

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Hana Mrázková

**Role volných kyslíkových radikálů v ischemicko – reperfučním poškození
při plicní transplantaci a možnosti prevence radikálového poškození**

*Ischemia-reperfusion injury in lungs after transplantation and the role of radical oxygen
species*

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

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

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

V Praze, 01. 10. 2016

HANA MRÁZKOVÁ

Podpis

Identifikační záznam

MRAZKOVA, Hana. *Role volných kyslíkových radikálů v ischemicko – reperfučním poškození při plicní transplantaci a možnosti prevence radikálového poškození [Ischemia-reperfusion injury in lungs after transplantation and the role of radical oxygen species]*. Praha, 2016. Počet stran: 72, počet příloh:3. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. chirurgická klinika 1. LF UK a FN Motol, Školitel: Lischke, Robert.

Poděkování

Na počátku této práce bych chtěla poděkovat a vyjádřit velkou úctu panu profesoru MUDr. J. Hergetovi, DrSc., který mi pomohl projít všemi taji a kouty vědecké práce. Jeho laskavost, ochota a neuvěřitelný rozhled mi pomohly dojít až sem a umožnily mi pokus o proniknutí do světa vědy.

Stejně bych chtěla poděkovat i celému týmu laborantů Fyziologického ústavu 2. LF UK, kteří mi pomáhali na cestě laboratorních dovedností a často se na mé práci i sami podíleli.

Díky patří i celému týmu lékařů a sester III. chirurgické kliniky 1. LF UK a FNM včele s jejím přednostou a školitelem mého MD PhD programu prof. MUDr. R. Lischkemu, PhD a emeritnímu přednostovi kliniky prof. MUDr. P. Pafkovi, DrSc.

V neposlední řadě je třeba zmínit i velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mne podporovali po celou dobu studia a vědecké práce ať už citově, morálně či finančně.

Děkuji!

Obsah

Prohlášení	2
Identifikační záznam	3
Poděkování.....	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt.....	8
Abstract.....	9
1 TEORETICKÝ ÚVOD	10
1.1 Historie a úvod do transplantace plic	10
1.2 Transplantace plic od dárců s nebijícím srdcem, Ex vivo rekondice plic	12
1.3 Ischemicko- reperfuční poškození plic	16
1.3.1 Role volných kyslíkových radikálů	18
1.3.2 Vliv hyperkapnie na radikálové poškození.....	22
1.3.3 Vliv pohlaví na radikálové poškození	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE.....	28
2.1 Úvod a hypotézy	28
2.2 Protektivní vliv hyperkapnie na ischemicko-reperfuční poškození plic při EVLP na zvířecím modelu	29
2.2.1 Cíle studie	29
2.2.2 Metodika a materiál.....	30
2.2.3 Výsledky	36
2.2.4 Diskuze	41

2.3	Vliv pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP na zvířecím modelu.....	46
2.3.1	Cíle studie	46
2.3.2	Metodika a materiál.....	47
2.3.3	Výsledky	51
2.3.4	Diskuze	54
3	ZÁVĚR.....	58
4	SUMMARY.....	61
5	REFERENCE	65

Seznam použitých zkratk

ANOVA	Analysis of Variance (analýsa rozptylu)
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
ATP	adenosintrifosfát
CF	cystická fibróza
CFTR	chloride channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CO ₂	oxid uhličitý
COPD	chronická obstrukční plicní nemoc
DCDs	death cadaveric donors
ENaC	epithelial sodium channel
eNOS	endoteliální NO syntáza
ER-alfa/beta	estrogenové receptory-alfa/beta
EVLP	ex vivo lung perfusion
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
iNOS	inducibilní NO syntáza
IPF	idiopatická plicní fibróza
IR poškození	ischemicko-reperfúzní poškození
ISHLT	the International Society for Heart and Lung Transplantation
LAM	lymfangioliomyomatóza
NHBDs	non-heart-beating donors (dárce s nebijícím srdcem)
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PAH	emfyzém při alfa-1 deficitu antitrypsinu a plicní arteriální hypertenze
PAI-1	inhibitor-1 tkáňového faktoru plasminogenu
ROI	reactive oxygen intermediates
ROS	radical oxygen species

Abstrakt

- **Klíčová slova:** Tx plic, EVLP, NHBD, IR poškození, ROS, hyperkapnie, genderové rozdíly

Tato disertační práce se zabývá velmi aktuální otázkou nedostatku dárcovských orgánů pro transplantace plic. Stejně jako u ostatních orgánů i zde se neustále zvyšuje množství pacientů v terminálních stádiích onemocnění na čekacích listinách, ale nedochází k adekvátnímu navýšení dárcovských orgánů.

V naší experimentální práci jsme se zaměřili na rozvoj výzkumu řešení, které se z dlouhodobého hlediska zdá jako nejúspěšnější a tím je transplantace orgánů od dárce s nebijícím srdcem (NHBDs) v protokolu ex vivo transplantace plic (EVLP) na zvířecím modelu (potkan kmene Wistar). Jedná se o metodu světově klinicky již zavedenou (v ČR jen experimentálně), která je neustále předmětem dalšího výzkumu.

Na podkladě dříve prováděných studií jsme se v první experimentální části práce zaměřili na možný **protektivní vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní (IR) poškození plic** při EVLP. Studie prokázala, že hyperkapnická ventilace má protektivní vliv na vznik volných kyslíkových radikálů (ROS) u IR poškození plic, ale pouze pokud je využita v období reperfúze.

Ve druhé experimentální studii jsme navázali na velmi aktuální téma **vlivu pohlaví na IR poškození plic** při EVLP u dárce s nebijícím srdcem. I zde jsme naplnili předpokládané hypotézy, že plíce samic jsou odolnější vůči IR poškození oproti plicím experimentálních samců.

Výsledky obou studií jsou významné z hlediska dalšího rozvoje metody EVLP a klinické aplikace výsledků. Ať už se jedná o benefit pro pacienta ve smyslu navýšení množství dárcovských orgánů, krátkodobého i dlouhodobého prospívání štěpu či volby vhodných dárců.

Abstract

- **Keywords:** Lung Tx, EVLP, NHBD, IR injury, ROS, hypercapnia, gender differences

This dissertation thesis deals with a very topical issue of the lack of donor organs for lung transplants. As with other organs, the number of patients on waiting lists in terminal stages of their diseases is also constantly rising but there is not an adequate increase in donor organs.

We focused our experimental work on the development of research concerning the solution which is most successful in a long-term perspective, i.e. organ transplants from non-heart-beating donors (NHBDs), in an *ex vivo* lung transplant protocol (EVLP) on an animal model (Wistar rats). This is a method which is clinically established worldwide (in the Czech Republic only experimentally) and is constantly subject to further research.

Based on earlier studies, we focused the first experimental part of this work on the potential **protective effect of hypercapnic ventilation on ischemia-reperfusion (IR) lung injury** in EVLP. The study proved that the hypercapnic ventilation has a protective effect on the generation of reactive oxygen species (ROS) in IR lung injury, but only when used in the period of reperfusion.

In the second experimental study, we followed up a very topical issue of **the effect of gender on IR lung injury** in EVLP in non-heart-beating donors. Also, here the hypotheses that female lungs are more resistant to IR lung injury than the lungs of experimental males were confirmed.

The results of both studies are significant in terms of further development of EVLP method and clinical application of results. Either it is a benefit for a patient in terms of the increase in the number of donor organs or short- and long-term thriving of the graft or selection of suitable donors.

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Historie a úvod do transplantace plic

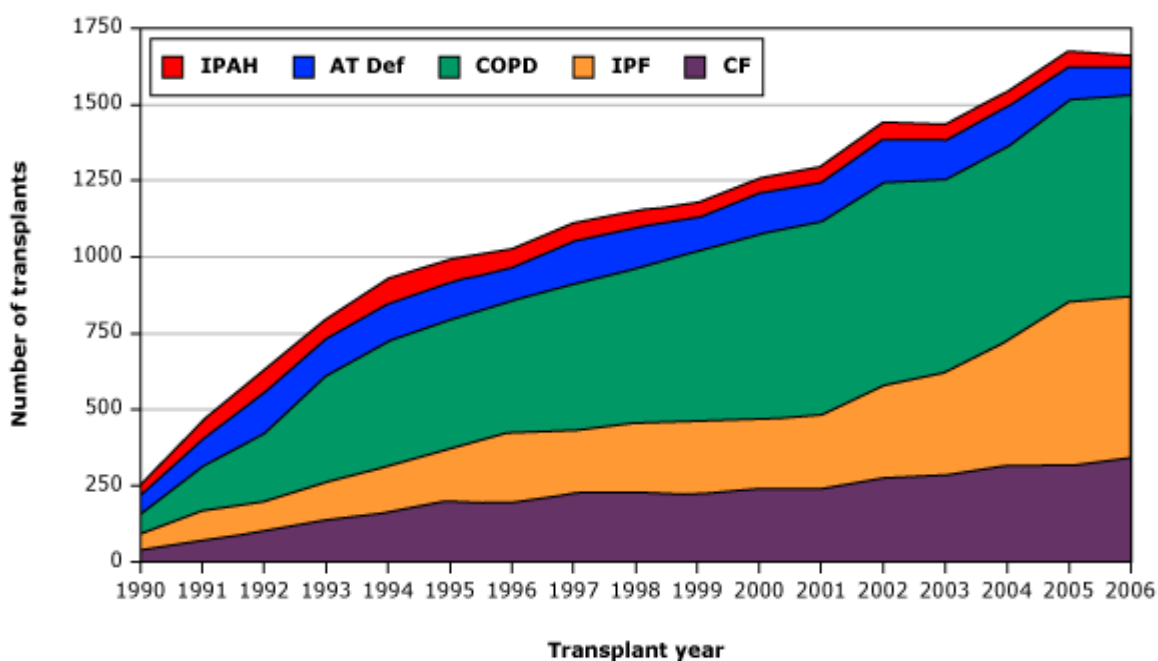
Během posledních 25 let se transplantace plic stala léčebnou metodou pro terminální fázi mnohých závažných plicních onemocnění. První transplantace plic byla ale provedena již v roce 1963, kdy příjemce orgánu podlehl 18 dní od operace renálního selhání a malnutrici (Hardy JD. et al., 1963). Během dalších 15 let bylo provedeno mnoho pokusů o plicní transplantaci, jež vedly k úmrtí pacientů nejčastěji pro komplikace bronchiálních anastomóz. První úspěšná transplantace bloku srdce-plice byla zaznamenána v roce 1981 pro idiopatickou plicní hypertenzi (Reitz BA. et al., 1982) a první oboustranná transplantace plic v roce 1986 pro plicní emfyzém (Patterson, GA. et al., 1990).

Úspěšnost transplantací se zvyšovala během dalších let na podkladě rozvoje chirurgických technik, uchování orgánů, vývoje diagnostiky i pooperační péče včetně objevení imunosupresivní terapie. Celosvětově se výrazně navyšoval počet transplantací mezi lety 1988 a 1993, kdy z 89 transplantačních operací se počet zvýšil na 1160 ročně a v roce 2012 se celosvětové počty transplantací plic udávaly již okolo 3700 ročně dle Registru mezinárodní společnosti pro transplantace srdce a plic – ISHLT (the International Society for Heart and Lung Transplantation) (Yusen RD. et al., 2015).

Hlavním limitujícím faktorem počtu transplantací byl a je nedostatek dárců. Zatímco počet pacientů indikovaných k transplantaci plic rychle vzrůstá, množství dárců zůstává stejné (Cypel M., 2009). Nejběžnější indikací pro transplantaci plic jsou chronická obstrukční plicní nemoc (COPD), idiopatická plicní fibróza (IPF), cystická fibróza (CF), emfyzém při alfa-1 deficitu antitrypsinu a plicní arteriální hypertenze (PAH) (Yusen RD. et al., 2015). Tyto indikace tvoří asi 85 % všech zákroků na celém světě. Zbývajících 15 % jsou různé diagnózy

v konečném stádiu jako sarkoidóza, lymfangioleiomyomatóza (LAM) nebo histiocytosa Langerhansových buněk (Shorr AF. et al., 2003; Pechet TT. et al., 2004; Dauriat G. et al., 2006) – viz obr. 1.1.

Podle zprávy Registru ISHLT 2014, byl medián přežití pro všechny dospělé příjemce 5,7 let. Příjemci po bilaterální transplantaci plic mají lepší medián přežití než příjemci po jednostranné transplantaci plic (7 let oproti 4, 5 roku) (Yusen RD. et al., 2015).



Obrázek 1. 1. : Celosvětový vývoj indikací k transplantacím plic 1990-2006 (Christie, JD. et al, 2008)
IPAH: idiopatická plicní hypertenze; AT Def: emfyzem při deficitu alpha-1 antitrypsin; COPD: chronická plicní obstrukční nemoc; IPF: idiopatická plicní fibrosa; CF: cystická fibrosa.

V České republice je jediným transplantačním centrem pro transplantace plic III. chirurgická klinika 1. LF University Karlovy a FN Motol. Zde byla první transplantace provedena pod vedením Prof. Pavla Pafka roku 1997. Do dnešního dne bylo na klinice transplantováno již více než 330 pacientů a byly provedeny i 2 transplantace bloku srdce-plíce

ve spolupráci s IKEM (Institut klinické a experimentální medicíny). Současně je nutno zmínit i úspěch v podobě provedení již 2 plicních retransplantací.

1.2 Transplantace plic od dárců s nebijícím srdcem, Ex vivo rekondice plic

Vzhledem k již zmíněnému nedostatku vhodných orgánů k transplantaci je logickým vývojem hledání alternativních strategií, které by vedly k rozšíření skupiny dárců. Oto T., 2008 udává, že 70 až 85 % plic u multiorgánových dárců nespĺňuje kritéria pro transplantaci. Inci I. et al., 2007 uvádí, že mortalita pacientů na čekacích listinách je až 30%.

Strategie navyšování množství vhodných dárců k transplantaci plic tak zahrnují například příbuzenské transplantace plicních laloků od živého dárce, schválení tzv. marginálních dárců, kde parametry pro transplantaci jsou splněny zcela hraničně, nebo využití plic z jednoho dárce pro více vzrůstově menších příjemců – lobární transplantace apod.

Jedním z alternativních zdrojů řešení je i **použití orgánů získaných po srdeční zástavě od dárců s nebijícím srdcem- NHBDs** (non-heart-beating donors) (Oto T., 2008). V novější literatuře se dnes spíše užívá výrazu DCDs (death cadaveric donors), ale vzhledem k zachování terminologie použité v našich publikacích, budeme nadále v této práci užívat termínu NHBD.

Uvádí se, že v západním světě je až 1/3 všech úmrtí způsobená ischemickou chorobou srdeční a až 375 000 lidí umírá jen v Evropě na infarkt myokardu (Inci I. et al., 2007). Myšlenka využití těchto zemřelých jako potencionálních dárců pro transplantace plic by mohla vést k výraznému navýšení množství orgánů k transplantaci.

Rozhodující rozdíl mezi běžně používanou transplantační technikou a transplantací od dárce s nebijícím srdcem je v trvání období tzv. teplé ischemie. To je doba od zástavy oběhu, kdy v orgánu neprobíhá perfúze okysličenou krví a je ponechán v pokojové teplotě (Levey BJ.

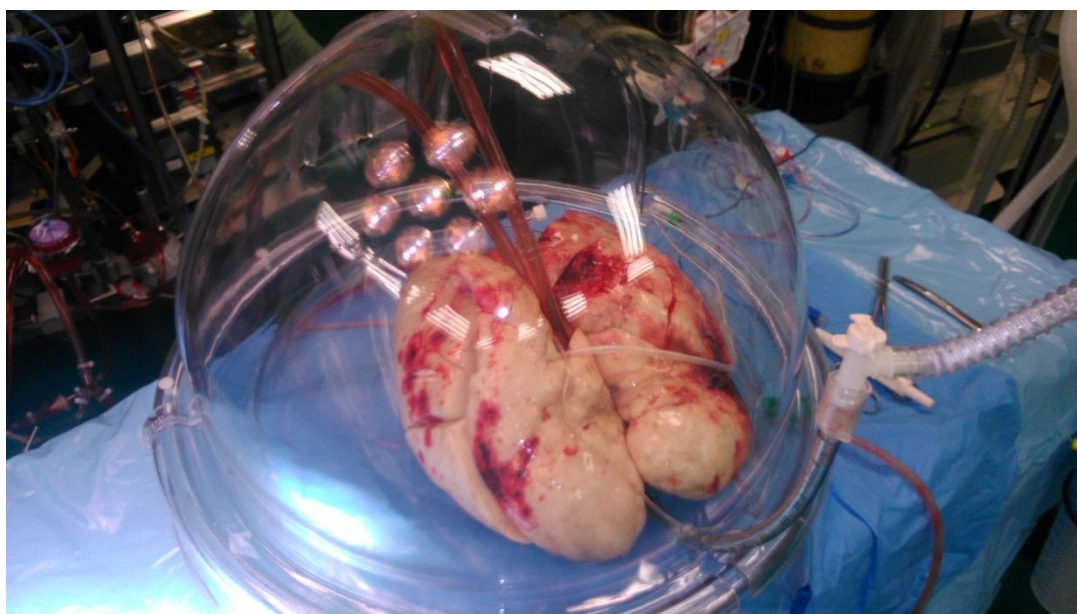
et al., 2008). Při standardním transplantačním postupu je období teplé ischemie omezeno na několik minut při odběru orgánu (naložení chirurgické svorky na orgán) a ten je následně zchlazen uložením do chladného konzervačního roztoku o teplotě 4-8°C (označováno jako období studené ischemie). Zde mohou být plíce uchovány ve funkčně dobrém stavu i několik hodin, vzhledem k výrazně sníženým metabolickým dějům (Hodyc D. et al., 2008). Dostupné studie ukazují, že akceptovatelná doba teplé ischemie je 60-90minut a následná ex vivo perfúze plic může mít vliv na výrazné zlepšení funkcí štěpu (De Vleeschauwer S. et al., 2009). Vlastní doba teplé ischemie se odvíjí od kategorie dárce s nebijícím srdcem. NHBDs jsou klasifikováni jako nekontrolovaní a kontrolovaní dárce. Nekontrolovaní dárce jsou zemřelí při příjezdu do nemocničního zařízení (kategorie I.) nebo měli neúspěšnou resuscitaci (kategorie II.). Doba teplé ischemie se tedy dá ovlivnit minimálně. Kontrolovaní dárce mají očekávanou srdeční zástavu (kategorie III.) nebo dojde k srdeční zástavě při ověřování mozkové smrti (kategorie IV.). Délka období teplé ischemie je u těchto kategorií značně ovlivnitelná. (De Vleeschauwer S. et al., 2009).

