

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Hana Mrázková

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: III. chirurgická klinika 1. LF UK a FN Motol

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

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce.....	7
3. Protektivní vliv hyperkapnie na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP na zvířecím modelu.....	8
3.1. Metodika a materiál	8
3.2. Výsledky	9
<i>Experiment A – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní poškození u plic v období reperfúze.....</i>	<i>9</i>
<i>Experiment B – vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfúzní poškození u plic v období teplé ischemie</i>	<i>11</i>
3.3. Diskuze	13
4 Vliv pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP na zvířecím modelu	14
4.1. Metodika a materiál.....	14
4.2. Výsledky	15
4.3. Diskuze	17
5 Závěr	18
Reference.....	19
Seznam publikací.....	20

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 = DCDs) 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 změřili na možný **protektivní vliv hyperkapnické ventilace na ischemicko-reperfuční (IR) poškození plic** při EVLP. Studie potvrdila hypotézu, že hyperkapnická ventilace má protektivní vliv na vznik volných kyslíkových radikálů (ROS) u IR poškození plic, ale pouze pokud je využita v období reperfuze.

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. Úvod

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. (Cypel M., 2009). Tato diskrepance je dána stále 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.

V naší experimentální práci se zabýváme řešením, které se z dlouhodobého hlediska zdá jako nejúspěšnější a tím je transplantace orgánů od dárce s nebijícím srdcem (NHBDs) v protokolu ex vivo lung perfusion (EVLP), kdy je blok srdce-plíce perfundován a ventilován mimo tělo dárce i příjemce a je tedy prodloužena doba teplé ischemie. Protokol metody EVLP je neustále předmětem dalších studií a do budoucna umožňuje velký potenciál v navýšení počtu dárců o orgány, které by dříve k transplantaci nebyly přijaty.

Během období teplé ischemie, kdy orgán není ventilován ani perfundován a následně je vystaven reperfúzi, dochází k poškození plic způsobenému různými mechanismy. Toto poškození nazýváme ischemicko-reperfúzní (IR) a mimo jiné mechanismy je způsobeno i zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů (ROS). V naší práci se zabýváme možnostmi ovlivnění produkce a reakcí ROS u IR poškození plic při EVLP.

V prvním experimentu jsme studovali vliv hyperkapnické ventilace na IR poškození při EVLP. V experimentech jsme vycházeli z předchozích studií, které prokázaly, že hyperkapnie může mít specifické ochranné účinky na jednotlivé orgánové systémy včetně plic (Kregenow DA. et Swenson ER., 2002; Moore TM. et al., 1995; Laffey JG. et al., 1999).

Ve druhém experimentu jsme sledovali protektivní vliv pohlaví na IR poškození při EVLP. I zde jsme vycházeli z dřívějších experimentálních studií u jiných orgánových systémů jako například IR poškození srdce (Murphy E. et al., 2007; Ostadal B. et al., 2009). Současně většina dostupných studií ukazuje, že ženy jsou vůči IR poškození různých tkání včetně plicní odolnější (pro přehled viz Carrey MA et al., 2007).

2. Hypotézy a cíle práce

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 na našem pracovišti – Ústav fyziologie 2. LF UK (Skoumalova A. et al. 2008; Chovanec M. et al. 2009), které potvrdily protektivní vliv hyperkapnie například na hypoxickou plicní hypertensi nebo na funkce erytrocytů. Současně jsme vycházeli i z poznatků dalších studií, které ukazují, že hyperkapnická acidóza a/nebo zvýšení CO₂ ve vdechované směsi plynů (hyperkapnická ventilace) má ochranný vliv při ex vivo reperfúzním poškození plic (Moore TM. et al., 1995; Laffey JG. et al., 1999).

- **Hypotéza:** Hyperkapnická ventilace má protektivní vliv na IR poškození plic při EVLP.
- **Cílem studie bylo zjistit:**
 1. zda hyperkapnická ventilace bude mít protektivní účinky na radikálové poškození plicní tkáně i v případě EVLP modelu.
 2. zda má hyperkapnická ventilace stejný protektivní účinek, pokud je použita jen v období teplé ischemie nebo jen v období reperfúze.

