

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Fyziologický ústav Akademie věd České republiky

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Anna Chytilová

Úloha TNF-alfa a IL-10 v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie
The role of TNF-alpha and IL-10 in cardioprotective effect of chronic
hypoxia

Diplomová práce

Školitel:

Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Konzultanti:

Prof. RNDr. František Kolář, CSc.

Dr. Gudrun Borchert, PhD.

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.5.2011

.....
Anna Chytilová

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za odborné vedení a užitečné rady při vypracování této práce. Dále děkuji Prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc., Dr. Gudrun Borchert, PhD. a RNDr. Janu Neckářovi, PhD. z oddělení Vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AVČR za trpělivost, spoustu cenných konzultací, pečlivé odborné vedení a za pomoc s orientací v problematice. Další velké díky patří моým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Tato práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury Akademie věd (IAAX01110901).

Abstrakt

Naším cílem bylo zjistit, zda adaptace na chronickou hypoxii ovlivní expresi TNF- α a IL-10 v srdečním svalu potkana. TNF- α patří mezi prozánětlivé cytokiny, které zesilují zánětlivou reakci. IL-10 působí opačně a potlačuje produkci zánětlivých cytokinů, včetně TNF- α . Součástí našeho experimentu bylo měření koncentrace nitrotyrosinu jako markeru poškození buněk oxidem dusnatým. K experimentům jsme použili potkany kmene Wistar, které jsme rozdělili do čtyř skupin: 1) normoxické kontroly; 2) adaptované na kontinuální normobarickou hypoxii (10% O₂) po dobu tří dnů nebo 3) tří týdnů a 4) adaptované na intermitentní normobarickou hypoxii (10% O₂) po dobu tří týdnů s jednohodinovou denní reoxygenací. Z myokardu levé komory, pravé komory a mezikomorového septa jsme získali proteiny obsažené v cytosolu (cytosolická frakce) a v membránách (partikulární frakce). Metodou ELISA jsme změřili koncentrace TNF- α a IL-10 v obou frakcích. Kontinuální hypoxie zvýšila hladinu TNF- α v partikulární frakci všech komorových oddílů a snížila poměr koncentrací IL-10/TNF- α v partikulární i cytosolické frakci. Intermitentní hypoxie vedla k výrazné redistribuci TNF- α z cytosolu do partikulární frakce a zabránila hypoxii vyvolanému poklesu poměru koncentrací IL-10/TNF- α pouze v cytosolické frakci. Nejvyšší koncentraci nitrotyrosinu jsme naměřili v partikulární frakci myokardu pravé komory u skupiny vystavené hypoxii po dobu tří dnů. Naše výsledky ukazují, že krátká periodická reoxygenace výrazně modifikuje prozánětlivý vliv chronické hypoxie na expresi a lokalizaci TNF- α a IL-10 v srdečním svalu potkana.

Klíčová slova: myokard, hypoxie, cytokiny, TNF- α , IL-10, nitrotyrosin

Abstract

The aim of the present study was to find out whether adaption to chronic hypoxia affects the expression of TNF- α and IL-10 in rat myocardium. TNF- α is a proinflammatory cytokine, which amplifies inflammatory reaction, while IL-10 has opposite antiinflammatory effect. We also measured concentration of nitrotyrosine as a marker of nitrosative stress. We used male Wistar rats divided into four groups: 1) normoxic controls; 2) exposed to continuous normobaric hypoxia (10% O₂) for three days or 3) for three weeks and 4) exposed to intermittent normobaric hypoxia (10% O₂) for three weeks with one hour daily reoxygenation. Cytosolic and membrane proteins (cytosolic and particulate fractions) were obtained from the left ventricle, right ventricle and interventricular septum. Concentrations of TNF- α and IL-10 in both fractions were measured by ELISA. Continuous hypoxia increased TNF- α production in particulate fractions from all ventricular parts and decreased the ratio of IL-10/TNF- α in particulate and cytosolic fractions. Intermittent hypoxia redistributed TNF- α from cytosol into the particulate fraction and prevented the drop of IL-10/TNF- α ratio in the cytosolic fraction. The highest concentration of nitrotyrosine was found in the particulate fraction from the right ventricle after three days of hypoxia. Our data suggest that short periodic reoxygenation significantly modulates the proinflammatory effect of chronic hypoxia on the expression and localization of TNF- α and IL-10 in rat myocardium. (In Czech)

Key words: myocardium, hypoxia, cytokines, TNF- α , IL-10, nitrotyrosine

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek.....	9
1. Úvod.....	11
2. Hypoxie.....	12
2.1. Adaptace na hypoxii	13
2.2. Historie výzkumu kardioprotektivního účinku chronické hypoxie	14
2.3. Kardioprotektivní vliv chronické hypoxie.....	15
2.4. Trvání kardioprotektivních účinků chronické hypoxie.....	16
2.5. Molekulární mechanismy chronické hypoxie.....	17
2.5.1. ATP senzitivní draslíkové kanály (K_{ATP})	18
2.5.2. Reaktivní formy kyslíku (ROS).....	19
2.5.3. Reaktivní formy dusíku (RNS).....	19
2.5.4. Proteinkináza C.....	20
2.5.5. Další molekulární mechanismy	20
3. Cytokiny.....	22
3.1. Definice cytokinů.....	22
3.2. Vlastnosti cytokinů	22
3.3. Klasifikace cytokinů	23
3.4. Role cytokinů v kardiovaskulárních onemocněních.....	24
4. Tumor nekrotizující faktory.....	25
4.1. TNF- β	25
4.2. TNF- α	25
4.2.1. Membránové receptory pro TNF- α	27
4.2.2. Aktivace TNFR1: spuštění apoptických signálních drah	27
4.2.3. Aktivace TNF-R2: signální dráha vedoucí k translokaci NF κ B do jader buněk.....	28
4.3. TNF- α v srdci.....	29
4.3.1. Buňky produkující TNF- α v srdeční tkáni.....	29
4.3.2. Duální efekt TNF- α	29
4.3.3. Molekulární mechanismus produkce TNF- α během hypoxie	30
4.3.4. Vliv TNF- α na ischemicko-reperfúzní poškození	30
4.3.5. TNF- α v ischemické odolnosti srdce	31
5. Interleukiny.....	33

5.1. IL-10	33
5.1.2. Membránové receptory pro IL-10.....	34
5.2. IL-10 v srdci.....	36
5.2.1. Buňky produkující IL-10 v srdeční tkáni.....	36
5.2.3. Molekulární mechanismus produkce IL-10 během hypoxie	36
5.2.4. Vliv IL-10 na ischemicko-reperfúzní poškození	37
6. Interakce TNF- α a IL-10.....	38
7. Oxid dusnatý	39
8. Cíl práce	41
9. Materiál a metody	42
9.1. Pokusná zvířata	42
9.1.1. Experimentální skupiny	42
9.2. Použité chemikálie	43
9.3. Použité metody	45
9.3.1. Izolace proteinů.....	45
9.3.1.2. Postup izolace proteinů	45
9.3.2. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda.....	47
9.3.2.1. Postup stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda	47
9.3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	48
9.3.3.1. Sandwich ELISA	48
9.3.3.2. Postup metody ELISA pro měření koncentrace TNF- α a IL-10.....	49
9.3.4. Kompetitivní ELISA.....	49
9.3.4.1. Postup metody ELISA pro měření koncentrace nitrotyrosinu.....	51
9.3.5. Statistické vyhodnocení	52
10. Výsledky	53
10.1. Základní hodnocené parametry.....	53
10.2. Vliv hypoxie na expresi TNF- α v srdcích pokusných zvířat	55
10.3. Vliv hypoxie na expresi IL-10 v srdcích pokusných zvířat	57
10.4. Poměr koncentrací IL-10/TNF- α v srdcích normoxických a chronicky hypoxických potkanů.....	59
10.5. Vliv hypoxie na produkci nitrotyrosinu v srdcích pokusných zvířat.....	61
11. Diskuse.....	64
11.1. Používané metody pro měření cytokinů	64

11.2. Vliv chronické hypoxie a reoxygenace na expresi TNF- α	64
11.3. Vliv chronické hypoxie a reoxygenace na expresi IL-10	66
11.4. Poměr koncentrací TNF- α a IL-10 během hypoxie a reoxygenace	67
11.5. Vliv hypoxie a reoxygenace na expresi nitrotyrosinu	68
11.6. Shrnutí všech výsledků	69
12. Závěr	70
Seznam použité literatury	71