Normoxická ex vivo perfúze plic (ex vivo lung perfusion-EVLP) je jednou z novějších strategií pro uchování a posouzení životaschopnosti plic primárně kontraindikovaných k transplantaci, nejčastěji u dárce s nebijícím srdcem. Při této metodě je blok srdce-plíce perfundován a ventilován mimo tělo dárce i příjemce. Výhodou oproti studené ischemii je zachování metabolické aktivity v orgánu a dále možnost transplantace a zhodnocení plic od dárce s nebijícím srdcem kategorie I. a II.

Alexis Carrel a Charles Lindbergh první normoxickou ex vivo perfúzi orgánu zdokumentovali již v roce 1935 a prokázali tak, že orgány zůstávají životaschopné i po dobu několika dnů. (Carrel A. et Lindbergh C. A., 1935).

Konkrétní postup odběru a transplantace plic po srdeční zástavě byl navržen a následně i experimentálně proveden Thomasem Eganem v roce 1991. (Egan TM. et al., 1991^{a,b}; Egan TM. et al., 1992)

Vlastní koncept EVLP byl popsán v klinickém experimentu profesorem Stingem Steenem, který v roce 2001 transplantoval ve Švédsku lidskému pacientovi plíce od pacienta po srdeční zástavě. (Steen S. et al., 2001) Tento jedinečný případ prokázal, že plíce mohou být úspěšně transplantovány po vystavení teplé ischemii a ex vivo perfúzi. Následná experimentální práce stimulovala a inspirovala mnoho výzkumných skupin na celém světě, včetně týmu na naší klinice a vedla k dalším výzkumům potenciální role EVLP jako metody zvýšení počtu vhodných plicních štěpů, snížení výskytu primární a pozdní dysfunkce štěpu a ke zlepšení celkových výsledků po plicní transplantaci. (Raemdonck D. et al., 2015)



Obrázek 1.2 : EVLP III. chirurgická klinika 1. LF UK a FNM (9.2013), foto: H. Mrázková

Dnes je nejužívanější technikou acelulární EVLP, která může udržovat plicní štěp po dobu až 12 hodin při teplotě těla bez vyvolání poranění. (Cypel M. et al, 2012) Při této metodě se plíce propláchnou studeným roztokem Perfadex k přepravě a po příjezdu do transplantačního centra jsou umístěny v EVLP komoře. Po kanylaci plicní tepny a levé síně, je anterográdním tokem zahájena reperfúze s perfúzátem odpovídajícím teplotě okolí. Teplota se postupně zvyšuje na 37 ° C. Při dosažení 32°C je zahájena ventilace s dechovým objemem 7 ml / kg a 7 dechů / min – viz obr. 1. 2.

Největší retrospektivní dostupná studie o této technice srovnává 63 příjemců EVLP ošetřených štěpů s 340 příjemci konvenčně obhospodařovaných dárcovských štěpů. (Tikkanen JM. et al, 2015) Přežívání příjemců po transplantaci štěpů po EVLP a konvenčních dárců plic bylo 79 ve srovnání s 85 procenty v prvním roce, 71 proti 73 procentům po třech letech a 58 proti 57 procentům na pět let.

1.3 Ischemicko- reperfuční poškození plic

Během období teplé ischemie, kdy orgán není ventilován ani perfundován a následně je vystaven reperfúzi, dochází k poškození plic způsobenému různými mechanismy. Tyto zahrnují následky molekulární a buněčné a mohou vést k akutní dysfunkci štěpu u příjemce.

K nejvýznamnějším příčinám poškození řadíme:

- **Zvýšená exprese adhezivních molekul**, která může přispět k akutnímu plicnímu selhání. Důkaz pro up-regulaci adhezivních molekul pochází z prospektivní studie 128 pacientů po transplantaci plic. (Covarrubias M. et al., 2007)
- **Protrombotický stav** - hypoxie v průběhu ischemie indukuje endotelové buňky k rozvoji prokoagulačního stavu, včetně up-regulace inhibitoru-1 tkáňového faktoru plasminogenu (PAI-1), které přispívají k mikrovaskulární trombóze a brání průtoku mikrocirkulace krve po reperfúzi. (Pinsky DJ. et al, 1998)
- **Lipidy zprostředkované buněčné zranění** - aktivace fosfolipázy A2 indukuje produkci faktoru aktivujícího krevní destičky, což je silný mediátor zánětu.
- **Uvolňování prozánětlivých mediátorů** - ischemicko-reperfuční poškození indukuje uvolňování prozánětlivých cytokinů, včetně chemokinu IL-8, což negativně koreluje s funkcí štěpu. (De Perrot M. et al., 2002)
- **Uvolňování markerů poškozujících epitel alveolů** - plazmatické hladiny těchto markerů jsou zvýšeny na 6 až 24 hodin po transplantaci plic a zdají se korelovat s poraněním buněk alveolárního typu I. (Christie JD. et al., 2009)

- **Aktivace endothelinu** – působí jako silný vasokonstriktor a současně endothelin-1 může stimulovat produkci cytokinů monocyty a makrofágy. Rovněž podporuje sdružování neutrofilů do plic. (Sato Y. et al., 2000)
- **Aktivace komplementu** – produkty aktivace komplementu způsobí kontrakce hladkého svalstva a tím zvýšenou vaskulární permeabilitu. Kromě toho je aktivován fragment C5a zesilující zánětlivou reakci prostřednictvím svých chemotaktických vlastností. (Ivey CL. et al., 1995)
- **Aktivace leukocytů** – k ischemicko-reperfúznímu poškození dochází dvoufázově. Dárcovské makrofágy jsou aktivovány během ischemie a zprostředkují ranou fázi reperfúzního poškození, zatímco neutrofilů a lymfocytů příjemce se podílí na pozdní fázi reperfúzního poškození. (Fisher SM. et al., 2001; Eppinger MJ. et al., 1997)

Rozdíl mezi ischemicko-reperfúzním poškození u plic oproti jiným orgánům spočívá v možnosti udržení dostatečné tkáňové oxygenace a tak aerobního metabolismu i určitou dobu po zástavě perfúze. (Binns OA. et al., 1996; Hodyc D. et al., 2008) Bylo publikováno několik experimentálních prací, které se zabývaly umělou plicní ventilací během období teplé ischemie jako možností dodávky kyslíku buňkám plicního parenchymu. Jejich výsledky prokázaly dobré funkční parametry takovýchto plic. (Boglione MM. et al., 1999; Van Raemdonck, DE. et al., 1997; Wittwer T. et al., 2004)

V plicích, které nebyly ventilovány, došlo po 4 hodinách k buněčné smrti u více než 50% pneumocytů (D'Armini, AM. et al., 1994). Naopak u ventilovaných kadaverosních plic po 4 hodinách přežívalo 90% pneumocytů a dokonce 70% po dobu 12 hodin. (Alessandrini F. et al., 1993)

Na podkladě uváděných studií by se tedy dalo předpokládat, že na rozdíl od jiných parenchymatosních orgánů můžeme ovlivnit u plic míru ischemicko-reperfúzního poškození u dárců s nebijícím srdcem ventilací vzduchem či směsí plynů s vyšším obsahem kyslíku. V určitém rozporu s popsaným pozitivním efektem ventilace plic po cirkulační zástavě jsou poznatky o významu volných kyslíkových radikálů pro tkáňové poškození a buněčnou smrt. (Hodyc D. et al., 2007)

1.3.1 Role volných kyslíkových radikálů

I když je podpůrná ventilace směsí plynů s vyšším obsahem kyslíku cennou klinickou léčebnou metodou, je prokázáno, že prolongovaná nebo nadměrná ventilace 100% kyslíkem může být škodlivá. (Gilbert DL et al., 1981). Dle studií na zvířatech i klinických studií může takováto směs plynů (více než 21% z atmosférického tlaku- FiO_2) způsobit poškození, jenž je histologicky v podstatě nerozpoznatelné od získaného syndromu akutní respirační tísně (ARDS). (Jenkinson SG., 1993; Freeman BA. et al., 1981)

Plíce jsou vystaveny nejvyšší koncentraci kyslíku v těle a vzhledem k tomu jsou buňky dýchacích cest a alveolů vystaveny největšímu riziku hyperoxické toxicity. (Heffner JE. et al., 1989) Při zástavě cirkulace dochází k expozici vysokému parciálnímu tlaku kyslíku v alveolech a tím k výraznému poškození alveolokapilární membrány s následkem zvýšené propustnosti membrány a vzniku plicního edému. (Kapanci I. et al., 1969; Bowden DH. et al., 1968) Oproti tomu v perfundovaných plicích je významnější poškození patrné až po delší době expozice kyslíku. (Crapo JD. et al., 1980; Newman JH. et al., 1983) Tyto rozdíly v době expozice nutné pro manifestaci toxických účinků kyslíku ukazují na rozdílnou míru toxicity vysokých koncentrací O_2 u perfundovaných a neperfundovaných plic. (Hodyc D., 2008,

disertační práce) Takovéto výsledky studií mají významný dopad na úvahy o možnostech hyperoxické ventilace při reperfúzi plic po období teplé ischemie u dárce s nebijícím srdcem.

Hyperoxie způsobuje poškození prostřednictvím zvýšené produkce vysoce reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen intermediates – ROI). (Winslow RM. et al., 2013) Při teplé ischemii u dárce s nebijícím srdcem ale dochází nejprve k ischemii plicní tkáně a následným změnám. Série událostí v ischemickém orgánu, které vedou nejprve k buněčnému poškození a následně i smrti se nazývá **akutní ischemické poškození**. Tyto procesy úzce souvisí s výrobou a využitím energie v jednotlivých buňkách a zahrnují:

- Sníženou výrobu energie s poklesem hladiny intracelulárního adenosintrifosfátu (ATP).
- Přejít od aerobního k anaerobnímu využití energie.
- Nahromadění produktů anaerobního metabolismu.
- Nahromadění intracelulárního sodíku a vápníku a pokles pH v buňkách.

Všechny tyto děje vedou k narušení buněk ischemického orgánu, v tomto případě pneumocytů, jejich fyziologických dějů včetně funkcí mitochondrií a sarkolem. A vedou ke generování reaktivních forem kyslíku (radical oxygen species- ROS). (Hausenloy DJ. et Yellon DM., 2013; Lønborg, JT., 2015) Volné radikály se uvolňují následně během několika minut po reperfúzi a mohou být generovány i několik hodin po obnovení průtoku krve do ischemické tkáně (Bolli R. et al., 1989).

K nejzastoupenějším volným kyslíkovým radikálům patří:

- superoxidový anion (O_2^-)
- oxid dusnatý (NO) a peroxynitrit
- peroxid vodíku (H_2O_2)
- hydroxylový radikál (OH)
- kyselina chlorná (HOCl)

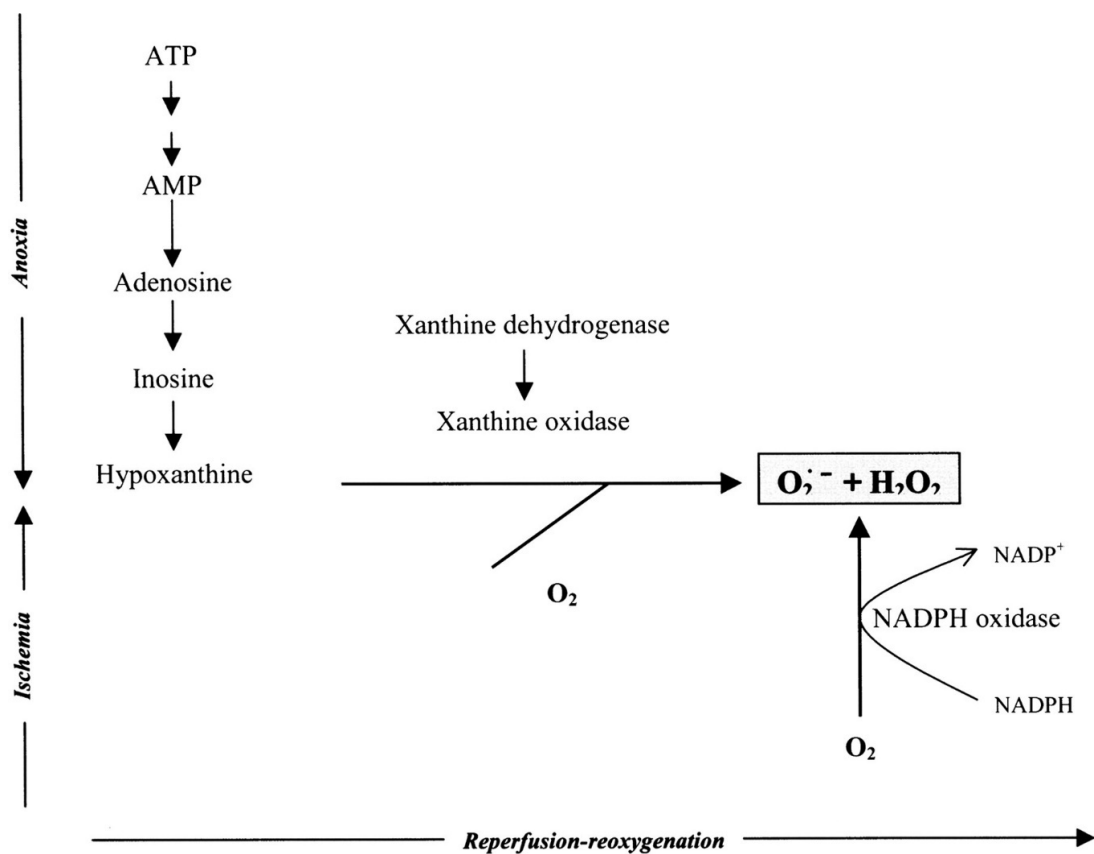
Několik studií zabývajících se mechanismy vzniku volných kyslíkových radikálů uvádí různé cesty vzniku ROS zahrnující například aktivaci neutrofilů a jejich akumulaci (Jordan JE. et al, 1999), únik elektronů z ischemických mitochondrií, katecholaminovou oxidaci, či aktivaci enzymů jako cyklooxygenáza a lipoxygenáza. (Verma S. et al, 2002) Relativní význam těchto jednotlivých cest není jasný, ale pravděpodobně navzájem souvisí a mohou se potencovat.

U ostatních transplantovaných orgánů odpovídá ischemicko-reperfuční poškození období anoxie s následnou reoxygenací. U plic, jež obsahují kyslík v alveolech při zástavě perfúze, se jedná o oxidační stres v důsledku ischemie, nikoliv hypoxie. Alveolární kyslík udržuje po určitou dobu aerobní metabolismus a zabraňuje hypoxii. (Matsumura A. et al, 1993; Fisher AB. et al., 1991; Eckenhoff RG. et al., 1992) Hypoxie a v konečném důsledku anoxie má za následek prudký pokles adenosintrifosfátu (ATP) a odpovídající zvýšení produktu **degradace ATP – hypoxanthinu**. Hypoxantin generuje superoxid po dodání O₂ reperfúzí a / nebo ventilací. Tento jev může nastat i v plicích, když alveolární tlak kyslíku klesne pod 7 mmHg v průběhu ischemie (Fisher AB. et al., 1981). (Obrázek 1.2)

Za jeden z hlavních zdrojů oxidačních činidel při nonhypoxické plicní ischemii je považován endotel (Al Mehdí AB et al., 1998). Endoteliální buňky jsou velmi citlivé na fyzikální podněty vyplývající z kolísání průtoku krve a jsou schopny transformovat tyto mechanické síly na elektrické a biochemické signály (mechanotransdukce) (Lansman JB., 1988). Absence mechanického složky proudu krve stimuluje membránovou depolarizaci endotelových buněk s **aktivací NADPH oxidázy** (viz obr. 1.3), nukleárního faktoru-kB, a vápník / kalmodulin-dependentní syntázy oxidu dusnatého (NOS). (De Perrot et al., 2003)

Opakovaně experimentálně potvrzená hlavní cesta vzniku ROS je také dle studií Steinberga H. 1983 katabolismus ATP s přeměnou na hypoxantin a současnou **oxidací xantin dehydrogenázy na xantin oxidázu** v období ischemie. V průběhu reperfúze, náhlá dostupnost

kyslíku působí jako kofaktor umožňující xantin oxidáze převést purinový substrát, nahromaděný během ischemie, na kyselinu močovou s tvorbou peroxidových anionů a peroxidu vodíku jako vedlejšími produkty (Kennedy TP. et al., 1989). Následně hydroxylové radikály způsobují poranění tkáně zahájením peroxidace lipidů buněčných membrán a oxidační deaktivací kritických buněčných proteinů (Kennedy TP. et al., 1989; Cohen G. 1985).



