

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

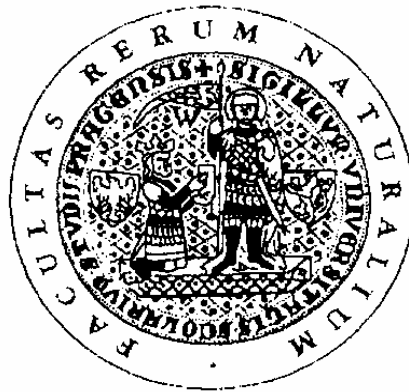
Oddělení vývojové kardiologie

Centrum výzkumu chorob srdce a cév

Úloha oxidu dusnatého v kardioprotektivním působení chronické hypoxie

Petra Mandíková

Diplomová práce



Školitel: RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

PRAHA 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vytvořila samostatně na základě studia literatury a konzultace se svým školitelem. Na získání výsledků týkajících se vlivu chronicky podávaného molsidominu na systémový tlak a tlak v pravé srdeční komoře se podílel prof. RNDr. František Kolář, CSc. Na získání výsledků biochemické analýzy tkáně levé srdeční komory na obsah glutathionu se podíleli RNDr. Jan Neckář, Ph.D. a RNDr. Jaroslav Mráz.

Projekt byl financován z grantových prostředků Oddělení vývojové kardiologie FgÚ AV ČR. Jednalo se o grantový projekt GAAV IAAX01110901 (2009 - 2013).

V Praze dne 30. dubna 2010

Petra Mandíková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli za odborné rady při sepisování této práce, za pomoc a trpělivost v začátcích mého působení na Oddělení vývojové kardiologie FgÚ AV ČR.

Abstrakt

Předkládaný projekt si kladl za cíl zjistit, jak ovlivní farmakologické zvýšení akutní a chronické produkce oxidu dusnatého (NO) kardioprotektivní efekt chronické hypoxie. Sledovali jsme vliv NO donoru molsidominu na hemodynamické parametry a ischemické poškození srdce. Laboratorní potkani kmene Wistar byli vystaveni kontinuální normobarické hypoxii (10 % O₂, 4 týdny). Potkanům byl podáván molsidomin chronicky (15 mg/kg/den) v pitné vodě nebo akutně (10 mg/kg) ve fyziologickém roztoku 5-min infuzí 30 minut před regionální ischemií. Kontrolní potkani byli chováni v normoxii a molsidomin jim byl podán odpovídajícím způsobem. Adaptace potkanů na kontinuální chronickou hypoxii vedla k rozvoji hypoxické plicní hypertenze a chronické podávání molsidominu tyto projevy hypoxie snížilo. Chronické podávání molsidominu významně neovlivnilo zvýšenou ischemickou toleranci myokardu chronicky hypoxických potkanů k akutní ischemii. Naproti tomu akutní podání molsidominu významně snížilo velikost infarktu a zvýšilo arytmogenezi u normoxické i chronicky hypoxické skupiny. Naše výsledky ukazují, že akutní farmakologické zvýšení dostupnosti NO má kardioprotektivní účinek a to jak u normoxických, tak chronicky hypoxických potkanů na rozdíl od chronického zvýšení, u kterého se zdá, že NO nebude mít významnější projektivní uplatnění.

Klíčová slova: myokard, hypoxie, kardioprotekce, ischemie, oxid dusnatý, molsidomin.

Abstract

The aim of present project was to uncover the effect of pharmacological increase in acute and chronic nitric oxide (NO) production on cardioprotective effect of chronic hypoxia. We studied the effect of NO donor molsidomine on hemodynamic conditions and ischemia - induced myocardium injury. Male Wistar rats were exposed to continual hypoxia in a normobaric chamber (10 % O₂, 4 weeks). Rats received molsidomine either chronically (15 mg/kg/day) in drinking water or acutely (10 mg/kg) in saline infused 30 min before ischemia. Control rats were kept under normoxia and treated in a corresponding manner. Adaptation to chronic hypoxia resulted in development of pulmonary hypertension. Chronic treatment with molsidomine slightly reduced these consequences of chronic hypoxia but it had no effect on increased cardiac ischemic tolerance in chronically hypoxic rats. On the other hand acute treatment with molsidomine significantly reduced infarct size and increased the number of arrhythmias in both normoxic and chronically hypoxic animals. In conclusion, our data suggests that acute increase in availability of NO is cardioprotective in both normoxic and chronically hypoxic rats contrary to its chronic increase which seems to have no protective contribution.

Key words: myocardium, hypoxia, cardioprotection, ischemia, nitric oxide, molsidomine.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod	11
2. Literární přehled	12
2.1. Ischemie	12
2.1.1. Metabolické změny vyvolané ischemií	12
2.1.2. Strukturální a funkční projevy ischemického poškození	13
2.2. Kardioprotektivní fenomény	14
2.2.1. Chronická hypoxie	15
2.2.1.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie	16
2.2.1.2. Molekulární mechanismy chronické hypoxie	18
2.2.1.3. Nepříznivé důsledky adaptace na chronickou hypoxii	19
2.3. Oxid dusnatý	20
2.3.1. Základní charakteristika	20
2.3.2. Syntéza oxidu dusnatého	21
2.3.2.1. Syntázy oxidu dusnatého	21
2.4. Úloha oxidu dusnatého	23
2.4.1. Oxid dusnatý a srdce	23
2.4.1.1. Syntázy oxidu dusnatého v srdci	24
2.4.1.2. Úloha oxidu dusnatého v ischemickém myokardu	25
2.4.1.2.1. Kontraktilita	25
2.4.1.2.2. Srdeční frekvence	26
2.5. Úloha oxidu dusnatého v působení chronické hypoxie	27
2.5.1. Plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory	28
2.5.2. Srdeční funkce	28
2.6. Cíle diplomové práce	30
3. Materiál a metody	31
3.1. Měření systémového tlaku a tlaku v pravé srdeční komoře a množství glutathionu	31
3.1.1. Molsidomin - NO donor	31
3.1.2. Experimentální skupiny	31
3.1.3. Experimentální model	32
3.1.3.1. Experimentální protokol	33

3.2.	Model chronické kontinuální hypoxie	34
3.2.1.	Experimentální skupiny	34
3.2.2.	Experimentální model srdce <i>in situ</i>	35
3.2.2.1.	Operační fáze pokusu	35
3.2.2.2.	Experimentální protokol	36
3.2.3.	Stanovení velikosti infarktu	37
3.2.4.	Vyhodnocení experimentálně získaných dat	38
3.2.4.1.	Velikost infarktu	38
3.2.4.2.	Ischemické a reperfuční arytmie	40
3.3.	Měření krevních plynů	42
3.3.1.	Experimentální skupina	42
3.3.2.	Experimentální model	43
3.3.2.1.	Operační fáze pokusu	43
3.3.2.2.	Experimentální protokol	43
3.4.	Statistické zpracování naměřených dat	46
4.	Výsledky	47
4.1.	Vliv chronického podávání molsidominu na systémový tlak a tlak v pravé srdeční komoře a množství glutathionu	49
4.2.	Vliv chronického a akutního podávání molsidominu na ischemické poškození srdce	54
4.2.1.	Velikost infarktu	57
4.2.2.	Ischemické a reperfuční arytmie	57
5.	Diskuze	66
5.1.	Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na tělesnou hmotnost a hematokrit	66
5.2.	Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na tepovou frekvenci	67
5.3.	Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na plicní hypertenzi	68
5.4.	Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s chronicky a akutně podaným molsidominem na ischemické poškození srdce	69
6.	Závěr	72
7.	Použitá literatura	73

Seznam použitých zkratek

A	exp. skupina - potkani adaptovaní na chronickou hypoxii
AM	exp. skupina - potkani adaptovaní na chronickou hypoxii s chronicky podávaným molsidominem
AMA	exp. skupina - potkani adaptovaní na chronickou hypoxii s akutně podaným molsidominem
AR (area at risk)	ohrožená oblast myokardu
ATP	adenosin - 5' - trifosfát
BK _{Ca}	mitochondriální draslíkové kanály aktivované Ca ²⁺
BW (body weight)	tělesná hmotnost
C	exp. skupina - normoxičtí potkani
cGMP	cyklický guanosin - 3', 5' - monofosfát
CM chronicky	exp. skupina - normoxičtí potkani s podávaným molsidominem
CMA	exp. skupina - normoxičtí potkani s akutně podaným molsidominem
D (doublets)	dvojité předčasné komorové stahy
DAP (diastolic arterial pressure)	diastolický arteriální tlak
EDRF (endothelium derived relaxing factor)	relaxační faktor odvozený od endotelu
EKG	elektrokardiogram
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GMP	guanosin - 5' - monofosfát
GSH	redukováná forma glutathionu
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GTP	guanosin - 5' - trifosfát

HD	hemová doména NOS
HIF-1 (hypoxia induced factor 1)	hypoxii indukující faktor 1
HPLC (high pressure liquid chromatography)	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HR (heart rate)	tepová frekvence
IL-1 β	interleukin 1 β
i.p.	intraperitoneálně
IS (infarct size)	velikost infarktového ložiska
i.v.	intravenózně
K _{ATP} kanál	draslíkový ATP senzitivní kanál
m K _{ATP}	mitochondriální draslíkový ATP senzitivní kanál
s K _{ATP}	draslíkový ATP senzitivní kanál na sarkolemě
LAD (left anterior descendens)	sestupná větev levé koronární arterie
LCA (left coronary artery)	levá koronární arterie
L-NA	N-nitro-L-arginin
L-NAME	N-nitro-L-arginin methyl ester
L-NMMA	N-monomethyl-L-arginin
LV (left ventricle)	levá komora
MAP (middle arterial pressure)	střední arteriální tlak
MAP kináza (mitogen activated protein kinase)	mitogenem aktivovaná protein kináza
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
eNOS	endoteliální NOS
iNOS	inducibilní NOS
mtNOS	mitochondriální NOS
nNOS	neuronální NOS
pCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
PKA	protein kináza A

PKC	protein kináza C
PKG	protein kináza G
pO ₂	parciální tlak kyslíku
PVC (premature ventricular contraction)	předčasný komorový stah
RD	reduktázová doména NOS
RNS (reactive nitrogen species)	reaktivní formy dusíku
ROS (reactive oxygen species)	reaktivní formy kyslíku
RVSP (right ventricle systolic pressure)	systolický tlak v pravé srdeční komoře
S (singles)	jednoduché předčasné komorové stahy
SAP (systolic arterial pressure)	systolický arteriální tlak
SEM (standard error of the mean)	střední chyba průměru
sGC	solubilní guanylátcykláza
SIN-1	3-morpholinosydnonimin
SMT	S-methylisothiurea
SNP (sodium nitroprusside)	nitroprusid sodný
sO ₂	saturace kyslíkem
T (triplets)	trojité předčasné komorové stahy
TNF- α (tumor necrosis factor α)	tumor nekrotizující faktor α
TTC	2, 3, 5 - trifenyltetrazolium chlorid
UV (ultraviolet)	ultrafialové záření
VF (ventricular fibrillation)	komorová fibrilace
VT (ventricular tachycardia)	komorová tachykardie

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění představují hlavní příčinu mortality v České republice a v dalších ekonomicky vyspělých zemích světa. U nás na tato onemocnění každoročně umírá okolo 60 000 lidí. Z celé řady chorob srdce a cév se nejčastěji vyskytují ischemické mozkové příhody, ischemická choroba srdeční a její akutní forma - infarkt myokardu. Není proto překvapující, že je této problematice věnována značná pozornost vědecké veřejnosti.

Výzkum ischemické choroby srdeční lze dnes rozdělit do dvou velkých oblastí:

- 1) studium patogenetických mechanismů uplatňujících se při vzniku poškození myokardu a
- 2) studium mechanismů vedoucích k ochraně srdečního svalu, ke zmenšení nebo prevenci jeho poškození.

Rozsah ischemického poškození srdce závisí nejen na intenzitě a délce trvání ischemie, ale také na stupni odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. Do popředí výzkumu se tak dostávají účinné kardioprotektivní fenomény, jakými jsou např. adaptace na chronickou hypoxii nebo tzv. preconditioning a postconditioning. Hlavním cílem jejich studia je objasnění molekulárních a buněčných mechanismů, které se podílejí na vzniku ischemické choroby srdeční a jejich rizikových faktorů, se zvláštním zřetelem k možným novým terapeutickým postupům.

Tato diplomová práce se věnuje úloze oxidu dusnatého v kardioprotektivním působení chronické hypoxie a pokouší se přispět k vysvětlení, jak zásadně může exogenně dodaný oxid dusnatý ovlivnit endogenní kardioprotektivní signální dráhy a tedy i citlivost chronicky hypoxického myokardu k ischemii. Hlubší porozumění této problematice by mohlo přispět k novému pohledu nejen na léčbu ischemické choroby srdeční.

2. Literární přehled

2.1. Ischemie

Ischemie je způsobená náhlým poklesem průtoku krve. Příčinou vzniku ischemie mohou být aterosklerotické léze nebo redukce krevního průtoku způsobená agregací krevních destiček. Tyto stavy mohou být dočasné a reverzibilní nebo trvalé a ireverzibilní. Důsledkem ischemie je rozvoj mnoha metabolických, funkčních a strukturálních změn. S délkou trvání ischemie dochází k posunu od fyziologických abnormalit k závažnějším ireverzibilním patologickým změnám v myokardu, což v konečném důsledku může vést až k selhání srdce. Patologické změny vyvolané akutním infarktem myokardu lze rozdělit na ischemické poškození, vzniklé v průběhu uzavření koronárního řečiště části myokardu, a reperfuční poškození, vyvolané obnovením koronárního průtoku po dlouhodobé ischemii. Velikost infarktového ložiska je úměrná velikosti oblasti zasažené ischemií, délce trvání ischemie, spotřebě kyslíku a kolaterálnímu krevnímu zásobení (zkráceno z přehledu Ošťádal a Kolář, 1999).

2.1.1. Metabolické změny vyvolané ischemií

Mezi metabolické změny vyvolané ischemií patří především změny v energetickém metabolismu. Důsledky ischemie se projevují v energetickém zásobení myokardu již v několika vteřinách od jejího začátku. Prvním důsledkem okluze koronární tepny je zredukování zásobení kyslíkem. Velmi rychle dochází k rapidnímu úbytku kyslíku v buňkách a prudce klesá aerobní metabolismus. Schopnost kardiomyocytů vytvářet energii ve formě adenosin - 5' - trifosfátu (ATP) a kreatinfosfátu klesá a dochází tak k vyčerpání energetických zásob. Tento stav aktivuje glykolýzu a glykogenolýzu. Přeměnou glukózy vzniká pyruvát, který vstupuje do mitochondrie, kde je oxidován a konvertován na laktát, konečný produkt anaerobní glykolýzy, který je v ischemickém myokardu akumulován.

Ischemie zásadně ovlivňuje iontovou homeostázu. Porucha iontové rovnováhy během ischemie nejvíce přispívá ke vzniku ireverzibilního poškození buňky, které je dnes vysvětlováno především vzrůstem koncentrace vápenatých kationtů (Ca^{2+}) v cytosolu ale i v mitochondriích. Toto tzv. vápníkové přetížení je intracelulárního i extracelulárního původu. Část Ca^{2+} se do cytosolu dostává z vnějšku buňky výměnou za sodíkové kationty (Na^+). Většina cytosolického Ca^{2+} je však intracelulárního původu. Dochází totiž ke zvýšenému uvolňování Ca^{2+} ze

sarkoplazmatického retikula a především je výrazně omezeno zpětné čerpání Ca^{2+} do retikula nefunkční ATP - dependentní Ca^{2+} pumpou. S delší dobou trvání ischemie se stává plazmatická membrána více permeabilní, pravděpodobně působením radikálů na architekturu membránových fosfolipidů. Ca^{2+} se snadněji dostává ze svých buněčných zásobníků do cytosolu, kde způsobí aktivaci lysozomálních proteáz a fosfolipáz vedoucí k dalšímu buněčnému poškození. Vzniklé lysofosfolipidy modifikují permeabilitu membrány a jsou jednou z možných příčin ischemických a reperfuzních arytmií.

2.1.2. Strukturální a funkční projevy ischemického poškození

Na metabolické změny navazují změny strukturální a funkční projevy ischemického poškození. Nedostatečné zásobení kyslíkem a metabolické změny části myokardu vyvolané ischemií vedou rychle k abnormální kontraktilní funkci. Ischemie redukuje kontrakci ischemické oblasti a naopak vyvolává kompenzační hyperfunkci zbytku myokardu. Zdá se, že akutní ischemická kontraktilní dysfunkce je důsledkem poklesu koncentrace ATP v ischemickém myokardu. Důsledkem zvýšené koncentrace laktátu je zkrácení doby trvání akčního potenciálu a následný vznik poruch srdečního rytmu - arytmií, dalšího z typických funkčních projevů ischemie.

2.2. Kardioprotektivní fenomény

Kardioprotektivní fenomény představují jevy, které působí antiischemicky a chrání tak myokard před důsledky akutního ischemicko - reperfuzního poškození. Ochranný účinek kardioprotekce je experimentálně demonstrován na třech nejzávažnějších projevech ischemie srdce, kterými jsou: 1) vznik infarktu myokardu, 2) postischemická kontraktilní dysfunkce a 3) výskyt závažných ischemických a reperfuzních arytmií. Mezi dnes nejvíce studované kardioprotektivní fenomény patří preconditioning, postconditioning a adaptace na chronickou hypoxii.

Nejstarším známým kardioprotektivním jevem je adaptace na chronickou hypoxii, o jehož existenci víme již z epidemiologických studií z konce 50. let minulého století (Hurtado et al., 1960). V průběhu posledních let byla získána řada zásadních poznatků o mechanismu protekce vyvolaném chronickou hypoxií. Dosud není znám jiný kardioprotektivní efekt, který udržuje zvýšenou ischemickou toleranci po delší dobu, v řádu týdnů po odeznění stimulu, jak je tomu u chronické hypoxie.

Současný experimentální výzkum, zabývající se kardioprotektivními vlivy, se soustřeďuje na fenomén krátkodobé adaptace, tzv. preconditioningu (Murry et al., 1986). Porovnáním kardioprotektivního působení chronické adaptace a preconditioningu se dosud zabývalo pouze několik málo prací. Zdá se, že chronická hypoxie využívá podobné buněčné signální dráhy jako preconditioning, avšak detailní analýza protektivních intracelulárních mechanismů zatím chybí. Z dosud známých poznatků vyplývá, že klíčové postavení mají na ATP závislé draslíkové kanály (K_{ATP} kanály), protein kináza C (PKC) a reaktivní formy kyslíku (ROS). Existující výsledky pokusů jsou však rozporuplné. Jedinými ověřenými rozdíly obou jevů jsou delší trvání kardioprotektivního účinku chronické hypoxie (protektivní účinek na ischemický myokard přetrvává mnohem déle, až několik týdnů, na rozdíl od hodinového trvání účinku preconditioningu) a silnější ochranný účinek preconditioningu (Neckář et al., 2004).

2.2.1. Chronická hypoxie

Chronická hypoxie je výsledkem disproporce mezi dodávkou a nárokem tkání na kyslík. Tento stav může být vyvolán několika způsoby. Nejběžnějším z nich je ischemická hypoxie, vyvolaná redukcí nebo úplným přerušением koronárního průtoku krve. Druhým možným mechanismem vzniku chronické hypoxie je systémová hypoxie, charakterizovaná poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Dalším v pořadí je anemická hypoxie, při které je parciální tlak kyslíku v arteriální krvi normální, ale kapacita krve nutná pro transport kyslíku je snižena (Ošťádal et al., 2007).

Nejběžnějším modelem pro výzkum chronické hypoxie je vysokohorské prostředí, popřípadě laboratorní podmínky simulované v normobarických (řízená změna složení plynů) a hypobarických (snížení parciálního tlaku kyslíku (pO_2) částečným odčerpáním vzduchu) komorách. Tyto modely umožňují studovat prospěšné i nepříznivé adaptivní změny, průběh desadaptace a farmakologickou protekci proti nežádoucím projevům adaptace.

Jak ukázaly experimentální studie, chronická hypoxie nemusí být navozena pouze dlouhodobým vystavením permanentní hypoxii, ale může mít také intermitentní charakter. Ten nastává např. při opakovaném horském výstupu nebo při tzv. spánkové apnoe. Současný výzkum intermitentní hypoxie se zaměřuje na délku, intenzitu, počet denních hypoxických epizod a celkový počet dní, kdy došlo k expozicím. Je zřejmé, že právě tyto faktory jsou rozhodující pro rozvoj pozitivních či negativních důsledků adaptace na intermitentní hypoxii (Asemu et al., 2000). Dalším faktorem v působení chronické hypoxie jsou pohlavní rozdíly. Kardioprotekce se rozvine u obou pohlaví, přesto u samic byla zjištěna vyšší odolnost myokardu k nedostatku kyslíku (Ošťádal et al., 1984).

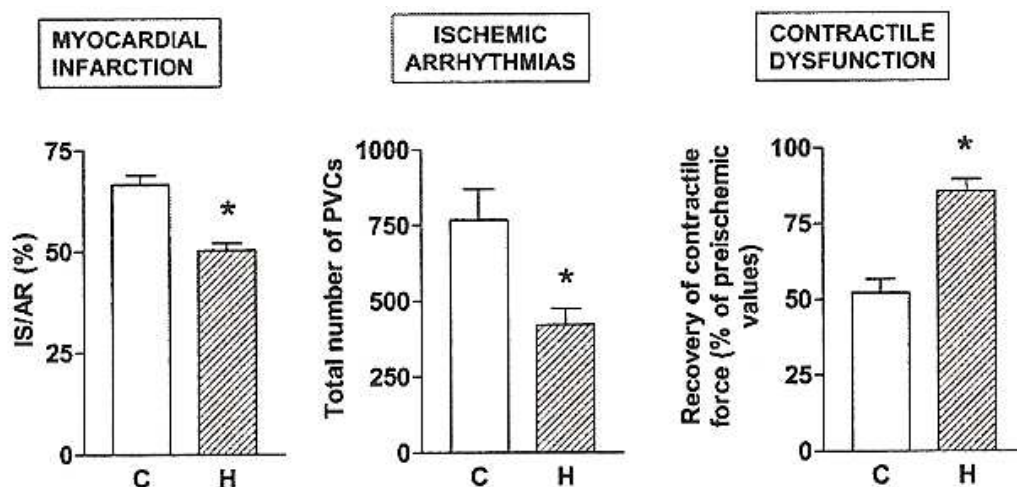
Existují také dva případy přirozené fyziologické hypoxie: 1) myokard populací žijících permanentně ve vysokých nadmořských výškách a 2) myokard lidského plodu, který je adaptovaný na hypoxii odpovídající nadmořské výšce 8000 metrů. V obou těchto situacích je srdeční myokard podstatně více rezistentní vůči nedostatku kyslíku. Hypoxický fetální oběh způsobuje, že myokard novorozenců je odolnější k ischemii v porovnání s dospělými jedinci. Po narození však zvýšená ischemická tolerance srdce klesá (Ošťádalová et al., 2002).

Za hypoxických podmínek musí myokard zastat adekvátní kontraktilní funkci navzdory sníženému tlaku kyslíku v koronárních tepnách. Takové prostředí vyžaduje genotypickou adaptaci, která má kardioprotektivní efekt. Již více než 50 let je známo, že lidé trvale žijící ve

vysokých nadmořských výškách (např. Peru, 4000 m) jsou tolerantnější k akutnímu ischemickému poškození srdce a výskyt infarktu myokardu je u těchto populací nižší. První z experimentálních studií publikovali Kopecký a Daum v Praze v roce 1958. Tehdy prokázali zlepšenou obnovu postischemické kontraktilní funkce myokardu potkana po šesti týdnech adaptace na nadmořskou výšku 7000 m v hypobarické komoře. Kardioprotektivní efekt vysokých nadmořských výšek byl opakovaně potvrzen experimentálními studiemi, které použily model chronické hypoxie simulované v hypobarické komoře (Poupa et al., 1966; Widimský et al., 1973; Neckář et al., 2002).

2.2.1.1. Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Chronická hypoxie redukuje všechny hlavní negativní projevy ischemicko - reperfučního poškození, jako je velikost infarktu, postischemická kontraktilní dysfunkce a ischemické a reperfuční komorové arytmie (*obr. č. 1*).

