



**CENTRUM VÝZKUMU  
CHOROB SRDCE A CÉV**

**Oddělení vývojové kardiologie  
Fyziologický ústav AV ČR**



**2. lékařská fakulta  
Univerzita Karlova, Praha**

# **ODOLNOST NEZRALÉHO SRDEČNÍHO SVALU K NEDOSTATKU KYSLÍKU**

**Dizertační práce**

**MUDr. Zuzana Charvátová  
roz. Chvojková  
Praha 2008**

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli Prof. MUDr. Bohuslavu Ošťádalovi, DrSc. za odborné vedení v průběhu studia a pomoc při psaní této dizertační práce. Můj velký dík náleží jeho manželce MUDr. Ivaně Ošťádalové, CSc., která přímo vedla mou experimentální práci a zasvětila mě do tajů práce s mláďaty. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Liborovi Škárkovi, PhD. za spolupráci na části zabývající se úlohou mitochondrií v mechanismu odolnosti srdečního svalu. Poděkování patří také všem pracovníkům mého školícího pracoviště, Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, za vytvoření vynikajících pracovních podmínek a přátelské atmosféry během mého postgraduálního studia. Další mé poděkování míří do Paříže, na pracoviště INSERM U 572, vedené J.-L. Samuel, kde jsem měla možnost na dlouhodobé stáži rozšířit své experimentální obzory. Mgr. Petru Stávkovi, PhD. z IKEM bych chtěla poděkovat za pomoc při měření aktivity laktát dehydrogenázy.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým blízkým za podporující zázemí během mého studia a všem ostatním, kteří přímo i nepřímo přispěli ke vzniku této dizertační práce.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	7
<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	9
CITLIVOST NEZRALÉHO SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU .....	9
<b>Odolnost srdce k hypoxii</b> .....	9
<b>Odolnost srdce k ischemii</b> .....	10
PROTEKCE NEZRALÉHO MYOKARDU.....	12
<b>Ischemický preconditioning</b> .....	12
<i>Ontogenetický vývoj IP</i> .....	12
<i>Molekulární mechanizmy IP</i> .....	14
<b>Adaptace na chronickou hypoxii</b> .....	15
<i>Protektivní účinky adaptace</i> .....	15
<i>Možné molekulární mechanizmy kardioprotektivního působení chronické hypoxie</i> ....	16
<i>Vedlejší účinky adaptace</i> .....	17
SYSTEMOVÁ HYPERTENZE A ODOLNOST NEZRALÉHO SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU.....	19
<b>Hypertenze u neonatálních SHR</b> .....	19
<b>Kardiomegalie u SHR</b> .....	20
<b>Hypertenze a odolnost srdečního svalu k ischemii</b> .....	21
MOŽNÉ MECHANIZMY VYŠŠÍ ODOLNOSTI NEZRALÉHO SRDCE.....	23
<b>Možná úloha mitochondrií v odolnosti nezralého srdce k ischemii</b> .....	26
<i>Mitochondrie při ischemii srdeční buňky</i> .....	26
<i>„Mitochondrial permeability transition pore“ (MPT pór)</i> .....	27
<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	30
<b>METODIKA</b> .....	31
EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....	31
MLÁĎATA S NÍZKOU TĚLESNOU HMOTNOSTÍ .....	33
ADAPTACE MLÁĎAT NA CHRONICKOU HYPOXII.....	33
STANOVENÍ INOTROPNÍ ODPOVĚDI NA STOUPAJÍCÍ KONCENTRACI VÁPŇÍKU .....	34
VLIV IRBESARTANU .....	34
BLOKÁDA MPT PÓRU U NEONATÁLNÍHO SRDCE.....	34
PERFUZE DOSPĚLÉHO SRDCE A BLOKÁDA MPT PÓRU .....	35

STANOVENÍ LDH.....	36
STANOVENÍ NAD <sup>+</sup> .....	37
STANOVENÍ EXPRESE HO-1 A HO-2.....	39
<b>STATISTICKÉ HODNOCENÍ.....</b>	<b>41</b>
<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>42</b>
FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ODOLNOST SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U KONVENČNÍCH POTKANŮ.....	42
<b>Vliv délky globální ischemie.....</b>	42
<b>Vliv tělesné hmotnosti.....</b>	43
<b>Úloha AT1 receptorů v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii.....</b>	45
VÝVOJ ODOLNOSTI SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ.....	47
<b>Hmotnostní parametry mláďat SHR.....</b>	47
<b>Citlivost neonatálního srdce SHR k vápníku.....</b>	48
<b>Odolnost srdcí neonatálních SHR k nedostatku kyslíku.....</b>	50
<b>Možnosti protekce neonatálního srdce SHR.....</b>	51
<b>Expresse hem oxygenázy v neonatálním srdci SHR.....</b>	53
ÚLOHA MPT PÓRU V MECHANIZMU ISCHEMICKO-REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ.....	55
<b>Ovlivnění rozsahu ischemicko-reperuzního poškození.....</b>	55
<b>Ovlivnění aktivity MPT póru.....</b>	57
<b>Vztah mezi LDH a NAD<sup>+</sup>.....</b>	58
<b>DISKUZE.....</b>	<b>59</b>
FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ODOLNOST SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U KONVENČNÍCH POTKANŮ.....	60
<b>Vliv délky globální ischemie.....</b>	59
<b>Vliv tělesné hmotnosti.....</b>	60
<b>AT1 receptory v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii.....</b>	61
VÝVOJ ODOLNOSTI SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ.....	63
<b>Expresse hem oxygenázy v neonatálním srdci SHR.....</b>	64
ÚLOHA MITOCHONDRIÍ PŘI ISCHEMII NEZRALÉHO SRDCE.....	64
<b>SOUHRN.....</b>	<b>67</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>70</b>

## SEZNAM ZKRATEK

2,3-DPG	2,3 - difosfoglutarát
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ANT	adenin nukleotid translokáza
Apaf-1	anti-apoptotic factor, faktor aktivující apoptotické proteázy
AT	angiotenzin
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CO	oxid uhelnatý
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
DF	developed force, síla kontrakce
eNOS	endoteliální NO syntáza
FAD <sup>+</sup>	flavin adenin dinukleotid
FADH <sub>2</sub>	redukovaný flavin adenin dinukleotid
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
HO-1	heme oxygenáza, izoforma 1
HO-2	heme oxygenáza, izoforma 2
HSP90	heat shock protein 90, protein tepelného šoku o molekulární hmotnosti 90
IgG	imunoglobulin třídy G
ICHS	ischemická choroba srdeční
IVH	intermitentní výšková hypoxie
iNOS	inducibilní NO syntáza
IP	ischemický preconditioning
ISO	isoproterenol
K <sub>ATP</sub>	na ATP závislé draslíkových kanály
LDH	laktát dehydrogenáza
L-NAME	N <sup>omega</sup> -nitro-L-arginin metylester (inhibitor syntázy oxidu dusnatého)
mitoK <sub>ATP</sub>	mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály
MPT	mitochondrial permeability transition, změna mitochondriální permeability

MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup>	nikotin amid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotin amid adenin dinukleotid (redukována forma)
NO	nitric oxide, oxid dusnatý
NOS	nitric oxide synthase, syntáza oxidu dusnatého
PKC	protein kináza C
ROS	reactive oxygen species, kyslíkové radikály
RyR	ryanodinový receptor
SDS	sodium dodecyl sulfát
SHR	spontaneous hypertensive rat, spontánně hypertenzní potkan
SR	sarkoplazmatické retikulum
TBS	Tris-buffered saline
TIC	time to ischemic contracture, doba vzniku ischemické kontraktury
TK	krevní tlak
TRIS	tris[hydroxymethyl]-aminomethan
VDAC	voltage-dependent anion channel, napětově řízený aniontový kanál
WKY	Wistar Kyoto

## ÚVOD

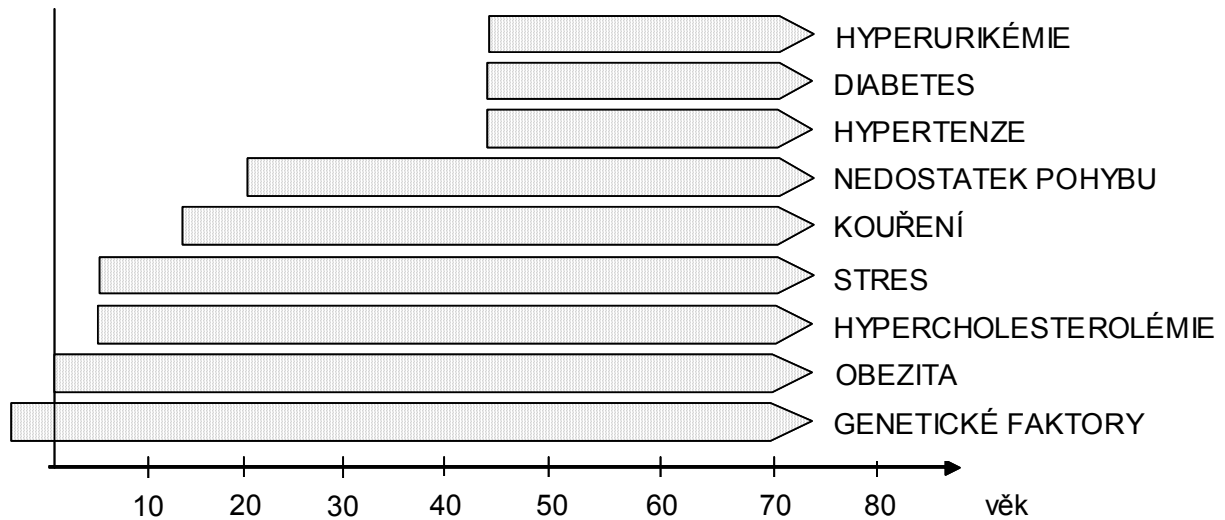
Dle údajů Světové zdravotnické organizace jsou v zemích střední a východní Evropy nejčastější příčinou úmrtí choroby srdce a cév. Více než polovinu z tohoto množství zaujímá jediné onemocnění, jímž je akutní a chronická ischemická choroba srdeční (ICHS). Cílem klinických i experimentálních kardiologů, kteří se výzkumem prevence a terapie ICHS zabývají, je proto tuto nepříznivou situaci zlepšit.

ICHS vzniká jako důsledek nerovnováhy mezi množstvím kyslíku (a substrátů) dodávaného srdeční buňce a množstvím kyslíku, které buňka aktuálně potřebuje ke splnění metabolických nároků. Při ischemii (na rozdíl od hypoxie) je navíc kromě dodávky živin narušen i odvod produktů a nežádoucích zplodin buněčného metabolismu. Výsledkem je pak přechod srdečního svalu na anaerobní metabolismus, hromadění metabolitů a porucha energetické a iontové homeostázy; to vede k poruchám kontraktility a konečným důsledkem omezení perfuze myokardu může být zánik srdeční buňky a vznik infarktu myokardu. V tom, zda poškození bude reverzibilní či ireverzibilní, hraje rozhodující roli délka trvání ischemie. Jedinou možností, jak zabránit či alespoň zmírnit nevratné poškození srdečního svalu, je včasné obnovení průtoku krve koronárním řečištěm v postižené oblasti.

Rozsah ischemického poškození srdečního svalu nezávisí pouze na intenzitě a trvání ischemického infarktu, ale také na odolnosti srdce k nedostatku kyslíku. A právě tento parametr se v průběhu ontogenetického vývoje charakteristickým způsobem mění: obecně lze říci, že odolnost je nejvyšší těsně po narození a pak v průběhu vývoje postupně klesá, přičemž obdobím nejdramatičtějších změn je u laboratorních potkanů první postnatální týden. Mechanizmy zvýšené odolnosti nezralého myokardu však dosud známy nejsou. Jejich analýza, spolu s hledáním možných protektivních mechanismů má klinický význam především pro dětskou kardiologii a kardiochirurgii.

Dle prospektivních epidemiologických studií patří k nejdůležitějším rizikovým faktorům ICHS a aterosklerózy genetická predispozice, hyperlipoproteinémie, kouření, hypertenze, obezita, diabetes mellitus, nedostatečná tělesná aktivita, stres a alkohol. Epidemiologické studie však také ukázaly, že uvedené rizikové faktory jsou často přítomny již v časných fázích ontogenetického vývoje (obr. 1). Patogenetické mechanismy, které se uplatňují při vzniku ICHS, tak působí již brzy po narození, genetické faktory dokonce ještě před narozením. Tento fakt, spolu s dramatickými postnatálními změnami odolnosti myokardu, stimuluje zájem klinických a experimentálních kardiologů o časně období vývoje.

Úkolem této dizertační práce je přispět k prohloubení znalostí týkajících se odolnosti nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku.



**Obrázek 1: Rizikové faktory ICHS a aterosklerózy během ontogenetického vývoje u člověka** {upraveno dle Fejfara a spol., 1975}.



## LITERÁRNÍ PŘEHLED

### CITLIVOST NEZRALÉHO SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Jak bylo již uvedeno v úvodu, hypoxie myokardu je výsledkem nerovnováhy mezi dodávkou kyslíku a jeho spotřebou. Zvláštností koronárního řečiště je vysoká arteriovenózní diference; v srdečním svalu nelze proto zvýšit dodávku kyslíku zvýšením jeho extrakce z arteriální krve. A tak jediným způsobem, jak pokrýt zvýšené nároky na kyslík, je vzestup koronárního průtoku. Spotřeba kyslíku závisí na srdeční frekvenci, na kontraktilním stavu myokardu a na napětí stěn srdečních komor. Teoreticky může být jakýkoli známý mechanismus, vedoucí k tkáňové hypoxii, příčinou snížené dodávky kyslíku do myokardu; nejčastější příčinou je však ischemická (stagnační) hypoxie, způsobená redukcí až úplnou zástavou koronárního průtoku, a systémová (hypoxická) hypoxie, charakterizovaná poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi při zachovaném koronárním průtoku.

Mnoho experimentálních studií během posledních let porovnává odolnost zralého a nezralého myokardu k hypoxii a ischemii, neboť ta se v průběhu vývoje výrazně mění {přehled viz Ošťádal a spol., 1999; Chvojková a spol., 2006}. Tyto studie byly stimulovány (i) vzrůstajícím zájmem o nezralý myokard dětí, které podstoupily operaci pro hypoxemické vrozené srdeční vady na otevřeném srdci; a (ii) skutečností, že rizikové faktory ICHS působí již v časných fázích ontogeneze (obr. 1).

#### **Odolnost srdce k hypoxii**

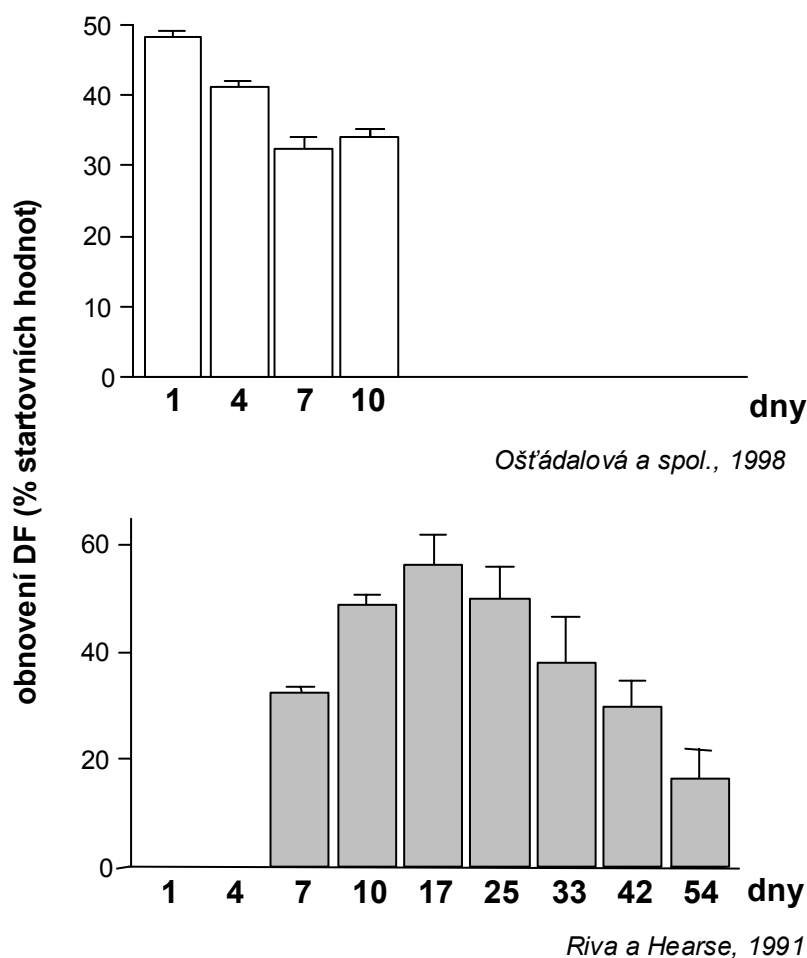
Prvotní důkazy, že odolnost k hypoxii klesá v závislosti na věku, přineslo studium doby přežití potkana, kočky, psa, morčete a králíka v anoxických podmínkách {Fazekas a spol., 1941}. Bylo prokázáno, že u každého druhu je doba přežití nepřímě úměrná zralosti novorozence. Schopnost novorozenců odolávat hypoxii byla přisuzována vysokému obsahu glykogenu v srdci a játrech. Tyto studie však byly prováděny na intaktních zvířatech a výsledek mohl nepřímě ovlivnit účinek hypoxie na centrální nervový systém {Trojan, 1978} a acido-bazickou rovnováhu. Koncepce vyšší tolerance neonatálního srdce byla podpořena studii, které později provedli Su a Friedman {1973} a Jarmakani a spol. {1978a,b; 1982}. Na modelu perfundovaného myokardu ukázali, že 30ti minutová anoxie (perfuzát ekvilibrován se směsí 95% N<sub>2</sub> a 5% CO<sub>2</sub>) měla u novorozeného králíka (stáří 0-2 dny) a psa

(0-9 dní) minimální efekt na kontraktilní funkci; u obou druhů byl negativní vliv hypoxie úměrný věku. U novorozenců byla dále oproti dospělým značně zvýšená produkce laktátu, což naznačuje, že novorozenci jsou schopni udržovat dospělé hladiny myokardiální ATP. Několik dalších studií na novorozeneckém srdci ukázalo, že některé protektivní jevy, jako jsou např. změny v transportu vápenatých iontů {Jarmakani a spol., 1979, Nakanishi a spol., 1982} a změny mitochondriálních funkcí {Young a spol., 1983} přetrvávají po hypoxii ve srovnání s dospělými déle. Podobná věková závislost odolnosti k hypoxii byla pozorována i u potkanů {Ošťádal a spol., 1982}; tolerance izolované pravé komory, vyjádřená jako obnovení kontraktility po 20ti minutové dusíkové anoxii, byla signifikantně vyšší u novorozených samců než u dospělých jedinců. Ontogenetický vývoj vykazoval bifázický profil: relativně vysoká odolnost srdce při narození stoupala až do věku 30 dní (to znamená do konce odstavu) a to jak u samců, tak u samic. Avšak od 30. do 60. dne odolnost u samců klesala, zatímco u samic se nezměnila; dospělý samičí myokard tak byl k hypoxii významně odolnější. Lze tedy shrnout, že citlivost srdce k nedostatku kyslíku se během ontogenetického vývoje signifikantně mění a že časový průběh změn je u samců a samic odlišný.

### **Odolnost srdce k ischemii**

Stejně jako k hypoxii je nezralý myokard relativně odolný i k ischemii, a to u králíka {Baker a spol., 1988}, prasete {Baker a spol., 1990}, psa {Julia a spol., 1990a,b} a potkana {Riva a Hearse, 1991 a 1993; Yano a spol., 1987}. Riva a Hearse {1993} pozorovali, že časově závislé změny odolnosti ke globální ischemii u izolovaného srdce samce potkana (vyjádřené jako obnovení systolického napětí po ischemii) vykazují bifázický profil, se vzrůstem odolnosti od konce prvního postnatálního týdne do doby odstavu a následným poklesem do doby dospělosti. Tento časový průběh je podobný tomu, který lze pozorovat u odolnosti srdce k hypoxii (viz výše).

Detailní analýza tolerance izolovaného srdce potkana (konvenčního kmene Wistar) ke globální ischemii během prvního týdne života ukázala významný pokles od prvního do sedmého dne, naznačující možný trifázický profil ontogenetického vývoje citlivosti srdce k ischemii, alespoň u potkana {Ošťádalová a spol., 1998, obr. 2}. Citlivost neonatálního myokardu k ischemii může být druhově specifická: srdce neonatálního prasete je k ischemii citlivější než neonatální srdce králíka {Baker a spol., 1995}.



**Obrázek 2: Ontogenetický vývoj citlivosti srdce k ischemii u potkana kmene Wistar {Ošťádalová a spol., 1998, Riva a Hearse, 1991}.**

V tomto kontextu je však nutné zmínit i práce, které ukazují, že nezralé srdce může být k ischemickému poškození citlivější než srdce dospělé {Chiu a spol., 1987 a Wittnich a spol., 1987}. Dle Quantze a spol. {1992} se shora uvedené výsledky liší díky rozdílným parametrům, použitým ke stanovení tolerance. Tito autoři totiž sledovali parametr „čas do vzniku ischemické kontraktury“ (TIC), jež byla u neonatálních srdcí kratší; uzavřeli proto, že nezralá srdce jsou k ischemickému poškození citlivější. Naproti tomu v ostatních studiích autoři hodnotili obnovení funkce komor v reperfuzi: u nezralých srdcí došlo po ischemii k lepšímu obnovení funkce, což ukazuje, že jsou k ischemickým zásahům odolnější. Vznik ischemické kontraktury je pokládán za počáteční známku ireverzibilního poškození a odpovídá vyčerpání zásob vysokoenergetických fosfátů. Nevypovídá však nic o situaci v reperfuzi a nesvědčí o nezvratném poškození ventrikulární funkce; TIC tedy není dobrým ukazatelem ischemického poškození. Navíc hodnocení stupně funkčního obnovení

kontraktility po ischemickém infarktu je mnohem blíže klinickým situacím, ke kterým v kardiologii a kardiochirurgii dochází.

## PROTEKCE NEZRALÉHO MYOKARDU

Jak již bylo uvedeno, stupeň hypoxického poškození nezávisí jen na intenzitě a trvání hypoxického infarktu, ale také na odolnosti srdce k nedostatku kyslíku. Není proto překvapující, že se v posledních čtyřiceti letech zájem mnoha experimentálních a klinických kardiologů soustřeďuje na otázku, jak lze odolnost srdce k nedostatku kyslíku zvýšit.

Z tohoto pohledu jsou v podstatě čtyři možnosti: 1) krátkodobá adaptace (ischemický preconditioning, IP), 2) dlouhodobá adaptace (na chronickou hypoxii), 3) farmakologické intervence, jež buď zvyšují zásobení myokardu kyslíkem (vazodilatátory) nebo snižují nároky na kyslík (negativně inotropní látky) a 4) kardioplegie, speciální typ farmakologické protekce, často kombinovaný s hypotermií a používaný v kardiochirurgii. Zatímco dat týkajících se protekce dospělého myokardu je značné množství, mnohem méně je známo o vyvíjejícím se srdci. Literární údaje jsou vzácné a často kontroverzní. V tomto přehledu se soustředíme na vývojové aspekty prvních dvou jmenovaných typů protekce, IP a adaptace na chronickou hypoxii.

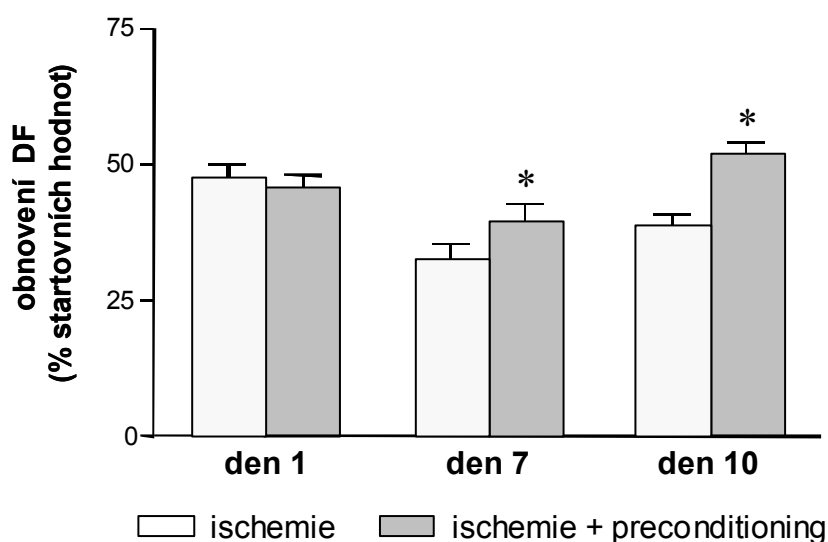
### **Ischemický preconditioning**

#### *Ontogenetický vývoj IP*

Nejúčinnější formou dočasné ochrany dospělého myokardu je ischemický preconditioning, který byl poprvé popsán v roce 1986 {Murry a spol., 1986}. Tento jev byl definován jako zvýšená odolnost srdce k dlouhodobé ischemii, získaná díky předchozí krátké expozici stejnému infarktu. Preconditioning se projevuje jako redukce poškození kardiomyocytů, výrazný úbytek komorových arytmií {Parrat a Vegh, 1994} a zlepšení obnovy kontraktilních funkcí během reperfuze (po dlouhotrvající ischemii) {Cave, 1996}. Zatímco o IP v dospělém myokardu jsou údaje velmi rozsáhlé, informace o tomto fenoménu v nezralém myokardu jsou značně omezené. V naší laboratoři bylo prokázáno {Ošťádalová a spol., 1998}, že klasický IP není, minimálně u potkanů, přítomný ihned po narození; jeho protektivní efekt lze poprvé pozorovat na konci prvního postnatálního týdne života (sedmý

den). Snižující se odolnost neonatálního srdce po narození je tak kompenzována rozvojem endogenního protektivního mechanismu – preconditioningu (obr. 3). Otázkou však zůstává, zda tento fenomén není závislý na intenzitě vyvolávajícího stimulu.