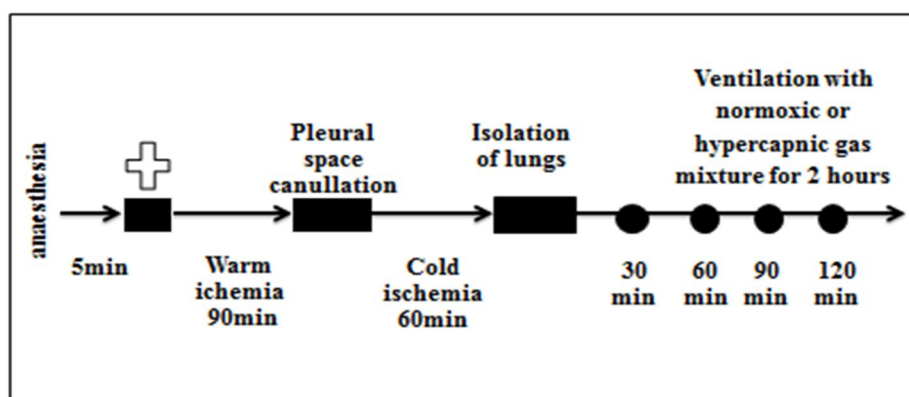
Ve druhém experimentu jsme **posuzovali vliv pohlaví na ischemicko-reperfúzní poškození plic při EVLP**. Domněnka odlišné reakce plicní tkáně na IR poškození u mužů a žen vznikla na podkladě předchozích publikovaných prací, které se zabývaly různými orgánovými systémy a odlišnosti prokázaly: Harada H. 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. Předpoklad jiného chování vůči poškození ROS u plic také vychází z rozdílného průběhu a reakcí na terapii některých plicních onemocnění u mužů a žen, jak uvádí Carey MA. et al., 2007.

- **Hypotéza:** Samičí pohlaví má protektivní vliv na IR poškození plicní tkáně při EVLP.
- **Cílem studie bylo zjistit,** zda bude mít samčí či samičí pohlaví protektivní vliv na radikálové poškození plicní tkáně v případě EVLP modelu.

3. Protektivní vliv hyperkapnie na ischemicko – reperfuční poškození plic při EVLP na zvířecím modelu

3.1. Metodika a materiál

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: Herget J. et Chovanec M., 2010. (Obrázek 1). Podrobný protokol je uveden v disertační práci.



Obrázek 1.: Schematický protokol experimentu vlivu hyperkapnické ventilace na IR poškození plic (Mrázková H. et al., 2015)

Zvířata byla na počátku pokusu anestetizována a následně z drobné laparotomie byl do jater podán injekčně heparin. Po 5 minutách bylo zvíře usmrceno letální dávkou tiopentalu. 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 – následovalo 60 minut období studené ischemie. Poté jsme preparovali a isolovali orgánový blok srdce – plíce dle dříve popsanych postupů – Herget J. et al., 2010. Po stabilisaci 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)

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. Rozdělení skupin a druh i čas ventilace je přehledně zpracován v tabulce 1.

Studie byla rozdělena do dvou experimentů:

- **Experiment A** – účinek hyperkapnické ventilace v období reperfúze
- **Experiment B** – účinek hyperkapnické 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 normoxická				X	
	Ch hyperkapnická					X
A	An normoxická		X	X	X	
	Ah hyperkapnická		X	X		X
B	Bh hyperkapnická	X		X	X	
	B0 bez ventilace		X	X	X	

Tabulka 1.: Experimentální skupiny

3.2. Výsledky

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

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

Mezi experimentálními (An, Ah) a kontrolními skupinami (Cn, Ch) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl ve změnách perfúzního tlaku. (viz graf 1.)