Obrázek 1.3. Tvorba volných kyslíkových radikálů ischemie/anoxie, jejich interakce, schéma dle De Perrota et al., 2003

1.3.2 Vliv hyperkapnie na radikálové poškození

Oxid uhličitý (CO₂) je důležitou složkou biologických acidobazických reakcí a má vliv na různé fyziologické děje. V posledních letech byla pozorována a zkoumána jeho nově zjištěná role - interakce s některými druhy ROS. V závislosti na mnoho faktorech inhibuje nebo potencuje reakce radikálových řetězců. (Skoumalova A et al., 2008)

Laboratorní studie prokázaly, že hyperkapnie může mít specifické ochranné účinky na jednotlivé orgánové systémy včetně poškození při infarktu myokardu (Nomura F. et al., 1994) nebo ischemii centrálního nervového systému (Vannucci RC. et al., 1995) či tlumivé účinky na aktivaci imunitního systému (Kregenow DA. et Swenson ER., 2002). Moore TM. et al., 1995 dále uvádějí, že **hyperkapnická acidóza má ochranný vliv při ischemicko- reperfúzním (IR) indukovaném poškození plic** a Shibata K. et al., 1998 a Laffey JG. et al., 1999 na podkladě svých studií prezentují, že **zvýšení CO₂ ve vdechované směsi plynů (hyperkapnická ventilace) má ochranný vliv při ex vivo reperfúzním poškození plic.**

Jak je uvedeno v předchozí kapitole, hlavní příčinou poškození vyskytující se v ischemické tkáni plic je poranění zprostředkované po reperfúzi volnými kyslíkovými radikály. V současné době je myšlenka reperfúzního poškození závislá na dvou kritických událostech, které nastaly v průběhu ischemie: degradace buněčných zásob ATP na puriny hypoxanthinu a xanthinu a přeměna xanthindehydrogenázy na xanthinoxidázu. (Kennedy TP. et al., 1989. McCord JM. 1985. Hoidal JR. et al., 1998).

Proto, pokud jsou plíce ventilované během reperfuze hyperkapnickou směsí plynů, dochází k nižšímu přívodu kyslíku jako kofaktoru reakce zprostředkované xanthinoxidázou. To by mohla být příčina ochranné role hyperkapnie proti poškození volnými kyslíkovými radikály.

Alternativní vysvětlení uvedl Kregenow DA. a Swenson ER. 2002, kteří tvrdí, že činnost CO₂ přímo inhibuje xanthinoxidázu a tím snižuje tvorbu ROS.

Curley GF et al., 2013 shrnuje, že mimo vlivu na tvorbu ROS při ischemicko-reperfúzním poškození vede hyperkapnická ventilace k vývoji hyperkapnické acidosis, jež potenciálně zvyšuje arteriální parciální tlak O₂ a okysličení periferních tkání. K tomu přispívá několika způsoby:

- **zlepšení ventilačně-perfúzního poměru** na podkladě potenciace hypoxické pulmonální vasokonstrikce (Swenson ER. et al., 1994; Wang Z. et al., 2008) a vzestupu lokální alveolární ventilace při inhibici konstrikce dýchacích cest (Domino KB. et al., 1998).
- **zvýšená dodávka kyslíku při zvýšení srdečního výdeje**, na podkladě nejen sympatoadrenergní modulace navýšení produkce katecholaminů (Akca O. et al., 2002).
- **zvýšená oxygenace periferních tkání** v důsledku pravostranného posunu disociační křivky hemoglobinu a mikrovaskulární vazodilataci (Turek Z. et Kreuzer F., 1981).
- **protizánětlivé účinky** - většina proteinů má pH optima svého fungování blízké fyziologickému rozmezí. Acidóza tak snižuje prozánětlivou produkce cytokinů a chemokinů, snižuje neutrofilní chemotaxi a inhibuje mnohé proteázy, nukleázy a fosfolipázy aktivované v poraněných buňkách (Somero GN., 1986; Nishio K. et al., 2001).

Bylo také prokázáno, že ventilační hyperkapnie zeslabuje vývoj chronické hypoxické plicní hypertenze u potkanů, včetně typických změn vyvolaných hypoxií ve změně struktury prealveolárních plicních cév a pravou srdeční hypertrofií (Chovanec M. et al., 2009). Inhibiční účinek je doprovázen snížením plazmatické koncentrace peroxydusitanu, která je velmi aktivní ROS indukující plicní vazokonstrikci a transvaskulární únik kapaliny. Autoři interpretovali pozorovaný inhibiční účinek jako možnou inhibici aktivity peroxinitritu ze strany hyperkapnie (Lyman SV. et Hurst JK., 1996).

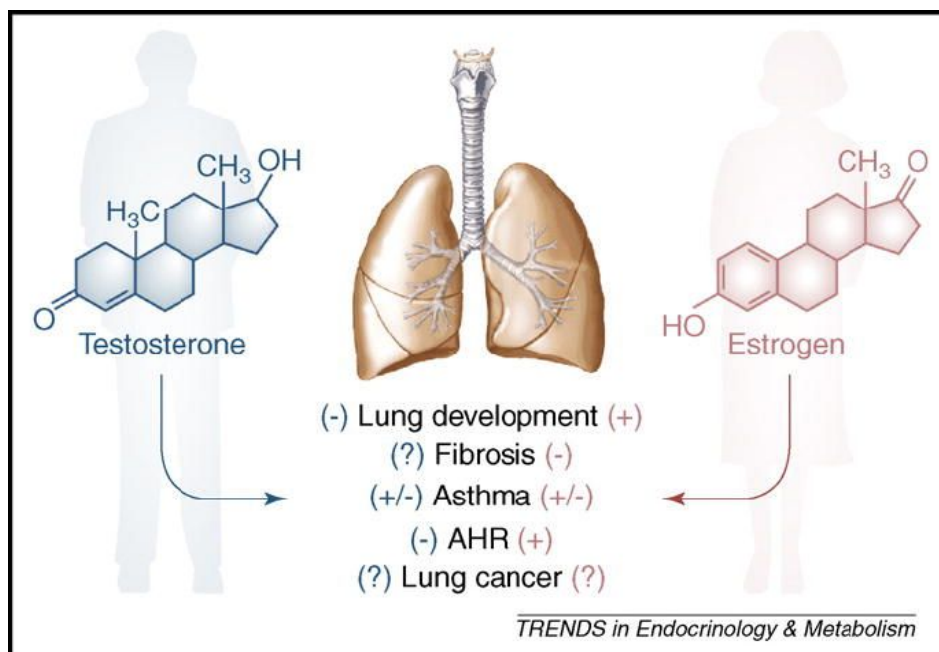
1.3.3 Vliv pohlaví na radikálové poškození

Stejně jako v jiných oblastech medicíny i u transplantace plic se nabízí otázka možnosti vlivu pohlaví na přežití a prosperování štěpu, které se často odvíjí z perioperačního průběhu a pooperačního stavu transplantovaného orgánu. Domněnka odlišné reakce tkáně na ischemicko-reperfuční poškození u mužů a žen vznikla na základě předchozích studií u jiných orgánových systémů jako například: IR poškození jater (Harada H. et al., 2001); IR poškození ledvin (Müller V. et al., 2002) nebo IR poškození srdce (Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009). Vychází i z rozdílného průběhu a reakcí na terapii plicních onemocnění u mužů a žen jak uvádí Carey MA. et al., 2007^a.

Většina dostupných studií ukazuje, že **ženy jsou vůči IR poškození různých tkání včetně plicní odolnější**. Zvýšená odolnost proti ROS byla prokázána v několika studiích na laboratorních zvířatech a **vychází z účinků estrogenů** (pro přehled viz Carrey MA et al., 2007^b).

Estrogeny uplatňují většinu svých účinků přes receptory: ER-alfa nebo ER-beta. Oba receptory jsou přítomny v buňkách plicní tkáně, kde ER β je hojnější než ER α (Couse JF. et al., 1997). Jedná se o jaderné hormonální receptory, které působí jako ligandem aktivované transkripční faktory s vazbou na DNA (Murphy E. a Steenbergen C., 2007). Kromě dobře zavedené cytosolové (jaderné) lokalizace, byly estrogenové receptory také detekovány na úrovni plasmatické membrány a membrány mitochondrií (Chen JQ. et al., 2005), kde působí tzv. non-genomickou cestou. Zkoumáním myši ER-deficientních bylo zjištěno, že ER α i ER β jsou nutné pro vytvoření plného množství alveolů u samic myši. ER α zprostředkovává sexuální dimorfismus výměny plynů a velikosti alveolů a absence ER β snižuje compliance plicní tkáně (Massaro GD. et al., 2006).

Carrey MA. et al., 2007^b (viz obr. 1.4) shrnuje vliv pohlavních hormonů na vývoj a chování plicní tkáně na podkladě množství dostupných studií.



Obrázek 1.4: Souhrn vlivu testosteronu a estrogenu na plicní tkáň, (-) negativní efekt, (+) pozitivní efekt, (?) neznámý efekt (Carey MA et al., 2007^b)

Účinky estrogenů na plicní tkáň:

- **Protektivní vliv na rozvoj plicního edému:** Carey MA. et al., 2007^b se také zabývá estrogeny jako významnými regulátory transmembránové vodivosti chloridových kanálů cystické fibrózy (CFTR - chloride channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulátor) a epiteliálních sodíkových kanálů (ENaC - epithelial sodium channel). Ty hrají důležitou roli v rozvoji plic v aktivní reabsorpci alveolární tekutiny nejen po narození, ale také při plicním edému. Autoři dospěli k závěru, že zvýšená exprese ENaC v ženských

plicích může být výhodou pro ženy v lepším clearance plicní kapaliny během plicního edému (Sweezey N. et al., 1998).

- **Vliv na velikost alveolární plochy a výměnu plynů:** Massaro GD. et al., 1995 zjistil, že na počátku pohlavní dospělosti samice krysy a myši mají vyšší výměnu plynů na celkový povrch alveolů a menší velikost alveolů, ale celkově větší alveolární plochu na hmotnost těla než samci stejného věku. Hypotéza příčiny byla evoluční příprava samic ke splnění metabolických a oxygenačních nároků na reprodukci. Následně Massaro GD. et al., 1996 potvrdili tuto teorii zjištěním, že estrogen je zodpovědný za sexuální dimorfismus ve výměně plynů a velikosti celkové alveolární plochy na jednotku hmotnosti.
- **Inhibice lipoperoxidace membrán:** Četné studie in vitro prokázaly, že estrogény mají potenciál ovlivnit redoxní chemii přechodných kovů, zejména železa a mědi. Tímto mechanismem estrogény velmi pravděpodobně inhibují peroxidaci membránových lipidů a lipoproteinů (Lacort M. et al., 1995; Ruiz-Larrea B. et al., 1995).
- **Ochrana před působením ROS:** V práci Arnala JF. et al., 1996 a kolektivu autorů Barp J. et al, 2002 jsou estrogenům připisována ochranné účinky jako antioxidantů. Všechny estrogény mají fenolické hydroxylové skupiny v poloze 3 a metylovou skupinu v poloze 13. Přítomnost této fenolové skupiny dává estrogenům jejich antioxidační vlastnosti tím, že působí jako scavengery ROS. Kromě toho, estrogény mohou indukovat expresi antioxidačních enzymů a tím stimulovat antioxidační obranný systém (Massafra C. et al., 1998).
- **Regulace NO syntázy:** Estrogény mohou mít také vliv na regulaci inducibilní NO syntázy související se zvýšením plicní kapilární permeability a změnou perfúzního tlaku (Kawachi S. et al, 2000;. Yu Z. et al., 2006). V endoteliálních buňkách cév nacházíme endoteliální

NO syntázy (eNOS) a indukibilní NO syntázy (iNOS). Estrogen zvyšuje produkci NO prostřednictvím zvýšené exprese iNOS a eNOS (Nuedling S. et al., 1999). NO poskytuje ochranu snížením exprese adhezních molekul, zejména P selektinu, a snižuje akumulaci neutrofilů. NO rovněž moduluje vápníkové kanály a ovlivňuje kontraktilitu myokardu. (Kher A. et al., 2005)

2 EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

2.1 Úvod a hypotézy

V teoretickém úvodu této práce se zabýváme ischemicko-reperfúzním poškozením plicní tkáně při transplantaci plic od dárce s nebijícím srdcem. Tyto teoretické poznatky jsme převedli v našem experimentálním zvířecím modelu na potkany a zaměřili jsme se na možné protektivní účinky hyperkapnické ventilace a výzkum vlivu pohlaví na IR poškození plicní tkáně.

1. V prvním experimentu jsme se zabývali **možností protektivního vlivu hyperkapnické ventilace během období teplé ischemie a/nebo během období reperfúze při EVLP na zvířecím modelu**. V naší práci jsme navázali na předchozí poznatky výzkumu nejen na našem pracovišti - Ústav fyziologie 2. LF UK (Skoumalova A. et al. 2008; Chovanec M. et al. 2009), které potvrdili protektivní vliv hyperkapnie například na hypoxickou plicní hypertensi nebo na funkce erytrocytů.
 - Hypotéza: Hyperkapnická ventilace má protektivní vliv na IR poškození plicní tkáně při EVLP.
2. V druhém experimentu jsme **posuzovali vliv pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP**. Opět jsme využili již zavedený experimentální zvířecí model. Náš výzkum vycházel z dříve uváděných studií, jež potvrzovaly významný protektivní vliv samičího pohlaví na IR poškození u plic i jiných orgánů: Harada H. et al., 2001; Müller V. et al., 2002; Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009; Carey MA. et al., 2007^{a, b}.
 - Hypotéza: Samičí pohlaví má protektivní vliv na IR poškození plicní tkáně při EVLP.

2.2 Protektivní vliv hyperkapnie na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP na zvířecím modelu

2.2.1 Cíle studie

Jak je uvedeno již v teoretickém úvodu této práce, laboratorní studie prokázaly, že hyperkapnie může mít specifické ochranné účinky na jednotlivé orgánové systémy. Hyperkapnická acidóza a/nebo zvýšení CO₂ ve vdechované směsi plynů (hyperkapnická ventilace) má ochranný vliv při ex vivo reperfučním poškození plic (Nomura F et al., 1994; Moore TM. et al., 1995; Laffey JG. et al., 1999).

Na podkladě těchto a dalších studií, jsme se rozhodli vytvořit experimentální zvířecí model IR poškození plic v režimu EVLP transplantace a následného hodnocení funkčních vlastností plic. Na tomto modelu jsme ověřovali vliv hyperkapnické ventilace na vznik a působení ROS. Radikálové poškození jsme hodnotili na podkladě sledovaných funkčních parametrů.

Cílem studie bylo zjistit:

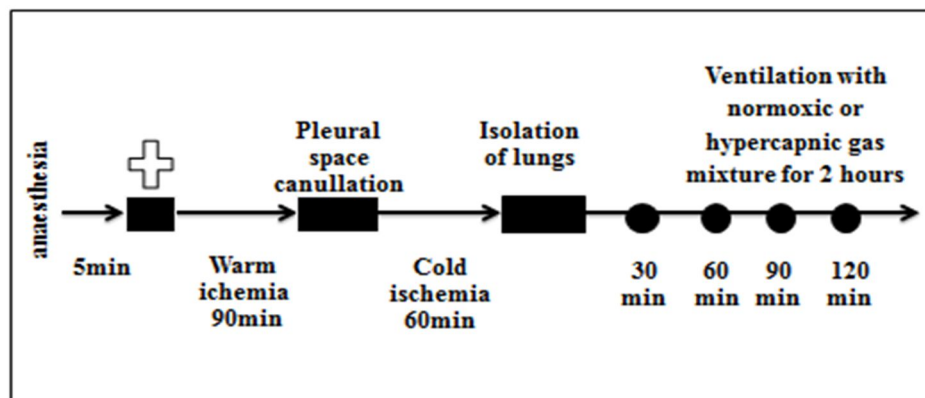
- 1. Zda hyperkapnická ventilace bude mít protektivní účinky na radikálové poškození plicní tkáně i v případě EVLP modelu.**
- 2. Dále bylo naším záměrem potvrdit, zda má hyperkapnická ventilace stejný protektivní účinek pokud je použita jen v období teplé ischemie nebo jen v období reperfúze.**

Výsledky studie byly uveřejněny v publikaci Mrazkova H. et al., 2015, která je součástí disertační práce jako Příloha 1.

