

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav fyziologie

MUDr. Vít Jakoubek

**Mechanismus vlivu hypoxie na
fetoplacentární cévní řečiště**

Disertační práce

Praha 2009

Poděkování :

Chtěl bych vyjádřit vděčnost svému školiteli, panu profesorovi RNDr. Václavu Hamplovi, DrSc., za vedení a podporu v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Děkuji panu prof. MUDr. Janu Hergetovi, DrSc., za pomoc a rady, které mi v průběhu mého studia poskytl.

Poděkování patří též paní MUDr. Janě Bíbové, Ph.D. za pomoc, podporu a povzbuzení při práci na pokusech i po nich .

Za pomoc při přípravě a provádění pokusů, podporu a optimismus děkuji paní Květoslavě Venclíkové a slečně Andree Trnkové.

Díky patří v neposlední řadě i mé rodině a přátelům za vytvoření odpovídajícího zázemí po celou dobu studia.

Obsah

1. ÚVOD	4
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	5
2.1 Krátkodobá (akutní) hypoxie.....	5
2.2 Chronická hypoxie.....	11
3. CÍLE PRÁCE.....	16
4. METODY.....	17
4.1 Izobarická hypoxická komora.....	17
4.2 Izolovaný, dvojitě perfundovaný kotyledon lidské placenty.....	18
4.3 Izolovaná, dvojitě perfundovaná placenta laboratorního potkana.....	19
4.4 Statistická analýza.....	20
5. VÝSLEDKY.....	21
5.1 Napětově řízené vápníkové kanály zprostředkovávají hypoxickou vasokonstrikci v lidské placentě	21
5.2 Chronická hypoxie zvyšuje odpor a reaktivitu k vasokonstrikčním látkám v cévách placenty laboratorního potkana.....	24
6. DISKUSE.....	26
6.1 Napětově řízené vápníkové kanály zprostředkovávají hypoxickou vasokonstrikci v lidské placentě.....	26
6.2 Chronická hypoxie zvyšuje odpor a reaktivitu k vasokonstrikčním látkám v cévách placenty laboratorního potkana.....	30
7. ZÁVĚR.....	35
8. LITERATURA.....	36
SEZNAM PUBLIKACÍ.....	43
PŘÍLOHY.....	44

1. Úvod

Placenta je orgán, na kterém je závislý každý savec před narozením. Její název pochází z latinského výrazu pro koláč a opravdu, u většiny druhů tvar orgánu odpovídá tomuto historickému pojmenování. Placenty různých druhů se liší nejen velikostí, ale i svou ultrastrukturou (Enders a Blankenship, 1999). Souvisí to nejen s délkou gestace (21 den u krysy, 177 dnů u prasete, 270 dnů u člověka), ale i s obvyklým počtem plodů. Mossman (1987) popisuje ve své monografii placentaci jako „přiblížení nebo kombinaci embryonálních tkání s rodičovskými, sloužící k fyziologické výměně“. Z toho vyplývá, že ač se placenty v mnohých ohledech liší, jejich funkce zůstávají podobné: jsou jimi zejména zajištěny maximálního přiblížení mateřské a fetální krve, ale zároveň jejich oddělení- interhemální bariéra. Úzký kontakt mateřského a fetálního oběhu je důležitý hlavně pro transportní funkce placenty: přenos krevních plynů, glukosy, imunoglobulinů a dalších látek, např. léků. Oddělení těchto dvou krevních oběhů je však nutné zejména z důvodu zabránění přestupu fetálních erytrocytů do mateřského oběhu, který při inkompatibilitě krevních systémů matky a plodu vyvolá tvorbu protilátek proti červeným krvinkám plodu. Tyto protilátky se dostávají do fetálního oběhu a mohou způsobit až hydrops plodu (Gomella, 2004).

Jak zmíněno výše, jednou z hlavních funkcí placenty je výměna krevních plynů a zajištění dostatečné oxygenace fetální krve. Hypoxie placenty pak může nastat z příčin lokálních (místní postižení cév, abrupce placenty) nebo celkových, např. plicní nebo kardiovaskulární onemocnění matky, komplikace diabetu či pobyt ve vysoké nadmořské výšce. Předpokládá se, že nedostatek kyslíku ve fetoplacentárním řečišti může být důležitým patogenetickým faktorem preeklampsie. V případě chronického nedostatku kyslíku pak může plod být postižen intrauterinní růstovou retardací (IUGR). Jde o stav, kdy se plod narodí menší vzhledem k délce těhotenství (pod 5. percentil hmotnostních grafů). Tyto děti pak bývají v dětství i dospělosti (po vyrovnání původního růstového deficitu) významně častěji postiženy infekty, kardiovaskulárními onemocněními, diabetem a dalšími onemocněními (Brodsky a Christou, 2004).

Je tedy pravděpodobné, že v placentárním cévním řečišti bude hypoxie jedním z významných regulačních i patofyziologických faktorů. Tato úvaha a

též absence literatury zejména v oblasti patofysiologie vlivu chronické hypoxie na placentární cévy, byly vůdčími důvody k realizaci této práce.

2.Literární přehled

2.1 Krátkodobá (akutní) hypoxie

Většina orgánů (a zvláště výrazně mozek, ledviny a srdce) reaguje na lokální pokles parciálního tlaku kyslíku vasodilací. Zajišťují si tím dostatečný průtok krve a dodávku kyslíku při momentální hyposaturaci. Zcela opačně je tomu jen ve dvou orgánech těla: v plicích a v placentě. Tyto dva orgány jsou si svými vlastnostmi a funkcí navzdory odlišnému tvaru v mnohém podobné. Jsou to jediné orgány zprostředkovávající oxygenaci krve a odstraňování CO₂ z krve. Jsou to též nízkotlaké systémy. Jejich cévy jsou velmi málo (v případě plic), či vůbec (v případě placenty), ovlivňovány autonomním nervovým systémem (Fox a Khong, 1990). Na akutní hypoxický podnět reagují plicní cévy vasokonstrikcí (hypoxická plicní vasokonstrikce - HPV). Tento mechanismus převádí proud krve z míst, kde je nedostatečně oxygenována, do oblastí, kde bude okysličená lépe. Ve výsledku tedy udržuje příznivý poměr ventilace - perfuze.

Předpokládáme, že podobně tomu je i v placentě. Zde též za hypoxických stavů dochází k vasokonstrikci (hypoxická fetoplacentární vasokonstrikce – HFPV) a pravděpodobně i zde má tento mechanismus zajistit dostatečné kyslíkové zásobení plodu (Howard, 1987; Talbert a Sebire, 2004).

Vliv různých podmínek oxygenace prostředí na kvalitu HFPV zkoumala skupina Ramasubramaniana (2006) a použila při svém experimentu model izolovaného, dvojité perfundovaného kotyledonu lidské placenty. Používala placenty z nekomplikovaných těhotenství a porodů. Kotyledon byl perfundován standardním Krebsovým roztokem, který byl za kontrolních podmínek syčen směsí plynů s 21% kyslíku. V experimentální části pak porovnávali změny perfusního tlaku na fetální straně preparátu při poklesu obsahu kyslíku v sytícím plynu až na 0%. Zjistili, že v lidské placentě dochází k postupnému zvyšování perfusního tlaku, které je nepřímo úměrné procentuálnímu zastoupení kyslíku v sytící směsi plynů.

Mechanismus HFPV je zatím minimálně prozkoumán. Jedním z činitelů, podílejícím se na mechanismu HFPV, by mohl být oxid dusnatý (NO). O vysvětlení mechanismu jeho možného působení se pokusila práce Byrneho a spol. (1997). Ti experimentovali též s izolovaným perfundovaným kotyledonem lidské placenty. Cévy perfundovali Earlovým roztokem a za normoxických podmínek sytili perfuzát směsí plynů s 95% O₂. Ověřovali hypotézu, že HFPV je způsobena sníženou produkcí NO. Po první hypoxické změně syčení perfuzátu v experimentální skupině pak přidali do perfuzátu N-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME), blokátor NO-syntázy. Po přidání blokátoru se signifikantně zvýšil perfuzní tlak a další hypoxická odpověď v této skupině byla zcela zablokována. Hampl a spol. (2002) však při podobném experimentu došli k diametrálně odlišnému výsledku: stejně jako u Byrneho došlo ke zvýšení bazálního perfuzního tlaku, ale zablokování HFPV nenastalo. Tato zásadní diskrepance s výsledky předchozího pokusu nastala podle našeho názoru z toho důvodu, že Byrne použil významně vyšší dávku L-NAME – proto pak pravděpodobně mohlo dojít ke zkreslení výsledků známými nespécifickými účinky blokátoru.

Hampl a spol. se ve zmíněné práci zaměřili ještě na jiné možné vysvětlení vzniku HFPV. Vyšli z podobnosti placentárního řečiště s plicním. V plicích hypoxie působí inhibiči napěťově řízených draslíkových kanálů, což vede k depolarizaci membrány hladkého svalu cévy. Následkem toho dojde k influxu vápenatých iontů z extracelulárního prostředí a sarkoplasmatického retikula a k následné vasokonstrikci.

Na tomto místě je vhodné zařadit krátký úvod do nomenklatury K kanálů: Na základě genetické analýzy napěťově řízených iontových kanálů se ukázalo, že se jedná vlastně o tzv. nadrodinu „voltage-gated-like“ (Yu a spol., 2005). Do této skupiny patří celkem 7 rodin, zmíníme se zde ale pouze o několika. Největší skupinu tvoří přímo napětím řízené K_v kanály. Tato rodina zahrnuje 40 členů (Gutman a spol., 2005). V placentě se vyskytuje kanál K_v 1.5, se specifickým blokátorem 4-aminopyridinem (4-AP) a K_v 2.1 s blokátorem baryem a 4-AP (Hampl a spol., 2002). Další skupinou jsou vápníkem aktivované K_{Ca} kanály. Dosud je jich známo 8 a jsou především aktivovány zvýšenou koncentrací vápníku, některé i napětím (Wei a spol., 2005). V placentě byl potvrzen kanál K_{Ca} 1.1, starším názvem BK_{Ca}, se specifickým blokátorem iberiotoxinem (Hampl a

spol., 2002). Třetím významným členem nadrodiny voltage-gated-like K kanálů, jsou k ATP citlivé K_{ATP} kanály. Tyto kanály jsou vlastně složeny z komplexu kanálu K_{ir} (inward rectifier) a receptorů pro sulfonylureu. Vyskytují se v srdečním svalu i hladkém svalu cév a v pankreatických buňkách a jejich farmakologické ovlivňování má velký význam v léčbě ischemické choroby srdeční i diabetu (Yokoshiki a spol., 2005). Další skupinou jsou již zmíněné kanály K_{ir} . Známe 6 zástupců (Yu a spol., 2005). Poslední dvě skupiny nebyly dosud potvrzeny v placentě na molekulární úrovni. Měření metodou patch-clamp při užití BaCl jako blokátoru kanálu K_{ir} a glyburidu jako blokátoru K_{ATP} kanálu nepotvrdila jejich podíl na hypoxické odpovědi v tomto orgánu (Hampl a spol., 2002).

Nyní opustíme K kanály, ale dále zůstaneme v nadrodině voltage-gated-like kanálů. Další skupinou spadající do této nadrodiny jsou kanály TRP (transient receptor potential). Jedná se o vápníkové kanály, které se aktivují poklesem intracelulární hladiny vápníku a v placentě dosud nebyly potvrzeny. Jejich význam je však již rozpoznán v plicích (Kunichika a spol., 2004).