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

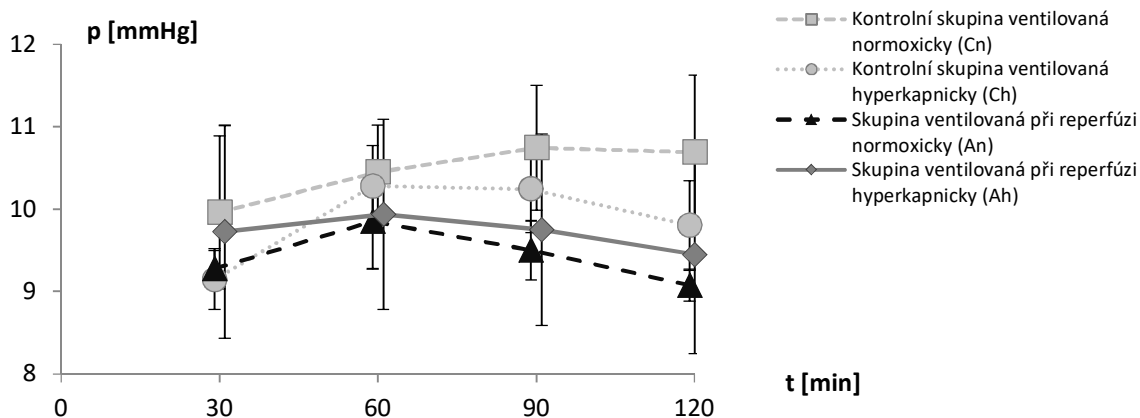
Mezi kontrolními skupinami (Cn, Ch) jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly ve změně hmotnosti preparátů. Plicní edém během experimentu u většiny preparátů v malé míře vznikl, ale nebyl překážkou funkčního hodnocení.

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.)

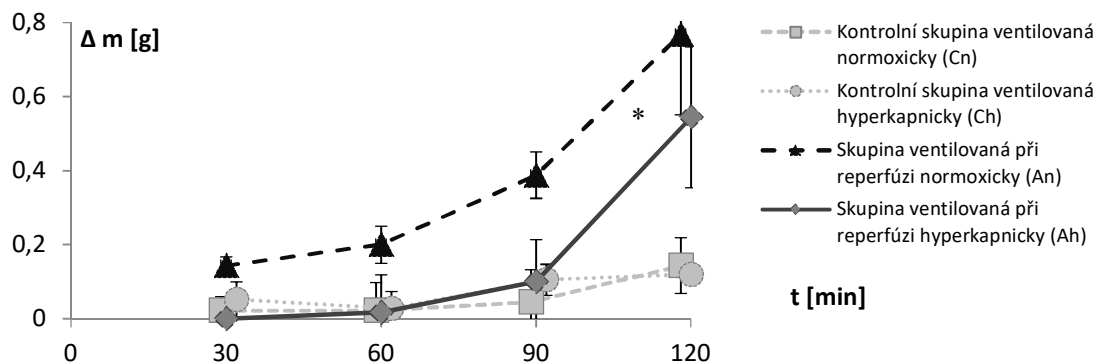
- **Arterio-venosní diference parciálního tlaku O_2 (transportní schopnost plic pro přenos O_2) ΔpO_2**

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) - * $p < 0,05$.

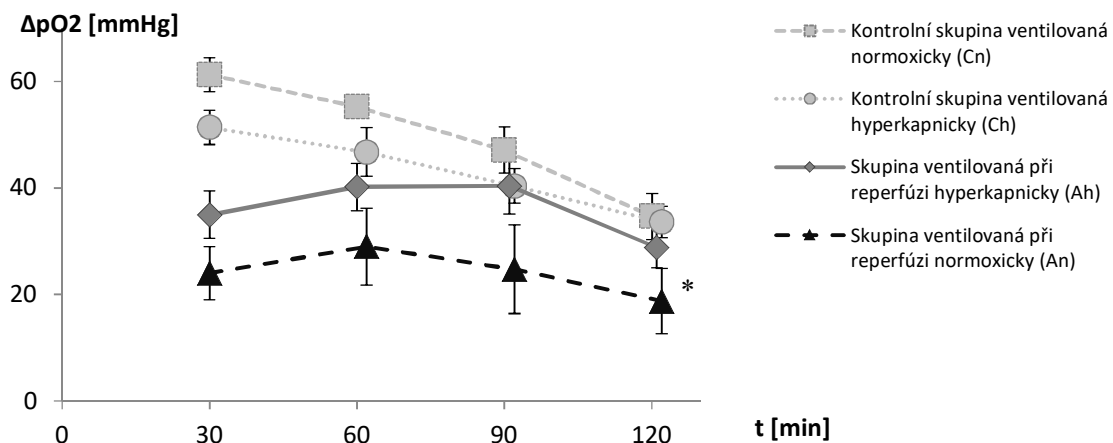
Nejlepší transportní schopnost O_2 , zejména na začátku perfúze, vykazovaly kontrolní skupiny (Cn, Ch), které nebyly vystaveny poškození ROS v průběhu teplé ischemie. (viz graf 3.)