Některé informace o protektivním ovlivnění neonatálního srdce lze rovněž získat studiem buněčných kultur. Webster a spol. {1995} demonstrovali, že u neonatálních kardiomyocytů potkana, nejprve vystavených 25ti minutové hypoxii s následnou reoxygenací, došlo k membránovému poškození až po 6 hodinách těžké hypoxie (méně než 0,2% O<sub>2</sub>). Naproti tomu kontrolní kardiomyocyty vykazovaly výrazné hypoxické poškození již po 2-4 hodinách. Poškození bylo hodnoceno jako míra uvolňování kyseliny arachidonové a obnova kontraktility. Je zřejmé, že selhání kontraktálních funkcí myocytů v tkáňových kulturách po hypoxii se objevuje mnohem později než u pracujícího srdce, zřejmě díky rozdílům v rovnováze mezi energetickými požadavky a dodávkou energie v těchto dvou situacích. Podobně Ovelgönne a spol. {1996} ukázali, že preconditioning v tkáňové kultuře neonatálních myocytů lze vyvolat 60ti minutovou hypoxií, ne však již proteiny tepelného šoku. Díky specifickým rysům tohoto experimentálního modelu je však obtížné takto získaná data srovnávat se studii na celém srdci.



**Obrázek 3: Protektivní působení IP v časných fázích ontogenetického vývoje {Ošťádalová a spol., 1998}.**

Přesný molekulární mechanizmus IP v dospělém myokardu zůstává nejasný a totéž platí i pro srdce nezralá. Signalizační kaskádu zřejmě zahajuje uvolnění určitých „ochranných molekul“ {Yellon a spol., 1998}. Mezi ně patří např. adenosin, bradykinin, prostacyklin a NO. Všechny tyto molekuly se mohou vázat na receptory srdečních buněk (spřažených s G proteiny) a tím zahájit aktivaci jedné nebo více signálních drah, což v konečném důsledku vede k fosforylaci cílového proteinu. Vedoucí úlohu při tom v dospělém srdci hraje zřejmě proteinkináza C (PKC); následkem IP dochází k její aktivaci a translokaci z cytosolu do sarkolemy {Ytrehus a spol., 1994}. Konečným efektem této kaskády jsou pak zřejmě mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály {Garlid a spol., 2003}. PKC je rodina serin-threoninových protein kináz, která se skládá z nejméně 12ti isoform. Dělí se na tzv. konvenční izoformy, které ke své aktivaci potřebují vápenaté ionty, a na tzv. nové izoformy, které k aktivaci vápník nepotřebují. V srdci potkana se během ontogenetického vývoje výrazně mění exprese izoform PKC {Rybin a Steinberg, 1994}; ačkoliv ve dvoudenních neonatálních srdcích byly detekovány PKC –  $\alpha$ ,  $\delta$ , a  $\zeta$ , v dospělých srdcích byla zaznamenána jen velmi slabá imunoreaktivita těchto izoform. V naší laboratoři jsme pozorovali, že v srdci potkana se hladiny izoform PKC  $\alpha$  a  $\delta$  významně mění již během prvního postnatálního týdne; zatímco PKC- $\alpha$  se ve vysoké hladině exprimuje již první den, PKC- $\delta$  byla pozorována teprve sedmý den po narození. Na druhé straně nebyla sedmý den, tedy v době, kdy se poprvé objevuje protektivní vliv preconditioningu, pozorována žádná známka translokace kterékoliv z izoform PKC {Ošťádalová a spol., 1998}. Webster a spol. {1995} našli, že aktivátor PKC phorbol ester tím, že napodobuje účinek krátkých period hypoxie, působí při dlouhotrvající hypoxii na neonatální myocyty v kultuře protektivně. Současná přítomnost nejméně čtyř odlišných izoform PKC v neonatálním srdci a pouze dvou různých v srdci dospělém, naznačuje vysoký stupeň věkově závislé specifity a flexibility v mechanismech přenosu signálu. Baker a spol. {1999a} ukázali, že v nezralém srdci králíka, podobně jako v srdci dospělém, je preconditioning spojen s aktivací mitochondriálních  $K_{ATP}$  kanálů. Naproti tomu v nezralém srdci potkana podání 5-hydroxydekanoátu (5-HD, selektivního blokátoru mitochondriálních  $K_{ATP}$  kanálů) protektivní působení IP neovlivnilo {Ošťádalová a spol., 2002}. Zdá se tedy, že v mechanismu protektivního ovlivnění nezralého myokardu existují značné mezidruhové rozdíly.

Lze tedy shrnout, že IP jako významný kardioprotektivní mechanizmus není, alespoň u potkana, genotypickým fenoménem, ale rozvíjí se teprve během postnatálního života. Zůstává

otázkou, zda se mechanismy, které se uplatňují v preconditioningu nezralého srdce, liší od mechanismů popsanych v myokardu dospělém.

### **Adaptace na chronickou hypoxii**

Hlavním patofyziologickým rysem hypoxemických vrozených srdečních vad je chronická hypoxie. Pochopení mechanismů, kterými cyanotické srdeční vady ovlivňují vlastnosti myokardu a jaký mají tyto modifikace dopad na ochranné mechanismy během akutní ischemie, může být významné např. pro léčbu limitního poškození myokardu při chirurgických korekcích vad {Baker a spol., 1998}. To je jeden z hlavních důvodů, který stimuluje zájem kardiologů o tuto problematiku. Do dnešního dne však neexistuje adekvátní model, který by modeloval chronickou perfuzi srdce hypoxickou krví, jako je tomu při cyanotických srdečních vadách. Proto jsou používány podobné modely jako u dospělých, to znamená chronická hypoxie, simulovaná v normobarické či hypobarické komoře.

#### *Protektivní účinky adaptace*

Při chronické hypoxii musí myokard udržet adekvátní kontraktilitu navzdory nižší tenzi kyslíku v koronární cirkulaci. Již na konci padesátých let bylo pozorováno {Hurtado, 1960}, že u lidí, kteří žijí ve vysokých nadmořských výškách, je nižší incidence infarktu myokardu. Epidemiologická pozorování jsou v souladu s výsledky experimentálních prací, které testovaly odolnost myokardu u zvířat aklimatizovaných na vysokou nadmořskou výšku. V této souvislosti je vhodné připomenout, že první experimentální práce, ukazující protektivní efekt vysoké nadmořské výšky na hypoxickou odolnost srdečního svalu, byly provedeny v Praze {Kopecký a Daum, 1958; Poupa a spol., 1966}. Ukázaly, že izolovaná pravá komora potkanů, adaptovaných na simulovanou vysokou nadmořskou výšku, obnovila svoji kontraktilitu po dusíkové anoxii lépe, než stejný preparát z normoxických zvířat. Tyto výsledky byly později potvrzeny i dalšími autory a to při využití různých experimentálních modelů, různých protokolů adaptace i různých známek ischemického poškození (velikost infarktového ložiska, kontraktilní dysfunkce a komorové arytmie).

Bohužel jen málo autorů se zaměřilo na odolnost nezralého myokardu v chronicky hypoxických podmínkách. V naší laboratoři {Ošťádal a spol., 1995} bylo zjištěno, že chronická hypoxie (simulovaná v barokomoře) vede u potkanů ke srovnatelnému zvýšení odolnosti srdce (vyjádřené jako obnovení kontraktilní funkce izolované pravé komory po

akutní anoxii *in vitro*), jestliže jsou zvířata vystavena chronické hypoxii buď od čtvrtého dne postnatálního života nebo v dospělosti. Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost u obou pohlaví, ale pohlavní rozdíl (tzn. zvýšená odolnost samic) zůstává zachován {Ošťádal a spol., 1984}. Podobně ukázal i Baker {Baker a spol., 1995}, že adaptace na chronickou hypoxii (od 7. do 28. dne postnatálního života) zvyšuje odolnost vyvíjejícího se srdce králíka. Z nedávných výsledků vyplývá {Ošťádalová a spol., 2002}, že protektivní účinek chronické hypoxie není přítomen u novorozených potkanů: u jednodenních mláďat se prenatální expozice výškové hypoxii (tzn. vystavení březích samic v posledním trimestru těhotenství) neprojevila dalším zvýšením odolnosti k ischemii. Ochranný efekt adaptace na chronickou hypoxii (podobně jako u IP) se tedy vyvíjí během prvního týdne života. Klesající odolnost srdečního svalu k ischemii během časných fází ontogentického vývoje je tak vyvážena vývojem endogenních ochranných mechanismů. Řešení tohoto problému může mít značný klinický význam. V myokardu dětí s vrozenými cyanotickými srdečními malformacemi byla pozorována metabolická adaptace na chronickou hypoxii (výrazná redukce aerobní kapacity energetického metabolismu) a aktivace protektivních kaskád {Šamánek a spol., 1989; Ferreira a spol., 2001; Rafiee a spol., 2002}.

#### *Možné molekulární mechanismy kardioprotektivního působení chronické hypoxie*

Bylo navrženo mnoho faktorů, jež by mohly hrát roli v kardioprotektivním mechanismu chronické hypoxie, ale molekulární mechanismus zůstává stále nejasný. Zahrnuje zřejmě na ATP závislé draslíkové kanály, volné kyslíkové radikály, oxid dusnatý, protein kinázy, opioidy a erytropoetin, nelze však vyloučit, že se mohou účastnit i další faktory {přehled viz Kolář a Ošťádal, 2004}. Naprostá většina prací, studujících možné mechanismy adaptace na chronickou hypoxii, se týká jen dospělého myokardu.

Ošťádalová a spol. {2002} prokázali, že 5-HD v perfuzátu izolovaného srdce zablokoval u 10ti denních mláďat protektivní efekt postnatální adaptace na chronickou hypoxii. Zdá se tedy, že mitochondriální  $K_{ATP}$  kanály mohou hrát roli v mechanismu adaptace i u neonatálních srdcí. Kontroverzní je úloha NO: u neonatálních králíků zvýšila chronická hypoxie v srdečním svalu bazální produkci NO díky aktivaci eNOS, zatímco iNOS nebyla měřitelná {Baker a spol., 1999b, Shi a spol., 2000}. Autoři se domnívají, že asociace eNOS s HSP90 (protein tepelného šoku) potencuje produkci NO a omezuje tvorbu superoxidu {Shi a spol., 2002}. Kolář a spol. {2003} však ukázali, že chronická hypoxie zvyšuje expresi iNOS i v dospělém myokardu, zatímco exprese eNOS je snížena. Podobná situace byla pozorována



v nezralém myokardu: hypoxie zvýšila aktivitu a expresi iNOS v myokardu síní u dětí s cyanotickými vrozenými srdečními vadami {Ferreiro a spol., 2001}. Bakerova skupina studovala rovněž úlohu NO v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii. Z jejich práce vyplývá, že endogenní NO hraje pozitivní roli ve zvýšené odolnosti srdce k ischemii u chronicky hypoxických neonatálních králíků a to aktivací solubilní guanylát cyklázy, akumulací cyklického GMP a možnou aktivací na cGMP závislé proteinkinázy (tím umožňuje fosforylaci sarkoplazmatických  $K_{ATP}$  kanálů). Akutní inhibice NO syntázy podáním L-NAME vedla k úplnému zrušení protektivního působení (zlepšená obnova kontraktility po ischemii) chronické hypoxie, zatímco donor NO (GSNO – S-nitrosoglutathion) měl protektivní účinek pouze u normoxických a ne u hypoxických srdcí neonatálních králíků {Baker a spol., 1999b}. U neonatálních potkanů inhibice NOS kompletně zablokovala protektivní efekt chronické hypoxie {Ošťádalová a spol., 2002}, u dospělých hypoxických potkanů však k blokádě nedochází. Podání L-NAME nemělo u izolovaného perfundovaného dospělého srdce pozitivní účinek na obnovu kontraktilních funkcí po ischemii {Szárszoi a spol., 2002}.

#### *Vedlejší účinky adaptace*

U zvířat, která jsou vystavena podmínkám vysoké nadmořské výšky, dochází k vývoji různého stupně polycytemie {Reynafarje, 1958}, což je spojeno s posunem disociační křivky hemoglobinu doprava, díky zvýšené koncentraci 2,3-DPG {Monge a spol., 1991}. K vzestupu hematokritu dochází již u 10ti denních mláďat, jež byla po narození vystavena intermitentní výškové hypoxii {Ošťádalová a spol., 2002}. Naproti tomu u savců a ptáků, kteří jsou genotypicky adaptováni na život ve vysokých nadmořských výškách, nebyl výrazný vzestup hematokritu pozorován {Banchero a spol., 1971}. Zdá se tedy, že zvýšená vazebná kapacita krve pro kyslík nemusí být nutně ukazatel adaptace.

Literární data týkající se vlivu věku na rozvoj změn kardiopulmonárního aparátu, vyvolaných chronickou hypoxií, nejsou ani dostačující ani konzistentní. Dle Smithe a spol. {1974} došlo u mladých potkanů, vystavených chronické hypobarické hypoxii, k výrazně nižšímu rozvoji hypertrofie pravé komory v porovnání s dospělými. Rabinowitch a spol. {1981} porovnávali změny kardiopulmonárního aparátu u potkanů vystavených stálé hypoxii, odpovídající nadmořské výšce 5000 m, od devátého dne postnatálního života nebo až v dospělosti. Dle jejich výsledků nebyl vliv věku na rozvoj plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory statisticky významný. Z výsledků naší laboratoře {Kolář a spol., 1989; Ošťádal a spol., 1995} vyplývá, že intermitentní výšková hypoxie (hypobarická komora, nadmořská

výška 7000m, 8 hodin denně, celkem 24 expozic) vyvolává zvětšení pravé komory a vznik chronické plicní hypertenze u zvířat vystavených chronické hypoxii jak od čtvrtého dne věku tak v dospělosti. Zatímco zvýšení tlaku v plicní cirkulaci bylo výraznější u dospělých, zvětšení pravé komory bylo zase více vyjádřeno u mláďat. U hypoxických mláďat vzestup hmotnosti pravé komory pozitivně koreloval ( $r = 0,72$ ) se vzestupem tlaku v plicním řečišti, na rozdíl od dospělých, kde korelace těchto dvou veličin byla velmi slabá ( $r = 0,16$ ). Významná korelace těchto dvou parametrů u hypoxických mláďat může mít příčinu ve vysoké plasticitě vyvíjejícího se srdce (např. hyperplastický růst myocytů ihned po narození). Chronická hypoxie rovněž moduluje změny kolagenních proteinů. Velikost této frakce byla zvětšena, zatímco poměr kolagenu I a III byl snížen; to naznačuje zvýšenou syntézu kolagenu III. Zvýšení kolagenu III bylo u mladých potkanů signifikantně významnější {Pelouch a spol., 1993}.

Adaptace na intermitentní výškovou hypoxii je také provázena výrazným opožděním růstu zvířat {Ošťádal a spol., 1984}. Vzhledem k tomu, že stav výživy významně ovlivňuje vývoj srdce (mláďata s růstovou retardací mají zmenšený objem a délku kardiomyocytů, {Bai a spol., 1990}) a vzhledem k tomu, že redukce hmotnosti byla pozorována i u obyvatel vysokohorských oblastí, kde je snížena incidence infarktu myokardu (viz výše), logicky vyvstává otázka, zda právě snížení hmotnosti nehraje v kardioprotekci významnou roli.

Zatím nevyřešenou otázkou v procesu adaptace na chronickou hypoxii rovněž zůstává vliv na koronární angiogenezi. Výsledky experimentálních studií jsou rozporuplné: některé práce referují o zvýšené denzitě kapilár v komorovém myokardu, některé zase o nezměněné, nebo dokonce o snížené denzitě kapilár {přehled viz Rakušan, 1999}. Z literárních údajů vyplývá, že důležitou roli v růstu srdce a koronárního terminálního cévního řečiště po různých stimulech hraje angiotenzin II. Tento efekt je zřejmě zprostředkován AT1 receptory, ačkoliv dostupná data nejsou jednotná {Greene a Amaral, 2002; Walther a spol., 2003}. Zajímalo nás tedy, zda se signální kaskáda AT1 receptorů uplatňuje v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii. Pro tyto experimenty jsme použili irbesartan, látku ze skupiny sartanů. Jsou to antagonisté angiotenzinu II, resp. AT1 receptorů, v současné době klinicky používané jako antihypertenziva.

Lze tedy shrnout, že adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost srdce k akutnímu hypoxickému poškození jak u dospělého tak nezralého srdce. U zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii od narození a v dospělosti jsou srovnatelné další parametry adaptace, jako například polycytemie, plicní hypertenze a hypertrofie pravé

komory. Přesný kardioprotektivní mechanismus adaptace na chronickou hypoxii však je, bohužel, stále neznámý.

## SYSTÉMOVÁ HYPERTENZE A ODOLNOST NEZRALÉHO SRDCE K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Jak bylo uvedeno v úvodu, ICHS a aterosklerózu nelze považovat za onemocnění páté a vyšších dekád života, ale jejich rizikové faktory jsou přítomny již v časných fázích ontogenetického vývoje {Fejfar a spol., 1975} (obr. 1). Jedním z nejvýznamnějších je bezesporu systémová hypertenze. Nabízí se proto otázka, zda toto onemocnění může ovlivnit odolnost myokardu k nedostatku kyslíku.

Nejčastějším experimentálním modelem esenciální hypertenze je kmen spontánně hypertenzních potkanů (SHR). Byl vyšlechtěn roku 1963 v japonském Kyotu {Okamoto a Aoki, 1963} z populace outbredních potkanů kmene Wistar křížením samců s mírnou hypertenzí a samic s vysokým krevním tlakem; do následujících sourozeneckých křížení byli vybíráni jen potomci s vysokým krevním tlakem {Okamoto, 1969}. Vznikli tak inbrední jedinci, u nichž se v průběhu vývoje bez výjimky vyvíjí hypertenze; systolický tlak dosahuje až 200 mm Hg. Jako kontrolní se používá inbrední normotenzní kmen Wistar-Kyoto (WKY), vyšlechtěný rovněž z outbrední linie Wistar. Používání SHR bývá z různých důvodů kritizováno: pro heterogenitu chovných kolonií, pro používání neadekvátních normotenzních kontrolních kmenů a pro nevhodnost SHR jako modelu lidské esenciální hypertenze {Zicha a Kuneš, 1999}. Avšak použití SHR přineslo již řadu významných informací: všeobecná dostupnost těchto zvířat umožnila detailní studium kardiovaskulárních abnormalit, jejich genetickou podmíněnost a kritické vývojové periody stejně jako možnosti farmakologického ovlivnění látkami, používanými v léčbě lidské esenciální hypertenze. Dlouhodobé zvýšení krevního tlaku je jistě ovlivněno především genotypem, avšak působí na něj i faktory zevního prostředí, jako jsou např. výživa, stres a fyzická aktivita; to do velké míry platí i pro lidské onemocnění.

### **Hypertenze u neonatálních SHR**

Je především nutno zdůraznit, že po narození je vzestup TK velmi rychlý a to i u normotenzních mláďat: ze 14 mm Hg vzroste během prvních tří týdnů postnatálního života na

85 mm Hg {Litchfield, 1958}. U SHR byl ve většině případů naměřen signifikantně vyšší TK již po narození {Bruno a spol., 1979; Gray, 1984; Clubb a spol., 1987}: existují však práce, které tuto skutečnost popírají {Lais a spol., 1977}. Důvodem tohoto rozporu může být použití různých podkmenů SHR stejně jako rozdíly v metodě měření TK novorozenců mláďat {Kuneš a spol., 1997}. K charakteristické akceleraci růstu TK dochází u SHR mezi třetím a desátým týdnem postnatálního života: hodnoty asi o 30% převyšují TK stejně starých normotenzních kontrol. Zatímco WKY dosahují dospělých hodnot TK asi 10. týden postnatálního života, u SHR tlak dále roste nejméně do 20. týdne {podrobněji v přehledu Zicha a Kuneš, 1999}.

Vzestup TK během vývoje je závislý na dvou základních hemodynamických parametrech: srdečním výdeji a celkové periferní rezistenci. Stále však není jasné, která z uvedených veličin je odpovědná za zvýšený TK u novorozenců SHR. Některé práce sice uvádějí, že srdeční frekvence je u mláďat SHR vždy vyšší než u WKY {Bruno a spol., 1979; Gray, 1984}, díky obrovské variabilitě však tento rozdíl nedosahuje statistické významnosti. Zvýšený TK u mláďat SHR může být rovněž důsledkem rychlejší maturace. Tuto hypotézu podporuje zvýšený tonus sympatiku v regulaci srdeční frekvence u novorozenců SHR {Tucker a Johnson, 1984}. Příčinou hypertenze může být i pokročilejší stádium vývoje mononukleárních kardiomyocytů {Clubb a spol., 1987}. Nevyřešená zůstává otázka, zda urychlený hyperplastický růst kardiomyocytů u plodů SHR může ovlivnit výši TK, či zda hypertenze SHR plodů urychluje růst kardiomyocytů.

## **Kardiomegalie u SHR**

Hypertenze mláďat SHR je spojena se zvětšením srdce. Několik studií novorozenců SHR ukazuje přítomnost kardiomegalie již v časných fázích ontogenetického vývoje {přehled viz Kuneš a spol., 1997}. Předpokládá se, že zvětšení srdce je komplexní děj, zahrnující iniciální podněty, na něž navazují signální mechanismy, jejichž výsledkem je exprese určitých genů. Úmyslně nepoužíváme termín „hypertrofie“, protože v časných fázích vývoje je růst srdce způsoben jak hypertrofií tak hyperplázií srdečních buněk {Anversa a spol., 1980}. Ačkoliv již bylo popsáno mnoho faktorů, jež stimulují patologický růst srdečního svalu, přesný mechanismus zůstává stále nejasný. Podle Clubba a spol. {1987} je zvýšená hmotnost srdce u novorozenců SHR důsledkem vystupňované hyperplazie *in utero*: při narození měla srdce SHR výrazně více kardiomyocytů oproti kontrolám. Práce Hameta a spol. {1982} zase poukazuje na vyšší relativní obsah DNA v srdcích novorozenců SHR v porovnání s WKY.

Další práce naznačují, že v patogeneze zvětšení srdce může hrát významnou roli genetické pozadí {Pang a spol., 1986}.

Jak bylo řečeno výše, kardiomegalie se u hypertenzních potkanů objevuje bezprostředně po narození. Jedním z enzymů, o kterém se předpokládá, že hraje významnou roli v regulaci TK a adaptaci srdce na zátěž je hem oxygenáza (HO); je to mikrozomální enzym, rozkládající molekulu hemu za vzniku ekvimolárního množství oxidu uhelnatého a biliverdinu, který je okamžitě dále redukován na bilirubin {Tenhunen, 1968}; uvolněné železo se váže na ferritin {přehled viz Maines, 1988}. Do dnešního dne jsou známy tři izoenzymy HO: jako HO-1 byla označena inducibilní forma, synonymem je též označení HSP 32 {Maines, 1997}. Exprese HO-1 je indukována různými stresovými a zánětlivými stimuly, jako například těžkými kovy, UV zářením, endotoxinem, hypoxií a hyperoxií {Keyse a Tyrrell, 1989}. HO-2 je konstitutivní forma, exprimovaná za normálních podmínek ve všech orgánech, nejvíce však v mozku a varlotech. Nejpozději objevená HO-3 {McCoubrey a spol., 1997}, je velmi podobná HO-2, vykazuje však nejslabší katalytickou aktivitu a o její funkci toho zatím není mnoho známo.

HO jsou přisuzovány významné cytoprotektivní vlastnosti, především díky působení produktů rozkladu hemu, biliverdinu a bilirubinu: velmi účinně zabraňují peroxidaci lipidových membrán a tento účinek se zesiluje při hypoxii {Stocker a spol., 1987}. Nelze nezmínit protektivní působení zvýšené exprese HO-1 v mechanismu ischemicko-reperfučního poškození, a to jak ve smyslu postischemického zlepšení srdečních funkcí a zmenšení velikosti infarktového ložiska {Clark a spol., 2000}, tak v preventivním působení na vznik letálních ischemických arytmií {Pataki a spol., 2001}.

HO má rovněž důležitou roli v regulaci TK. Předpokládá se, že metabolická cesta HO/CO se uplatňuje v regulaci bazálního tonu rezistentních cév, růstu hladkých svalových buněk cév a remodelaci cévní stěny {Ndisang a spol., 2002}. U dospělých SHR vedlo podávání induktorů HO-1 či substrátů HO k normalizaci TK. A naopak podávání blokátorů HO normotenzním zvířatům způsobilo vzestup systémového TK {přehled viz Chen a spol., 2003}.

### **Hypertenze a odolnost srdečního svalu k ischemii**

Bylo opakovaně prokázáno, že hypertrofický myokard dospělých SHR je ve srovnání s normotenzními zvířaty podstatně méně odolný k akutnímu nedostatku kyslíku {Belichard a spol., 1988; Snoeckx a spol., 1989, 1993; Mill a spol., 1998, Itter a spol., 2004}. Výsledky

z naší laboratoře navíc ukázaly {Bešík a spol., 2007}, že v odpovědi srdcí dospělých SHR na akutní ischemii existují významné pohlavní rozdíly: myokard samic byl k akutnímu nedostatku kyslíku podstatně odolnější než srdeční sval stejně starých samců. Sníženou odolnost má však i srdeční sval, jehož zvětšení bylo vyvoláno jinými experimentálními zásahy, jako je např. podávání isoproterenolu, thyroxinu, renální hypertenze, aortokavální zkrat či konstrikce aorty {přehled viz Bešík a spol., 2007}. To odpovídá i klinickému pozorování, že hypertrofický myokard je citlivější k ischemii než srdeční sval nezvětšený {Friehs a del Nido, 2003}. Zdá se tedy, že snížená odolnost k akutnímu nedostatku kyslíku je způsobena především morfologickými a metabolickými změnami, charakteristickými obecně pro hypertrofický srdeční sval, bez ohledu na vyvolávající patogenetický mechanismus {Bešík a spol., 2007}.