2.2.2 Metodika a materiál

2.2.2.1 Protokol experimentu

K tomuto pokusu byl převzat a upraven zvířecí experimentální protokol pro NHBD (potkani kmene Wistar) z již zavedeného modelu použitého v dřívějších experimentech na našem pracovišti: Hodyc D. et al., 2008; Herget J. et al., 2010. (Obrázek 2.1)



Obrázek 2.1.: Schematický protokol experimentu vlivu hyperkapnické ventilace na IR poškození plic (Mrázková H. et al., 2015)

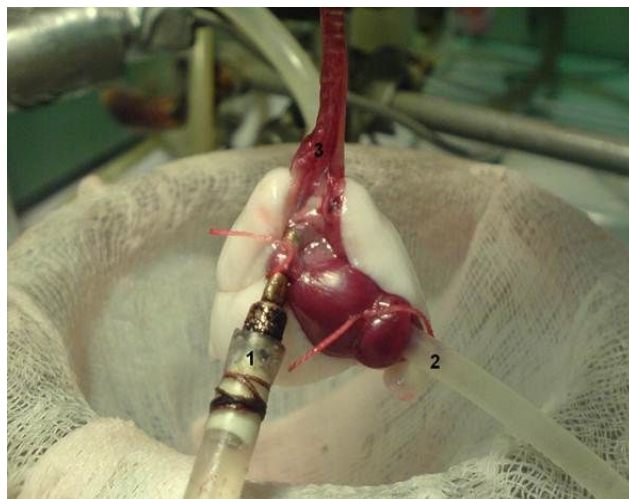
Zvířata byla na počátku pokusu anestetizována intraperitoneálním podáním tiopentalu sodného v dávce 100mg/kg tělesné hmotnosti. Následně pod kontrolou zraku z drobné laparotomie byl do jater podán injekčně heparin v dávce 250 IU a po 5 minutách bylo zvíře usmrceno letální dávkou tiopentalu sodného intraperitoneálně (až 250 mg/kg tělesné hmotnosti). Po usmrcení byla vypreparována trachea se zavedením tracheostomické kanyly.

Zvíře jsme ponechali v laboratorní teplotě po dobu 90 minut jako simulace období teplé ischemie. Po uplynutí tohoto období jsme provedli sternotomii a otevřeli hrudní dutinu se zavedením 2 perfúzních kanyl sloužících k cirkulaci chladného solného roztoku s 5% Ficolem. Kanyly byly fixovány k hrudní stěně tak, aby drénovaly volně hrudní dutinu. Následovalo 60

minut období studené ischemie, kdy bylo zvíře umístěno do teplotně stabilní chladné komory s promýváním hrudní dutiny chladným roztokem. Teplota preparátu byla udržována na 12°C. V období studené ischemie nebyla pokusná zvířata ventilována.

Po uplynutí 60ti minut jsme zvířata přesunuli do místa s běžnou laboratorní teplotou a odstranili jsme z hrudní dutiny perfúzní kanyly. Následovala preparace a izolace orgánové bloku srdce- plíce dle dříve popsanych postupů - Hodyc D. et al., 2008; Herget J. et al., 2010. Tento blok byl připojen tracheální kanylou k ventilátoru (Harvard Rodent Ventilator 683) s nastavením dechové frekvence 50 dechů/min, pozitivním inspiračním tlakem 10 cm H₂O, pozitivním tlakem na konci výdechu (PEEP) 2 cm H₂O a ventilován normoxickou (21% O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂) nebo hyperkapnickou (21% O₂ + 10% CO₂ + 64% N₂) směsí plynů.

Poté jsme zavedli perfúzní kanyly do arteria pulmonalis a levé srdeční síně a propojili je s peristaltickou pumpou s nastaveným vypočítaným konstantním průtokem 4ml na 100g tělesné hmotnosti/ min. K perfúzi jsme použili osvědčený perfúzní Solný roztok s 4% Ficolem a Mecklofenamátem (17×10^{-6}). (Obrázek 2.2)



Obrázek 2.2.: Pozice tracheální a perfúzních kanyl u izolovaného bloku srdce-plíce v teplotně stále vlhké komoře, 1- kanyla v tr. pulmonalis (vtékání perfuzátu), 2- kanyla v levé síni srdeční (odtok perfuzátu), 3- tracheální kanyla

Blok srdce plíce byl umístěn do teplotně stabilní vlhké komory o teplotě 38°C a upevněn prostřednictvím trachey na siloměru. Pro odpuštění buněčného detritu a krevních elementů byl blok nejprve perfundován 20ml perfúzátu, který nebyl vrácen do oběhu. Až po tomto pročištění byla výtoková kanyla napojena do cirkulačního okruhu a preparát byl za kontinuální perfúze s tlakem 2 mmHg a ventilací ponechán 20 min ke stabilizaci.

Po stabilizaci preparátu jsme po dobu 120 minut sledovali a v čase 30,60,90 a 120 minut zaznamenávali hodnoty:

1. perfúzního tlaku (plicní vaskulární rezistence) p (torr)
2. změnu hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm
3. arterio-venosní difference parciálního tlaku O_2 ΔpO_2
(transportní schopnost plic pro přenos O_2)

Plicní perfúzní tlak jsme monitorovali pomocí tlakového snímače připojeného k vtokové kanyle (Pressure transducer, PowerLab, ADI Instruments).

Přírůstek hmotnosti plic byl měřen kontinuálně pomocí siloměru na tracheální kanyle a převodníku (Force transducer, PowerLab, ADI Instruments).

Po 20 minutách období ekvilibrace, jsme provedli první měření arterio-venosní difference parciálního tlaku O_2 . Tato měření byla následně opětovně provedena v čase 30, 60, 90 a 120 min od ekvilibrace preparátu. Ve stanovených časových intervalech jsme odebrali vždy dva vzorky perfúzního roztoku – „venosní“ vzorek z vtokové kanyly v a. pulmonalis a „aretriální“ vzorek z výtokové kanyly v levé srdeční síni. Parciální tlak kyslíku (pO_2) byl měřen okamžitě po odebrání vzorku na radiometru (ABLTM 5, Radiometer Medical A / S, Kodaň, Dánsko). Je nutno znovu zmínit, že jsme použili model izolovaného bloku srdce a plic bez jakýchkoliv dalších orgánů, které by spotřebovávaly O_2 a do oběhu produkovaly CO_2 . Proto

jsme vždy před odběrem po dobu 5 minut perfúzáta desaturovali uměle, sycením perfúzáta v zásobníku směsí plynů: 5% CO₂ + 95% N₂. To znamená, že zvýšení parciálního tlaku kyslíku mezi kanylymi (ΔpO_2) bylo spolehlivým měřítkem schopnosti plic k přenosu kyslíku z plicních sklípků do perfúzáta.

2.2.2.2 Zhodnocení funkčnosti preparátu, statistická analýza

Všechny preparáty kontrolních i experimentálních skupin byly po celou dobu experimentálního protokolu funkčně hodnotitelné. Během 120 minut měření nebyl u žádného preparátu zaznamenán masivní plicní edém, výrazné navýšení plicního tlaku nebo porušení transportní schopnosti plic.

Dvakrát během pokusu jsme současně prováděli test životaschopnosti plic (Herget J. a Chovanec M., 2010). Posuzovali jsme reaktivitu perfúzního tlaku na angiotensin II (0,4 μ g) a na akutní hypoxickou výzvu – ventilace hypoxickou směsí plynů (0 % O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂). Ve všech případech jsme sledovali signifikantní vasokonstriční odpověď.

Pro statistické vyhodnocení jsme použili metodu analýzy opakovaných měření (ANOVA) s následnými testy Fishera (Fisher PLSD post hoc) a Gamese/Howella. K zhodnocení byl používán software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně i graficky vyjadřovány jako střední hodnoty \pm SEM.

2.2.2.3 Experimentální skupiny

Experimenty byly prováděny na šesti skupinách dospělých samců potkanů kmene Wistar v souladu se směrnicemi Evropského společenství pro pokusná zvířata. V každé skupině bylo 7 pokusných zvířat.

Studie byla rozdělena do dvou experimentů:

- Experiment A- účinek hypercapnické ventilace v období reperfúze
- Experiment B- účinek hypercapnické ventilace v období teplé ischemie

Experiment	skupiny	Teplá ischemie 90min		Studená ischemie 60min	Reperfúze protokol 120 min měření	
		Hyperkapnická ventilace	Bez ventilace	Bez ventilace	Normoxická ventilace	Hyperkapnická ventilace
kontroly	Cn				X	
	Ch					X
A	An		X	X	X	
	Ah		X	X		X
B	Bh	X		X	X	
	B0		X	X	X	

Tabulka 2.1: Experimentální skupiny

Experiment A – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní poškození u plic v období reperfúze

K tomuto experimentu jsme použili 4 skupiny laboratorních zvířat, 2 pokusné (An, Ah) a 2 kontrolní (Cn, Ch), viz tab. 2.1.

Pokusné skupiny jsme podrobili protokolu odpovídajícímu popisu v oddílu 2.2.2.1 (protokol experimentu). Každé zvíře bylo anestetizováno a po kanylaci trachey a aplikaci heparinu usmrceno letální dávkou tiopentalu. Zvířata byla ponechána v období teplé i studené ischemie bez ventilace. Ventilace byla v souladu s uváděným protokolem zahájena až před reperfúzi izolovaného bloku srdce-plíce v teplotně stabilní vlhké komoře a to u skupiny An (n-

normoxická) normoxickou směsí plynů: 21% O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂ a u skupiny Ah (h-hyperkapnická) hyperkapnickou směsí plynů: 21% O₂ + 10% CO₂ + 64% N₂.

U obou kontrolních skupin nebyla zvířata vystavena období teplé a studené ischemie. Blok srdce-plíce byl izolován ihned po usmrcení tiopentalem. Kontroly se od sebe opět lišily jen použitou směsí plynů k ventilaci. Cn (n-normoxická) byla ventilována normoxickou směsí plynů: 21% O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂ a skupina Ch (h-hyperkapnická) hyperkapnickou směsí plynů: 21% O₂ + 10% CO₂ + 64% N₂, viz tab. 2.1. Postup a následná měření zcela odpovídala měření při pokusech s experimentálními skupinami.

Experiment B – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní poškození u plic v období teplé ischemie

I v experimentu B jsme využili 2 experimentální skupiny (Bh, B0). Kontrolní skupiny byly shodné s experimentem A (Cn, Ch), viz tab. 2.1.

Laboratorní potkany jsme připravili a usmrtili shodně dle protokolu jako pokusné skupiny experimentu A, ale skupina Bh (h-hyperkapnická) byla ventilována hyperkapnickou směsí plynů: 21% O₂ + 10% CO₂ + 64% N₂ během období 90 minut teplé ischemie. Naopak skupina B0 (0-bez ventilace) nebyla během teplé ani studené ischemie ventilována. V období reperfúze byly obě skupiny ventilovány normoxicky, viz tab 2.1.

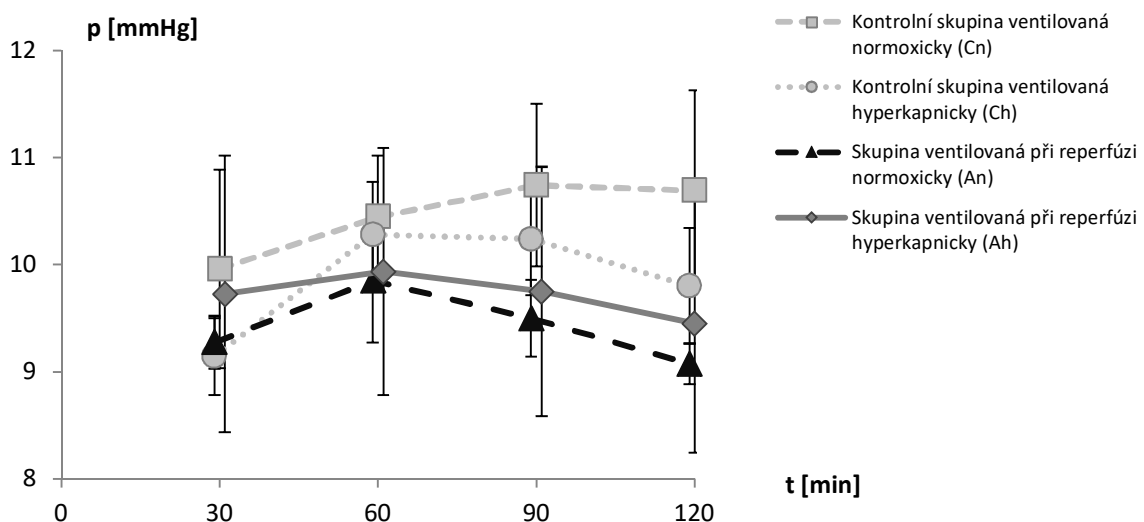
2.2.3 Výsledky

Jak bylo výše uvedeno všechny preparáty kontrolních i experimentálních skupin byly po celou dobu experimentálního protokolu funkčně hodnotitelné a ve všech případech jsme pozorovali signifikantní vasokonstrikční odpovědi na stimulaci angiotensinem II. a hypoxickou směsí plynů.

Experiment A – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfuční poškození u plic v období reperfuze

- **Perfuční tlak (plicní vaskulární rezistence) p [mmHg]**

Mezi experimentálními (An, Ah) a kontrolními skupinami (Cn, Ch) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl ve změnách perfučního tlaku. (viz graf 2.1.)

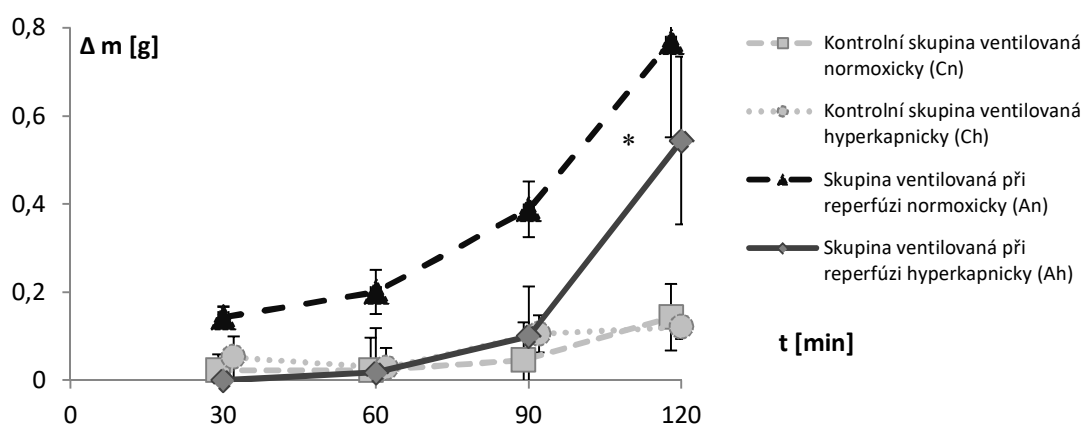


Graf 2. 1.: Vliv hyperkapnické ventilace během období reperfuze na perfuční tlak

- **Změna hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm [g]**

Mezi kontrolními skupinami (Cn, Ch) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly ve změně hmotnosti preparátů. Plicní edém během experimentu u většiny preparátů v malé míře vznikl, ale nebyl překážkou funkčního hodnocení.

Naopak jsme zjistili významně nižší přírůstek hmotnosti plic (ukazující na přítomnost plicního edému) u preparátů experimentální skupiny ventilované během období reperfúze hyperkapnickou směsí plynů (Ah) ve srovnání s experimentální skupinou ventilovanou při reperfúzi normoxicky (An) - * $p < 0,05$. (viz graf 2.2.)



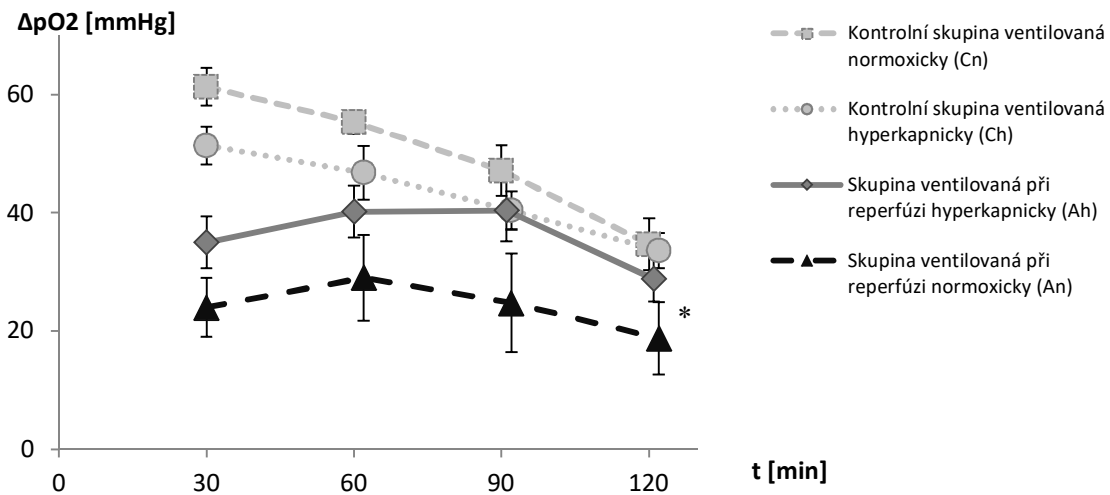
Graf 2. 2.: Vliv hyperkapnické ventilace během období reperfúze na změny hmotnosti preparátu

- **Arterio-venosní diference parciálního tlaku O_2 (transportní schopnost plic pro přenos O_2) ΔpO_2**

Měřením transportní schopnosti kyslíku pomocí rozdílu arterio-venosního parciálního tlaku kyslíku jsme zjistili signifikantně vyšší přenos kyslíku u plic ventilovaných během

reperfúze hyperkapnickou směsí plynů (Ah) ve srovnání s plícemi ventilovanými během reperfúze normokapnickou směsí plynů (An) - * $p < 0,05$. (viz graf 2.3.)