Graf 1.: Vliv hyperkapnické ventilace během období reperfúze na perfúzní tlak



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



Graf 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 4.)

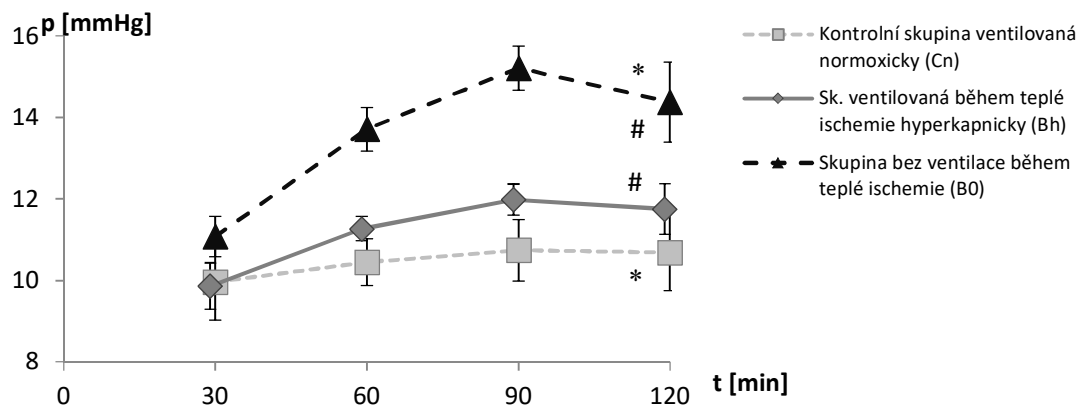
- **Změna hmotnosti plic (rozvoj plicního edému) Δm [g]**

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 5.)

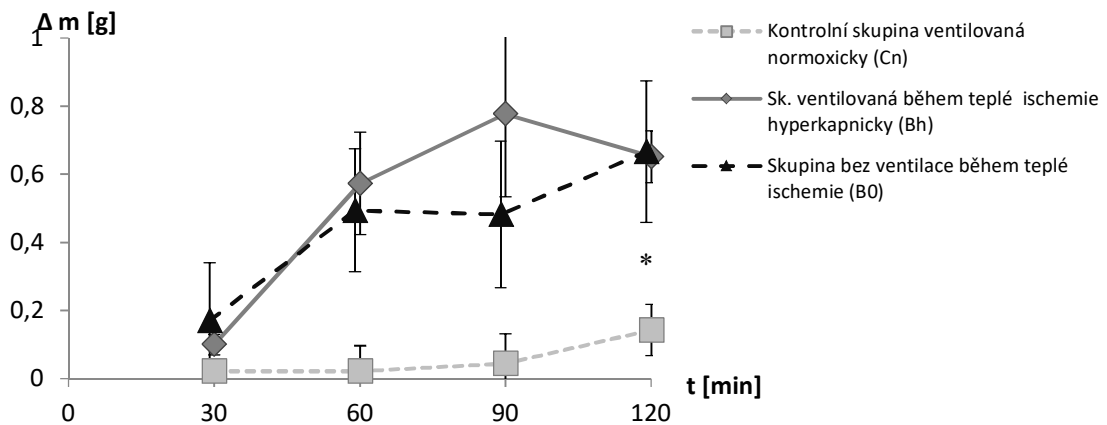
- **Arterio-venosní diference parciálního tlaku O_2 (transportní schopnost plic pro přenos O_2) ΔpO_2**

