k defektům ve funkci sarkoplazmatického retikula, kdy kalcium se neakumuluje v SR (únik přes ryanodinové receptory a pokles funkce SERCA). Blokáda PI3K pomáhá u srdečního selhání. Kalcineurinová dráha je upregulována (efekt CsA na kalcineurin a Cyp-D je považován za oddělený, vzhledem ke komplexnosti signalizačních drah však nelze vyloučit, že spolu souvisí (přehledy viz Rosca a Hoppel, 2013; Tarone et al., 2014)). Selhávající srdce zvýšeně využívá glukózu jako zdroj energie, ovšem pouze anaerobně. Vzhledem k poškození mitochondrií není schopno ji oxidovat (De Jong a Lopaschuk, 2017). Je vhodné připomenout, že v dospělém srdci má otevření mito-K-ATP kanálu negativní vliv na kontraktilitu.

Ne všechny mechanismy vycházejí takto jednoznačně. eNOS je součástí protekce proti srdečnímu selhání a sildenafil je testován jako lék pro srdeční selhání. ROS jsou opět konfliktní (je navrhována závislost na místě produkce, ta je popisována i u kardioprotektivních mechanismů, ovšem z dat lze jen těžko odvodit bližší závěry).

Je však možné prosté vysvětlení, že tyto dva stavy jdou proti sobě. Neonatální srdce nepotřebuje vysoký výkon, proto může být odolné k ischemii. Samci mívají silnější tělesnou konstituci než samice. Hypertrofie srdce většinou není choroba, ale je to reakce na jiné onemocnění, která mu pomáhá vyrovnat se se zvýšenými nároky. Hypertrofická srdce jsou refrakterní na IPoC. To, co je dobré pro přežití ischemie, v dlouhodobém důsledku může vést k srdečnímu selhání. Navíc to, že se některé kardioprotektivní dráhy staly významným předmětem zájmu v oboru onkologie, dobře ukazuje jejich potenciální nežádoucí účinky.

To neznamená, že by nebylo možné jich terapeuticky využívat. Právě naopak, evoluční nastavení může být kompromis mezi riziky jdoucími na obě strany. Kardiomyocyt neví, že centimetr před ním je aterosklerotický plát a pokud se to dozví, např. v podobě IPC, je schopen se na to adaptovat. Selektivní aktivace či inhibice uvedených mechanismů pouze tam, kde je třeba, může představovat velmi významný terapeutický zásah do všech uvedených chorob. Rizika přitom mohou být významně nižší než při chronické dlouhodobé aktivaci. Aktivace kinázy Akt na pár hodin pouze v myokardu, kde je navíc velmi nízká incidence malignit, může být výrazně lepší volbou než dlouhodobá aktivace Akt v celém organismu.

9. SOUHRN

1. Potvrdili jsme, že se neonatální srdce vyznačují vyšší odolností k ischemicko-reperfuznímu poškození (vyjádřenou jako míra obnovení síly kontrakce), která klesá mezi 1. a 10. postnatálním dnem.
2. Ischemický postconditioning nemá protektivní efekt v časných fázích postnatálního vývoje a jeho protektivní efekt se objevuje až 10. postnatální den při použití protokolu 5x10 sekund. Tento protokol je pravděpodobně účinnější než předchozí protokoly 3x10, 3x30 a 3x60 sekund.
3. Délka ischemie neměla v našich pokusech vliv na ischemický postconditioning. Tento náleží je v rozporu s předchozími výsledky u ischemického preconditioningu, kde prodloužení délky ischemie mělo vliv.
4. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v množství uvolněné LDH v koronárním effluentu, což je v souladu s výsledky ischemického postconditioningu, ačkoliv mají nižší přesnost než měření obnovy síly kontrakce (DF).
5. Podání blokátoru mito-K-ATP kanálu 5-HD odolnost neonatálních srdcí neovlivnilo. Nelze vyloučit, že 5-HD ve skutečnosti na neonatální mito-K-ATP kanál nepůsobí. Možná absence superoxidu v neonatálních srdcích a přítomný efekt 5-HD na čas do maxima obnovy DF (pravděpodobně dán jeho vlivem na kontraktilitu) však svědčí proti roli mito-K-ATP kanálu ve vysoké odolnosti neonatálních srdcí.
6. Podání blokátoru mito-K-ATP kanálu 5-HD neovlivnilo přítomný protektivní efekt protokolu IPoC 5x10s 10. postnatální den. Opět nelze vyloučit, že 5-HD na neonatální mito-K-ATP kanál nepůsobí. Pokud by působil, pak by to znamenalo rozdíl v mechanismech IPoC mezi neonatálním a dospělým srdcem.
7. Stanovení sérových nitrátů prokázalo signifikantně vyšší hladiny 1. postnatální den oproti 10. postnatálnímu dni. V kombinaci s předchozím nalezeným efektem L-