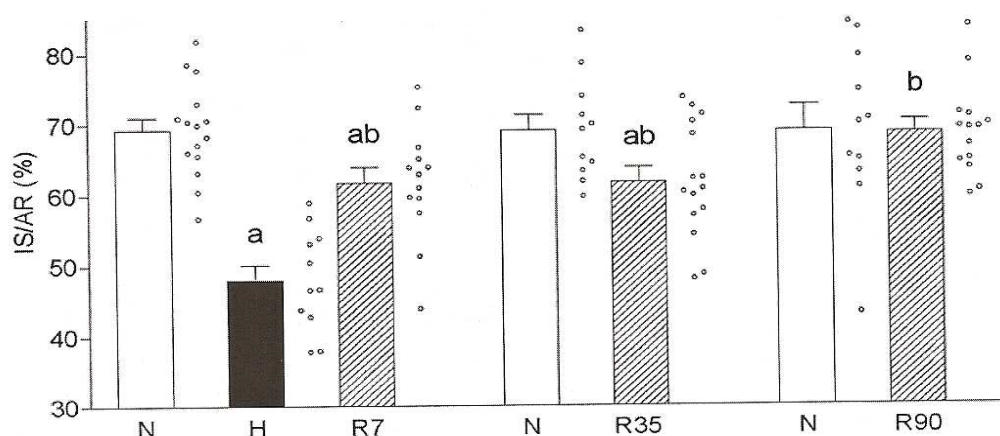


Obr. č. 1: Kardioprotektivní efekty adaptace na chronickou intermitentní hypoxii (7000 m, 8 hod/den, 5 dní/týden) u potkanů. Redukce velikosti infarktu (IS/AR), snížený počet ischemických arytmií (PVCs), zlepšená obnova postischemických kontraktilních funkcí. Převzato z Ošťádal et al., 2007.

Většina strukturních a biochemických změn navozených chronickou hypoxií (plicní hypertenze, hypertrofie pravé komory) se po návratu do normoxických podmínek normalizují do původního stavu. Avšak některé změny mohou po posledním vystavení hypoxii přetrvat delší dobu. Je jistě klinicky zajímavé, že protektivní efekt chronické hypoxie na velikost infarktu byl

zjištěn ještě 7. a 35. den po skončení adaptace (*obr. č. 2*). Na druhou stranu ve stejné studii bylo prokázáno, že antiarytmická protekce vymizí během prvního týdne po návratu do normoxických podmínek (Neckář et al., 2004). Vliv chronické hypoxie na komorové arytmie je tedy velmi závislý na stupni a délce trvání denních expozií. U extrémních modelů chronické intermitentní hypoxie (pO_2 5 %, čtyřicetisekundové cykly hypoxie následované 20 s normoxie, 8 hod/den, celkově 35 dní) byla zjištěna zvýšená citlivost myokardu k ischemii. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena extrémním vzestupem produkce ROS (Béguin et al., 2005).

Doba trvání kardioprotektivního účinku chronické hypoxie byla zkoumána i na modelu nedospělých srdcí (Netuka et al., 2010). Tato studie prokázala, že mláďata potkanů, narozená samicím vystaveným hypoxickým podmínkám a chovaná ještě dalších 5 dní po narození v normobarické hypoxické komoře, vykazovala v dospělosti vyšší toleranci k ischemii srdce. Toto zjištění platilo pouze pro testované samce. U samic pozdní kardioprotektivní efekt chronické hypoxie pozorován nebyl, což svědčí o odlišném působení chronické hypoxie na obě pohlaví. Další vědecká skupina vystavila mláďata králíků hypoxii od narození do 10. dne věku a zvýšená rezistence k ischemii u nich byla zjištěna až do 30. dne věku (Fitzpatrick et al., 2005). Zvýšená kardioprotekce tedy přetrvávala alespoň 20 dní po návratu do normoxických podmínek. Zdá se tedy, že hypoxie aplikovaná v ranné fázi ontogeneze působí jako spouštěč kardioprotektivních mechanismů, vedoucích ke zvýšené toleranci srdce v pozdějším životě.



Obr. č. 2: Velikost infarktu myokardu (IS/AR) u potkanů adaptovaných na intermitentní chronickou hypoxii (7000 m, 8 hod/den, 5 dní/týden, H), hypoxičtí potkani zotavení v normoxii po 7 dní (R7), 35 (R35) a 90 dní (R90) a odpovídající normoxická skupina (N). Převzato z Neckář et al., 2004.

2.2.1.2. Molekulární mechanismy chronické hypoxie

Až v průběhu posledních let byla získána řada zásadních poznatků o mechanismu protekce vyvolaném chronickou hypoxií. Chronická hypoxie vyvolává řadu adaptivních změn v myokardu, které jsou považovány za protektivní. Zvyšuje expresi a mění distribuci řady cytoprotektivních proteinů zahrnujících PKC (Ding et al., 2004; Marková et al., 2005), MAP kinázy (Rafiee et al., 2002; Ravingerová et al., 2007), prostaglandiny nebo tzv. heat shock proteiny (Shi et al., 2002), které pomáhají srdci lépe snášet adaptační stres.

Z dosud známých poznatků také vyplývá, že klíčové postavení mají K_{ATP} kanály (Neckář et al., 2002; Kolář et al., 2005). K_{ATP} kanály jsou lokalizovány na membráně sarkoplazmatického retikula (sK_{ATP}) a na vnitřní mitochondriální membráně (mK_{ATP}). Během adaptace na chronickou hypoxii dochází k jejich zvýšené aktivaci (Eells et al., 2000). Adaptace na chronickou hypoxii způsobuje zvýšený tok draselných iontů (K^+) přes K_{ATP} kanály, jsou tak zodpovědné za hyperpolarizaci a zkrácení doby trvání akčního potenciálu (Baker et al., 2001). Zdá se, že mK_{ATP} kanály a jejich přínos v bioenergetických procesech by mohl přispět k objasnění role mitochondrií ve zvýšené rezistenci k ischemii u srdcí adaptovaných na chronickou hypoxii. Aktivace mK_{ATP} kanálů zvyšuje tok K^+ do mitochondrie, což způsobuje snížení produkce ATP. Tento výzkum byl prováděn na základě sledování produkce ATP v přítomnosti aktivátorů a inhibitorů mK_{ATP} kanálů (Eells et al., 2000). Aktivátory mK_{ATP} kanálů zmenšují velikost infarktu, jejich blokátory infarkt naopak zvětšují. Existuje tedy hypotéza předpokládající, že zvýšená rezistence k ischemii navozená chronickou hypoxií je spojená se zvýšenou aktivací K_{ATP} kanálů (Baker et al., 1999).

V kardioprotekci se stejně jako mK_{ATP} uplatňuje také další typ mitochondriálních draslíkových kanálů, tzv. BK_{Ca} kanály (Borchert et al., 2009; Sato et al., 2005). Jsou lokalizované na vnitřní mitochondriální membráně a jsou aktivovány Ca^{2+} . Chronická hypoxie zvyšuje jejich expresi a také mění poměr glykosylované formy k neglykosylované. Chronická hypoxie pravděpodobně aktivuje kanál právě pomocí změny tohoto poměru. Zdá se, že oba tyto typy mitochondriálních draslíkových iontových kanálů (mK_{ATP} , BK_{Ca}) se uplatňují v kardioprotektivním působení chronické hypoxie. Přispívají ke vzniku kardioprotekce tím, že zvyšují tok K^+ do matrix, dochází tak k prevenci přetížení Ca^{2+} a zvýšené tvorbě ROS, které se mohou uplatňovat jako důležité signální molekuly.

Přesný molekulární mechanismus působení chronické hypoxie je zatím neznámý. Další molekulou, která by se mohla uplatňovat v kardioprotektivním působení chronické hypoxie, je

oxid dusnatý (NO). Role NO v působení chronické hypoxie bude podrobně rozebrána v kap. 2.5.

2.2.1.3. Nepříznivé důsledky adaptace na chronickou hypoxii

Kromě pozitivních adaptivních změn (zvýšená ischemická tolerance) má chronická hypoxie také nepříznivý dopad na kardiopulmonální systém. Adaptace na chronickou hypoxii způsobuje vznik hypoxické plicní hypertenze a v jejím důsledku vznik hypertrofie pravé srdeční komory (Hampl et al., 2006). Plicní hypertenze je definována jako stav zvýšeného tlaku v plicních tepnách nebo také jako rezistence plicních cév (Hampl et al., 2000). Zvýšená rezistence plicních cév je důsledkem remodelace periferních plicních arterií. Remodelace postihuje endotel a hladkou svalovinu cév, které hypertrofuje a proliferuje. Tyto změny způsobují zesílení cévní stěny a redukci velikosti cévního lumen, což dále vede ke zvýšení rezistence cév ke krevnímu průtoku a zvýšení tlaku v plicních cévách. Plicní hypertenze představuje zvýšenou zátěž pro pravou srdeční komoru, která pod tímto tlakem hypertrofuje a může dojít až k jejímu selhání. Selhání pravého srdce je ve skutečnosti nejčastější příčinou smrti na plicní hypertenzi. Hypertrofie pravé komory je adaptací srdce na zvýšený tlak, proti kterému musí tlačit krev jdoucí do plic plicními tepnami. Díky hypertrofii pravé komory dokáže srdce udržet svůj minutový výdej srdeční.

První pozorování tohoto efektu bylo provedeno asi před půl stoletím. Rotta et al. (1956) poprvé poukázali na to, že u zdravých lidí trvale žijících ve vysokých nadmořských výškách je rozvinutá plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory. Stejný efekt na organismus má jak permanentní, tak intermitentní chronická hypoxie simulovaná v hypoxické komoře (Hampl et al., 2000).

2. 3. Oxid dusnatý

2.3.1. Základní charakteristika

NO je dvouatomová plynná molekula s jedním nepárovým valenčním elektronem, jedná se tedy o volný radikál. Fyzikální vlastnosti NO, jako jsou rozpustnost ve vodě i v lipidech, difuzibilita a lipofilní charakter, rozhodují o vysoké chemické reaktivitě. Jeho biologický poločas je krátký (3 - 5 s). Ochotně reaguje s kyslíkem za vzniku oxidu dusičitého (NO₂). NO₂ také obsahuje nepárový elektron, ve srovnání s NO se však vyznačuje vyšší reaktivitou a toxicitou. Ve vodném roztoku jsou produktem oxidace nitritu (NO₂⁻), pouze v přítomnosti hemoproteinů proběhne oxidace až na nitráty (NO₃⁻). Pokud se v blízkosti nachází superoxidový aniont (O₂⁻), vzniká peroxyinitrit (⁻ONOO), což není radikál, ale je to velmi reaktivní a cytotoxický produkt. NO patří do skupiny reaktivních forem dusíku (RNS) společně s ⁻ONOO, NO₂, N₂O₃. Vzhledem k jejich redoxnímu potenciálu jsou RNS důležitými molekulami ve vaskulární biologii. Porušení rovnováhy oxidačně - redukčních stavů vede ke vzniku oxidačního stresu, který se podílí na vzniku řady kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou např. hypertenze, ateroskleróza apod.

NO působí prostřednictvím dvou odlišných mechanismů - 1) cGMP - dependentní a 2) cGMP - independentní (Ziolo et al., 2008). V prvním případě NO aktivuje solubilní izoformu enzymu guanylátcyklázy (sGC). Interakce je zprostředkována vazbou NO na železo obsažené v hemové skupině sGC. Aktivovaná sGC konvertuje guanosin - 5' - trifosfát (GTP) na cyklický guanosin - 3', 5' - monofosfát (cGMP), který je považovaný za hlavního druhého posla signální dráhy NO. cGMP reguluje buněčné pochody tím, že se váže na proteinkinázu G (PKG) a cGMP - dependentní fosfodiesterázy 2 a 3. cGMP je inaktivován fosfodiesterázami cGMP na guanosin - 5' - monofosfát (GMP). Aktivovaná PKG fosforylaci inaktivuje vápenaté iontové kanály na sarkoplazmatické membráně a tím snižuje intracelulární koncentraci Ca²⁺. PKG dále přispívá k vazodilataci tím, že snižuje senzitivitu troponinu C k Ca²⁺ (Rastaldo et al., 2007). Slouží tedy jako primární modulátor cévního tonu.

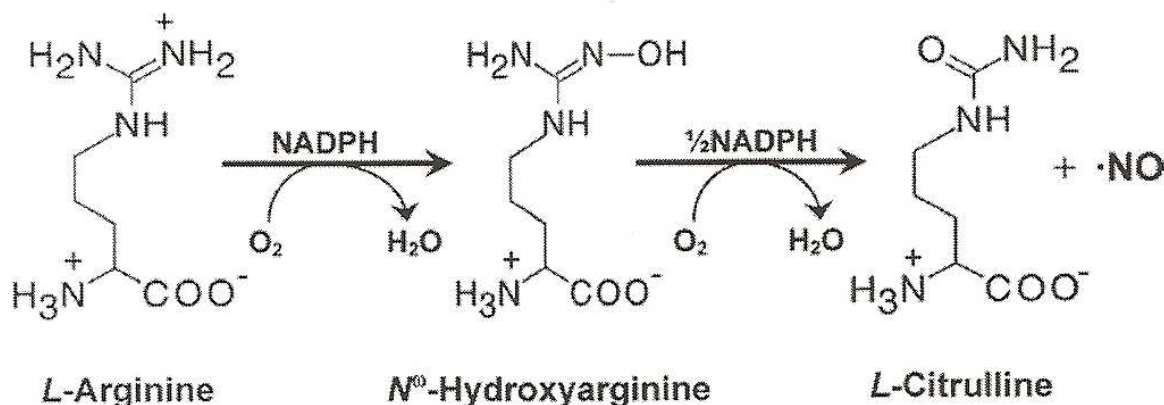
Druhý způsob působení NO je prostřednictvím proteinových modifikací na základě vazby na hemové skupiny, S - nitrosylaci redukovaných cysteinových zbytků a C - nitraci tyrosinových a tryptofanových zbytků.

Kromě hlavní signální dráhy zprostředkované cGMP vedoucí k vazodilataci byla objevena i alternativní cesta nezávislá na působení cGMP. Vazodilatace závislá pouze na NO je

způsobena přímou aktivací draslíkových iontových kanálů. Po otevření těchto kanálů dojde k hyperpolarizaci buněčné membrány a inaktivaci napětím ovládaných vápenatých kanálů. Dochází tak k inhibici vtoku Ca^{2+} do cytosolu a následné vazodilataci (Weisbrod et al., 1998).

2.3.2. Syntéza oxidu dusnatého

Syntéza NO probíhá v různých buněčných typech a tkáních, zahrnujících cévní endotel, makrofágy, krevní destičky, myokard a buňky nervového systému (Rouet - Benzineb et al., 1999). V savčích buňkách je NO produktem pětielektronové oxidace L-argininu (*obr. č. 3*). Meziproduktem enzymatické reakce je N-hydroxy-L-arginin. Společně s NO vzniká L-citrulin. Celou reakci katalyzuje jediný enzym - syntáza oxidu dusnatého (NO - syntáza; NOS).



Obr. č. 3: Syntéza oxidu dusnatého (NO) z L-argininu. Převzato z Manukhina et al., 2006.

2.3.2.1. Syntázy oxidu dusnatého

U savců byly dosud identifikovány tři různé izoformy NOS a byly pojmenovány podle tkáně svého původu na neuronální NOS (nNOS; NOS1), indukibilní NOS (iNOS; NOS2) a endoteliální NOS (eNOS; NOS3). Mezi jednotlivými izoformami je významná podobnost nukleotidových sekvencí. Všechny izoformy mají několik společných vlastností. Izoformy NOS jsou stereospecifické (D-arginin není substrátem) a vyžadují redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), flavinadeninukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN) jako kofaktory. Příslus L-argininu a kofaktorů ovlivňuje množství vyprodukovaného NO. Všechny tři izoformy vyžadují pro svou maximální účinnost kalmmodulin, nNOS a eNOS jsou však Ca^{2+} - kalmmodulin - dependentní. Pouze iNOS dokáže vytvářet aktivní

komplex s kalmodulem i při nízké koncentraci intracelulárního Ca^{2+} (Alderton et al., 2001). NOS obsahují ve svém aktivním centru hem, jsou aktivní v produkci NO pouze jako homodimery, přičemž každý monomer se skládá ze dvou katalytických domén. Oxygenázová - hemová, N - terminálová doména (HD) zahrnuje vazebná místa pro protoporfyrin IX (hem) a L-arginin (substrát). HD je kalmodulem spojena s C - terminálovou reduktázovou doménou (RD). RD obsahuje vazebná místa pro prostetické skupiny FAD a FMN a kosubstrát NADPH. NADPH je donorem redukčních ekvivalentů pro konverzi L-argininu na L-citrulin. Přenos elektronů se uskutečňuje z NADPH přes FAD a FMN po vazbě na Ca^{2+} - kalmodulem k hemu oxygenázové domény, kde probíhá reakce s tvorbou NO (Jáchymová et al., 2006).

Dvě z výše popsaných izoform jsou konstitutivní - trvale exprimované. nNOS je exprimována hlavně v neuronech, eNOS zase v endoteliálních buňkách. nNOS byla poprvé objevena v předním mozku, ale je trvale exprimována i v kosterním svalu, hladké svalovině cév a myokardu. nNOS je lokalizována v cytosolu na sarkoplazmatickém retikulu a její molekulová hmotnost je 160 kDa. eNOS je exprimována především cévním endotelem, plicním a renálním epitelem a kardiomyocyty. Je lokalizována v kaveolách, malých invaginacích plazmatické membrány, které slouží jako centra pro přenos signálů. Její molekulová hmotnost je 133 kDa. Inducibilní izoforma iNOS o velikosti 130 kDa byla poprvé popsána v makrofágové buněčné linii. Nyní je známo, že iNOS je exprimována mnoha buněčnými typy, jako jsou glie, hepatocyty, cévní endotel, epitel nebo kardiomyocyty. Exprese iNOS je odpovědí na fyziologický nebo patofyziologický podnět, jakým je např. zánět, zátěž organismu nebo hypoxie (Ding et al., 2005).

Několik novějších prací se věnuje také existenci mitochondriální NOS (mtNOS; Zenebe et al., 2007). Mechanismy působení této izoformy však nejsou příliš známé. Cleeter et al. (1994) zjistili, že NO může inhibovat mitochondriální dýchací řetězec reverzibilní kompeticí s O_2 o vazebné místo na komplexu IV (cytochrom c oxidáza). Z tohoto místa může NO regulovat např. apoptózu. Dále bylo prokázáno, že aktivita mtNOS je zvýšená v srdeční tkáni potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (Nagendran et al., 2009).

2.4. Úloha oxidu dusnatého

NO má v organismu nezastupitelnou úlohu. Je to důležitá signální molekula v cévách, imunitním systému a nervové soustavě. Jako plyn dokáže procházet od signalizující buňky přes buněčné membrány a regulovat funkce ostatních buněk. Jeho trvalá sekrece je nutná k udržení průchodnosti cév. Difuzí do lumen NO inhibuje adhezi trombocytů, jejich aktivaci a agregaci. Slouží jako endogenní mediátor vazodilatace produkováný endotelovými buňkami. Funguje také jako neurotransmitter. Vysoké hladiny NO a produkty jeho oxidace jsou toxické, proto bývají využívány buňkami imunitního systému ke zničení invazivních částic (viry, bakterie, tumory). Význam NO v regulaci apoptózy a nekrózy není plně objasněný. Je však zcela evidentní, že NO má cytotoxické a mutagenní vlastnosti. Efekt na regulaci apoptózy je závislý na jeho množství. Pro přežívání buněk je třeba určité koncentrace NO, neboť bylo prokázáno, že inhibitory NOS zvyšují incidenci apoptózy (Li et al., 2002). NO může inhibovat mitochondriální dýchací řetězec, což vede k snížení produkce ATP a zvýšení produkce mitochondriálních ROS. Tento stav zvyšuje náchylnost buňky k buněčné smrti (Brown et al., 2007). NO hraje také důležitou roli u různých patologických stavů, jako jsou septický šok, kardiovaskulární onemocnění, artritida, diabetes mellitus nebo hypertenze (Jáchymová et al., 2006).

2.4.1. Oxid dusnatý a srdce

NO působí na kardiovaskulární systém a hraje roli v některých jeho fyziologických i patofyziologických procesech. Je důležitým regulátorem funkce myokardu a cévního tonu a jeho role v některých patologických stavech, jako je např. ischemie myokardu, je nezpochybnitelná.

Jak již bylo uvedeno v kap. 2.3.2.1., NO se reverzibilně váže na komplex IV (cytochrom c oxidáza) v mitochondriálním dýchacím řetězci (Brown et al., 2007). Pro srdce je NO tedy důležitý hned z několika důvodů. Zaprvé, mitochondrie produkují veškeré ATP, které srdce vyžaduje pro svou svalovou kontrakci, a inhibice mitochondriální respirace tedy vede ke ztrátě kontraktility. Zadruhé, inhibice mitochondriální respirace může vést k nekróze a apoptóze buněk srdeční tkáně. Zatřetí, inhibice mitochondriální respirace stimuluje produkci ROS, jejichž vysoká koncentrace může vést k indukci apoptózy.

V kardiomyocytech je signální kaskáda aktivovaná NO a cGMP zahrnuta do regulace intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Děje se tak přes cGMP - dependentní fosforylaci L - typu vápenatých iontových kanálů (Méry et al., 1991), snížení kontraktility myokardu a tepové frekvence (Balligand et al., 1995) a otevření sK_{ATP} kanálů (Shinbo et al., 1997). Aktivace sK_{ATP} kanálů v srdečním sval vede ke zkrácení doby trvání akčního potenciálu a snížení kontraktility. Několik studií také poukázalo na možnou cytotoxicitu NO. Příliš vysoká produkce NO přispívá k cévním a srdečním patologiím, avšak role NO v těchto abnormalitách nebyla dosud zcela objasněna. Jedna z představ předpokládá, že toxicita NO je způsobena spíše jeho reakcí s O_2^- , při které vzniká ONOO^- . Ten dále interaguje s mnoha buněčnými molekulami a může být příčinou poškození myokardu (Dusting et al., 1996).

2.4.1.1. Syntázy oxidu dusnatého v srdci

Ve zdravém srdci je syntéza NO zajišťována především konstitutivní izoformou eNOS (Garcia et al., 2008). Tato izoforma má za normálních fyziologických podmínek v myokardu největší podíl na produkci NO (Grilli et al., 2003). eNOS je exprimována endoteliálními buňkami koronárních cév i samotnými kardiomyocyty. Z toho vyplývá, že kardiomyocyty jsou pod stálým vlivem NO. eNOS je lokalizována v kaveolách, kde je ukotvena pomocí kaveolinu-3 do plazmatické membrány. nNOS je v srdci přítomná v místních gangliích a nervových vláknech.

Kardiomyocyty exprimují také iNOS. Jak již bylo řečeno, hlavním zdrojem NO v srdci je eNOS, avšak jednou exprimovaná iNOS tuto produkci významně převyšuje. Děje se tak za některých patofyziologických situací, jako jsou např. zánět, ischemicko - reperfuzní poškození, stárnutí nebo srdeční selhání. Expresce iNOS může být indukována přítomností endotoxinů, cytotoxinů, jako jsou např. interleukin 1β (IL- 1β) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α ; Grilli et al., 2003). Chen et al. (2001) prokázali, že ischemicko - reperfuzní poškození je spojeno s nárůstem exprese iNOS a naopak snížením exprese eNOS. Inducibilní izoforma produkuje v porovnání s konstitutivními izoformami mnohem větší množství NO. Avšak vysoká koncentrace vyprodukovaného NO může působit toxicky. Existují studie, které ukázaly, že aktivace iNOS přispívá k poškození myokardu a selektivní inhibice tohoto enzymu může zablockovat ischemické poškození srdeční tkáně a zmenšit velikost infarktového ložiska (Wildhirt et al., 1999).