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)

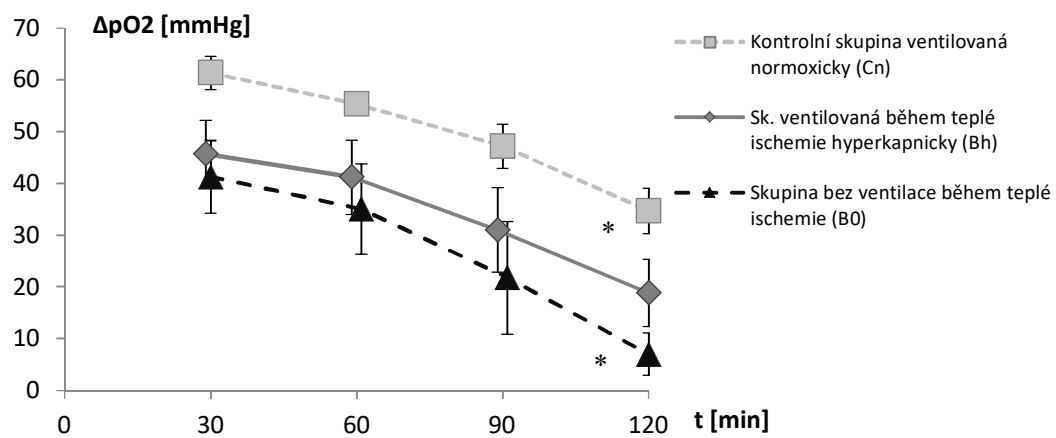
byla signifikantně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou (Cn), která nebyla vystavena období teplé ischemie - * $p < 0,05$. (viz graf 6.)



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



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



Graf 6.: Vliv hyperkapnické ventilace během období teplé ischemie na transportní schopnost plic pro přenos O₂

3.3. 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. Ventilace hyperkapnickou směsí plynů během období reperfúze má ochranný účinek na transportní schopnost plicní tkáně pro O ₂ po vystavení plicní tkáně období teplé ischemie. (viz graf 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**. Tento výsledek lze interpretovat na podkladě předchozích studií jako přímé působení CO₂ na snížení tvorby ROS nebo nepřímé cesty působení hyperkapnické ventilace přes snížení dostupného O₂ jako kofaktoru dalších reakcí. (Kennedy TP. et al., 1989; Hoidal JR. et al., 1998; Kregenow DA. et Swenson ER. 2002; atd.)

Druhý závěr studie potvrzuje **signifikantní rozdíl mezi zvýšením hodnot partiálního tlaku O₂ ve prospěch plic vystavených hyperkapnické ventilaci (Ah) v období reperfúze oproti normoxicky ventilovaným plicním preparátům (An)**. Kregenow DA. et Swenson ER., 2002 a Kavanagh BP. et Laffey GJ. 2006 poukazují k tomuto tématu na harmonizaci poměru ventilace-perfúze na podkladě hyperkapnické ventilace a tím celkové zlepšení výměny plynů. Dále uvádějí vliv vlastní acidosis na zlepšení povrchového napětí, a tak zlepšení compliance plicní tkáně u plic po reperfúzi.

Poslední výsledek studie, že **hyperkapnická ventilace po období teplé ischemie nemá protektivní vliv na IR poškození** vychází z výsledků měření na grafech 4. - 6. 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 na odlišném působení CO₂ jako scavengeru vůči reaktivním formám kyslíku a dusíku v polárním a nepolárním prostředí.

Jednotlivé výsledky jsou hlouběji diskutovány v disertační práci v oddíle 2.2.4. (Diskuze).

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

4.1. Metodika a materiál

Stejně jako v naší první studii o vlivu hyperkanické ventilace na IR poškození plic jsme i v tomto experimentu využili zavedeného zvířecího experimentálního modelu (potkani kmene Wistar) a protokolu pro NHBD (Herget J. et Chovanec M., 2010) -viz obrázek. 1. Měřené parametry byly shodné, ale oproti předchozí studii jsme měřili u jednotlivých preparátů plic také přímo koncentraci ROS v perfuzátu po 90 minutách období teplé ischemie prostřednictvím přístroje PAT test (FRA-II, Itálie) (Bertuglia a Giusti 2005).