O odolnosti srdečního svalu neonatálních SHR k nedostatku kyslíku není, bohužel, doposud nic známo. Tím méně jsou dostupné údaje o možném protektivním ovlivnění ischemického myokardu nezralých SHR a o faktorech, které se při tomto fenoménu uplatňují.

## MOŽNÉ MECHANIZMY VYŠŠÍ ODOLNOSTI NEZRALÉHO SRDCE

Mechanismy odpovědné za vyšší odolnost nezralého srdce k nedostatku kyslíku dosud nebyly uspokojivě objasněny {Ošťádal a spol., 1999} (tab. 1). Lze spekulovat, zda vysvětlení tohoto fenoménu lze nalézt v nižších energetických požadavcích, vyšší anaerobní glykolytické kapacitě a větších zásobách glykogenu v nezralém srdci {Hoerter, 1976}. Odolnost nezralého srdce k ischemii může rovněž souviset s lepší schopností využívat aminokyseliny transaminací {Julia a spol., 1990 a, b}. Během vývoje se mění též míra utilizace ATP {Hohl, 1997}: ve zralém srdci dojde rychleji k vyčerpání jeho zásob; v nezralém srdci se během ischemie akumuluje AMP, což umožňuje rychlé doplnění ATP v reperfuzi; v dospělém srdci je proto potřebná syntéza *de novo*. Tato pozorování naznačují, že nezralý myokard je lépe připraven pro syntézu ATP, což je výhodné v podmínkách nízké dostupnosti substrátů.

Dalším faktorem, který se může podílet na zvýšené odolnosti nezralého srdce, jsou vývojové změny v transportu  $\text{Ca}^{2+}$  {Nijjar a Dhalla, 1997}. Homeostáza kalcia je v úzkém vztahu k metabolismu buňky a je obecně přijatou determinantou tkáňového poškození a to jak při nedostatku, tak při obnovení dodávky kyslíku. Transport  $\text{Ca}^{2+}$  se u novorozenců a dospělých liší (obr. 4): je známo, že kontrakce myokardu u savců je závislá jak na přestupu  $\text{Ca}^{2+}$  přes sarkolemu, tak na uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula {Fabiato, 1983}. Během vývoje se však výrazně mění vzájemný poměr těchto mechanismů. Kontrakce neonatálního myokardu, ve kterém není sarkoplazmatické retikulum plně vyvinuto, je ve velké míře závislá na toku vápníku přes sarkolemu, především  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníkem. Během dalšího vývoje se zvyšuje schopnost sarkoplazmatického retikula akumulovat vápenaté ionty, mění se rovněž distribuce vápníkových kanálů a postupně dozrává schopnost uvolňovat  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula {Tanaka a Shigenobu, 1989}. Podobně se zvyšuje citlivost srdečních myofilament k  $\text{Ca}^{2+}$ ; u potkana dosáhne dospělých hodnot po dvou týdnech postnatálního života {Vornanen, 1997}.

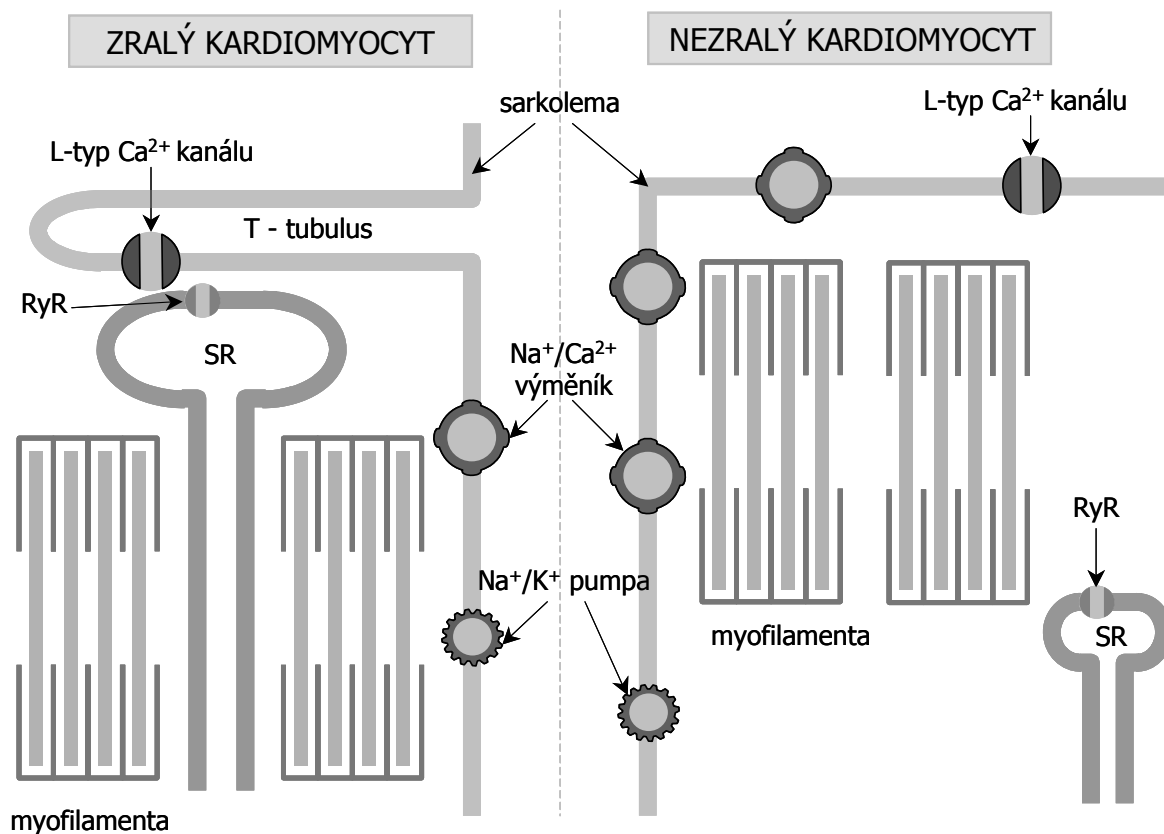
**Tabulka 1: Možné příčiny vyšší odolnosti nezralého myokardu k ischemicko/reperfuznímu poškození** {upraveno z Ošťádal a Kolář, 1999}.

- 
- ↓ Energetické nároky
  - ↑ Glykolytická kapacita
  - ↑ Zásoby glykogenu
  - ↓ Vychytávání volných mastných kyselin
  - Modifikace katabolických drah pro ATP
  - Odlišný obsah oxidačních radikálů
  - ↓ Citlivost k acidóze
  - ↓ Citlivost k vápníkovému přetížení
- 

Nezralé srdce je díky větší závislosti na transsarkolemálním vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  citlivější k negativně inotropnímu účinku antagonistů vápníkových kanálů, jako je verapamil, nifedipin a diltiazem. Dávky, které u dospělých zvířat vyvolaly jen malý negativně inotropní efekt, u novorozených srdcí kontrakci zastavily {Boucek a spol., 1984; Škovránek a spol., 1986; Kolář a spol., 1990}. Tato pozorování lze označit za překvapivá, protože vstup vápníku přes membránu zajišťuje v nezralém srdci především  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$  výměník, který není antagonisty vápníku přímo ovlivněn. Zdánlivý rozpor lze vysvětlit nejspíše zkrácením akčního potenciálu, ke kterému vlivem inhibice vápníkových kanálů dochází {Artman a spol., 2002}. Vývojové rozdíly v účinku vápníkových antagonistů tedy nejsou zřejmě výsledkem změn v hustotě a afinitě L-typu vápníkových kanálů {Ošťádal a Kolář, 1999}, neboť tyto parametry v srdci potkana dosahují dospělých hodnot již během prvního týdne života. Podobně se v srdci novorozených a dospělých králíků zásadně neliší vazebné vlastnosti vápníkových kanálů. Byly však popsány významné vývojové rozdíly v subcelulární lokalizaci těchto kanálů; během zrání jsou soustředěny v junkčních oblastech vznikajících T-tubulů, které jsou spjaty se sarkoplazmatickým retikulem {Wibo a spol., 1991}. Tato skutečnost, spolu se vzrůstající úlohou uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula, může vysvětlit klesající citlivost k negativně inotropnímu působení vápníkových antagonistů během vývoje. Navzdory významným mezidruhovým rozdílům je však zřejmé, že ontogenetické změny v citlivosti k vápníkovým antagonistům existují u všech savců včetně člověka a závisejí na časovém průběhu zrání systémů, jež ovlivňují transport  $\text{Ca}^{2+}$  v srdci a cévách. Klinické použití



antagonistů kalcia je proto u dětských pacientů značně limitováno {Artman, 1992; Artman a spol., 2002; Ošťádal a spol., 1989,1999}.



**Obrázek 4: Transport vápníku ve zralém a nezralém kardiomyocytu.** Ve zralém kardiomyocytu otvírá depolarizace membrány napětově závislé Ca<sup>2+</sup> kanály (L-typ). Přestup extracelulárního Ca<sup>2+</sup> do buňky vyvolá uvolnění Ca<sup>2+</sup> ze sarkoplazmatického retikula (SR) specifickými (RyR) Ca<sup>2+</sup> kanály („calcium-induced calcium release“). V nezralém kardiomyocytu chybí T-tubuly, SR není dostatečně vyvinuté; buňky jsou více závislé na přestupu Ca<sup>2+</sup> sarkolemou cestou Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> výměníku {upraveno z Artman a spol., 2002}.

Dalším faktorem, který se podílí na tkáňovém poškození, jsou volné kyslíkové radikály. Dle Southwortha a spol. {1997} produkuje nezralé srdce v reperfuzi méně volných radikálů; největší rozdíl pozorovali po 20 minutách ischemie, kdy zralé srdce vytvořilo čtyřikrát více volných radikálů než srdce nezralé. Jelikož hlavním zdrojem kyslíkových radikálů je u tohoto modelu xantin-oxidázový systém, lze vývojové změny tvorby volných radikálů v reperfuzi vysvětlit stimulací zmíněného systému během ischemie. Není však jasné,

zda se za vývoje objevují podobné změny i v dalších systémech tvořících volné radikály. Nejasný je rovněž vztah mezi produkcí volných radikálů a obnovou kontraktilních funkcí v reperfuzi. Zdá se však, že rozhodující roli hraje předchozí ischemické poškození (délka ischemického inzultu) {Ošťádal a Kolář, 1999}.

Důležitou roli v citlivosti srdce k ischemii může hrát též acidóza: negativně inotropní efekt nízkého pH byl překvapivě nižší u neonatálních králíků, což může být dle Solara a spol. {1988} vysvětleno nižší citlivostí myofibrilů k  $\text{Ca}^{2+}$  při nízkém pH v této věkové skupině. Žádná z těchto pozorování však nemohou zcela vysvětlit rychle se měnící odolnost srdce k ischemii během prvního týdne života potkana {Ošťádalová a spol., 1998}.

## **Možná úloha mitochondrií v odolnosti nezralého srdce k ischemii**

### *Mitochondrie při ischemii srdeční buňky*

V průběhu déletrvající ischemie se energetický metabolismus musí spolehnout na anaerobní glykolýzu, která však není schopna krýt požadavky pracujícího myokardu. Díky tomu se v srdeční buňce hromadí škodlivé produkty, zejména laktát a  $\text{H}^+$  ionty. Hladina ATP rychle klesá, a to ze dvou důvodů: jednak proto, že jeho tvorba je zastavena pro nefunkční oxidativní fosforylaci, jednak proto, že ATP syntáza ve snaze udržet mitochondriální membránový potenciál začíná ATP štěpit {Jennings a spol., 1991}. Tento obranný mechanismus funguje jako prevence proti selhání mitochondriálního metabolismu, avšak v případě déletrvajícího nedostatku kyslíku urychluje energetický kolaps buňky. V průběhu ischemie se v respiračním řetězci na vnitřní mitochondriální membráně hromadí částečně redukované meziproducty ubisemichinonu; ty po obnovení průtoku krve reagují s kyslíkem a produkují obrovské množství superoxidu {Vanden Hoek a spol., 1997}. Za normálních okolností je superoxid přeměněn na relativně málo škodlivý peroxid vodíku enzymatickým komplexem superoxid dismutázy, nacházejícím se v matrix mitochondrie. Avšak za ischemie nejsou enzymatické antioxidační systémy již schopny zabránit vzniku velkého množství  $\text{H}_2\text{O}_2$ , které je v přítomnosti redukovaných atomů železa (Fe-S skupiny respiračního řetězce, akonitáza, ferritin) zdrojem vysoce nebezpečných hydroxylových radikálů {Biemond a spol., 1984}. Po vyčerpání veškerých obranných antioxidačních mechanismů buňky dochází k radikálovému poškození enzymů oxidativního řetězce (místa největšího poškození jsou totožná s místy největší produkce radikálů) a mitochondrie pak není schopna obnovit membránový potenciál a zahájit produkci ATP; obnova dodávky kyslíku pak nemusí vést

k reparaci srdečních funkcí. V případě déletrvající ischemie dochází k ireverzibilnímu poškození: mitochondrie se rozpadají, veškerá energie je vyčerpána, dojde k narušení iontové a metabolické rovnováhy v cytoplazmě a srdeční buňka podléhá nekróze či apoptóze {Fliss a Gattinger, 1996; Akiyama a spol., 1997}.

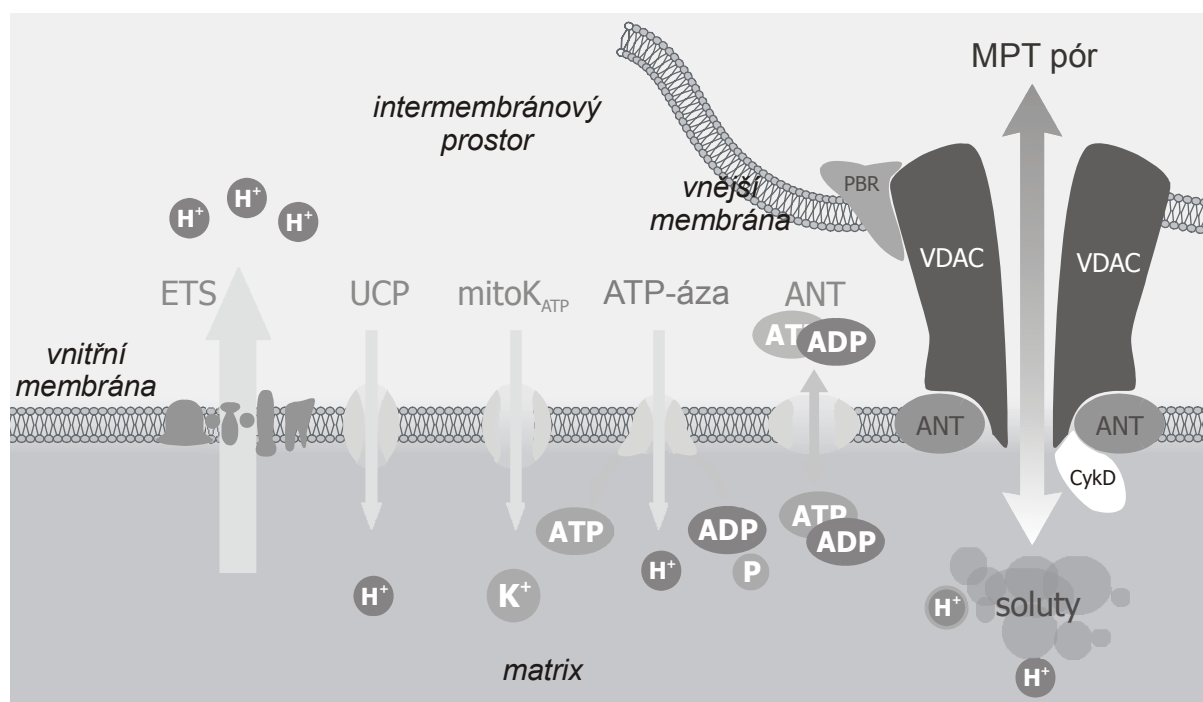
*„Mitochondrial permeability transition pore“ (MPT pór)*

Za určitých okolností se mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou může vytvořit velký komplex proteinů vnitřní a vnější membrány, který otevírá cestu pro výměnu solutů mezi oběma systémy. Protože hlavním znakem tohoto jevu je vysoká permeabilita mitochondriální membrány, označuje se tento proteinový komplex jako „mitochondrial permeability transition pore“ (MPT pore) {Crompton, 1999}.

Struktura MPT póru není zatím zcela jasná, ale předpokládá se, že sestává z mitochondriálních membránových proteinů, a to především z porinu (VDAC) a ANT {Zamzami a Kroemer, 2001}(obr. 5). VDAC se za normálních okolností nachází na vnější mitochondriální membráně a je propustný pro molekuly o velikosti do 5000 Da. Zajišťuje tak volnou výměnu respiračních substrátů, jako např. NADH, FADH<sub>2</sub>, ATP a ADP mezi cytoplazmou a intermembránovým prostorem. Vnitřní mitochondriální membrána je naproti tomu prakticky nepropustná. Dojde-li k aktivaci kanálu, v oblasti kontaktních míst obou membrán (místa, kde je vnitřní membrána nejbližší vnější) se vytvoří spojením VDAC a ANT velký pór a propojí matrix s cytoplazmou. Bylo zjištěno, že faktory, zvyšující pravděpodobnost otevření MPT póru, jsou především nízká hladina ATP, vysoká intramitochondriální koncentrace vápníku a změna pH {Halestrap a spol., 2004}. V srdečním svalu se MPT otevírá především v průběhu ischemicko-reperfuzního poškození. Otevřený pór umožňuje volnou výměnu vody a solutů do velikosti 1500 Da mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou buňky; pro mitochondrii to znamená vážné narušení vnitřního prostředí, dochází k rozvratu metabolické rovnováhy. V důsledku rychlého poklesu potenciálu na vnitřní membráně dochází záhy k rozpáření oxidativní fosforylace (tj. k přerušení přeměny energie, získané oxidací, na ATP), produkce ATP ustává; někdy dokonce ATP-syntáza v reverzním chodu štěpí ATP ve snaze zachovat membránový potenciál. ATP je v buňce rychle spotřebován, přičemž syntéza nového nefunguje, většina metabolických procesů buňky je narušena. Dalším důsledkem otevřeného MPT póru je zvýšená produkce ROS; poškození se tím potencuje a otevírají se další MPT póry. Díky volnému proudění vody a solutů mezi mitochondriální matrix a cytoplazmou dochází k narušení iontové rovnováhy, mitochondrie

bobtná, krysty postupně mizejí a vnější membrána se rozpadá. Z mezimembránového prostoru se do cytoplazmy uvolňuje cytochrom *c*, který v souhře s Apaf-1 a prokaspázou 9 (prekurzor enzymu ze skupiny cysteinových proteáz, které po aktivaci vedou k rozpadu buňky) vytváří tzv. apoptosom, který může nastartovat proces buněčné smrti.

Klíčovou součástí aktivace MPT póru se zdá být cyklofilin D, malý mitochondriální protein, který byl pojmenován díky své schopnosti vázat se na imunostatikum cyklosporin A. Cyklosporin A inhibuje jeho navázání na ANT, čímž výrazně omezuje aktivitu MPT póru. U myši, postrádající gen pro cyklofilin D, byla pozorována vysoká odolnost k nekrotickému poškození buněk následkem oxidativního stresu a vápníkového přetížení {Baines a spol., 2005; Nakagawa a spol., 2005}. Podobný efekt byl rovněž pozorován v pokusech, kdy se k blokadě MPT póru používají inhibitory cyklofilinu D {Di Lisa a spol., 2001; Clarke a spol., 2002}.



**Obrázek 5: MPT pór a struktury vnitřní mitochondriální membrány.** H<sup>+</sup> - vodík, K<sup>+</sup> - draslík, P – fosfát, ATP – adenosintrifosfát, ADP – adenosindifosfát, ETS – elektronový transportní systém, UCP – „uncoupling“ protein, mitoK<sub>ATP</sub> – mitochondriální na ATP závislé draslíkové kanály, MPT pór – „mitochondrial permeability transition“ pór, VDAC – napěťově řízený aniontový kanál, ANT – adenin nukleotid translokáza, CykD – cyklofilin D, PBR - periferní benzodiazepinový receptor.

O tom, zda se buňka vydá cestou apoptotické či nekrotické smrti, rozhoduje několik faktorů. Apoptotický proces je charakteristický především závislostí na dodávce ATP, zatímco nekrotický proces je spíše vyvrcholením kompletního metabolického a energetického kolapsu. Zdá se, že MPT pór se uplatňuje především v nekrotickém typu buněčné smrti, kde je aktivován oxidativním stresem a vysokou hladinou vápníku {Baines a spol., 2005; Nakagawa a spol., 2005}; u myši postrádající gen pro cyklofilin D nebylo totiž pozorováno narušení apoptotické kaskády, vyvolané cestou Bcl-2 proteinů ani řadou dalších proapoptotických stimulů {Nakagawa a spol., 2005}. Podobně Li a spol. {2004} pozorovali u neuronálních buněk, které tvořily velké množství cyklofilinu D, zvýšenou odolnost vůči apoptóze. Přesto nelze možnost účasti MPT póru v apoptóze zcela zavrhnout; je možné, že se zde uplatňuje právě jeho přechodné otevření {Halestrap a spol., 2004}.

O tom, zda by se MPT pór mohl uplatňovat také v ischemicko-reperfučním poškození neonatálního srdce, není dosud nic známo.

## CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo ověření hypotézy, zda

- a) se liší odolnost neonatálního srdce k nedostatku kyslíku u konvenčních a spontánně hypertenzních potkanů;
- b) zda se v patogeneze ischemicko-reperfuzního poškození neonatálního srdce uplatňuje, podobně jako u dospělých jedinců, mitochondriální pór (MPT)

Na základě detailní analýzy dostupných literárních dat byly stanoveny tři etapy dizertační práce:

1. studium faktorů ovlivňujících odolnost nezralého srdce u konvenčních potkanů
2. analýza vývoje odolnosti srdečního svalu v časném postnatálním období u SHR
3. analýza úlohy MPT póru v ischemicko-reperfuzním poškození nezralého srdce

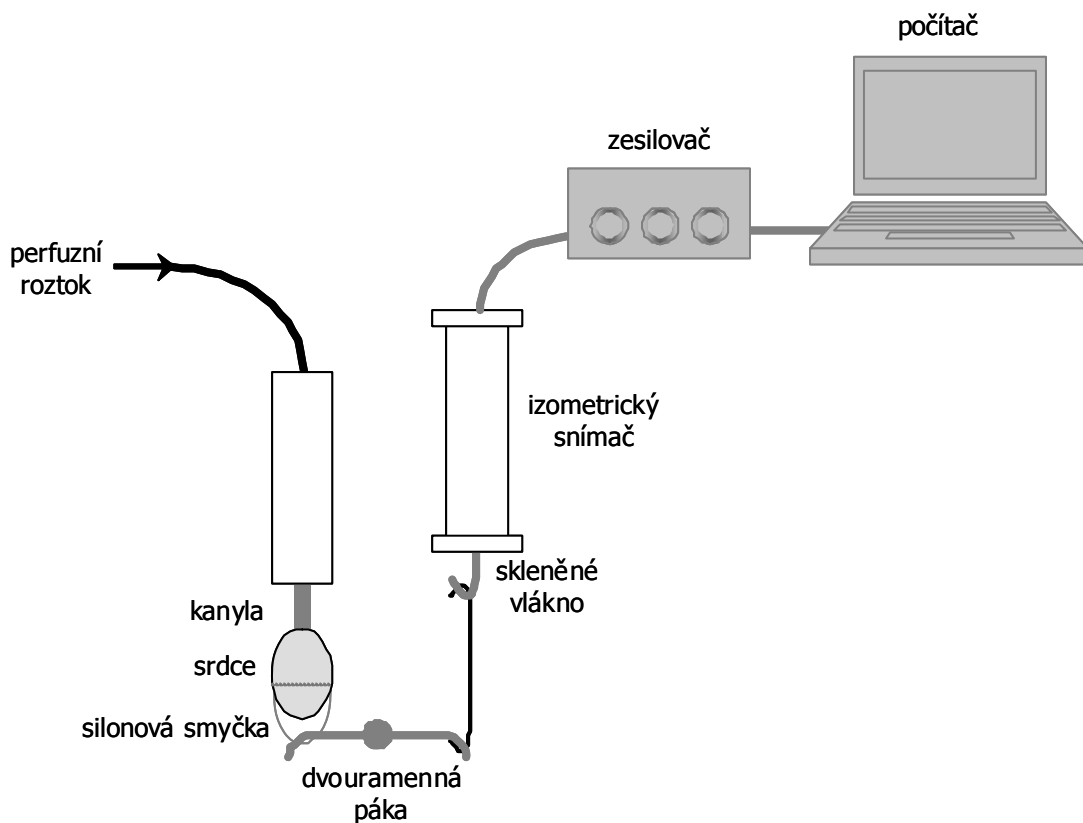
## METODIKA

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

### EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

K pokusům byla použita mláďata laboratorního potkana kmenů Wistar, SHR a WKY z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Ve stáří 1 resp. 10 dnů byla mláďata zvážena a usmrcena dekapitací. Hrudník byl rychle otevřen a aorta byla kanylována (nerezovou kanylou s vnějším průměrem 0,45 mm pro 1. den a 0,8 mm pro 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 a kmen {Litchfield, 1958; Zicha a spol., 1986; Clubb a spol., 1987}. Srdce byla perfundována Krebs–Henseleitovým roztokem, který obsahoval (v mmol/l): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 1,25; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 a glukózu 7,0. Roztok byl satureován směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub> (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.