Nejlepší transportní schopnost O_2 , zejména na začátku perfúze, vykazovaly kontrolní skupiny (Cn, Ch), které nebyly vystaveny poškození ROS v průběhu teplé ischemie (viz tab. 2.1).

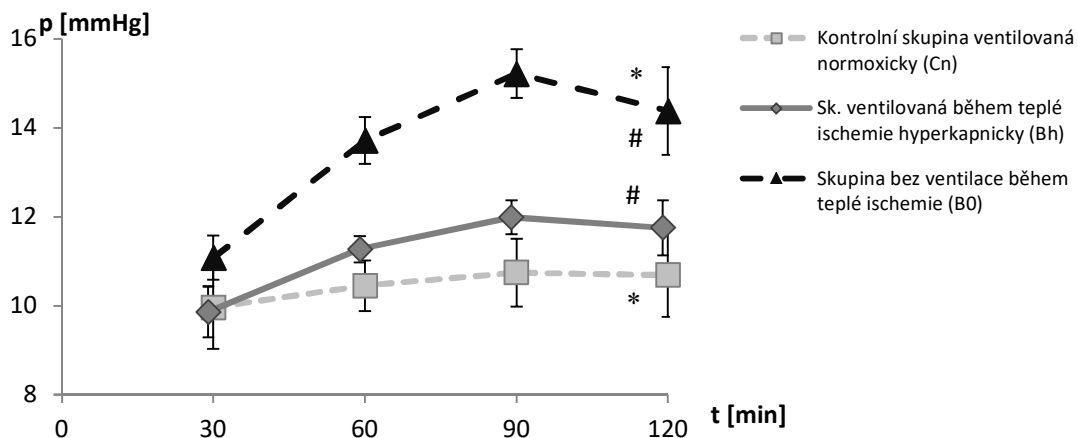


Graf 2. 3.: Vliv hyperkapnické ventilace během období reperfúze na transportní schopnost plic pro přenos O_2

Experiment B – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní poškození u plic v období teplé ischemie

- Perfúzní tlak (plicní vaskulární rezistence) p [mmHg]**

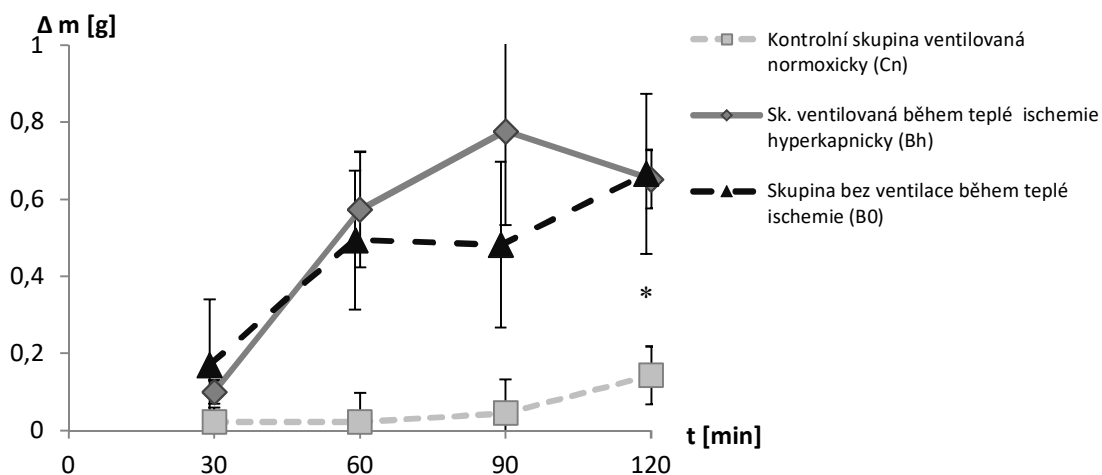
Při měření jsme zaznamenali signifikantní rozdíl ve vzestupu perfúzního tlaku u experimentální skupiny, která prošla obdobím teplé ischemie, ale nebyla ventilována (B0) ve srovnání s experimentální skupinou, která byla hyperkapnicky ventilována v období teplé ischemie (Bh) i ve srovnání se skupinou kontrolní (Cn) *, # $p < 0,05$. (viz graf 2.4.)



Graf 2. 4.: Vliv hyperkapnické ventilace během období teplé ischemie na perfúzní tlak

- Změna hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm [g]**

Mezi experimentálními skupinami (Bh, B0) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl ve změně hmotnosti během 120 minut experimentu. Ale rozdíl mezi nárůstem hmotnosti u neventilované experimentální skupiny během období teplé ischemie (B0) a kontrolní skupinou (Cn) byl signifikantní - * $p < 0,005$. (viz graf 2.5.)

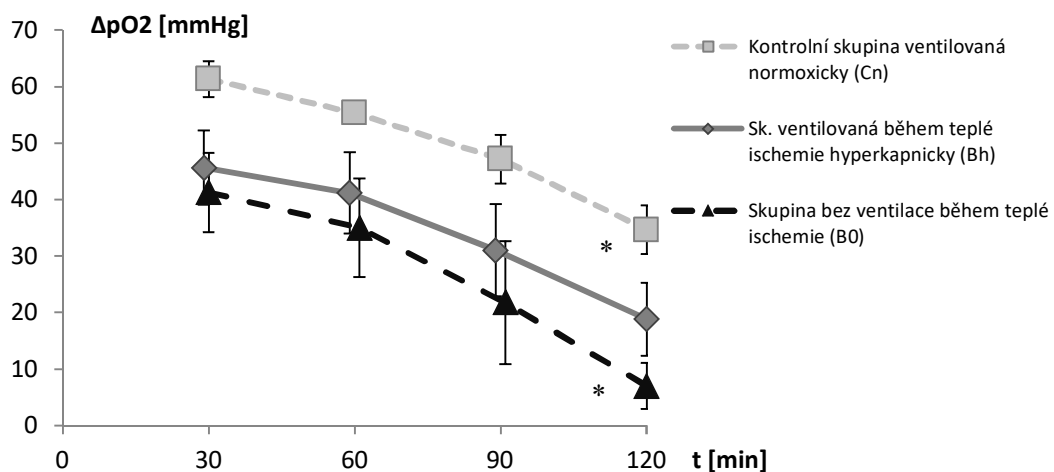


Graf 2. 5.: Vliv hyperkapnické ventilace během období teplé ischemie na změny hmotnosti preparátu

- **Arterio-venosní diference parciálního tlaku O_2 (transportní schopnost plic pro přenos O_2)**

ΔpO_2

U plic ventilovaných hyperkapnickou směsí plynů v průběhu teplé ischemie (Bh) jsme nezjistili po celou dobu experimentu žádný významný rozdíl v schopnosti přenosu kyslíku ve srovnání s plicemi, které byly během teplé ischemie ponechány bez ventilace (B0). Nicméně přenosová schopnost O_2 u experimentální skupiny bez ventilace během teplé ischemie (B0) byla signifikantně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou (Cn), která nebyla vystavena období teplé ischemie - * $p < 0,05$. (viz graf 2.6.)



Graf 2. 6.: Vliv hyperkapnické ventilace během období teplé ischemie na transportní schopnost plic pro přenos O_2

2.2.4 Diskuze

Z uváděných výsledků vyplívají **3 hlavní závěry** studie, které jsou v souladu s dříve publikovanými ochrannými účinky hyperkapnické ventilace (Kavanagh BP. et Laffey JG., 2006; Skoumalová A. et al., 2008; Chovanec M. et al., 2009) a naplňují námi vytyčené cíle na počátku experimentu:

1. Ventilace hyperkapnickou směsí plynů během období reperfúze omezuje rozvoj plicního edému po vystavení plicní tkáně období teplé ischemie. (viz graf 2.2.)
2. Ventilace hyperkapnickou směsí plynů během období reperfúze má ochranný účinek na transportní schopnost plicní tkáně pro O₂ po vystavení plicní tkáně období teplé ischemie. (viz graf 2.3.)
3. Hyperkapnická ventilace nemá ochranný účinek při ventilaci po dobu teplé ischemie.

Naše měření tedy potvrdila, že ventilační **hyperkapnie při reperfúzi snižuje transvaskulární únik kapaliny při IR poškození plicní tkáně**. Plíce vystavené teplé ischemii a následné reperfúzi, během které byly ventilovány hyperkapnickou směsí plynů (Ah), měly výrazně nižší přírůstek hmotnosti než preparáty ventilované při reperfúzi normoxicky (An)- viz graf 2.2.

Tento výsledek lze interpretovat na podkladě předchozích studií jako přímé působení CO₂ na snížení tvorby ROS nebo nepřímé cesty působení hyperkanické ventilace přes snížení dostupného O₂ jako kofaktoru dalších reakcí. ROS jsou potom příčinou poškození buněk plicního parenchymu a endotelu cév a vedou tak k rozvoji plicního edému.

Kennedy TP. et al., 1989 a Cohen G., 1985 zdůrazňují jako příčinu zranění plicní tkáně hydroxylové radikály. Tyto vznikají při IR poškození jako silné oxidanty, které způsobují peroxidaci lipidů buněčných membrán a oxidační deaktivaci kritických buněčných proteinů.

Snížení jejich produkce tak vede k menšímu poškození a tedy ochraně před vznikem plicního edému.

Některé z uváděných procesů, jak dochází ke snížení produkce ROS včetně hydroxylových radikálů, byly již uváděny v kapitole 1.3.2 (Vliv hyperkapnie na radikálové poškození). Během ischemie dochází k degradaci buněčných zásob ATP na puriny hypoxanthinu a xanthinu a přeměně xanthindehydrogenázy na xanthinoxidázu. (Kennedy TP. et al., 1989; McCord JM. 1985; Hoidal JR. et al., 1998) Při ventilaci hyperkapnickou směsí plynů během reperfúze je nižší přívodů kyslíku jako kofaktoru reakce zprostředkované xanthinoxidázou, což může být považováno za jednu z příčin ochranné role hyperkapnie proti poškození volnými kyslíkovými radikály.

Kregenow DA. et Swenson ER. 2002 vysvětlují snížení tvorby ROS na podkladě přímé inhibice xanthinoxidázy vlastní molekulou CO₂.

I Chovanec M. et al., 2009 poukazuje na nepřímou cestu působení hyperkapnické ventilace, jež zeslabuje vývoj chronické hypoxické plicní hypertenze u potkanů a snižuje plazmatickou koncentraci peroxydusitanu jako velmi aktivního ROS.

K prvnímu bodu výsledků této studie je nutno ještě uvést upřesnění, že nárůst hmotnosti preparátů plic nelze interpretovat čistě jen jako formování plicního edému. Hmotnost plic se může navýšit i zvětšením pouze intravaskulárního objemu při vazodilataci cévního řečiště. Tím lze vysvětlit mírný vzestup hmotnosti preparátů plic u kontrolních skupin (Cn, Ch), které nebyly vystaveny období teplé a studené ischemie. (viz graf 2. 2. a 2. 5.)

Další závěr studie vychází z naměřených hodnot rozdílu partiálního tlaku kyslíku mezi vtokovou a výtokovou kanylou a tedy z měření přenosové schopnosti plicní tkáně pro O₂. V grafu 2. 3. **pozorujeme signifikantní rozdíl mezi zvýšením hodnot partiálního tlaku O₂ ve**

prospěch plic vystavených hyperkapnické ventilaci (Ah) v období reperfúze oproti normoxicky ventilovaným plicním preparátům (An).

Účinky hyperkapnie na transportní schopnost plic pro O₂ jsou vysoce komplexní. Kregenow DA. et Swenson ER., 2002 a Kawanagh BP. et Laffey GJ. 2006 poukazují na harmonizaci poměru ventilace-perfúze na podkladě hyperkapnické ventilace a tím celkové zlepšení výměny plynů.

Hyperkapnická ventilace má současně vliv přes působení acidosis na zlepšení povrchového napětí a tak zlepšení compliance plicní tkáně u plic po reperfúzi. CO₂ ovlivňuje tvorbu povrchově aktivních látek surfaktantu. Existuje předpoklad, že hyperkapnická ventilace může ovlivnit dysfunkce povrchově aktivních látek, které vznikly při IR poškození (Kregenow DA. et Swenson ER., 2002).

Laffey GJ. et al. 2000 popisuje vlastnosti hypercapnické acidózy včetně jejího vlivu na ventilačně-perfúzní poměr: snižuje tkáňový metabolismus, zvyšuje srdeční výdej a mění disociační vlastnosti hemoglobinu. Nicméně, tyto mechanismy se vztahují k in vivo procesům a nemůžeme je tedy aplikovat u izolovaného bloku srdce plíce při ex vivo experimentu.

Poslední výsledek studie, že **hyperkapnická ventilace po období teplé ischemie nemá protektivní vliv na IR poškození** vychází z výsledků měření na grafech 2. 4. -2. 6. Ve většině sledovaných parametrů jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi experimentálními skupinami (B0, Bh) ani mezi hyperkapnicky ventilovanou experimentální skupinou v období teplé ischemie (Bh) a skupinou kontrolní, která nebyla vystavena období ischemie a byla ventilována normoxicky (Cn).

Tento odlišný účinek hyperkapnické ventilace v období teplé ischemie oproti hyperkapnické ventilaci v období reperfúze vysvětluje v kontextu dalších autorů Vesela A. et Wilhelm J., 2000. V buňkách je produkován jako primární a vysoce reaktivní ROS superoxid,

který je například produkt NADH oxidázy nebo membrány mitochondriálního dýchacího řetězce. Tento reaktivní radikál je rychle metabolizován na poměrně stabilní radikál – peroxid vodíku enzymem SOD (superoxid dismutáza). Ve vodném prostředí působí CO₂ jako scavenger vůči reaktivním formám kyslíku a dusíku, čímž zabraňuje oxidačnímu a nitračnímu poškození.

V nepolárním prostředí membrán (plic bez perfúze během teplé ischemie s hyperkapnickou ventilací) může CO₂ naopak podporovat radikálové reakce tvorbou uhličitanových radikálů a tím zhoršit oxidační poškození.

K úplnosti diskuze je třeba uvést, že v experimentu B jsme zaznamenali signifikantní rozdíl mezi experimentálními skupinami (Bh, B0) pouze v rozvoji plicní vaskulární rezistence. Signifikantně menší rozvoj rezistence u ventilované experimentální skupiny v období teplé ischemie (Bh) oproti neventilované experimentální skupině (B0) lze interpretovat na podkladě protektivního vlivu vlastní ventilace bez závislosti na složení směsi plynů. Teorie protektivního účinku ventilace, který se nelišil mezi skupinami ventilovanými dusíkem, atmosférickým vzduchem a kyslíkem byla pozorována Van Raemdonckem DE. et al., 1997. Rovněž byla popsána signifikantně lepší funkce plic kadaversního dárce po hodinové srdeční zástavě, pokud byly plíce roztaženy jedním nádechem před navozením teplé ischemie. (Loeche F. et al., 2002).

Ulicny KS. et al., 1993 uvádí, že bylo opakovaně experimentálně potvrzeno, že při vyšším vaskulárním tlaku distenze alveolů plynem snižuje filtraci a následnou tvorbu plicního edému.

Na závěr je třeba zdůraznit, že při experimentu byly preparáty perfundovány acelulárním roztokem. Z tohoto důvodu nebyly výsledky diskutovány na základě vlivu

hyperkapnie na krevní elementy. Zaměřili jsme se na změny způsobené změnami pH, enzymatickými vlivy a změnami v buňkách plicního parenchymu.

Celkově při hodnocení výsledků studie vlivu hyperkapnické ventilace je výsledek měření významný pro zvážení klinické aplikace po provedení dalších studií. Vliv CO₂ na plicní edém pouze během reperfúze po vystavení období teplé a studené ischemie a jeho ochranný účinek na přenosovou schopnost plic pro kyslík by mohl být využíván pro protokol transplantace NHBD a to zejména v ex vivo transplantačním programu. Mohlo by se jednat o způsob navýšení akceptovatelných dárcovských plic.