NAME na odolnost 1. denních srdcí tento nález podporuje hypotézu, že produkce NO je odpovědná za vysokou odolnost neonatálních srdcí.

8. Nebyl nalezen rozdíl v množství 3-nitrotyrozinu mezi 1. a 10. postnatálním dnem. Možným vysvětlením je absence superoxidu nutného pro vytvoření 3-NT. Vzhledem k tomu, že tvorba superoxidu by měla být podporována otevřením mito-K-ATP kanálu, tento nález podporuje pravděpodobnou neúčast mito-K-ATP na vysoké odolnosti neonatálních srdcí.

10. SUMMARY

1. We have confirmed, that neonatal hearts are characterized by higher resistance to ischemia-reperfusion injury (expressed as recovery of developed force), which drops between 1st and 10th postnatal day.
2. Ischemic postconditioning does not have protective effect in early stages of postnatal development and its protective effect appears only on day 10 of postnatal life while using protocol 5x10 seconds. This protocol is probably more potent than previous protocols 3x10, 3x30 and 3x60 seconds.
3. The length of ischemia in our experiments did not affect the ischemic postconditioning. This finding contradicts previous results regarding ischemic preconditioning, where prolongating ischemia did influence cardioprotection.
4. No significant differences found in LDH release in coronary effluent are in agreement with our results of ischemic postconditioning, although they have lower accuracy compared to recovery of developed force (DF).
5. Application of mito-K-ATP channel blocker 5-HD did not affect the high resistance of neonatal hearts. We cannot rule out, that 5-HD actually does not affect mito-K-ATP channel in neonatal hearts. Probable absence of superoxide in neonatal hearts and existence of effect of 5-HD on time to recovery (probably caused by its effect on contractility) however speak against role of mito-K-ATP channel in high resistance of neonatal hearts.
6. Administering mito-K-ATP channel blocker did not affect protective effect of IPoC protocol 5x10s on day 10. Once again, we cannot rule out that 5-HD actually does not affect neonatal mito-K-ATP channel. If it had an effect, that would mean difference in mechanisms of IPoC between neonatal and adult hearts.

7. Serum nitrates measurement proved significantly higher levels on postnatal day 1 compared to day 10. Taken together with previously found effect of L-NAME on resistance of neonatal hearts on day 1, this finding supports the theory, that NO production is responsible for high resistance of neonatal hearts.

8. We found no difference in 3-nitrotyrosine content between day 1 and day 10. Possible explanation is absence of superoxide that is necessary for 3-NT formation. Since superoxide production should be associated with mito-K-ATP channel opening, this finding supports that mito-K-ATP channel probably does not play role in high resistance of neonatal hearts.

11. LITERATURA

1) Akao M, O'Rourke B, Kusuoka H, Teshima Y, Jones SP, Marban E Differential actions of cardioprotective agents on the mitochondrial death pathway. *Circulation research*, 2003, 92(2), s. 195-202.

2) Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC, Brierley GP Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *The American journal of physiology*, 1992, 262(6 Pt 2), s. H1699-1704.

3) Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2006, 291(5), s. H2067-2074.

4) Ardehali H, O'Rourke B Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2005, 39(1), s. 7-16.