Seznam použitých symbolů a zkratek

BSA („ <i>bovine serum albumin</i> “)	hovězí sérový albumin
BW („ <i>body weight</i> “)	tělesná hmotnost
CRP	C reaktivní protein
CD („ <i>cluster of differentiation</i> “)	diferenční antigen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
ELISA („ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> “)	imunologická metoda sloužící k určování koncentrace
EPO	erytropoetin
FADD („ <i>FAS associated death domain</i> “)	faktor asociovaný s FAS
FAS	membránový receptor patřící do rodiny TNF receptorů, znám také jako CD95
FAD ⁺	flavinadenindinukleotid oxidovaný
FADH ₂	flavinadenindinukleotid redukovaný
FGF	růstový faktor fibroblastů
G-CSF	cytokin stimulující v kostní dřeni diferenciaci granulocytů
GM-CSF	cytokin stimulující v kostní dřeni diferenciaci myeloidních buněk
HRP („ <i>horseradish peroxidase</i> “)	křenová peroxidáza
ICAM („ <i>intercellular adhesion molecule</i> “)	mezibuněčná adhezivní molekula
I κ B	inhibitorový protein bránící translokaci NF κ B do jádra
IFN	interferon
IL	interleukin
IPC	ischemický preconditioning
K _{ATP}	ATP závislý draslíkový kanál
LAM („ <i>leukocyte adhesion molecules</i> “)	adhezivní molekuly
LIF („ <i>leukemia inhibiting factor</i> “)	faktor inhibující růst leukemických buněk

LV („ <i>left ventricle</i> “)	levá komora
MAPK („ <i>mitogen activated protein kinase</i> “)	mitogenem aktivovaná protein kináza
M-CSF	cytokin stimulující v kostní dřeni diferenciaci monocytů
NFκB („ <i>nuclear factor κB</i> “)	jaderný transkripční faktor κB
NGF	nervový růstový faktor
NOS	NO syntáza
NK („ <i>natural killer</i> “)	přírozený zabíječ
PAF („ <i>platelet-activating factor</i> “)	faktor aktivující krevní destičky
PBS („ <i>phosphate saline buffer</i> “)	pufrovaný fyziologický roztok
PC	preconditioning
pH _i	intracelulární pH
RIP („ <i>receptor interacting protein</i> “)	s receptorem interagující protein
RNS („ <i>reactive nitrogen species</i> “)	reaktivní formy dusíku
ROS („ <i>reactive oxygen species</i> “)	reaktivní formy kyslíku
RV („ <i>right ventricle</i> “)	pravá komora
SEP	septum
SCF	růstový faktor kmenových buněk
TACE („ <i>TNF-α converting enzyme</i> “)	enzym štěpící pro-TNF-α
TGF („ <i>transforming growth factor</i> “)	transformační růstový faktor
TMB	tetramethylbenzidin
TNF („ <i>tumor necrosis factor</i> “)	tumor nekrotizující faktor
TRADD („ <i>TNF-α receptor associated death domain</i> “), „ <i>death</i> “	doména asociovaná s TNF-α receptorem
TRAF („ <i>TNF receptor associated factor</i> “)	faktor asociovaný s TNF receptorem
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITON	t-oktylfluoxypolyetoxyethanol
VAP („ <i>apoptosis-inducing protein</i> “)	proteiny indukující apoptózu

1. Úvod

Kardiovaskulární choroby patří mezi hlavní příčiny úmrtí v rozvinutých zemích včetně České republiky. Přední příčku zaujímají z důvodu zhoršujícího se životního stylu obyvatelstva moderního světa.

Nejčastější formou onemocnění srdce a cév je dnes ischemická choroba srdeční. Kouření, stres a obezita spolu s nedostatkem pohybu mají klíčovou roli při vzniku a progresi tohoto onemocnění. Proto vědci a lékaři věnují intenzivní pozornost vypracování metod a přístupů k prevenci a léčbě ischemické choroby srdeční, především její akutní formy – infarktu myokardu.

Existují dva přístupy experimentálních kardiologů. První je založen na studiu patogenetických mechanismů uplatňujících se při vzniku ischemického poškození myokardu. Druhý je zaměřen na výzkum endogenních kardioprotektivních mechanismů, které zvyšují odolnost k ischemii.

Jedním z prvních objevených kardioprotektivních jevů je zvýšená odolnost vyvolaná adaptací organismů na hypoxické podmínky spojené s vysokou nadmořskou výškou.

Tato práce si dala za cíl zavést experimentální metodu pro sledování vlivu chronické hypoxie na expresi TNF- α a IL-10 v srdečním svalu laboratorního potkana. TNF- α a IL-10 patří mezi cytokiny, které modulují imunitní reakce. Protože hypoxie je spojena s oxidačním stresem, měřili jsme zároveň koncentrace nitrotyrosinu jako ukazatele poškození buněk produkty reakce oxidu dusnatého s reaktivními formami kyslíku.

2. Hypoxie

Hypoxie je charakterizována jako disproporce mezi dodávkou a nárokem tkání na kyslík. Hypoxie může být akutní nebo chronická. V řadě kardiovaskulárních onemocnění se často setkáváme s hypoxickými stavy kardiopulmonálního systému, které vznikají právě na základě nerovnosti mezi dodávkou a buňkami momentálně vyžadovaným množstvím kyslíku (Gregor a Widimský, 1999).

Jsou známy 4 základní typy hypoxie (Ošťádal a Vízek, 2003):

a) ischemická hypoxie (často označována jako srdeční ischemie), která je vyvolaná redukcí až zástavou koronárního průtoku;

b) hypoxická hypoxie, charakterizována poklesem parciálního tlaku kyslíku pO_2 v arteriální krvi při normálním koronárním průtoku;

c) anemická hypoxie, při níž je sice arteriální tlak kyslíku pO_2 normální, ale transportní kapacita krve pro kyslík je snížena;

d) histotoxická hypoxie, vznikající sníženou utilizací kyslíku v buňce při dostatečné saturaci i průtoku (např. inhibice oxidativních enzymů při otravě kyanidem).

Nejčastějšími příčinou nedostatečného zásobování srdečního svalu kyslíkem jsou bezpochyby první dva mechanismy; tj. ischemická a hypoxická hypoxie. S ischemickou hypoxií se nejčastěji setkáváme při ischemické chorobě srdeční a s hypoxickou hypoxií u chronických plicních onemocnění, u cyanotických vrozených vad nebo při změnách kardiopulmonálního systému vyvolaného pobytem v prostředí s nízkým obsahem kyslíku ve vzduchu (Ošťádal a kol., 1998).

Ve dvou případech můžeme však hypoxickou hypoxii kvalifikovat jako situaci fyziologickou: fetální myokard a srdeční sval obyvatel vysokých nadmořských výšek. V obou těchto situacích je srdeční sval významně odolnější k akutnímu nedostatku kyslíku. Tato skutečnost se stala středem zájmu v řadě experimentálních výzkumů zaměřených na studium mechanismů chránících srdce před akutním ischemickým poškozením (Kolář a Ošťádal, 2004).

V podmínkách chronické hypoxické hypoxie musí myokard udržovat adekvátní funkci při sníženém parciálním tlaku kyslíku (pO_2) v koronárních artériích. Tento stav nutně vyžaduje adaptaci, která může ochránit myokard i za situací, které na něj kladou zvýšené pracovní a tím i metabolické nároky. Adaptace na chronickou hypoxii je charakterizována velkým počtem fyziologických a metabolických změn, které slouží

k udržení homeostáze za spotřeby minimálního množství energie. Je to děj komplexní, který sice chrání srdce před ischemickým poškozením, ale působí na kardiovaskulární systém také negativně, neboť vede např. k rozvoji plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory srdeční (Ošťádal a Kolář, 2007).

2.1. Adaptace na hypoxii

Adaptace na chronickou hypoxii zahrnuje řadu základních fyziologických funkcí. V první řadě je stimulována reflexní hyperventilace drážděním periferních i centrálních chemoreceptorů. Tento efekt je během několika hodin částečně oslaben rozvíjející se respirační alkalózou, která je však postupně kompenzována zvýšenou exkrecí HCO_3^- ledvinami a ventilační úsilí se opět zvyšuje.