Zmínili jsme, že po depolarizaci membrány dojde k influxu vápenatých iontů do buňky, který je následován vasokonstrikcí. Děje se tak skrze dalšího člena zmíněné nadrodiny, kanály Ca_v . Vápenaté ionty tak regulují nitrobuňčné procesy jako kontrakce, sekrece, nervový přenos atd. a vzhledem k zaměření této práce se nyní o nich zmíníme podrobněji. Jsou to komplexní proteiny, složené ze 4-5 subjednotek. Největší z nich je ≈ 1 subjednotka, která se na podkladě genetické analýzy dělí do tří podrodin. Na základě tohoto dělení byla vytvořena současná nomenklatura: Kanály jsou označeny Ca_v dle druhu iontu a otevírajícího impulsu-napětí (voltage). Číslovka pak určuje zařazení do podrodiny na základě genetického kódu ≈ 1 subjednotky.

Vápníkové proudy procházející kanály mají v různých buňkách různé vlastnosti. Jsou označeny písmeny a dřívější nomenklatura byla založena právě na nich. Typ L vyžaduje pro otevření poměrně silnou depolarizaci a proud iontů trvá dlouho (long-lasting). Vyskytují se převážně ve svalových buňkách, za úkol mají převážně zprostředkování kontrakce svalů a mají své specifické antagonisty, jak je uvedeno v tabulce č. 1. Proudů typu P/Q, N a R se inaktivují v zásadě rychleji než typ L a vyskytují se převážně v nervových buňkách. Kanály zprostředkující tyto proudy vyžadují též silnou depolarizaci, odlišují se však

významně svými antagonisty, kterými jsou různé hmyzí a hadí toxiny a jejich úkolem je převážně uvolňování neurotransmiterů. Kanály typu T vyžadují ke své aktivaci pouze slabou depolarizaci; vyskytují se též v neuronech, ale i kardiomyocytech - většinou v buňkách, fungujících jako pacemaker. Není u nich dosud znám žádný specifický antagonist. Stručný přehled napětově řízených vápníkových kanálů s jejich specifickým antagonistou uvádí tabulka 1 (Catterall a spol., 2005).

kanál	proud	lokalizace	antagonista
Ca _v 1.1	L	Kosterní svaly, T- tubuly	Dihydropyridiny, fenylalkylaminy, Benzothiazepiny
Ca _v 1.2	L	Kardiomyocyty, hladký sval, těla neuronů	Dihydropyridiny, fenylalkylaminy, Benzothiazepiny
Ca _v 1.3	L	Endokrinní buňky, těla neuronů, atriální kardiomyocyty, kochleární vláskové bb	Dihydropyridiny, fenylalkylaminy, Benzothiazepiny
Ca _v 1.4	L	Tyčinky sítnice, mícha, nadledviny, žírné bb	Dihydropyridiny, fenylalkylaminy, Benzothiazepiny
Ca _v 2.1	P/Q	Nervová zakončení, dendrity, neuroendokrinní bb	Agatoxin IVA
Ca _v 2.2	N	Nervová zakončení, dendrity, neuroendokrinní bb	Conotoxin- GVIA
Ca _v 2.3	R	Těla neuronů, dendrity	SNX 482
Ca _v 3.1	T	Těla neuronů, dendrity, srdeční a hladké svalové bb	žádný
Ca _v 3.2	T	Těla neuronů, dendrity, srdeční a hladké svalové bb	žádný
Ca _v 3.3	T	Těla neuronů, dendrity	žádný

Tab. 1: Přehled napětově řízených vápníkových kanálů. Vysvětlení k pojmům uvedených v tabulce: "kanál"- jedinečné pojmenování kanálu v rámci uvedené skupiny; "proud"-vápníkové proudy zaznamenané v různých buňkách jsou rozděleny na základě svých farmakologických a fyziologických vlastností a lokalizace.

Hampl a spol. (2002) nejprve pomocí polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR) z homogenátu periferních placentárních cév ověřili přítomnost K_v a BK_{Ca} kanálů. Pak použili stejný preparát jako Byrne, za normoxických podmínek byl však perfuzní roztok syčen směsí plynů jen s 40% O_2 (nikoliv 95% jako u Byrneho). Po ověření viability preparátu podáním bolusu angiotensinu II do fetálního oběhu a provedení 20 minutového akutního hypoxického podnětu přidali do perfuzátu v experimentální skupině specifický blokátor K_v kanálů 4-aminopyridin (4-AP). Došlo pak k signifikantnímu vzestupu perfusního tlaku – podobnému jako při hypoxické vasokonstrikci. Hypoxický podnět aplikovaný za přítomnosti 4-AP již další zvýšení tlaku nevyvolal. Selektivní blokátor BK_{Ca} kanálů iberiotoxin neměl vliv ani na basální tlak, ani na HFPV. Hypoxická inhibice K_v kanálů je tedy esenciálním prvkem mechanismu HFPV.

Zajímavý pokus zejména z hlediska metodiky prováděli Bachmaier a spol. (1997), když zkoumali morfologické změny lidské placenty po dlouhodobé dvojité perfuzi. Placenty byly perfundovány 6 hodin, v kontrolní skupině byl maternální okruh perfundován vzduchem a fetální 95% N_2 a 5% CO_2 a v experimentální skupině byly touto směsí perfundovány oba okruhy. V kontrolní skupině nebyly ve struktuře placent po ukončení perfuze zaznamenány téměř žádné změny. Naproti tomu v experimentální skupině došlo k zúžení lumen cév terminálních klků, porušení spojení endoteliálních buněk a elektronovým mikroskopem bylo vidět velké množství vakuol v terminálních klcích a značné rozšíření endoplasmatického retikula. Tyto změny mohou podle autorů mít vliv nejen na rheologické vlastnosti cév, ale mohou být příčinou mírně zvýšeného perfusního tlaku v hypoxických placentách.

Na Hamplův pokus navázali Warening a spol. (2006a; 2006b) , kteří pomocí RT-PCR nejprve ověřovali přítomnost dalších draslíkových kanálů. Kromě již zmíněných K_v a BK_{Ca} i K_{ATP} kanály. Cévy z fyziologických placent (zvláště artérie a vény) zkoumali pomocí myografu a vlastnosti kanálů zjišťovali farmakologicky při různých parciálních tlacích kyslíku.

Po natažení cév na myograf přidávali do lázně selektivní blokátory zmíněných kanálů, iberiotoxin pro BK_{Ca} kanály, 4-AP pro K_v kanály a glybenklamid pro K_{ATP} kanály a dále agonistu K_{ATP} kanálů pinacidil. Porovnávali pak cévní reaktivitu po podání vzestupných koncentrací tromboxanového mimetika U46619.

Po podání 4-AP došlo u artérií i vén k signifikantně větším odpovědím na podání U46619 a rovněž i výchozí napětí před podáním mimetika bylo vyšší. Podobně jako u Hampla a spol., iberiotoxin nezměnil významně reaktivitu ani výchozí napětí cév. Podání glybenklamidu však nezpůsobilo očekávané zvýšení vasokonstrikčních odpovědí, ale posun dose-response křivky směrem doprava. To naznačuje, že glybenklamid zde působí spíše než jako blokátor K_{ATP} kanálů, jako kompetitivní antagonist receptorů pro mimetika tromboxanu. Podáním pinacidilu došlo jak ke snížení pasivního napětí cévy, tak i k snížení odpovědí na U 46619.

Jedním z dalších možných faktorů, které se mohou účastnit na reakci placentárních cév na hypoxii, je i aktivita angiotensinu II. Tato vazoaktivní látka vzniká v organismu v rámci renin-angiotenzinového systému a jeho přeměna z angiotenzinu I je katalyzována angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE). Aktivita ACE se snižuje za hypoxických podmínek v plicním i systémovém řečišti. Davidson a spol.(1981) měřili aktivitu ACE v placentárním řečišti za normálních a hypoxických podmínek. Pracovali s modelem perfundované morčecí placenty. Placenta byla perfundována in situ cestou a. umbilicalis solným roztokem, který byl probubláván směsí plynů s 13 („normoxie“) resp. 3 % kyslíku (hypoxie). Z pupeční vény byly odebírány vzorky perfuzátu a byla v nich měřena aktivita ACE. Matka byla zaintubována a napojena na ventilátor a byla ventilována směsí plynů s 40% resp. 8% O_2 . Jak bylo předpokládáno, při poklesu koncentrace kyslíku (na 8% u matky a 3% u plodu) došlo k signifikantnímu snížení aktivity ACE. Za normoxických podmínek se opět zvýšila. Autoři uzavírají, že promptní reakce aktivity ACE na změnu parciálního tlaku kyslíku hraje významnou roli

zejména v perinatálním období, kdy zvýšení aktivity ACE po porodu zabraňuje systémové hypotenzi plodu. Při experimentu autoři měřili též perfuzní tlak v ubilikální arterii i véně, avšak nikde nezaznamenali významnou hypoxickou změnu perfusních tlaků.

2.2 Chronická hypoxie

Je známo, že placenta se v prvním období gestace (do 10. týdne) vyvíjí v téměř anoxickém prostředí (Rodesch a spol., 1992). Do té doby zátky cytotrofoblastu uzavírají mateřské spirální artérie, které zásobují místo placentace. Lokální parciální tlak kyslíku se pak v 11. týdnu zvyšuje z přibližně 18 na 60 mmHg

Na toto téma existuje značné množství literatury a není účelem této práce popsat všechny doposud známé aspekty placentace. Domnívám se však, že je vhodné alespoň ve zkratce se o některých faktorech zmínit a ukázat možnou šíři problému, jehož dílčí řešení hodláme nalézt studiem vlastností placentárních cév.

Jak popisuje Aplin (2000) ve svém komentáři, regulační pochody závislé na parciálním tlaku kyslíku v trofoblastu nejsou doposud zcela známy; významnou roli v regulaci však hraje „hypoxia inducible factor“-HIF. Jedná se o molekulární senzor v trofoblastu pro registraci změn v parciálním tlaku kyslíku. Skrze svou transkripční aktivitu řídí zásadní procesy placentace-angiogenezu, erytropoezu a migraci a diferenciaci. Fryer a Simon (2006) ve svém experimentu použili myši s vyřazeným genem pro subjednotku HIF 1 α a HIF 2 α . Plody těchto myší nepřežily 10. den gestace a v histologickém vyšetření placent pak byla patrná zúžená vrstva spongiotrofoblastu a nedostatečná chorio-allantoické fúze.

HIF 1 detekovali v myší placentě vystavené hypoxii i Schaffer a spol. (2006). Detekovali ho zejména v periférii placent, naproti tomu labyrintní část nebyla (na základě zkoumání architektury tkáně a exprese hypoxických markerů- např. vaskulární endoteliální růstový faktor-VEGF) hypoxií zasažena. Po té co však podáním L-NAME zablokoval NO syntasu, byla hypoxickými změnami postižena placenta celá.

Na molekulární úrovni se chronickou hypoxií zabývali Soleymanou a spol. (2005) v souvislosti s preeklampsií. Toto onemocnění postihuje významný počet těhotenství. V případě preeklampsie zatím nelze jednoznačně určit, zda jde o důsledek nebo příčinu placentární hypoxie (anebo obojí). K tomuto problému též existuje značné množství literatury a zde se o něm zmíním pouze krátce v souvislosti se zmiňovaným pokusem. Preeklampsie je onemocnění, které pravděpodobně vzniká již v době invaze trofoblastu do dělohy poruchou spirálních artérií a jak se předpokládá, následnou placentární hypoxií. Ve zmíněné práci se autoři rozhodli porovnat globální expresi genů v placentách pacientek postižených preeklapsií se dvěma dalšími skupinami. Jednou byla tkáňová kultura z prvotrimestrálních placent, kdy buňky byly kultivovány jak za hypoxických podmínek (3% O₂), tak za normoxických (21% O₂). Druhou srovnávací skupinou byly placenty matek, které prožily těhotenství a porodily ve vysoké nadmořské výšce. Tyto placenty vlastně slouží jako „in vivo“ model placentární hypoxie.