2.4.1.2. Úloha oxidu dusnatého v ischemickém myokardu

NO má v průběhu akutní ischemie myokardu dva různé účinky. Zaprvé, působí jako silný vazodilatátor. Tato schopnost byla rozpoznána po objevení relaxačního faktoru odvozeného od endotelu (EDRF; Furchgott a Zawadski, 1980) a jeho následné identifikaci jako NO. Zadruhé, NO předchází adhezi a agregaci krevních destiček. Obě tyto vlastnosti mohou přispět k redukci závažnosti ischemie myokardu a také snížit výskyt závažných ischemických arytmií. Ukazuje se, že právě donory NO mají tento potenciál. Studie zabývající se účinky inhibitorů fosfodiesteráz ukázaly, že zvýšená koncentrace cGMP může působit antiarytmicky (Holbrook et al., 1989). Farmakologickým způsobem, jak lze zvýšit hladinu cGMP, je použití NO donorů, které uvolňují NO a stimulují tak sGC v produkci cGMP. Bohužel, výsledky pokusů s různými NO donory na výskyt ischemických arytmií nejsou prozatím konzistentní. Některé z nich prokázaly, že podávání NO donorů (nitroprusid sodný (SNP), 3-morpholinosydnominin (SIN-1), molsidomin) v různých dávkách nemá vliv na ischemickou arytmogenezi (Barnes et al., 1995; Martorana et al., 1983). Předpokládá se, že NO dokáže snížit výskyt ischemických arytmií pouze u živočišných druhů, které mají myokard bohatě zásoben přes kolaterální řečiště. Do této skupiny patří např. psi na rozdíl od potkanů, kteří mají kolaterální cévní zásobení velmi malé. U první skupiny zvířat může NO zvýšit průtok krve do ischemické oblasti kolaterálním cévním zásobením a tím navodit antiarytmický efekt (Barnes et al., 1995). Většina NO vyprodukovaného konstitutivními izoformami má pozitivní efekt na postischemickou obnovu myokardu. Na rozdíl od NO syntetizovaného iNOS, který je spojován s buněčným poškozením v důsledku generace vysoce reaktivních NO derivátů.

2.4.1.2.1. Kontraktilita

NO produkovaný cévními endotelovými buňkami může ovlivňovat kontrakci myokardu, protože endoteliální buňky koronárních tepen se nacházejí v těsném spojení s kardiomyocyty. Kontrakce myokardu je však ovlivňována také NO produkovaným vlastními kardiomyocyty (Rastaldo et al., 2007).

Vliv NO na kontraktilitu myokardu má dvojí charakter (Zaobornyj et al., 2007; Rastaldo et al., 2007). NO může mít na myokard jak pozitivně ionotropní, tak negativně ionotropní efekt, který je závislý na dávce. Nízké koncentrace (0,05 μM) zvyšují kontraktilitu myokardu, zatímco vysoké koncentrace (10 μM) vykazují negativně ionotropní efekt (Kojda et al., 1999;

Muller - Strahl et al., 2000). Jak již bylo zmíněno, iNOS syntetizuje mnohem větší množství NO než ostatní dvě trvale exprimované izoformy, proto po aktivaci iNOS hladina NO může překročit 10 μ M a snížit sílu kontrakce.

Efekt NO na kontraktilitu myokardu také závisí na sGC a množství vyprodukovaného cGMP, které dále aktivuje dvě odlišné signální kaskády. Nízká koncentrace cGMP aktivuje protein kinázu A (PKA), která je zodpovědná za otevření vápenatých iontových kanálů na povrchu sarkoplazmatického retikula a vápenatých kanálů spojených s ryanodinovými receptory, což způsobí vtok vápenatých iontů do intracelulárního prostoru a zvýšení síly kontrakce. Vysoká koncentrace cGMP aktivuje PKG, která blokuje vápenaté iontové kanály na sarkoplazmatickém retikulu a inhibuje troponin C (Rastaldo et al., 2007).

2.4.1.2.2. Srdeční frekvence

Endogenní NO ovlivňuje fyziologii srdce v mnoha ohledech, včetně regulace srdeční frekvence. NO zvyšuje srdeční frekvenci, má tedy pozitivně chronotropní efekt. Tento efekt byl prokázán po exogenním podání SNP a molsidominu (Hogan et al., 1999). Naopak inhibice NOS pomocí N-nitro-L-argininu (L-NA) způsobila snížení srdeční frekvence (Pagliaro et al., 1996). Dále se podařilo prokázat, že NO má přímý vliv na autonomní regulaci srdeční frekvence. Tato hypotéza byla testována podáváním SNP a molsidominu anestezovaným králíkům, kterým byl chirurgicky odstraněn n. vagus a podán propranolol, který inhiboval možnou aktivaci sympatikem. Výsledky ukázaly, že NO donory vykazují pozitivně chronotropní efekt, který je nezávislý na srdeční inervaci (Hogan et al., 1999). Tento výsledek nepřímo potvrdili Chowdhary et al. (2002), kteří studovali přímý účinek NO na srdeční frekvenci u pacientů s transplantovaným srdcem. Denervované srdce dárce reagovalo negativně chronotropně při injekci inhibitoru NOS N-monomethyl-L-argininu (L-NMMA) a pozitivně chronotropně po aplikaci SNP. Přehled dostupných výsledků týkajících se účinku NO na tepovou frekvenci bude podrobněji rozepsán v kap. 5.2.

2.5. Úloha oxidu dusnatého v působení chronické hypoxie

NO je důležitou molekulou uplatňující se v adaptaci kardiopulmonárního systému na chronickou hypoxii. Jak ukázala měření nepřímých ukazatelů produkce NO, chronická hypoxie zvyšuje množství NO v myokardu (Ding et al., 2005; Felaco et al., 2000; Fitzpatrick et al., 2005; Manukhina et al., 1999; Shi et al., 2000), plicích (Xue et al., 1994) a buňkách plicního endotelu (Hampl et al., 2000). Existují však studie, které naopak prokázaly inhibici produkce NO v plicních tepnách (Shaul et al., 1994).

Zvýšená produkce NO je důsledkem zvýšené exprese a aktivity NOS během adaptace na chronickou hypoxii. Kontroverzní otázkou však zůstává, která z izoform (nNOS, iNOS, eNOS) je za ni zodpovědná. Experimentálně bylo prokázáno, že exprese iNOS v srdci je za hypoxických podmínek zvýšená (Grilli et al., 2003; Ding et al., 2005; Rouet - Benzineb et al., 1999). Hypoxie mění expresi iNOS a reguluje ji na úrovni transkripce a posttranskripčních úprav. Jedním z mechanismů, kterým hypoxie zvyšuje expresi iNOS, je indukce transkripčních faktorů, jakým je např. hypoxií indukovaný faktor - 1 (HIF-1). HIF-1 je dimer složený ze dvou podjednotek – HIF-1 α a HIF-1 β , která je konstitutivně exprimovaná (Wang et al., 1995). Exprese HIF-1 α je zvýšená během hypoxie, ale v normoxických podmínkách je rychle degradována (Jewell et al., 2001). Natarajan et al. (2006) na myším modelu dokázali, že HIF-1 α zvyšuje expresi iNOS.

Další studie prokázaly, že chronická hypoxie zvyšuje aktivitu eNOS v myokardu potkana (Ryou et al., 2008; Baker et al., 2001). Ryou et al. (2008) dále dokázali, že intermitentní hypoxie naopak aktivitu tohoto enzymu tlumí. Řada dosud publikovaných protichůdných výsledků (Rouet - Benzineb et al., 1999; Grilli et al., 2003; Ding et al., 2005; Baker et al., 1999; Forkel et al., 2004) může být důsledkem používání odlišných živočišných druhů (myš, potkan, králík, pes), vývojových stádií (neonatalní vs. dospělí jedinci) a způsobů, formy a doby adaptace na chronickou hypoxii (hypobarické vs. normobarické hypoxické komory; intermitentní vs. permanentní hypoxie; adaptace trvající od několika dní po 5 - 6 týdnů). Zásadní otázkou stále zůstává, zda se NO produkovaný v důsledku adaptace na chronickou hypoxii podílí na mechanismu jejího kardioprotektivního působení.

2.5.1. Plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory

Jak již bylo zmíněno v kap. 2.2.1.3., adaptace na chronickou kontinuální a intermitentní hypoxii vede ke vzniku plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory. Není proto překvapující, že nejčastějším modelem pro studium chronické plicní hypertenze je vystavení experimentálních zvířat hypoxickému prostředí.

U zdravých dospělých jedinců je plicní cirkulace maximálně dilatovaná. Tento fakt je založen na znalosti vysokého krevního průtoku, nízkého tlaku a nízké rezistenci plicních cév (Hampl et al., 2000). Vše bylo ověřeno experimentálním podáváním vazodilatátorů, které mají jen malý nebo žádný efekt na plicní cirkulaci. Mechanismy zodpovědné za tento bazální tonus plicních cév nejsou zatím objasněny. Po objevení NO se předpokládalo, že právě kontinuální uvolňování NO udržuje normální plicní cévy dilatované. Současný výzkum pro objasnění bazálního tonu v plicní cirkulaci využívá podávání inhibitorů NOS různým živočišným druhům. U většiny studií na potkanech došlo při chronickém i akutním použití inhibitorů NOS k systémové vazokonstrikci, ale efekt na plicní cévy byl nulový. Tato data dokazují, že kontinuální uvolňování NO přispívá k regulaci bazálního tonu v systémové cirkulaci, což se neprokázalo u plicních cév.

2.5.2. Srdeční funkce

Adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost myokardu k ischemii, která je doprovázena zvýšenou produkcí NO. Výsledky studií ukazují, že v kardioprotekci se uplatňuje jak inducibilní, tak konstitutivní izoformy NOS (Forkel et al., 2004) nebo pouze eNOS izoforma (Shi et al., 2000). Ta je lokalizována v kaveolách sarkoplazmatické membrány společně s K_{ATP} kanály. Baker et al. (2001) prokázali, že zvýšená produkce NO a zvýšený tok iontů přes sK_{ATP} kanály v chronicky hypoxickém myokardu neonatálních králíků spolu souvisí. Tato skupina dokázala, že intracelulární NO uvolněný z podaného NO donoru S-nitrosoglutathionu (GSNO) u normoxických srdcí a endogenní NO produkovaný zvýšenou aktivitou eNOS u chronicky hypoxických srdcí aktivuje sK_{ATP} kanály. Jak u normoxických, tak u chronicky hypoxických srdcí dochází k aktivaci K_{ATP} kanálů cGMP - dependentním mechanismem. Většina dosud publikovaných prací zabývajících se touto otázkou prokázala, že akutní farmakologická inhibice NO produkce eliminovala kardioprotektivní účinek chronické hypoxie (obnova postischemické kontraktilní funkce, velikost infarktu *in vitro*; Baker et al., 1999 a 2001; Ošťádalová et al., 2002;

Ding et al., 2005; Ryou et al., 2008). Ukazuje se, že tato skutečnost však nemusí platit pro výskyt a závažnost ischemických a reperfuzních arytmií, jak naznačila studie Szárszoie et al. (2003): akutní inhibice NO produkce pomocí N-nitro-L-arginin methyl esteru (L-NAME) neovlivnila snížený výskyt a závažnost reperfuzních arytmií na modelu srdce in vitro, působila však antiarytmicky u normoxických jedinců. Naopak akutní zvýšení produkce NO pomocí GSNO zcela eliminovalo antiarytmický účinek chronické hypoxie, ale neovlivnilo arytmogenezi u normoxických jedinců. Zdá se tedy, že zvýšená nabídka exogenního NO v chronicky hypoxickém myokardu dospělého potkana může negativně ovlivňovat arytmogenezi v ischemii.

2.6. Cíle diplomové práce

Na základě detailní analýzy dostupné literatury o úloze NO v mechanismech kardioprotektivního působení chronické hypoxie jsme si definovali následující cíle:

- 1) Zjistit, jak ovlivní chronické podávání NO donoru molsidominu rozvoj plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory způsobené adaptací na chronickou hypoxii.

- 2) Zjistit, jak ovlivní chronické a akutní podání NO donoru molsidominu kardioprotektivní účinek chronické hypoxie.

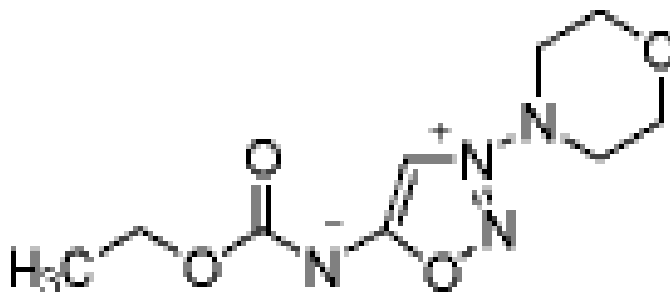
3. Materiál a metody

3.1. Měření systémového tlaku a tlaku v pravé srdeční komoře a množství glutathionu

Zjišťovali jsme vliv chronického podávání NO donoru molsidominu na změnu systémového tlaku a tlaku v pravé srdeční komoře a obsah glutathionu, ukazatele míry oxidačního stresu, v tkáni levé srdeční komory.

3.1.1. Molsidomin - NO donor

Studovanou látkou pro naše pokusy byl NO donor molsidomin (N-(ethoxycarbonyl)-3-(4-morpholinyl)-sydnon imin; Sigma - Aldrich). Molsidomin (*obr. č. 4*) není přímým donorem NO, jedná se o proléčivo, které je v těle metabolizováno. Enzymy v játrech jej přeměňují na jeho aktivní metabolit SIN-1, který uvolňuje NO. Jeho aktivní poločas v krevní plazmě je 1 - 2 hodiny. Molsidomin byl podáván chronicky v denní dávce 15 mg/kg/den rozpuštěný v pitné vodě po dobu 4 týdnů (Elmedal et al., 2004) a akutně v dávce 10 mg/kg, i.v. rozpuštěný ve fyziologickém roztoku 30 minut před regionální ischemií (Chander et al., 2005).



Obr. č. 4: Strukturální vzorec molsidominu. Převzato z katalogu Sigma - Aldrich.

3.1.2. Experimentální skupiny

Pro tento typ pokusů jsme vyčlenili celkem 32 dospělých samců potkanů kmene Wistar (chov Velaz), kteří byli rozděleni do čtyř skupin. Dvě skupiny byly během adaptační fáze chovány v normoxii a další dvě skupiny byly adaptovány na chronicky hypoxické podmínky v normobarické hypoxické komoře (10 % O₂). Dále jsme polovině potkanů chronicky podávali zkoumaný NO donor molsidomin. U všech skupin jsme v den odběru změřili systolický a

diastolický tlak v *a. karotis* a systolický tlak v pravé srdeční komoře, vyjmuli srdce a zmražené vzorky tkáně levé srdeční komory poslali na biochemickou analýzu do Státního zdravotního ústavu.

Charakteristika skupin:

1. skupina - Normoxická kontrola (C)

Kontrolní potkani chovaní po celou dobu adaptační fáze v normoxických podmínkách.

2. skupina - Normoxická kontrola s chronicky podávaným molsidominem (CM)

Normoxické kontroly s chronicky podávaným molsidominem v pitné vodě (15 mg/kg/den) po dobu čtyř týdnů.

3. skupina - Adaptace na chronickou hypoxii (A)

Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii po dobu čtyř týdnů v normobarické hypoxické komoře (10 % O₂).

4. skupina - Adaptace na chronickou hypoxii s chronicky podávaným molsidominem (AM)

Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii, kterým byl chronicky podáván molsidomin v pitné vodě (15 mg/kg/den) po dobu čtyř týdnů.

3.1.3. Experimentální model

Pokusní potkani prošli adaptační fází pokusu, která trvala čtyři týdny. Následujícího dne po posledním dni adaptace jsme anestetizovanému zvířeti změřili systolický (SAP) a diastolický (DAP) arteriální tlak a systolický tlak v pravé srdeční komoře (RVSP). Dále jsme vyjmuli srdce a tkáň levé srdeční komory poslali do Státního zdravotnického ústavu pro stanovení hladiny glutathionu.

3.1.3.1. Experimentální protokol

Všechna pokusná zvířata byla v den odběru anestezována pentobarbitalem sodným (60 mg/kg; Sigma - Aldrich). Následovala kanylace levé *a. karotis* (pro měření arteriálního systolického a diastolického tlaku) a pravá *v. jugularis* (pro měření systolického tlaku v pravé srdeční komoře). Kanylace byla provedena kovovým katetrem, který byl napojený na tlakový snímač. Po dosažení stabilních hemodynamických podmínek byl zaznamenán SAP a DAP v levé *a. karotis* a RVSP v pravé srdeční komoře. Pro další použití jsme z naměřených tlaků spočítali střední arteriální tlak (MAP). Hemodynamická měření (SAP, DAP, RVSP) provedl prof. RNDr. František Kolář, CSc. Po zapsání všech hodnot byl potkan usmrcen otevřením hrudníku, bylo mu rychle vyjmuto srdce a vloženo do chlazeného fyziologického roztoku (0 °C). Srdce bylo nůžkami rozděleno na tkáň pravé a levé komory a septum. Všechny části byly zmrazeny v tekutém dusíku. Jednotlivé vzorky byly zváženy na analytických vahách, označeny a zabaleny do alobalu. Přípravu srdeční tkáně pro biochemickou analýzu provedl RNDr. Jan Neckář, Ph.D. Vzorky byly uchovávány v mrazáku při teplotě -80 °C. Stanovení hladiny glutathionu bylo provedeno RNDr. Jaroslavem Mrázem ve Státním zdravotním ústavu v Praze metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí při vlnové délce 365 nm.

3.2. Model chronické kontinuální hypoxie

Vliv výškové chronické hypoxie na organismus se dá zkoumat různými metodickými přístupy. Nejpřirozenějším modelem pro výzkum chronické hypoxie je vysokohorské prostředí (tzv. výšková hypoxie), dále to jsou laboratorní podmínky simulované v normobarických (řízená změna složení plynů) a hypobarických (snížení pO₂ částečným odčerpáním vzduchu) komorách. Tyto modely umožňují studovat prospěšné i nepříznivé adaptivní změny, průběh desadaptace a farmakologickou protekci proti negativním projevům chronické hypoxie. Jak normobarická, tak hypobarická hypoxie může mít kontinuální nebo intermitentní průběh.

V diplomové práci jsme sledovali vliv normobarické chronické kontinuální hypoxie na laboratorní potkany. Zvířata byla adaptována po dobu čtyř týdnů (24 hod/den, 7 dní/týden) v normobarické hypoxické komoře, kde hypoxie dosahovala 10 % O₂. Požadovaného složení vzduchu v hypoxické komoře bylo dosaženo ještě před zahájením pokusu, takže procento kyslíku na počátku adaptační fáze bylo stejné jako na jejím konci. Během adaptace byla v komoře udržovaná stálá teplota a vlhkost.

3.2.1. Experimentální skupiny

Dospělí samci potkanů kmene Wistar (chov Velaz) byli náhodně rozděleni do základních dvou skupin na normoxické a adaptované na chronicky hypoxické podmínky. Dále byly tyto skupiny děleny podle toho, zda jim byl zkoumaný molsidomin podáván chronicky nebo akutně a kontroly, kterým se molsidomin nepodával. Ve výsledku byly pokusy provedeny na šesti skupinách zvířat. U všech skupin jsme sledovali velikost infarktu a výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií.

Charakteristika skupin:

1. skupina - Normoxická kontrola (C)

Kontrolní potkani chovaní po celou dobu adaptační fáze v normoxických podmínkách.

2. skupina - Normoxická kontrola s chronicky podávaným molsidominem (CM)

Normoxické kontroly s chronicky podávaným molsidominem v pitné vodě (15 mg/kg/den) po dobu čtyř týdnů.

3. skupina - Normoxická kontrola s akutně podaným molsidominem (CMA)

Normoxické kontroly s akutně podaným molsidominem (10 mg/kg) intravenózně 30 minut před ischemií.

4. skupina - Adaptace na chronickou hypoxii (A)

Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii v normobarické hypoxické komoře po dobu čtyř týdnů.

5. skupina - Adaptace na chronickou hypoxii s chronicky podávaným molsidominem (AM)

Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii, kterým byl chronicky podáván molsidomin v pitné vodě (15 mg/kg/den) po dobu čtyř týdnů.

6. skupina - Adaptace na chronickou hypoxii s akutně podaným molsidominem (AMA)

Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii, kterým byl 30 minut před ischemií podán molsidomin (10 mg/kg) intravenózní infuzí.

3.2.2. Experimentální model srdce *in situ*

Model srdce *in situ* je standardní metodou pro studium citlivosti myokardu k letálnímu buněčnému poškození - vzniku infarktu myokardu u experimentálních zvířat. Podstatou metody je akutní okluze koronární arterie v anestezovaném zvířeti, která způsobí rozvoj regionální ischemie myokardu. Během ischemie kardiomyocyty trpí nedostatečným zásobováním kyslíkem, nejdříve dochází k reverzibilním později i k ireverzibilním změnám vedoucím ke vzniku infarktu myokardu. V průběhu ischemie a následné reperfuze se mohou vyskytovat komorové arytmie, další z projevů akutního infarktu myokardu. Po ukončení pokusu je na vyjmutém srdci histochemicky hodnocena velikost infarktu.

3.2.2.1. Operační fáze pokusu

Pokusná zvířata byla anestezována pentobarbitalem sodným (60 mg/kg; Sigma - Aldrich) intraperitoneálně. Hloubka anestezie byla testována korneálním reflexem a štípnutím chirurgickou pinzetou do konce ocasu. Uspané zvíře bylo přemístěno na vyhřívaný operační stůl a po celou dobu pokusu byla jeho tělesná teplota monitorována rektálním

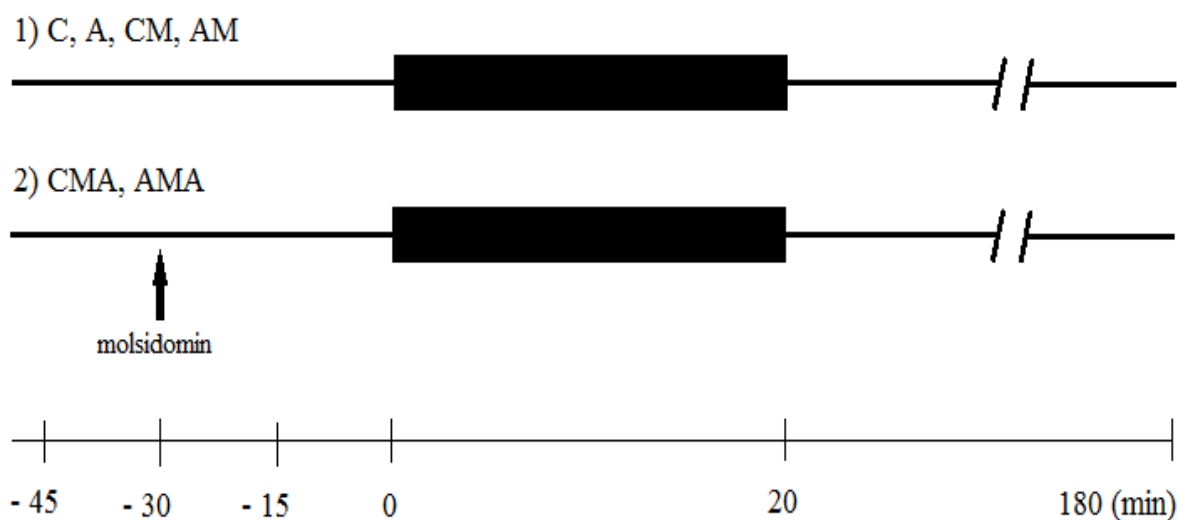
teploměrem a udržována v rozmezí 36,5 - 37,5 °C. Hematokrit byl měřen ze vzorku ocasní krve odebrané do heparinizovaných kapilár (Vitrex Medical). Poměr červených krvinek byl stanoven mikrocentrifugací na přístroji Micro 20, Hettich (Germany). Následovala kanylace levé *a. karotis* (pro měření tlaku) a pravé *v. jugularis* (pro podání farmaka) heparinizovanými polyethylenovými kanylami (Portex, England). Dalším krokem byla tracheotomie, zavedení tracheální kanyly (hadička z infuzního setu; Gama) do trachey. Potkani byli napojeni na ventilátor pro drobné hlodavce (Ugo Basile, Italy). Parametry dýchání byly: dechový objem 1,2 ml/100 g zvířete, 68 - 70 cyklů/min. Dále byla provedena levostranná thorakotomie, otevřeli jsme hrudník asi 1 cm pod spojnici předních končetin v oblasti 5. mezižebří. Otvor hrudníku byl za pomoci nůžek zvětšen tak, aby se do rány vešel retraktor umožňující přístup k srdci. Chirurgickou pinzetou jsme odstranili perikard. Lokalizovali jsme sestupnou větev levé koronární arterie (LAD), jejíž podvaz byl proveden šicím vláknem a chirurgickou jehlou (Chirmax) 1 - 2 mm distálně od místa odstupu LAD od levé koronární arterie (LCA). Oba konce vlákna byly provlečeny polyetylenovou kanylou a zajištěny chirurgickou svorkou. Nakonec byl potkan napojen na měření tlaku a EKG. Pro snímání EKG jsme k potkanovi připojili tři jehlové snímací elektrody tak, aby na monitoru byl co nejčitelnější záznam. Dále byl měřen arteriální krevní tlak. Tlak byl snímán vnějším snímačem (Gould P236b, USA) z nakanylované *a. karotis*. Obě měření (EKG, krevní tlak) byla zaznamenávána počítačovým programem CAR od začátku stabilizace, během ischemie a prvních tří minut reperfuze. Po skončení monitorování na počátku reperfuze byl otvor v hrudníku uzavřen několika stehy a přebytečný vzduch a tekutiny byly odsáty. Potkan byl odpojen od ventilační pumpy a samovolně dýchající byl přemístěn na vyhřívanou podložku, kde byl po dobu reperfuze udržován v hluboké anestezii.