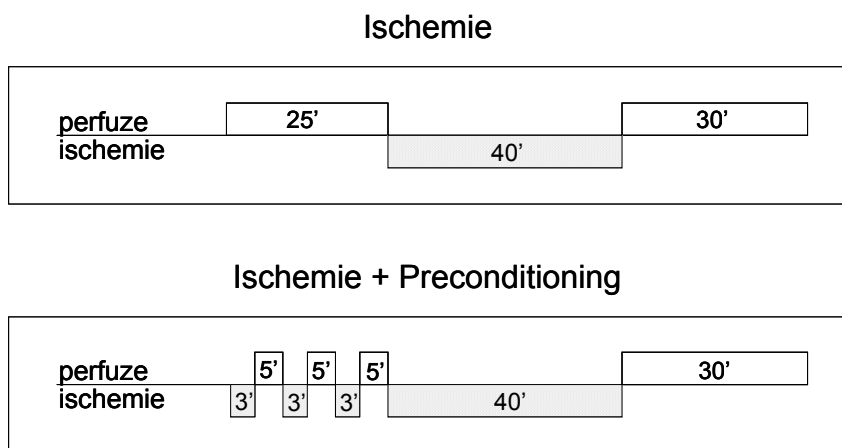
Kontraktilní funkce (DF, +dF/dt, -dF/dt) izolovaného srdce byly měřeny pomocí snímače síly kontrakce. Ten byl se srdečním hrotem spojen pomocí silonového úvazu, dvouramenné titanové páky a skleněného vlákna (obr. 6). Kontraktilní parametry byly automaticky vyhodnocovány on-line připojeným počítačem (signál byl patřičně zesílen zesilovačem).



**Obrázek 6: Schéma měření kontraktility izolovaného neonatálního srdce dle Langendorffa.**

Po stabilizaci izolovaného srdce byla zaznamenána startovní hodnota DF. Srdce, na kterých byl hodnocen účinek ischemického preconditioningu, byla vystavena třem 3-minutovým periodám globální ischemie, oddělených 5 minutami reperfuze; kontrolní srdce byla odpovídající dobu perfundována. Všechna srdce pak byla vystavena 40 (případně 20, 30, 60) minutám globální ischemie, na kterou navazovala doba reperfuze do maxima obnovení DF (poslední hodnota před jejím poklesem, měřeno v tří-minutových intervalech; průměrně 30 minut; obr. 7). Míra obnovení síly kontrakce byla vyjádřena jako procento startovní hodnoty.





**Obrázek 7: Experimentální protokol pro stanovení odolnosti k ischemii a protektivního působení IP.**

## MLÁĎATA S NÍZKOU TĚLESNOU HMOTNOSTÍ

Nízké tělesné hmotnosti mláďat bylo dosaženo využitím modelu velkých hnízd dle Kennedyho {1957}. Pokusná mláďata byla po porodu rozdělena tak, aby jejich počet v hnízdě byl 14; kontrolní hnízda měla 8 mláďat.

## ADAPTACE MLÁĎAT NA CHRONICKOU HYPOXII

Mláďata byla v hnízdech spolu s matkou vystavena intermitentní výškové hypoxii (IVH) v hypobarické komoře při barometrickém tlaku 54 kPa (405 mm Hg – odpovídá nadmořské výšce 5000 m) a parciálnímu tlaku kyslíku  $P_{O_2}$  11,3 kPa (85 mm Hg); denní expozice trvala 8 hodin, mláďata byla vystavena hypoxii od prvního do devátého postnatálního dne (tj. celkem 9 expozic). Analýzy byly provedeny následující den po poslední expozici, tj. desátý postnatální den.

## STANOVENÍ INOTROPNÍ ODPOVĚDI NA STOUPAJÍCÍ KONCENTRACI VÁPŇÍKU

Srdce byla perfundována Tyrodovým roztokem, který obsahoval (v mmol): NaCl 145,0; KCl 5,9; CaCl<sub>2</sub> 1,25; MgCl<sub>2</sub> 1,2; glukózu 11,0; mannitol 1,1 a HEPES 5,0. pH bylo upraveno pomocí Tris na 7,4 a roztok byl saturován 100%ním O<sub>2</sub>. Tímto roztokem (koncentrace Ca<sup>2+</sup> 1,25 mmol/l) byla srdce stabilizována; poté byla ekvilibrována roztokem s poloviční koncentrací Ca<sup>2+</sup> (tj. 0,625 mmol/l); koncentrace vápníku byla postupně zvyšována (cca po 30s) na 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 a 10,0 mmol/l; u každé koncentrace byla zaznamenána inotropní odpověď srdcí.

## VLIV IRBESARTANU

Irbesartan, blokátor AT1 receptorů (Bristol-Myers Squibb, New Brunswick, USA), byl rozpuštěn v 0,8obj% 1N hydroxidu sodného. Roztok byl mláďatům podáván žaludeční sondou v dávce 40μg/g a objemu 10μl/g (doplněno fyziologickým roztokem) tělesné hmotnosti 1x denně od 1. do 9. dne postnatálního života; vždy před vystavením výškové hypoxii; kontrolní skupině byl stejným způsobem podáván fyziologický roztok.

## BLOKÁDA MPT PÓRU U NEONATÁLNÍHO SRDCE

Pro pokusy s blokádou MPT póru byl použit modifikovaný Krebs-Henseleitův roztok, tzn. neobsahoval manitol a koncentrace CaCl<sub>2</sub> byla dvojnásobná (2,5 mmol/l). Po stabilizaci (průměrně 10 minut) byla zaznamenána hodnota DF a srdce byla 10 minut perfundována roztokem obsahujícím 1 μM sanglifehrin A (blokátor MPT póru, Novartis Pharma AG, Basel) nebo 3,38 mM etanol (kontrolní měření s rozpouštědlem sanglifehrinu) (obr. 8). Poté byla všechna srdce vystavena 40 minutové globální ischemii, následované reperfuzí 20 min. Během reperfuze byly odebírány vzorky koronárního efluentu pro stanovení koncentrace LDH (obr. 8). Zbývající efluent byl použit pro stanovení celkového množství vyplavené LDH. Po odebrání posledního vzorku byla opět zaznamenána hodnota DF a srdce bylo (bez zastavení perfuze) rychle zmrazeno Wollenbergerovými kleštěmi vychlazenými v tekutém dusíku a uloženo při teplotě – 70 °C.

## PERFUZE DOSPĚLÉHO SRDCE A BLOKÁDA MPT PÓRU

K pokusům byli použiti dospělí samci laboratorních potkanů kmene Wistar stáří 3 měsíců a průměrné hmotnosti 350 g.

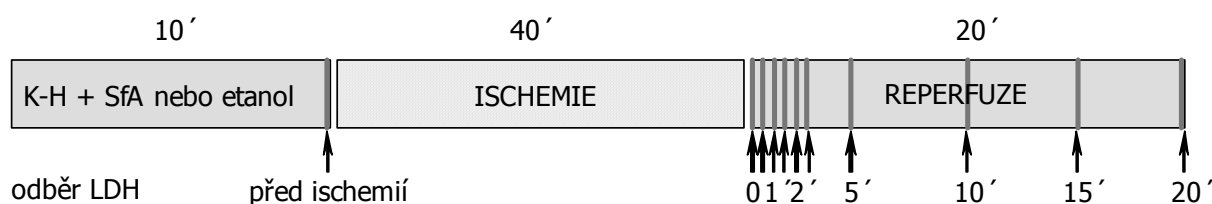
Zvířata byla anestetizována jednorázovým intraperitoneálním podáním thiopentalu (50 mg/kg). Po fixaci na operační podložce byla kůže na hrudníku nastřížena až k jugulu a odklopena. Poté byla otevřena břišní dutina těsně pod bránicí. Po přestřížení bránice byla žebra stříhána kraniálně až k prvnímu žebru a odklopena. Srdce bylo rychle vyjmuto z hrudníku, upevněno na aortální kanylu a perfundováno v perfuzním aparátu podle Langendorffa.

Srdce bylo perfundováno za konstantního tlaku (100 cm H<sub>2</sub>O) Krebs-Henseleitovým roztokem ve složení (mmol/l): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 a glukóza 7,0. Roztok byl saturován karbogenem (95% O<sub>2</sub> a 5% CO<sub>2</sub>), pH bylo upraveno na 7,4 a roztok byl udržován při konstantní teplotě 37 °C. Perfuzní roztok byl připravován každý den před začátkem pokusu. Po upevnění v perfuzním aparátu byly ze srdce odstraněny zbytky extrakardialní tkáně. Srdce bylo elektricky stimulováno pravoúhlými pulsy s frekvencí 300 za minutu koaxiální elektrodou přiloženou na bázi pravé komory. Délka pulzů byla nastavena na 2 ms a napětí na hodnotu převyšující o 50 % hodnotu prahovou.

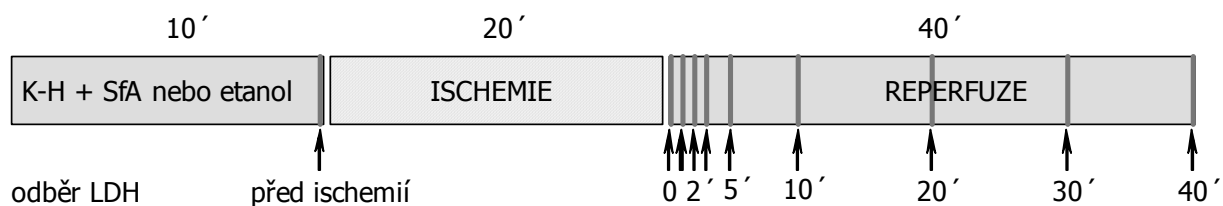
Po 10 minutové stabilizaci byla srdce perfundována roztokem s obsahem 1 μM sanglifehrinu A (blokátor MPT póru, Novartis Pharma AG, Basel) nebo 3,38 mM etanolu (kontrolní měření s rozpouštědlem sanglifehrinu) po dobu 10 min (obr. 8). Sanglifehrin A byl do perfuzátu přidáván ve formě zásobního alkoholového roztoku o koncentraci 5 mmol/l těsně před vlastním pokusem. Kontrolní skupina byla před ischemickou fází perfundována po dobu 20 minut nemodifikovaným perfuzním roztokem. Poté byla srdce vystavena 20-min globální ischemii a 40-min reperfuzi. Globální ischemie byla vyvolána uzavřením přítoku perfuzního roztoku do srdce. V průběhu ischemie byla srdce ponořena do Krebs-Henseleitova roztoku temperovaného na 37°C (pH 7,4).

V průběhu reperfuzní fáze byly odebírány vzorky pro stanovení LDH v efluentu (obr. 8). Po 40 minutách bylo srdce rychle zmrazeno Wollenbergerovými kleštěmi vychlazenými v tekutém dusíku a uchováno při teplotě -70 °C.

## NEONATÁLNÍ SRDCE



## DOSPĚLÉ SRDCE



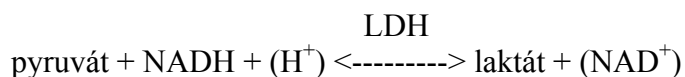
**Obrázek 8: Experimentální protokol pro neonatální a dospělé srdce.** Po 10 min stabilizaci byla srdce perfundována roztokem sanglifehrinu A (SfA) nebo etanolu po dobu 10 min. Poté byla vystavena globální ischemii (40 min u mládřat a 20 min u dospělých), následované reperfuční fází (20 min v případě mládřat a 40 min v případě dospělých). Na konci stabilizace, před ischemií a v průběhu reperfuze byly odebírány vzorky pro stanovení laktát dehydrogenázy (LDH), a to dle následujícího schématu: u mládřat po dobu 30 s v čase 0 (na začátku reperfuze) a pak v čase 0,5 min, 1 min, 1,5 min, 2 min, 2,5 min, 5 min, 10 min, 15 min a 20 min; u dospělých 20 s v čase 0 a pak 10 s v čase 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min a 40 min.

## STANOVENÍ LDH

K hodnocení rozsahu poškození srdce byla použita metoda měření obsahu LDH v koronárním efluentu. Vzorky efluentu byly odebírány dle experimentálního protokolu (obr. 8) 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 byly odebrány dva vzorky pro zjištění obsahu celkové LDH uvolněné v průběhu reperfuční fáze. Vzorky, určené k měření obsahu LDH, byly udržovány při teplotě 4 °C až do doby měření (do 15 hod po ukončení experimentu).

LDH bylo měřeno analyzátozem Roche/Hitachi 902 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany), za použití kitu LDH Roche/Hitachi.

Princip stanovení:



{viz Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972}.

Data jsou vyjádřena jako množství LDH na hmotnost srdeční tkáně [nkat/g]. Vzhledem k nutnosti analyzovat v srdeční tkáni kromě LDH také  $\text{NAD}^+$  nebylo možné data vyjádřit na hmotnost sušiny. Protože hydratace myokardu se u jednotlivých pokusných skupin významně lišila, bylo nutné vytvořit postup, který by tuto skutečnost respektoval. Byl proto stanoven tzv. koeficient hydratace a bylo zjištěno, jak se liší obsah vody v jednotlivých experimentálních skupinách (tab. 2). Jako referenční skupina byla zvolena ta srdce, která byla po vyjmutí z těla pouze dvacet minut perfundována Krebs-Henseleitovým roztokem a zmrazena Wollenbergerovými kleštěmi. Poté byla zjištěna průměrná relativní hmotnost srdce každé skupiny (poměr hmotnosti srdce a těla  $\times 100$ ) a stanoven koeficient hydratace, který je dán poměrem průměrné relativní hmotnosti srdce dané skupiny k hodnotě skupiny referenční (tab. 2).

#### STANOVENÍ $\text{NAD}^+$

Stanovení  $\text{NAD}^+$  v srdeční tkáni lze použít jako jednu z metod pro sledování aktivity MPT póru {Di Lisa a spol., 2001}. Otevření MPT póru ovlivňuje řadu metabolických dějů spojených s energetickým metabolismem; k nim lze počítat i degradaci  $\text{NAD}^+$  enzymem  $\text{NAD}^+$ -glykolhydrolázou, lokalizovanou vně mitochondriální matrix. V průběhu ischemie a reperfuze se otevírá MPT pór,  $\text{NAD}^+$  se vyplaví z mitochondrie a je degradován výše uvedeným enzymem. Následkem ischemicko-reperfuzního poškození dochází tedy ke značnému úbytku  $\text{NAD}^+$  v srdeční tkáni; tento efekt lze snížit použitím blokátorů MPT póru {Di Lisa a spol., 2001, Clarke a spol., 2002}.

Extrakce  $\text{NAD}^+$  byla prováděna na srdcích zmrazených Wollenbergerovými kleštěmi a uschovaných při teplotě  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Spodní třetina srdce (převážně apex levé komory) byla rozdracena v tekutém dusíku a homogenizována přístrojem SilentCrusher M (Heidolph, Schwabach, Germany) v 0,5 M roztoku  $\text{HClO}_4$ . Množství  $\text{HClO}_4$  bylo přidáno v poměru 10 ml na 1 g tkáně a homogenizace byla provedena 3x v délce 10s s 20s pauzami při teplotě  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Suspenze byla centrifugována 2x 10 min při 1500  $g_{AV}$  ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Supernatant byl sbírán do zkumavek a pelet resuspendován ve stejném množství  $\text{HClO}_4$  jako na počátku. Vzorky byly následně neutralizovány dvojnásobným množstvím 0,25 M roztoku KOH v 1 M

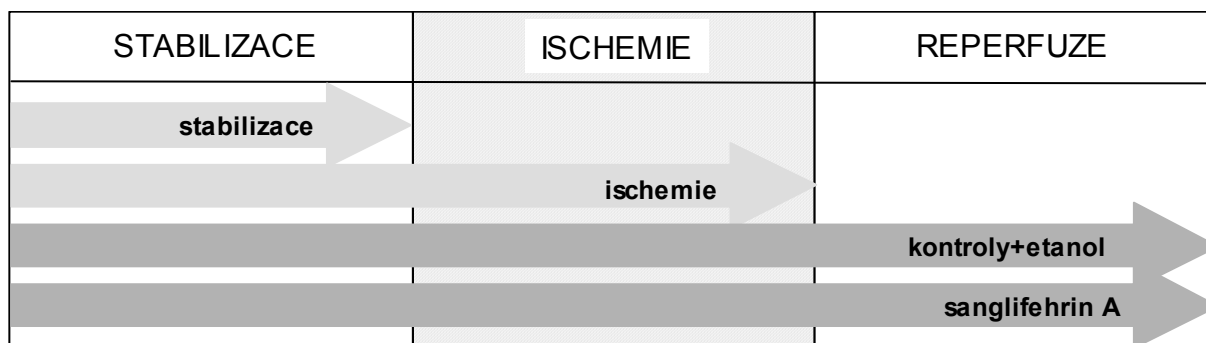
fosfátovém pufru o pH 7,5, a to na ledu po dobu 15 min. V reakci vzniká silný oxidant  $\text{KClO}_4$ , který sedimentuje na dně zkumavek a supernatant tak lze odebrat bez nutnosti centrifugace. V této fázi byla zjišťována velikost pH extraktů a odstraněny vzorky, jejichž pH se pohybovalo mimo oblast 7,3-7,4. Z každého vzorku byly 2 ml extraktu skladovány při teplotě  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  až do doby stanovení  $\text{NAD}^+$ .

K vlastnímu stanovení  $\text{NAD}^+$  byla použita modifikovaná metoda pomocí alkohol dehydrogenázy {Bernofsky a Swan, 1973; Jacobson a Jacobson, 1976}. V principu jde o enzymatickou cyklickou reakci oxidace alkoholu alkohol dehydrogenázou za současné redukce  $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ . Konečnou redukcí MTT tetrazolia za účasti elektronového přenašeče phenazin ethosulfátu dojde ke změně barvy ze žluté na hnědou až černou; reakci inhibuje iodacetát.

Extrakt byly po rozmražení znovu centrifugovány 10 min při 1500  $g_{AV}$  pro odstranění precipitovaného  $\text{KClO}_4$ . Vzorky byly dle potřeby a předchozího testovacího měření naředěny. V detekčních zkumavkách bylo před zahájením reakce 0,5 ml vzorku a reagentie o celkovém objemu 0,6 ml v následujících koncentracích: Na-Bicin, 100 mM, pH=7,8; ethanol, 0,5 M; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT), 0,42 mM; phenazin ethosulfát, 1,66 mM; EDTA, 4,16 mM; hovězí sérový albumin 0,83 mg/ml a 0,1 ml roztoku alkohol dehydrogenázy (0,3 mg/ml v 100 mM roztoku Na-Bicinu, pH=7,8). Jako standard byly použity vzorky různé koncentrace připravené z  $\text{NAD}^+$  (Sigma) v redestilované vodě. Reakce byla zahájena smícháním všech reagentií za sníženého osvětlení a přidáním 0,1 ml roztoku alkohol dehydrogenázy. Inkubace probíhala ve tmě při  $30\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 25 min; reakce byla zastavena přidáním 0,5 ml iodacetátu (12 mM roztok v redestilované vodě) do každé detekční zkumavky. Absorbance byla stanovena spektrofotometrem při 570 nm. Data jsou vyjádřena jako  $\mu\text{g NAD}^+$  na g srdeční tkáně. Každý extrakt byl změřen 2x a výsledná koncentrace je aritmetickým průměrem obou měření. Získané výsledky byly korigovány koeficientem hydratace (viz výše).

## **Tabulka 2: Relativní hmotnost srdce a koeficient hydratace 10ti denních a dospělých potkanů**

a) schéma odběru srdcí:



b) experimentální data:

	stabilizace (ref. skupina)	ischemie	kontroly + etanol	sanglifehrin A
<b>10ti denní mládřata</b>				
- relativní hm. srdce	8,88 ± 0,22	5,28 ± 0,11	7,84 ± 0,16 **	7,84 ± 0,21 **
- koeficient hydratace	–	0,59 ± 0,02	0,88 ± 0,03	0,88 ± 0,03
<b>dospělí</b>				
- relativní hm. srdce	3,38 ± 0,08	3,29 ± 0,08	3,71 ± 0,10 *	4,08 ± 0,15 **
- koeficient hydratace	–	0,97 ± 0,03	1,10 ± 0,04	1,21 ± 0,05

a) schéma odběru srdcí: srdce byla odebírána na konci stabilizace (referenční skupina), na konci ischemie a na konci reperfuze (do perfuzátu bylo přidáno rozpouštědlo (etanol) nebo sanglifehrin A)

b) experimentální data: \* P<0,05, \*\* P<0,01, vs. referenční skupina. Data jsou vyjádřena jako průměr ± S.E.M.

## STANOVENÍ EXPRESE HO-1 A HO-2

Ve stáří 10 dnů byla mládřata usmrcena dekapitací, jejich srdce byla rychle vyjmuta z těla a promyta fyziologickým roztokem o teplotě 4 °C. Následně byla srdce rozdělena na pravou komoru a levou komoru se septem a jednotlivé části byly prudce zmrazeny v tekutém dusíku a zváženy. Do další analýzy byly uchovávány při teplotě –70 °C.

Pro extrakci proteinů z levé komory a septa bylo použito 25 řezů z kryostatu (tloušťka 15µm); pravá komora byla vzhledem ke své velikosti homogenizována celá přístrojem Ultraturax Polytron (rychlost 8, 20 sekund). Pro extrakci byl použit vřelý SDS pufr (1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM ortho-vanadát, 0,3 mM aprotinin, 4 mM leupeptin, 60 mM

phenylmethanesulfonyl fluorid). Lyzáty byly zahřáty v mikrovlnné troubě (15s, 900W) a poté zcentrifugovány (11 000g, 15 min při 15°C). Koncentrace extrahovaných proteinů v supernatantu byla změřena pomocí „BCA protein assay“ kitu (Pierce-Perbio; Brebières, Francie); jako standard byly použity vzorky o různé koncentraci BSA. Extrakty byly do další analýzy uchovány při teplotě -20°C.

Expres HO-1 a HO-2 byla stanovena pomocí metody Western blot. Proteiny (20 µg pro detekci HO-1 a 10 µg pro detekci HO-2) byly po denaturaci separovány elektroforézou (90V) na 12%ním SDS-polyakrylamidovém gelu a následně elektroforeticky (2 hodiny, 300 mA, 200V) přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (póry 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) v roztoku o složení: 25mM Tris, 192 mM glycin, 0,01% SDS a 15% ethanol (pro oba kroky byl použit Bio Rad systém). Pro ověření, zda do každé jamky bylo nanášeno stejné množství proteinu, byly membrány obarveny pomocí S-ponceau (Sigma). Membrány pak byly po dobu 2 hodin blokovány při laboratorní teplotě v saturačním roztoku: TBS (pH 7,4) obsahující 0,1% Tween-20 a 5% odtučněné sušené mléko. Poté byly přes noc inkubovány s protilátkami při teplotě 4°C a to buď s anti-HO-1 nebo anti-HO-2 (obě králičí; Stressgen); obě byly použity v koncentraci 1/4000 v saturačním roztoku (TBS-Tween-20 s přídavkem mléka). Po vymytí nenavázaných protilátek (3x 10min v TBS-Tween-20) byly membrány 2 hodiny inkubovány při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou (IgG proti králičím protilátkám) konjugovanou s křenovou peroxidázou (o koncentraci 1/5000 v saturačním roztoku, Amersham). Po opětovném vymytí byly imunoreaktivní proužky vizualizovány pomocí zesílené chemiluminiscence ECL+ (Amersham) a přístroje Fujifilm Las-1000. Velikost proužků byla stanovena denzitometricky na počítači se softwarem Image Gauge, Fuji a výsledek byl normalizován na množství aktinu v příslušném gelu (stanoveno denzitometricky z fotografie membrány po obarvení S-ponceau). Aby byla možná normalizace mezi jednotlivými analýzami v různé dny, do každého gelu byl nanášen protein ze stejného vzorku.



## STATISTICKÉ HODNOCENÍ

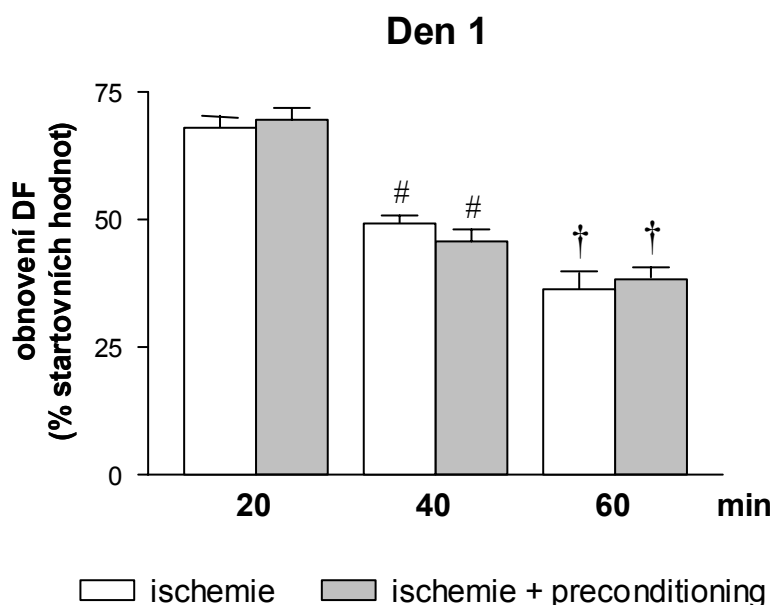
Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty  $\pm$  střední chyby průměru (S.E.M.). Výsledky byly získány z nejméně osmi izolovaných srdcí v každé skupině. U biochemických analýz bylo ve skupině vždy nejméně 5 vzorků. Rozdíly v obnově kontraktility mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny použitím dvoj- a jednocestné analýzy variance. ANOVA a následný Student-Newman-Keulsův test byly použity pro analýzu variance uvnitř skupin. Lineární regresní přímky byly hodnoceny analýzou kovariance (ANCOVA). Statistické rozdíly byly považovány za významné při  $p < 0,05$ . Ke statistickému a grafickému zpracování výsledků byl použit program GraphPad Prism 3.00.