Výsledky této studie ukázaly, že globální genová exprese u těchto dvou modelů placentární hypoxie (*in vivo* a *in vitro*) byla ve srovnání s preeklamptickými placentami významně podobná. Tato skutečnost není zajímavá jen sama o sobě, ale slibuje do budoucna možnosti v dalším výzkumu mechanismu těchto onemocnění a potenciální terapeutické intervence.

Dalším faktorem, který hraje důležitou roli v patofysiologii hypoxií indukované IUGR, je silný vasokonstriktor endotelin 1 (EDN 1). Zabývali se jím Theate a spol. (2007) v experimentu s gravidními samicemi potkana. Březí samice byly 18.-21. den gravidity umístěny v normobarické komoře s 12% kyslíku. 21. den pak byly krysy usmrceny a byly vypreparovány placenty a dělohy. Metodou RT-PCR byla posouzena exprese mRNA pro EDN 1 a jeho receptory. V chronicky hypoxických placentách byla signifikantně zvýšená exprese EDN1 mRNA, naproti tomu v dělohách docházelo k jejímu snížení. Pro mRNA receptorů nebylo nalezeno signifikantní zvýšení. EDN1 tedy může hrát roli v odpovědi placenty na hypoxii a snížená exprese v děloze je pravděpodobně kompenzatorní mechanismus. Tato studie názorně ilustruje opačnou odpověď na hypoxii na mateřské straně (v děloze), která se chová podobně jako ostatní systémová řečiště (při poklesu EDN1 lze očekávat pokles cévního odporu), oproti

straně fetální, která se chová podobně jako postnatální plicní cirkulace (při vzrůstu EDN1 lze čekat zvýšenou cévní rezistenci).

Nabízí se otázka, zda v placentě, podobně jako v plicích, chronická hypoxie mění morfologii cévního řečiště.

O posouzení vlivu vysoké nadmořské výšky na morfologii placentárních cév se pokusili Espinosa a spol. (2001). Porovnávali morfologii placent z normálních těhotenství a placent matek, které strávily těhotenství ve vysoké nadmořské výšce. Zjistili, že procentuální zastoupení cév v poměru k oblasti zastižené v řezu klkem placent z vysoké nadm. výšky a i průměr kapilár je signifikantně větší ve srovnání s placentami matek z výšky při hladině moře. Tento výsledek poněkud kontrastuje s popisovanými nálezy u placent, kde byla snížena placentární perfuze z důvodu špatné invaze trofoblastu do mateřských spirálních artérií (preeklampsie), kde dochází spíše k snížení vaskularizace v terminálních klcích a zmenšení průměru kapilár (Fox, 1997). Možná to souvisí s tím, že jde vlastně o různé druhy hypoxie. V případě nedostatečné invaze se jedná o hypoxii ischemickou, kdy je povšechně snížena distribuce kyslíku ke tkáním. Naproti tomu v případě těhotenství z vyšších nadmořských výšek jde o hypoxii hypoxemickou a je tedy možné snížený obsah kyslíku nahradit zvýšeným krevním průtokem.

Vliv vysoké nadmořské výšky na morfologii zkoumali též Tissot van Patot a spol. (2003). Srovnávali morfologii a morfometrii placent žen, které prožily těhotenství v 1600 a 3100 m.n.m. V souladu s předchozími autory potvrdili signifikantně zvýšenou kapilární denzitu u placent z 3100 m.n.m. Dále se však také zabývali posuzováním remodelace cév, tj. zda cévy vykazují znaky charakteristické pro invazivní trofoblast a zda nezůstávají pouze ve stadiu klidového trofoblastu. Nedostatek invazivity je považován za jeden z důvodů nedostatečné výživy a oxygenace plodu a s tím spojených komplikací. V souladu se svojí hypotézou pak autoři potvrdili signifikantně snížený počet remodelovaných cév u placent z vysoké nadmořské výšky. Dá se tak také vysvětlit již dříve popisovaný snížený průtok, měřený v placentách těchto matek ultrazvukem (Zamudio a spol., 1995).

Otázku, zda chronická hypoxie zvyšuje oxidativní stres v placentách, zkoumali Zamudio a spol. (2007). Jako v předchozích experimentech sloužila i zde vysoká nadmořská výška jako experimentální prostředí. V tomto experimentu

se jako míra oxidačního stresu měřila oxidace proteinů a peroxidace lipidů. Aktivita superoxid dismutasy, glutathion transferasy a thioredoxinu sloužily jako markery antioxidantní aktivity placenty. Jako marker apoptosy sloužila aktivita kaspasy 3. Navzdory očekávání experiment nepotvrdil, že chronická hypoxie placenty zvyšuje oxidativní stres. Markery oxidačního stresu ve srovnání s kontrolami nebyly zvýšené. Nedošlo ani k větší apoptose u těchto chronicky hypoxických placent. Nicméně, aktivita antioxidantních enzymů ve srovnání s kontrolami byla snižena. V tomto případě se můžeme domnívat, že tato snížená koncentrace antioxidantů by mohla přispívat k rozvoji např. preeklampsie u žen těhotných ve vysoké nadmořské výšce, ale z dosavadních výsledků není zřejmé, že by šlo o hlavní etiologický faktor.

Morfologii preeklamptických placent zkoumali Resta a spol. (2006). Vzorky placent z normálních a preeklamptických těhotenství byly uloženy do formolu a byly z nich připraveny parafínové řezy. Ty pak byly inkubovány s monoklonální protilátkou proti endotelu s navázanou imunoflorescenční barvou. Takto připravené preparáty byly potom zkoumány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Pomocí posouzení intenzity signálu a imunoflorescenční amplitudy byl popsán zvýšený počet kapilár u preeklamptických placent, nicméně celková intenzita signálu je u těchto vzorků nižší. To znamená, že lumina těchto cév jsou užší a i celková plocha umožňující fetomaternální výměnu je menší.

Již bylo zmíněno, že jedním z následků chronické hypoxie plodu může být i IUGR. Cévy placent z takto postižených těhotenství mohou pak již mít změněné vlastnosti v porovnání s normoxickými cévami. Wareing a Baker (2004) nejprve porovnávali na myografu vlastnosti placentárních cév, jejichž vzorky byly získány z placent normálních těhotenství a těhotenství postižených IUGR. Při experimentu byla navozována vasokonstrikce přidáním tromboxanového mimetika U46619 do média. Výsledkem pokusu bylo zjištění, že vasokonstrikce u IUGR-cév je signifikantně snížena oproti cévám z normálních těhotenství. V dalším pokusu pak měřili vliv různého stupně hypoxie na reaktivitu cév placent postižených IUGR (Wareing a spol., 2006c). Arterie a vény z těchto placent zkoumali pomocí myografu za situace, kdy bylo médium syceno směsí plynů s 20%, 7% a 2% O₂. Pak se iniciovala vasokonstrikce postupně se zvyšující koncentrací tromboxanového mimetika U46619. Vasokonstrikce u vén byla při koncentracích

kyslíku v médiu 7% a 2% signifikantně vyšší, než za normoxických podmínek. U artérií nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. Pokud se však vasokonstrikce artérií u placent z IUGR porovnávala s placentami z normálních těhotenství, kdy experiment probíhal za stejného protokolu, byl při sycení média 21% kyslíku rozdíl zjištěn i zde. Jak již bylo řečeno v úvodu, v membráně hladkého svalu placentární cévy se na hypoxické vasokonstrikci podílejí napěťově řízené draslíkové kanály, jejichž blokádou dojde k depolarizaci membrány a následné vasokonstrikci. V další části experimentu autoři do média přidali 4 aminopyridin- selektivní blokátor těchto kanálů. Bazální napětí artérií a vén se signifikantně zvýšilo a stejně tomu bylo i při reakci na podání tromboxanového mimetika.

Metodou myografu pracovali i Jain a spol. (2006). Ve své práci se rozhodl ověřit vliv erythropoetinu na cévy placent postižených IUGR. Erythropoetin je hormon tvořený v ledvinách jako odpověď na hypoxii a anémii. V průběhu těhotenství je v mateřské cirkulaci množství erythropoetinu zvýšeno až 3 x a ještě se navyšuje za podmínek hypoxie (Irelad a spol., 1992); jako významný producent v tomto případě slouží trofoblast. Cévy třetího řádu byly preinkubovány 24 hodin v médiu obsahujícím erythropoetin. Pak byla zkoumána jejich reaktivita po přidání tromboxanu a endotelinu 1. Ve srovnání s kontrolami byla reaktivita cév inkubovaných za přítomnosti erythropoetinu signifikantně nižší. To by znamenalo, že sekrece erythropoetinu v těhotenství je součástí adaptivních mechanismů plodu na hypoxické prostředí a snaží se zajistit plodu optimální oxygenaci.

Dosud tedy víme, že na akutní hypoxický podnět reagují placentární cévy vasokonstrikcí, která je tím větší, čím nižší pO_2 cévy obklopuje. V mechanismu HFPV hraje zásadní roli depolarizace membrány hladkého svalu placentárních cév, způsobené inhibicí K_v kanálů. NO má sice vliv na tonus placentárních cév, jeho role v HFPV je však nejasná.

Na regulaci placentárního cévního řečiště se podílí HIF a EDN 1, kteréžto látky jsou v placentách vystavených hypoxii ve zvýšené míře exprimovány. Jako model dlouhodobé hypoxie „in vivo“ je znám pobyt ve vysoké nadmořské výšce. V těchto placentách byla zjištěna vyšší vaskularizace, která pravděpodobně slouží jako kompenzatorní mechanismus při sníženém pO_2 . Tyto cévy však také vykazují morfologické změny, svědčící pro nedostatek invazivity, která může být

podkladem nedostatečné výživy plodu. Morfologické změny cév byly nalezeny i v placentách preeklamptických matek, u nichž bylo nalezeno zmenšení celkové plochy pro fetomaternální výměnu. Změny vlastností vykazují i cévy placent těhotenství postižených IUGR; jedná se zejména o zvýšenou reaktivitu vén za hypoxických podmínek.

3.Cíle práce

Z literárního přehledu je patrné, že působení hypoxie na fetoplacentární cévy - jakkoliv klinicky významné - je v současnosti známo pouze rudimentárně. Tato práce se proto zabývala dvěma aspekty této problematiky: mechanismem akutní HFPV a působením chronické hypoxie. U akutní HFPV jsme vycházeli z předpokladu, že podobně jako v plicních cévách, hypoxická inhibice K kanálů (a tedy depolarizace buňky cévního hladkého svalu) vede k vasokonstrikci prostřednictvím napěťově řízených Ca kanálů.

U chronické hypoxie bylo našim cílem prokázat, jak ovlivňuje odpor a reaktivitu fetoplacentárního cévního řečiště.

Specificky tedy bylo cílem práce testovat dvě hypotézy:

- 1) Zablokováním Ca_v kanálů typu L zabráníme HFPV v lidské placentě.

- 2) Chronická hypoxie zvyšuje odpor a mění reaktivitu fetoplacentárního cévního řečiště laboratorního potkana.

4. Metody

Volba metod, pomocí kterých byly řešeny úkoly této práce, odpovídá stanoveným cílům. K experimentům, které byly zaměřeny na výzkum placenty za fyziologického stavu, jsme mohli použít preparát z lidské placenty, neboť tam nebylo nutno zasahovat do průběhu těhotenství. Bylo tedy možno maximalizovat relevanci použitého preparátu pro humánní fyziologii, potažmo medicínu. Pro posouzení vlivu chronické hypoxie na placentu pak bylo nutno užít zvířecí model, protože experimentální navození chronické hypoxie u lidí by nebylo eticky akceptovatelné. Jako přijatelný jak z hlediska nákladů, tak proveditelnosti, se ukázal být preparát izolované krysí placenty, kdy krysy před porodem byly umístěny v hypoxické komoře.