5) Arieli Y, Gursahani H, Eaton MM, Hernandez LA, Schaefer S Gender modulation of Ca(2+) uptake in cardiac mitochondria. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2004, 37(2), s. 507-513.

6) Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature cell biology*, 2007, 9(5), s. 550-555.

7) Baker JE, Holman P, Gross GJ Preconditioning in immature rabbit hearts: role of KATP channels. *Circulation*, 1999a, 99(9), s. 1249-1254.

8) Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW, Pritchard KA, Jr. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999b, 874 s. 236-253.

9) Bandara N, Gurusinghe S, Lim SY, Chen H, Chen S, Wang D, Hilbert B, Wang LX, Strappe P Molecular control of nitric oxide synthesis through eNOS and caveolin-1 interaction regulates osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells

by modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Stem cell research & therapy*, 2016, 7(1), s. 182.

10) Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280(19), s. 18558-18561.

11) Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *The Journal of biological chemistry*, 2008, 283(39), s. 26307-26311.

12) Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS letters*, 1996, 396(2-3), s. 189-195.

13) Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic research in cardiology*, 2010, 105(6), s. 771-785.

14) Bolli R Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2007, 292(1), s. H19-27.

15) Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free radical biology & medicine*, 2003, 34(5), s. 546-552.

16) Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Sun L, Mochly-Rosen D Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 2010, 88(1), s. 83-92.

17) Budas GR, Churchill EN, Mochly-Rosen D Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological research*, 2007, 55(6), s. 523-536.

18) Bugge E, Ytrehus K Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart--a protective additive to ischaemic preconditioning. *Cardiovascular research*, 1995, 29(2), s. 269-274.

19) Cao CM, Yan WY, Liu J, Kam KW, Zhan SZ, Sham JS, Wong TM Attenuation of mitochondrial, but not cytosolic, Ca²⁺ overload reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Acta pharmacologica Sinica*, 2006, 27(7), s. 911-918.

20) Carraro M, Giorgio V, Sileikyte J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabo I, Bernardi P Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*, 2014, 289(23), s. 15980-15985.

21) Clubb FJ, Jr., Bell PD, Kriseman JD, Bishop SP Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1987, 56(2), s. 189-197.

22) Cohen MV, Yang XM, Downey JM The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, 2007, 115(14), s. 1895-1903.

23) Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circulation research*, 2001, 89(3), s. 273-278.

24) Correa F, Garcia N, Gallardo-Perez J, Carreno-Fuentes L, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Zazueta C Post-conditioning preserves glycolytic ATP during early reperfusion: a survival mechanism for the reperfused heart. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 2008, 22(5-6), s. 635-644.

25) Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research*, 2005, 97(4), s. 329-336.

26) Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281(30), s. 20801-20808.

27) Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2005, 289(4), s. H1618-1626.

28) De Jong KA, Lopaschuk GD Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *The Canadian journal of cardiology*, 2017, 33(7), s. 860-871.

29) De Marchi U, Basso E, Szabo I, Zoratti M Electrophysiological characterization of the Cyclophilin D-deleted mitochondrial permeability transition pore. *Molecular membrane biology*, 2006, 23(6), s. 521-530.

30) Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ Cyclophilin D deficiency prevents diet-induced obesity in mice. *FEBS letters*, 2011, 585(4), s. 677-682.

31) Dickson EW, Porcaro WA, Fenton RA, Heard SO, Reindhardt CP, Renzi FP, Przyklenk K "Preconditioning at a distance" in the isolated rabbit heart. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 2000, 7(4), s. 311-317.

32) Elrod JW, Wong R, Mishra S, Vagnozzi RJ, Sakthivel B, Goonasekera SA, Karch J, Gabel S, Farber J, Force T and others Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *The Journal of clinical investigation*, 2010, 120(10), s. 3680-3687.

33) Fang J, Chen L, Wu L, Li W Intra-cardiac remote ischemic post-conditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rats. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, 2009, 43(6), s. 386-394.

34) Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Jatene MB, Bento De Souza LC, Lemos Da Luz P Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation*, 2001, 103(18), s. 2272-2276.

35) Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovascular drugs and therapy*, 2009, 23(4), s. 327-331.

36) Fisarkova B, Vytasek R, Mikova D, Vizek M Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of rats with experimental pneumonia. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2004, 53(5), s. 487-492.

37) Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2000, 278(1), s. H305-312.

38) Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*, 2002, 105(12), s. 1497-1502.

39) Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta*, 2003, 1606(1-3), s. 1-21.

40) Garlid KD, Puddu PE, Pasdois P, Costa AD, Beauvoit B, Criniti A, Tariosse L, Dioloz P, Dos Santos P Inhibition of cardiac contractility by 5-hydroxydecanoate and tetraphenylphosphonium ion: a possible role of mitoKATP in response to inotropic stress. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2006, 291(1), s. H152-160.

41) Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*, 2008, 117(21), s. 2761-2768.

42) Goodman MD, Koch SE, Fuller-Bicer GA, Butler KL Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2008, 295(4), s. H1649-1656.

43) Gross GJ, Fryer RM Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circulation research*, 1999, 84(9), s. 973-979.

44) Hanley PJ, Drose S, Brandt U, Lareau RA, Banerjee AL, Srivastava DK, Banaszak LJ, Barycki JJ, Van Veldhoven PP, Daut J 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *The Journal of physiology*, 2005, 562(Pt 2), s. 307-318.

45) Hausenloy DJ, Lim SY, Ong SG, Davidson SM, Yellon DM Mitochondrial cyclophilin-D as a critical mediator of ischaemic preconditioning. *Cardiovascular research*, 2010, 88(1), s. 67-74.

46) Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic research in cardiology*, 2009, 104(2), s. 189-202.

47) Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM Ischemic preconditioning targets the reperfusion phase. *Basic research in cardiology*, 2007, 102(5), s. 445-452.

48) Hausenloy DJ, Yellon DM New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research*, 2004, 61(3), s. 448-460.

49) Heidkamp MC, Bayer AL, Martin JL, Samarel AM Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta in neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation research*, 2001, 89(10), s. 882-890.

50) Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A, Terzic A Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *The American journal of physiology*, 1998, 275(5 Pt 2), s. H1567-1576.

51) Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *The Journal of physiology*, 1999, 519 Pt 2 s. 347-360.

52) Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276(44), s. 41394-41398.

53) Chinopoulos C, Adam-Vizi V Modulation of the mitochondrial permeability transition by cyclophilin D: moving closer to F(0)-F(1) ATP synthase? *Mitochondrion*, 2012, 12(1), s. 41-45.

54) Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi K, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, Mochly-Rosen D Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*, 2003, 108(19), s. 2304-2307.

55) Inerte J, Barba I, Hernando V, Abellan A, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovascular research*, 2008, 77(4), s. 782-790.

56) Inerte J, Hernando V, Vilarrosa U, Abad E, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D Activation of cGMP/protein kinase G pathway in postconditioned myocardium depends on reduced oxidative stress and preserved endothelial nitric oxide synthase coupling. *Journal of the American Heart Association*, 2013, 2(1), s. e005975.

57) Jekabsone A, Ivanoviene L, Brown GC, Borutaite V Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2003, 35(7), s. 803-809.

58) Ji L, Zhang X, Liu W, Huang Q, Yang W, Fu F, Ma H, Su H, Wang H, Wang J and others AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury. *PloS one*, 2013, 8(7), s. e69910.

59) Jonassen AK, Brar BK, Mjos OD, Sack MN, Latchman DS, Yellon DM Insulin administered at reoxygenation exerts a cardioprotective effect in myocytes by a possible anti-apoptotic mechanism. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2000, 32(5), s. 757-764.

60) Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(24), s. 13807-13812.

61) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL and others Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of clinical investigation*, 2004, 113(11), s. 1535-1549.

62) Kaljusto ML, Rutkovsky A, Stenslokken KO, Vaage J Postconditioning in mouse hearts is inhibited by blocking the reverse mode of the sodium-calcium exchanger. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 2010, 10(5), s. 743-748.

63) Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004, 427(6973), s. 461-465.

64) Kolar F, Jezkova J, Balkova P, Breh J, Neckar J, Novak F, Novakova O, Tomasova H, Srbova M, Ost'adal B and others Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2007, 292(1), s. H224-230.

65) Korge P, Honda HM, Weiss JN Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(5), s. 3312-3317.

66) Kunes J, Dobesova Z, Zicha J. Cardiac hypertrophy in newborn rats with genetic or experimental hypertension. In: Ostadal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla N, editors. *The developing heart*. Philadelphia, PA,: Lippincott. 1997. p 427-441.

67) Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, 2005, 112(25), s. 3911-3918.

68) Lee TM, Su SF, Tsai CC, Lee YT, Tsai CH Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+)Channels in canine hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2000, 32(7), s. 1147-1158.

69) Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *The Journal of biological chemistry*, 2008, 283(39), s. 26312-26323.

70) Liaw NY, Hoe LS, Sheeran FL, Peart JN, Headrick JP, Cheung MM, Pepe S Postnatal shifts in ischemic tolerance and cell survival signaling in murine myocardium. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2013, 305(10), s. R1171-1181.

71) Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular research*, 2007, 75(3), s. 530-535.

72) Litchfield J Blood Pressure in Infant Rats. *Physiological Zoology*, 1958, 31(1), s. 1-6.

73) Liu H, Cala PM, Anderson SE Ischemic preconditioning: effects on pH, Na and Ca in newborn rabbit hearts during Ischemia/Reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1998, 30(3), s. 685-697.

74) Liu H, Wang L, Eaton M, Schaefer S Sevoflurane preconditioning limits intracellular/mitochondrial Ca²⁺ in ischemic newborn myocardium. *Anesthesia and analgesia*, 2005, 101(2), s. 349-355, table of contents.

75) Lu C, Minatoguchi S, Arai M, Wang N, Chen XH, Bao N, Kawamura I, Yasuda S, Kobayashi H, Wu DJ and others Nicorandil improves post-ischemic myocardial dysfunction in association with opening the mitochondrial K(ATP) channels and decreasing hydroxyl radicals in isolated rat hearts. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 2006, 70(12), s. 1650-1654.

76) Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell*, 2004, 16(5), s. 819-830.

77) Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J, Jr., Braunwald E Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation*, 1971, 43(1), s. 67-82.

78) Matsuzaki S, Szweda PA, Szweda LI, Humphries KM Regulated production of free radicals by the mitochondrial electron transport chain: Cardiac ischemic preconditioning. *Advanced drug delivery reviews*, 2009, 61(14), s. 1324-1331.

79) McGee AM, Baines CP Phosphate is not an absolute requirement for the inhibitory effects of cyclosporin A or cyclophilin D deletion on mitochondrial permeability transition. *The Biochemical journal*, 2012, 443(1), s. 185-191.

80) Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nature medicine*, 2002, 8(5), s. 466-472.

81) Milerova M, Drahota Z, Chytilova A, Tauchmannova K, Houstek J, Ostadal B Sex difference in the sensitivity of cardiac mitochondrial permeability transition pore to calcium load. *Molecular and cellular biochemistry*, 2016, 412(1-2), s. 147-154.

82) Milerova M, Charvatova Z, Skarka L, Ostadalova I, Drahota Z, Fialova M, Ostadal B Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*, 2010, 335(1-2), s. 147-153.

83) Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovascular research*, 2000, 47(1), s. 68-73.

84) Mudalagiri NR, Mocanu MM, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Yellon DM Erythropoietin protects the human myocardium against hypoxia/reoxygenation injury via phosphatidylinositol-3 kinase and ERK1/2 activation. *British journal of pharmacology*, 2008, 153(1), s. 50-56.

85) Mukherjee K. Routine analysis of diagnostic enzymes Lactic dehydrogenase (LD). *Med Lab Tech Vol 3*. 2010. p 930-933.

86) Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circulation research*, 1990, 66(4), s. 913-931.

87) Muscari C, Bonafe F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, Guarnieri C, Caldarera CM Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric

oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart. *Life sciences*, 2004, 74(9), s. 1127-1137.

88) Netuka I, Szarszoi O, Maly J, Besik J, Neckar J, Kolar F, Ostadalova I, Pirk J, Ostadal B Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(8), s. 714-719.

89) Netuka I, Szarszoi O, Maly J, Riha H, Turek D, Ostadalova I, Ostadal B Late effect of early hypoxic disturbance in the rat heart: gender differences. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2010, 59(1), s. 127-131.

90) Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M and others Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circulation research*, 2008, 103(3), s. 307-314.

91) Numata M, Petrecca K, Lake N, Orłowski J Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(12), s. 6951-6959.

92) Ostadal B The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection. *Pharmacological reports : PR*, 2009, 61(1), s. 3-12.

93) Ostadal B, Kolar F Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respiratory physiology & neurobiology*, 2007, 158(2-3), s. 224-236.

94) Ostadal B, Netuka I, Maly J, Besik J, Ostadalova I Gender differences in cardiac ischemic injury and protection--experimental aspects. *Experimental biology and medicine*, 2009a, 234(9), s. 1011-1019.

95) Ostadal B, Ostadalova I, Kolar F, Charvatova Z, Netuka I Ontogenetic development of cardiac tolerance to oxygen deprivation - possible mechanisms. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2009b, 58 Suppl 2 s. S1-12.

96) Ostadalova I, Kolar F, Ostadal B, Rohlicek V, Rohlicek J, Prochazka J Early postnatal development of contractile performance and responsiveness to Ca²⁺, verapamil and ryanodine in the isolated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1993, 25(6), s. 733-740.

97) Ostadalova I, Ostadal B, Jarkovska D, Kolar F Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatric research*, 2002, 52(4), s. 561-567.

98) Ostadalova I, Ostadal B, Kolar F, Parratt JR, Wilson S Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1998, 30(4), s. 857-865.

99) Overgaard J, Stecyk JA, Gesser H, Wang T, Gamperl AK, Farrell AP Preconditioning stimuli do not benefit the myocardium of hypoxia-tolerant rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 2004, 174(4), s. 329-340.

100) Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R and others Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular research*, 2010, 87(3), s. 406-423.

101) Penna C, Cappello S, Mancardi D, Raimondo S, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic research in cardiology*, 2006a, 101(2), s. 168-179.

102) Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic research in cardiology*, 2006b, 101(2), s. 180-189.

103) Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D and others Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*, 2008, 359(5), s. 473-481.

104) Quantz M, Tchervenkov C, Chiu RC Unique responses of immature hearts to ischemia. Functional recovery versus initiation of contracture. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1992, 103(5), s. 927-935.

105) Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA, Jr., Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquiss RD, Su J, Baker JE Activation of protein kinases in chronically

hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation*, 2002, 106(2), s. 239-245.

106) Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS Nitric oxide, nitrates and ischaemic preconditioning. *Cardiovascular research*, 1999, 43(3), s. 621-627.

107) Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(2), s. 726-731.

108) Ravingerova T, Matejikova J, Neckar J, Andelova E, Kolar F Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. *Molecular and cellular biochemistry*, 2007, 297(1-2), s. 111-120.

109) Riva E, Hearse DJ Age-dependent changes in myocardial susceptibility to ischemic injury. *Cardioscience*, 1993, 4(2), s. 85-92.

110) Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R and others Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica et biophysica acta*, 2009, 1787(11), s. 1342-1351.

111) Rodbard D, McClean SW Automated computer analysis for enzyme-multiplied immunological techniques. *Clinical chemistry*, 1977, 23(1), s. 112-115.

112) Rodrigo GC, Samani NJ Ischemic preconditioning of the whole heart confers protection on subsequently isolated ventricular myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2008, 294(1), s. H524-531.

113) Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, Konietzka I, Miro E, Totzeck A, Heusch G and others Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circulation research*, 2006, 99(1), s. 93-101.