Dochází ke zvýšené syntéze erythropoetinu, který stimuluje tvorbu červených krvinek v kostní dřeni. Vzniká tedy polycytemie. Zvýšený hematokrit dále zvyšuje viskozitu krve. Také celkový objem krve se zvětšuje. U osob trvale žijících ve vysoké nadmořské výšce dochází k posunu saturační křivky hemoglobinu (Hb) pro kyslík v důsledku perzistence určité frakce fetálního Hb. Ten umožňuje, aby se Hb sytil O_2 při nižším parciálním tlaku. Všechny tyto děje zvyšují transportní kapacitu krve pro kyslík (Trojan a kol., 1999).

Plicní řečiště je v normě nízkotlaké. Systolický/diastolický tlak v *truncus pulmonalis* je u člověka okolo 25/10 mmHg. Při systémové hypoxii, dojde k vazokonstrikci plicních arteriol. Tento děj směřuje ke zlepšení poměru ventilace/perfuze v plicích, tedy ke zvýšení difúzní kapacity plic pro výměnu plynů. V důsledku chronické hypoxie dochází ke ztluštění média plicních arteriol a k rozvoji plicní hypertenze. Zvýšený tlak v plicním řečišti nadměrně zatěžuje pravou komoru, která pod tímto vlivem hypertrofuje (Ošťádal a Vízek, 2003).

Chronická hypoxie vyvolává řadu adaptačních změn na buněčné i molekulární úrovni, jejichž cílem je udržení homeostáze i v podmínkách snížené dostupnosti O_2 .

2.2. Historie výzkumu kardioprotektivního účinku chronické hypoxie

U lidí žijících trvale ve vysoké nadmořské výšce byl popsán nižší výskyt infarktu myokardu ve srovnání s populacemi žijícími v nízkých nadmořských výškách. Tato skutečnost byla prokázána u obyvatel Peru, žijících ve výšce kolem 4000 m, ale i u obyvatel Nového Mexika, kteří žijí v mírnější výšce (2100 m). U těchto populací byl zjištěn nižší výskyt úmrtí následkem ischemické choroby srdeční (Hurtado, 1960). Toto zjištění vedlo vědce k experimentálnímu studiu kardioprotektivního působení chronické hypoxie a k prozkoumání jeho mechanismu. Výšková hypoxie se v laboratorních podmínkách simuluje v hypobarických komorách. Kopecký a Daum (1958) jako první experimentálně prokázali kardioprotektivní vliv chronické hypoxie na srdcích potkanů. Poupa a kol. (1966) studovali účinek kardiotoxické dávky isoprenalinu na srdce potkanů. Dospěli k tomu, že srdce adaptovaná na vysokou nadmořskou výšku jsou odolnější vůči účinku isoprenalinu než normoxická skupina. Také se ukázalo, že nejen adaptace na kontinuální hypoxii, ale také adaptace na intermitentní výškovou hypoxii (4 hodiny denně, celkem 24 expozic) je schopna aktivovat v srdci kardioprotektivní mechanismy (Mc Grath a kol., 1973; Widimský a kol., 1973).

Ošťádal a kol. (1984) prokázali pohlavní rozdíly v odolnosti srdce vůči akutní kyslíkové deprivaci. Ukázalo se, že přestože je samičí myokard odolnější k ischemii, adaptace na chronickou hypoxii způsobí zvýšení odolnosti u obou pohlaví, přičemž pohlavní rozdíl zůstává zachován.

Dále Ošťádal a Kolář (1999) zjistili, že nezralý myokard je více odolný k ischemii než myokard dospělý. To je způsobeno hypoxickými podmínkami, kterým je plod během svého vývoje vystaven. Po narození ale jeho zvýšená odolnost klesá (Ošťádalová a kol., 1998). Pomocí experimentů se zjistilo, že vystavení hypoxii od narození zabrání přirozenému vývojovému poklesu odolnosti vůči akutní anoxii (Baker a kol., 1995, Ošťádalová a kol., 2002).

Před 25 lety byl objeven další protektivní fenomén, *preconditioning* (PC), který sdílí s chronickou hypoxií některé prvky signální kaskády (Kolář a Ošťádal, 2004). PC lze definovat jako krátkodobý stimul aplikovaný před ischemií, který nastartuje v buňce kardioprotektivní mechanismy. Nejprve byl popsán tzv. ischemický PC (IPC) (Murry a kol., 1986): 4 cykly 5 minutové okluze a následné reperfuze koronární tepny psa výrazně

omezily velikost infarktu myokardu vyvolané následnou 40 minutovou akutní ischemií. Bylo zjištěno, že protekce navozená IPC se objevuje ve dvou fázích: první rychlá odpověď trvá 1-2 hodiny po stimulu a poté vymizí. Během následujících 24 hodin se aktivuje druhá fáze kardioprotekce, která trvá 2-3 dny (Marber a kol., 1993). První fáze je z hlediska protekce účinnější, druhá fáze má naproti tomu delší trvání.

Intenzivní výzkum PC přinesl řadu významných poznatků o jeho mechanismu, které v posledních letech vedly ke zvýšenému zájmu o protektivní působení chronické hypoxie.

2.3. Kardioprotektivní vliv chronické hypoxie

Adaptace organismů na podmínky chronické hypoxie vede ke zvýšené odolnosti myokardu k akutní ischemii na různých úrovních poškození. Adaptace má pozitivní vliv na velikost infarktu myokardu, postischemickou obnovu kontraktálních funkcí a výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií (Kolář a Ošťádal, 2004).

Počátkem 70. let minulého století se prokázalo, že chronická hypoxie významně snižuje velikost infarktu myokardu u potkanů (Maroko a kol., 1972), což bylo později podpořeno dalšími publikacemi (např: Turek a kol., 1980, Neckář a kol., 2002). Míra kardioprotektivního účinku chronické hypoxie na velikost infarktu je přímo úměrná intenzitě hypoxického stimulu – nadmořské výšce, počtu hypoxických expozic a době jejich trvání. Velikost infarktu u skupiny potkanů adaptovaných na mírnou intermitentní výškovou hypoxie (5000 m) byla po 30 minutách regionální ischemie a 4 hodinové reperfuzi významně menší oproti normoxickým kontrolám. Tento efekt se zvýšil při vyšším stupni hypoxie (7000 m). Také adaptace potkanů na kontinuální normobarickou hypoxii snižuje velikost infarktu v podobném rozsahu jako intermitentní výšková hypoxie. Důležité je si uvědomit, že s rostoucím stupněm hypoxie se zvyšují i negativní projevy adaptace (Kolář a Ošťádal, 2004).

Adaptace na chronickou hypoxii má také pozitivní vliv na postischemickou obnovu kontraktálních funkcí myokardu (Kopecký a Daum, 1958, Poupa a kol., 1966, Widimský a kol., 1973, McGrath a kol., 1973). Tato skutečnost byla sledována i později na izolované pravé komoře jak u samců potkana, tak i samic, které jsou obecně k ischemii odolnější než samci (Ošťádal a kol., 1998). Dále se prokázalo, že i na modelu izolovaného

perfundovaného srdce dochází ke zlepšení kontraktilní funkce levé komory (Felaco a kol., 2000, Neckář a kol., 2002, Zhong a kol., 2002). Intermitentní výšková hypoxie působila protektivně na obnovu kontraktilních funkcí myokardu potkana i v případě poškození srdce vápníkovým přetížením vyvolaným vápníkovým paradoxem (Zhu a kol., 2003). Neckář a kol. (2010) ukázali na potkaním modelu, že denní jednohodinová reoxygenace ruší kardioprotektivní účinky chronické hypoxie na zmenšení velikosti infarktu a redukce ventrikulárních arytmií. Dále zjistili, že periodická reoxygenace zvyšuje koncentraci malondialdehydu v srdci a brání nárůstu exprese mitochondriální manganové superoxiddismutázy (MnSOD), neovlivní však efekt chronické hypoxie na vznik hypertrofie pravé komory a zvýšení hematokritu.