4.1 Izobarická hypoxická komora

V experimentech byla k vytvoření podmínek chronického nedostatku kyslíku v fetoplacentárním řečišti použita izobarická hypoxická komora. Jedná se o uzavřený systém, ve kterém vzduch cirkuluje rychlostí 6-8 l/min okruhem, který slouží k odstraňování vlhkosti, CO₂ a tepla vznikajících metabolismem zvířat. CO₂ je absorbováno v nasyceném roztoku hydroxidu draselného a ve vrstvě natronového vápna, vlhkost je odstraňována průchodem vzduchu vrstvou silikagelu a ochlazením. Obsah kyslíku v hypoxické komoře je trvale sledován Clarkovým čidlem, které při poklesu koncentrace kyslíku pod libovolně nastavitelnou mez samočinně zapne čerpadla, která dočerpají do komory vzduch, dokud obsah kyslíku v komoře nedosáhne nastavené úrovně. Vzniku přetlaku v komoře brání vodní ventil. Zařízení nevyžaduje dohled ani zvláštní bezpečnostní opatření. S minimálními nároky na údržbu může být v provozu po dobu řady týdnů. V našem případě komora udržovala obsah kyslíku na 10%. Březí potkaní samice snášely pobyt v 10% hypoxii velmi dobře. To je výhoda normobarické komory oproti hypobarické expozici, která není tolerována bez několikadenní adaptace (která by při délce březosti potkana nebyla pro naše pokusy možná).

4.2 Izolovaný, dvojitě perfundovaný kotyledon lidské placenty

Příprava preparátu

K experimentům byly používány placenty matek, které porodily mezi 38. a 42. týdnem těhotenství spontánně nebo podstoupily elektivní císařský řez. S přípravou preparátu bylo započato nejpozději do 10 minut po porodu placenty, po rychlém transportu z porodního sálu. Byl vybrán zjevně intaktní kotyledon a do jeho přívodné arterie a vény bylo vstříknuto 2500 jednotek heparinu. Arterie i véna byly nakanylovány a byla zahájena perfuse preparátu Krebsovým roztokem se 4% dextransu a 17 mM meklofenamátu o teplotě 38 °C. Rychlost perfuse byla nejprve cca 2ml/min a po dokončení přípravy preparátu se postupně během cca 10-15 minut zvyšovala na 8 ml/min. Byly podvázány všechny viditelné cévy odstupující z kmene přívodné arterie. Perfuzát vytékající z venosní kanyly byl nejprve vyléván a po viditelném odbarvení od zbytků krve posléze recirkulován. Roztok byl probubláván směsí plynů s 40 % O₂, 5% CO₂ a 55% N₂. Takto perfundovaný kotyledon byl pak odštířen od zbytku placenty, umístěn na drátěnou mřížku mateřskou stranou dolů a zakryt prohřívaným skleněným krytem, majícím uprostřed otvor. Tímto otvorem byly do placentárních maternálních lakun naslepo zapíchnuty 3 jehly, zásobující perfusním roztokem mateřskou stranu preparátu. Perfusní okruh byl sestaven ponejvíce z tygonových hadiček, které se ukázaly jako nejméně propouštějící vzduch při zachování požadované flexibility. Ke vtokové kanyle na fetální i maternální straně byla připojena tlaková čidla, měřící a zaznamenávající perfusní tlak v reálném čase.

Protokol pokusů

Po stabilizaci preparátu byl podán bolus angiotenzinu II (ANG II) do přívodné kanyly (0,15 µg) a následně byl preparát vystaven 2x v intervalu cca 10 min. hypoxickému podnětu (změna plynů probublávajících perfuzát na směs 95% N₂ + 5% CO₂) (Hampl a spol., 2002). Stimulus trval cca 10-15 min, než se perfusní tlak stabilizoval, a pak byla směs plynů změněna na původní. Punkcí výtokové kanyly byly pravidelně odebírány vzorky perfuzátu ke stanovování pO₂,

pCO₂ a pH. Po té byl do perfuzátu přidán selektivní inhibitor Ca kanálů typu L ze skupiny dihydropyridinů -nifedipin (výsledná koncentrace perfuzátu byla 1 nM) a navozen další hypoxický stimulus. Dávka nifedipinu byla určena na podkladě literatury, kdy při obdobném pokusu s izolovanými plícemi byly užity výsledné koncentrace až 0,1 μM (Morio a McMurtry, 2002) V kontrolní skupině byl místo nifedipinu do perfuzátu přidáván dimethylsulfoxid (DMSO), rozpouštědlo nifedipinu, k vyloučení jeho případných nespecifických účinků (byl rozředěn v poměru 1:10⁶ ve vodě a 1 μl tohoto roztoku byl přidáván do 1ml perfuzátu). Po ukončení tohoto hypoxického podnětu byl perfuzát vyměněn za čerstvý, bez nifedipinu či DMSO, a na samém konci pokusu navozen poslední hypoxický stimulus.

4.3 Izolovaná, dvojitě perfundovaná placenta laboratorního potkana

Příprava preparátu

K experimentům byly používány březí samice potkanů kmene Wistar zakoupené od firmy Biotest Konárovice. Zabřeznutí bylo kontrolováno výtěrem z pochvy. Samice byly týden až 14 dní před plánovaným porodem převezeny do naší laboratoře pro zajištění odpovídající aklimatizace. Den před plánovaným termínem porodu (21. den březosti), jsme samici anestezovali Thiopentalem (50mg/kg i.p.) V další preparaci jsme postupovali dle Štulce a spol.(1990): Po uvedení do anestezie jsme zvíře uložili do lázně s Ringerovým roztokem, který byl po celou dobu experimentu udržován na teplotě 37°C. Provedli jsme střední laparotomii a pronikli do peritoneální dutiny. Zde jsme manuálně vybavili dělohu s plody a umístili je před břišní stěnu. Zakanylovali jsme přívodnou děložní arterii kanylou o síle 24 jednotek, zajistili ligaturou a začali perfundovat Krebsovým roztokem, probublávaným směsí plynů s 21% O₂, 5% CO₂ a 74% N₂. Rychlost perfuse se postupně zvyšovala na 1 ml/ min. Podvázány byly též cévy zásobující placenty v řadě za naší zvolenou. K zajištění venosního odtoku jsme děložní žíly po zakanylování artérie na několika místech propíchlí. Po té jsme nastříhli děložní stěnu a z plodových obalů vybavili plod a ozřejmili pupečnickové cévy (u potkana jsou pouze 2). Kanyly stejné velikosti jako u děložních cév jsme zavedli do pupečnickové artérie a vény a venosní cestou jsme započali s perfusí fetální strany preparátu ze společného rezervoáru rovněž rychlostí 1 ml/min. Arteriální kanyla

sloužila k odběru perfuzátu ke stanovení hodnot krevních plynů. Plody u zvolené placenty i ostatní byly usmrceny nadměrnou dávkou anestetika.

Protokol pokusu

V obou pokusech s tímto preparátem termínovaně zabřezlé samice strávily posledních 7 dní březosti (z celkového 21 dne) v hypoxické normobarické komoře s 10% kyslíku. Kontrolní skupina samic trávila celou dobu březosti ve standardních, normoxických podmínkách. 21. den březosti byly samice z komory vyjmuty a bezprostředně použity k přípravě preparátu perfundované placenty.

V prvním experimentu jsme po 15 minutové stabilizaci preparátu provedli k posouzení odporových vlastností placentárních cév měření křivky závislosti průtoku na tlaku. Při průtoku 1 ml/min jsme na fetální straně nejprve na několik desítek vteřin zcela zastavili perfuzi, a pak jsme postupně zvyšovali průtok stupňovitě po 0,2 ml/min až na 1,8 ml/min, kdy každý krok trval cca 2 min. Po provedení prvního měření jsme do perfuzátu přidali nitroprusid sodný (SNP) ve výsledné koncentraci 60 mM a podruhé změřili závislost tlaku na průtoku. SNP je silná vasodilatační látka jejímž prostřednictvím jsme chtěli zjistit, do jaké míry je případný hypoxický posun křivky tlak - průtok ovlivněn aktivní vasokonstrikcí.

Ve druhém experimentu jsme po stabilizaci preparátu při průtoku 1 ml/min v obou perfuzních okruzích do přírodní fetální kanyly aplikovali bolusově postupně 3 dávky ANG II - 0,1; 0,15 a 0,2 ug v přibližně 10 minutových intervalech. Pak jsme změnou směsi plynů probublávající perfuzát na 95% N₂+5%CO₂ provedli první hypoxický stimulus, trvající asi 10 min. Po té jsme opět změnili směs plynů na normoxickou. Po 15 minutovém zotavení jsme pak stejným způsobem provedli druhý hypoxický stimulus.

4.4. Statistická analýza

Výsledky jsou uváděny jako průměr ± SE. K analýzám jsme používali program StatView 5.0.1. Hodnoty tlaku před a po podání nifedipinu či DMSO a hmotnosti placent od stejné matky byly zpracovány užitím párového *t*-testu. Nepárový *t*-test jsme používali např. pro porovnání hmotnosti zvířat mezi skupinami. Hodnoty bazálního perfuzního tlaku, změny tlaku při hypoxii, křivky vztahu tlak-průtok a změny reaktivity byly porovnávány mezi skupinami užitím analýzy rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření. Jako statisticky signifikantní jsme považovali hladinu významnosti $P < 0,05$.

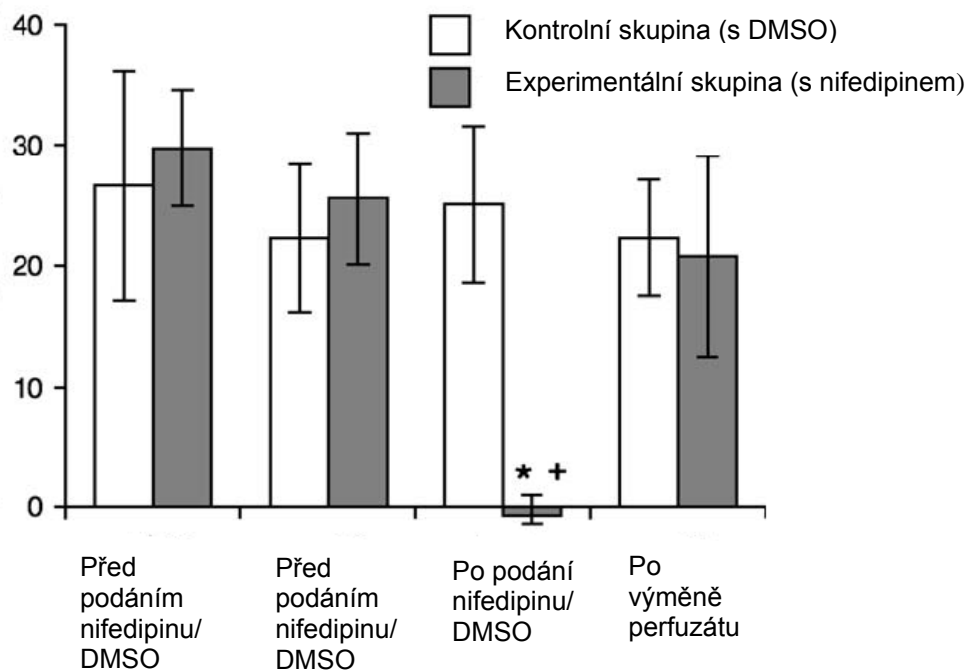
5. Výsledky

5.1 Napětově řízené vápníkové kanály zprostředkovávají hypoxickou vasokonstrikci v lidské placentě.

(příloha A)

V této studii, jejímž cílem bylo pomocí inhibitoru L- kanálů nifedipinu zjistit jejich roli v mechanismu HFPV, se kontrolní a experimentální skupina od sebe během celého experimentu nelišily v hodnotách bazálního perfusního tlaku. Před podáním nifedipinu nebo DMSO se skupiny také nelišily odpovědích na ANG II a hypoxii (obr.1). Hypoxické stimuly způsobily v obou skupinách pokles pO_2 (z 86 ± 3 k 58 ± 5 mmHg) a pH (z $7,40 \pm 0,01$ k $7,30 \pm 0,02$) perfuzátu ve výtokové kanyle. Podání nifedipinu ani DMSO nezpůsobilo samo o sobě změnu perfuzního tlaku. Po přidání nifedipinu došlo ke kompletnímu zablokování vasokonstrikční odpovědi na hypoxický stimulus. Naproti tomu v kontrolní skupině velikost HFPV ovlivněna nebyla (obr.1).