2.3 Vliv pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP na zvířecím modelu

2.3.1 Cíle studie

Stejně jako v jiných oblastech medicíny vyvstává i v oblasti transplantace plic otázka vlivu pohlaví na přežití a prosperitu štěpu. Domněnka odlišné reakce plicní tkáně na IR poškození u mužů a žen vznikla na podkladě předchozích publikovaných prací, které se zabývaly různými orgánovými systémy a odlišnosti prokázaly: Harada H. et al., 2001 - IR poškození jater; Müller V. et al., 2002 - IR poškození ledvin nebo Murphy E. et al., 2007 a Ostadal B. et al., 2009 - IR poškození srdce.

Je dobře známo, že četné zdravotní problémy jsou ovlivněny pohlavím (Ošťádal et al., 2009). Očekávané odlišnosti v chování vůči poškození ROS u plic tak vychází i z rozdílného průběhu a reakcí na terapii některých plicních onemocnění u mužů a žen, jak uvádí Carey MA. et al., 2007^a.

Většina dostupných studií ukazuje, že ženy jsou vůči IR poškození různých tkání včetně plicní odolnější.

Na podkladě těchto a dalších studií a v návaznosti na předchozí experiment, jsme se rozhodli opětovně využít již zavedený experimentální zvířecí model IR poškození plic v režimu EVLP transplantace a následného hodnocení funkčních vlastností plic. Tentokrát jsme na tomto modelu ověřovali vliv samčího a samičího pohlaví na vznik a působení ROS. Radikálové poškození jsme hodnotili na podkladě sledovaných funkčních parametrů.

Cílem studie bylo zjistit, zda bude mít samčí či samičí pohlaví protektivní vliv na radikálové poškození plicní tkáně v případě EVLP modelu. Předpoklad dle výše uvedených závěrů byl, že naměříme lepší funkční parametry u plic samic.

Výsledky studie budou uveřejněny v přijaté publikaci Mrazkova H. et al., 2016, která je součástí disertační práce jako Příloha 2 a v době odevzdání je k dispozici ve formě internetového článku.

2.3.2 Metodika a materiál

2.3.2.1 Protokol experimentu

Stejně jako v naší první studii o vlivu hyperkanické ventilace na IR poškození plic (Mrazkova H. et al., 2015) jsme i v tomto experimentu využili zavedeného zvířecího experimentálního modelu (potkani kmene Wistar) a protokolu pro NHBD (Hodyc D. et al., 2008; Herget J. et al., 2010. (Obrázek 2.1)

Zvířata byla na počátku pokusu shodným způsobem anestetizována a heparinizována. Po 5 minutách od heparinizace jsme podali letální dávku tiopentalu sodného intraperitoneálně (až 250 mg/kg tělesné hmotnosti) a po úmrtí jsme vypreparovali tracheu a zavedli tracheostomickou kanylu.

Následoval protokol 90minut ponechání při laboratorní teplotě (teplá ischemie) a 60minut v teplotně stabilní chladné komoře s promýváním dutiny hrudní chladným perfúzním solným roztokem (studená ischemie, 12°C). Žádná z experimentálních skupin nebyla během období ischemie ventilována. Po uplynutí studené ischemie jsme vypreparovali orgánový blok srdce-plíce (podrobný popis viz - Hodyc D. et al., 2008; Herget J. et al., 2010) a výše popsaným způsobem (kapitola 2.2.2.1) jsme započali s ventilací normoxickou směsí plynů (21% O₂ + 5%

CO₂ + 74% N₂). Po kanylaci a. pulmonalis a levé srdeční síně jsme orgánový blok reperfundovali Solným roztokem s 4% Ficolem a Mecklofenamátem (17x10⁻⁶). (Obrázek 2.2) I při tomto experimentu byl preparát upevněn pomocí trachey na siloměru v teplotně stabilní vlhké komoře a po prvotní reperfúzi byl ponechán 20 minut k ekvilibraci. Po stabilizaci preparátu jsme sledovali 120minut a v pravidelných intervalech (30,60,90 a 120 minut) zaznamenávali hodnoty:

1. perfúzního tlaku (plicní vaskulární rezistence) p (torr)
2. změnu hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm
3. arterio-venosní diference parciálního tlaku O₂ ΔpO₂
(transportní schopnost plic pro přenos O₂)

Monitorace probíhala na shodných přístrojích a stejným způsobem jako v předchozí uváděné studii.

Oproti předchozí studii jsme měřili u jednotlivých preparátů plic také přímo koncentraci ROS v perfuzátu po 90minutách období teplé ischémie prostřednictvím přístroje PAT test (FRA-II, Itálie) (Bertuglia a Giusti 2005). Test vychází z měření antioxidačního potenciálu prostřednictvím chromatických změn thiokyanatanu amonného.

2.3.2.2 Zhodnocení funkčnosti preparátu, statistická analýza

Dvakrát během pokusu jsme u preparátů opět ověřovali reaktivitu perfúzního tlaku na angiotensin II (0,4 μg) a na akutní hypoxickou výzvu – ventilace hypoxickou směsí plynů (0 % O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂). Očekávanou odpovědí byla signifikantní vasokonstrikční odpověď jako průkaz životaschopnosti preparátu (Herget J. a Chovanec M., 2010).

Během celé studie byly zaznamenány 3 případy nedokončení experimentu z důvodu extrémního nárůstu hmotnosti plicních preparátů při rozvoji plicního edému. Tyto preparáty neprošly testem životaschopnosti plic, kdy nevykázaly vazokonstrikční odpověď na výzvu angiotensinem II ani na hypoxii. Jednalo se o 2 preparáty plic samčích a 1 samičích u experimentálních skupin. U obou samčích plic byla jako příčina edému identifikována technická závada s následkem plynné embolizace do plic. U samičích plic nebyla příčina objasněna. Všechny nehodnotitelné preparáty byly ze studie vyřazeny.

Všechny preparáty kontrolních skupin byly po celou dobu experimentálního protokolu funkčně hodnotitelné s adekvátní vazokonstrikční odpovědí.

Pro statistické vyhodnocení jsme použili metodu analýzy opakovaných měření (ANOVA) s následnými testy Fishera (Fisher PLSD post hoc) a Gamese/Howella. K zhodnocení byl používán software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Výsledky jsou číselně i graficky vyjadřovány jako střední hodnoty \pm SEM.

2.3.2.3 Experimentální skupiny

Studie byla prováděna na 4 skupinách potkanů kmene Wistar, hmotnosti 250 ± 30 g a stáří 2-3 měsíců, každá se 6 pokusnými zvířaty. Jednalo se o 2 skupiny pohlavně dospělých samců (skupina kontrolní-Cm a experimentální-M) a 2 skupiny pohlavně dospělých samic (skupina kontrolní-Cf a experimentální- F), viz Tab 2.2.

Veškeré postupy byly v souladu se směrnicemi Evropského společenství pro pokusná zvířata.

Pokusné skupiny samců (M) a samic (F) prošly experimentálním protokolem včetně vystavení teplé a studené ischemie dle výše popsaného postupu (2.3.2.1. Protokol experimentu).

Během teplé ani studené ischemie nebyly jejich plíce ventilovány a během reperfúze byla zahájena ventilace normoxickou směsí plynů (21% O₂ + 5% CO₂ + 74% N₂).

	Skupiny	Teplá ischemie 90min	Studená ischemie 60min	Reperfúze protokol 120min měření
		Bez ventilace	Bez ventilace	Normoxická ventilace
Kontrolní skupiny	Cf (samičí)			x
	Cm (samčí)			x
Experimentální skupiny	F (samičí)	x	x	x
	M (samčí)	x	x	x

Tabulka 2.2: Experimentální skupiny

Zvířata kontrolních skupin (Cf-samičí, Cm-samčí) nebyla vystavena období teplé ani studené ischemie. Blok srdce-plíce byl izolován ihned po usmrcení tiopentalem. Kontroly se tak od sebe lišily jen pohlavím. Postup a následná měření zcela odpovídala měření při pokusech s experimentálními skupinami.

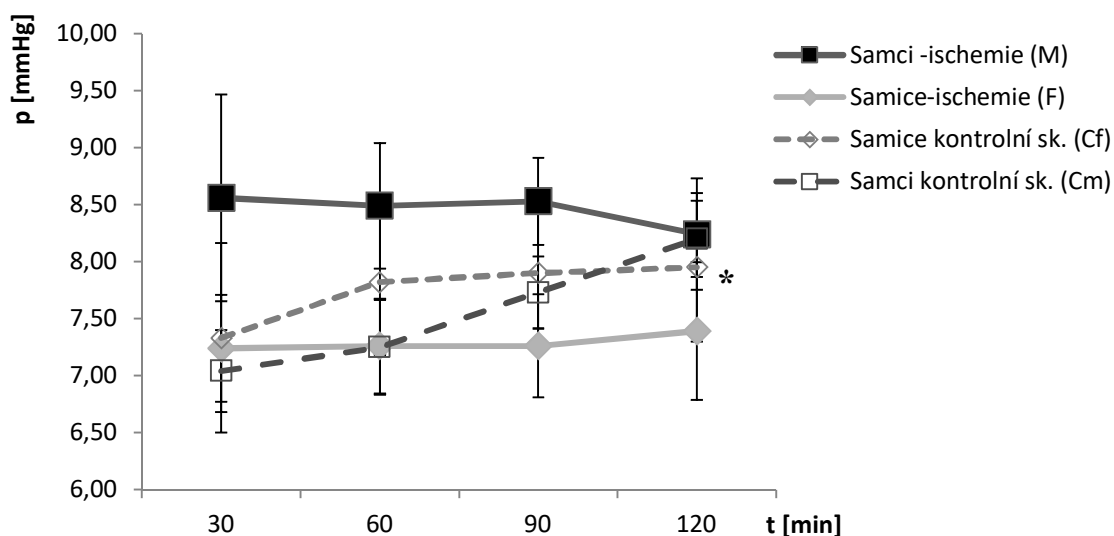
2.3.3 Výsledky

Jak jsme uvedli výše, měřené funkční vlastnosti plic byly v tomto experimentu: perfúzní tlak, změna hmotnosti preparátu, arterio-venózní diference a koncentrace ROS v perfúzátu. Tři preparáty experimentálních skupin byly ze studie vyřazeny pro rozvoj plicního edému a nahrazeny novými preparáty, které byly stejně jako všechny ostatní preparáty po celou dobu experimentálního protokolu funkčně hodnotitelné s adekvátní vazokonstriční odpovědí.

- **Perfúzní tlak (plicní vaskulární rezistence) p [mmHg]**

Při konstantním toku perfúzního roztoku jsou změny perfúzního tlaku výsledkem působení plicní vaskulární rezistence, která byla dle našich měření signifikantně vyšší u experimentální skupiny samců (M) * $p < 0,05$ oproti experimentální samičí skupině (F) - viz graf 2.7.

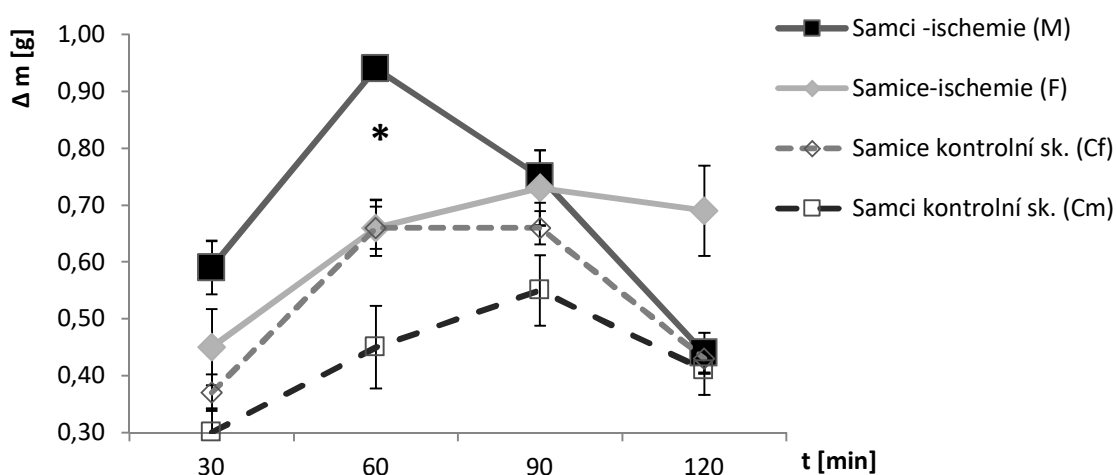
Naopak jsme nezaznamenali významný rozdíl mezi kontrolními (Cf, Cm) a mezi experimentálními (F, M) skupinami.



Graf 2. 7.: Vliv pohlaví na perfúzní tlak při ischemicko-reperfúzním poškození

- **Změna hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm [g]**

Při měření přírůstků hmotnosti preparátů nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi experimentálními skupinami (F, M). Staticky významný rozdíl jsme ale naměřili mezi samčí experimentální skupinou (M), která byla vystavena období teplé a studené ischemie, a samčí kontrolní skupinou (Cm) - * $p < 0,05$ (graf 2.8.).



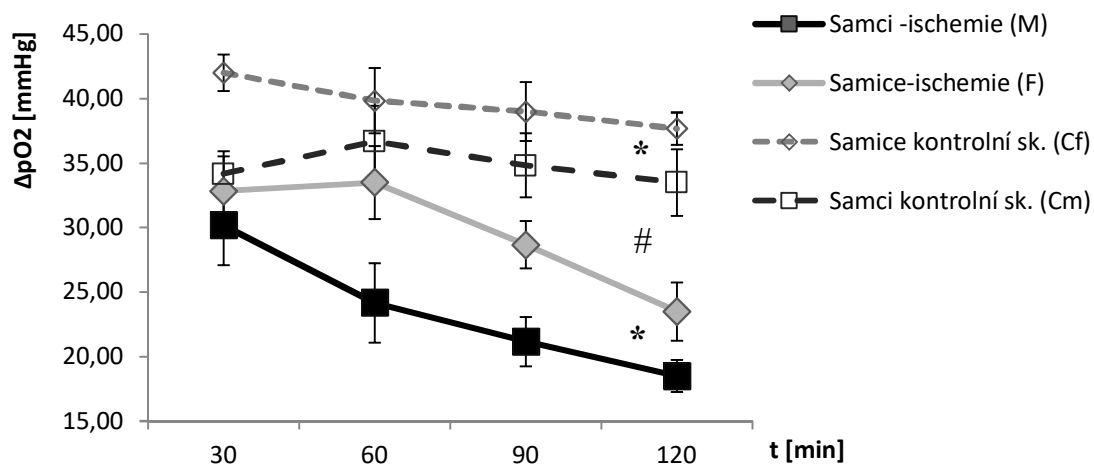
Graf 2. 8.: Vliv pohlaví na změny hmotnosti preparátu při ischemicko-reperfúzním poškození

- **Arterio-venosní diference parciálního tlaku O_2 (transportní schopnost plic pro přenos O_2)**
 ΔpO_2

Sledováním rozdílu arterio-venosního parciálního tlaku kyslíku jsme zjistili, že podstatně vyšší schopnost okysličení mají plíce experimentální samičí skupiny (F) ve srovnání se samčí experimentální skupinou (M) - * $p < 0,05$.

Nejvyšší schopnost okysličení byla ale zaznamenána zejména na počátku perfúze u kontrolní samičí skupiny (Cf), která nebyla vystavena období teplé a studené ischemie. Rozdíl

byl signifikantní oproti oběma experimentálním skupinám (F, M) ale i vůči kontrolní samčí skupině, jež také neprošla obdobím ischemie - # $p < 0,05$ (graf 2.9).



Graf 2. 9.: Vliv pohlaví na transportní schopnost plic pro přenos O_2 při ischemicko-reperfúzním poškození

- **Přímá koncentrace ROS v perfuzátu**

Hodnoty biologického antioxidačního potenciálu (PAT) ukázaly dle výsledků měření vyšší oxidační stres u vzorků experimentálních samčích skupiny (M) než u experimentální skupiny samičí (F). Zkouška PAT v perfuzátu experimentálních samic potkanů byla 350 ± 30 a u experimentálních samců 225 ± 35 IU Carr.

2.3.4 Diskuze

Dle uváděných hypotéz na počátku naší práce, jsme potvrdili existující genderové rozdíly u IR poškození plic v souladu s dřívějšími závěry u IR poškození jiných orgánů (Harada H. et al., 2001; Müller V. et al.; 2002 Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009). I v souladu s rozdílným průběhem a reakcemi u plicních onemocnění u mužů a žen (Carey MA. et al., 2007^a).

Z naší studie o vlivu rozdílu pohlaví na IR poranění plic po vystavení období teplé a studené ischemie u dárců s nebijícím srdcem vyplývají **4 hlavní závěry**:

1. Měření potvrdila pohlavně vázaný rozdíl transportní schopnosti O₂ po IR poškození u dárců s nebijícím srdcem. Prokázali jsme podstatně vyšší schopnost okysličení u experimentálních samičích plic (F) oproti experimentální skupině samců (M)- viz graf 2.9.
2. Významný ochranný účinek samičího pohlaví se projevil i při rozvoji vaskulární rezistence. Během experimentu stoupal perfúzní tlak na podkladě vzestupu periferní rezistence signifikantně více u experimentální skupiny samců (M)- viz graf 2.7.
3. Nepotvrdili jsme vliv sexuálního dimorfismu na vývoji plicního edému. Při měření jsme mezi pohlavími nezaznamenali signifikantní rozdíly- graf 2.8.
4. Naopak jsme jasně prokázali přímým měřením antioxidačního potenciálu vyšší oxidační stres u experimentální skupiny samců oproti experimentální skupině samic.