Dlouhodobá adaptace na hypoxické podmínky na modelech „*in situ*“ a perfundovaného srdce „*in vitro*“ snižuje výskyt závažných komorových arytmií jak v průběhu ischemie tak v následné reperfuzi (Asemu a kol., 1999, Zhong a kol., 2002). Studie Meersona a kol. (1987) ukázala, že adaptace potkanů na mírnou intermitentní výškovou hypoxii snižuje výskyt závažných ischemických arytmií, avšak pouze na modelu anestizovaného uměle ventilovaného zvířete (srdce „*in situ*“). Pozdější studie zjistily, že adaptace na intermitentní výškovou hypoxii vede ke snížení celkového počtu ischemických i reperfuzních arytmií a jejich závažnosti u obou experimentálních modelů (*in situ* i *in vitro*) (Asemu a kol., 1999; Szászoi a kol., 2002). S narůstající hypoxickou zátěží však antiarytmický účinek vymizel v podmínkách *in vitro*, zatímco na modelu „*in situ*“ byl naopak zesílen (Neckář a kol., 2004). Zdá se tedy, že antiarytmický účinek je závislý na použitém experimentálním modelu a adaptačním protokolu.

Dosud neobjasněnou otázkou zůstává, jak dlouhou dobu je nutné adaptovat organismus na chronicky hypoxické podmínky, abychom vyvolali setrvalý kardioprotektivní účinek.

2.4. Trvání kardioprotektivních účinků chronické hypoxie

Většina změn vyvolaných chronickou hypoxií se vrací na původní úroveň během 3-5 týdnů od ukončení adaptace. Dochází k postupné normalizaci hmotnosti hypertrofované pravé komory, poklesu hodnot tlaku v pravé komoře a v plicnici (Kolář a Ošťádal, 2004), snížení hematokritu a hladiny hemoglobinu a normalizaci elektrofyzilogických (Chouabe a kol., 2002) i metabolických změn myokardu (Novák a kol., 2004). Přesto některé

parametry zůstávají významně pozměněny: např. snížená účinnost adrenergního přenosu přetrvává více než 5 týdnů (Hrbasová a kol., 2003), srdeční fibróza více než 8 týdnů (Pelouch a kol., 1997) a zvýšená muskularizace malých plicních cév více jak 10 týdnů (Urbanová a kol., 1973).

Několik experimentů ukázalo, že protektivní působení chronické hypoxie na ischemický myokard může přetrvávat mnohem déle než u jakékoliv formy PC. Ošťádal a kol. (1985) zjistili zlepšenou obnovu kontraktilní funkce izolované pravé komory po akutní anoxii *in vitro* ještě 4 měsíce od ukončení adaptace potkanů na výraznou intermitentní výškovou hypoxii. Práce Neckáře a kol. (2004) ukázala, že trvalý návrat do normoxie sice vede během prvního týdne po poslední hypoxické expozici (7000 m, 8 h denně, 35 expozic) k oslabení kardioprotektivního účinku chronické hypoxie na velikost infarktu, ale významný rozdíl oproti kontrolám přetrvával ještě nejméně 5 týdnů.

Chronická hypoxie v časných fázích postnatálního vývoje může dlouhodobě ovlivnit odolnost myokardu k ischemicko-reperfúznímu poškození v dospělosti. Na rozdíl od velikosti infarktu, antiarytmický účinek chronické hypoxie vymizel již po 1. týdnu v normoxii. Zdá se, že nezralý myokard samců a samic může rozdílně reagovat na hypoxii, což se projeví odlišnou citlivostí na ischemický podnět v dospělosti (Ošťádalová I. a kol., 2002). S ohledem k narůstající skupině pacientů, kterým byla v dětství korigována vrozená hypoxemická srdeční vada, by měla být pozdním důsledkům časného hypoxického poškození myokardu věnována větší pozornost.

2.5. Molekulární mechanismy chronické hypoxie

Moderní metodické přístupy umožňují studovat podstatu kardioprotektivního účinku chronické hypoxie na molekulární úrovni. I když detailní mechanismus zůstává stále nejasný, existují experimentální důkazy, které podporují úlohu řady signálních molekul. Nejvíce informací je k dispozici o úloze draslíkových kanálů závislých na ATP (K_{ATP}), reaktivních forem kyslíku (ROS), oxidu dusnatého (NO), protein kinázy C (PKC) a dalších (Kolář a Ošťádal, 2004).

2.5.1. ATP senzitivní draslíkové kanály (K_{ATP})

ATP senzitivní draslíkové kanály jsou přítomny ve všech tělních buňkách. Existují dva základní podtypy v kardiomyocytech: povrchový, který je lokalizován v sarkolemě, a mitochondriální, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně. Sarkolemní kanály ($sarkK_{ATP}$) byly popsány před více než 20 lety (Noma, 1983), mitochondriální ($mitoK_{ATP}$) byly objeveny později (Inoue a kol., 1991). Molekulární struktura $sarkK_{ATP}$ byla již zjištěna, na rozdíl od struktury $mitoK_{ATP}$. $sarkK_{ATP}$ kanály jsou oktamery tvořené čtyřmi podjednotkami SUR (sulfonylureový receptor) a čtyřmi podjednotkami K_{ir} („*inwardly rectifying potassium channel*“) (Inagaki a kol., 1995; Aguilar-Bryan a kol., 1995). Protein SUR patří do rodiny ABC transportérů a reaguje na koncentraci ATP. Podjednotky K_{ir} formují K^+ selektivní pór v membráně. Identifikovány byly různé izoformy zmíněných podjednotek: např. SUR2A/ $K_{ir}6.2$ v membráně kardiomyocytů; SUR1/ $K_{ir}6.2$ v povrchové membráně β buněk pankreatických ostrůvků (Inagaki a kol., 1995); SUR2B/ $K_{ir}6.1$ v hladkých svalových buňkách cévní stěny (Isomoto a kol., 1996). Skutečnost, že se různé K_{ATP} kanály liší svou strukturou, je podkladem jejich farmakologické diverzity. Funkci jednotlivých podtypů kanálů je tedy možno ovlivňovat selektivními modulátory.

Při normální cytolické koncentraci ATP jsou K_{ATP} kanály uzavřené. Pokles ATP v buňce zvyšuje pravděpodobnost jejich otevření. Dlouhodobá i krátkodobá adaptace na nejrůznější stresové podněty, včetně chronické hypoxie a PC, navodí aktivaci K_{ATP} kanálů v srdci a ostatních orgánech (Cameron a Baghdady, 1994).

Vstup K^+ iontů do mitochondriální matrix $mitoK_{ATP}$ kanály, resp. únik K^+ z cytoplazmy do extracelulárního prostoru $sarkK_{ATP}$ kanály při jejich aktivaci, navodí řadu změn, které se mohou podílet na zvýšené odolnosti myokardu k poškození. Detailní vysvětlení vlastního mechanismu je však stále na úrovni hypotéz.

Přesvědčivé důkazy o klíčové roli mitochondriálních kanálů v protektivním mechanismu chronické hypoxie dávají pokusy se selektivními modulátory $mitoK_{ATP}$ kanálů. Tyto látky dovolují testovat aktivaci, resp. blokádu $mitoK_{ATP}$, nezávisle na fungování povrchových $sarkK_{ATP}$ kanálů a naopak. 5-hydroxydekanoát (5-HD) je selektivním inhibitorem mitochondriálních kanálů. Jeho aplikace kompletně zruší protektivní efekt chronické hypoxie (především zlepšení kontraktilních funkcí a redukce infarktu myokardu), ale nemá žádný vliv u normoxické skupiny. Diazoxid je selektivní aktivátor $mitoK_{ATP}$, jehož podání omezí velikost infarktu myokardu u normoxických

kontrol, ale jeho účinek se neprojeví u adaptovaných zvířat (Neckář a kol., 2002). Neselektivní blokátor K_{ATP} kanálů glibenclamid i selektivní blokátor $mitoK_{ATP}$ 5-HD blokují antiarytmický účinek chronické hypoxie. Diazoxid má antiarytmický efekt pouze ve skupině normoxických kontrol (Asemu a kol., 1999).

2.5.2. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Spojku mezi aktivací protektivních signálních drah a otevřením $mitoK_{ATP}$ kanálů jsou pravděpodobně reaktivní formy kyslíku. ROS hrají dvojí úlohu v odolnosti myokardu vůči ischemicko-reperfučnímu poškození. Vznikají v srdečních buňkách během ischemie a zejména reperfúze a významně přispívají k buněčnému poškození. Na druhé straně se opakovaně v různých experimentech potvrdila nezastupitelná role ROS v signální kaskádě kardioprotekce, zprostředkované jak IPC, tak chronickou hypoxií. Otevření mitochondriálních K_{ATP} kanálů zvyšuje produkci kyslíkových radikálů, které aktivují další signální molekuly v protektivní kaskádě (Forbes a kol., 2001). Přenašeči kyslíkových radikálů (melatonin, tempol) redukuje výskyt a závažnost reperfučních arytmí u normoxické skupiny, ale zároveň ruší příznivý antiarytmický efekt chronické hypoxie u adaptovaných zvířat (Szárszoi, 2003). Chronické podávání antioxidantu N-acetylcysteinu během adaptace na výškovou hypoxii eliminuje pozitivní vliv chronické hypoxie na odolnost myokardu vůči letálnímu poškození (Kolář a kol., 2003).