Δ perfuzního tlaku při hypoxii
(% bazálního tlaku)



Obr. 1. Podání nifedipinu zcelaablokovalo HFPV. Hodnoty v tomto grafu znázorňují změny perfuzního tlaku, navozených hypoxií, vyjádřených jako procento bazálního perfuzního tlaku před hypoxickým stimulem. Po třetím hypoxickém stimulu byl perfuzát vyměněn za čerstvý, bez nifedipinu či DMSO. To vedlo ke kompletnímu obnovení hypoxické vasokonstrikce.* $P < 0,05$ po podání nifedipinu ve srovnání se všemi odpověďmi bez podání nifedipinu v experimentální skupině. + $P < 0,05$ nifedipin ve srovnání s kontrolní skupinou.

Změna perfuzního tlaku při hypoxii byla před podáním nifedipinu $13,6 \pm 3,7$ mmHg a po podání pak $-0,6 \pm 1,0$ mmHg ($P < 0,05$), zatímco velikost HFPV byla před podáním DMSO $11,9 \pm 2,9$ mmHg a po podání $13,9 \pm 3,0$ mmHg ($P > 0,05$).

V pokusné skupině, v níž byla HFPV kompletněablokována nifedipinem, došlo po jeho odstranění (po výměně perfuzátu) ke kompletní obnově HFPV. V kontrolní skupině, kde HFPV nebyla podáním DMSO změněna, nevedlo ani jeho odstranění výměnou perfuzátu k žádné změně velikosti HFPV. Hodnoty perfuzního tlaku před podáním nifedipinu či DMSO se nelišily od hodnot po výměně perfuzátu. Pokles pO_2 v perfuzátu při hypoxických podnětech nebyl ovlivněn podáním nifedipinu ani DMSO.

5.2 Chronická hypoxie zvyšuje odpor a reaktivitu k vasokonstrikčním látkám v cévách placenty laboratorního potkana.

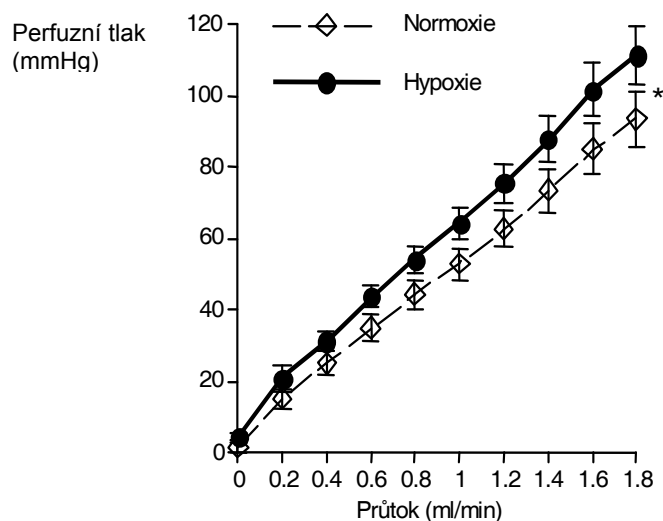
(příloha B)

Zjistili jsme podle očekávání, že hmotnost plodů i matek po týdnu v hypoxii byla signifikantně nižší než u normoxických kontrol. Hmotnosti placent se významně nelišily (viz tab. 2).

skupina	hmotnosti těl matek (g)	vlhká hmotnost placent po perfusi (mg)	vlhká hmotnost neperfundovaných placent (mg)	fetální hmotnost (g)
normoxické kontroly	426±31	562±151	647±75	4,08±0,05
týdenní hypoxie	323±11	456±54	675±71	3,26±0,16
hodnoty P (normoxické oproti hypoxickým)	0,012	0,43	0,82	<0,0001

Tab. 2: Hmotnosti matek, placent a plodů. Čísla jsou uváděna jako průměr ± SE. Párovým t-testem nebyl prokázán rozdíl mezi hmotnostmi perfundovaných a neperfundovaných placent.

V prvním pokusu byl perfusní tlak při bazálním průtoku 1ml/min u hypoxických placent 64 ± 3 mmHg, v kontrolní skupině pak 53 ± 4 mmHg - rozdíl mezi skupinami byl těsně za námi předem stanovenou hranicí statistické významnosti ($P= 0,056$). Celá křivka P/Q byla ovšem u hypoxických placent signifikantně posunuta k vyšším tlakům (obr. 2).



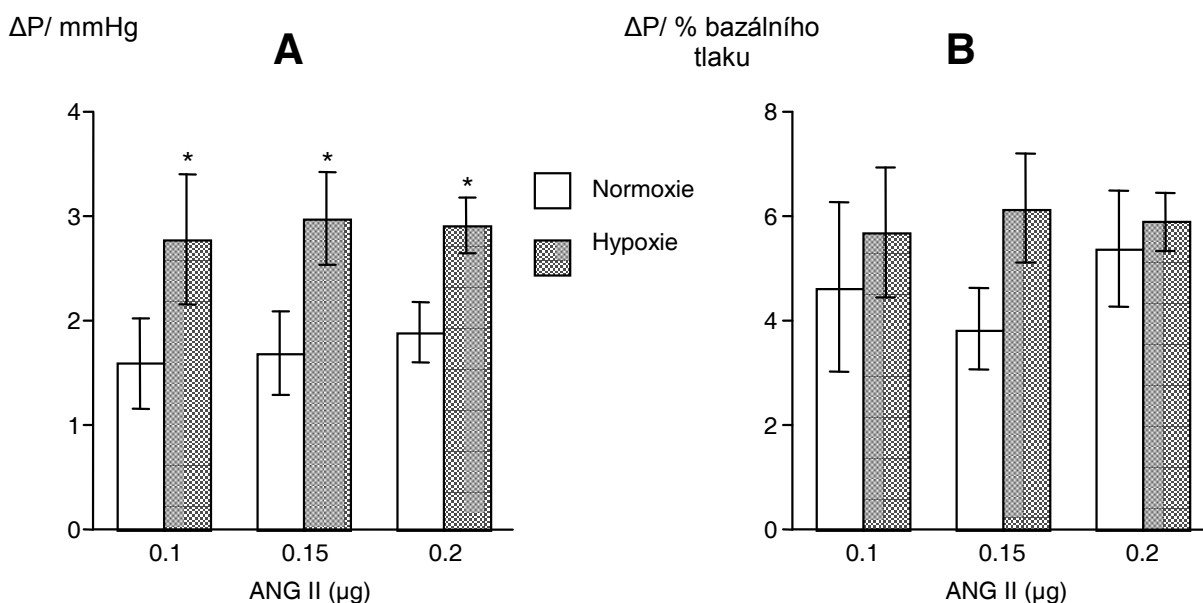
Obr. 2. Vztah tlak-průtok měřený na fetální straně placenty. Křivka u skupiny vystavené chronické hypoxii se významně liší od kontrolní skupiny (* $P < 0,05$, ANOVA pro opakovaná měření).

Pro posouzení podílu aktivního napětí cévní stěny na zvýšený tlak jsme porovnávali v obou skupinách křivku P/Q před a po podání nitroprusidu. V normoxické skupině jsme nepozorovali mezi křivkami rozdíl. Co ale bylo poněkud překvapující byla skutečnost, že ani v experimentální skupině se křivky před a po podání nitroprusidu prakticky nelišily. Na zvýšeném perfusním tlaku se tedy nepodílí trvalá vazokonstrikce. Abychom si byli jisti, že tento výsledek nebyl dán např. chyběním enzymatického aparátu v myocytech fetoplacentárních cév, zodpovědného za uvolnění NO ze SNP (a tedy za vasodilataci), provedli jsme ještě dodatečný pokus, kdy jsme porovnali reakci cév na ANG II u normoxických placent před a po podání nitroprusidu. První reakce na ANG II zvýšila perfusní tlak o 15 %, po podání nitroprusidu pak zvýšení tlaku nebylo větší než 5 %. Nitroprusid je tedy schopen redukovat cévní tonus ve fetoplacentárních cévách tohoto druhu.

V druhém pokusu, zaměřeném na akutní vazokonstrikční reaktivitu, přesáhl oproti předchozímu pokusu rozdíl mezi skupinami v perfusních tlacích na začátku pokusu při bazálním průtoku 1 ml/min hranici statistické významnosti. U chronicky hypoxických placent byl perfusní tlak 48 ± 3 mmHg, u kontrolní skupiny pak 36 ± 3 mmHg ($P = 0,0048$). Pokud se data o bazálním perfusním tlaku analyzují společně (to je možné vzhledem k identickému průběhu obou pokusů až do stadia měření

této hodnoty), rozdíl mezi skupinami je signifikantní ($P=0,04$). Představuje to podpůrný argument pro existenci zvýšení fetoplacentárního cévního odporu chronickou hypoxií.

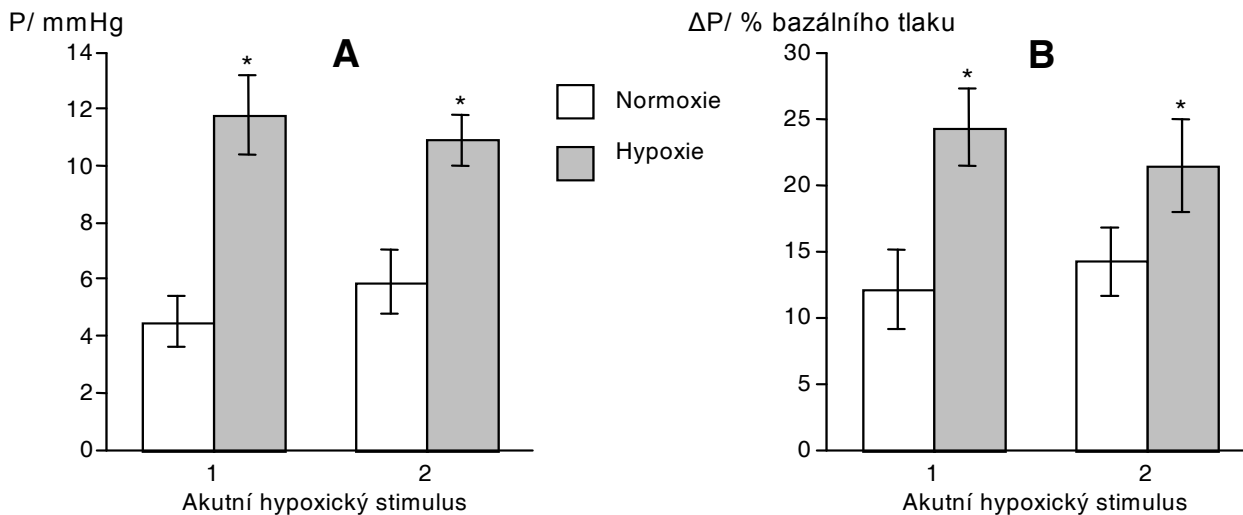
Všechny tři odpovědi na ANG II byly téměř kompletně reversibilní. V experimentální skupině byly (vyjádřeno v absolutních číslech) signifikantně vyšší, než ve skupině normoxické. Při vyjádření odpovědi v % bazálního tlaku se skupiny nelišily (obr. 3). V rozmezí použitých dávek ANG II nebyla velikost závislá na dávce.