3.2.2.2. Experimentální protokol

Skupiny C, CM a CMA byly po dobu adaptační fáze chovány v normoxických podmínkách. Skupiny A, AM a AMA byly adaptovány na hypoxické podmínky v normobarické hypoxické komoře. Skupinám CM a AM byl podáván molsidomin rozpuštěný v pitné vodě (15 mg/kg/den) po dobu 4 týdnů. Skupinám CMA a AMA byla podána pětiminutová intravenózní infuze rozpuštěného molsidominu (10 mg/kg) ve fyziologickém roztoku 30 minut před ischemií. Experimentální protokol zobrazuje *obr. č. 5*.

Všechny skupiny prošly operační fází pokusu. Na jejím konci byli naoperovaní potkani napojeni k měření krevního tlaku a EKG. Po desetiminutové stabilizační fázi následovala

ischemie. Okluze byla vyvolána tlakem polyethylenové trubičky proti arterii v místě podvazu a upevněním kanyly na šicím vlákně chirurgickou svorkou. Po dvacetiminutové ischemii byla svorka uvolněna a kanyla odstraněna z vlákna. Následovala tři hodiny trvající reperfuze. Po uplynutí této fáze bylo potkanovi vyjmuta srdce z těla a použito pro stanovení velikosti infarktu.



Obr. č. 5: Schéma experimentálního protokolu. 1) Experimentální skupiny C, A, CM, AM - 20 min ischemie, 180 min reperfuze. 2) Experimentální skupiny CMA, AMA - 30 min před ischemií byl podán NO donor molsidomin, 20 min ischemie, 180 min reperfuze. C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

3.2.3. Stanovení velikosti infarktu

Srdce jsme potkanovi vyndali po uplynutí tříhodinové reperfuze a ihned vložili do kádinky s fyziologickým roztokem. Aorta byla napojena a šicím vláknem připevněna na kovovou kanylu spojenou s injekční stříkačkou naplněnou fyziologickým roztokem. Srdce jsme důkladně propláchnuli fyziologickým roztokem, abychom odstranili zbytky krve z koronárního řečiště a srdečních komor. Opět jsme provedli okluzi LAD. Následně jsme pomocí injekční stříkačky perfundovali srdce 5% roztokem manganistanu draselného (KMnO_4 ; Lachema), abychom barevně odlišili okludovanou oblast od normálně perfundované. Oxidační reakcí manganistanu došlo k obarvení normálně perfundované oblasti dohněda. Následně bylo srdce propláchnuto fyziologickým roztokem a uvolněna ligatura.

Srdce jsme sundali z kanyly a odstříhali z něj odstupující cévy a srdeční síně. Dále bylo osušeno filtračním papírem, zabaleno do kousku potravinové folie a dáno do mrazáku. Po 1 hod byla tkáň dostatečně ztuhlá, abychom srdce mohli nakrájet na 6 - 8 příčných řezů. Řezy jsme

vložili do lahvičky s 10 ml 1% 2, 3, 5 - trifenyltetrazolium chlorid (TTC; Sigma - Aldrich) ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (0,1 g TTC + 10 ml pufru). Pro přípravu 10 ml tohoto pufru o pH 7,4 jsme smíchali: 7,75 ml 0,1 M roztoku Na_2HPO_4 (3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/100$ ml v dionizované vodě; Penta) a 2,25 ml 0,1 M roztoku NaH_2PO_4 (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4/100$ ml v dionizované vodě; Penta). Lahvičku s řezy jsme vložili do kádinky s teplou vodou, což vedlo k ohřátí roztoku TTC na požadovaných 37 °C. Po 30 min jsme TTC roztok vylili a vyměnili za vodný roztok formaldehydu.

Takto fixovaná srdce jsme uložili do lednice. Po 2 - 3 dnech jsme z řezů odstranili pravou komoru. Řezy jsme poskládali na Petriho misku (*obr. č. 6*) a vyfotografovali z obou stran fotoaparátem (Nikon) při osvětlení laboratorní lampou. Ze vzniklého souboru fotografií jsme pomocí počítačového programu Ellipse analyzovali velikost infarktu. Počítačovou planimetrií jsme určili velikost infarktového ložiska (IS), velikost ohrožené oblasti (AR) a velikost levé komory (LV).

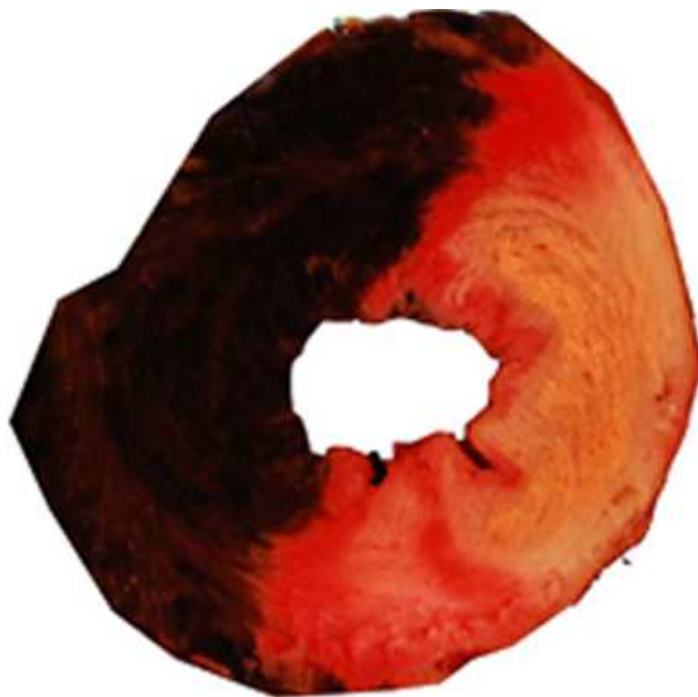
3.2.4. Vyhodnocení experimentálně získaných dat

3.2.4.1. Velikost infarktu

Velikost infarktového ložiska byla stanovována z fotografií příčných řezů (*obr. č. 7*). Snímky řezů jednotlivých srdcí, vyfotografované jak z apikální, tak z bazální strany, byly z fotoaparátu vloženy do počítače, kde byly doostřeny v programu Adobe Photoshop. Ze snímků zabírajících 6 - 8 příčných řezů byly jednotlivé řezy postupně vyřezány a vloženy do samostatných souborů. Dále jsme je vkládali do programu Ellipse, kde jsme analyzovali vlastní velikost ploch. Principem této metody je fakt, že perfuze manganistanem draselným způsobila barevné rozlišení jednotlivých oblastí řezu srdečního myokardu. Normálně perfundovaná oblast byla zbarvena dohněda; tkáň, která byla okluží LAD oddělena od krevního zásobení, ale přežila, byla zbarvena dočervena; bílá až šedivá barva pak představovala nekrotické ložisko.



Obr. č. 6: Fotografie řezů obarveného myokardu.



Obr. č. 7: Příčný řez obarveného srdce. Černohnědá barva - oblasti normálně perfundované; červená barva - oblasti myokardu, které odolaly ischemickému poškození v ohrožené oblasti; bílá barva - nekrotická tkáň.

Snímky řezů byly postupně proloženy třemi připravenými sítěmi bodů (35x35 bodů). V první síti jsme označili všechny body, které byly součástí řezu, jejichž počet nám ukazoval celkovou velikost levé komory (LV). V druhé síti byly označeny body, které spadaly do hnědě obarvené oblasti; ukazovaly nám velikost normálně perfundované oblasti. Pokud jsme toto číslo odečetli od velikosti levé komory, vyšla nám velikost ohrožené oblasti zasažené okludovanou arterií (AR). Ve třetí síti jsme označili body, které ležely uvnitř červeně zbarvené oblasti. Pokud jsme toto číslo odečetli od velikosti ohrožené oblasti, vyšla nám velikost infarktového ložiska (IS).

3.2.4.2. Ischemické a reperfuční arytmie

Komorové arytmie byly sledovány v průběhu dvacetiminutové ischemie a prvních tří minut reperfuze.

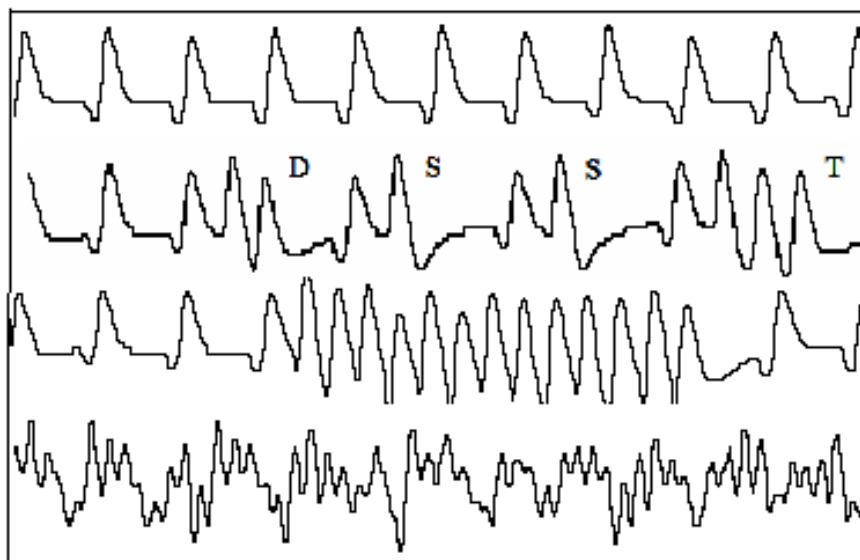
Na EKG záznamu jsme hodnotili 5 typů arytmií:

1. Jednoduché předčasné komorové stahy - tzv. singels;
2. Dvojité předčasné komorové stahy těsně po sobě následující - tzv. doublets;
3. Trojité předčasné komorové stahy těsně po sobě následující - tzv. triplets;
4. Komorové tachykardie (VT) obsahující čtyři a více předčasných komorových stahů jdoucích za sebou;
5. Komorové fibrilace (VF) představovaly heterogenní nekoordinovanou elektrickou aktivitu myokardu.

Jednotlivé typy ischemických arytmií názorně zobrazuje *obr. č. 8. Záznamy EKG z průběhu ischemie a reperfuze všech experimentálních skupin byly uloženy v počítači a následně vyhodnocovány v programu CAR, kde jsme je postupně procházeli a analyzovali jednotlivé typy arytmií. Program nám následně vytvořil protokol, který obsahoval informace o výskytu a závažnosti arytmií v jednotlivých minutách ischemie a reperfuze a jejich celkový počet. Podle výskytu jednotlivých typů ischemických a reperfučních arytmií jsme ke každému záznamu přiřadili hodnotu arytmiického skóre (tab. č. 1).*

Body	Typ arytmíí
0	bez arytmíí
1	jednoduché předčasné komorové stahy (singels; S)
2	dvojité (doublets; D) a trojité (triplets; T) předčasné komorové stahy
3	komorové tachykardie (VT)
4	reverzibilní komorové fibrilace (VF)
5	ireverzibilní komorové fibrilace

Tab. č. 1: Bodové hodnocení arytmíí (skóre).



Obr. č. 8: Typy ischemických arytmíí: 1. řádek - normální rytmus; 2. řádek - singels (S), doublets (D), triplets (T); 3. řádek - komorová tachykardie; 4. řádek - komorová fibrilace.

3.3. Měření krevních plynů

Dílčím úkolem mé diplomové práce bylo zjistit, jak se umělé dýchání potkanů projevuje na složení plynů a pH arteriální krve. Na našem Oddělení vývojové kardiologie se pro umělé dýchání potkanů používá standardní dechový objem 1,2 ml vzduchu/100 g zvířete. Tato hodnota byla převzata z experimentální studie (Li et al., 1995) a sloužila při pokusech jako neměnná konstanta řadu let. V nedávné době, po zakoupení analyzátoru krevních plynů ABL5 (Radiometer Copenhagen), se však naskytla příležitost k ověření její správnosti. Zjišťovali jsme tedy pH, saturaci kyslíkem (sO_2), parciální tlak oxidu uhličitého (pCO_2) a kyslíku (pO_2) ve vzorcích arteriální krve odebraných při ventilaci o různých dechových objemech umělého dýchání.

ABL5 Blood Gas System je přístroj určený pro měření vzorků lidské krve v biochemických laboratořích. ABL5 měří následující parametry: pH, pCO_2 a pO_2 . ABL5 prochází automaticky dvěma druhy kalibrací, ta kratší z nich (Cal 1) se koná každou půlhodinu, delší (Cal 2) po každých 4 hodinách provozu. pH elektroda je kalibrována podle dodaných kalibračních roztoků (S1545 Calibrating Solution 1, S1555 Calibrating Solution 2) a elektrody pro pCO_2 a pO_2 podle směsi plynů z připojených plynových bomb, které obsahují přesně definovanou směs plynů s 5,6 a 11,2 % CO_2 . Pro analýzu vzorku je potřebný objem 80 μ l arteriální nebo venózní krve. Vzorek krve může být nasán z injekční stříkačky, zkumavky nebo heparinizovaných kapilár. Nasátá krev prochází měřicími komorami s referenční, pH, pCO_2 a pO_2 elektrodou. Přístroj nakonec vytiskne zprávu se zadaným číslem pokusu, přednastaveným typem zkoumané krve (arteriální, venózní), teplotou (37 °C) a obsahem hemoglobinu. Zpráva dále obsahuje naměřené hodnoty (pH, pCO_2 , pO_2) a z nich odvozené hodnoty (saturace kyslíkem, koncentrace HCO_3^-). Po každé analýze a kalibraci je měřicí systém automaticky propláchnut.

3.3.1 Experimentální skupina

Pro tento typ pokusů jsme použili pouze jednu experimentální skupinu o pěti dospělých samcích potkanů kmene Wistar (chov Velaz), kterým jsme během operační fáze pokusu měnili sled tří dechových objemů v pořadí 1,2 - 0,8 - 0,6 ml/100 g zvířete.

3.3.2. Experimentální model

Změny krevních hodnot, popsanych v kap. 3.3., ke kterým dojde v důsledku použití odlišných dechových objemů umělého dýchání, jsme zjišťovali za pomoci ABL5 z 11 vzorků arteriální krve potkana odebraných během operační fáze pokusu.

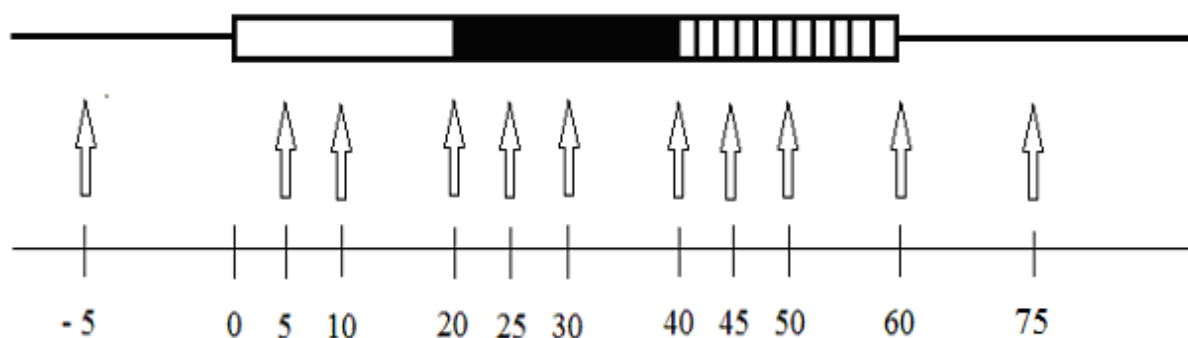
3.3.2.1. Operační fáze pokusu

Pokusná zvířata byla anestetizována pentobarbitalem sodným (60 mg/kg; Sigma - Aldrich) intraperitoneálně. Hloubka anestezie byla testována korneálním reflexem a štípnutím pinzetou do konce ocasu. Uspané zvíře bylo přemístěno na vyhřívaný operační stůl a po celou dobu pokusu byla kontrolována jeho tělesná teplota zavedeným rektálním teploměrem a udržována v rozmezí 36,5° - 37,5 °C. Následovala kanylace levé *a. karotis* heparinizovanou polyethylenovou kanylou (odebrání krevních vzorků; Portex, England). Dále byla provedena tracheotomie, kdy byla do trachey zavedena tracheální kanyla (Gama) pro následné napojení na ventilátor pro drobné hlodavce (Ugo Basile, Italy). Byla provedena levostranná thorakotomie, otevřeli jsme hrudník v oblasti asi 1 cm pod spojnici předních končetin. Rychle jsme potkana napojili k ventilační pumpě. Ta byla přednastavena tak, aby dodávala požadovaný dechový objem s frekvencí 68 - 70 cyklů/min. Po odebrání 10. krevního vzorku jsme otvor v hrudníku zašili a potkana odpojili od umělého dýchání a provedli poslední odběr krve.

3.3.2.2. Experimentální protokol

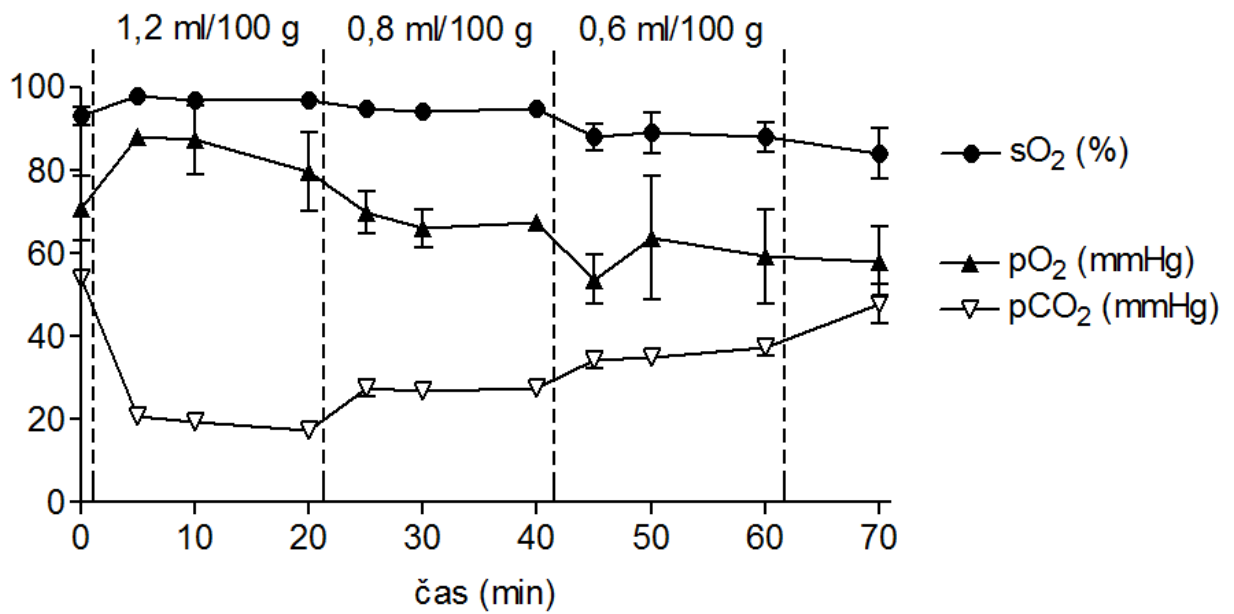
Všem pokusným potkanům bylo v průběhu pokusu odebráno 11 krevních vzorků. Krev byla odebírána z nakanylované *a. karotis* do heparinizovaných kapilár o objemu 80 µl (Vitrex Medical). Kapilára byla napojena k ABL5 a krevní vzorek byl přístrojem nasán a analyzován. První odběr (1) byl proveden po kanylaci a tracheotomii. V 5. min po napojení k umělé ventilaci byl odebrán druhý (2), třetí (3) byl odebrán v 10. min a čtvrtý (4) ve 20. min podávání prvního analyzovaného dechového objemu 1,2 ml/100 g. Dále jsme ventilační pumpu přenastavili na druhý testovaný dechový objem (0,8 ml/100 g) a odebrali další tři vzorky (5, 6, 7) ve stejných časových intervalech jako v předešlém případě. Opět jsme změnili dýchací objem na 0,6 ml/100 g a odebrali další tři vzorky (8, 9, 10). Po zašití otvoru v hrudníku jsme potkana

odpojili od umělé ventilace. Po dalších 10 minutách byl proveden poslední odběr (11). Názorněji experimentální protokol zobrazuje *obr. č. 9*.

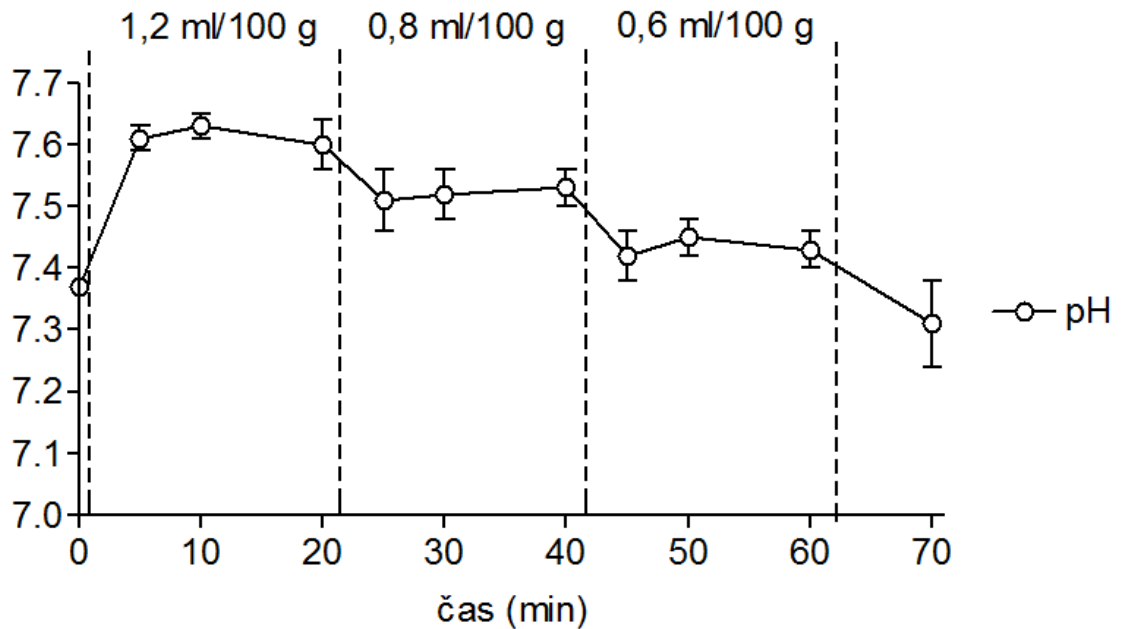


Obr. č. 9: Schéma experimentálního protokolu. Prázdný obdélník označuje dobu, po kterou byl potkanům podáván dechový objem 1,2 ml/100 g, černě vybarvený obdélník 0,8 ml/100 g a proužkovaný obdélník 0,6 ml/100 g. Šipky označují čas odebrání krevního vzorku.