Na počátku diskuze musíme zdůraznit, že měření vycházela z Ex vivo experimentu v izolovaných plicích perfundovaných roztokem bez krevních elementů a vlastní plazmy. Výsledky tedy podporují možnost, že ochranné účinky pohlavních hormonů (v tomto

experimentu estrogenů) nemusí nutně vycházet z jejich aktuální plazmatické koncentrace a nejsou tak vázány pouze na In vivo probíhající měření.

V případě prvního závěru - **protektivního vlivu na transportní schopnost O₂ u samic** můžeme vycházet z práce Massara GD. et al., 1995. Jak bylo v teoretické části této práce uvedeno (kapitola 1.3.3 – Vliv pohlaví na radikálové poškození), dle Massary estrogeny na počátku pohlavní dospělosti samic krys a myši připravují evolučně samice na metabolické a oxygennační nároky reprodukce. Proto řízeně přes cytoplasmatické ER-receptory dojde k vývojovým změnám ve stavbě plic mezi samci a samicemi stejného druhu. Samice tak vykazují menší velikost alveolů ale celkově větší alveolární plochu na hmotnost těla a vyšší výměnu plynů na celkový povrch alveolů než samci stejného věku.

Později upřesnil ve svém přehledovém článku Carey MA. et al., 2007^b, že estrogeny uplatňují většinu svých účinků cestou receptorů ER α a ER β , které jsou různě zastoupeny v buňkách alveolů. Oba receptory jsou dle autora nutné pro vytvoření alveolů a správnou produkci surfaktantu. ER α zprostředkovává sexuální dimorfismus v celkové ploše alveolů a výměně plynů a ER β zodpovídají za nízkou vaskulární plicní rezistenci.

Uvažujeme-li o příčinách **protektivního vlivu samičího pohlaví na plicní vaskulární rezistenci** je nutno znovu poukázat na výše uváděné specifické receptory ER β ovlivňující právě vaskulární rezistenci v plicním parenchymu. Patrone C. et al., 2003 zkoumali myši s navozeným deficitem ER β a zjistili snížení tvorby PDGF-A (Platelet Derived Growth Factor-A) a GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) v plicích dospělých myši. Vzhledem k tomu, že tyto faktory jsou kritické ve formaci alveolárního uspořádání a tvorbě povrchově aktivních látek, mohou mít vliv na celkovou compliance plicní tkáně. Jejich celkový vliv na IR poškození u samců a samic ale není zcela objasněn. Murphy E. et Steenbergen C., 2007 uvádí, že některé studie podporují v případě IR srdce odpovědnost ER β za menší

ischemické poškození samčího srdce při infarktu myokardu (Yu HP. et al., 2006; Hsieh YC. et al., 2006). Naopak Booth EA. et al., 2005 uvádí, že podání bolusu ER β agonisty nemělo na IR poškození v případě srdečního svalu vliv ani u samců ani u samic.

Vaskulární rezistence je ale prokazatelně ovlivňována estrogenní regulací inducibilní NO syntázy (iNOS) a endoteliální NO syntázy (eNOS). Ty se podílí na regulaci plicní kapilární permeability a tím i změn perfúzního tlaku (Kawachi S. et al, 2000; Yu Z. et al., 2006). Estrogeny přes indukci iNOS a eNOS zvyšují dlouhodobě produkci oxidu dusnatého, který je účinnou signální molekulou. NO snižuje expresi adhezních molekul, zejména P selektinu, a snižuje akumulaci neutrofilů. (Kher A. et al., 2005)

Třetí závěr našich měření nepotvrdil předpokládané hypotézy. Při experimentu jsme oproti očekávání **nezaznamenali signifikantní rozdíl v rozvoji plicního edému** mezi experimentálními skupinami samic (F) a samců (M).

Carey MA. et al., 2007^b uvádí estrogeny jako významné regulátory aktivity chloridových kanálů cystické fibrózy (CFTR-chloride channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) a epiteliálních sodíkových kanálů (ENaC-epithelial sodium channel). CFTR i ENaC hrají důležitou roli v aktivní reabsorpci alveolární tekutiny při plicním edému. Zvýšená exprese ENaC v samicích plicích může tak být výhodou lepšího clearance plicní kapaliny během plicního edému (Sweezey N. et al., 1998). Vzhledem k tomu jsme předpokládali signifikantně menší rozvoj edému u experimentálních plic samic (F).

Diskrepanci mezi závěry této studie a našimi výsledky lze vysvětlit ex Vivo prostředím, ve kterém náš experiment probíhal a relativně krátkou dobou měření. Současně stejně jako u předchozí studie platí, že hmotnost plic se může navýšit i zvětšením pouze intravaskulárního objemu při vazodilataci cévního řečiště, nikoliv pouze rozvojem plicního edému.

Při měření změn hmotnosti (Δm) bloku srdce-plíce jsme ale zaznamenali signifikantní rozdíl mezi samčí experimentální (M) a samčí kontrolní skupinou (Cm), čímž jsme prokázali nepřímo výraznější ROS poškození a zvýšení propustnosti alveolokapilární membrány u samců vystavených období teplé a studené ischemie- viz graf 2.8. U samic nebyl rozdíl mezi experimentální (F) a kontrolní skupinou (Cf) signifikantní a tedy lze nepřímo předpokládat, že ROS poškození bylo menší než u samců.

K číselnému vyjádření ROS v naší studii jsme využili relativně novou metodu přímého měření tvorby ROS popisovanou Bertugliem S. a Giustim A., 2005. Výsledek měření potvrdil **nižší oxidační stres u experimentální skupiny samic (F)** oproti experimentální skupině samců (M). Jak bylo popsáno v kapitole 1.3.3 (Vliv pohlaví na radikálové poškození), protektivní vliv estrogenů na vznik ROS při IR poškození po období teplé a studené ischemie byl již předmětem několika předchozích studií.

Lacort M. et al., 1995 a Ruiz-Larrea B. et al., 1995 se zaměřili na inhibici peroxidace membránových lipidů a lipoproteinů přes ovlivnění redoxních reakcí přechodných kovů estrogeny. Arnal JF. et al., 1996 a Barp J. et al, 2002 připisují hlavní antioxidační účinek u estrogenů fenolické hydroxylové skupině v poloze 3, díky které působí jako scavengery. Massafra C. et al., 1998 uvádí, že estrogeny mohou indukovat expresi antioxidačních enzymů a tím stimulovat antioxidační obranný systém.

Celkově naše experimentální měření ve studii vlivu pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození při EVLP vede k závěru, že plíce samic jsou odolnější vůči IR poškození pod vystavení období teplé a studené ischemie. Proto je třeba dále tento výzkum rozvíjet a uvažovat i o klinické aplikaci výsledků. Ať už se jedná o benefit pro pacienta ve smyslu krátkodobého i dlouhodobého prospívání štěpu, volby vhodných dárců pro protokol NHBD ex vivo reperfuze plic anebo hledisko ekonomické náročnosti a investice do vhodných dárců.

3 ZÁVĚR

Ve své disertační práci jsem se zaměřila na otázku nedostatku dárců u transplantace plic. Stejně jako u ostatních orgánů i zde se neustále zvyšuje množství čekajících potencionálních příjemců, ale nedochází k adekvátnímu navýšení dárcovských orgánů. Tato diskrepance je dána neustále se zlepšující lékařskou péčí a vědeckými pokroky léčby onemocnění progredujících k plicnímu selhání a nutnosti zařazení na čekatelskou listinu. Toto téma je aktuální již mnoho let a je řešeno různými způsoby- viz kapitola 1.2. (Transplantace plic od dárců s nebijícím srdcem, Ex vivo rekondice plic).

V naší experimentální práci jsme se zaměřili na řešení, které se z dlouhodobého hlediska zdá jako nejúspěšnější a tím je transplantace orgánů od dárce s nebijícím srdcem (NHBDs). Protokol metody EVLP je neustále předmětem dalších studií a do budoucna umožňuje z našeho pohledu velký potenciál v navýšení počtu dárců o orgány, které by dříve k transplantaci nebyly přijaty.

Na podkladě dříve prováděných studií na plicích i jiných orgánech jsme se **v první experimentální části** práce soustředili na ischemicko-reperfúzní poškození plicní tkáně při ex vivo transplantaci plic od dárce s nebijícím srdcem na zvířecím modelu (potkan kmene Wistar). V návaznosti studií probíhajících dříve na našem pracovišti (Ústav fyziologie 2. LF UK: Skoumalova A. et al. 2008; Hodyc D. et al., 2008; Chovanec M. et al. 2009 nebo Herget J. et al., 2010) jsme se zabývali **možností ovlivnění ischemicko-reperfúzního radikálového poškození hyperkapnickou ventilací**. Měření jsme prováděli po hyperkapnické ventilaci v období reperfúze – experiment A a po hyperkapnické ventilaci v období teplé ischemie- experiment B. Sledované parametry byly: perfúzní tlak, změna hmotnosti plic a arterio-venosní difference parciálního tlaku O₂.

Studie prokázala předpokládanou hypotézu, že hyperkapnická ventilace má protektivní vliv na vznik ROS u IR poškození plic, ale jen v období reperfúze. Výsledky v období teplé ischemie nebyly vyhodnoceny jako signifikantní.

Celkově jsme získali 3 hlavní závěry první části experimentální studie, které byly diskutovány v oddíle 2.2.4 (Diskuze):

- Ventilace hyperkapnickou směsí plynů během období reperfúze omezuje rozvoj plicního edému po vystavení plicní tkáně období teplé ischemie. (viz graf 2.2.)
- Ventilace hyperkapnickou směsí plynů během období reperfúze má ochranný účinek na transportní schopnost plicní tkáně pro O₂ po vystavení plicní tkáně období teplé ischemie. (viz graf 2.3.)
- Hyperkapnická ventilace nemá ochranný účinek při ventilaci po dobu teplé ischemie.

Výsledky měření první studie jsou významné pro zvážení klinické aplikace a pro provedení dalších studií zabývajících se možnostmi hyperkapnické terapie plicní tkáně. Vliv CO₂ na plicní edém a jeho ochranný účinek na přenosovou schopnost plic pro kyslík pouze během reperfúze po vystavení období teplé a studené ischemie, by mohl být využíván pro protokol transplantace NHBD a to zejména v ex vivo transplantačním programu. To by mohlo vést k využití plicních štěpů, které nebyly dříve k transplantaci přijímány.

Ve **druhé experimentální studii** jsme navázali na velmi aktuální téma **vlivu pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP u dárce s nebijícím srdcem**. Vycházeli jsme z dříve potvrzených genderových rozdílů u IR poškození jiných orgánů (Harada H. et al., 2001; Müller V. et al.; 2002 Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009). Naši hypotézu podporovaly i rozdíly v průběhu a odlišné reakce na terapii u plicních onemocnění u mužů a žen (Carey MA. et al., 2007^a).

Provedená měření sledovala stejné parametry jako v prvním experimentu a navíc nově přímo měřila oxidační stres u samců a samic experimentálních zvířat. I zde jsme naplnili předpokládané hypotézy a získali jsme 4 hlavní závěry, jež jsou podrobně diskutovány v kapitole 2.3.4 (Diskuze):

- Měření potvrdila pohlavně vázaný rozdíl transportní schopnosti O₂ po IR poškození u dárců s nebijícím srdcem. Prokázali jsme podstatně vyšší schopnost okysličení u experimentálních samičích plic (F) oproti experimentální skupině samců (M)- viz graf 2.9.
- Významný ochranný účinek samičího pohlaví se projevil i při rozvoji vaskulární rezistence. Během experimentu stoupal perfúzní tlak na podkladě vzestupu periferní rezistence signifikantně více u experimentální skupiny samců (M)- viz graf 2.7.
- Nepotvrdili jsme vliv sexuálního dimorfismu na vývoji plicního edému. Při měření jsme mezi pohlavími nezaznamenali signifikantní rozdíly- viz graf 2.8.
- Naopak jsme jasně prokázali přímým měřením antioxidačního potenciálu vyšší oxidační stres u experimentální skupiny samců oproti experimentální skupině samic.

Celkový závěr naší druhé experimentální studie vlivu pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození při EVLP je potvrzení, že plíce samic jsou odolnější vůči IR poškození po vystavení období teplé a studené ischemie. Tento výzkum je jistě možno dále rozvíjet a uvažovat o klinické aplikaci výsledků. Ať už se jedná o benefit pro pacienta ve smyslu krátkodobého i dlouhodobého prospívání štěpu nebo volby vhodných dárců pro protokol NHBD ex vivo reperfúze plic, případně hledisko ekonomické náročnosti a investice do vhodných dárců.

4 SUMMARY

I focused in my dissertation thesis on the issue of the lack of donors for lung transplants. As with other organs, the number of waiting potential receivers is constantly increasing, while there is not an adequate increase in donor organs. This discrepancy is caused by constantly improving healthcare and scientific progress in the therapy of the diseases with progression to lung failure and necessity of being put on a waiting list. This topic has been an issue for many years and is being resolved in various ways – see Chapter 1.2. (Lung transplant from non-heart-beating donors, *ex vivo* lung reconditioning).

We focused our experimental work on the solution which seems to be most successful from the long-term perspective: organ transplants from non-heart-beating donors (NHBDs). The protocol of EVLP method is incessantly subject to further studies and, from our point of view, has a great potential for future increase in the number of donors by means of organs which would not have been accepted for transplants before.

On the base of the studies conducted before with lungs and other organs, we focused on ischemia-reperfusion injury of lung tissue in *ex vivo* lung transplants from a non-heart-beating donor on an animal model (Wistar rats) in the **first experimental part** of the work. Following up the studies conducted at our workplace (Institute of Physiology, Second Faculty of Medicine, Charles University: Skoumalova A. et al. 2008; Hodyc D. et al., 2008; Chovanec M. et al. 2009 or Herget J. et al., 2010) before, we investigated **the possibility of influencing the ischemia-reperfusion radical injury by hypercapnic ventilation**. We performed the relevant measurements after hypercapnic ventilation, in the periods of reperfusion and warm ischemia – Experiments A and B, respectively. The parameters observed included: perfusion pressure, change in lung weight and arterial-venous differentiation of partial O₂ pressure.

The study demonstrated the assumed hypothesis that hypercapnic ventilation has a protective effect on ROS development in IR lung injury, but only in the period of reperfusion. The results of warm ischemia were not assessed as significant.

In total, we obtained three main conclusions of the first part of our experimental study, which were discussed in Section 2.2.4 (Discussion):

- Ventilation by hypercapnic mixture of gases during the period of reperfusion reduces the development of lung oedema after the exposure of the lung tissue to the period of warm ischemia (see Graph 2.2.).
- Ventilation by hypercapnic mixture of gases during the period of reperfusion has a protective effect on the transport abilities of the lung tissue for O₂ after its exposure to the period of warm ischemia (see Graph 2.3.).
- Hypercapnic ventilation does not have a protective effect during ventilation in the period of warm ischemia.

The results of the measurements of the first study are significant for consideration of clinical application and for conducting further studies dealing with the possibilities of hypercapnic ventilation of the lung tissue. The effect of CO₂ on lung oedema and its protective effect on the transport ability of lungs for oxygen only during reperfusion after the exposure to the period of warm and cold ischemia could be used for the protocol of NHBD transplant, mainly in *ex vivo* transplant programme. This could lead to the use of lung grafts which would not have been accepted for transplants before.

In the **second experimental study**, we followed up a very topical issue of **the effect of gender on ischemia-reperfusion lung injury in EVLP in a non-heart-beating donor**. We laboured upon gender differences in IR injury of other organs confirmed before (Harada H.

et al., 2001; Müller V. et al.; 2002 Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009). Our hypothesis was also supported by the differences in the course of the therapy of lung diseases in men and women and various reactions to it (Carey MA. et al., 2007^a).

The performed measurements investigated the same parameters as in the first experiment and, additionally, newly measured oxidation stress in male and female experimental animals in a direct way. We confirmed the presumed hypotheses and obtained four main conclusions, discussed in details in Chapter 2.3.4 (Discussion):

- The measurements confirmed the gender-related difference of the transport ability of O₂ after IR injury in non-beating-heart donors. We demonstrated substantially higher oxygenation ability in experimental female (F) lungs compared with an experimental group of males (M) – see Graph 2.9.
- The significant protective effect of the female gender was also manifested in the development of vascular resistance. During the experiment, based on the increase in peripheral resistance the perfusion pressure increased significantly more in the experimental male (M) group – see Graph 2.7.
- We did not confirm the effect of sexual dimorphism on the development of lung oedema. We did not notice significant differences between genders – see Graph 2.8.
- On the contrary, using a direct measurement of antioxidative potential, we clearly demonstrated higher oxidative stress in an experimental group of males, compared to that of females.

The general conclusion of our second experimental study of the effect of gender on ischemia-reperfusion injury in EVLP is the confirmation that female lungs are more resistant to IR injury after their exposure to the period of warm and cold ischemia. This research can be

further developed and it is possible to consider clinical application of the results. Either it means a benefit for a patient in terms of short- or long-term thriving of the graft or selection of suitable donors for the NHBD protocol of *ex vivo* lung reperfusion or a perspective of economic demands and investments in suitable donors.