2.5.3. Reaktivní formy dusíku (RNS)

Úloha radikálů odvozených od oxidu dusnatého je poněkud spornější. Jednou z navrhovaných teorií o účinku NO je, že zvyšuje ischemickou toleranci působením na solubilní guanalylycyklázu a akumulací cGMP, které aktivuje na cGMP závislé kinázy a ty následně fosforylují $sarcK_{ATP}$ (Baker a kol., 1999). Inhibice produkce NO podáním blokátorů NO syntáz L-NAME a L-NMA eliminovala kardioprotektivní účinek chronické hypoxie. Zvýšení hladiny NO v srdci podáním NO donoru (GSNO) naopak aktivovalo protekci myokardu chronicky hypoxických mláďat potkanů (Ošťádalová a kol., 2002). K opačným výsledkům dospěl Szárszoi a kol. (2002), který podával blokátor L-NAME dospělým chronicky hypoxickým potkanům. Tento blokátor neměl inhibiční účinek na

zlepšenou obnovu kontraktilních funkcí v myokardu. Podání GSNO navíc eliminovalo antiarytmický účinek chronické hypoxie u hypoxických potkanů, ale neovlivnilo výskyt arytmií u normoxické skupiny (Szárszoi a kol., 2003). Tyto údaje naznačují, že zvýšená koncentrace NO má v chronicky hypoxickém myokardu potkana spíše negativní, proarytmický vliv. Je tedy zřejmé, že působení NO na ischemickou odolnost chronicky hypoxických srdcí není ještě zcela objasněno.

2.5.4. Proteinkináza C

Různé typy buněčných kináz se uplatňují v jednotlivých krocích kardioprotekce chronické hypoxie i PC. Zapojení kináz lze předpokládat v paralelních i zpětnovazebných drahách buněčné signalizace. Centrální roli však má proteinkináza C (PKC) (Ytrehus a kol., 1994). V kardioprotekci vyvolané chronickou intermitentní hypoxií se nejvíce uplatňuje izoforma δ . Současné studie naznačují, že existuje zpětnovazebná smyčka, díky níž může PKC aktivovat $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, ale současně aktivace $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ a produkce ROS stimuluje kinázu. Tento enzym je permanentně aktivován v průběhu adaptace na chronickou hypoxii (Morel a kol., 2003). Podání obecného inhibitoru PKC chelerytrinu zablokuje kardioprotektivní účinek chronické hypoxie na úrovni postischemické kontraktilní dysfunkce a velikosti infarktu a podání selektivního inhibitoru PKC izoformy δ rottlerinu významně oslabí kardioprotektivní účinek chronické hypoxie na velikost infarktu (Neckář a kol., 2005). Z těchto výsledků vyplývá, že izoforma PKC δ hraje důležitou roli v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie. Nejnovější práce prokázaly, že za zvýšenou indukci tohoto enzymu v chronicky hypoxickém myokardu může právě zvýšená produkce ROS v průběhu adaptace (Kolář a Ošťádal, 2004).

2.5.5. Další molekulární mechanismy

Úloha dalších komponent, které mohou hrát roli v mechanismech kardioprotekce vyvolané chronickou hypoxií je zatím ve stádiu zkoumání. V poslední době se hovoří o erythropoetinu (EPO), který má zásadní význam ve stimulaci červených krvinek, ale kromě toho může přímým působením na srdce zvyšovat jeho odolnost k ischemickému poškození. Kolář a kol. (2006) ukázali na modelu srdce potkana „*in situ*“, že EPO podaný před podvazem koronární arterie zmenšuje velikost infarktu. Během adaptace dochází také ke

zvýšení koncentrace proteinů tepelného stresu (HSP), které mají opravnou funkci (Zhong a kol. 2000). Významnou roli v protektivních mechanismech chronické hypoxie mohou hrát cytokiny, které se uplatňují v zánětlivých reakcích. Touto otázkou se budu zabývat v následujících kapitolách.

3. Cytokiny

3.1. Definice cytokinů

Cytokiny jsou definovány jako sekreční regulační proteiny a glykoproteiny o molekulových hmotnostech od 6 do 60 kDa. Jejich úlohou je kontrola buněčného růstu, diferenciací a další funkce. Nejdůležitější funkcí je regulace imunitních dějů a zajištění homeostázy za normálních i patologických podmínek (Pěnička a Gregor, 2000)

3.2. Vlastnosti cytokinů

Cytokiny nacházíme především extracelulárně, kde reakcí s příslušným receptorem na cílových buňkách přenášejí informaci o stavu organismu a vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Většina cytokinů je sekretována klasickými sekrečními cestami. Existují však i membránové formy některých cytokinů, které jsou na rozdíl od sekretovaných forem zakotveny v cytoplazmatické membráně hydrofobní sekvencí přibližně 20 aminokyselin (transmembránové proteiny) (Das, 2000).

Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní (působí na několik různých druhů buněk), často působí v kaskádě (jeden cytokin indukuje tvorbu druhého) a celý cytokinový systém je do určité míry redundantní (jednotlivé cytokiny mohou být často nahrazeny jinými). Cytokiny působí buď autokrinně (působí na buňku, která je produkuje), parakrinně (působí na buňky v těsné blízkosti) nebo endokrinně (po transportu cévním řečištěm působí na vzdálené tkáně). Pro některé účely je nezbytně nutné koordinované spolupůsobení několika různých cytokinů. Tyto složité interakce v cytokinovém systému se označují jako cytokinová síť (Hořejší a Bartůňková, 2005).

3.3. Klasifikace cytokinů

Obecné dělení (Hořejší a Bartůňková, 2005):

- Interleukiny: IL1 až IL-32; heterogenní skupina cytokinů regulujících hlavně rozličné aspekty vývoje a aktivace leukocytů.
- Chemokiny: IL-8 a řada příbuzných molekul s chemotaktickou aktivitou.
- Interferony: IFN- α , β a γ ; důležité složky neadaptivních antivirových obranných mechanismů a regulátory imunity.
- Transformující růstové faktory: TGF- α , TGF- β (strukturně zcela odlišné).
- Faktory stimulující kolonie (CSF): cytokiny stimulující v kostní dřeni diferenciaci granulocytů (G-CSF), monocytů (M-CSF) nebo obou typů myeloidních buněk (GM-CSF).
- Tumor nekrotizující faktory: TNF- α , β
- Růstové faktory: růstový faktor kmenových buněk (SCF), erythropoetin (EPO), růstový faktor fibroblastů (FGF), nervový růstový faktor (NGF), faktor inhibující leukémii (LIF) a další