Vyhodnocení těchto pokusů mělo ukázat, jaký vliv má změna velikosti objemu umělého dýchání na složení krevních plynů a zda je možné sledované parametry (pH, sO_2 , pO_2 , pCO_2) normalizovat pouhou změnou velikosti dechového objemu. *Graf č. 1* zobrazuje průběh změn sO_2 , pO_2 a pCO_2 v závislosti na velikosti podávaného dechového objemu. Z grafu je patrný pokles sO_2 a zároveň i pO_2 s klesajícím objemem dechu. Opačná závislost platí pro pCO_2 , který se zmenšeným dechovým objemem stoupal. *Graf č. 2* doplňuje předešlý graf o informace týkající se hodnoty pH arteriální krve, které během aplikace nižších dechových objemů klesaly. Pro porovnání zmiňují průměrné hodnoty těchto veličin za fyziologických podmínek: pH 7,35; pO_2 90 - 100; pCO_2 35 - 45 (převzato z Gross, 1994). Tímto pokusem jsme prokázali, že standardně podávaný dechový objem 1,2 ml/100 g splňuje náš požadavek na dostatečnou saturaci krve kyslíkem. Zároveň je však zřejmé, že tyto podmínky snižují pCO_2 a zvyšují pH. Naše pokusy ukázaly, že pouhou změnou velikosti dechového objemu nelze normalizovat všechny sledované parametry. Tento požadavek bude možné splnit při použití směšovače vzduchu, který obohatí vdechovaný vzduch o kyslík.



Graf č. 1: Průběh změn saturace kyslíkem (sO₂), parciálního tlaku kyslíku (pO₂) a parciálního tlaku oxidu uhličitého (pCO₂) za podávání různých objemů umělého dýchání.



Graf č. 2: Průběh změn pH za podávání různých objemů umělého dýchání.

3.4. Statistické zpracování naměřených dat

Výsledky jsou uváděny jako průměry \pm střední chyba průměru (SEM). Statistické rozdíly mezi dvěma experimentálními skupinami s normálním rozložením dat byly hodnoceny t - testem nebo Mann - Whitneyho testem v případě dat s nenormálním rozložením. Pro zjištění statistické významnosti mezi třemi a více skupinami byla použita jednocestná ANOVA s následným Newman - Keulsovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na úrovni $P < 0,05$. Výsledky byly graficky zpracovány v počítačovém programu GraphPad Prism verze č. 3.

4. Výsledky

V rámci diplomové práce bylo provedeno 141 experimentů zaměřených na dva různé cíle (viz kap. 2.6.). První série pokusů byla určena pro invazivní měření systolického (SAP) a diastolického (DAP) tlaku v levé *a. karotis* a systolického tlaku v pravé srdeční komoře (RVSP). Ve Státním zdravotním ústavu byla následně provedena biochemická analýza vzorků tkáně levé srdeční komory pro stanovení obsahu glutathionu. Tato měření zahrnovala 32 laboratorních potkanů rozdělených do čtyř experimentálních skupin. Velikost skupin a počet měření uvádí *tab. č. 2*.

Skupina	Počet kusů	SAP	DAP	RVSP
C	8	8	8	8
A	8	6	6	6
CM	8	7	7	8
AM	8	8	8	7

Tab. č. 2: Počet provedených pokusů, měření systolického (SAP) a diastolického (DAP) arteriálního tlaku a systolického tlaku v pravé srdeční komoře (RVSP) u jednotlivých experimentálních skupin. *C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin.*

V *tab. č. 2* chybí 3 měření SAP. Důvodem byla smrt 2 potkanů ze skupiny A v průběhu experimentu a utlumeného záznamu měřených tlaků u 1 potkana ze skupiny CM. Ze stejných důvodů chybí i příslušné hodnoty DAP a RVSP.

Dalších 109 pokusů jsme provedli v rámci studie analyzující efekt molsidominu na velikosti infarktu a výskyt ischemických a reperfučních arytmií. Velikost skupin, počet vyhodnocených záznamů arytmií a počet analyzovaných velikostí infarktů uvádí *tab. č. 3*.

Skupina	Počet kusů	Analýza arytmií	Analýza velikosti infarktu
C	16	16	10
A	18	18	14
CM	24	23	15
AM	27	27	20
CMA	13	12	6
AMA	11	9	9

Tab. č. 3: Počet provedených pokusů, vyhodnocených záznamů arytmií a analýz velikosti infarktu u jednotlivých experimentálních skupin. *C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.*

Do hodnocení velikosti infarktu nebylo zařazeno 35 experimentů. 28 srdcí bylo z analýzy vyloučeno z důvodu nezdařeného obarvení. Zastoupení nehodnocených srdcí u jednotlivých experimentálních skupin bylo: 5 z C, 2 z A, 8 z CM, 6 z AM, 6 z CMA, 1 z AMA. Sedm potkanů zemřelo během reperfuze, pravděpodobně v důsledku rozsáhlého ischemického poškození. Zastoupení těchto potkanů bylo: 1 z C, 2 z A, 1 z CM, 1 z AM, 1 z CMA, 1 z AMA. Čtyři záznamy EKG nebyly hodnoceny. 1 z CM kvůli smrti potkana během probíhající ischemie, 1 z CMA a 2 z AMA pro špatnou čitelnost.

4.1. Vliv chronického podávání molsidominu na systémový tlak a tlak v pravé srdeční komoře a množství glutathionu

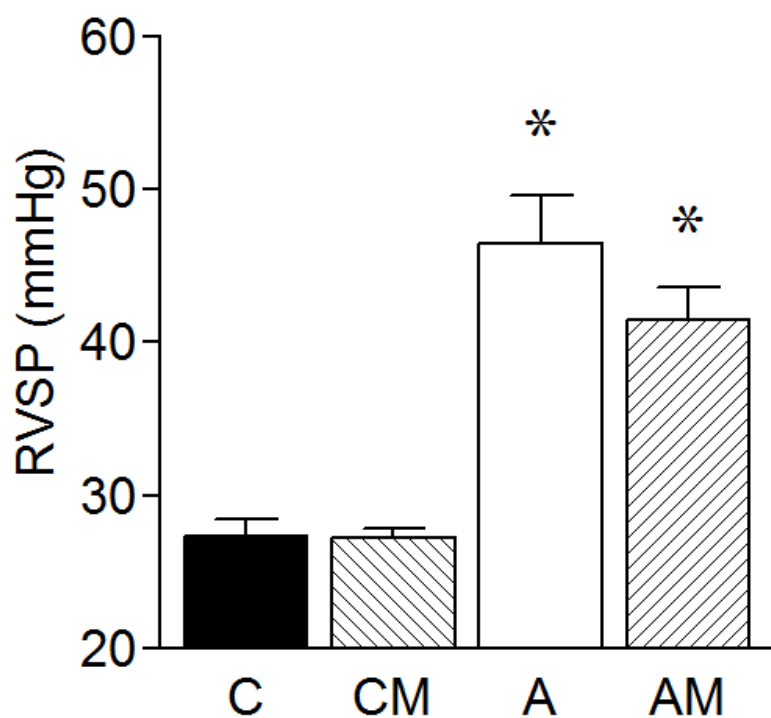
Tab. č. 4 uvádí hodnoty tepové frekvence (HR), systolického (SAP) a diastolického (DAP) arteriálního tlaku. Uvedené hodnoty HR, SAP a DAP se od sebe významně nelišily. Spolu s tímto měřením bylo provedeno i měření systolického tlaku v pravé srdeční komoře (RVSP), jehož hodnoty (C $27,33 \pm 1,13$; CM $27,24 \pm 0,6$; A $46,48 \pm 3,09$; AM $41,43 \pm 2,16$) jsou znázorněny v *grafu č. 3*. Z grafu je patrný významný nárůst RVSP u skupin adaptovaných na chronickou hypoxii (A, AM) oproti normoxickým skupinám (C, CM) o 70 % a 52 %. Zdá se tedy, že chronicky podávaný molsidomin měl výraznou tendenci snížit rozvoj plicní hypertenze u chronicky hypoxických potkanů, ale neovlivnil normoxické potkany. Následující *graf č. 4* pak ukazuje hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP), které se mezi skupinami významně nelišily (C $99,83 \pm 3,88$; CM $99,17 \pm 5,53$; A $99,33 \pm 4,91$; AM $108,42 \pm 2,88$).

Skupina	HR (min^{-1})	SAP (mmHg)	DAP (mmHg)
C	349 ± 8	117 ± 4	91 ± 4
CM	357 ± 11	117 ± 4	96 ± 5
A	352 ± 15	119 ± 5	90 ± 5
AM	326 ± 12	124 ± 3	97 ± 3

Tab. č. 4: Tepová frekvence (HR), systolický (SAP) a diastolický (DAP) arteriální tlak. C - *Kontroly*, A - *Adaptace na hypoxii*, CM - *Kontroly + chronicky podávaný molsidomin*, AM - *Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin*.

Graf č. 5 ukazuje hmotnost pravé komory vztaženou na tělesnou hmotnost zvířete. Hodnoty pro jednotlivé skupiny byly: C $0,456 \pm 0,013$; CM $0,454 \pm 0,01$; A $0,695 \pm 0,026$; AM $0,665 \pm 0,035$. Ve shodě s měřením RVSP (*graf č. 3*) je zde patrný nárůst hmotnosti pravé komory u skupin adaptovaných na chronickou hypoxii (A, AM) oproti normoxickým skupinám (C, CM) o 52 % a 47 %. Následující *graf č. 6* pak ukazuje hmotnost levé komory vztaženou na tělesnou hmotnost zvířete (C $1,366 \pm 0,048$; CM $1,316 \pm 0,033$; A $1,425 \pm 0,041$; AM $1,373 \pm 0,036$). Zde jsme mezi skupinami nepozorovali žádné významné rozdíly, podobně jako v případě měření systémových tlaků (*graf č. 4, tab. č. 4*).

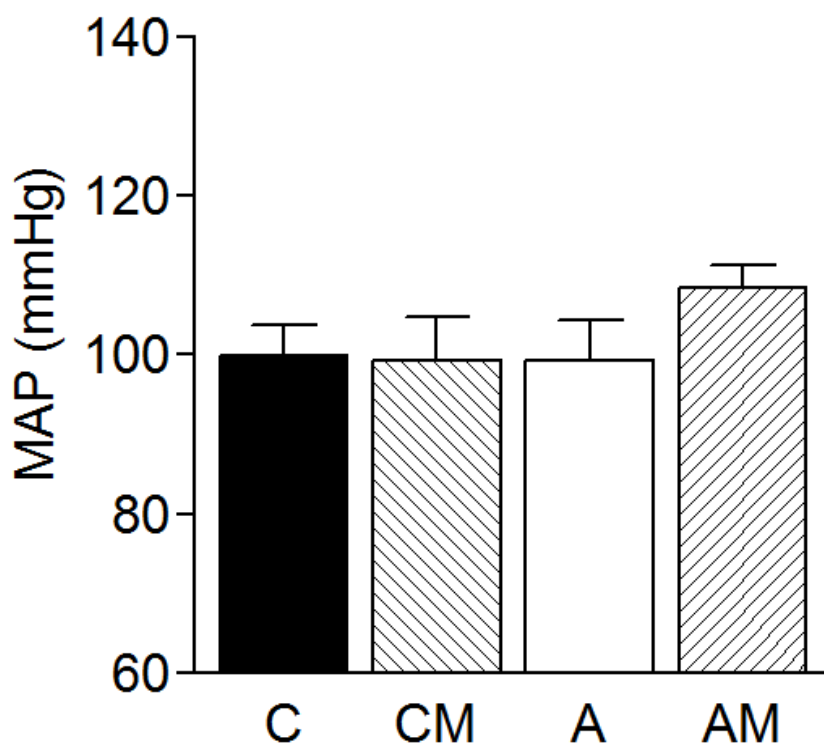
Grafy č. 7 a 8 zobrazují obsah redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu ve vzorcích tkáně levé srdeční komory a poměr GSH/GSSG. Jednotlivé hodnoty byly: GSH: C $1,94 \pm 0,04$; CM $1,91 \pm 0,029$; A $1,8 \pm 0,036$; AM $1,88 \pm 0,057$; GSSG: C $0,053 \pm 0,002$; CM $0,057 \pm 0,001$; A $0,052 \pm 0,001$; AM $0,061 \pm 0,003$. Signifikantní rozdíly zde nebyly nalezeny, nicméně jak chronická hypoxie, tak chronicky podávaný molsidomin snížily tento poměr, což svědčí o zvýšeném oxidačním stresu v důsledku obou intervencí.



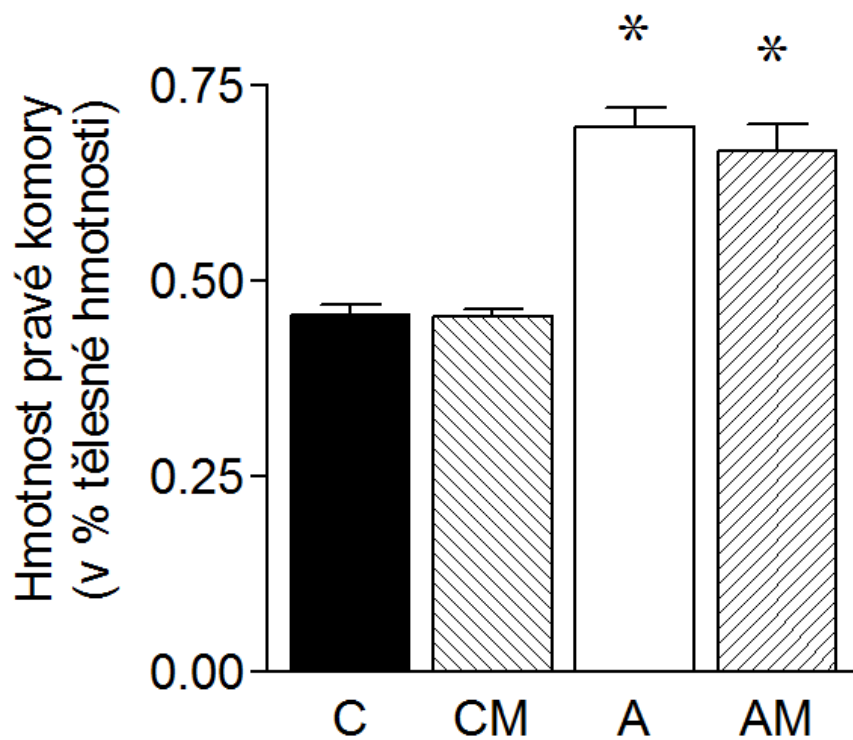
Graf č. 3: Systolický tlak v pravé srdeční komoře (RVSP). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin.

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: A vs. C

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: AM vs. CM



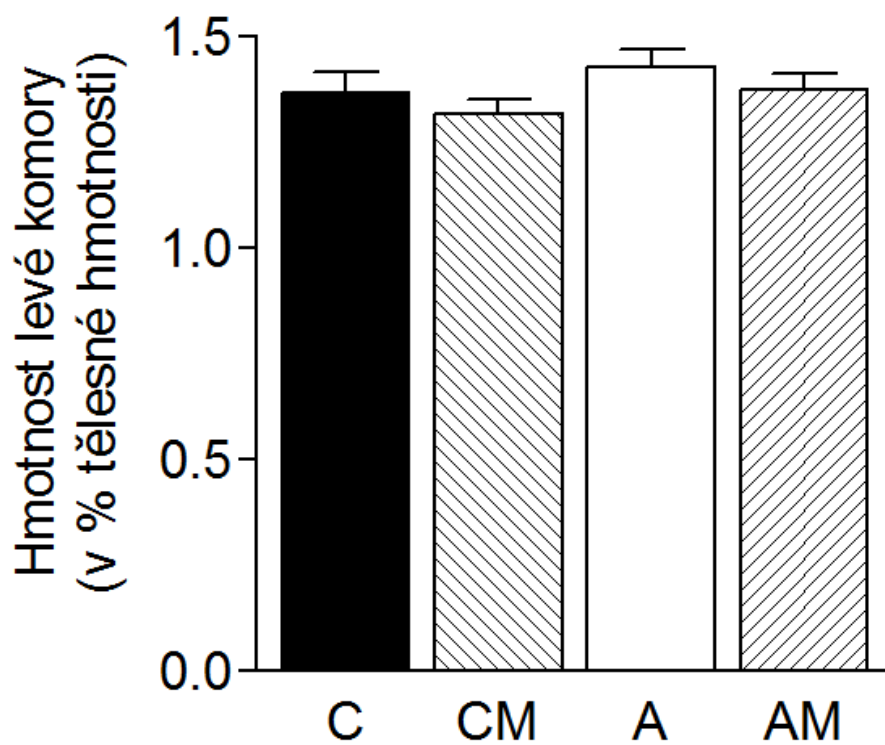
Graf č. 4: Střední arteriální tlak (MAP). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin.



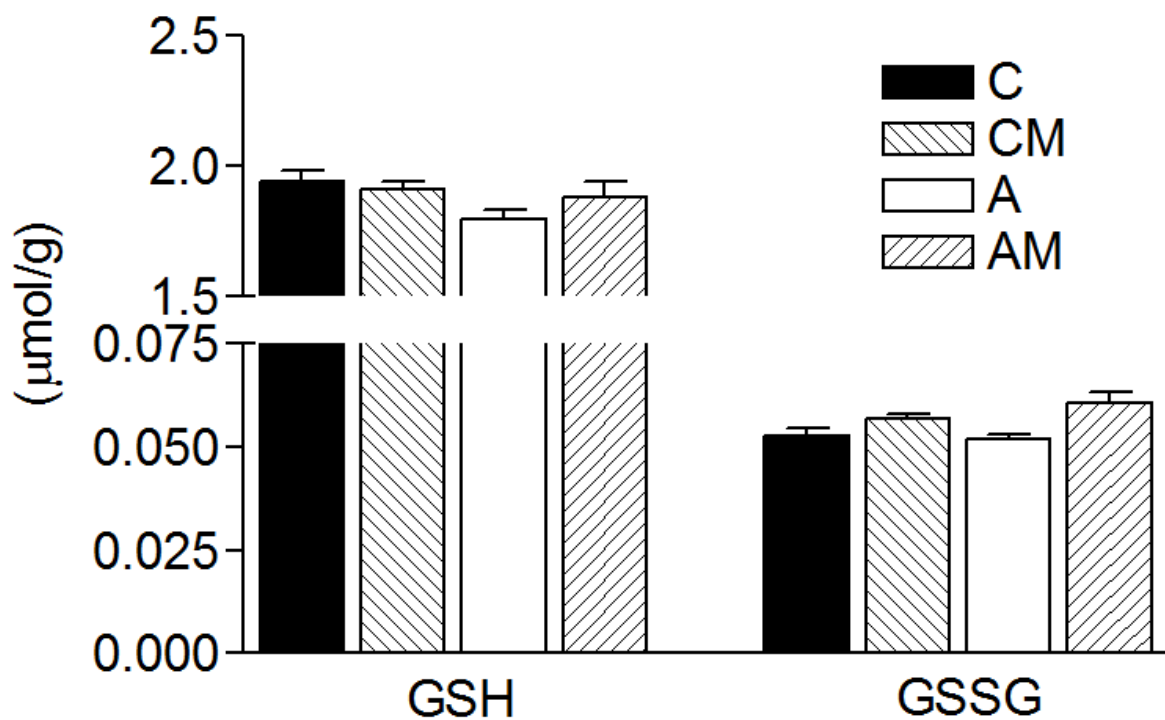
Graf č. 5: Hmotnost pravé komory vztažená na tělesnou hmotnost. *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin.

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: A vs. C

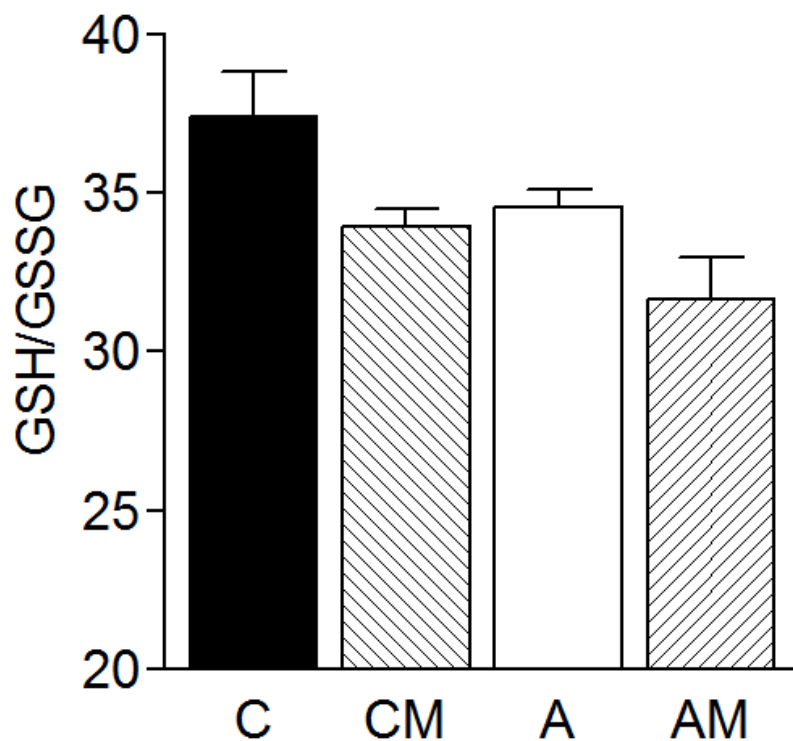
* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: AM vs. CM



Graf č. 6: Hmotnost levé komory vztažená na tělesnou hmotnost. *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin.



Graf č. 7: Obsah redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu ve vzorcích tkáně levé srdeční komory. C - *Kontroly*, A - *Adaptace na hypoxii*, CM - *Kontroly + chronicky podávaný molsidomin*, AM - *Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin*.



Graf č. 8: Poměr redukované (GSH) a oxidované (GSSG) formy glutathionu ve vzorcích tkáně levé srdeční komory. C - *Kontroly*, A - *Adaptace na hypoxii*, CM - *Kontroly + chronicky podávaný molsidomin*, AM - *Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin*.

4.2. Vliv chronického a akutního podávání molsidominu na ischemické poškození srdce

Tab. č. 5 ukazuje tělesnou hmotnost (BW) a tepové frekvence (HR) v definovaných časových intervalech u jednotlivých experimentálních skupin. Průměrná BW u normoxických potkanů (C, CM, CMA) byla 354 ± 4 g, u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (A, AM, AMA) byla 345 ± 4 g. BW se mezi jednotlivými skupinami příliš nelišila, u potkanů adaptovaných na hypoxii klesla pouze o 2,5 %. Chronické podávání molsidominu nemělo významný efekt na BW a to jak u normoxických, tak chronicky hypoxických potkanů. *Graf č. 9* znázorňuje BW jednotlivých experimentálních skupin.

Dalšími parametry, které jsme sledovali, byla HR a střední arteriální tlak (MAP). Naměřené hodnoty HR (*tab. č. 5*) se na počátku experimentu mezi jednotlivými skupinami významně nelišily a ani v jeho průběhu nedošlo ke statisticky signifikantním změnám. V *tab. č. 6* jsou uvedeny hodnoty MAP změřené ve vybraných časových intervalech. U všech skupin adaptovaných na chronickou hypoxii došlo k mírnému nárůstu MAP, který však nedosahoval statistické významnosti. V rámci intervalu P1 došlo k statisticky významnému nárůstu tlaku u obou skupin s akutně podaným molsidominem (CMA, AMA) v porovnání se skupinami s chronicky podávaným molsidominem (CM, AM). U intervalu P2 jsme u stejných skupin naopak zaznamenali signifikantní pokles oproti všem ostatním skupinám. V rámci skupin se hodnoty v jednotlivých časových intervalech nelišily u C, A, CM a AM. Statisticky významné změny proběhly u obou skupin s akutně podaným molsidominem (CMA, AMA), kde po prvním měřeném intervalu P1 došlo k statisticky významnému poklesu tlaku, který přetrval až do posledního měření.