## VÝSLEDKY

### FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ODOLNOST SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U KONVENČNÍCH POTKANŮ

#### Vliv délky globální ischemie

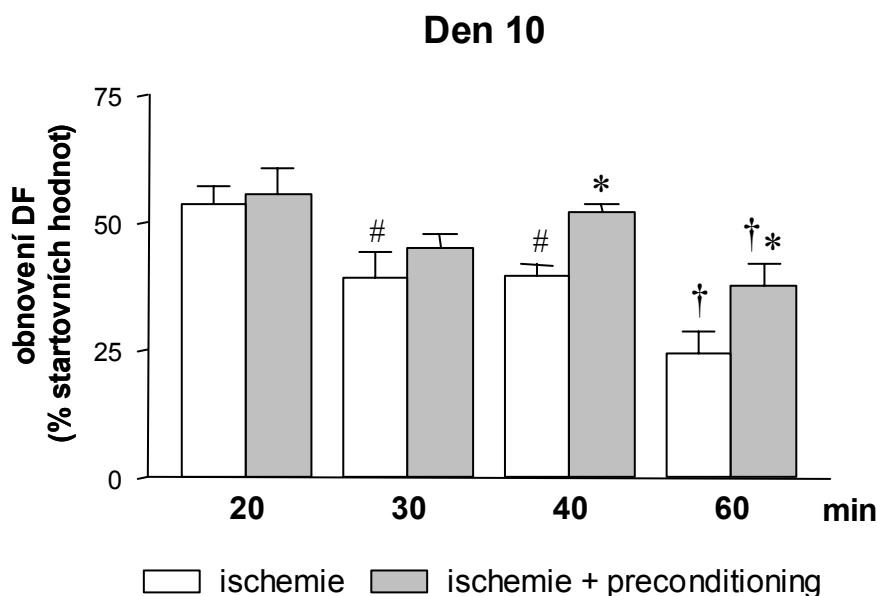
1. den postnatálního života se odolnost myokardu k ischemii (vyjádřená jako obnovení kontraktility) s prodlužováním délky ischemie významně snižovala. Protektivní efekt IP však nebylo možné vyvolat ani zvyšováním intenzity ischemického stimulu (obr. 9).



**Obrázek 9: Odolnost srdečního svalu a IP u jednodenního srdce; závislost na délce globální ischemie.**

<sup>#</sup> signifikantní ( $p < 0,05$ ) oproti 20 min; <sup>†</sup> signifikantní ( $p < 0,05$ ) oproti 40 min.

10. den postnatálního života reparace kontraktility s prodlužující se délkou globální ischemie rovněž významně klesala. Protektivní efekt IP se po 20 a 30 min ischemii neprojevil, minimální doba ischemie, kdy bylo možno jeho účinek pozorovat, byl 40 minut (obr. 10). Ve všech následujících experimentech proto byla neonatální srdce vystavena 40 min globální ischemii.



**Obrázek 10: Odolnost srdečního svalu a IP u 10ti denního srdce; závislost na délce ischemie.**

# signifikantní ( $p < 0,05$ ) oproti 20 min; † signifikantní ( $p < 0,05$ ) oproti 40 min; \* signifikantní ( $p < 0,05$ ) oproti ischemické skupině.

### Vliv tělesné hmotnosti

Při adaptaci mláďat na IVH signifikantně klesá hmotnost mláďat. Otázkou je, zda právě nízká tělesná hmotnost *per se* není tím protektivním faktorem. Porovnávali jsme proto odolnost srdce k ischemii u tří skupin mláďat: a) u „hypoxických“, která měla sníženou tělesnou hmotnost díky pobytu v hypobarické komoře (hypoxická s nízkou hmotností, HNH), b) u skupiny normoxických mláďat, u níž bylo dosaženo nízké tělesné hmotnosti díky většímu počtu mláďat v jednom hnízdě (normoxická s nízkou hmotností, NNH) a c) u kontrolní skupiny (normální tělesná hmotnost).

Hmotnostní parametry mláďat a hematokrit jsou uvedeny v tabulce 3. Hmotnost těla byla oproti kontrolám signifikantně snížena u obou pokusných skupin (HNH, NNH). Stejně tak byla snížena i vlhká a suchá hmotnost srdce; tento efekt byl více vyjádřen u NNH. U HNH byla signifikantně zvýšena jak relativní hmotnost srdce, tak jeho hydratace (snížený obsah sušiny). Růstová retardace byla doprovázena zvýšením hematokritu a to jak u HNH, tak u NNH.

Absolutní startovní hodnoty síly kontrakce byly u obou pokusných skupin oproti kontrolám signifikantně sníženy. U NNH se síla kontrakce, vyjádřená na gram srdeční tkáně (suché i vlhké), od kontrol nelišila, ale byla signifikantně vyšší než u mláďat ze skupiny HNH (tabulka 4).

**Tabulka 3: Hmotnostní parametry.**

Skupina	n	Hmotnost těla [g]	Hematokrit [%]	Hmotnost srdce [mg]	Relativní hmotnost srdce [mg/g]	Hmotnost sušiny [mg]	Relativní hmotnost sušiny [%]
<i>Kontroly</i>	13	23,7 ± 0,8	31,4 ± 0,5	100,5 ± 3,4	4,3 ± 0,1	19,2 ± 0,4	19,4 ± 0,7
<i>HNH</i>	22	17,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	39,5 ± 0,6 <sup>ab</sup>	85,0 ± 2,9 <sup>ab</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>	15,0 ± 0,6 <sup>ab</sup>	17,7 ± 0,3 <sup>ab</sup>
<i>NNH</i>	10	16,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	34,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	69,1 ± 2,8 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,2	12,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	18,7 ± 0,3

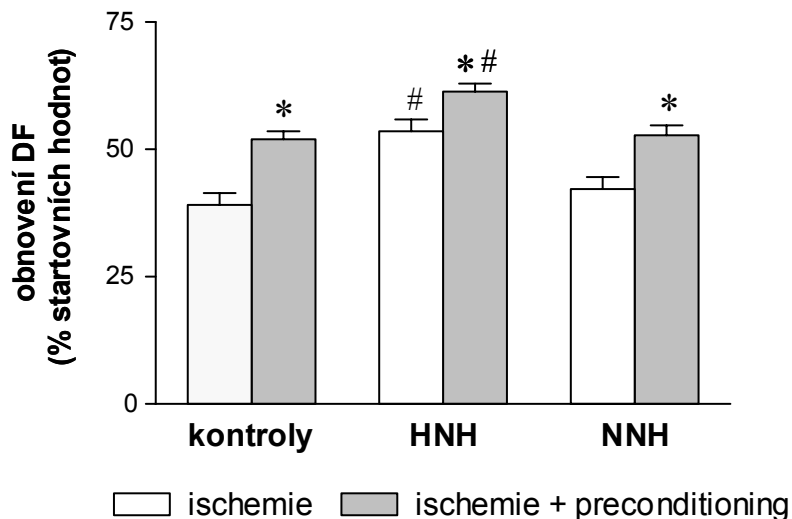
<sup>a</sup> signifikantní vs. Kontroly, <sup>b</sup> signifikantní vs. NNH

**Tabulka 4: Kontraktilní parametry – startovní hodnoty.**

Skupina	DF [g]	DF/hmotnost srdce [g/g]	DF/sušina [g/g]
<i>Kontroly</i>	4,6 ± 0,3	46,6 ± 3,0	241 ± 16
<i>HNH</i>	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	41,0 ± 2,4 <sup>b</sup>	233 ± 14 <sup>b</sup>
<i>NNH</i>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	50,0 ± 2,2	269 ± 10

<sup>a</sup> signifikantní vs. Kontroly, <sup>b</sup> signifikantní vs. NNH

Zatímco adaptace mláďat na IVH signifikantně zvyšuje obnovení síly kontrakce po ischemii, nízká tělesná hmotnost *per se* (u normoxických mláďat) neměla na reparaci kontraktilních funkcí po globální ischemii žádný vliv. Protektivní efekt IP byl pozorován u všech sledovaných skupin; IP navíc zvyšoval protektivní účinek IVH (obr. 11).



**Obrázek 11: Odolnost 10ti denního srdce mlád'at s nízkou tělesnou hmotností, efekt IP.**

Kontroly – standartní počet (8) mlád'at v hnízdě za normoxických podmínek; HNH – mlád'ata s nízkou tělesnou hmotností adaptovaná na IVH; NNH – mlád'ata s nízkou tělesnou hmotností (vyšší počet mlád'at v hnízdě, 14) za normoxických podmínek.

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. ischemie; # signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. kontroly a NNH.

### Úloha AT1 receptorů v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii

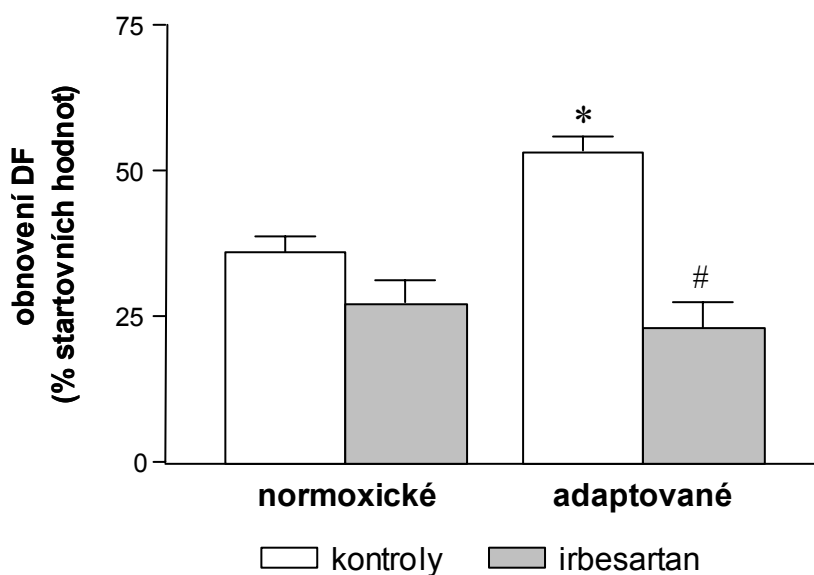
Jak bylo uvedeno v úvodu, molekulární mechanismy zvýšené odolnosti nezralého srdce k ischemii nejsou dosud známy. Možné signální dráhy, které se v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii mohou uplatňovat, zahrnují i AT1 receptory. Mlád'atům, vystaveným chronické hypoxii nebo chovaným v normoxických podmínkách, jsme proto podávali blokátor AT1 receptorů irbesartan.

Hmotnostní parametry mlád'at jsou shrnuty v tabulce 5. U mlád'at adaptovaných od narození do 10. dne na IVH došlo k signifikantnímu poklesu tělesné hmotnosti, vzestupu hematokritu a nárůstu hmotnosti pravé srdeční komory, zatímco hmotnost levé komory zůstala oproti normoxickým kontrolám nezměněná. Podávání irbesartanu vedlo k významnému snížení absolutní hmotnosti těla a obou srdečních komor jak u normoxické, tak hypoxické skupiny mlád'at. Relativní hmotnost obou komor byla snížena pouze u mlád'at adaptovaných na IVH. U normoxické skupiny došlo po podávání irbesartanu k vzestupu hematokritu, u adaptovaných mlád'at se hematokrit po podání farmaka nezměnil. Podávání irbesartanu nemělo u normoxické skupiny žádný vliv na odolnost srdce k ischemii, ale zablokovalo protektivní efekt adaptace mlád'at na chronickou hypoxii (obr. 12).

**Tabulka 5: Hmotnostní parametry 10ti denních mlád'at po adaptaci na IVH a podávání irbesartanu.**

Skupina	n	Hmotnost těla [g]	Hematokrit [%]	Hmotnost PK [mg]	Hmotnost LK [mg]	PK/HT [mg/g]	LK/HT [mg/g]
<i>normoxické</i>	K 16	17,2 ± 0,9	31,9 ± 0,2	18,4 ± 1,2	53,9 ± 1,8	1,07 ± 0,03	3,18 ± 0,10
	I 16	12,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	34,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	15,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	37,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,06	2,92 ± 0,13
<i>adaptované</i>	K 15	14,9 ± 0,6 <sup>b</sup>	41,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	21,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	50,7 ± 1,8	1,46 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,41 ± 0,07
	I 17	12,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	41,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	15,4 ± 0,6	32,6 ± 0,9 <sup>ab</sup>	1,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,04 <sup>a</sup>

K – kontroly, I – irbesartan, PK – pravá komora, LK – levá komora se septem, HT – hmotnost těla  
<sup>a</sup> signifikantní vs. kontrolní skupina, <sup>b</sup> signifikantní vs. normoxická skupina



**Obrázek 12: Vliv irbesartanu na odolnost 10ti denního srdce mlád'at k akutní ischemii.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. normoxická skupina; # signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. kontrolní skupina (bez irbesartanu).

## VÝVOJ ODOLNOSTI SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ

### Hmotnostní parametry mláďat SHR

Časný postnatální vývoj vybraných hmotnostních a kontraktilních parametrů mláďat SHR v porovnání s jejich normotenzivními kontrolami WKY je shrnut v tabulkách 6-8.

První postnatální den měla mláďata obou kmenů stejnou tělesnou hmotnost, během časného postnatálního období však měla mláďata SHR menší vahový přírůstek a 10. den již měla oproti kontrolám signifikantně nižší hmotnost těla. Srdce hypertenzních mláďat byla významně zvětšená již po narození, tento rozdíl přetrvával i 10. den. Zvětšená srdce však obsahovala méně sušiny. Z kontraktilních parametrů se po narození mláďata SHR od WKY nelišila v absolutních hodnotách DF a dF/dt max, 10. den však již byly tyto hodnoty u SHR signifikantně sníženy. DF vztažená na hmotnost srdce však byla výrazně nižší již 1. den.

**Tabulka 6: Hmotnostní parametry jednodenních WKY a SHR.**

Skupina	n	Hmotnost těla [g]	Hematokrit [%]	Hmotnost srdce[mg]	Relativní hmotnost srdce[mg/g]	Relativní hmotnost sušiny [%]
WKY	14	5,0 ± 0,1	38,6 ± 1,3	21,2 ± 0,7	4,3 ± 0,1	18,8 ± 0,3
SHR	9	4,8 ± 0,1	36,2 ± 1,5	27,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	16,1 ± 0,5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> signif. vs. WKY

**Tabulka 7: Hmotnostní parametry 10ti denních WKY a SHR.**

Skupina	n	Hmotnost těla [g]	Hematokrit [%]	Hmotnost srdce[mg]	Relativní hmotnost srdce[mg/g]	Relativní hmotnost sušiny [%]	Srdeční index [%]
WKY	13	18,7 ± 0,6	31,7 ± 0,5	77,5 ± 2,5	4,2 ± 0,1	18,4 ± 0,3	29,1 ± 1,3
SHR	18	12,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	33,2 ± 0,9	69,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	15,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	23,7 ± 0,9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> signifikantní. vs. WKY

**Tabulka 8: Startovní hodnoty kontraktilních parametrů SHR a WKY 1. a 10. den.**

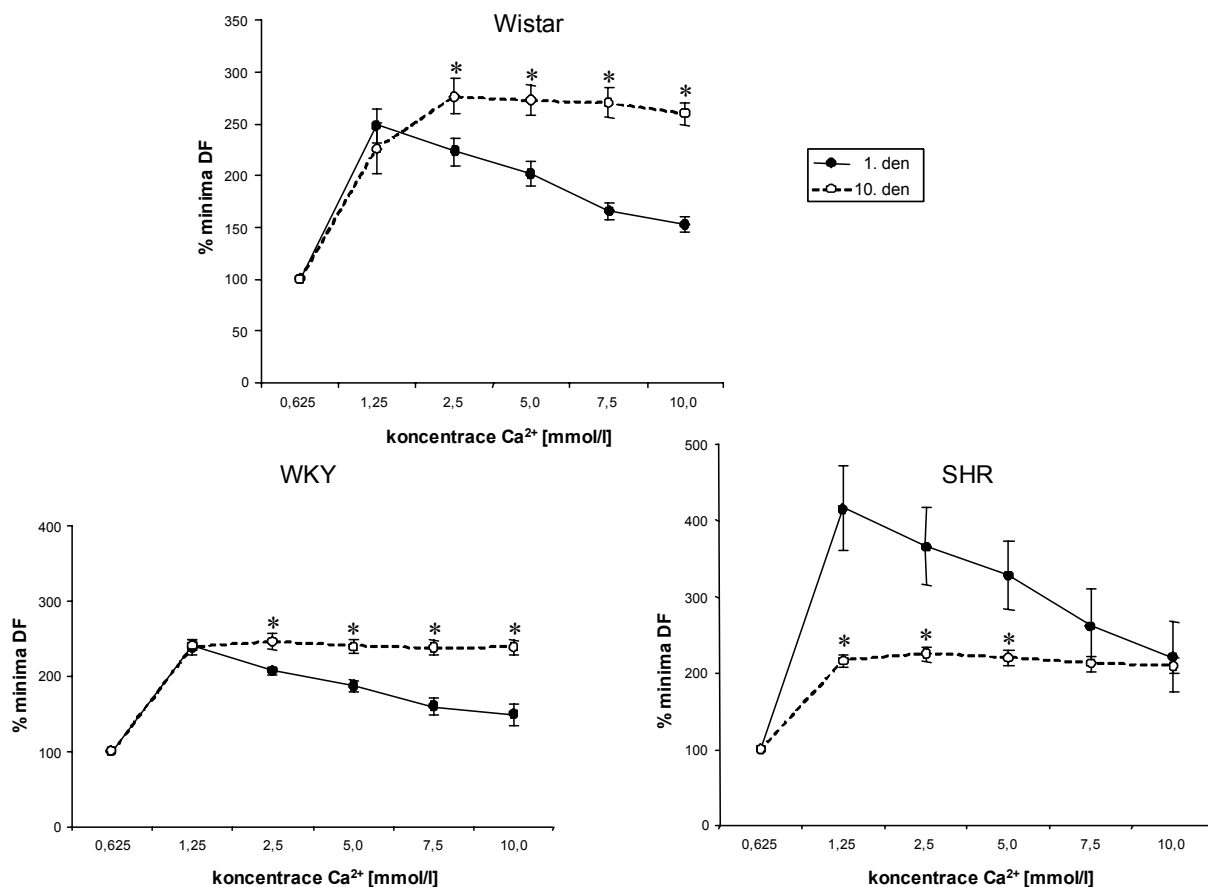
Skupina	Věk	DF [g]	DF/ hmotnost srdce [g/g]	DF/sušina [g/g]	+dF/dt max [g/min]
<i>WKY</i>	1	1,2 ± 0,1	55,4 ± 3,0	305,2 ± 15,0	26,9 ± 1,8
	10	5,7 ± 0,2	74,5 ± 3,1	404,0 ± 15,1	129,2 ± 4,4
<i>SHR</i>	1	1,1 ± 0,1	40,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	256,4 ± 14,9 <sup>a</sup>	24,1 ± 1,2
	10	4,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	60,0 ± 3,3 <sup>a</sup>	387,0 ± 20,1	89,7 ± 4,2 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> signifikantní. vs. WKY odpovídajícího věku

### Citlivost neonatálního srdce SHR k vápníku

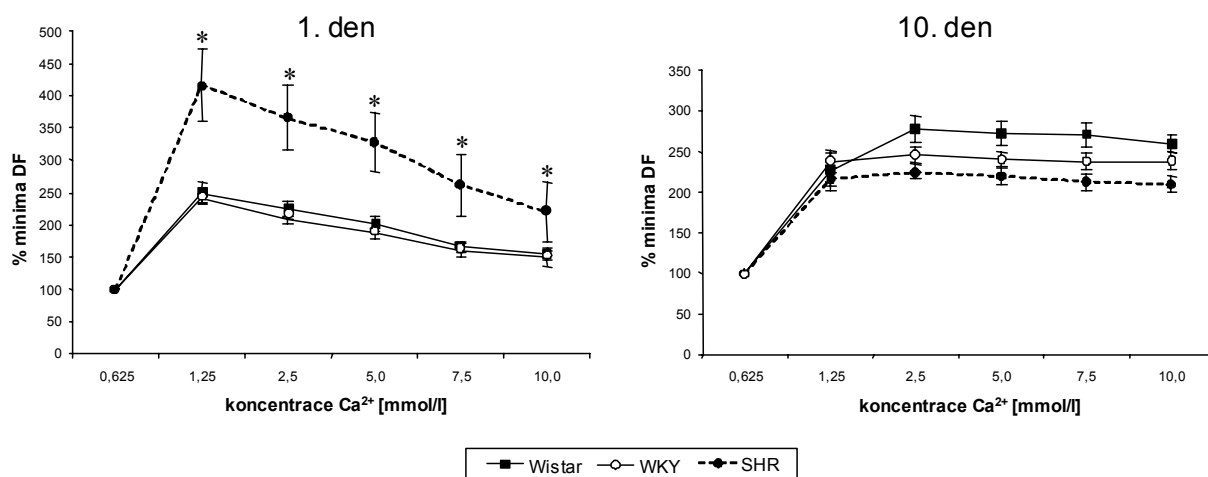
Porovnávali jsme citlivost jednodenního a desetidenního izolovaného srdce konvenčních kmenů, WKY a SHR ke stoupající koncentraci vápníku v perfuzním roztoku. Během časného postnatálního období se citlivost k vápníku významně mění u všech sledovaných kmenů (obr. 13). U jednodenních srdcí všech kmenů síla kontrakce při vyšších koncentracích klesala, u 10ti denních se držela přibližně na stejné úrovni. Citlivost jednodenních SHR k vápníku však byla oproti normotenzním kontrolám WKY (a konvenčním mláďatům) významně vyšší, 10. den se tato hodnota u jednotlivých skupin již nelišila (obr. 14).





**Obrázek 13: Citlivost izolovaných srdcí 1 a 10ti denních mláďat kmene Wistar, WKY a SHR ke stoupající koncentraci vápníku.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. 1. den.



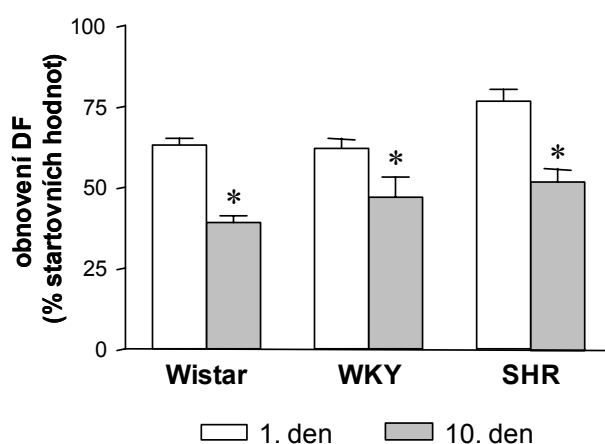
**Obrázek 14: Srovnání citlivosti izolovaných srdcí 1 a 10ti denních mláďat kmene Wistar, WKY a SHR ke stoupající koncentraci vápníku.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. WKY.

## Odolnost srdcí neonatálních SHR k nedostatku kyslíku

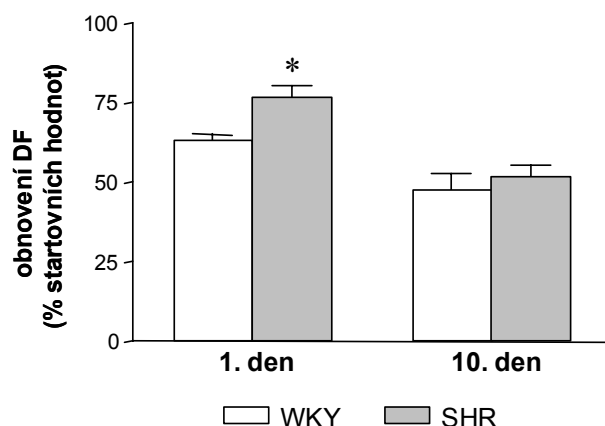
Stejně jako u konvenčních kmenů Wistar, odolnost srdečního svalu k ischemii u kmenů SHR a WKY během časného postnatálního vývoje klesá: 10. den jsou jejich srdce signifikantně méně odolná k nedostatku kyslíku než 1. den (obr. 15).

Novorozená hypertenzní mláďata jsou přitom k nedostatku kyslíku významně odolnější než mláďata kontrolního kmene WKY. 10. den se pak již v odolnosti SHR od WKY neliší (obr. 16).



**Obrázek 15: Odolnost srdečního svalu k ischemii u kmenů Wistar, WKY a SHR, 1. a 10. postnatální den.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. 1. den.



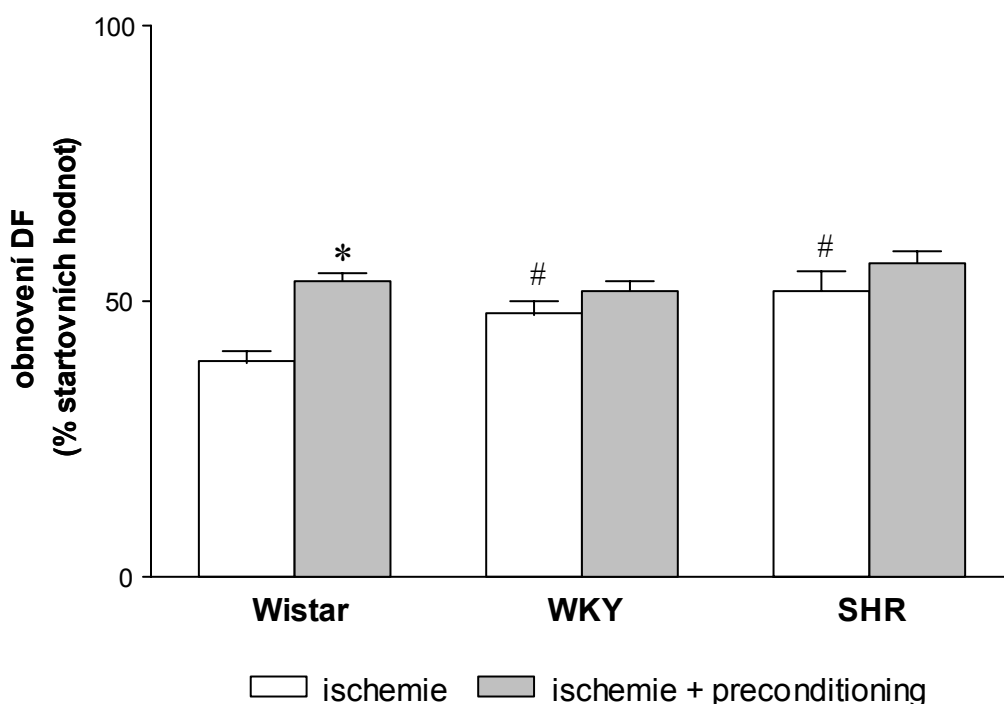
**Obrázek 16: Odolnost srdečního svalu mláďat SHR a WKY. Porovnání 1. a 10. postnatálního dne života.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. WKY.