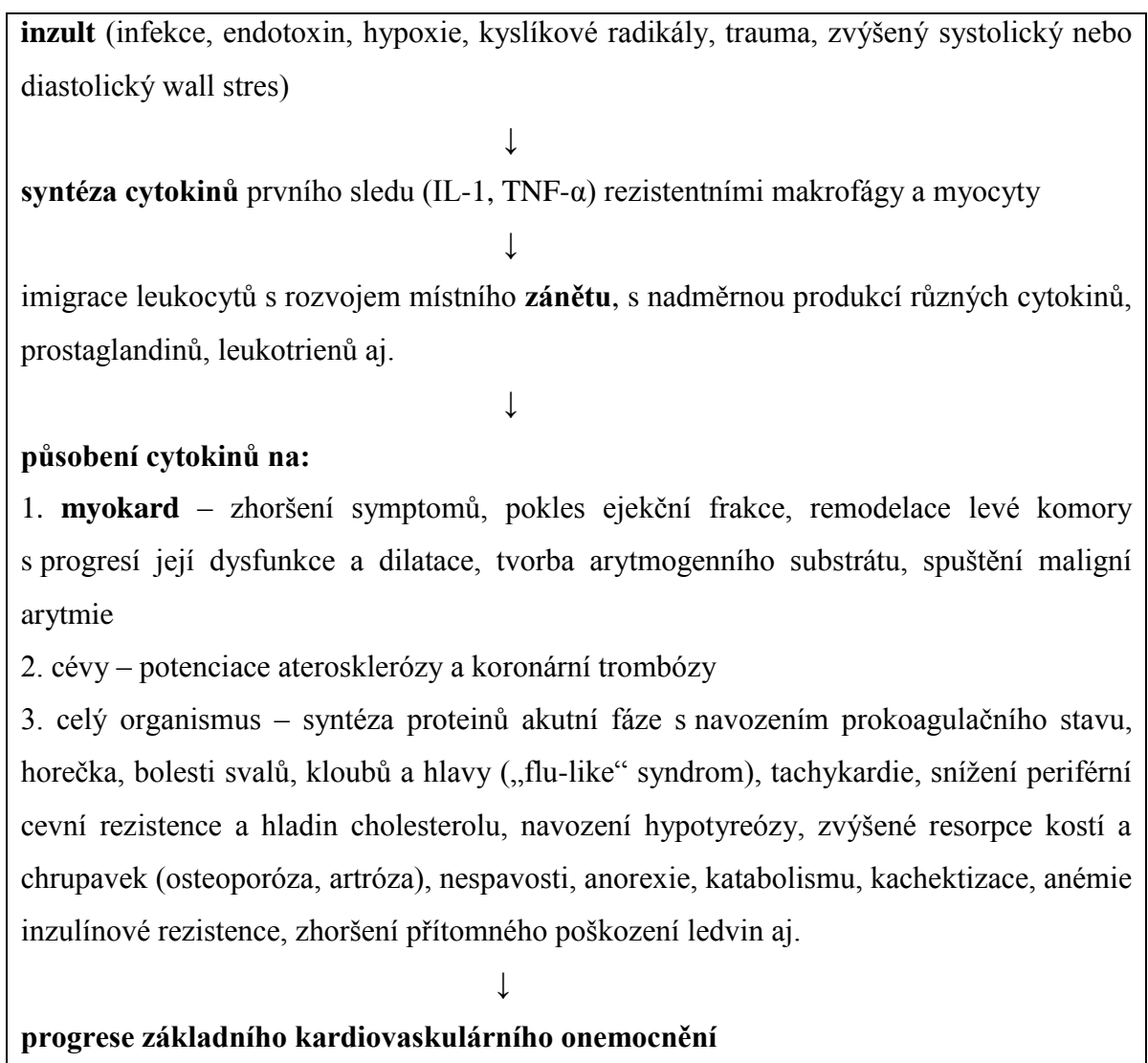
Dělení podle funkce (Klener a kol., 1997):

- Prozánětlivé cytokiny (včetně chemokinů): (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , TNF- β)
- Protizánětlivé cytokiny: (IL-4, IL-10, TGF β)
- Cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk: (IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, EPO, CSF)
- Cytokiny uplatňující se v humorální (protilátkové) imunitě: (IL-4, IL-5, IL-13)
- Cytokiny uplatňující se v buněčné imunitě: (IL-2, IFN- γ)
- Cytokiny s antivirovým účinkem – interferony: (IFN- α , IFN- β)

3.4. Role cytokinů v kardiovaskulárních onemocněních

Cytokiny se v kardiologii uplatňují v patogenezi řady poruch funkčních (vazospasmy, poruchy kontraktility myokardu), degenerativních (zejména v aterogenezi) a v patogenezi zánětlivých procesů (myokarditida, perikarditida). Zcela specifická je jejich úloha při vzniku a progresi onemocnění cévní stěny (zejména aterosklerózy) (Klener a kol., 1997).

Pěnička a Gregor (1997) navrhli stručnou hypotézu o roli cytokinů v kardiovaskulárních onemocněních (viz *Obrázek č. 1*):



Obr. č. 1: Cytokinová hypotéza kardiovaskulárního onemocnění (převzato z Pěnička a kol., 2000)

4. Tumor nekrotizující faktory

TNF řadíme mezi prozánětlivé cytokiny. Tyto cytokiny jsou schopny zvýšit svoji vlastní produkci, stimulovat syntézu malých zánětlivých mediatorů jako jsou PAF („*Platelet-activating factor*“), eikosanoidy a kyslíkové radikály, a aktivovat buněčné komponenty. TNF jsou endogenní pyrogeny, které stimulují produkci jiných endogenních pyrogenů jako IL-1 β (Meldrum, 1998).

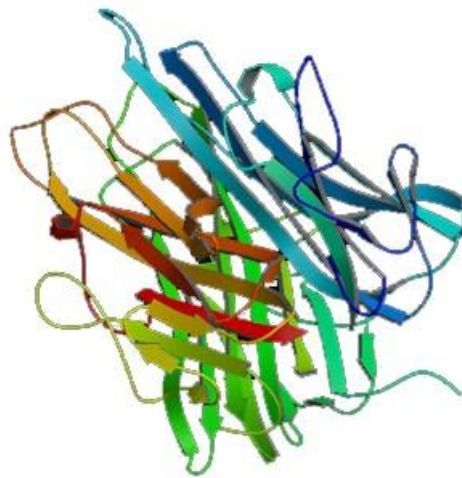
Do této skupiny cytokinů patří TNF- α a TNF- β .

4.1. TNF- β

TNF- β byl poprvé popsán Carswelem v roce 1975 jako lymfotoxin. Má větší molekulu než TNF- α , je méně účinný a jeho výskyt je omezený. Je nejčastěji produkován T-lymfocyty. Má cytotoxické a cytolytické účinky (Feldman a kol., 2000).

4.2. TNF- α

TNF- α je stabilní homotrimerní molekula. Jedna podjednotka obsahuje 185 aminokyselin. Celková molekulová hmotnost činí 17 kDa. Skládá se z dlouhých řetězců β -struktury skládaných listů, stočených do tzv. rolky („*jell roll*“). Jeho struktura je vyobrazena na *obrázku č. 2*. Patří mezi peptidové hormony a glykoproteiny. Nachází se volně, ale i v membránové formě (Locksley a kol., 2001).



Obr. č. 2: Struktura TNF- α (převzato z Locksley a kol., 2001)

V roce 1975, Carswel a kol. identifikovali TNF- α jako endotoxinem indukovaný sérový faktor. O deset let později vědci izolovali hormon kachektin z nádorových buněk postižených kachexií. Následující klonování genu kódujícího kachektin a TNF- α potvrdilo, že jsou tyto molekuly identické a proto se TNF- α označuje jako kachektin (Feldman a kol., 2000).

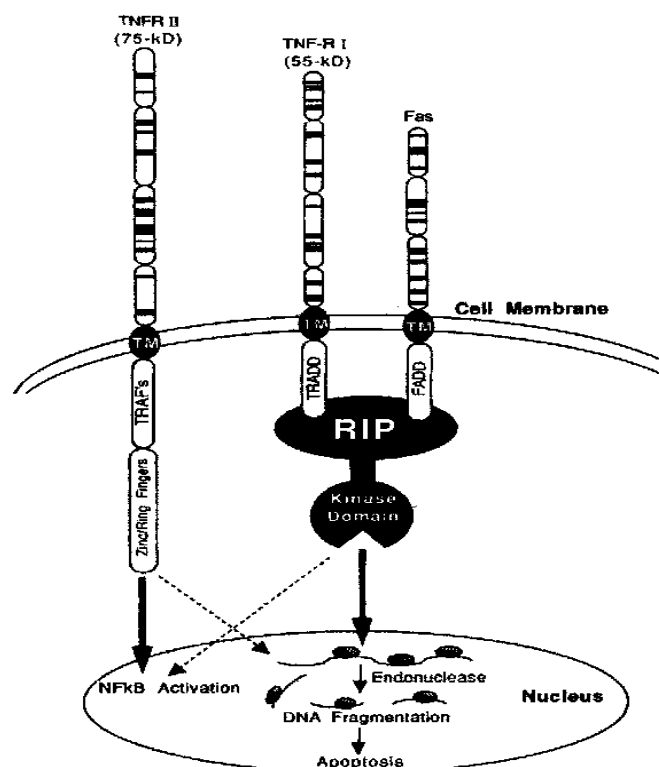
TNF- α se uplatňuje jako mediátor zánětlivých dějů a septického šoku, působí uvolnění dalších mediátorů zánětu (leukotrienů, prostagladinu E), indukuje expresi některých genů. Má cytostatické a cytotoxické účinky, cytotoxicky působí tvorba kyslíkových radikálů, kterou TNF- α indukuje. Dále je znám jeho silný katabolický účinek zodpovědný za nádorovou kachexii. Inhibuje lipoproteinové lipázy, potlačuje diferenciaci adipocytů a má silné angiogenní účinky. Přisuzuje se mu role v patogenezi roztroušené sklerózy a některých autoimunitních onemocněních, ale také v patogenezi ischemicko-reperfučního poškození, endotoxemie, aterosklerózy, myokarditidy a srdečního selhání, a uplatňuje se zřejmě i při odmítnutí transplantovaných organů (Klener a kol., 1997).