114) Rosca MG, Hoppel CL Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart failure reviews*, 2013, 18(5), s. 607-622.

115) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC and others Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 2002, 288(3), s. 321-333.

116) Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca^{2+} overload. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2012, 53(2), s. 233-239.

117) Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 2000, 407(6803), s. 538-541.

118) Skarka L, Bardova K, Brauner P, Flachs P, Jarkovska D, Kopecky J, Ostadal B Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2003, 35(3), s. 321-330.

119) Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, Schulz R, Kremastinos DT, Heusch G Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic research in cardiology*, 2009, 104(5), s. 469-483.

120) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 1985, 150(1), s. 76-85.

121) Steenbergen C, Das S, Su J, Wong R, Murphy E Cardioprotection and altered mitochondrial adenine nucleotide transport. *Basic research in cardiology*, 2009, 104(2), s. 149-156.

122) Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2006, 11(9), s. 1583-1593.

123) Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free radical biology & medicine*, 2013, 54 s. 105-112.

124) Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A and others Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem cells*, 2010, 28(11), s. 1930-1939.

125) Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of cell biology*, 2006, 175(6), s. 901-911.

126) Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, Kotelevets L, Chastre E, Khan F, Landegren U, Soderberg O and others Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(7), s. 2427-2432.

127) Tarone G, Balligand JL, Bauersachs J, Clerk A, De Windt L, Heymans S, Hilfiker-Kleiner D, Hirsch E, Iaccarino G, Knoll R and others Targeting myocardial remodelling to develop novel therapies for heart failure: a position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*, 2014, 16(5), s. 494-508.

128) Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation research*, 2004, 95(3), s. 230-232.

129) Valenta T, Degirmenci B, Moor AE, Herr P, Zimmerli D, Moor MB, Hausmann G, Cantu C, Aguet M, Basler K Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell reports*, 2016, 15(5), s. 911-918.

130) Vigneron F, Dos Santos P, Lemoine S, Bonnet M, Tariosse L, Couffignal T, Duplaa C, Jaspard-Vinassa B GSK-3beta at the crossroads in the signalling of heart

preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways. *Cardiovascular research*, 2011, 90(1), s. 49-56.

131) Wall TM, Sheehy R, Hartman JC Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1994, 270(2), s. 681-689.

132) Wang J, Li Z, Feng M, Ren K, Shen G, Zhao C, Jin X, Jiang K Opening of astrocytic mitochondrial ATP-sensitive potassium channels upregulates electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *PloS one*, 2013, 8(2), s. e56605.

133) Xiong J, Liao X, Xue FS, Yuan YJ, Wang Q, Liu JH Remote ischemia conditioning-an endogenous cardioprotective strategy from outside the heart. *Chinese medical journal*, 2011, 124(14), s. 2209-2215.

134) Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2001, 281(3), s. H1295-1303.

135) Yang C, Talukder MA, Varadharaj S, Velayutham M, Zweier JL Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation. *Cardiovascular research*, 2013, 97(1), s. 33-43.

136) Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ and others Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovascular research*, 2006, 70(2), s. 315-324.

137) Zhan E, McIntosh VJ, Lasley RD Adenosine A(2)A and A(2)B receptors are both required for adenosine A(1) receptor-mediated cardioprotection. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 2011, 301(3), s. H1183-1189.

138) Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circulation research*, 2001, 89(12), s. 1177-1183.

139) Zhang JM, Orihashi K, Sueda T, Matsuura Y Cardioprotective effects of FK409, a nitric oxide donor, after isolated rat heart preservation for 16 hours. *The Annals of thoracic surgery*, 2000, 70(5), s. 1601-1606.

140) Zhang SZ, Gao Q, Cao CM, Bruce IC, Xia Q Involvement of the mitochondrial calcium uniporter in cardioprotection by ischemic preconditioning. *Life sciences*, 2006, 78(7), s. 738-745.

141) Zhu WZ, Xie Y, Chen L, Yang HT, Zhou ZN Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2006, 40(1), s. 96-106.