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. Pokusné skupiny samců (M) a samic (F) prošly experimentálním protokolem včetně vystavení teplé a studené ischemie dle výše popsaného postupu. Během teplé ani studené ischemie nebyly jejich plíce ventilovány a během reperfúze byla zahájena ventilace normoxickou směsí plynů (21 % O₂ + 5 % CO₂ + 74 % N₂). Zvířata kontrolních skupin (Cf-samičky, 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.

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

Tabulka 2.: Experimentální skupiny

4.2. Výsledky

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

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

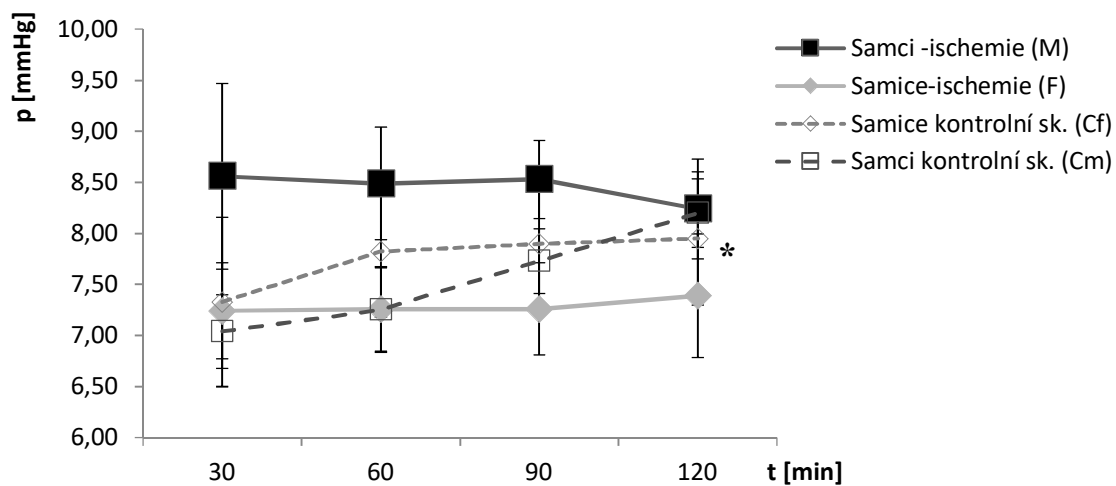
Při měření přírůstků hmotnosti preparátů nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi experimentálními skupinami (F, M). Staticky významný rozdíl jsme ale naměřili mezi samičí experimentální skupinou (M), která byla vystavena období teplé a studené ischemie, a samičí kontrolní skupinou (Cm) - * $p < 0,05$ (graf 8.).

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

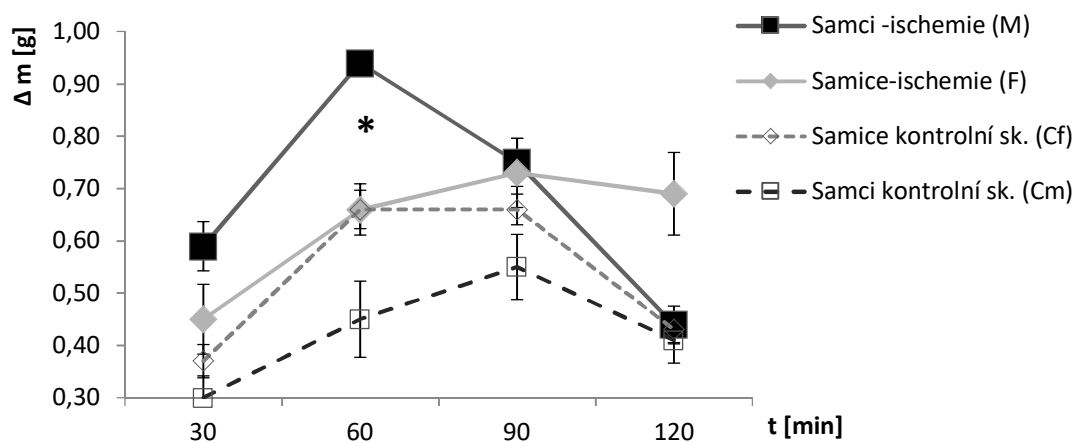
Sledováním rozdílu arterio-venosního parciálního tlaku kyslíku jsme zjistili, že podstatně vyšší schopnost okysličení mají plíce experimentální samičí skupiny (F) ve srovnání se samičí experimentální skupinou (M) - * $p < 0,05$. Nejvyšší schopnost okysličení byla ale zaznamenána zejména na počátku perfúze 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 samičí skupině, jež také neprošla obdobím ischemie - # $p < 0,05$ (graf 9.).