Graf č. 10 ukazuje hodnoty hematokritu (C $50,3 \pm 0,81$; CM $51,4 \pm 0,56$; CMA $48,7 \pm 0,56$; A $56,3 \pm 0,64$; AM $58,3 \pm 0,33$; AMA $55,5 \pm 0,57$). U všech skupin adaptovaných na hypoxii (A, AM, AMA) došlo k navýšení hodnot hematokritu v průměru o 13 % oproti normoxickým (C, CM, CMA). Chronické podávání molsidominu nemělo významný efekt na hematokrit a to jak u normoxických, tak chronicky hypoxických potkanů.

Skupina	Tělesná hmotnost (g)	Tepová frekvence (min ⁻¹)		
	BW	HR1	HR2	HR3
C	360 ± 7	391 ± 22	432 ± 7	405 ± 11
A	345 ± 5	417 ± 6	428 ± 8	417 ± 7
CM	356 ± 7	418 ± 11	427 ± 11	404 ± 11
AM	338 ± 5	419 ± 7	424 ± 11	404 ± 13
CMA	346 ± 6	397 ± 11	413 ± 11	401 ± 12
AMA	351 ± 11	401 ± 12	420 ± 10	413 ± 5

Tab. č. 5: Tělesná hmotnost (BW) a tepová frekvence (HR) ve vybraných časových intervalech (HR1 - před ischemií, HR2 - v 19. minutě ischemie, HR3 - na konci 3-hod reperfuze). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

Skupina	Arteriální tlak (mmHg)		
	P1	P2	P3
C	118 ± 6	117 ± 6	102 ± 8
A	133 ± 5	123 ± 4	120 ± 2
CM	101 ± 5	109 ± 4	108 ± 4
AM	116 ± 5	115 ± 5	120 ± 3
CMA	131 ± 5 ‡	57 ± 4 †‡§	94 ± 4 § &
AMA	148 ± 4 ‡	56 ± 3 †‡§	114 ± 8 § &

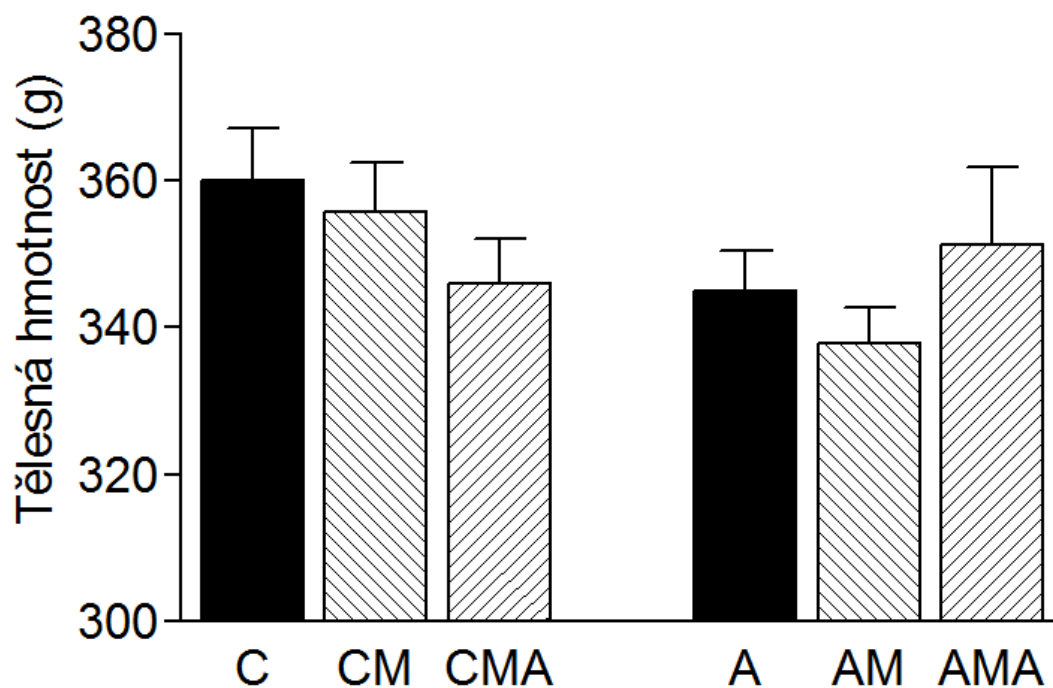
Tab. č. 6: Střední arteriální tlak (MAP) ve vybraných časových intervalech (P1 - před ischemií, P2 - v 19. minutě ischemie P3 - na konci 3-hod reperfuze). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

† P < 0,001; statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající kontrola bez molsidominu

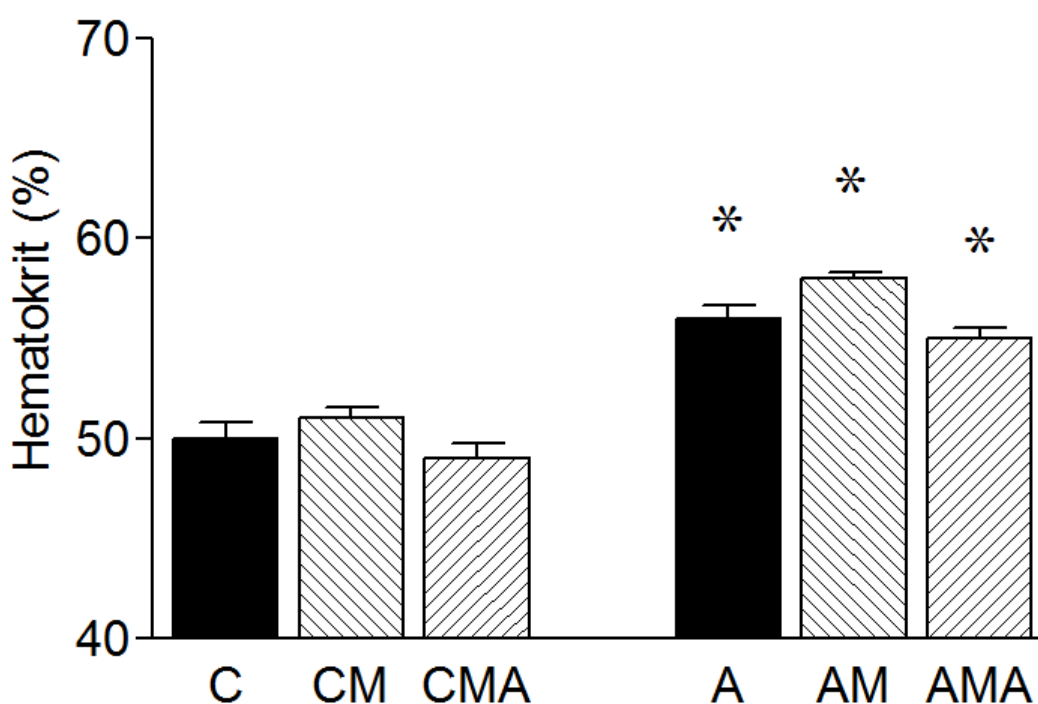
‡ P < 0,05; statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající skupina s chronicky podávaným molsidominem

§ P < 0,001; statisticky významný rozdíl: vs. P1

& P < 0,001; statisticky významný rozdíl: vs. P2



Graf č. 9: Tělesné hmotnosti jednotlivých experimentálních skupin. *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.



Graf č. 10: Hematokrit stanovený ze vzorku ocasní krve. *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: A vs. C

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: AM vs. CM

* $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: AMA vs. CMA

4.2.1. Velikost infarktu

Graf č. 11 znázorňuje porovnání relativních velikostí ohrožených oblastí vztažených na velikost levé komory (AR/LV) u jednotlivých skupin. Hodnoty AR/LV se mezi experimentálními skupinami významně nelišily (C $36,42 \pm 2,26$; CM $40,97 \pm 2,43$; CMA $38,91 \pm 3,52$; A $37,22 \pm 2,59$; AM $41,85 \pm 1,66$; AMA $32,14 \pm 2,14$). Na základě těchto měření jsme mohli porovnat relativní velikosti infarktů, aniž by došlo ke zkreslení výsledků.

Následující *graf č. 12* ukazuje relativní velikosti infarktů vztažené na velikost ohrožené oblasti (IS/AR) u jednotlivých skupin (C $57,51 \pm 2,74$; CM $50,73 \pm 2,33$; CMA $32,29 \pm 5,7$; A $43,4 \pm 2,86$; AM $47,42 \pm 2,4$; AMA $25,97 \pm 2,31$). U skupiny adaptované na chronickou hypoxii (A) došlo k významnému snížení velikosti infarktu o 25 % oproti normoxickým kontrolám (C). Další statisticky významné rozdíly jsou patrné u normoxické skupiny s akutně podaným molsidominem (CMA), kde došlo k poklesu velikosti infarktu o 44 % oproti skupině normoxických kontrol (C) a o 36 % oproti zvířatům, která dostávala chronicky molsidomin (CM). Uvnitř skupin adaptovaných na chronickou hypoxii lze také nalézt významné rozdíly. U skupiny potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii s akutně podaným molsidominem (AMA) jsme zaznamenali pokles velikosti infarktu o 40 % oproti potkanům adaptovaným na chronickou hypoxii (A) a o 45 % oproti adaptovaným potkanům s chronicky podávaným molsidominem (AM).

Graf č. 13 ukazuje závislost relativní velikosti infarktu vztaženou na velikost levé komory (IS/LV) na relativní velikosti ohrožené oblasti vztaženou na velikost levé komory (AR/LV). Je zde patrné, že normoxická kontrolní skupina (C) má výrazně strmější závislost, což se projevilo většími velikostmi infarktu u podvazů, které ovlivnily větší část ohrožené oblasti. Jak chronická hypoxie, tak molsidomin (akutně i chronicky podávaný) ovlivnily sklon této závislosti a posunuly ji k nižším hodnotám velikosti infarktu.

4.2.2. Ischemické a reperfuční arytmie

Graf č. 14 představuje časovou distribuci počtu ischemických arytmií v průběhu 20-min ischemie, (A) u normoxických skupin, (B) u skupin adaptovaných na chronickou hypoxii. Arytmogeneze začala jak u normoxických, tak chronicky hypoxických kontrol (C, A) okolo 5. minuty, arytmie odezněly kolem 15. minuty. Podobné rozložení se vyskytuje i u obou skupin s chronicky podávaným molsidominem (CM, AM). U skupin s akutně podaným

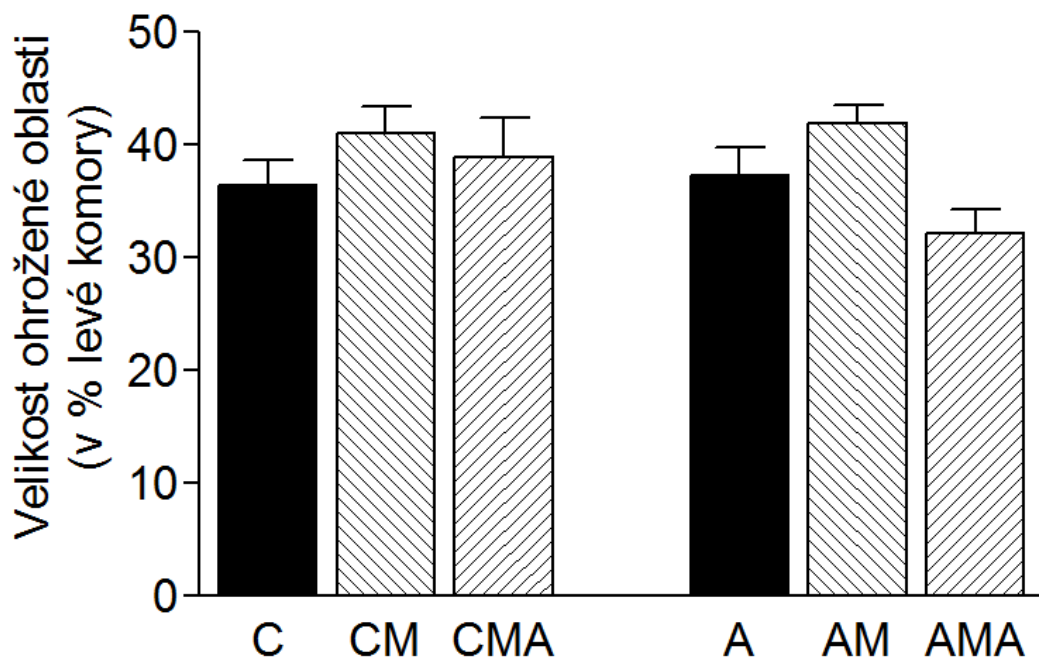
molsidominem (CMA, AMA) může být patrný nejen nárůst počtu ischemických arytmií, ale i trvání arytmogeneze do pozdější fáze ischemie oproti ostatním skupinám. Zdá se, že především skupina potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii s akutně podaným molsidominem (AMA) měla vyšší počet arytmií, které přetrvaly ve vyšším počtu i do pozdější fáze ischemie.

Tento poznatek je detailněji analyzován v *grafu č. 15*, který ukazuje medián distribuce předčasných komorových stahů, tedy konkrétní čas (minutu) během 20-min ischemie, kdy počet předčasných komorových stahů dosáhl poloviny svého celkového počtu. Medián u jednotlivých skupin byl roven: C $8,76 \pm 0,58$; CM $8,95 \pm 0,85$; CMA $9,18 \pm 0,4$; A $8,13 \pm 0,27$; AM $8,54 \pm 0,35$; AMA $9,78 \pm 0,6$. U skupiny potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii s akutně podaným molsidominem (AMA) došlo k statisticky významnému posunu mediánu do pozdější fáze ischemie o 1 min a 15 s oproti skupině potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii s chronicky podávaným molsidominem (AM) a o 1 min a 39 s oproti chronicky hypoxickým kontrolám (A).

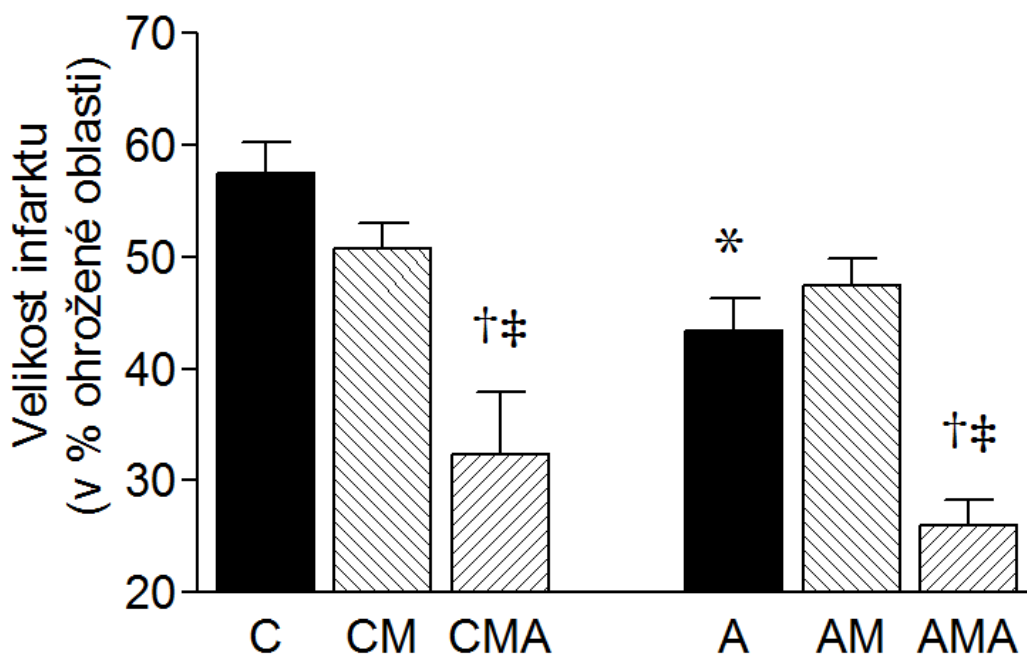
Graf č. 16 ukazuje celkový počet předčasných komorových stahů během ischemie u jednotlivých skupin (C $392,63 \pm 207,72$; CM $229,96 \pm 77,86$; CMA $645,64 \pm 189,57$; A $684,33 \pm 231,31$; AM $581,7 \pm 129,23$; AMA $842 \pm 279,82$). Rozdíly mezi skupinami nejsou statisticky významné vzhledem k vysoké variabilitě arytmogeneze a tedy vysokým hodnotám S.E.M.

Graf č. 17 ukazuje typové zastoupení ischemických arytmií - počet jednoduchých stahů, salv a komorových tachykardií (VT), (A) u normoxických skupin (jednoduché: C $57,19 \pm 15,81$; CM $55,43 \pm 10,68$; CMA $178,36 \pm 55,1$; salvy: C $20,25 \pm 9,83$; CM $16,52 \pm 3,91$; CMA $58,64 \pm 13,97$; VT: C $315,19 \pm 190,37$; CM $158 \pm 71,22$; CMA $408,64 \pm 149,18$), (B) u skupin adaptovaných na chronickou hypoxii (jednoduché: A $124,56 \pm 21,55$; AM $71,07 \pm 14,77$; AMA $99,33 \pm 15,81$; salvy: A $20,25 \pm 9,83$; AM $23,48 \pm 6,05$; AMA $29 \pm 7,25$; VT: A $315,19 \pm 190,37$; AM $487,3 \pm 118,69$; AMA $713,67 \pm 270,41$). V rámci normoxických skupin jsme zjistili statisticky významný nárůst počtu jednoduchých stahů u skupiny s akutně podaným molsidominem (CMA) oproti kontrolám (C) o 212 % a oproti skupině s chronicky podávaným molsidominem (CM) o 222 %. Dále jsme zaznamenali nárůst salv u stejné skupiny (CMA) oproti kontrolám (C) o 190 % a oproti skupině s chronicky podávaným molsidominem (CM) o 255 %. V rámci skupin adaptovaných na chronickou hypoxii jsme žádné významné rozdíly nezjistili. Avšak je zde patrný trend ke zvýšení počtu VT především u obou molsidominových skupin (AM, AMA).

Výše zmíněný trend v nárůstu arytmogeneze u adaptovaných potkanů se projevil, pokud jsme analyzovali arytmie bodováním dle systému skóre. *Graf č. 18* představuje bodové hodnocení ischemických arytmií u jednotlivých skupin (C $2,13 \pm 0,24$; CM $2,22 \pm 0,23$; CMA $2,91 \pm 0,09$; A $2,94 \pm 0,15$; AM $2,81 \pm 0,18$; AMA $2,78 \pm 0,15$). Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii (A) měli významně zvýšené arytmiické skóre oproti normoxickým kontrolám (C) o 38 %. Skupina adaptovaných potkanů s chronicky podávaným molsidominem (AM) měla také zvýšenou hodnotu arytmiického skóre proti skupině normoxických potkanů s chronicky podávaným molsidominem (CM) o 27 %. Zvýšený počet ischemických arytmií u obou experimentálních skupin s akutně podaným molsidominem (CMA, AMA) vedl k nárůstu hodnoty skóre u normoxických kontrol (CMA) o 37 % v porovnání s kontrolní skupinou (C), neovlivnil však výrazně tento parametr u hypoxické skupiny (AMA), která se nelišila od zbylých dvou.



Graf č. 11: Relativní velikost ohrožené oblasti vztažená na velikost levé komory (AR/LV). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.



Graf č. 12: Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti (IS/AR). *C* - Kontroly, *A* - Adaptace na hypoxii, *CM* - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, *AM* - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, *CMA* - Kontroly + akutně podaný molsidomin, *AMA* - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

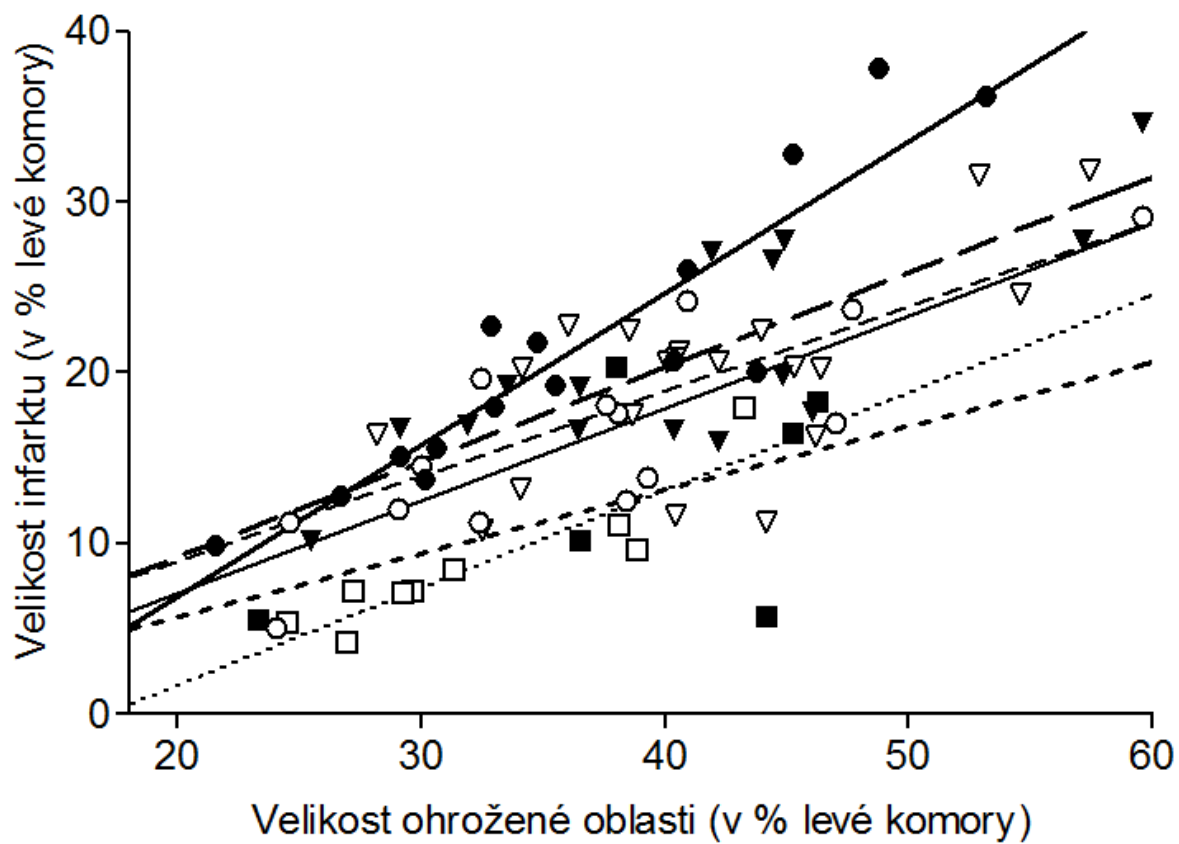
* $P < 0,01$; statisticky významný rozdíl: A vs. C