## Možnosti protekce neonatálního srdce SHR

Jak bylo řečeno výše, u mláďat konvenčního kmene Wistar lze 10. den odolnost srdce k ischemii protektivně ovlivnit v zásadě dvěma mechanismy: IP a adaptací na chronickou hypoxii. Zajímalo nás proto, jak na oba protektivní fenomény budou reagovat 10ti denní mláďata WKY a SHR. Zjistili jsme, že u SHR a WKY se protektivní účinek IP neprojevil (obr. 17).

Vystavení mláďat obou sledovaných kmenů IVH (hmotnostní parametry shrnuty v tab. 9) vedlo ke zvýšení hematokritu a jejich adaptace byla provázena významným snížením hmotnosti těla. Relativní hmotnost srdce se však zvýšila pouze u kontrolních WKY, u hypertenzních mláďat, u kterých byla relativní hmotnost srdce zvýšena již u normoxické skupiny, k dalšímu zvýšení nedošlo. Pravolevý srdeční index však po adaptaci stoupal i u SHR, u normoxické skupiny byl naopak nižší. Obdobně jako u IP, u žádného z testovaných kmenů jsme neprokázali kardioprotektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii (obr. 18.).



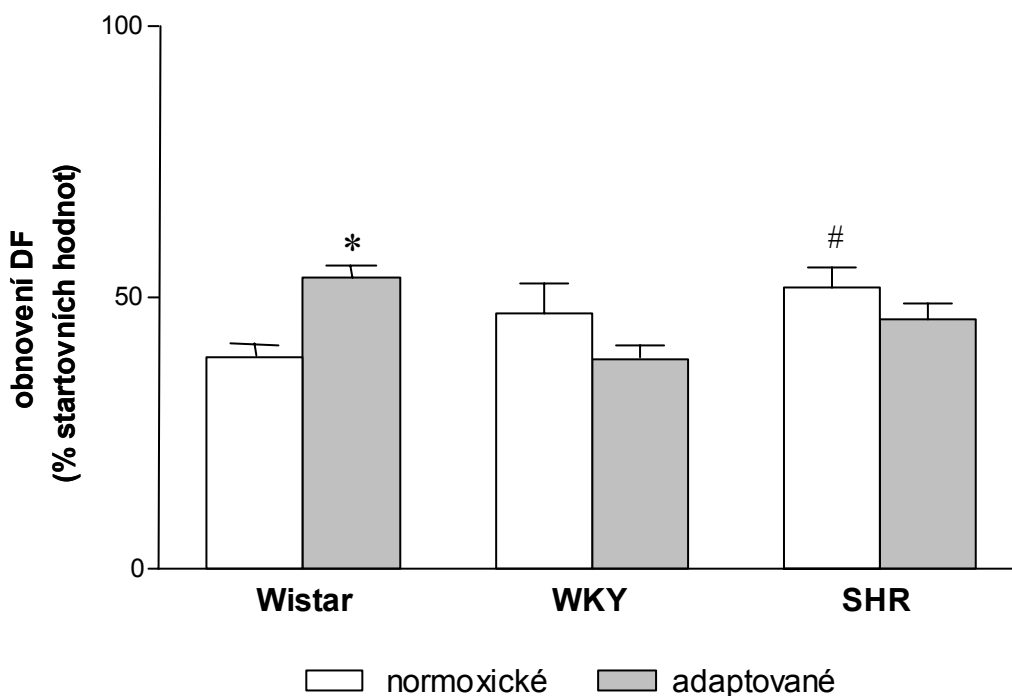
**Obrázek 17: Vliv IP na odolnost srdečního svalu 10ti denních mláďat kmene Wistar, WKY a SHR.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. ischemická skupina, # signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. konvenční Wistar.

**Tabulka 9: Hmotnostní parametry 10ti denních WKY a SHR po adaptaci na IVH.**

Skupina	n	Hmotnost těla [g]	Hematokrit [%]	Hmotnost srdce[mg]	Relativní hmotnost srdce[mg/g]	Relativní hmotnost sušiny [%]	Srdeční index [%]	
<i>WKY</i>	normoxické	13	18,7 ± 0,6	31,7 ± 0,5	77,5 ± 2,5	4,2 ± 0,1	18,4 ± 0,3	29,1 ± 1,3
	adaptované	18	14,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	38,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	72,0 ± 2,0	4,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	17,8 ± 0,3	37,5 ± 1,2 <sup>b</sup>
<i>SHR</i>	normoxické	18	12,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	33,2 ± 0,9	69,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	15,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	23,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
	adaptované	16	8,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	36,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	50,7 ± 1,9 <sup>b</sup>	5,7 ± 0,1	16,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	35,8 ± 1,3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> signifikantní. vs. WKY, <sup>b</sup> signifikantní. vs. normoxická skupina



**Obrázek 18: Vliv adaptace na chronickou hypoxii na odolnost srdečního svalu 10ti denních mládřat kmene Wistar, WKY a SHR.**

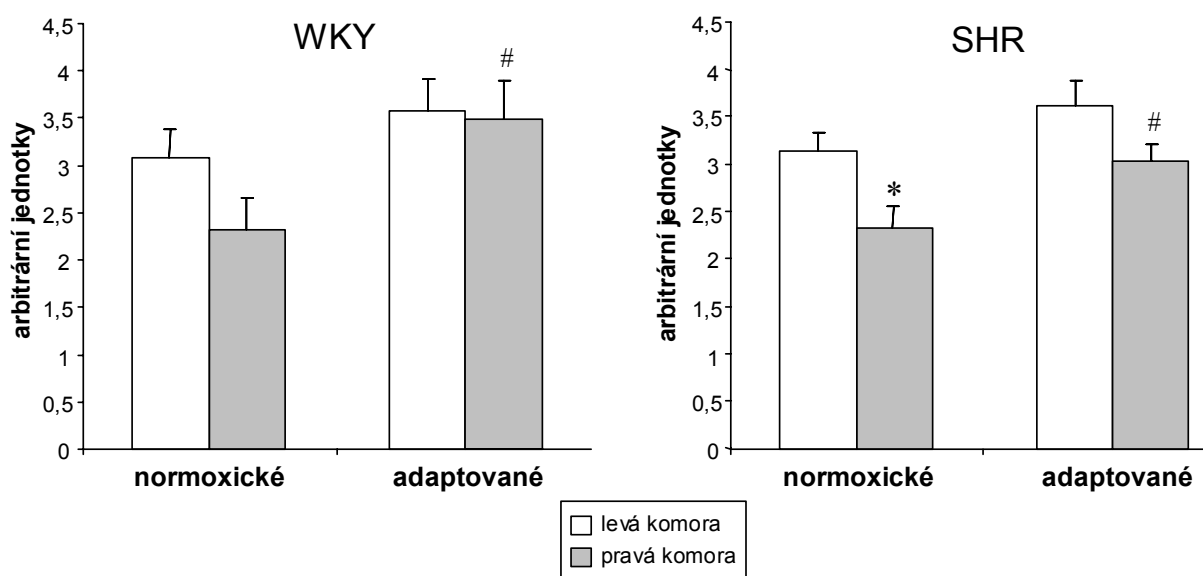
\* signifikantní (p < 0,05) vs. normoxická skupina, # signifikantní (p < 0,05) vs. konvenční Wistar.

## Expresi hem oxygenázy v neonatálním srdci SHR

V 10ti denních srdcích spontánně hypertenzních mláďat s kardiomegalií a jejich kontrol WKY jsme studovali expresi hem oxygenázy 1 a 2, a to odděleně v pravé a levé komoře se septem.

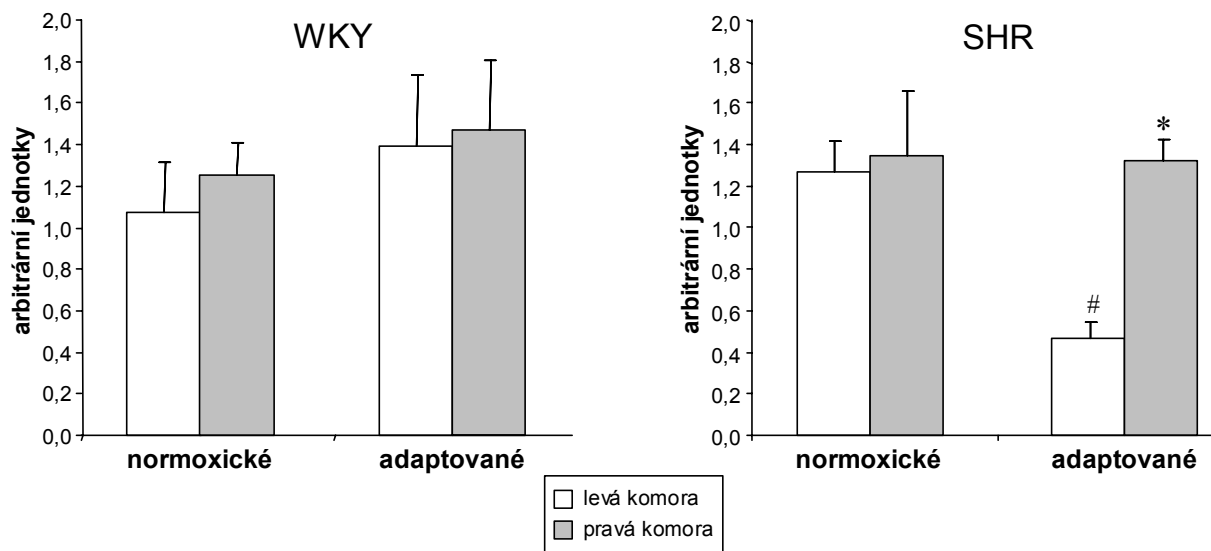
Expresi inducibilní izoformy HO-1 byla u SHR signifikantně nižší v pravé komoře v porovnání s komorou levou. U kontrolních WKY nebyl mezi komorami v expresi HO-1 statisticky významný rozdíl. Po adaptaci na IVH došlo jak u mláďat SHR, tak u kontrolních WKY k signifikantnímu zvýšení exprese HO-1 v pravé komoře (obr. 19).

Expresi konstitutivní izoformy HO-2 byla v obou komorách shodná jak u SHR, tak u WKY. Adaptace na IVH významně snížila expresi HO-2 u SHR v levé komoře oproti normotenzním mláďatům. U kontrolních WKY nebyla exprese HO-2 adaptací ovlivněna (obr. 20).



**Obrázek 19: Expresi HO-1 v 10ti denním srdci mláďat kmene WKY a SHR, vliv chronické hypoxie.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. levá komora; # signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. normoxická skupina.



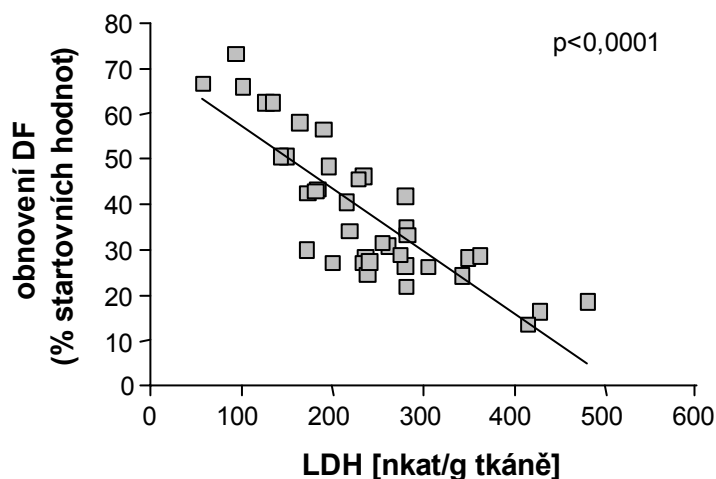
**Obrázek 20: Exprese HO-2 v 10ti denním srdci mláďat kmene WKY a SHR, vliv chronické hypoxie.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. levá komora; # signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. normoxická skupina.

## ÚLOHA MPT PÓRU V MECHANIZMU ISCHEMICKO-REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ

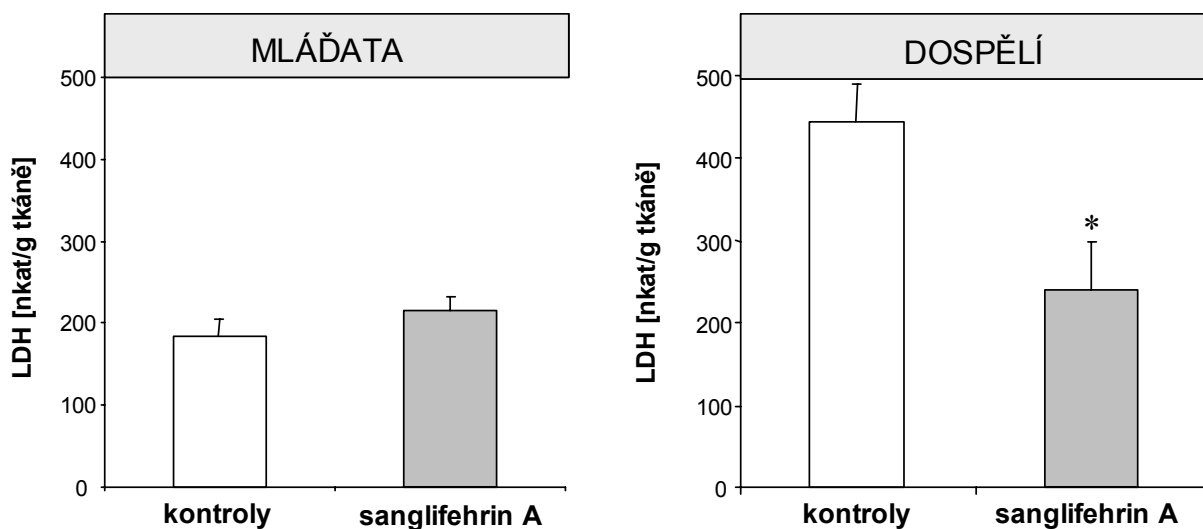
### Ovlivnění rozsahu ischemicko-reperuzního poškození

Na nezralém srdci (10. den) jsme sledovali vliv blokády MPT póru sangliféhrinem A na rozsah ischemicko-reperuzního poškození v porovnání se srdcem dospělým. Ke stanovení míry ischemicko-reperuzního poškození na izolovaném srdci jsme použili metodu měření aktivity LDH v koronárním efluentu. Tato metoda se rutinně používá u dospělých, u mláďat však její spolehlivost zatím nebyla ověřena. Naše měření ukázala, že míra obnovy kontraktility po ischemii a množství vyplavené LDH vykazovala výraznou negativní korelaci (obr. 21), což nás utvrdilo v tom, že tuto metodu lze velmi dobře použít i pro neonatální srdce.



**Obrázek 21: Vztah mezi reparací kontraktility a množstvím vyplavené LDH u 10ti denních mláďat.**

Rozsah poškození jsme proto vyjadřovali jako množství celkové LDH vzniklé během postischemické reperfuze. Zatímco u 10-ti denních mláďat nedošlo blokádou MPT póru ke statisticky významnému ovlivnění produkce LDH v průběhu reperfuze, u dospělých došlo k významnému snížení rozsahu poškození (obr. 22).

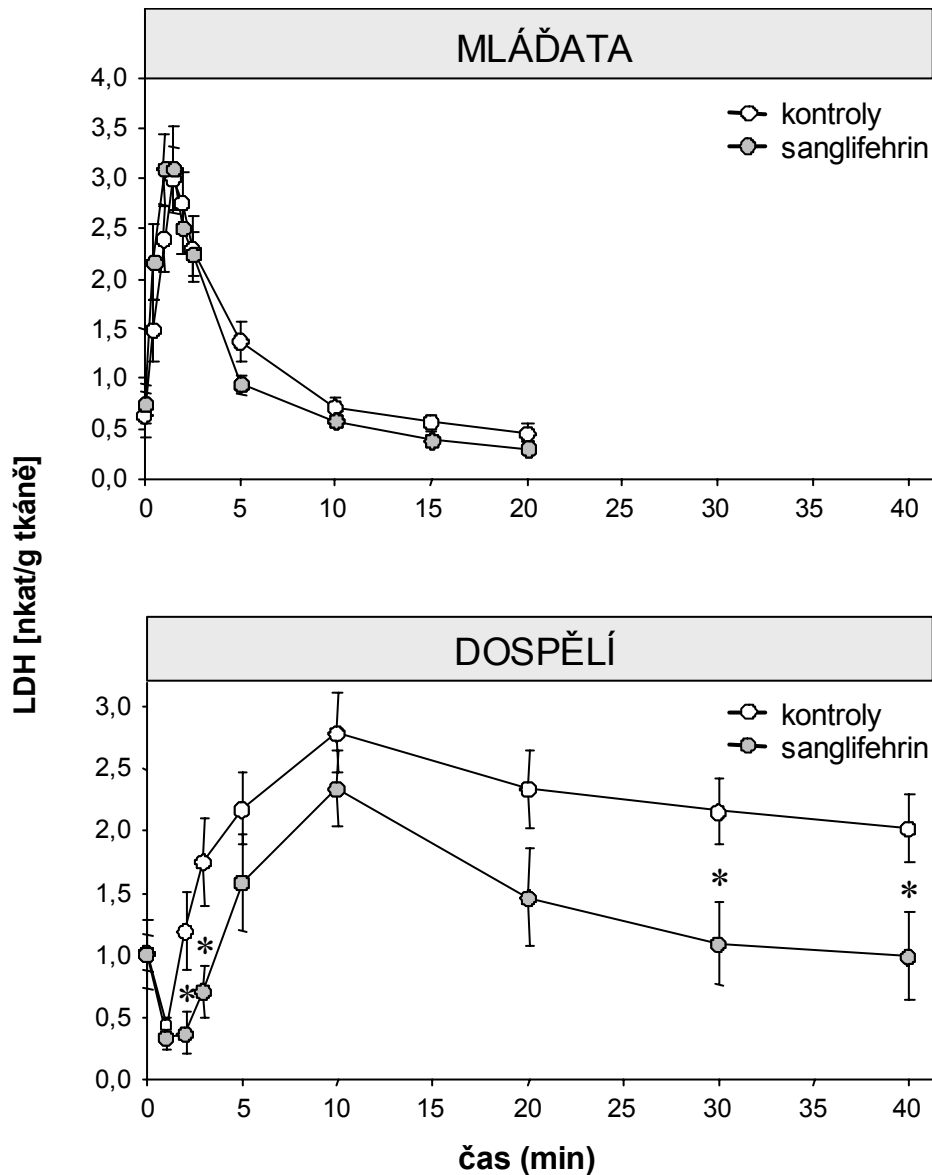


**Obrázek 22: Vliv blokády MPT póru na ischemicko-reperfuzní poškození izolovaných srdcí 10ti denních mláďat a dospělých potkanů.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. kontroly.

Časový průběh vyplavování LDH se u mláďat a dospělých významně lišil. U mláďat bylo maxima dosaženo po 3. min, u dospělých o 7 min později; návrat k počátečním hodnotám jsme u mláďat pozorovali po 15-20 min, u dospělých zvířat zůstaly hodnoty i po 40 min reperfuze zvýšeny (obr. 23).



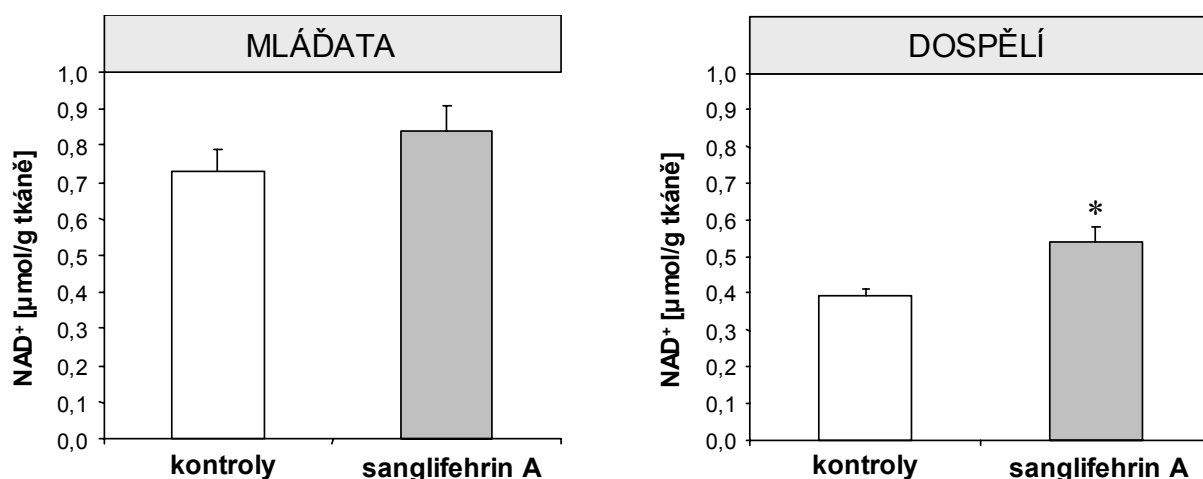


**Obrázek 23: Vliv blokady MPT póru na ischemicko-reperfuzní poškození izolovaných srdcí 10ti denních mláďat a dospělých potkanů; časový průběh vyplavení LDH.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. kontroly.

### Ovlivnění aktivity MPT póru

Pro sledování aktivity MPT póru po podání sangliferinu A jsme použili metodu měření  $NAD^+$  v srdeční tkáni na konci reperfuze. U mláďat jsme nezaznamenali statisticky významné změny, naproti tomu u dospělých se vlivem blokady póru zachovalo v srdeční tkáni významně větší množství  $NAD^+$  (obr. 24).

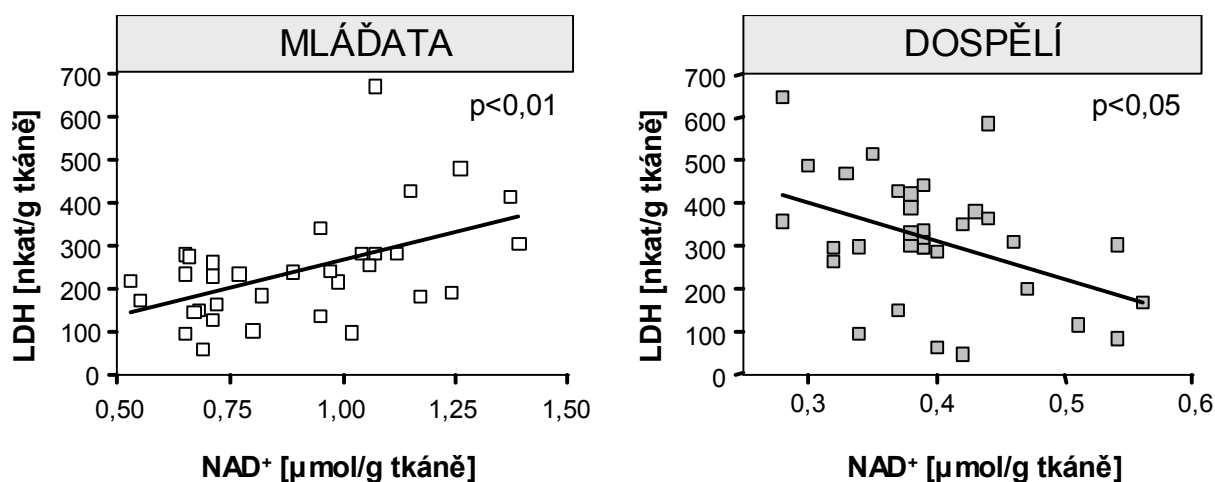


**Obrázek 24: Vliv blokády MPT póru na obsah NAD<sup>+</sup> v srdeční tkáni 10ti denních mlád'at a dospělých potkanů v průběhu ischemie a reperfúze.**

\* signifikantní ( $p < 0,05$ ) vs. kontroly.

### Vztah mezi LDH a NAD<sup>+</sup>

U dospělých byla prokázána negativní korelace mezi mírou ischemického poškození a koncentrací NAD<sup>+</sup> v srdeční tkáni: se zvětšujícím se poškozením množství NAD<sup>+</sup> klesá (obr. 25). Tento vztah jsme však nezaznamenali u nezralého srdce. Regresní analýza v tomto případě ukázala vztah právě opačný - s rostoucím poškozením, vyjádřeným jako množství uvolněného LDH, se zvyšuje hladina NAD<sup>+</sup> v tkáni (obr. 25).



**Obrázek 25: Vztah mezi celkovým množstvím vyplavené LDH a obsahem NAD<sup>+</sup> v srdeční tkáni na konci reperfúze; porovnání dospělých srdcí a srdcí 10ti denních mlád'at.**

## DISKUZE

Naše pokusy ukázaly, že u jednodenních mláďat konvenčních potkanů odolnost myokardu k ischemii (vyjádřená jako obnovení kontraktility) klesá s délkou ischemie. U jednodenních mláďat nelze vyvolat protektivní působení IP ani prodloužením ischemie z 20 na 60 min. U 10ti denních mláďat se protektivní vliv IP projeví, ale minimální doba ischemie, nutná k ochrannému účinku IP, je 40min. Odolnost neonatálního srdce k ischemii není ovlivněna nízkou tělesnou hmotností, vyvolanou nedostatečnou výživou v časně fázi ontogenetického vývoje. To naznačuje, že minimálně u neonatálních potkanů nejsou kardioprotektivní fenomény, jako je adaptace na IVH a IP, ovlivněny růstovou retardací. Kardioprotektivní efekt chronické hypoxie lze u 10ti denních mláďat kompletně odstranit blokádou AT 1 receptorů.