- **Přímá koncentrace ROS v perfuzátu**

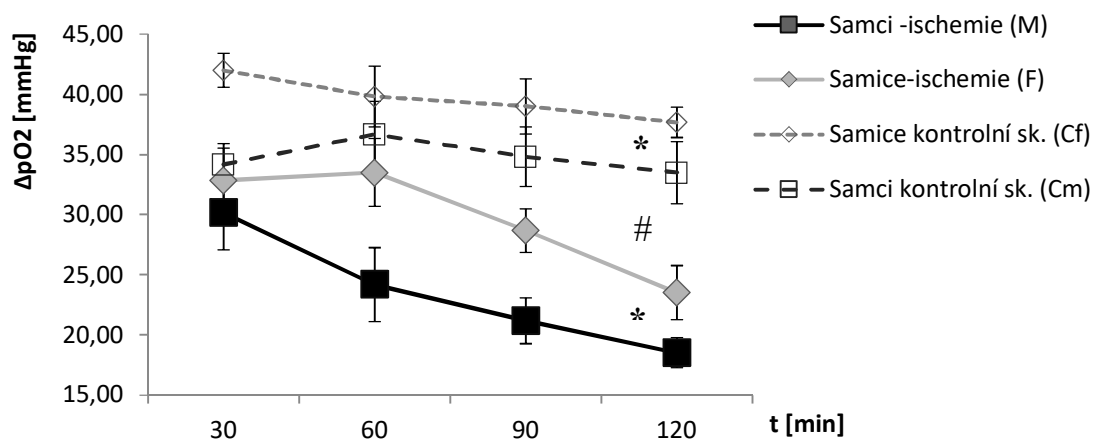
Hodnoty biologického antioxidačního potenciálu (PAT) ukázaly dle výsledků měření vyšší oxidační stres u vzorků experimentálních samčích skupiny (M) než u experimentální skupiny samičí (F). Zkouška PAT v perfuzátu experimentálních samic potkanů byla 350 ± 30 a u experimentálních samců 225 ± 35 IU Carr.



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



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



Graf 9.: Vliv pohlaví na transportní schopnost plic pro přenos O₂ při ischemicko-reperfúzním poškození

4.3. Diskuze

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 O ₂ po IR poškození u dárců s nebijícím srdcem. Prokázali jsme podstatně vyšší schopnost okysličení u experimentálních samicích plic (F) oproti experimentální skupině samců (M)- viz graf 9.
2. Významný ochranný účinek samicího 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 7.
3. Nepotvrdili jsme vliv sexuálního dimorfismu na vývoji plicního edému. Při měření jsme mezi pohlavími nezaznamenali signifikantní rozdíly – graf 8.
4. Naopak jsme jasně prokázali přímým měřením antioxidačního potenciálu vyšší oxidační stres u experimentální skupiny samců oproti experimentální skupině samic.

V případě prvního závěru – **protektivního vlivu na transportní schopnost O₂ u samic** můžeme vycházet z práce Massara GD. et al., 1995, který připisuje odlišnou stavbu plic a lepší schopnost oxygenace u samic evoluční přípravě samic na metabolické a oxygenační nároky reprodukce.