Obr.3. Chronická hypoxie zvyšuje vasokonstriční odpověď na podání angiotensinu II. Zvýšení perfusního tlaku navozené ANG II za konstantního průtoku bylo vyšší u hypoxických oproti normoxickým placentám. ($P < 0,05$) (A). Odpovědi na ANG II vyjádřené ve vztahu k bazálnímu perfuznímu tlaku před podáním ANG II se mezi skupinami signifikantně nelišily (B).*

Odpovědi na akutní hypoxické stimuly byly signifikantně větší v experimentální skupině. U prvního hypoxického stimulu byla změna perfuzního tlaku $9,8 \pm 1,7 \text{mmHg}$ u chronicky hypoxických placent oproti $4,7 \pm 1,1 \text{mmHg}$ u kontrol (vyjádřeno jako procento bazálního tlaku) byla u chronicky hypoxických

placent změna tlaku $24 \pm 3,5\%$ a $12,5 \pm 4,8\%$ u kontrol, $P < 0,05$). U druhého hypoxického stimulu byla v experimentální skupině změna tlaku $9,1 \pm 0,7 \text{ mmHg}$ ($21,5 \pm 3,5\%$) a v kontrolní skupině $5,9 \pm 1,1 \text{ mmHg}$ ($14,2 \pm 2\%$) (obr.4) ($P < 0,05$). Opakování podnětu nemělo vliv na velikost odpovědi.



Obr. 4. Chronická hypoxie zvětšuje vasokonstriční reakci na akutní hypoxické stimuly. Zvýšení perfuzního tlaku za konstantního průtoku při opakovaných hypoxických stimulech je vyšší u hypoxických placent (A). Je tomu tak i pokud změnu vyjádříme ve vztahu k bazálnímu tlaku před hypoxickým stimulem (B) ($P < 0,05$).*

Během hypoxických podnětů poklesl významně pO_2 ve vzorcích perfuzátu z fetální výtokové kanyly u normoxické skupiny (ze 117 ± 3 k 81 ± 2 mmHg) i hypoxické skupiny (ze 119 ± 3 k 84 ± 3 mmHg). Ve srovnání s odpověďmi na ANG II bylo zvýšení perfuzního tlaku relativně pomalejší, trvalo po celou dobu hypoxie a po návratu k normoxii se pak perfuzní tlak vrátil blízko původní úrovni (reverzibilita byla větší než 85%).

6. Diskuse

6.1 Napětově řízené vápníkové kanály zprostředkovávají hypoxickou vazokonstrikci v lidské placentě

Tato studie prokázala zásadní roli napětově řízených vápníkových kanálů typu L v mechanismu HFPV. V plicním cévním řečišti prokázali podobnou roli již McMurtry a spol. (1976) na preparátu izolovaných perfundovaných plic, kdy zablokovali hypoxickou vasokonstrikci podáním verapamilu.

V placentě byly nalezeny kanály z rodiny $Ca_v1.1$ (Hampl a spol., 2002). Jejich specifickými antagonisty jsou m.j. dihydropyridiny – v naší studii jsme použili nifedipin. Vzhledem k přítomnosti mnoha molekul vážících Ca v cytosolu by se extracelulární vápenaté ionty vstupující skrze tyto kanály nemusely dostat až ke kontraktilnímu aparátu, který je relativně značně vzdálen od plasmatické membrány, v dostatečném množství. Dostatek vápníku na uskutečnění kontrakce by tak mohlo zajistit jeho uvolnění ze sarkoplasmatického retikula, jak je to běžné při odpovědi na celou řadu vasokonstrikčních podnětů (Mc Donald a spol., 1994; Pozzan a spol., 1994). Obě hlavní rodiny vápníkových kanálů sarkoplasmatického retikula (IP3 a ryanodinové receptory) reagují na zvýšené množství intracelulárního vápníku a uvolňují do cytoplasmy další vápenaté ionty (CICR – Calcium –induced Ca release). Ty pak se šíří ke kontraktilnímu aparátu buňky.

V plicích, jako v jediném dalším orgánu schopném hypoxické vasokonstrikce, byla prokázána pomocná role sarkoplasmatického retikula na hypoxické kontrakci buňky hladkého svalstva (Morio a Mc Murtry, 2002). Při hypoxii však po depolarizaci membrány (vyvolané inhibicí K_v kanálů) zřejmě dochází nejprve k uvolnění vápníku z extracelulárního prostředí. Tento influx zřejmě představuje hlavní zdroj vápníku pro následnou vasokonstrikci (Moudgil a spol., 2004). K udržení hladiny intracelulárního vápníku pak při hypoxii přispívají výše zmíněné zásoby v sarkoplasmatickém retikulu. Názory, zda je při HPV hlavní zdroj vápenatých iontů intra- či extracelulární, není dosud jednotné, přesvědčivější jsou zatím však argumenty, které uvádějí za hlavní, roli extracelulárního vápníku

(Moudgil a spol., 2004). V této souvislosti je třeba ještě zmínit influx vápenatých iontů kanály aktivovanými poklesem zásob vápníku v sarkoplasmatickém retikulu. Tyto kanály nejenže přímo přispívají ke zvýšené hladině vápníku v buňce, ale i zajišťují opětovné plnění sarkoplasmatického retikula vápníkem (kapacitivní influx vápenatých iontů) (Salvaterra a Goldman, 1993; Post a spol., 1995). Zdá se, že tyto kapacitivní kanály náleží do rodiny TRP (transient receptor potential).

(Kunichika a spol., 2004). Tyto kanály nejsou citlivé na blokátory odvozené z dihydropyridinu (jako je např. nifedipin, použitý v naší studii) (Pozzan a spol., 1994; Parekh a Putney, 2005). Naše výsledky tedy nepodporují významnou roli TRP kanálů a kapacitivního influxu v mechanismu HFPV.

Kromě svého hlavního účinku blokátory kanálů typu L mohou ve vyšších dávkách uvolňovat Ca ze sarkoplasmatického retikula (Jabr a spol., 1997). Pokud by tomu tak bylo i v našem pokusu s nifedipinem, z retikula by se uvolnilo více vápníku a následovala by větší kontrakce. Naproti tomu jsme po podání nifedipinu pozorovali kompletní zablokování hypoxické vasokonstrikce. Tato skutečnost naznačuje, že pokud po podání nifedipinu k nějakému uvolnění vápníku ze sarkoplasmatického retikula došlo, bylo nejvýše minimální. Jako důležitou okolnost je třeba zmínit i fakt, že jsme z důvodu zabránění možným nespecifickým účinkům nifedipinu (např. vliv na sarkoplasmatické retikulum) použili velmi nízkou dávku (1nM) což je řádově méně, než v jiných studiích (např. Moiro a McMurtry, 2002).

Již bylo řečeno, že fetoplacentární cévy mají minimální klidový tonus (Hampl a spol., 2002). Proto není překvapivá skutečnost, že nifedipin již dále nesnížil bazální perfusní tlak. V mnoha cévních myocytech je klidový membránový potenciál zápornější, než práh aktivace kanálů typu L (Archer a spol., 1996). Pravděpodobnost otevřeného stavu těchto kanálů je za těchto okolností mizivá a nemůže být tedy blokátory dále významně snížena.

Metodologickou limitací tohoto a podobných experimentů je skutečnost, že parciální tlak kyslíku v preparátu je vyšší než v placentě za fyziologických okolností. Je to způsobeno především difúzí molekul kyslíku skrze stěnu hadiček, z nichž je sestaven perfuzní okruh, i difúzí tkání samotnou. Věnovali jsme se poměrně důkladně možnostem omezení tohoto problému a lze říci, že dosažený stav je maximum možného, s výjimkou umístění celé experimentální aparatury do

silně hypoxického prostředí. To by ovšem pokusy zásadně prodražilo. Relativně zvýšená hladina oxygenace může být významná z hlediska kvantifikace absolutní velikosti HFPV. Hlavní závěr této studie, že vasokonstrikce způsobená poklesem parciálního tlaku O_2 je zásadně závislá na vápníkových kanálech typu L, tím ovšem není narušen. Snížení parciálního tlaku kyslíku během hypoxických změn bylo signifikantní a podobné v experimentální i kontrolní skupině.

V průběhu hypoxických stimulů došlo k malému, ale statisticky významnému poklesu pH. Není znám přímý efekt malých změn pH na cévní napětí. Bylo však již dříve dokázáno, že na HFPV nemá vliv hyperkapnie (Hampl a spol., 2002), a proto inhibici Ca kanálů typu L působí snížený pO_2 a nikoliv snížené pH.

6.2 Chronická hypoxie zvyšuje odpor a reaktivitu k vasokonstrikčním látkám v cévách placenty laboratorního potkana

Tato studie ukázala, že chronická hypoxie zvyšuje odpor a reaktivitu ve fetoplacentárním cévním řečišti. Přestože se něco takového předpokládá jako jeden z mechanismů vzniku IUGR a někdy i preeklampsie (Myatt, 1992; Poston a spol., 1995; Reynolds a spol., 2006; Brodsky a Christou, 2004), nebyla dosud existence tohoto jevu prokázána. Naše výsledky tedy doplnily předpokládaný řetězec událostí, kdy chronická hypoxie zvyšuje fetoplacentární cévní odpor a tím nadále zhoršuje hypoperfuzi placenty, která se projeví následně nedostatečnou výživou a růstem plodu.

V našich experimentech užíváme pojem „chronický“ pro dobu, již se v humánní medicíně popisuje mnohem delší časový úsek. Dopouštíme se této „nepřesnosti“ s argumentací, že týden hypoxie u potkana představuje plnou třetinu celkové doby gestace. Ekvivalentem u člověka by tedy byl celý poslední trimestr a ten jistě definici chronicity splňuje. Vybrali jsme tuto dobu s ohledem na to, že jsou již vytvořeny všechny orgány a i plně funkční placenta. Naše výsledky odráží tedy spíše vliv hypoxie na již vyvinuté, než na vyvíjející se cévní řečiště. To však nevylučuje možnost ovlivnění funkčního vyžívání těchto cév.

Důležitá je též skutečnost, že pozorované zvýšení cévního odporu fetoplacentárních cév způsobené chronickou hypoxií je trvalé a není možné jej

snížit akutní reoxygenací. Tuto skutečnost odvozujeme z faktu, že křivka vztahu tlak-průtok u chronicky hypoxických placent byla na vyšších tlacích než u kontrol i při normoxické perfuzi.

Relativně vysoká dávka nitroprusidu sodného (SNP) přidaná do perfuzátu nezměnila v experimentální skupině cévní odpor. Toto pozorování naznačuje, že ke zvýšení cévní resistence v chronicky hypoxických placentách, naměřeném za normoxických podmínek, nepřispívá aktivní napětí cévní stěny. Nicméně je pravděpodobné, že *in vivo*, tedy za podstatně nižšího pO_2 , je rozdíl mezi normoxickými a chronicky hypoxickými placentami dále zvyšován přítomností hypoxické vasokonstrikce u chronicky hypoxické skupiny. Ukázali jsme, že hypoxická vasokonstrikční reaktivita je chronickou hypoxií dokonce zvýšená.