† $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: CMA vs. C

‡ $P < 0,001$; statisticky významný rozdíl: AMA vs. A

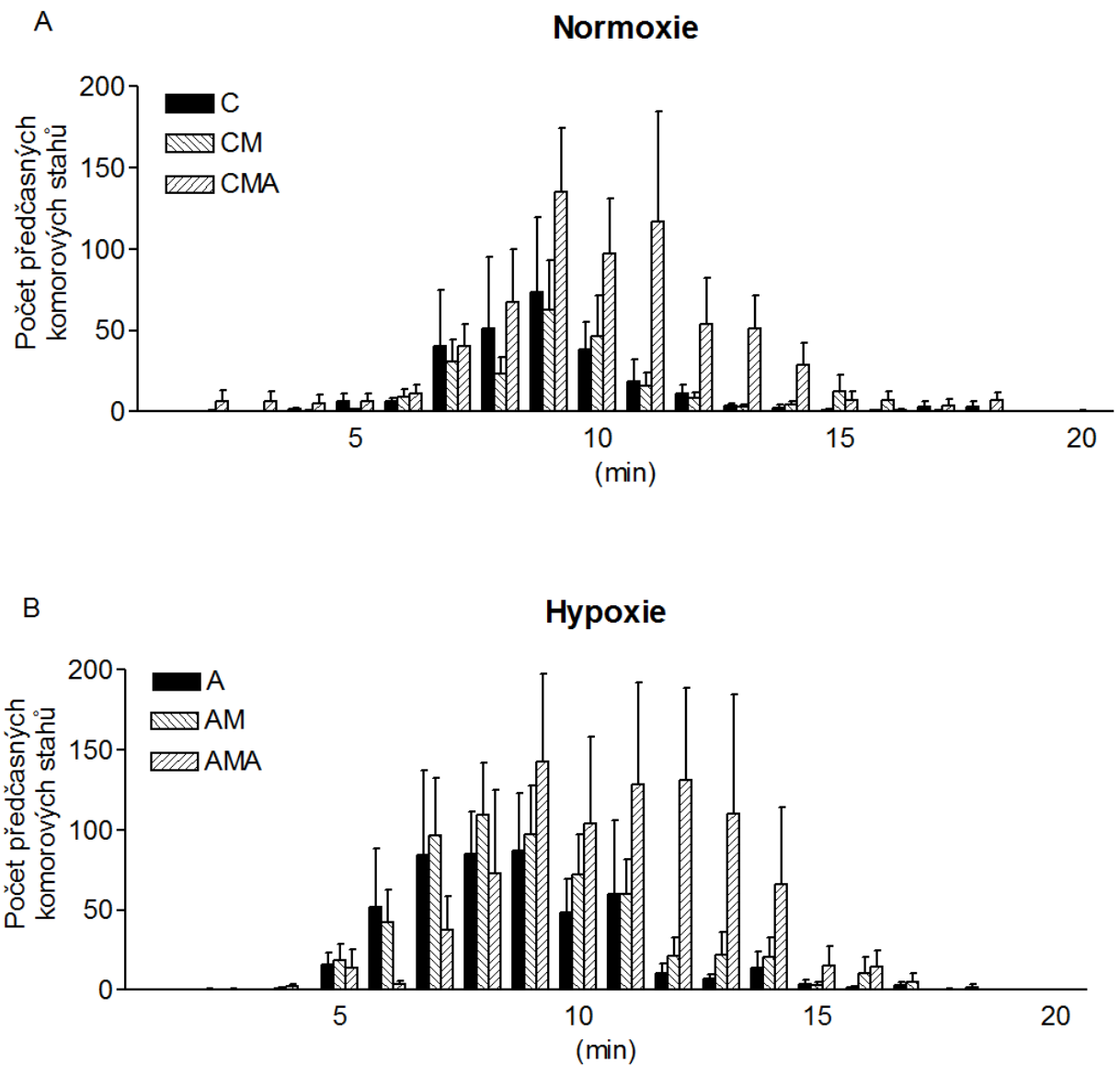
‡ $P < 0,01$; statisticky významný rozdíl: CMA vs. CM

‡ $P < 0,01$; statisticky významný rozdíl: AMA vs. AM

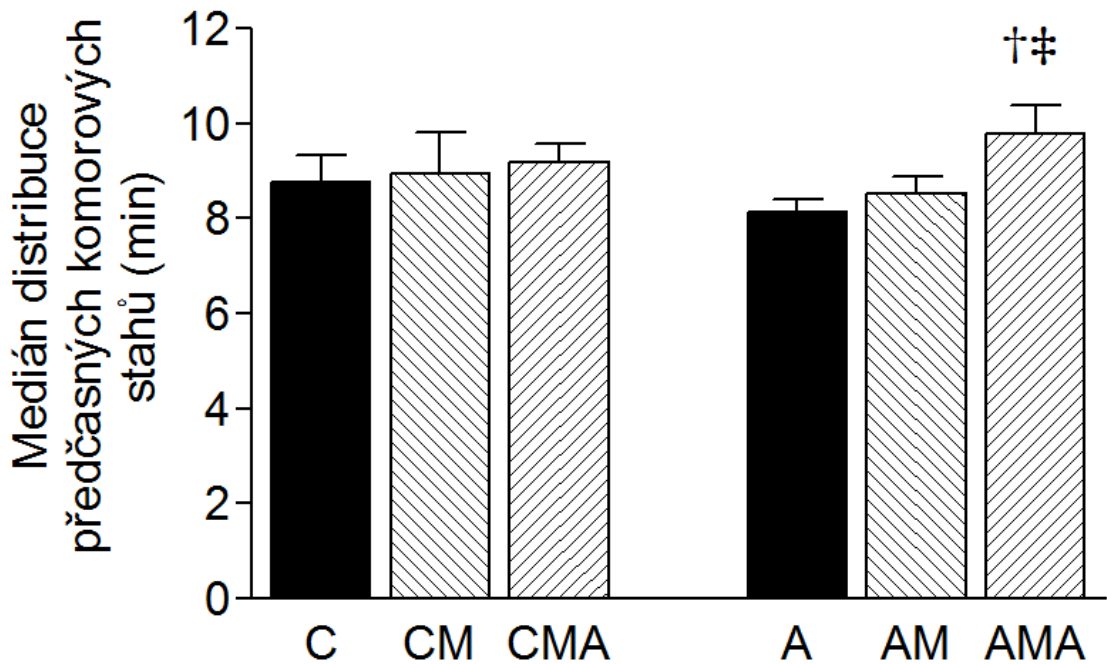


- C $r=0,9186$ ———
- A $r=0,8305$ ———
- ▼ CM $r=0,8117$ - - - - -
- ▽ AM $r=0,6409$ - - - - -
- CMA $r=0,4983$ - - - - -
- AMA $r=0,9080$ ·····

Graf č. 13: Závislost relativní velikost infarktu (IS/LV) na relativní velikosti ohrožené oblasti (AR/LV). C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin, r - korelační koeficient.



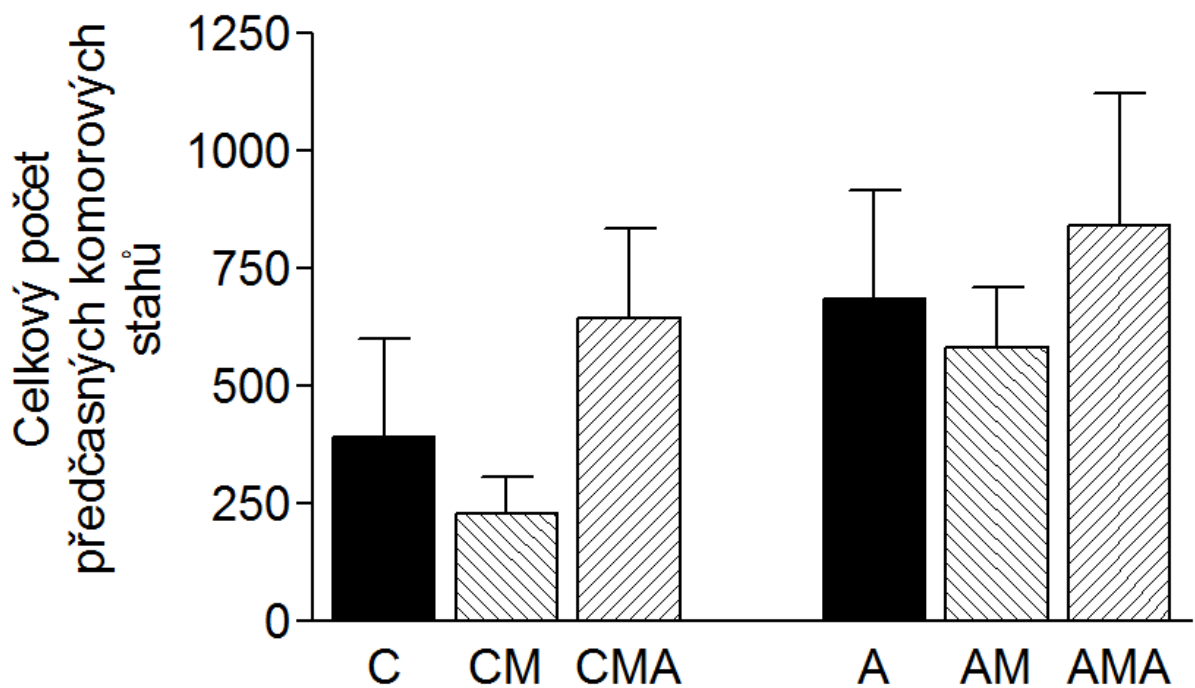
Graf č. 14: Časové rozložení ischemických arytmií v průběhu 20-min ischemie: A - u normoxických skupin, B - u hypoxických skupin. C - *Kontroly*, A - *Adaptace na hypoxii*, CM - *Kontroly + chronicky podávaný molsidomin*, AM - *Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin*, CMA - *Kontroly + akutně podaný molsidomin*, AMA - *Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin*.



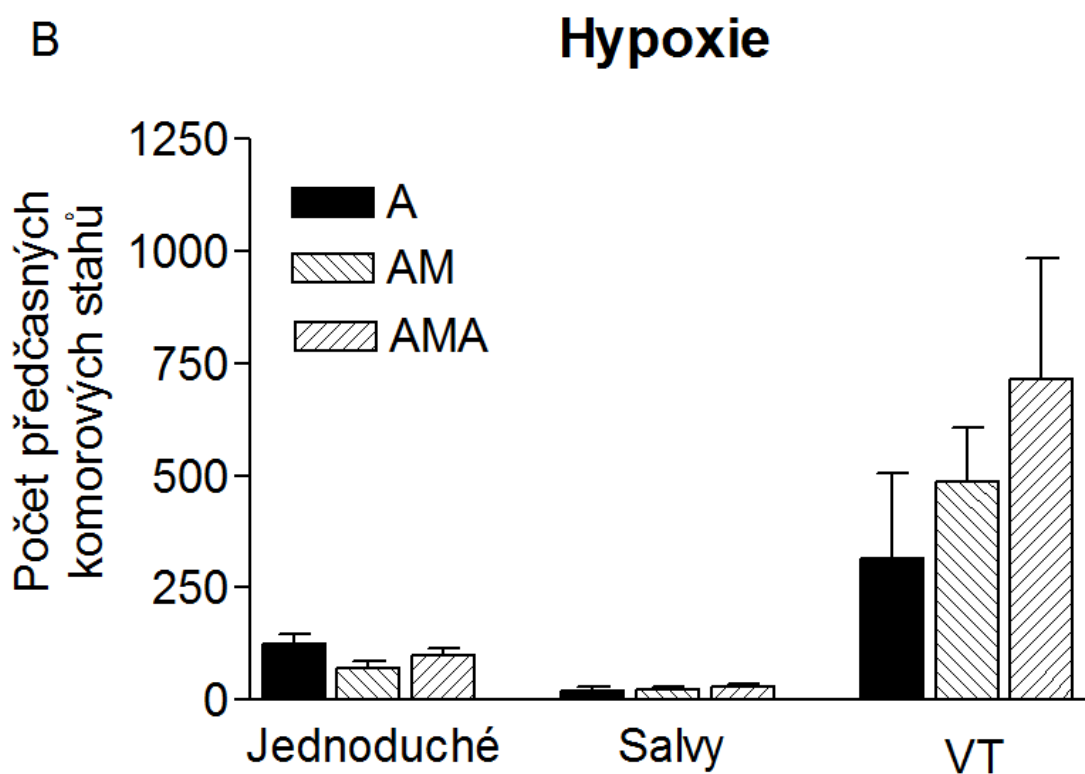
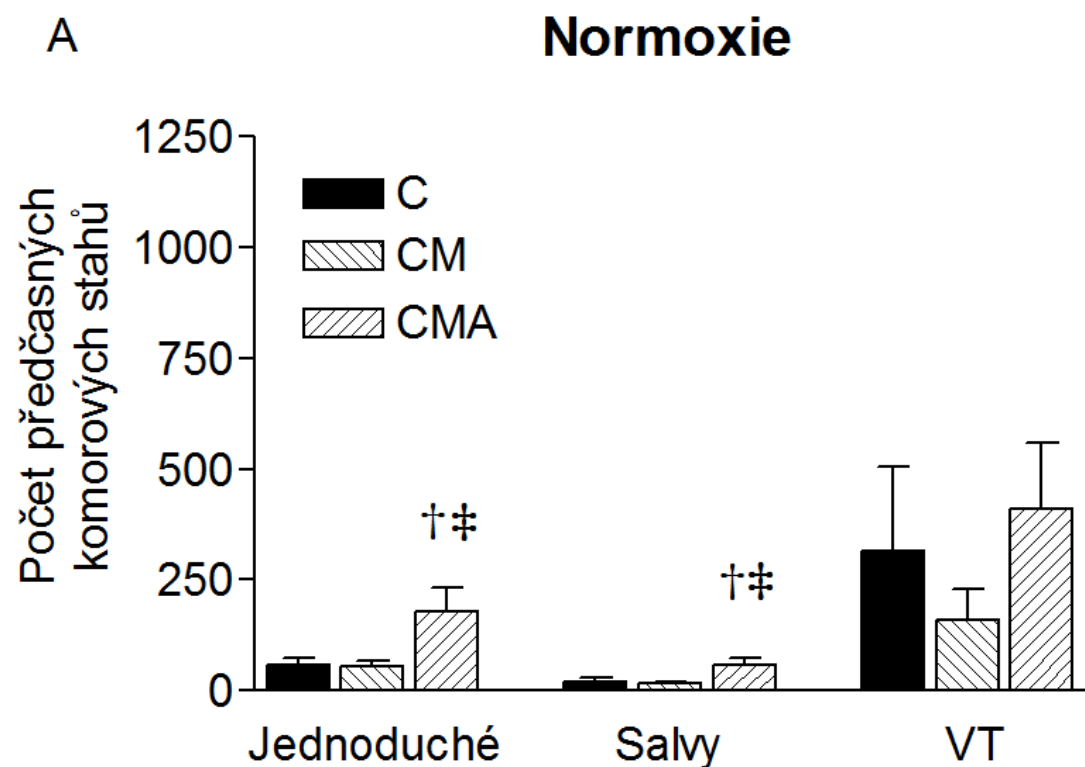
Graf č. 15: Medián distribuce předčasných komorových stahů. *C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.*

† $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: AMA vs. A

‡ $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: AMA vs. AM



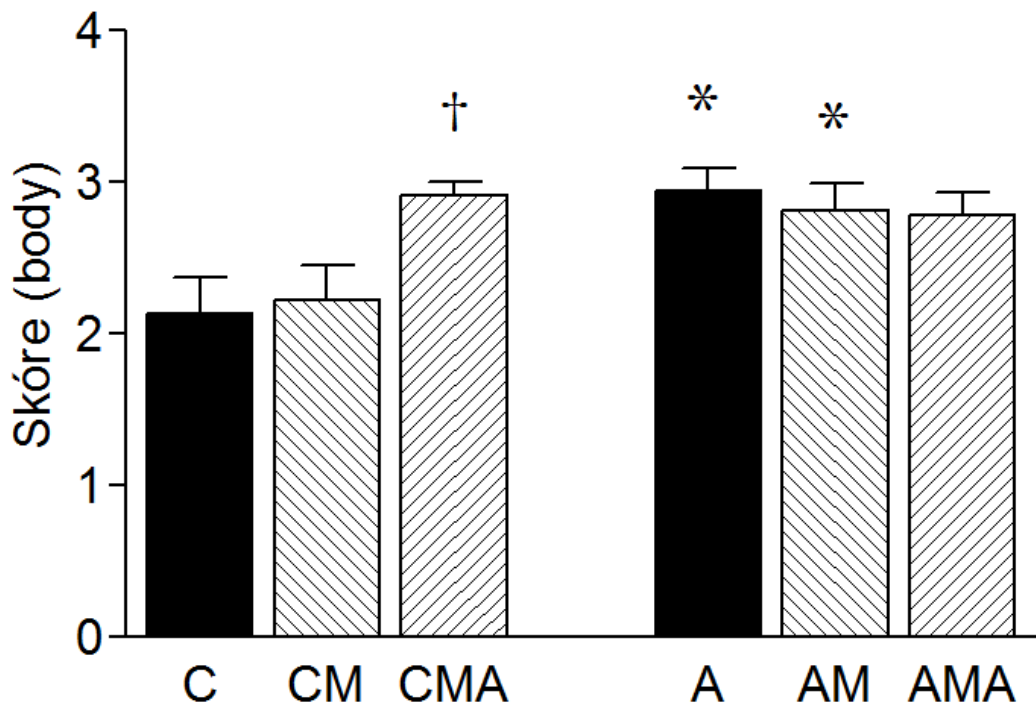
Graf č. 16: Celkový počet předčasných komorových stahů. *C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.*



Graf č. 17: Typové zastoupení ischemických arytmií: A - u normoxických skupin, B - u hypoxických skupin. C - Kontroly, A - Adaptace na hypoxii, CM - Kontroly + chronicky podávaný molsidomin, AM - Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin, CMA - Kontroly + akutně podaný molsidomin, AMA - Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin.

† P < 0,01; statisticky významný rozdíl: CMA vs. C

‡ P < 0,01; statisticky významný rozdíl: CMA vs. CM



Graf č. 18: Bodové hodnocení ischemických arytmií (skóre). *C* - *Kontroly*, *A* - *Adaptace na hypoxii*, *CM* - *Kontroly + chronicky podávaný molsidomin*, *AM* - *Adaptace na hypoxii + chronicky podávaný molsidomin*, *CMA* - *Kontroly + akutně podaný molsidomin*, *AMA* - *Adaptace na hypoxii + akutně podaný molsidomin*.

* $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: A vs. C

* $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: AM vs. CM

† $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: CMA vs. C

5. Diskuze

Tato diplomová práce se pokusila přispět k objasnění úlohy NO v kardioprotektivním působení chronické hypoxie. Adaptace na chronickou hypoxii, přirozeně se vyskytující ve vysokých nadmořských výškách nebo simulovaná v laboratořích, s sebou přináší pozitivní i negativní důsledky na organismus. Tím prospěšným efektem je zvýšená odolnost srdce k ischemii myokardu, mezi ty nepříznivé patří vznik hypoxické plicní hypertenze a s ní spojené hypertrofie pravé srdeční komory. Molekulární mechanismy těchto změn zatím nejsou zcela objasněny. Zdá se však, že jednou z molekul zahrnutých v protektivním účinku chronické hypoxie je i NO. Zkoumali jsme tedy vliv chronického a akutního podání NO donoru molsidominu na hemodynamické parametry a ischemické poškození srdce.

5.1. Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na tělesnou hmotnost a hematokrit

Adaptace na chronickou hypoxii vede ke snížení tělesné hmotnosti a zvýšení hodnot hematokritu. Naše výsledky ukázaly, že model kontinuální normobarická hypoxie (10 % O₂, 4 týdny) vede k pouze nepatrnému zpomalení tělesného růstu a významnému zvýšení hodnot hematokritu. Chronické ani akutní podání molsidominu nemělo na tělesnou hmotnost ani na hematokrit žádný efekt.

Tyto poznatky jsou v souladu s výsledky Zemanové (2007), která ve své práci na našem Oddělení vývojové kardiologie sledovala vliv různých modelů hypoxie na tělesnou hmotnost a hematokrit potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii. Permanentní normobarická hypoxie, podobně jako v této práci, zvýšila hematokrit a zpomalila tělesný růst. Statisticky významný rozdíl v tělesné hmotnosti potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii oproti normoxickým kontrolám byl však patrný až po 60. dni adaptace. Větší účinek na sledované parametry měla intermitentní hypobarická hypoxie. Silně zpomalila tělesný růst (především na počátku adaptace) a výrazně zvýšila nárůst hematokritu. K podobnému signifikantnímu snížení tělesné hmotnosti došlo také ve studii Elmedal et al. (2004), kde potkani byli chováni v permanentní hypobarické hypoxii (50 kPa, 2 týdny). Statisticky významné snížení tělesné hmotnosti a zvýšení hematokritu bylo již dříve prokázáno u potkanů adaptovaných na výraznou chronickou intermitentní hypobarickou hypoxii (7000 m, 8 hod/den, 5 dní/týden, 24 - 30 expozic) oproti

stejně starým normoxickým kontrolám (Asemu et al., 2000; Neckář et al., 2004; Kolář et al., 2007).

Je vcelku logické, že efekty chronické hypoxie jsou závislé na typu použité hypoxické komory (normobarická vs. hypobarická), formě (intermitentní vs. kontinuální) a celkové době jejího trvání (Asemu et al., 2000; Zemanová, 2007). Z výsledků je zřejmé, že nejslabší účinek na sledované parametry vykazuje kontinuální normobarická hypoxie, nejsilnější účinek má hypobarická hypoxie. Vysvětlení rozdílné síly účinku normobarické a hypobarické hypoxie zatím stále chybí. Způsob adaptace je proto nutné zohlednit při výběru hypoxického modelu.

5.2. Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na tepovou frekvenci

Jedním z důsledků adaptace na chronickou hypoxii může být hyperpolarizace, zkrácení doby trvání akčního potenciálu a tedy i vyšší tepová frekvence. Při našich pokusech jsme žádné změny v tepové frekvenci u potkanů adaptovaných na chronickou normobarickou hypoxii (10 % O₂, 4 týdny) nezaznamenali. Naše výsledky se shodují s těmi v práci Bertuglia et al. (2008), kteří také nepozorovali změny tepové frekvence způsobené adaptací na chronickou normobarickou intermitentní hypoxii (pO₂ 8 %, šestiminutové cykly hypoxie následované 6 min normoxie, 5 cyklů/hod, celkově 21 dní) u křečků.

Některé práce se zabývají hypotézou o pozitivně chronotropním efektu oxidu dusnatého. Během našich experimentů s chronicky a akutně podaným molsidominem jsme žádný účinek NO na tepovou frekvenci nepozorovali. Pozitivně chronotropní účinek NO byl však potvrzen u zvířat i pacientů. Poprvé Pagliaro et al. (1996) ukázali na anestezovaných psech, že podání L-NA snížilo tepovou frekvenci. Podobně Schwenke et al. (2005) prokázali pokles tepové frekvence u potkanů po podání L-NAME (150 µg). Pozitivně chronotropní efekt NO prokázali i Kojda et al. (1999) na modelu deficientní myši eNOS, který způsobil bradykardii. Podání GSNO (50 µM) na modelu izolovaného neonatálního králičího srdce zkrátilo délku trvání akčního potenciálu a zvýšilo tepovou frekvenci (Baker et al., 2001). Chowdhary et al. (2002) podávali pacientům SNP (50, 70, 100 a 130 µg) a L-NMMA (3 mg/kg). Exogenní NO způsobilo na dávce závislou tachykardii a inhibice NOS naopak bradykardii. Další studie (Hogan et al., 1999) sledovala vliv molsidominu (0,2 mg/kg i.v.) a SNP (50 µM) na králičím modelu srdce *in situ* s přerušeným *n. vagem*. Tyto experimenty dokázaly, že NO donory vykazují pozitivně

chronotropní efekt *in situ*, který je nezávislý na autonomním nervovém systému. Většina dostupných prací referuje o pozitivně chronotropním efektu NO, ale existují i studie tvrdící opak. Jednou z nich je např. Sears et al. (1999), kteří prokázali negativně chronotropní efekt u králíků, kterým byl akutně podán molsidomin (0,2 mg/kg) *in situ* a SNP (10 a 100 μ M) *in vitro*.

Poznatky o vlivu chronické hypoxie a NO na tepovou frekvenci se různí. Při hledání jednoznačného důkazu byly použity různé zvířecí modely i pacienti, různé NO donory a inhibitory NOS v různých dávkách. Zdá se však, že vysoké koncentrace NO snižují tepovou frekvenci, zatímco nízké koncentrace způsobují pravý opak.

5.3. Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s molsidominem na plicní hypertenzi

Chronická hypoxie způsobuje vznik plicní hypertenze a hypertrofie pravé srdeční komory. Naše výsledky tento poznatek potvrdily. Model kontinuální normobarické hypoxie (10 % O₂, 4 týdny) zvýšil jak tlak v pravé srdeční komoře, tak hmotnost pravé komory. Hypoxie neměla vliv na systémový tlak ani na hmotnost levé komory. Chronické podávání molsidominu nijak neovlivnilo systolický tlak v pravé komoře u normoxické skupiny, ale snížilo byt' nesignifikantně tlak v pravé komoře u hypoxické skupiny. Stejně tomu bylo i s hmotností pravé komory.