Uvažujeme-li o příčinách **protektivního vlivu samicího pohlaví na plicní vaskulární rezistenci** je nutno poukázat na specifické estrogenové receptory ER β . Patrone C. et al., 2003 označuje tyto faktory jako kritické ve formaci alveolárního uspořádání a tvorbě povrchově aktivních látek. Mohou tak mít vliv na celkovou compliance plicní tkáně. Kawachi S. et al, 2000 a Yu Z. et al., 2006 prokazatelně potvrzují regulaci plicní kapilární permeability a tím i změn perfúzního tlaku estrogení regulací inducibilní NO syntázy (iNOS) a endoteliální NO syntázy (eNOS).

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). Diskrepanci mezi závěry této studie a našimi výsledky lze vysvětlit ex vivo prostředím, ve kterém náš experiment probíhal a relativně krátkou dobou měření.

Jednotlivé výsledky jsou hlouběji diskutovány v disertační práci v oddíle 2.3.4. (Diskuze).

5 Závěr

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). 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.

Uváděné výsledky měření 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**. I zde jsme naplnili předpokládané hypotézy.

Celkový závěr naší druhé experimentální studie vlivu pohlaví na IR poškození při EVLP je potvrzení, že plíce samic jsou vůči IR poškození odolnější. Tento výzkum je jistě možno dále rozvíjet a uvažovat i 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.

Reference:

1. 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.
2. 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.
3. CAREY 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
4. CHOVANEC, M., et al. Hypercapnia attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting lung radical injury. *Physiological Research*, 2009, 58: S79.
5. 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.
6. 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.
7. HOIDAL, John R., et al. Lung injury and oxidoreductases. *Environmental health perspectives*, 1998, 106.Suppl 5: 1235.
8. KAVANAGH, B. P.; LAFFEY, J. G. Hypercapnia: permissive and therapeutic. *Minerva anesthesiologica*, 2006, 72.6: 567-576.
9. KAWACHI, Shigeyuki, et al. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000, 276.3: 851-854.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. MÜLLER, Veronika, et al. Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney international*, 2002, 62.4: 1364-1371.
16. MURPHY, Elizabeth; STEENBERGEN, Charles. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 2007, 75.3: 478-486.

17. OSTADAL, Bohuslav, et al. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection—experimental aspects. *Experimental Biology and Medicine*, 2009, 234.9: 1011-1019.
18. PATRONE, Cesare, et al. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor β . *Molecular and cellular biology*, 2003, 23.23: 8542-8552.
19. 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.
20. VESELA, A.; WILHELM, J. The role of carbon dioxide in free radical reactions in organism. *Physiological research*, 2002, 51.4: 335-340.
21. 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.

Seznam publikací:

1 a) Publikace, které jsou podkladem disertace s IF:

- 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. (IF 1, 97)
- Mrazkova, H., Lischke, R., Herget, J., & Uvalu, V. (2016). Influence of gender on ischemia-reperfusion injury in lungs in an animal model. *Physiological research*. (IF 1, 293)

1 b) Publikace, které jsou podkladem disertace bez IF: 0

2 a) Publikace bez vztahu k tématu disertace s IF:

- Generation of dendritic cell-based vaccine using high hydrostatic pressure for non-small cell lung cancer immunotherapy, Hradilova N.; Sadilkova L.; Palata O.; Mysikova D.; **Mrazkova H.**; Lischke R.; Spisek R.; Adkins I.
- v recenzním řízení do: Vaccine (Elsevier) (IF 3,624)

2 b) Publikace bez vztahu k tématu disertace bez IF:

- **Mrazkova H.**, Snajdauf M., Lischke R. (2015) Metastasing Presacral Myxopapillary Ependymoma: Case Report. *MOJ Clin Med Case Rep* 3(1): 00048.
- Šnajdauf, M., Pazdro, A., Haruštiak, T., **Mrázková, H.**, & Lischke, R. (2015). [Intramural haematoma of the oesophagus—a case report and literature review]. *Rozhledy v chirurgii: mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti*, 94(1), 30-33.
- Fík, Z., Šteffl, M., **Mrázková, H.**, Chovanec, M., & Plzák, J. (2015). Podtlaková terapie v otorinolaryngologii. *Otorhinolaryngology & Phoniatrics/Otorinolaryngologie a Foniatrie*, 64(1).