Normoxickými (ve skutečnosti ve srovnání se situací *in vivo* spíše hyperoxickými) podmínkami perfuze lze také vysvětlit skutečnost, že rozdíl v rezistenci hypoxických a normoxických placent (ač statisticky významný), byl relativně malý. Předpokládáme, že dalším důvodem může být fakt, že při experimentu byl použit perfuzát o velmi nízké viskozitě (bez přídavku např. dextranu jako v pokusu s lidskou placentou). Díky tomu i rezistence byla nízká a též její změny, číselně vyjádřeny, poměrně malé. V každém případě jsme potvrdili, že chronická hypoxie vede ke zvýšení fetoplacentární cévní resistence, které je (minimálně z části) odolné vůči akutní reoxygenaci a během normoxické (resp. relativně hyperoxické) perfuze i k podaným vasodilatačním látkám. Příčinou zvýšené resistence, naměřené za normoxických podmínek, by pak možná mohla být morfoloická přestavba placentární tkáně.

Vliv chronické hypoxie na morfoloii uteroplacentárního řečiště je poměrně dobře znám (Moore, 2003). Méně se však ví o změnách fetoplacentárního řečiště navozené chronickou hypoxií. Jak bylo řečeno v literárním přehledu, vysoká nadmořská výška slouží v přeneseném slova smyslu jako laboratoř pro zkoumání vlivu chronické hypoxie na člověka. Chronická hypoxie vysoké nadmořské výšky zvyšuje vaskularizaci klků, zvětšuje průměr kapilár v klcích, ztenčuje jejich membránu (Espinosa a spol., 2001; Khalid a spol., 1997; Tissot van Patot a spol., 2004; Zamudio, 2003). O většině z těchto změn by se předpokládalo, že bude spíše snižovat než zvyšovat odpor na kapilární úrovni. Morfoloické změny na úrovni kapilár ovšem nemusí odrážet změny v odporové části řečiště. Např. při

chronické hypoxické plicní hypertenzi je průměr lumen odporových plicních arteriol snížen, navzdory zvýšené kapilární denzitě (Farber a Loscalzo, 2004; McLauhlin a McGoan, 2006).

V této souvislosti je třeba zmínit dosud nepublikované výsledky skupiny doc. MVDr. Vajnera, CSc. z Ústavu histologie a embryologie naší fakulty, na nichž jsem spolupracoval (zejména při přípravě preparátů a některých měřeních). Při těchto experimentech byly březí samice vystaveny posledních 14 dní březosti hypoxii (10% O₂) v normobarické hypoxické komoře. Po vyjmutí z komory 21. den březosti byly samice usmrceny a placenty byly fixovány formolem a histologicky zpracovány.

Počet artérií odstupujících z pupečnickové artérie (chorionic plate artery- CPA) na jednom řezu byl u hypoxických placent statisticky významně redukován jak u samčích, tak samičích placent. V počtu prelabyrintních artérií (intraplacentar artery- IPA) na jednom řezu nedošlo u hypoxických placent ke statisticky významné změně. Vnitřní průměry jak u CPA, tak u IPA byly u hypoxických placent významně menší u obou pohlaví.

U hypoxických placent našla skupina doc. Vajnera v arteriálních stěnách nepravidelné zesílené nebo ztenčené sektory. Zesílené sektory stěny hypoxických IPA byly signifikantně silnější než stěny normoxických artérií, ale pouze u samců. Naproti tomu byly ztenčené sektory stěn IPA signifikantně tenčí v hypoxických placentách, a to u obou pohlaví. U CPA se od kontrol statisticky významně lišila tloušťka pouze ztenčených sektorů u obou pohlaví. Tato morfometrická data jsou konzistentní s našimi fyziologickými závěry a mohla by tedy být minimálně částečným vysvětlením námi pozorovaného zvýšení odporu fetoplacentárního řečiště při chronické hypoxii.

Cílem naší studie bylo prokázání existence zvýšení cévního odporu ve fetoplacentárním řečišti po chronické hypoxii. Pro objasnění mechanismu tohoto jevu bude třeba dalších studií. V této chvíli lze jen na základě paralel (zejména s hypoxickou plicní hypertenzí) uvést několik možných faktorů. Jedná se např. o aktivaci Rho kinasy (Fagan a spol., 2004; Nagaoka a spol., 2004; Stenmark a McMurtry, 2005) nebo depolarizaci buněčné membrány skrze pokles aktivity (resp. exprese) některých draslíkových kanálů (Hampl a spol., 2003; Hong a spol., 2004; Mandegar a Yuan, 2002). Dalším z možných mechanismů je oxidační

postížení cévní stěny kyslíkovými radikály (Lachmanová a spol., 2005; Liu a spol., 2006) a možná oxidem dusnatým (Hampl a spol., 2006; Hampl a Herget, 2000) s následnou akumulací extracelulární matrix (Herget a spol., 2003; Zaidi a spol., 2002), zprostředkovanou částečně žírnými buňkami (Vajner a spol., 2006). Uvažovat lze též i o roli serotoninové signalizace (Bělohávková a spol., 2001; Keegan a spol., 2001; Launay a spol., 2002; Marcos a spol., 2003).

HFPV byla v naší práci poprvé prokázána u jiného druhu než u člověka. Kvalitativně byla odpověď, měřená jako změna perfuzního tlaku za konstantního průtoku, podobná jako v izolovaném kotyledonu lidské placenty (Byrne a spol., 1997; Challis a spol., 2000; Hampl a spol., 2002; Howard a spol., 1987; Ramasubramanian a spol., 2006). V obou pokusech jsme pozorovali pomalý růst tlaku, následovaný víceméně stabilní fází plateau a téměř kompletním návratem k původnímu tlaku po reoxygenaci. Kvantitativně byly odpovědi u kontrolních potkanů relativně menší ve srovnání s předchozími pokusy na izolovaném kotyledonu lidské placenty (Hampl a spol., 2002). Je však nutné zmínit ještě fakt, že se jedná o první záznam HFPV celé placenty a nikoliv jen izolované části a že preparace nebyla ovlivněna porodem, který může být pro placentu relativně traumatický a lze se domýšlet, že v ní může vyvolávat v tuto chvíli neznámé fyziologické změny.

Dalším novým poznatkem této práce je zvýšení vasokonstriční reaktivity placentárních cév v chronické hypoxii a to jak v reakci na ANG II, tak v odpovědi na akutní hypoxický podnět. Odpovědi na ANG II byly u hypoxických zvířat zvýšeny proporcionálně k preexistující úrovni cévního odporu. Z jiných orgánů (např. z plic) je dobře známo, že vasokonstriční reaktivita na ANG II závisí na klidovém tonu cévní stěny. Jak ovšem ukázala reakce na podání SNP v našem pokusu, u chronicky hypoxických placent klidový tonus zvýšený nebyl. Místo zvýšeného klidového tonu lze tedy jako o důvodu zvýšené reaktivity na ANG II uvažovat o zvětšeném množství svalové tkáně v cévní stěně. S ohledem na zmíněný výzkum Vajnera a spol., kdy v placentárním labyrintu nebyla ve stěně cév nalezena téměř žádná svalová vlákna, lze však spíše uvažovat o významu pericytů, které byly u arteriol čteně přítomny. Zvýšení reaktivity na ANG II by mohlo zhoršovat placentární hypoperfuzi a fetální výživu při chronické hypoxii, pokud by současně byla zvýšena koncentrace cirkulujícího ANG II. Nicméně

v případě potkana byla maxima odpovědi na ANG II příliš malá na to, aby se daly čekat nějaké závažnější funkční důsledky. ANG II proto pravděpodobně není ideálním prostředkem pro zkoumání vasoreaktivity ve fetoplacentárních cévách laboratorního potkana.

Na rozdíl od reaktivity na ANG II byla HFPV zvýšena chronickou hypoxií nejen absolutně, ale i relativně. To implikuje, že působení chronické hypoxie na tyto dva vasokonstriční mechanismy se liší. Mechanismus HFPV zahrnuje inhibici draslíkových kanálů (Hampl a spol., 2002), depolarizaci membrány a, jak jsme dokázali v první části této disertace, otevření vápníkových kanálů typu L. Možná je také účast NO signalizace (Byrne a spol., 1997).

Metodologicky je práce s placentou potkana, stejně jako studie na lidské placentě, limitována praktickou nemožností dosáhnout podobně nízkého pO_2 , jaké má plod v děloze - okolo 30 mmHg (Abman a spol., 1987; Alonso a spol., 1987; Jackson a spol., 1987; Kitanaka a spol., 1989; Rurak a spol., 1990 a; Rurak a spol., 1990 b; Sherman a spol., 1991). Příčinou je difuze molekul kyslíku skrze stěny hadiček, které zejména v tomto velmi malém preparátu musí být značně subtilní. Dýchání hypoxické směsi matkou snížilo fetální arteriální pO_2 *in vivo* u různých druhů (hlavně ovcí) o 25-30% (Abman a spol., 1987; Alonso a spol., 1987; Jackson a spol.; 1987; Kitanaka a spol., 1989; Rurak a spol., 1990 a; Rurak a spol., 1990 b; Sherman a spol., 1991). V našich pokusech představoval hypoxický podnět snížení pO_2 o 30%. V tomto smyslu šlo tedy o fyziologicky relevantní podnět.

7. Závěr

Experimenty popsané v této disertační práci přinesly tyto nové poznatky:

- 1) Napěťově řízené vápníkové kanály jsou esenciální pro HFPV. Toto zjištění doplňuje předpokládaný řetězec dějů při HFPV v tom smyslu, že v důsledku hypoxické inhibice draslíkových kanálů dojde k depolarizaci membrány, což představuje potřebný stimulus k otevření napěťově řízených vápníkových kanálů. Následuje influx vápenatých iontů, které (případně posíleny o sekundární uvolnění Ca ze sarkoplasmatického retikula) aktivují kontraktilní aparát buňky. Ten pak je efektoem HFPV.
- 2) Chronická hypoxie zvyšuje odpor fetoplacentárního cévního řečiště v placentě laboratorního potkana. Toto zvýšení je rezistentní vůči reoxygenaci a - alespoň během normoxické perfuze - se na něm nepodílí zvýšený cévní tonus.
- 3) Chronická hypoxie zvyšuje reaktivitu na ANG II a zejména na akutní hypoxické podněty.

Je pravděpodobné, že námi popsané změny při chronické hypoxii mohou vést k hypoperfuzi placenty a následně k nedostatečné výživě plodu. Ta je pak příčinou jeho nedostatečného růstu a podkladem klinických jednotek jako např. IUGR.

8. Literatura

Abman SH, Accurso FJ, Wilkening RB, and Meschia G. Persistent fetal pulmonary hypoperfusion after acute hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 253: H941-948, 1987.

Alonso JG, Okai T, Longo LD, and Gilbert RD. Cardiac function during long-term hypoxemia in fetal sheep. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 257: H581-589, 1989.

Aplin JD. Hypoxia and human placental development. *J Clin Invest* 105: 559-560, 2000.

Archer SL, Huang JMC, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, and Weir EK. Differential Distribution of Electrophysiologically Distinct Myocytes in Conduit and Resistance Arteries Determines Their Response to Nitric Oxide and Hypoxia. *Circ Res* 78: 431-442, 1996.

Bachmaier N, Linnemann K, May K, Warzok R, Kuno S, Niemeyer M, Balk S, and Fusch C. Ultrastructure of human placental tissue after 6 h of normoxic and hypoxic dual in vitro placental perfusion. *Placenta* 28: 861-867, 2007.

Belohlavkova S, Simak J, Kokesova A, Hnilickova O, and Hampl V. Fenfluramine-induced pulmonary vasoconstriction: role of serotonin receptors and potassium channels. *J Appl Physiol* 91: 755-761, 2001.