Odolnost srdečního svalu k akutní ischemii u SHR a WKY po porodu klesá, podobně jako je tomu u konvenčních potkanů. Na rozdíl od kmene Wistar nelze však u WKY a SHR odolnost protektivně ovlivnit: jak IP tak adaptace na IVH byly bez efektu. Adaptace na IVH však výrazně ovlivnila aktivitu obou izoforem hem oxygenázy: zvýšila expresi HO-1 v pravé komoře, naopak u SHR snížila expresi HO-2 v komoře levé.

Úloha MPT póru v mechanismu ischemicko-reperfúzního poškození neonatálního srdce se od dospělého srdce liší: zatímco jeho blokáda v dospělém srdci snižuje rozsah poškození, v nezralém srdci je bez účinku.

Podívejme se nyní na jednotlivé výsledky podrobněji.

### FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ODOLNOST SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U KONVENČNÍCH POTKANŮ

#### **Vliv délky globální ischemie**

U jednodenních i 10ti denních mláďat se odolnost myokardu k ischemii s prodloužováním délky ischemického insultu významně snižovala. V souladu s předchozími výsledky naší laboratoře {Ošťádalová a spol., 1998} jsme ukázali, že ihned po narození (1. den) nelze protektivní působení IP vyvolat, a to ani po prodloužení ischemické fáze na 60 minut. Podobný výsledek popisuje Awad a spol. {1998} u 4-denního potkana. Nelze však vyloučit, že při použití odlišného ukazatele poškození (např. velikost infarktu, počet arytmií) či jiného živočišného druhu, může mít protektivní efekt preconditioningu odlišný časový

průběh. Dokladem může být práce Liu a spol. {1998}, kteří pozorovali, že IP může být vyvolán na izolovaném perfundovaném srdci 4-7 denního králíka.

10. den postnatálního života lze již při použití našeho standardního protokolu (tj. 40min ischemie) protektivní efekt IP vyvolat. Při zkrácení ischemické fáze na 30 resp. 20 min se však ochranný účinek neprojevil. IP není tedy zřejmě genotypickým fenoménem, ale rozvíjí se během prvního postnatálního týdne s tím, jak klesá endogenní odolnost myokardu k nedostatku kyslíku.

### **Vliv tělesné hmotnosti**

Mláďata, jež byla od narození adaptována na IVH, rostla pomaleji a dosáhla nižší hmotnosti těla a srdce, navíc měla zvýšený hematokrit. Míra těchto adaptivních odpovědí je obdobná jako v předcházejících experimentech {Ošťádalová a spol., 2002}. Mláďata jsou do 15. dne postnatálního života z hlediska výživy a vylučování výhradně závislá na matce {Babický a spol., 1970, 1973}. Hlavním důvodem opoždění růstu adaptovaných mláďat je tedy zřejmě negativní dopad adaptace matky na produkci mléka, a to na jeho kvalitu i kvantitu. Mezi dalšími příčinami lze jmenovat například sníženou odpověď mláďat na hlad, vyvolanou IVH {Henning, 1981}, dehydrataci, vyvolanou zvýšenou plicní ventilací {Heath a Williams, 1995}, zvýšenou bazální metabolickou spotřebu při pobytu ve vysokých nadmořských výškách {Nair a spol., 1971}, anorexii a hypofagii {Gloster a spol., 1974; přehled viz Chvojková a spol., 2005}. Stejně opoždění růstu vykazovala i mláďata, jež byla chována v hnízdech s vyšším počtem jedinců. V tomto případě je důvodem omezený přístup mláďat k sání mléka. Vzhledem k tomu, že mateřské mléko je nejen zdrojem kalorií, ale i tekutin, zvýšený hematokrit mláďat v této skupině lze vysvětlit dehydratací mláďat. Hematokrit u adaptované skupiny je kromě dehydratace (viz výše) zvýšen také díky polyglobulii, vyvolané pobytem ve vysoké nadmořské výšce {Ošťádal a Kolář, 1999}.

Samotná nízká tělesná hmotnost, vyvolaná větším počtem mláďat v hnízdě, však neměla žádný vliv na odolnost srdce k ischemii. Zdá se tedy, že růstová retardace není součástí kardioprotektivního mechanismu adaptace na IVH ani mechanismu IP v časných fázích ontogenetického vývoje. Nelze však vyloučit, že malnutrice v časných fázích ontogenetického vývoje nemůže ovlivnit citlivost srdečního svalu k nedostatku kyslíku v dospělosti {Barker, 2006}.

## AT1 receptory v mechanismu adaptace na chronickou hypoxii

Podávání blokátoru AT1 receptorů irbesartanu vedlo k růstové retardaci mláďat. Relativní hmotnost srdečních komor nebyla u normoxické skupiny po podání irbesartanu znatelně ovlivněna, tzn. že retardace růstu postihuje proporcionálně hmotnost těla i srdce. Příčinou této retardace může být anorexie mláďat po podání tohoto farmaka. Snížené sání mláďat vede nejen k poklesu příjmu energie, ale také k dehydrataci. Otázkou je, zda anorexii nemohla vyvolat samotná sondáž žaludku: kontrolní mláďata však podstoupila stejný zákrok; žaludeční sondou jim bylo podáno odpovídající množství fyziologického roztoku a jejich hmotnostní parametry se nelišily od zvířat intaktních. Vliv samotné sondáže žaludku na růstovou retardaci mláďat je tedy nepravděpodobný.

U hypoxické skupiny však irbesartan snížil relativní hmotnost levé srdeční komory a kompletně zabránil zvětšení pravé srdeční komory, vyvolanému adaptací na IVH. Je nepravděpodobné, že by byl tento účinek způsoben sníženou citlivostí mláďat na působení chronické hypoxie, neboť blokáda AT1 receptorů neovlivnila zvýšení hematokritu u hypoxické skupiny. Tyto výsledky však naznačují, že angiotenzin II cestou AT1 receptorů hraje důležitou roli v růstové odpovědi nezralého srdce na IVH. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že v myokardu mláďat vystavených IVH byla nalezena zvýšená denzita AT1 receptorů, zatímco denzita AT2 subtypů zůstala nezměněná {Rakušan a spol., 2007}. Podobně Chassagne a spol. {2000} našli, že zvýšená muskularizace plicních arteriol, vyvolaná chronickou hypoxií, je doprovázena zvýšenou expresí AT1 receptorů. Signální kaskáda cestou AT1 receptorů se v nezralém myokardu rovněž uplatňuje ve vaskulogenezi po adaptaci na IVH, neboť po podání blokátoru AT1 receptorů irbesartanu zůstala denzita arteriol a kapilár u adaptovaných mláďat nezměněná {Rakušan a spol., 2007}.

Důležitým výsledkem těchto experimentů je, že podávání irbesartanu zablokovalo kardioprotektivní efekt adaptace mláďat na IVH, zatímco u normoxické skupiny podávání farmaka odolnost srdce k ischemii neovlivnilo. Z toho vyplývá, že signální kaskáda AT1 receptorů je zřejmě součástí kardioprotektivního účinku adaptace na IVH. V této souvislosti je zajímavé zmínit výsledky Oudota a spol. {2003}, že stimulace AT1 receptorů zlepšuje ochranu srdečního svalu při ischemicko-reperfučním poškození. Zdá se, že inhibiční působení AT1 blokády na odolnost srdce k ischemii se odehrává spíše na úrovni myocytů než na úrovni mikrocirkulace: mláďata adaptovaná na IVH měla po podávání irbesartanu výrazně nižší odolnost k ischemii, zároveň však signifikantně vyšší koronární průtok v průběhu reperfuze {Rakušan a spol., 2007}.

## VÝVOJ ODOLNOSTI SRDEČNÍHO SVALU K ISCHEMII V ČASNÝCH FÁZÍCH POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE U SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍCH POTKANŮ

Jak bylo uvedeno již v úvodu, odolnost srdečního svalu k nedostatku kyslíku se v časných fázích ontogenetického vývoje výrazně mění. Detailní analýza tolerance izolovaného srdce potkana kmene Wistar ke globální ischemii během prvního týdne života ukázala významný pokles od prvního do sedmého dne {Ošťádalová a spol., 1998}. Podobný trend vykazuje i neonatální srdce kmenů SHR a WKY: 10. den postnatálního života jsou jejich srdce signifikantně méně odolná k nedostatku kyslíku než bezprostředně po narození. Překvapivé je však zjištění, že novorozená hypertenzní mláďata jsou významně odolnější než mláďata kontrolního kmene WKY: tento rozdíl však v průběhu prvního postnatálního týdne mizí a 10. den jsme v citlivosti izolovaných srdcí SHR a WKY k ischemii rozdíl nenalezli. V této souvislosti je nutno poznamenat, že u dospělých zvířat je situace přesně obrácená: hypertrofické srdce dospělých samců kmene SHR je k ischemii méně odolné než srdce samců kmene WKY {Belichard a spol., 1988; Snoeckx a spol., 1989, 1993; Itter a spol., 2004, Bešik a spol., 2007}. Příčinou snížené odolnosti hypertrofického srdce k ischemii je zřejmě komplex různých změn: v průběhu ischemie vykazuje hypertrofické srdce zvýšenou ztrátu makroergních fosfátů, zvýšenou akumulaci laktátu a vodíkových iontů, časnější vznik kontraktury, zrychlené přetížení buňky vápníkem v průběhu reperfuze, zhoršený metabolismus sodíku a sníženou dostupnost NO. Zvětšení buněk navíc prodlužuje difuzní dráhu pro kyslík {Batra a Rakušan, 1992} a snížená hustota terminálního krevního řečiště je dle Friehe a del Nida {2003} doprovázena poklesem kontraktility a zvýšenou citlivostí k ischemicko-reperfuznímu poškození.

Vysvětlit ontogenetické rozdíly v citlivosti srdcí SHR a WKY k ischemii může být zatím pouze spekulativní, protože údaje o odolnosti myokardu těchto kmenů v časných fázích postnatálního vývoje v literatuře doposud chybějí. Jak vypadá srdce a krevní oběh novorozených SHR? První otázkou, na kterou je třeba hledat odpověď je, zda můžeme o jednodenním srdci SHR říci, že je hypertrofické. Srdce novorozených SHR je sice zvětšené, možná již prenatálně {Gray, 1984}, avšak o hypertrofii rozhodně mluvit nemůžeme {Kuneš a spol., 1997}. Pro fetální a časné postnatální období (přibližně do 4. dne života) je totiž typický hyperplastický růst. V tomto období roste srdce rychleji než ostatní tělo a jeho relativní hmotnost stoupá; maxima dosahuje v průběhu prvního postnatálního týdne a poté až do dospělosti pozvolna klesá {Kuneš a spol., 1997}. Srdce novorozených SHR má ve srovnání s kmenem WKY větší počet menších buněk {Clubb a spol., 1987}; odpadá tak shora uvedený

důvod zhoršeného krevního zásobení. Co je příčinou zvětšení srdečního svalu novorozených SHR? Na rozdíl od dospělých zvířat se nezdá pravděpodobné, že je to sekundární adaptace na zvýšené hodnoty krevního tlaku: farmakologická intervence vede v neonatálním období k významnému snížení krevního tlaku, avšak k podstatně menšímu ovlivnění kardiomegalie {Weiss a Lundgren, 1978}. Je proto nezbytné uvažovat o jiných mechanismech, jako je genetické pozadí či hormonální kontrolní mechanismy (např. adrenergní a renin-angiotensinový systém) {Gray, 1984; Zicha a Kuneš, 1999}.

Vzhledem k tomu, že srovnatelný stupeň kardiomegalie, vyjádřený zvýšenou hodnotou relativní hmotnosti srdce, jsme našli jak 1. tak 10. den života SHR, nelze předpokládat, že pouze kvantitativní rozdíl ve velikosti srdce by mohl být zodpovědný za rozdíly v odolnosti v časně postnatální ontogeneze. Do stejné kategorie je možno zřejmě zařadit i vývoj kontraktilních parametrů, které byly 1. i 10. den života u SHR nižší než u WKY. Jak se tedy liší jednodenní a desetidenní srdce SHR ve srovnání s normotenzními zvířaty? Jsou to především shora zmíněné rozdíly morfogenetické: jednodenní srdce SHR má větší počet menších buněk a tedy i výhodnější poměr kapilára:vlákno {Clubb a spol., 1987}. Je zajímavé, že mitotická aktivita myocytů klesá u SHR dříve než u normotenzních zvířat, a proto i dříve dochází k přechodu na hypertrofický růst {Engelmann a Gerrity, 1988}. První den života je významně vyšší inotropní odpověď na katecholaminy {Tanaka a spol., 1988}, sami jsme našli vyšší inotropní odpověď na stoupající koncentraci vápníku; v dalším vývoji se tyto rozdíly stírají. Vyloučit nelze ani rozdíly metabolické: novorozené SHR mají nižší hladinu glukózy a vyšší koncentraci laktátu v plazmě, což může svědčit pro různou míru adaptace na intrauterinní hypoxii {Lewis a spol., 1997}. Lze předpokládat, že první týden života se uvedené parametry u SHR velmi rychle mění a den ode dne se liší, podobně jako kontraktilní parametry u potkanů kmene Wistar {Ošťádalová a spol., 1995} Uvedené nálezy svědčí pro kritický význam neonatálního období pro normální a patologický vývoj srdečního svalu SHR {Zicha a Kuneš, 1999}. Rozhodnout, která z vývojových změn, probíhajících v srdečním svalu v tomto období je odpovědná za změny odolnosti k ischemii, je však při současné úrovni našich znalostí obtížné.

V literatuře doposud chybějí údaje o možném protektivním ovlivnění neonatálních srdcí SHR. Srovnávat tak můžeme pouze s dřívějšími výsledky z naší laboratoře, které ukázaly, že jak ischemický preconditioning tak adaptace na chronickou hypoxii u novorozených srdcí potkanů kmene Wistar protektivní účinek nemají; ten se vyvíjí teprve v průběhu prvního postnatálního týdne {Ošťádalová a spol., 2002}. Skutečnost, že u srdcí SHR a WKY se nám tento efekt nepodařilo prokázat ani 10. den života, může být způsobena tím,

že protektivní účinek nastupuje u těchto kmenů v pozdějším období života; pro to svědčí fakt, že u dospělých SHR ischemický preconditioning kardioprotektivní efekt má {Boutros a Wang, 1995}.

### **Expresí hem oxygenázy v neonatálním srdci SHR**

Jak již bylo uvedeno v úvodu, HO hraje významnou úlohu v regulaci TK a v regulaci růstu kardiomyocytů u dospělých jedinců. U neonatálních SHR byla expresí inducibilní HO-1 významně vyšší v levé komoře v porovnání s komorou pravou; u normotenzních WKY jsme však rozdíl nezjistili. Zvýšenou expresí HO-1 lze vysvětlit jednak aktivací antihypertrofických signalizačních kaskád {Tongers a spol., 2004; Fiedler a Wollert, 2004}, jednak přímou reakcí na rozvoj systémové hypertenze. Vzestup expresí HO-1 v aortě SHR považují Cheng a spol. {2004} za kompenzační mechanismus, vyvolaný vzestupem systolického TK. Po adaptaci mláďat na IVH došlo k vzestupu expresí HO-1 ve zvětšené pravé komoře, a to jak u mláďat SHR tak WKY. Jde o prioritní nález, jehož vysvětlení může být zatím pouze spekulativní. Jednou z možných příčin může být výše uvedená reakce na vzestup tlaku. V této souvislosti je nutno zmínit nález Grilliho a spol. {2003}, kteří uvádějí, že vzestup expresí HO-1 v srdci potkana může být přímou adaptativní odpovědí na hypoxii, a to cestou aktivace iNOS v srdečních buňkách.

V expresí konstitutivní HO-2 jsme u normoxické skupiny mláďat SHR i WKY nenalezli žádný rozdíl. Tento výsledek nebyl překvapivý, neboť je známo, že je to právě inducibilní HO-1, která mění svoji expresí a aktivitu za určitých patofyziologických situacích {Keyse a Tyrrell, 1989}. Nečekaný byl proto významný pokles expresí HO-2 v levé komoře u hypertenzních mláďat po adaptaci na IVH. Můžeme pouze spekulovat, že se může jednat o geneticky podmíněný vliv hypoxie.

### **ÚLOHA MITOCHONDRÍ PŘI ISCHEMII NEZRALÉHO SRDCE**

V posledních letech se ukázalo, že zásadní úlohu v ischemicko-reperfuzním poškození dospělého srdce hraje MPT pór {Halestrap a spol., 2004; přehled viz Di Lisa a Bernardi, 2006}. Důkazem pro toto tvrzení jsou především výsledky ukazující, že blokáda otevření póru významně snižuje velikost infarktového ložiska. Příčinou otevření MPT póru jsou děje, ke kterým dochází na počátku reperfuze: vzestup hladiny vápníku, pokles membránového potenciálu mitochondrií, zvýšená hladina anorganického fosfátu, změny v pH, pokles hladiny



makroergních fosfátů a zvýšení volných kyslíkových radikálů. Důsledkem otevření póru je pak kolaps membránového potenciálu mitochondrie, pokles úrovně oxidativního metabolismu, bobtnání mitochondrií, vedoucí k redukci krist a poškození vnější mitochondriální membrány a konečně zánik mitochondrie se všemi negativními dopady na samotnou buňku. Inhibice otevření MPT póru sanglifehrinem A (SfA se váže na jednu z komponent MPT póru a tím ho blokuje {Clarke a spol., 2002}) výrazně snižuje rozsah ischemicko-reperfuzního poškození u dospělých srdcí.

Sledováním aktivity MPT póru jsme potvrdili jeho nezastupitelnou úlohu v procesu ischemicko-reperfuzního poškození; u dospělých zvířat jeho inhibice sanglifehrinem A, ve shodě s výše uvedenými pokusy {Halestrap a spol., 2004}, výrazně snížila rozsah ischemicko-reperfuzního poškození. Jeho úloha v nezralém srdci však zůstává stále nejasná; u mláďat se inhibicí MPT póru nepodařilo rozsah poškození ovlivnit. Co může být za tuto vývojovou změnu odpovědné?

Ke stanovení míry ischemicko-reperfuzního poškození na izolovaném srdci jsme použili metodu měření aktivity LDH v koronárním efluentu, která se rutinně používá u dospělých; její použitelnost u mláďat však nebyla doposud ověřena. Výsledky našich měření ukazují, že mezi reparací kontraktility (reciproční hodnota míry ischemicko-reperfuzního poškození) a množstvím produkovaného LDH existuje u 10ti denních mláďat významná negativní korelace, tj., že se zvyšujícím se poškozením stoupá množství LDH v koronárním efluentu. K posouzení rozsahu ischemicko-reperfuzního poškození u 10ti denních mláďat tedy lze, podobně jako u dospělých, metodu měření LDH použít.

Pro sledování aktivity samotného MPT póru jsme použili metodu měření  $\text{NAD}^+$  v srdeční tkáni, založené na vztahu mezi mírou otevření póru a úbytkem  $\text{NAD}^+$ , jak ji v dospělé srdeční tkáni popsali Di Lisa a spol. {2001}. Tento vztah potvrzují i naše výsledky, které ukazují negativní korelaci mezi množstvím produkovaného LDH v eluátu (míra poškození) a  $\text{NAD}^+$  v srdeční tkáni na konci reperfuze u dospělého srdce. Tento vztah jsme však nepozorovali u nezralého srdce, kde regresní analýza prokázala přímou úměru mezi uvolněným LDH do eluátu a obsahem  $\text{NAD}^+$  na konci reperfuze - s rostoucím poškozením se zvyšuje množství  $\text{NAD}^+$  v tkáni. To znamená, že na rozdíl od srdce dospělého, vyšší poškození neonatálního srdce není provázáno snížením  $\text{NAD}^+$  v myokardu. Metoda sledování aktivity MPT póru pomocí stanovení obsahu  $\text{NAD}^+$  je proto v srdečním svalu nezralého potkana nepoužitelná. Důvodem je s největší pravděpodobností zcela odlišný metabolismus nezralého myokardu, který v situaci globální ischemie spoléhá na produkci ATP cestou anaerobní glykolýzy {Lopaschuk a spol., 1992; Bass a spol., 2001}. Při ní vzniká velké

množství redukovaného  $\text{NADH} + \text{H}^+$  a roste poměr  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , což je z hlediska řady enzymatických funkcí buňky nežádoucí (zejména pro samotnou glykolýzu). Proto se  $\text{NAD}^+$  regeneruje prostřednictvím LDH v reakci pyruvát  $\rightarrow$  laktát (při dostatku kyslíku dochází k regeneraci  $\text{NAD}^+$  na začátku dýchacího řetězce a laktát je oxidován na vodu a oxid uhličitý). Poté, co se v buňce spotřebuje glukóza, není již  $\text{NAD}^+$  využíván a díky tomu se jeho množství na konci ischemie zvyšuje. Lze tedy předpokládat, že v nezralé srdeční buňce bude v důsledku vyššího využití glukózy i vyšší hladina  $\text{NAD}^+$  v cytoplazmě. Jeho uvolňování z mitochondrií může být proto z hlediska měření celkového obsahu  $\text{NAD}^+$  v srdeční tkáni zanedbatelné (i s přihlédnutím k faktu, že mitochondrií je v tomto věkovém období relativně málo). Naproti tomu v dospělém srdci převažuje  $\text{NAD}^+$  mitochondriální a jeho uvolnění a následnou degradaci  $\text{NAD}^+$ -glykolhydrolázou lze spolehlivě změřit {Di Lisa a spol., 2001}. Ke sledování aktivity MPT póru u mláďat se proto zdá být vhodnější metodika měření bobtnání izolovaných mitochondrií {Balaska a spol., 2005}; stav póru je však možno hodnotit až za několik hodin po samotném pokusu. Izolace mitochondrií může znamenat nejen oddálení momentu měření póru, ale nelze vyloučit ani negativní vliv izolace na funkci mitochondrií.

Skutečnost, že se nám na rozdíl od dospělých nepodařilo prokázat protektivní vliv blokády MPT póru na poškození myokardu u mláďat, může mít několik vysvětlení: (i) sanglifehrin A nemusí fungovat v důsledku vývojových změn ve struktuře MPT póru (chybí receptor pro sanglifehrin A), (ii) v neonatálních srdečních buňkách je tak malé množství MPT pórů, že nejsou schopny svou aktivitou chování srdeční buňky ovlivnit a (iii) množství mitochondrií v nezralé srdeční buňce je menší než v dospělých srdcích. To jednak snižuje možnost výrazněji ovlivnit buněčný metabolismus, jednak vypovídá o orientaci neonatálního srdce na extramitochondriální způsob získávání energie. Zdá se tedy, že mechanismus ischemicko-reperfuzního poškození v nezralém srdci není spojený s úlohou mitochondrií v takové míře, jako je tomu u dospělého srdce.

## SOUHRN

1. U jednodenních mláďat konvenčních potkanů odolnost myokardu k ischemii (vyjádřená jako obnovení kontraktility izolovaného perfundovaného srdce) klesá s délkou ischemie. V této fázi vývoje nelze odolnost zvýšit působením ischemického preconditioningu, a to ani po prodloužení ischemické fáze ze 40 na 60 minut. Naproti tomu 10. den postnatálního života lze protektivní účinek ischemického preconditioningu vyvolat již při použití 40 min ischemie; při zkrácení ischemické fáze na 30 resp. 20 min se však ochranný účinek neprojevil. Ischemický preconditioning není tedy zřejmě genotypickým fenoménem, ale rozvíjí se během časného postnatálního vývoje s tím, jak klesá odolnost myokardu k nedostatku kyslíku.
2. Odolnost neonatálního srdce k akutní ischemii není ovlivněna nízkou tělesnou hmotností, vyvolanou nedostatečným příjmem mateřského mléka (větší počet mláďat v hnízdě). Zdá se tedy, že růstová retardace není součástí kardioprotektivních mechanismů: adaptace na intermitentní výškovou hypoxii či ischemického preconditioningu. Nelze však vyloučit, že malnutrice v časných fázích ontogenetického vývoje může ovlivnit citlivost srdečního svalu k nedostatku kyslíku v dospělosti.
3. Kardioprotektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii lze u 10 denních mláďat kompletně odstranit blokadou AT1 receptorů. To znamená, že tato signální kaskáda je v nezralých srdcích zřejmě součástí mechanismu kardioprotektivního účinku adaptace.
4. Odolnost srdečního svalu k akutní ischemii je u jednodenních SHR vyšší než u WKY. Po narození odolnost u obou kmenů klesá, podobně jako je tomu u konvenčních potkanů. Na rozdíl od kmene Wistar nelze však u neonatálních SHR a WKY odolnost srdečního svalu protektivně ovlivnit: jak ischemický preconditioning tak adaptace na chronickou hypoxii byly v tomto věkovém období bez efektu. Jedním z možných vysvětlení je, že protektivní účinek nastupuje u těchto kmenů v pozdějším období života; pro to svědčí fakt, že u dospělých SHR ischemický preconditioning kardioprotektivní efekt má.

5. Adaptace na nedostatek kyslíku výrazně ovlivnila aktivitu hem oxygenázy 1 v pravé komoře neonatálních SHR a WKY; aktivita hem oxygenázy 2 ovlivněna nebyla. Vzestup exprese hem oxygenázy může být přímou adaptivní odpovědí na hypoxii, a to zřejmě cestou aktivace iNOS v srdečních buňkách.
  
6. Úloha MPT póru v mechanismu ischemicko-reperfúzního poškození neonatálního srdce se od dospělého srdce liší: zatímco jeho blokáda v dospělém srdci snižuje rozsah poškození, v nezralém srdci je bez účinku. Vysvětlením mohou být vývojové rozdíly v přítomnosti receptorů pro sanglifehrin, v denzitě MPT pórů či v množství mitochondrií. Zdá se tedy, že mechanismus ischemicko-reperfúzního poškození není v nezralém srdci spojen s úlohou mitochondrií v takové míře, jako je tomu u dospělého srdce.