Je produkován řadou buněk, např. lymfocyty, neutrofilů, fibroblasty, hladkými svalovými buňkami, v menší míře i endotelovými buňkami a buňkami různých nádorů. V průběhu ischemicko-reperfučního procesu jsou jeho hlavním zdrojem aktivované neutrofilů a makrofágy v ložisku ischemie (Dawn a kol., 2004).

Účinky TNF- α závisí na aktivitě jeho receptorů, jejichž dva typy jsou známy. Teprve vazbou TNF- α na tyto receptory dochází k výslednému účinku spočívajícímu např. v indukci apoptózy, cytotoxickému působení a řadě dalších (Bajaj a kol., 2006). Část těchto receptorů je vázána na buněčné membrány buněk imunitního systému a tkání, další část volně cirkuluje. Bylo prokázáno, že se molekuly těchto receptorů mohou stát za určitých podmínek rezervoárem TNF- α , neboť vazba cirkulujícího receptoru pro TNF- α na vlastní molekulu TNF- α má „neutralizující účinek“ (Monden a kol., 2007).

4.2.1. Membránové receptory pro TNF- α

TNF- α zprostředkovává své účinky přes dva typy membránových receptorů: TNF-R1 a TNF-R2. Oba receptory vlastní extracelulární doménu, která obsahuje 4 tandemově se opakující na cystein bohaté motivy. Každý z receptorů spouští jiné signální dráhy (viz obrázek č. 3). TNF-R1 aktivuje proces apoptózy a TNF-R2 spouští dráhy vedoucí k translokaci transkripčního faktoru NF κ B do buněčného jádra (Meldrum, 1998).



Obr. č. 3: Receptory pro TNF- α : TNF-R1 aktivuje apoptické signální dráhy, zatímco TNF-R2 spouští signální dráhy aktivující translokaci transkripčního faktoru NF κ B do jádra buňky (převzato z Meldrum, 1998).

4.2.2. Aktivace TNFR1: spuštění apoptických signálních drah

TNF- α indukuje apoptózu v mnoha buněčných typech včetně buněk myokardu. Na počátku signální dráhy vedoucí k apoptóze se TNF- α naváže na TNF-R1 nebo FAS. Oba tyto receptory patří do rodiny TNF receptorů, jsou to povrchové receptory a souhrnně je

nazýváme „*death*“ receptory. Tyto transmembránové receptory nesou na své cytosolické části tzv. „*death*“ doménu. Tato doména je součástí jejich cytosolických podjednotek; u TNF-R1 to je TNF- α asociovaná „*death*“ doména TRADD a u FAS to je FAS asociovaná „*death*“ doména FADD. Interakci mezi těmito dvěma doménami zprostředkovává receptor interagující s proteiny RIP. Součástí RIP je kinázová doména, která aktivuje cysteinové proteázy – kaspázy. Signální dráha kaspáz vede ke stimulaci endonukleázy, které v následujícím kroku ničí jadernou DNA. Jen při trimerizaci tohoto receptoru je možné, aby TNF-R1 aktivovalo signální dráhu vedoucí k translokaci NF κ B do buněčného jádra (Meldrum, 1998).

4.2.3. Aktivace TNF-R2: signální dráha vedoucí k translokaci NF κ B do jader buněk

Součástí TNF-R2 je cytoplazmatický receptor asociovaný s faktory TRAFs, který se aktivuje při navázání TNF- α . Biologická funkce TRAFs zatím není zcela známa, ale ví se, že obsahuje dva proteinové motivy, které se označují „zinkový a kruhový prst“. Z nich se signál šíří a přenáší na MAP kinázy, které fosforylují inhibiční proteiny I κ B, které se následně uvolňují z vazby s NF κ B (Meldrum, 1998).

4.3. TNF- α v srdci

4.3.1. Buňky produkující TNF- α v srdeční tkáni

Ve zdravém srdci je koncentrace TNF- α nízká. TNF- α je hlavně lokalizováno v cévních endoteliálních buňkách, makrofázích a žírných buňkách. Tento typ produkce TNF- α myokardem je označován jako bazální a slouží pravděpodobně k udržování homeostáze. Bylo prokázáno, že TNF- α má v nízkých koncentracích ochranné účinky proti hypoxickému poškození (Maekawa a kol. 2000).

Hypoxie zvyšuje produkci ROS a tím se také zvyšuje produkce TNF- α . Za tuto expresi zodpovídají hlavně kardiomyocyty (Schulz, 2008).

4.3.2. Duální efekt TNF- α

Buněčné efekty TNF- α jsou velmi pleiotropní. V nízkých koncentracích má tento cytokin efekt na parakrinní a autokrinní regulaci leukocytů a endoteliálních buněk, protože je důležitý regulátor zánětlivých procesů (Feldman a kol., 2000). Pfeffer a kol. (1993) experimentálně zjistili u myši s chybějícím genem pro receptor p55 TNF- α vyšší citlivost na bakteriální infekce. TNF- α zvyšuje chemotaxi, fagocytózu a cytotoxickou aktivitu makrofágů a neutrofilů, dále podporuje leukostázi indukcí zvýšené exprese vnitrobuněčných adhézních molekul ICAMS a endoteliální leukocytárních adhézních molekul ELAMS (Djeu a kol., 1988). Ve vyšších koncentracích TNF- α převyšuje počet receptorů TNFR1 a TNFR2, TNF- α se tedy nachází volně v cirkulaci. Jednou uvolněný TNF- α způsobuje mikrovaskulární koagulaci, hypotenzi a horečku (Kwak a kol., 1995). Přispívá také k remodelaci až destrukci tkáně tím, že stimuluje proliferaci fibroblastů a mezenchymálních buněk a indukuje syntézu ostatních růstových faktorů. Jelikož přímo ovlivňuje cytotoxicitu endoteliálních buněk, může indukovat syntézu kolagenu, proteáz, ROS a spouštět metabolismus kyseliny arachidonové (Tracey a Cerami, 1989). V normálních hladinách TNF- α jsou tyto cytotoxické vlastnosti důležité proti bakteriální infekci a nádorovému bujení, pro modulaci buněčného růstu a diferenciaci buněk (Feldman a kol., 2000).

Srdeční choroby jako myokarditida zvyšují hladiny prozánětlivých cytokinů, včetně TNF- α , který je spojen se zhoršením funkce levé komory a snížením arteriálního tlaku (Duran, 2008). TNF- α aktivuje metaloproteinázy a inhibuje expresi inhibitorů metaloproteináz, což může mít za následek remodelace extracelulárního matrix (Li a kol., 1999). Jeho ionotropní účinek je spojen se schopností indukovat NO syntázy. Protilátky proti TNF- α podané před ischemicko-reperfuzním poškozením přispěly ke zlepšení koronární vasodilatace způsobenou NO, redukovali tvorbu superoxidu inhibicí aktivity NADPH oxidázy a xantin oxidázy (Yokoyama a kol., 1993). Dále navozuje hypertrofii kardiomyocytů, což je následek adaptivní odpovědi na hemodynamický a oxidační stres (Yokoyama a kol., 1996).

4.3.3. Molekulární mechanismus produkce TNF- α během hypoxie

Transkripční faktor NF κ B je zodpovědný za spuštění produkce TNF- α . Za normálních podmínek je NF κ B vázán na dva inhibiční proteiny I κ B, které znemožňují jeho translokaci do jádra. I κ B mohou být fosforylovány např. kinázou p38 MAPK, která se může aktivovat působením oxidačního stresu. Z komplexu NF κ B-I κ B se uvolňuje I κ B a aktivovaný NF κ B se může transportovat do jádra, kde se naváže na jedno ze čtyř vazebných míst v promotoru genu pro TNF- α . Aby došlo k transkripci, musí se navázat nejméně dvě molekuly NF κ B (Kimura a kol., 2006). K vytvoření TNF- α a k jeho následnému uvolnění do extracelulárního prostoru je nutná aktivace TACE („TNF- α converting enzyme“), který je řazen do skupiny metaloproteináz (Sack, 2002).