5 REFERENCE

1. AKCA, Ozan, et al. Hypercapnia Improves Tissue Oxygenation. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2001, 2001: B30-B30.
2. ALESSANDRINI, Francesca, et al. When does the lung die? II. Ultrastructural evidence of pulmonary viability after" death". *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 1993, 13.5: 748-757.
3. AL-MEHDI, Abu B., et al. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circulation Research*, 1998, 83.7: 730-737.
4. ARNAL, J. F., et al. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93.9: 4108-4113.
5. BARP, Jaqueline, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002, 35.9: 1075-1081.
6. BERTUGLIA, Silvia; GIUSTI, Andrea. Role of nitric oxide in capillary perfusion and oxygen delivery regulation during systemic hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005, 288.2: H525-H531.
7. BINNS, O. A., et al. Impaired bronchial healing after lung donation from non-heart-beating donors. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 1996, 15.11: 1084-1092.
8. BOGLIONE, Mariano M., et al. Pre-arrest heparinization and ventilation during warm ischemia preserves lung function in non-heart-beating donors. *Journal of pediatric surgery*, 1999, 34.12: 1805-1809.
9. BOLLI, Roberto, et al. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86.12: 4695-4699.
10. BOOTH, Erin A.; OBEID, Nabeel R.; LUCCHESI, Benedict R. Activation of estrogen receptor- α protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2005, 289.5: H2039-H2047.
11. BOWDEN, D. H.; ADAMSON, I. Y.; WYATT, J. P. Reaction of the lung cells to a high concentration of oxygen. *Archives of pathology*, 1968, 86.6: 671-675.
12. CAREY ^a, Michelle A., et al. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2007, 293.2: L272-L278
13. CAREY ^b, Michelle A., et al. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2007, 18.8: 308-313.
14. CARREL, Alexis; LINDBERGH, Charles A. The culture of whole organs. *Science*, 1935, 81.2112: 621-623.
15. CHEN, Jin-Qiang; YAGER, James D.; RUSSO, Jose. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2005, 1746.1: 1-17.
16. CHOVANEC, M., et al. Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiological Research*, 2009, 58: S79.

17. CHRISTIE, Jason D., et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report—2008. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2008, 27.9: 957-969.
18. CHRISTIE, Jason D., et al. Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2009, 180.10: 1010-1015.
19. COHEN, Gerald. The fenton reaction. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, 1985, 55-64.
20. COUSE, John F., et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*, 1997, 138.11: 4613-4621.
21. COVARRUBIAS, M., et al. Plasma intercellular adhesion molecule - 1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation. *American journal of transplantation*, 2007, 7.11: 2573-2578.
22. CRAPO, James D., et al. Structural and Biochemical Changes in Rat Lungs Occurring During Exposures to Lethal and Adaptive Doses of Oxygen 1–3. *American Review of Respiratory Disease*, 1980, 122.1: 123-143.
23. CURLEY, Gerard F.; LAFFEY, John G.; KAVANAGH, Brian P. CrossTalk proposal: there is added benefit to providing permissive hypercapnia in the treatment of ARDS. *The Journal of physiology*, 2013, 591.11: 2763-2765.
24. CYPEL, M., et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2009, 9.10: 2262-2269.
25. CYPEL, Marcelo, et al. Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2012, 144.5: 1200-1207.
26. D'ARMINI, Andrea M., et al. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after " death". *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 1993, 13.5: 741-747.
27. DAURIAT, Gaëlle, et al. Lung transplantation for pulmonary Langerhans' cell histiocytosis: a multicenter analysis. *Transplantation*, 2006, 81.5: 746-750.
28. DE PERROT, Marc, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002, 165.2: 211-215.
29. DE PERROT, Marc, et al. Ischemia–reperfusion–induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2003, 167.4: 490-511.
30. DE VLEESCHAUWER, Stéphanie, et al. Early outcome after lung transplantation from non–heart-beating donors is comparable to heart-beating donors. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2009, 28.4: 380-387.
31. DOMINO, Karen B., et al. Ventilation heterogeneity is increased in hypocapnic dogs but not pigs. *Respiration physiology*, 1998, 111.1: 89-100.
32. ECKENHOFF, RODERIC G., et al. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *Journal of Applied Physiology*, 1992, 72.4: 1454-1460.
33. EGAN, Thomas M., et al. A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *The Annals of thoracic surgery*, 1991, 52.5: 1113-1121.
34. EGAN, Thomas M., et al. Analysis of referrals for lung transplantation. *Chest*, 1991, 99.4: 867-870.

35. EGAN, Thomas M., et al. Isolated lung transplantation for end-stage lung disease: a viable therapy. *The Annals of thoracic surgery*, 1992, 53.4: 590-596.
36. EPPINGER, Michael J., et al. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *The American journal of pathology*, 1997, 150.5: 1773.
37. FISHER, ARON B.; DODIA, CHANDRA. Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 1981, 241.1: E47-E50.
38. FISHER, Aron B., et al. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *Journal of Clinical Investigation*, 1991, 88.2: 674.
39. FISER, Steven M., et al. Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 2001, 121.6: 1069-1075.
40. FREEMAN, Bruce A.; CRAPO, James D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*, 1981, 256.21: 10986-10992.
41. GILBERT, Daniel L. Oxygen: an overall biological view. In: *Oxygen and living processes*. Springer New York, 1981. p. 376-392.
42. HARADA, Hirohisa, et al. Selected contribution: Effects of gender on reduced-size liver ischemia and reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology*, 2001, 91.6: 2816-2822.
43. HARDY, James D., et al. Lung homotransplantation in man: report of the initial case. *Jama*, 1963, 186.12: 1065-1074.
44. HAUSENLOY, Derek J.; YELLON, Derek M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*, 2013, 123.1: 92-100.
45. HEFFNER, John E.; REPINE, John E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *American Review of Respiratory Disease*, 1989, 140.2: 531-554.
46. HERGET, Jan; CHOVANEC, Milan. Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2010, 7.3: 131-135.
47. HOIDAL, John R., et al. Lung injury and oxidoreductases. *Environmental health perspectives*, 1998, 106.Suppl 5: 1235.
48. HODYC, Daniel, et al. Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production. *Experimental physiology*, 2007, 92.5: 945-951.
49. HODYC, Daniel, et al. Pre-arrest Administration of the Cell-permeable Free Radical Scavenger Tempol Reduces Warm Ischemic Damage of Lung Function in Non-Heart-beating Donors. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2008, 27.8: 890-897.
50. Hodyc, Daniel. *Význam volných kyslíkových radikálů při ischemicko – reperfučním poškození plic získaných od dárců po srdeční zástavě*. Praha, 2008. 54, 2. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav fyziologie 2. LF UK, Školitel: Herget, Jan.
51. HSIEH, Ya-Ching, et al. Inhibition of cardiac PGC-1 α expression abolishes ER β agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *The FASEB journal*, 2006, 20.8: 1109-1117.
52. INCI, Ilhan, et al. Fibrinolytic treatment improves the quality of lungs retrieved from non-heart-beating donors. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2007, 26.10: 1054-1060.

53. IVEY, Claire L., et al. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95.6: 2720.
54. JENKINSON, S. G. Oxygen toxicity. *New horizons (Baltimore, Md.)*, 1993, 1.4: 504-511.
55. JORDAN, James E.; ZHAO, Zhi-Qing; VINTEN-JOHANSEN, Jakob. The role of neutrophils in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 1999, 43.4: 860-878.
56. KAPANCI, Y., et al. Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1969, 20.1: 101-118.
57. KAVANAGH, B. P.; LAFFEY, J. G. Hypercapnia: permissive and therapeutic. *Minerva anesthesiologica*, 2006, 72.6: 567-576.
58. KAWACHI, Shigeyuki, et al. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000, 276.3: 851-854.
59. KENNEDY, Thomas P., et al. Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *Journal of Clinical Investigation*, 1989, 83.4: 1326.
60. KHER, Ajay, et al. Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. *Shock*, 2005, 23.1: 1-10.
61. KREGENOW, D. A.; SWENSON, E. R. The lung and carbon dioxide: implications for permissive and therapeutic hypercapnia. *European Respiratory Journal*, 2002, 20.1: 6-11.
62. LACORT, Mercedes, et al. Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids*, 1995, 30.2: 141-146.
63. LAFFEY, John G.; KAVANAGH, Brian P. Carbon dioxide and the critically ill—too little of a good thing?. *The Lancet*, 1999, 354.9186: 1283-1286.
64. LAFFEY, John G., et al. Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2000, 162.6: 2287-2294.
65. LANSMAN, Jeffrey B. Going with the flow. *Nature*, 1988, 331: 481-482.
66. LEVVEY, Bronwyn J., et al. Definitions of warm ischemic time when using controlled donation after cardiac death lung donors. *Transplantation*, 2008, 86.12: 1702-1706.
67. LOEHE, Florian, et al. Tissue damage of non-heart-beating donor lungs after long-term preservation: evaluation of histologic alteration, bronchoalveolar lavage, and energy metabolism. *Shock*, 2002, 17.6: 502-507.
68. LØNBORG, Jacob Thomsen. Targeting reperfusion injury in the era of primary percutaneous coronary intervention: hope or hype?. *Heart*, 2015, heartjnl-2015-307804.
69. LYMAR, Sergei V.; HURST, James K. Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant?. *Chemical research in toxicology*, 1996, 9.5: 845-850.
70. MASSARO, Donald; MASSARO, Gloria DeCarlo. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006, 290.5: L866-L870.
71. MASSARO, Gloria D.; MORTOLA, Jacopo P.; MASSARO, Donald. Sexual dimorphism in the architecture of the lung's gas-exchange region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92.4: 1105-1107.

72. MASSARO, GLORIA D.; MORTOLA, JACOPO P.; MASSARO, DONALD. Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface area and alveoli in female rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1996, 270.1: L110-L114.
73. MASSAFRA, Cosimo, et al. Variations in erythrocyte antioxidant glutathione peroxidase activity during the menstrual cycle. *Clinical endocrinology*, 1998, 49.1: 63-67.
74. MATSUMURA, A., et al. Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four-hour canine lung preservation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1993, 105.3: 480-491.
75. MCCORD, Joe M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 1985, 312.3: 159-163.
76. MOORE, TIMOTHY M.; KHIMENKO, PAVEL L.; TAYLOR, AUBREY E. Restoration of normal pH triggers ischemia-reperfusion injury in lung by Na⁺/H⁺ exchange activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1995, 269.4: H1501-H1505.
77. MRAZKOVA, Hana, et al. The protective effect of hypercapnia on ischemia-reperfusion injury in lungs. *Respiratory physiology & neurobiology*, 2015, 205: 42-46.
78. MRAZKOVA, Hana, et al. Influence of gender on ischemia-reperfusion injury in lungs in an animal model. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2016.
79. MÜLLER, Veronika, et al. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney international*, 2002, 62.4: 1364-1371.
80. MURPHY, Elizabeth; STEENBERGEN, Charles. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 2007, 75.3: 478-486.
81. NEWMAN, JOHN H., et al. Effects of 100% oxygen on lung vascular function in awake sheep. *Journal of Applied Physiology*, 1983, 54.5: 1379-1386.
82. NISHIO, Kazumi, et al. Effects of hypercapnia and hypocapnia on [Ca²⁺]_i mobilization in human pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Applied Physiology*, 2001, 90.6: 2094-2100.
83. NOMURA, Fumikazu, et al. Effects of hypercarbic acidotic reperfusion on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *Circulation*, 1994, 90.5 Pt 2: II321-7.
84. NUEDLING, Simone, et al. 17β-Estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovascular research*, 1999, 43.3: 666-674.
85. OSTADAL, Bohuslav, et al. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection—experimental aspects. *Experimental Biology and Medicine*, 2009, 234.9: 1011-1019.
86. OTO, Takahiro. Lung transplantation from donation after cardiac death (non-heart-beating) donors. *General thoracic and cardiovascular surgery*, 2008, 56.11: 533-538.
87. PATRONE, Cesare, et al. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor β. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23.23: 8542-8552.
88. PATTERSON, G. A., et al. Airway complications after double lung transplantation. Toronto Lung Transplant Group. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 1990, 99.1: 14-20; discussion 20-1.
89. PECHET, Taine T., et al. Lung transplantation for lymphangioliomyomatosis. *The Journal of heart and lung transplantation*, 2004, 23.3: 301-308.

90. PINSKY, David J., et al. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, 102.5: 919.
91. RAEMDONCK, Dirk, et al. Ex - vivo lung perfusion. *Transplant International*, 2015, 28.6: 643-656.
92. REITZ, Bruck A., et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *New England Journal of Medicine*, 1982, 306.10: 557-564.
93. RUIZ-LARREA, Begoña, et al. Effects of estrogens on the redox chemistry of iron: a possible mechanism of the antioxidant action of estrogens. *Steroids*, 1995, 60.11: 780-783.
94. SATO, Yukio, et al. Endothelin-1 changes polymorphonuclear leukocytes' deformability and CD11b expression and promotes their retention in the lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2000, 23.3: 404-410.
95. SHIBATA, Keizo, et al. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1998, 158.5: 1578-1584.
96. SKOUMALOVÁ, Alice; HERGET, Jan; WILHELM, Jiří. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell biochemistry and function*, 2008, 26.7: 801-807.
97. SHORR, Andrew F.; DAVIES, Darcy B.; NATHAN, Steven D. Predicting mortality in patients with sarcoidosis awaiting lung transplantation. *CHEST Journal*, 2003, 124.3: 922-928.
98. SOMERO, G. N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1986, 251.2: R197-R213.
99. STEEN, Stig, et al. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *The Lancet*, 2001, 357.9259: 825-829.
100. STEINBERG, Harry, et al. The effect of oxygen-derived free radicals on pulmonary endothelial cell function in the isolated perfused rat lung. *Experimental lung research*, 1982, 3.2: 163-173.
101. STEINBERG, Harry, et al. The Effect of Oxygen Adaptation on Oxyradical Injury to Pulmonary Endothelium 1–3. *American Review of Respiratory Disease*, 1983, 128.1: 94-97.
102. SWEEZEY, N., et al. Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1998, 274.2: C379-C386.
103. SWENSON, Erik R.; ROBERTSON, H. Thomas; HLASTALA, Michael P. Effects of inspired carbon dioxide on ventilation-perfusion matching in normoxia, hypoxia, and hyperoxia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1994, 149.6: 1563-1569.
104. TIKKANEN, Jussi M., et al. Functional outcomes and quality of life after normothermic ex vivo lung perfusion lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015, 34.4: 547-556.
105. TUREK, Zdenek; KREUZER, Ferdinand. Effect of shifts of the O₂ dissociation curve upon alveolar-arterial O₂ gradients in computer models of the lung with ventilation-perfusion mismatching. *Respiration physiology*, 1981, 45.2: 133-139.
106. ULICNY, Karl S., et al. Cadaver lung donors: effect of preharvest ventilation on graft function. *The Annals of thoracic surgery*, 1993, 55.5: 1185-1191.
107. VAN RAEMDONCK, Dirk EM, et al. Extended preservation of ischemic pulmonary graft by postmortem alveolar expansion. *The Annals of thoracic surgery*, 1997, 64.3: 801-808.

108. VAN RAEMDONCK, D. E., et al. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Annals of surgery*, 1998, 228.6: 788.
109. VANNUCCI, Robert C., et al. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics*, 1995, 95.6: 868-874.
110. VERMA, Subodh, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*, 2002, 105.20: 2332-2336.
111. VESELA, A.; WILHELM, J. The role of carbon dioxide in free radical reactions in organism. *Physiological research*, 2002, 51.4: 335-340.
112. WANG, Zhen, et al. Acute hypercapnia improves indices of tissue oxygenation more than dobutamine in septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2008, 177.2: 178-183.
113. WINSLOW, Robert M. Oxygen: the poison is in the dose. *Transfusion*, 2013, 53.2: 424-437.
114. WITTEWER, Thorsten, et al. Innovative pulmonary preservation of non-heart-beating donor grafts in experimental lung transplantation. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 2004, 26.1: 144-150.
115. YU, Huang-Ping, et al. Mechanism of cardioprotection following trauma-hemorrhagic shock by a selective estrogen receptor- β agonist: up-regulation of cardiac heat shock factor-1 and heat shock proteins. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2006, 40.1: 185-194.
116. YU, Zhiyuan, et al. Nitric oxide-dependent negative feedback of PARP-1 trans-activation of the inducible nitric-oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281.14: 9101-9109.
117. YUSEN, Roger D., et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-second official adult lung and heart-lung transplantation report—2015; focus theme: early graft failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2015, 34.10: 1264-1277.

- **Příloha 1.** - Mrazkova, H., Lischke, R., Hodyc, D., & Herget, J. (2015). The protective effect of hypercapnia on ischemia-reperfusion injury in lungs. *Respiratory physiology & neurobiology*, 205, 42-46.
- **Příloha 2.** - Mrazkova, H., Lischke, R., & Herget, J. (2016). Influence of gender on ischemia-reperfusion injury in lungs in an animal model. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*.
- **Příloha 3.** - autoreferát