## LITERATURA

- AKIYAMA K, GLUCKMAN T, TERHAKOPIUM A, JINADASA P, NARAYAN S, SINGASWANY S, MASSEY B, 3., BING RJ: Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell* **29**: 733-743, 1997.
- ANVERSA P, OLIVETTI G, LOUD AV: Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. *Circ Res* **46**: 495-502, 1980.
- ARTMAN M, MAHONY L, TEITEL DF: Neonatal Cardiology. New York, The McGraw-Hill, 272 s, 2002.
- ARTMAN M: Developmental changes in myocardial contractile responses to inotropic agents. *Cardiovasc Res* **26**: 3-13, 1992.
- AWAD WI, SHATTOCK MJ, CHAMBERS DJ: Ichemic preconditioning in immature myocardium. *Circulation* **98**: 206-213, 1998.
- BABICKÝ A, OŠŤÁDALOVÁ I, PAŘÍZEK J, KOLÁŘ J, BÍBR B: Use of radioisotope techniques for determining the weaning period in experimental animals. *Physiol Bohemoslov* **19**: 457-467, 1970.
- BABICKÝ A, OŠŤÁDALOVÁ I, PAŘÍZEK J, KOLÁŘ J: Initial solid food intake and growth of young rats in nests of different sizes. *Physiol Bohemoslov* **22**: 557-566, 1973.
- BAI SL, CAMPBELL SE, MOORE JA, MORALES MC, GERDES AM: Influence of age, growth, and sex on cardiac myocyte size and number in rats. *Anat Rec* **226**: 207-212, 1990.
- BAINES CP, KAISER RA, PURCELL NH, BLAIR NS, OSINSKA H, HAMBLETON MA, BRUNSKILL EW, SAYEN MR, GOTTLIEB RA, DORN GW, ROBBINS J, MOLKENTIN JD: Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**: 658-662, 2005.

- BAKER EJ, BOERBOOM LE, OLINGER GN, BAKER JE: Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am J Physiol* **268**: H1165-H1173, 1995.
- BAKER EJ, HOLMAN P, KALYANARAMAN B, PRITCHARD KA: Adaptation of hearts to chronic hypoxia increases tolerance to subsequent ischemia by increased nitric oxide production. In: *Oxygen Transport to Tissue*. HUDETZ, DRULEY (eds.). New York: Plenum Press, 1998: pp 203-217.
- BAKER JE, BOERBOOM LE, OLINGER GN: Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* **96**: 717-724, 1988.
- BAKER JE, BOERBOOM LE, OLINGER GN: Is protection of ischemic neonatal myocardium by cardioplegia species dependent. *J Thorac Cardiovasc Surg* **99**: 280-287, 1990.
- BAKER JE, HOLMAN P, GROSS GJ: Preconditioning in immature rabbit hearts. Role of  $K_{ATP}$  channels. *Circulation* **99**: 1249-1254, 1999a.
- BAKER JE, HOLMAN P, KALYANARAMAN B, GRIFFITH OW, PRITCHARD KA: Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci* **874**: 236-253, 1999b.
- BALASKA D, HALESTRAP AP, SULEIMAN M-S, GRIFFITHS EJ: Increased susceptibility to pore-opening in heart mitochondria from neonatal compared with adult rats. (abstract). *J Mol Cell Cardiol* **38**: 1002, 2005.
- BANCHERO N, GROVER RF, WILL JA: Oxygen transport in llama (*Lama glama*). *Respi Physiol* **13**: 102-115, 1971.
- BARKER DJ: Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* **49(2)**: 270-283, 2006.
- BASS A, STEJSKALOVÁ M, STIEGLEROVÁ A, OŠŤÁDAL B, ŠAMÁNEK M: Ontogenetic development of energy-supplying enzymes in rat and guinea-pig heart. *Physiol Res* **50**: 237-245, 2001.

- BATRA S, RAKUŠAN K: Capillary network geometry during postnatal growth in rat hearts. *Am J Physiol* **262**: H635-H640, 1992.
- BELICHARD P, PRUNEAU D, ROCHETTE L: Influence of spontaneous hypertension and cardiac hypertrophy on the severity of ischemic arrhythmias in the rat. *Basic Res Cardiol* **83**: 560-566, 1988.
- BERNOFSKY C, SWAN M: An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* **53**: 452-458, 1973.
- BEŠÍK J, SZARSZOI O, KUNEŠ J, NETUKA I, MALÝ J, KOLÁŘ F, PIRK J, OŠŤÁDAL B: Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* **56**: 267-274, 2007.
- BIEMOND P, VAN EIJK H, SWAAK A, KOSTER J: Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest* **73**: 1576-1579, 1984.
- BOUCEK RJ, SHELTON M, ARTMAN M, MUSHLIN PS, STARNES VA, OLSON RD: Comparative effect of verapamil, nifedipine and diltiazem on contractile function in the isolated immature and adult rabbit heart. *Pediatr Res* **18**: 948-954, 1984.
- BOUTROS A, WANG J: Ischemic preconditioning, adenosine and bethanechol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* **275**: 1148-1156, 1995.
- BRUNO L, AZAR S, WELLER D: Absence of a pre-hypertensive stage in post-natal Kyoto hypertensive rats. *Jpn heart J* **20**: 90-92, 1979.
- CAVE AC: The protective effect of preconditioning on postischemic contractile dysfunction. In: *Myocardial Preconditioning*, WAINWRIGHT CL, PARRATT JR (eds). Austin, TX: Landes, 1996, pp 61-78.
- CLARK JE, FORESTI R, SARATHCHANDRA P, KAUR H, GREEN CJ, MOTTERLINI R: Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**: H643-H651, 2000.

- CLARKE SJ, MCSTAY GP, HALESTRAP AP: Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* **277**: 34793-34799, 2002.
- CLUBB JF, BELL PD, KRISEMAN JD, BISHOP SP: Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest* **56**: 189-197, 1987.
- CROMPTON M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341**: 233-249, 1999.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE: Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z Klin Chem Klin Biochem* **10**: 182-193, 1972.
- DI LISA F, BERNARDI P: Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovasc Res* **66**: 222-232, 2006.
- DI LISA F, MENABO R, CANTON M, BARILE M, BERNARDI P: Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* **276**: 2571-2575, 2001.
- ENGELMANN GL, GERRITY RG: Biochemical characterization of neonatal cardiomyocyte development in normotensive and hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* **20**: 169-177, 1988.
- FABIATO A: Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**: C1-C14, 1983.
- FAZEKAS JF, ALEANDER FAD, HIMWICH HE: Tolerance of the newborn to anoxia. *Am J Physiol* **134**: 281-285, 1941.
- FEJFAR Z: Prevention against ischemic heart disease: a critical review. In: *Modern Trends in Cardiology*. OLIVER MF (editor). Boston, MA: Butterworth-Heinemann, 1975, pp 465-499.



- 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 adaptative mechanism. *Circulation* **103**: 2272-2276, 2001.
- FIEDLER B, WOLLERT KC: Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **63**: 450-457, 2004.
- FLISS H, GATTINGER D: Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* **79**: 949-956, 1996.
- FRIEHS I, DEL NIDO PJ: Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg* **75**: S678-S684, 2003.
- GARLID KD, DOS SANTOS P, XIE ZJ, COSTA AD, PAUCEK P: Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* **1606**: 1-21, 2003.
- GLOSTER J, HASLETON PS, HARRIS P, HEATH D: Effect of chronic hypoxia and diet on the weight and lipid content of viscera in the guinea-pig. *Environ Physiol Biochem* **4**: 251-258, 1974.
- GRAY SD: Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate* **45**: 25-32, 1984.
- GREENE AS, AMARAL SL: Microvascular angiogenesis and the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* **4**: 56-62, 2002.
- GRILLI A, DE LUTTI MA, PATRUNO A, SPERANZA L, GIZZI F, TACCARDI AA, DI NAPOLI P, DE CATERINA R, CONTI P, FELACO M: Inducible nitric synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **33**: 208-215, 2003.
- HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**: 372-385, 2004.

- HAMET P, KUNES J, FLETCHER K, CANTIN M, GENEST J: Hypertrophy and hyperplasia of heart and kidney in newborn hypertensive rats. In: *Hypertensive mechanism: the spontaneously hypertensive rat as a model to study human hypertension*. RASCHER W, CLOUGH D, GANTEN D (eds). Stuttgart, Schattauer Verlag, 1982, pp 161-164.
- HEATH D, WILLIAMS DR: *High Altitude Medicine and pathology*. Oxford University Press, New York, 1995.
- HENNING SJ: Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* **241**: G199-G214, 1981.
- HOERTER J: Change in the sensitivity to hypoxia and glucose deprivation in the isolated perfused rabbit heart during perinatal development. *Pflügers Arch* **363**: 1-6, 1976.
- HOHL CM: Effect of respiratory inhibition and ischemia on nucleotide metabolism in newborn swine cardiac myocyte. In: *The developing heart*. OŠŤÁDAL B, NAGANO M, TAKEDA N, DHALLA NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 1997, pp 393-405.
- HURTADO A: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* **53**: 247-258, 1960.
- CHASSAGNE C, EDDAHIBI S, ADAMY C, RIDEAU D, MAROTTE F, DUBOIS-RANDE JL, ADNOT S, SAMUEL JL, TEIGER E: Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 323-332, 2000.
- CHEN Y, YET S, PERRELLA MA: Role of heme oxygenase-1 in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Exp Biol Med* **228**: 447-453, 2003.
- CHENG PY, CHEN JJ, YEN MH: The expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in aorta during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **17**: 1127-1134, 2004.
- CHIU R, BINDON W: Why are newborn hearts vulnerable to ischemia? *Circulation* **76**: 146-149, 1987.

- CHVOJKOVÁ Z, OŠŤÁDALOVÁ I, OŠŤÁDAL B: Low body weight and cardiac tolerance to ischemia in neonatal rats. *Physiol Res* **54**: 357-362, 2005.
- CHVOJKOVÁ Z, OŠŤÁDALOVÁ I, OŠŤÁDAL B: Odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku. *Cesk Fysiol* **55**: 4-13, 2006.
- ITTER G, JUNG W, JURETSCHKE P, SCHOELKENS BA, LINZ W: A model of chronic heart failure in spontaneous hypertensive rats (SHR). *Lab Anim* **38**: 138-148, 2004.
- JACOBSON EL, JACOBSON MK: Pyridine nucleotide levels as a function of growth in normal and transformed 3T3 cells. *Arch Biochem Biophys* **175**: 627-634, 1976.
- JARMAKANI JM, NAGAMOTO T, NAKAZAWA M, LANGER GA: Effect of hypoxia on mechanical function in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* **235**: H469-474, 1978a.
- JARMAKANI JM, NAGAMOTO T, NAKAZAWA M, LANGER GA: Effect of hypoxia on myocardial high-energy phosphates in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* **235**: H475-481, 1978b.
- JARMAKANI JM, NAKANISHI T, GEORGE BL, BERS D: Effect of extracellular calcium on myocardial mechanical function in the neonatal rabbit. *Dev Pharmacol Ther* **5**: 1-13, 1982.
- JARMAKANI JM, NAKANISHI T, JARMAKANI RN: Effect of hypoxia on calcium exchange in neonatal mammalian myocardium. *Am J Physiol* **237**: H612-619, 1979.
- JENNINGS R, REIMER K, STEENBERGEN C: Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **23**: 1383-1395, 1991.
- JULIA P, KORFSKY ER, BUCKBERG GD, YOUNG HH, BUGYI HI: Studies of myocardial protection in the immature heart. I. Enhanced tolerance of immature versus adult myocardium to global ischemia with reference to metabolic differences. *J Thorac Cardiovasc Surg* **100**: 879-887, 1990a.

- JULIA P, YOUNG PP, BUCKBERG GD, KOFISKY ER, BUGYI HI: Studies of myocardial protection in the immature heart. II. Evidence for importance of amino acid metabolism in tolerance to ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* **100**: 888-895, 1990b.
- KENNEDY GC: The effect of age on the somatic and visceral response to overnutrition in the rat. *J Endocrinol* **15**: 19-34, 1957.
- KEYSE SM, TYRRELL RM: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 99-103, 1989.
- KOLÁŘ F, OŠŤÁDAL B, PAPOUŠEK F: Effect of verapamil on contractile function of the isolated perfused heart. *Basic Res Cardiol* **85**: 429-434, 1990.
- KOLÁŘ F, OŠŤÁDAL B, PROCHÁZKA J, PELOUCH V, WIDIMSKÝ J: Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration* **5**: 57-62, 1989.
- KOLÁŘ F, OŠŤÁDAL B: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S3-13, 2004.
- KOLÁŘ F, SZÁRSZOI O, NECKÁŘ J, PECHAŇOVÁ O, MIKOVÁ D, HAMPL V, OŠŤÁDAL B: Role of nitric oxide and reactive oxygen species in reperfusion-induced arrhythmias and cardioprotection in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* **52**: 52P, 2003.
- KOPECKÝ M, DAUM S: Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium. *Cs Fysiol* **7**: 518-521, 1958.
- KUNEŠ J, DOBEŠOVÁ Z, ZICHA J: Cardiac hypertrophy in newborn rats with genetic or experimental hypertension. In: *The developing heart*, OŠŤÁDAL B, NAGANO M, TAKEDA N, DHALLA NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 1997, pp 427-441.
- LAIS LT, RIOS LL, BOUTELLE S, DIBONA GF, BRODY MJ: Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* **14**: 277-284, 1977.

- LEWIS RM, BATCHELOR DC, BASSETT NS, JOHNSTON BM, NAPIER J, SKINNER SJ: Perinatal growth disturbance in the spontaneously hypertensive rat. *Pediatr Res* **42**: 758-764, 1997.
- LI Y, JOHNSON N, CAPANO M, EDWARDS M, CROMPTON M: Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J* **383**: 101-109, 2004.
- LITCHFIELD JB: Blood pressure in infant rats. *Physiol Zool* **31**: 1-6, 1958.
- LIU H, CALA PM, ANDERSON SE: Ischaemic preconditioning: effect on pH, Na and Ca in newborn rabbit hearts during ischemia/reperfusion. *J mol Cell Cardiol* **30**: 685-697, 1998.
- LOPASCHUK GD, COLLINS-NAKAI RL, ITOI T: Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res* **26**: 1172-1180, 1992.
- MAINES MD: Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* **2**: 2557-2568, 1988.
- MAINES MD: The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 517-554, 1997.
- MCCOUBREY WKJ, HUANG TJ, MAINES MD: Isolation and characterization of cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* **247**: 725-732, 1997.
- MILL JG, NOVAES MA, GALON M, NOGUEIRA JB, VASSALLO DV: Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol* **76**: 387-394, 1998.
- MONGE C, LEON-VELARDE F: Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev* **71**: 1135-1172, 1991.
- MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**: 1124-1136, 1986.

- NAIR CS, MALHOTRA MS, GOPINATH PM: Effect of altitude and acclimatisation on the basal metabolism in man. *Aerosp Med* **42**: 1056-1059, 1971.
- NAKAGAWA T, SHIMIZU S, WATANABE T, YAMAGUCHI O, OTSU K, YAMAGATA H, INOHARA H, KUBO T, TSUJIMOTO Y: Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**: 652-658, 2005.
- NAKANISHI T, NISHIOKA K, JARMAKANI RN: Mechanism of tissue Ca<sup>2+</sup> gain during reoxygenation after hypoxia in rabbit myocardium. *Am J Physiol* **242**: H437-449, 1982.
- NDISANG JF, ZHAO W, WANG R: Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension* **40**: 315-321, 2002.
- NIJJAR MS, DHALLA NS: Biochemical basis of calcium handling in developing myocardium. In: *The developing heart*, OSTADAL B, NAGANO M, TAKEDA N, DHALLA NS (eds). Philadelphia, PA: Lippincott, 1997, pp 189-217.
- OKAMOTO K, AOKI K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**: 282-293, 1963.
- OKAMOTO K: Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* **7**: 227-270, 1969.
- OŠŤÁDAL B, BEAMISH RE, BARWINSKI J, DHALLA NS: Ontogenetic development of cardiac sensitivity to catecholamines. *J Appl Cardiol* **4**: 467-486, 1989.
- OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F, PELOUCH V, WIDIMSKÝ J: Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **44**: 45-51, 1995.
- OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F: Cardiac Ischemia: From Injury to Protection. London, Kluwer Academic Publishers, 173 s, 1999.
- OŠŤÁDAL B, OŠŤÁDALOVÁ I, DHALLA NS: Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* **79**: 635-659, 1999.
- OŠŤÁDAL B, PROCHÁZKA J, JANATOVÁ T, PELOUCH V, KRAUSE EG: Developmental aspect of cardiac resistance to hypoxia. *Ber Humboldt Univ Berlin* **24**: 52-58, 1982.

- OŠTÁDAL B, PROCHÁZKA J, PELOUCH V, URBANOVÁ D, WIDIMSKÝ J: Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* **33**: 129-138, 1984.
- OŠTÁDALOVÁ I, OŠTÁDAL B, JARKOVSKÁ D, KOLÁŘ F: Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* **52**: 561-567, 2002.
- OŠTÁDALOVÁ I, OŠTÁDAL B, KOLÁŘ F, PARRAT JR, WILSON S: Tolerance to ischemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 857-865, 1998.
- OŠTÁDALOVÁ I, OŠTÁDAL B, KOLÁŘ F: Effect of prenatal hypoxia on contractile performance and responsiveness to Ca<sup>2+</sup> in the isolated perinatal rat heart. *Physiol Res* **44**: 135-137, 1995.
- OU DOT A, VERGELY C, ECARNOT-LAUBRIET A, ROCHETTE L: Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* **462**: 145-154, 2003.
- OVELGÖNNE JH, VAN WIJK R, VERKLEIJ J, POST JA: Cultured neonatal rat heart cells can be preconditioned by ischemia, but not by heat shock. The role of stress proteins. *J Moll Cell Cardiol* **28**: 1617-1629, 1996.
- PANG SC, LONG C, POIRIER M, TREMBLAY J, KUNES J, VINCENT M, SASSARD J, DUZZI L, BIANCHI G, LEDINGHAM J, PHELAN EL, SIMPSON FO, IKEDA K, YAMORI Y, HAMET P: Cardiac and renal hyperplasia in newborn genetically hypertensive rats. *J Hypertens* **4** (suppl 3): S119-S122, 1986.
- PARRAT JR, VEGH A: Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. *Cardioscience* **5**: 9-18, 1994.
- PATAKI T, BAK I, CSONKA C, KOVACS P, VARGA E, BLASIG IE, TOSAKI A: Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused heart. *Antioxid Redox Signal* **3**: 125-134, 2001.

- PELOUCH V, OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F, MILEROVÁ M, GRÜNERMEL J: Chronic hypoxia-induced right ventricular enlargement: age dependent changes of collagenous and non-collagenous cardiac protein fractions. In: *Heart Function in Health and Disease*, OŠŤÁDAL B, DHALLA NS (eds). Boston, MA: Kluwer, 1993, pp 209-218.
- POUPA O, KROFTA K, PROCHÁZKA J, TUREK Z: Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Federation Proc* **25**: 1243-1246, 1966.
- QUANTZ M, TCHERVENKOV C, AND CHIU R C-J: Unique responses of immature hearts to ischemia. Functional recovery versus initiation of contracture. *J Thorac Cardiovasc Surg* **103**: 927-935, 1992.
- RABINOWITCH M, GAMBLE WJ, MIETTINEN OS, REID L: Age and sex influence of chronic hypoxia on pulmonary hypertension and on recovery. *Am J Physiol* **240** (Heart Circ. Physiol. 9): H62-H72, 1981.
- RAFIEE P, SHI Y, KONG X, PRITCHARD KA, 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 kardioprotection. *Circulation* **106**: 239-245, 2002.
- RAKUŠAN K, CHVOJKOVÁ Z, OLIVIERO P, OŠŤÁDALOVÁ I, KOLÁŘ F, CHASSAGNE C, SAMUEL JL, OŠŤADAL B: ANG II type I receptor antagonist irbersartan inhibits coronary angiogenesis stimulated by chronic intermittent hypoxia in neonatal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**: H1237-H1244, 2007.
- RAKUŠAN K: Vascularization of the heart during normal and pathological growth. *Adv Org Biol* **7**: 130-153, 1999.
- REYNAFARJE C: The influence of high altitude on erythropoietic activity. In: *Homeostatic Mechanisms*. Upton, NY: Brookhaven Natl. Lab., 1958, pp 132-146.
- RIVA A, HEARSE DJ: Age-dependent changes in myocardial susceptibility to ischemic injury. *Cardioscience* **4**: 85-92, 1993.
- RIVA A, HEARSE DJ: Isolated, perfused neonatal rat heart preparation for studies of calcium and functional stability. *Ann Thorac Surg* **52**: 987-992, 1991.



- RYBIN VO, STEINBERG SF: Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res* **74**: 299-309, 1994.
- SHI Y, BAKER JE, ZHANG C, TWEDDELL JS, SU J, PRITCHARD KA: Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serin phosphorylation. *Circ Res* **91**: 300-306, 2002.
- SHI Y, PRITCHARD KA, HOLMAN P, RAFIEE P, GRIFFITH OW, KALYANARAMAN B, BAKER JE: Chronic myocardial hypoxia increases nitric oxide synthase and decreases caveolin-3. *Free Radic Biol. Med.* **29**: 695-703, 2000.
- SMITH O, MOOSAVI H, WINSON M, HEATH D: The influence of age and sex on the response of the right ventricle, pulmonary vasculature and carotid bodies to hypoxia in rats. *J Pathol* **112**: 11-18, 1974.
- SNOECKX LH, VAN DER VUSSE GJ, COUMANS WA, WILLEMSSEN PH, RENEMAN R: Differences in ischaemia tolerance between hypertrophied hearts of adult and aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **27**: 874-881, 1993.
- SNOECKX LH, VAN DER VUSSE GJ, VAN DER VEEN FH, COUMANS WA, RENEMAN R: Recovery of hypertrophied rat hearts after global ischemia and reperfusion at different perfusion pressures. *Pflugers Arch* **413**: 303-312, 1989.
- SOLARO RJ, LEE JA, KENTISH JC, ALLEN DG: Effect of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* **63**: 779-787, 1988.
- SOUTHWORTH R, SHATTOCK MJ, KELLY FJ: Age-related difference in the cardiac response to ischemia and free radical production on reperfusion. In: *The developing heart*. OŠŤÁDAL B, NAGANO M, TAKEDA N, DHALLA NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 1997, pp 427-441.
- STOCKER R, YAMAMOTO Y, McDONALD AF, GLAZER AN, AMES BN: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-1046, 1987.
- SU JY, FRIEDMAN WF: Comparison of the responses of fetal and adult cardiac muscle to hypoxia. *Am J Physiol* **224**: 1249-1253, 1973.

- SZÁRSZOI O, ASEMU G, OŠŤÁDAL B, KOLÁŘ F: Cardioprotection by chronic hypoxia: role of nitric oxide. *Physiol Res* **51**: 69P, 2002.
- ŠAMÁNEK M, BASS A, OŠŤÁDAL B, HUČÍN B, STEJSKALOVÁ M: Effect of hypoxaemia on enzymes supplying myocardial energy in children with congenital heart disease. *Int J Cardiol* **25**: 265-270, 1989.
- ŠKOVŘÁNEK J, OŠŤÁDAL B, PELOUCH V, PROCHÁZKA J: Ontogenetic differences in cardiac sensitivity to verapamil in rats. *Pediatr Cardiol* **7**: 25-29, 1986.
- TANAKA H, KASUYA Y, SHIGENOBU K: Altered responsiveness to autonomic transmitters of hearts from neonatal spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **12**: 678-682, 1988.
- TANAKA H, SHIGENOBU K: Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol* **21**: 1305-1313, 1989.
- TENHUNEN R, MARVER HS, SCHMID R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**: 748-755, 1968.
- TONGERS J, FIEDLER B, KÖNIG D, KEMPF T, KLEIN G, HEINEKE J, KRAFT T, GAMBARYAN S, LOHMANN SM, DREXLER H, WOLLERT KC: Heme oxygenase-1 inhibition of MAP kinases, calcineurin/NFAT signaling, and hypertrophy in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **63**: 545-552, 2004.
- TROJAN S: Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monograph* **85**: 5, 1978.
- TUCKER DC, JOHNSON AK: Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* **246**: R570-R577, 1984.
- VANDEN HOEK T, SHAO Z, LI C, SCHUMACKER P, BECKER L: Myocardial electron transport can be a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2441-2450, 1997.

- VORNANEN M: Postnatal changes in cardiac calcium regulation. In: *The developing heart*. OŠŤÁDAL B, NAGANO M, TAKEDA N, DHALLA NS (eds). Philadelphia, PA, Lippincott, 1997, pp 219-229.
- WALTHER T, MENRAD A, ORZECZOWSKI HD, SIEMEISTER G, PAUL M, SCHIRNER M: Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *Faseb J* **17**: 2061-2067, 2003.
- WEBSTER KA, DISCHER DJ, BISHOPRIC NH: Cardioprotection in an in vitro model of hypoxic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **27**: 453-458, 1995.
- WEISS L, LUNDGREN Y: Left ventricular hypertrophy and its reversibility in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **12**: 635-638, 1978.
- WIBO M, BRAVO G, GODFRAIND T: Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ Res* **68**: 662-673, 1991.
- WITTNICH C, PENISTON C, IANUZZI D, ABEL JG, SALERNO TA: Relative vulnerability of neonatal and adult hearts to ischemic injury. *Circulation* **76**: 156-160, 1987.
- YANO Y, BRAIMBRIDGE MV, HEARSE DJ: Protection of the pediatric myocardium: differential susceptibility to ischemic injury of the neonatal rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* **94**: 887-896, 1987.
- YELLON DM, BAXTER GF, GARCIA-DORADO D, SUMERAY MS: Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* **37**: 21-33, 1998.
- YOUNG HH, SHIMIZU T, NISHIOKA K, NAKANISHI T, JARMAKANI JM: Effect of hypoxia and reoxygenation on mitochondrial function in neonatal myocardium. *Am J Physiol* **245**: H998-1006, 1983.
- YTREHUS K, LIU Y, DOWNEY JM: Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* **266** (*Heart circ Physiol* **35**): H1145-H1152, 1994.

ZAMZAMI N, KROEMER G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.  
*Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67-71, 2001.

ZICHA J, KUNEŠ J, JELÍNEK J: Experimental hypertension in young and adult animals.  
*Hypertension* **8**: 1096-1104, 1986.

ZICHA J, KUNEŠ J: Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat.  
*Physiol Rev* **79**: 1227-1282, 1999.