Naše pokusy potvrdily, že jak mírná chronická hypoxie, tak chronicky podávaný molsidomin nemají vliv na systémový tlak. Výsledky uvedené v této práci jsou ve shodě s Andersen et al., 2005; Blumberg et al., 2002; Elmedal et al., 2004 a Schwenke et al., 2005. Společným jmenovatelem zmíněných prací byl také fakt, že adaptace na chronickou hypoxii zvýšila tlak v pravé srdeční komoře a hmotnost pravé komory. Naše poznatky o pozitivním vlivu chronického podávání molsidominu na zmírnění plicní hypertenze indukované chronickou hypoxií jsou ve shodě s výsledky Blumberg et al. (2002), které prokázaly protektivní vliv chronického podávání molsidominu (15 mg/kg/den). Andersen et al. (2005) kromě pokusů s molsidominem ukázali pozitivní vliv inhibitoru fosfodiesterázy sildenafilu (10 mg/kg/den) na snížení tlaku v pravé srdeční komoře u chronicky hypoxických skupin. Kombinace molsidominu a sildenafilu neměla žádný aditivní efekt. Elmedal et al. (2004) použili odlišný model chronické hypoxie adaptací potkanů v hypobarické komoře, ale stejnou dávku molsidominu (15 mg/kg/den). Výsledky této studie se od našich liší ve výraznějším poklesu

tlaku v pravé srdeční komoře u chronicky hypoxických potkanů s chronicky podávaným molsidominem. Tento pokles byl signifikantní a dosáhl hodnoty tlaku kontrolních normoxických potkanů. Důvod tohoto rozdílu nám není známý, nicméně je potřeba vzít v úvahu odlišný model chronické hypoxie, dobu jejího trvání nebo možný odlišný přístup k měření.

Každopádně naše práce potvrdila, že zvýšená dostupnost NO, ať již z důvodu zvýšené produkce (účinek molsidominu apod.) nebo snížené degradace (účinek sildenafilu), významným způsobem zmírňuje rozvoj plicní hypertenze.

5.4. Vliv adaptace na chronickou hypoxii v kombinaci s chronicky a akutně podaným molsidominem na ischemické poškození srdce

Adaptace na hypoxické podmínky zvyšuje toleranci srdce k ischemicko - reperfučnímu poškození, o čemž svědčí redukce velikosti infarktu myokardu, zlepšená obnova kontraktilní funkce a omezení počtu ischemických arytmií. Námí použitý model adaptace na kontinuální chronickou hypoxii (10 % O₂, 4 týdny) snížil velikost infarktu u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii oproti normoxickým kontrolám. Chronické podávání molsidominu mírně snížilo velikost infarktu u normoxických potkanů, u hypoxických mělo opačný trend k lehkému zvýšení. Akutní podání molsidominu mělo významný vliv jak na normoxické, tak chronicky hypoxické potkany. Způsobilo výrazný pokles velikosti infarktu. Dle našeho názoru se tento výsledek dá vysvětlit jako NO - indukovaný preconditioning, který má silný protektivní vliv na myokard.

Většina dostupných prací potvrzuje pozitivní vliv adaptace na chronickou hypoxii na velikost infarktu (Kolář et al., 2007; Neckář et al., 2004; Asemu et al., 2000). Zdá se, že snížení infarktového ložiska lze docílit jak kontinuální, tak intermitentní normobarickou či hypobarickou hypoxií. Neckář et al. (2004) prokázali přetrvávající efekt na velikost infarktu ještě 7 a 35 dní po návratu do normoxických podmínek. Většina prací zabývajících se NO se věnují jeho účinkům na plicní hypertenzi a hemodynamické parametry. Efekt chronického podávání NO donorů na velikost infarktu u chronicky hypoxických zvířat dosud nebyl zkoumán. Pouze Xi et al. (2002) analyzovali velikost infarktu na modelu izolovaných myších srdcí po akutní normobarické hypoxii (10 % O₂, 30 min, 2 hod a 4 hod hypoxie následované 24 hod reoxygenací) a po podání iNOS inhibitorem S-methylisothioureou (SMT; 3 mg/kg) u kontrolních a iNOS knockout myší. Akutní efekt hypoxie vedl k signifikantní redukci velikosti

infarktu u myší vystavených hypoxii. Tento efekt vymizel u skupin zvířat s podaným iNOS inhibítorem a u iNOS knockout myší.

Dalším sledovaným parametrem ischemického poškození srdce byl výskyt ischemických arytmií - jejich počet a závažnost. Náš model chronické normobarické hypoxie nezmírnil počet ischemických arytmií, jak poprvé publikovala Kotasová (2007). Výsledky našich pokusů naznačují trend ke zvýšení počtu ischemických arytmií u skupin adaptovaných na chronickou hypoxii. Chronické podávání molsidominu lehce zredukovalo celkový počet ischemických arytmií u normoxických i chronicky hypoxických potkanů. Akutní podání molsidominu mělo opačný účinek - u normoxických i chronicky hypoxických potkanů počty arytmií zvýšilo. Naše výsledky dále ukázaly posun výskytu ischemických arytmií u chronicky hypoxických potkanů do pozdější fáze ischemie u skupin s akutně podaným molsidominem. Akutní podání molsidominu také zvýšilo počet jednoduchých předčasných komorových stahů a salv (dvojité a trojité předčasné komorové stahy) u normoxických skupin. Tento nárůst arytmogeneze a posun do pozdější fáze ischemie je velmi podobný efektu akutního podání mimetika superoxid dismutázy tempolu, jak publikovali Neckář et al. (2008). Ze srovnání těchto studií lze usuzovat, že akutní výrazná změna hladiny ROS nebo NO může významně ovlivnit výslednou citlivost myokardu k ischemickým arytmiím. Je otázkou budoucího výzkumu, aby byl vzájemný vztah ROS a NO (např. produkce peroxynitritu) blíže objasněn.

Adaptace na chronickou hypoxii vyvolává zvýšený oxidační stres. Během těchto podmínek se ve zvýšené míře tvoří ROS a RNS, které mohou přispívat ke vzniku adaptačních změn chronicky hypoxického srdce. Jednou z těchto změn je vznik hypoxické plicní hypertenze. V této práci jsme sledovali množství glutathionu, ukazatele míry oxidačního stresu. Toto měření bylo první svého druhu, které si naše Oddělení vývojové kardiologie nechalo zpracovat ve Státním zdravotním ústavu. Výsledky, ač nesignifikantní, naznačují zvýšený oxidační stres v důsledku adaptace na chronickou hypoxii a chronického podávání molsidominu.

Protektivní účinek na výskyt a závažnost ischemických arytmií závisí na modelu použité chronické hypoxie. Neckář et al. (2004) zkoumali vliv intermitentní hypobarické hypoxie (7000 m, 8 hod/den, 35 expozic), která snížila výskyt i závažnost komorových tachykardií, ostatní ukazatele antiarytmické protekce však nedosáhly statistické významnosti. Dále prokázali, že antiarytmický účinek vymizí 7 dní po návratu do normických podmínek. Asemu et al. (2000) porovnávali vliv dvou odlišných modelů intermitentní hypobarické hypoxie. První z nich (7000 m, 8 hod/den, 5 - 6 týdnů) poskytl výraznou antiarytmickou protekci na modelu

srdce *in situ*. Došlo k poklesu celkového počtu předčasných komorových stahů a komorových tachykardií. Druhý model (5000 m, 4 hod/den, 5 - 6 týdnů) ukázal antiarytmickou tendenci, ale žádný ukazatel nedosáhl statistické významnosti. Downey et al. (2004) potvrdili, že adaptace na intermitentní normobarickou hypoxii (10 % O₂, pětiminutové cykly hypoxie následované 4 min normoxie, 5 cyklů/den, 20 dní) ochránila psí myokard před infarktem a fibrilací. Z těchto poznatků je patrné, že účinek chronické intermitentní hypobarické hypoxie na komorové arytmie je závislý na stupni a trvání každodenních hypoxických expozic.

Účinek NO na počet a závažnost ischemických arytmií je stále rozporuplný. Existuje teorie, která předpokládá antiarytmický potenciál NO (Végh et al., 1992). Naše výsledky s chronicky podávaným molsidominem u normoxických potkanů, který měl trend ke snížení ischemických arytmií, jsou ve shodě s pracemi Wainwright et al. (1993, 2002), Martorana et al. (1983) a Cano et al. (1986), kteří prokázali antiarytmický potenciál NO donorů u prasat a psů. Naopak Barnes et al. (1995) zkoumali podávání SNP (0,1; 0,3; 1 µg/kg/min) a SIN-1 (10; 20; 40 µg/kg/min), které nemělo žádný vliv na výskyt ischemických arytmií. Tyto výsledky nepřímo podpořily studie Sun et al. (1994) a Pabla et al. (2007), které sledovaly vliv L-NAME (100 mg/kg) na ischemické arytmie a také nepozorovaly žádný efekt. Stejný NOS inhibitor byl použit i ve studii Szárszoie a kol. (2003), kde akutní inhibice NO produkce neovlivnila snížený výskyt a závažnost reperfučních arytmií na modelu srdce *in vitro*, působila však antiarytmicky u normoxických jedinců. Naopak akutní zvýšení produkce NO (pomocí GSNO) zcela eliminovalo antiarytmický účinek chronické hypoxie, ale neovlivnilo arytmogenezi u normoxických jedinců. Gönczi et al. (2009) představili teorii, podle které NO reguluje funkci mezibuněčných spojení (gap junction) a tím i komunikaci mezi buňkami. Děje se tak přes aktivovanou PKG, která fosforyluje konexiny, proteiny způsobující propojení a otevření těchto spojení. Ve své práci se zabýval vlivem SNP na ischemické arytmie u psů, avšak SNP zde pouze snížil počet epizod komorových tachykardií, ale nedokázal myokard ochránit před výskytem závažných forem ischemických arytmií, jako jsou komorové tachykardie nebo komorové fibrilace.

Otázka týkající se úlohy NO jako endogenní kardioprotektivní molekuly zůstává stále kontroverzní. Výsledky jednotlivých prací se nedají zobecnit a nelze z nich vyvozovat závěry, které by platily pro všechny živočišné druhy najednou.

6. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem zvýšené hladiny NO podáním donoru NO molsidominu na rozvoj hypoxické plicní hypertenze a ischemickou toleranci normoxických a chronicky hypoxických srdcí. Na základě provedených experimentů jsme dospěli k těmto závěrům:

- 1) Adaptace potkanů na kontinuální chronickou hypoxii vedla k rozvoji hypoxické plicní hypertenze a chronické podávání molsidominu tyto projevy hypoxie oslabilo.
- 2) Chronické podávání molsidominu významně neovlivnilo zvýšenou ischemickou toleranci myokardu chronicky hypoxických potkanů k akutní ischemii.
- 3) Akutní podání molsidominu významně snížilo velikost infarktu u normoxické i chronicky hypoxické skupiny.

7. Použitá literatura

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593 - 615, 2001.

Andersen CH, Mulvany M, Simonsen U: Lack of synergistic effect of molsidomine and sildenafil on development of pulmonary hypertension in chronic hypoxic rats. *Eur J Pharmacol* 510: 87 - 96, 2005.

Asemu G, Neckář J, Szárszoi O, Papoušek F, Ošťádal B, Kolář F: Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* 49: 597 - 606, 2000.

Baker J, Contney S, Singh R, Kalyanaraman B, Gross G, Bosnjak Z: Nitric oxide activates sarcolemmal K(ATP) channel in normoxic and chronically hypoxic hearts by a cyclic GMP-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 33: 331 - 341, 2001.

Baker J, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith O, Pritchard K: Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci* 874: 236 - 253, 1999.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T: Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *Am J Physiol* 268: H1293 - H1303, 1995.

Barnes C, Coker S: Failure of nitric oxide donors to alter arrhythmias induced by acute myocardial ischaemia or reperfusion in anaesthetized rats. *Brit J Pharmacol* 114: 349 - 356, 1995.

Béguin P, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribouot C: Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol* 99: 1064 - 1069, 2005.

Bertuglia S: Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1914 - H1922, 2008.

Blumberg F, Lorenz C, Wolf K, Sandner P, Riegger G, Pfeifer M: Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 55: 171 - 177, 2002.

Borchert GH, Kolář F: Mechanism of increased anoxic tolerance of cardiomyocytes isolated from preconditioned or chronically hypoxic rats involves BK_{Ca} channels. Abstrakt

Brown G, Borutaite V: Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res* 75: 283 - 290, 2007.

Cano JP, Guillen JC, Jouve R, Langlet F, Puddu PE, Rolland PH, Serradimigni A: Molsidomine prevents post - ischaemic ventricular fibrillation in dogs. *Br J Pharmacol* 88: 779 - 789, 1986.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH: Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345: 50 - 54, 1994.

Ding H, Zhu H, Dong J, Zhu W, Yang W, Yang H, Zhou Z: Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxic against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin* 26: 315 - 322, 2005.

Ding H, Zhu H, Dong J, Zhu W, Zhou Z: Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci* 75: 2587 - 2603, 2004.

Downey HF, Zong P, Setty S, Martinez R, Sun W, Tune JD, Ehrenburg IV, Tkatchouk EN: Intermittent systemic hypoxia protects canine myocardium from infarction and fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 37: 161 - 375, 2004.

Dusting GJ: Nitric oxide in coronary artery disease: roles in atherosclerosis, myocardial reperfusion and heart failure. *EXS* 76: 33 - 55, 1996.

Eells J, Henry M, Gross G, Baker J: Increased mitochondrial K_{ATP} channel activity during chronic myocardial hypoxia. *Circ Res* 87: 915 - 921, 2000.

Elmedal B, Dam M, Mulvany M, Simonsen U: The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Brit J Pharmacol* 141: 105 - 113, 2004.

Felaco M, Grilli A, Gorbunov N, Di Napoli P, De Lutiis M, Di Giulio C, Taccardi A, Barsotti A, Barbacane RC, Reale M, Conti P: Endothelial NOS expression and ischemia-reperfusion in isolated working rat heart from hypoxic and hyperoxic conditions. *Biochim Biophys Acta* 1524: 203 - 211, 2000.

Fitzpatrick C, Shi Y, Hutchins W, Su J, Gross G, Ošťádal B, Tweddell J, Baker J: Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H62 - H68, 2005.

Forkel J, Chen X, Wandinger S, Keser F, Duschin A, Schwanke U, Frede S, Massoudy P, Schulz R, Jakob H, Heusch G: Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: K_{ATP} channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H545 - H551, 2004.

Garcia JA, Incerpi EK: Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol* 90: 409 - 416, 2008.

Gönczi M, Papp R, Kovács M, Seprényi G, Végh Á: Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside? *Brit J Pharmacol* 156: 786 - 793, 2009.

Grilli A, De Lutiis MA, Patrino A, Speranza L, Cataldi A, Centurione L, Taccardi AA, Di Napoli P, De Caterina R, Barbacane R, Conti P, Felaco M: Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue. *Exp Biol Med* 228: 935 - 942, 2003.

Gross DR: *Animal models in cardiovascular research*. Kluwer Academic Publishers, 1994.

Hampl V, Bíbová J, Baňasová A, Uhlík J, Miková D, Hniličková O, Lachmanová V, Herget J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: 11 - 20, 2006.

Hampl V, Herget J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80: 1337 - 1372, 2000.

Hogan N, Casadei B, Paterson D: Nitric oxide donors can increase heart rate independent of autonomic activation. *J Appl Physiol* 87: 97 - 103, 1999.

Holbrook M, Coker SJ: Comparison of the effects of isobutylmethylxanthine and milrinone on ischaemia-induced arrhythmias and platelet aggregation in anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol* 98: 318 - 324, 1989.

Hurtado A: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* 53: 247 - 258, 1960.

Chander V, Chopra K: Molsidomine, a nitric oxide donor and L-arginine protease against rhabdomyolysis-induced myoglobinuric acute renal failure. *Biochim Biophys Acta* 1723: 208 - 214, 2005.

Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta J: TGF- β_1 modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1035 - H1039, 2001.

Chowdhary S, Harrington D, Bonser R, Coote J, Townend J: Chronotropic effects of nitric oxide in the denervated human heart. *J Physiol* 541: 645 - 651, 2002.

Jáchymová M, Masters B, Horký K, Zíma T, Martásek P: Syntázy oxidu dusnatého, typické hemoflavoproteiny a jejich komplikovaná enzymologie. Časopis lékařů českých 145: 526 - 531, 2006.

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M: Induction of HIF-1 alpha in response to hypoxia is instantaneous. FASEB J 15: 1312 – 1314, 2001.

Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG: Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. Cardiovasc Res 42: 206 - 213, 1999.

Kolář F, Ježková J, Balková P, Břeh J, Neckář J, Novák F, Nováková O: Role of oxidative stress in PKC- δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 292: H224 - H230, 2007.

Kolář F, Neckář J, Ošťádal B: MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. Physiol Res 54: 467 - 471, 2005.

Kotasová M: Úloha TNF-alfa v ischemické odolnosti chronicky hypoxického srdce. Diplomová práce PŘF UK, 2007.

Lee SH, Heo JS, Han HJ: Effect of hypoxia on 2-deoxyglucose uptake and cell cycle regulatory protein expression of mouse embryonic stem cells involvement of Ca²⁺/PKC, MAPKs and HIF-1 alpha. Cell Physiol Biochem 19: 269 – 282, 2007.

Li Ch, Jackson RM: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol 282: C227 - C241, 2002.

Li Y, Kloner RA: Does protein kinase C play a role in ischemic preconditioning in rat hearts? Am J Physiol 268: H426 - H431, 1995.

- Manukhina E, Downey F, Mallet R: Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* 231: 343 - 365, 2006.
- Manukhina E, Malyshev I, Smirin B, Mashina S, Saltykova V, Vanin A: Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric oxide: Biology and chemistry* 5: 393 - 401, 1999.
- Marková I, Neckář J, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ošťádal B, Kolář F: Increased expression and altered subcellular distribution of PKC- δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1566 - H1572, 2005.
- Martorana PA, Mogilev AM, Kettenbach B, Nitz RE: Effect of molsidomine on spontaneous ventricular fibrillation following myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Adv Myocardiol* 4: 605 - 613, 1983.
- Méry PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R: Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1197 - 1201, 1991.
- Muller-Strahl G, Kottenberg K, Zimmer HG, Noack E, Kojda G: Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart. *J Physiol* 2: 311 - 320, 2000.
- Murry C, Jennings R, Reimer K: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124 – 1136, 1986.
- Nagendran J, Michelakis E: Mitochondrial NOS is upregulated in the hypoxic heart: implications for the function of the hypertrophied right ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1723 - H1726, 2009.
- Natarajan R, Salloum FN, Fischer BJ, Kukreja RC, Fowler AA: Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res* 98: 133 – 140, 2006.

- Neckář J, Ošťádal B, Kolář F: Acute but not chronic treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol Res* 57: 653 – 656, 2008.
- Neckář J, Ošťádal B, Kolář F: Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* 53: 621 - 628, 2004.
- Neckář J, Szárszoi O, Kóten L, Papoušek F, Ošťádal B, Grover G, Kolář F: Effects of mitochondrial K (ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55: 567 - 575, 2002.
- Netuka I, Szárszoi O, Malý J, Říha H, Turek D, Ošťádalová I, Ošťádal B: Late effect of early hypoxic disturbance in the rat heart: gender differences. *Physiol Res* 59: 127 - 131, 2010.
- Ošťádal B, Kolář F: Cardiac adaptation to chronic high - altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respir Physiol* 158: 224 - 236, 2007.
- Ošťádal B, Kolář F: *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999.
- Ošťádal B, Procházka J, Pelouch V, Urbanová D, Widimský J: Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* 33: 129 - 38, 1984.
- Ošťádalová I, Ošťádal B, Jarkovská D, Kolář F: Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* 52: 561 - 567, 2002.
- Pabla R, Curtis MJ: Nitric oxide fails to confer endogenous antiarrhythmic cardioprotection in the primate heart *in vitro*. *Brit J Pharmacol* 150: 893 - 898, 2007.
- Pagliari P, Dalla Valle R, Gattullo D, Merletti A, Marsh NA: The heart rate after inhibition of nitric oxide release in the anaesthetized dog. *Gen Pharmacol* 27: 695 - 699, 1996.

- Poupa O, Krofta K, Rakušan K, Procházka J: Myoglobin content of the heart and resistance of the isolated myocardium to anoxia and on the myoglobin content of the heart during adaptation to high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* 15: 447 - 449, 1966.
- Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard K, Tweddell J, Litwin S, Mussatto K, Jagniss R: Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* 106: 239 - 245, 2002.
- Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G: Nitric oxide and cardiac function. *Life Sciences* 81: 779 - 793, 2007.
- Ravingerová T, Strnisková M, Neckář J, Kolář F, Pastorková S, Barančík M: Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. *Gen Physiol Biophys* 26: 75 - 85, 2007.
- Rotta A, Canepa A, Chavez R, Hurtado A, Velasquez T: Pulmonary circulation at sea level and at high altitudes. *J Appl Physiol* 9: 328 - 336, 1956.
- Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, Laplace M, Depond S, Adnot S, Crozatier B: Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol.* 31: 1697 - 1708, 1999.
- Ryou MG, Sun J, Oguayo KN, Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT: Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion. *Exp Biol Med* 233: 766 - 774, 2008.
- Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H: Mitochondrial Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Cardiac Myocytes: A Mechanism of the Cardioprotective Effect and Modulation by Protein Kinase A. *Circulation* 111: 198 - 203, 2005.
- Sears CE, Choate JK, Paterson DJ: No-cGMP pathway accenuates the decrease in heart rate cause by cardiac vagal nerve stimulation. *J Appl Physiol* 86: 510 – 516, 1999.

Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA: Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 94: 2231 - 2236, 1994.

Shi Y, Baker JE, Zhang C, Tweddell JS, Su J, Pritchard KA: Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation. *Circ Res* 91: 300 - 306, 2002.

Shi Y, Pritchard KA, Holman P, Rafiee P, Griffith OW, Kalyanaraman B, Baker JE: Chronic myocardial hypoxia increases nitric oxide synthase and decreases caveolin-3. *Free Radic Biol Med* 29: 695 - 703, 2000.

Shinbo A, Iijima T: Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K^+ current induced by K^+ channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Brit J Pharmacol* 120: 1568 - 1574, 1997.

Schwenke D, Pearson J, Tsuchimochi H, Mori H, Shirai M: Exogenous nitric oxide centrally enhances pulmonary reactivity in the normal and hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 952 - 959, 2005.

Sun W, Wainwright CL, Parrat JR: The antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning is not prevented by inhibition of endothelium-derived nitric oxide in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 112: 380 - 386, 1994.

Szárszoi O, Asemu G, Ošťádal B, Kolář F: The role of reactive oxygen species and nitric oxide in ischemia/reperfusion injury of chronically hypoxic rats. *Eur J Heart Fail* (No. 1), Suppl: 53, 2003.

Végh A, Szekeres L, Parratt J: Preconditioning of the ischaemic myocardium, involvement of the L-arginin nitric oxide pathway. *Brit J Pharmacol* 107: 648 - 652, 1992.

Wainwright CL, Martorana PA: Pirsidomine, a novel nitric oxide donor, suppresses ischaemic arrhythmias in anaesthetized pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: S44 - S50, 1993.

Wainwright CL, Miller AM, Work LM, Del Soldato P: NCX4016 (NO-aspirin) reduces infarct size and suppresses arrhythmias following myocardial ischaemia/reperfusion in pigs. *Br J Pharmacol* 135: 1882 - 1888, 2002.

Wang GL, Jiang BH, Semenza GL: Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 669 – 675, 1995.

Weisbrod RM, Griswold MC, Yaghoubi M, Komalavilas P, Lincoln TM, Cohen RA: Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 125: 1695 - 1707, 1998.

Widimský J, Urbanová D, Ressler J, Ošťádal B, Pelouch V, Procházka J: Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* 112: 1389 - 1393, 1973.

Wildhirt S, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B: Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43: 698 - 711, 1999.

Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Levasseur J, Kukreja R: Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 5 - 12, 2002.

Xue C, Rengasamy A, Le Cras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA: Distribution of NOS in normoxic vs. Hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am J Physiol* 266: L722 - 727, 1994.

Zaobornyj T, Gonzales G, Valdez L: Mitochondrial contribution to the molecular mechanisms of heart acclimatization to chronic hypoxia: role of nitric oxide. *Frontiers in bioscience* 12: 1247 - 1259, 2007.

Zemanová L: Vliv různých forem chronické hypoxie na tělesný růst, hematokrit a myokard laboratorního potkana. Středoškolská odborná činnost (SOČ), 2007.

Zenebe W, Nazarewicz R, Parihar M: Hypoxia/Reoxygenation of isolated heart mitochondria causes cytochrome c release and oxidative stress, evidence for involvement of mitochondrial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* 43: 411 - 419, 2007.

Ziolo M, Kohr M, Wang H: Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 625 - 632, 2008.