Brodsky D and Christou H. Current Concepts in Intrauterine Growth Restriction. *J Intensive Care Med* 19: 307-319, 2004.

Byrne BM, Howard RB, Morrow RJ, Whiteley KJ, and Adamson SL. Role of the -arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction. *Placenta* 18: 627-634, 1997

Catterall WA and Gutman G. Introduction to the IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels 2005. *Pharmacol Rev* 57: 385-, 2005.

Davidson D, Stalcup SA, and Mellins RB. Angiotensin-converting enzyme activity and its modulation by oxygen tension in the guinea pig fetal-placental unit

[retracted by Stalcup SA, Lipset JS, Oday CE, Goodfriend TL, Davidson D, Pang LM, Mellins RB. In: *Circ Res* 1985 Oct;57(4):646]. *Circ Res* 48: 286-291, 1981.

Enders AC, and Blankenship TN. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev* 38: 3-15, 1999.

Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, and McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L656-664, 2004.

Espinoza J, Sebire NJ, McAuliffe F, Krampfl E, and Nicolaides KH. Placental Villus Morphology in Relation to Maternal Hypoxia at High Altitude. *Placenta* 22:606-608, 2001.

Farber HW and Loscalzo J. Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 351: 1655-1665, 2004.

Fox SB and Khong TY. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta* 11: 59-62, 1990.

Fox H. Pathology of the Placenta, Second Edition. London: W.B. Saunders, 1997

Fryer BH, and Simon MC. Hypoxia, HIF and the placenta. *Cell Cycle* 5: 495-498, 2006.

Gomella TL, Neonatology 5 th edition, Lange, 2004

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, and Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* 57: 473-508, 2005.

Hampfl V and Herget J. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension. *Physiol Rev* 80: 1337-1372, 2000.

Hampfl V, Bibova J, Stranak Z, Wu X, Michelakis ED, Hashimoto K, and Archer SL. Hypoxic fetoplacental vasoconstriction in humans is mediated by potassium channel inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2440-2449, 2002.

Hampfl V, Bibova J, Povysilova V, and Herget J. Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* 21: 862-865, 2003.

- HampI V, Bibova J, Banasova A, Uhlik J, Mikova D, Hnilickova O, Lachmanova V, and Herget J.** Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L11-20, 2006.
- Herget J, Novotna J, Bibova J, Povysilova V, Vankova M, and HampI V.** Metalloproteinase inhibition by Batimastat attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L199-208, 2003.
- Hong Z, Weir EK, Nelson DP, and Olschewski A.** Subacute Hypoxia Decreases Voltage-Activated Potassium Channel Expression and Function in Pulmonary Artery Myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 337-343, 2004.
- Howard RB.** Control of human placental blood flow. *Medical Hypotheses* 23: 51-58, 1987
- Challis DE, Pfarrer CD, Ritchie JW, Koren G, and Adamson SL.** Glucose metabolism is elevated and vascular resistance and maternofetal transfer is normal in perfused placental cotyledons from severely growth-restricted fetuses. *Pediatr Res* 47: 309-315, 2000
- Ireland R, Abbas A, Thilaganathan B, Melbye O, Snjiders R, Layton M, and Nicolaidis KH.** Fetal and maternal erythropoietin levels in normal pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 7: 21-25, 1992.
- Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX, and Hume JR.** Prominent role of intracellular Ca²⁺ release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 122: 21-30, 1997.
- Jackson BT, Piasecki GJ, and Novy MJ.** Fetal responses to altered maternal oxygenation in rhesus monkey. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 252: R94-101, 1987.
- Jain V, Lim M, Longo M, and Fisk NM.** Inhibitory effect of erythropoietin on contractility of human chorionic plate vessels. *Am J Obstet Gynecol* 194:246,2006.
- Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, and MacLean MR.** Contribution of the 5-HT_{1B} Receptor to Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension: Converging Evidence Using 5-HT_{1B}-Receptor Knockout Mice and the 5-HT_{1B/1D}-Receptor Antagonist GR127935. *Circ Res* 89: 1231-1239, 2001.
- Khalid ME, Ali ME, and Ali KZ.** Full-term birth weight and placental morphology at high and low altitude. *Int J Gynaecol Obstet* 57: 259-265, 1997.

Kitanaka T, Alonso JG, Gilbert RD, Siu BL, Clemons GK, and Longo LD. Fetal responses to long-term hypoxemia in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 256: R1348-1354, 1989.

Kunichika N, Yu Y, Remillard CV, Platoshyn O, Zhang S, and Yuan JXJ. Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L962-969, 2004.

Lachmanova V, Hnilickova O, Povysilova V, Hampl V, and Herget J. N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 77: 175-182, 2005.

Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, and Maroteaux L. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 8: 1129-1135, 2002.

Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JSK, and Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L2-10, 2006.

Mateev S, Sillau AH, Mouser R, McCullough RE, White MM, Young DA, and Moore LG. Chronic hypoxia opposes pregnancy-induced increase in uterine artery vasodilator response to flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H820-H829, 2003.

Mandegar M and Yuan JX. Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol* 38: 25-33, 2002.

Marcos E, Adnot S, Pham MH, Nosjean A, Raffestin B, Hamon M, and Eddahibi S. Serotonin Transporter Inhibitors Protect against Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 487-493, 2003.

McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, and Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 74: 365-507, 1994.

McLaughlin VV and McGoon MD. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 114: 1417-1431, 2006.

McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, and Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* 38: 99-104, 1976.

Moore LG. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy. *High Alt Med Biol* 4: 141-156, 2003

Morio Y and McMurtry IF. Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J Appl Physiol* 92: 527-534, 2002.

Mossman HW, Vertebrate Fetal Membranes, Rutgers, New Brunswick, 1987.

Moudgil R, Michelakis ED, and Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 98: 390-403, 2005.

Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, and Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 12: 167-172, 1997.

Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I, and Oka M. Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L665-672, 2004.

Parekh AB and Putney JW, Jr. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 85: 757-810, 2005.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, and Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74: 595-636, 1994.

Post JM, Gelband CH, and Hume JR. [Ca²⁺]_i Inhibition of K⁺ Channels in Canine Pulmonary Artery : Novel Mechanism for Hypoxia-Induced Membrane Depolarization. *Circ Res* 77: 131-139, 1995.

Poston L, McCarthy AL, and Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and fetoplacental arterial beds. *Pharmacology & Therapeutics* 65: 215-239, 1995.

Ramasubramanian R, Johnson RF, Downing JW, Minzter BH, and Paschall RL. Hypoxemic Fetoplacental Vasoconstriction: A Graduated Response to Reduced Oxygen Conditions in the Human Placenta. *Anesth Analg* 103: 439-442, 2006.

Resta L, Capobianco C, Marzullo A, Piscitelli D, Sanguedolce F, Schena FP, and Gesualdo L. Confocal laser scanning microscope study of terminal villi vessels in normal term and pre-eclamptic placentas. *Placenta* 27: 735-739, 2006.

Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G, and Spencer TE. Evidence for

altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol* 572: 51-58, 2006.

Rodesch F, Simon P, Donner C, and Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80: 283-285, 1992.

Rurak DW, Richardson BS, Patrick JE, Carmichael L, and Homan J. Oxygen consumption in the fetal lamb during sustained hypoxemia with progressive acidemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R1108-1115, 1990 a.

Rurak DW, Richardson BS, Patrick JE, Carmichael L, and Homan J. Blood flow and oxygen delivery to fetal organs and tissues during sustained hypoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R1116-1122, 1990 b.

Salvatera CG and Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 264: L323-328, 1993.

Sherman DJ, Ross MG, Day L, Humme J, and Ervin MG. Fetal swallowing: response to graded maternal hypoxemia. *J Appl Physiol* 71: 1856-1861, 1991

Schaffer L, Vogel J, Breymann C, Gassmann M, and Marti HH. Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R844-851, 2006.

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, and Caniggia I. Molecular Evidence of Placental Hypoxia in Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4299-4308, 2005.

Stenmark KR and McMurtry IF. Vascular Remodeling Versus Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension: A Time for Reappraisal? *Circ Res* 97: 95-98, 2005.

Talbert D and Sebire NJ. The dynamic placenta: I. Hypothetical model of a placental mechanism matching local fetal blood flow to local intervillous oxygen delivery. *Med Hypotheses* 62: 511-519, 2004.

Tissot van Patot M, Grilli A, Chapman P, Broad E, Tyson W, Heller DS, Zwerdinger L, and Zamudio S. Remodelling of uteroplacental arteries is decreased in high altitude placentae. *Placenta* 24: 326-335, 2003.

Tissot van Patot MC, Bendrick-Peart J, Beckey VE, Serkova N, and Zwerdinger L. Greater vascularity, lowered HIF-1/DNA binding, and elevated

GSH as markers of adaptation to in vivo chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L525-532, 2004.

Thaete LG, Jilling T, Synowiec S, Khan S, and Neerhof MG. Expression of Endothelin 1 and Its Receptors in the Hypoxic Pregnant Rat. *Biol Reprod* 77: 526-532, 2007.

Vajner Lk, Vytášek R, Lachmanová V, Uhlík J, Konrádová V, Novotná J, Hampel V, and Herget J. Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their MMP-13 expression in rats. *International Journal of Experimental Pathology* 87: 383-391, 2006.

Wareing M, and Baker PN. Vasoconstriction of small arteries isolated from the human placental chorionic plate in normal and compromised pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 23: 237-246, 2004.

Wareing M, Bai X, Seghier F, Turner CM, Greenwood SL, Baker PN, TaggartMJ, and Fyfe GK. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R437-446, 2006a.

Wareing M, Greenwood SL, Fyfe GK, Baker PN, and Taggart MJ. Glibenclamide inhibits agonist-induced vasoconstriction of placental chorionic plate arteries. *Placenta* 27: 660-668, 2006b.

Wareing M, Greenwood SL, Fyfe GK, and Baker PN. Reactivity of Human Placental Chorionic Plate Vessels from Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *Biol Reprod* 75: 518-523, 2006c.

Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, and Wulff H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* 57: 463-472, 2005. **Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, and Sperelakis N.** ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C25-37, 1998.

Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, and Catterall WA. Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol Rev* 57: 387-395, 2005.

Zaidi SHE, You X-M, Ciura S, Husain M, and Rabinovitch M. Overexpression of the Serine Elastase Inhibitor Elafin Protects Transgenic Mice From Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Circulation* 105: 516-521, 2002.

Zamudio S, Palmer SK, Droma T, Stamm E, Coffin C, and Moore LG. Effect of altitude on uterine artery blood flow during normal pregnancy. *J Appl Physiol* 79: 7-14, 1995

Zamudio S. The placenta at high altitude. *High Alt Med Biol* 4: 171-191, 2003.

Zamudio S, Kovalenko O, Vanderlelie J, Illsley NP, Heller D, Belliappa S, and Perkins AV. Chronic hypoxia in vivo reduces placental oxidative stress. *Placenta* 28: 846-853, 2007

Seznam publikací

Původní publikace

Jakoubek V, Bibova J, and Hampl V. Voltage-gated calcium channels mediate hypoxic vasoconstriction in the human placenta. *Placenta* 27: 1030-1033, 2006.
IF 3,23

Jakoubek V, Bibova J, Herget J, and Hampl V. Chronic hypoxia increases fetoplacental vascular resistance and vasoconstrictor reactivity in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1638-1644, 2008.
IF 3,97

Abstrakta

Jakoubek V, Bibova J, Venclikova K, and Hampl V. Chronic Hypoxia Elevates Fetoplacental Vascular Resistance. *FASEB J* 20: A1217-c-, 2006.

Jakoubek V, Bibova J, Venclikova K, and Hampl V. Chronic Hypoxia Increases Fetoplacental Vascular Reactivity *FASEB J* 21: A1287, 2007.

PŘÍLOHY