4.3.4. Vliv TNF- α na ischemicko-reperfuzní poškození

V průběhu ischemie dochází ke zvýšené produkci TNF- α . Intenzita produkce TNF- α je přímo úměrná třem faktorům: závažnosti ischemie, velikosti ložiska a přítomnosti srdečního selhání. TNF- α je jedním z faktorů, které se podílejí na tom, zda myocyty přežijí nebo odumřou. Kromě toho spouští další buněčné zánětlivé odpovědi a funguje jako chemoreaktant pro neutrofilů (Durán, 2008).

TNF- α se váže na receptory endotheliálních buněk v cévách, čímž aktivuje expresi leukocytárních adhezních molekul LAM a translokaci NF κ B do buněčného jádra, což vede

k produkci intracelulárních adhezních molekul ICAM-1 a E-selektinu. Jde o esenciální molekuly, které přímo zprostředkovávají interakce aktivovaných neutrofilů, trombocytů, endotelu a ischemizovaných myocytů (Eddy a kol., 1992). Pro tento proces je nezbytná interakce povrchové struktury CD11/CD18 (povrchové molekuly leukocytů) na povrchu aktivovaného neutrofilu s adhezivními molekulami ostatních zúčastněných buněk (endotelu, trombocytů a myocytů) (Kimura a kol., 2006). Zatímco některé adhezivní molekuly jsou v určitém množství konstitutivně exprimovány na buněčných strukturách srdce (ICAM-1, ICAM-2, CD31, CD73, VAP1), jiné (např. E-selektin) nikoliv. Bylo prokázáno, že exprese těchto molekul je rovnoměrná v myokardu síní i komor (Das, 2000). Akumulace aktivovaných neutrofilů v ischemií postižené tkáni a jejich interakce s myocyty, ostatními buňkami a složkami mezibuněčné hmoty, vede k produkci ROS, derivátů kyseliny arachidonové a proteolytických enzymů, které dále prohlubují poškození myokardu (Gu a kol. 2006).

Zvýšená koncentrace TNF- α v myokardu ovlivňuje hemodynamické parametry tím, že snižuje kontraktilní funkce srdečního svalu, redukuje ejekční frakci, snižuje odpor cév, způsobuje hypotenzi a dilataci komor. TNF- α navozuje v myokardu také apoptózu kardiomyocytů a indukci dalších srdečních depresorů jako jsou cytokiny IL-1, IL-2 a IL-6 (Kurrelmeier a kol. 2000). Podání inhibitoru pro TNF- α (např: Etanerecept) redukuje postischemickou zánětlivou reakci, která přispívá k poškození a následné nepříznivé remodelaci srdce (Durán, 2008).

4.3.5. TNF- α v ischemické odolnosti srdce

Určitým ovlivněním úlohy TNF- α v srdci lze vyvolat kardioprotektivní účinky. Např. při inhibici TNF-R1 po třicetiminutové koronární okluzi a následné 24-hodinové reperfúzi dochází ke zmenšení velikosti infarktu. Naopak aktivace TNF-R1 zvyšuje kontraktilní dysfunkci, zhoršuje obnovu remodelace srdce po infarktu a má dopad na ireverzibilní poškození buněk během ischemicko-reperfúzního děje. Účinky aktivace TNFR2 nejsou ještě zcela objasněny (Schulz, 2008).

Klasický ischemický preconditioning (IPC) zmenšuje velikost infarktu myokardu, zmírňuje kontraktilní dysfunkci a také snižuje zvýšenou produkci TNF- α vyvolanou ischemií (Belosjorow a kol., 2003). Produkce TNF- α během IP má kardioprotektivní

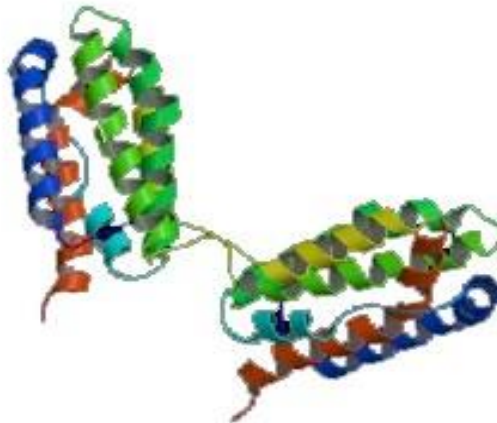
účinky, protože udržuje správný metabolismus vápníku a brání otevírání pórů v mitochondriální membráně (Lecour a kol., 2005). Akumulace endogenního TNF- α během 6-ti hodin po koronární mikroembolizaci redukuje velikost infarktu myokardu, jeho protekce může být zrušena protilátkami proti TNF- α . Kardioprotektivní účinek IPC vymizí pokud před ním podáváme protilátky proti TNF- α (Skyschally a kol., 2007).

5. Interleukiny

Interleukiny jsou heterogenní skupina cytokinů regulujících hlavně rozličné aspekty vývoje a aktivace leukocytů.

5.1. IL-10

IL-10 je nekovalentní homodimer. Jedna jeho podjednotka obsahuje 178 aminokyselin, skládá se z α -helikálních úseků. Jeho struktura je podobná interferonům a hemopoetickým cytokinům. Jeho velikost se pohybuje mezi 17 a 18 kDa. Gen pro IL-10 se nachází na chromosomu 1 (Moore a kol., 2001). Trojrozměrná struktura tohoto cytokinu je vyobrazena na obrázku č. 4 (Jones a kol., 2002).



Obr. č. 4: Struktura IL-10 (převzato z Jones a kol., 2002).

IL-10 byl poprvé popsán v roce 1989 jako „*cytokine synthesis inhibitory factor*“ (CSIF), který byl produkován myšimi Th2 buňkami a jehož funkcí bylo inhibovat produkci cytokinů Th1 buňkami. Dále byla objevena jeho schopnost inhibovat široké spektrum funkcí makrofágů, syntézu monokinů, produkci NO a expresi MHC proteinů třídy II a kostimulačních molekul jako je IL-12 a CD80/CD86 (Kaur a kol., 2009).

V monocytech, makrofázích a dendritických buňkách IL-10 inhibuje především produkci IL-1 a TNF- α . Tyto dva cytokiny jsou zodpovědné za zánětlivou odpověď a procesy, které tento zánět dále rozvíjejí indukcí sekundárních mediatorů jako jsou

chemokiny, prostaglandiny a PAF (Giachini a kol., 2009). IL-10 inhibuje produkci prostaglandinu E2 (PGE2) snížením exprese cyklooxygenasy 2 (COX-2). Tento efekt má vliv i na produkci matrixové metaloproteinázy TIMP-1, která je regulována cestou PGE-cAMP. Je snížena i produkce gelatinasy a kolagenasy (MMP2/MMP9) (Moore a kol., 2001). Dále IL-10 potlačuje expresi transdukčního receptoru pro lipopolysacharidy TLR4. Omezuje indukci Th1 buněk a tím potlačuje zánětlivé procesy vyvolané dendritickými buňkami (Mosser a Zhang, 2008). Podporuje diferenciaci plazmocytů na β -buňky, dále pak produkci protilátek β -buňkami. IL-10 je silný inhibitor produkce a proliferace CD4+ T-buněk a naopak stimuluje CD8+ T-buňky (Moore a kol., 2001).

Detekce virového IL-10 ukazuje na přítomnost Epstein-Barr viru. Dále se IL-10 uplatňuje protizánětlivými účinky v odpovědi na bakteriální a jiné infekce. Zvýšená koncentrace IL-10 v séru je označována jako negativní prognostický faktor přežití nebo odpovědi na léčbu v Hodgkinsonově lymfomu. Detekovatelný IL-10 v séru je popisován jako negativní indikátor klinického výsledku na hepatocelulární karcinom, plicní nádor, ledvinový karcinom, kolaterální karcinom a na další závažné tumory. Zvýšená exprese IL-10 u příjemce zlepšuje přijetí orgánu po transplantaci, má tedy imunosupresivní účinky (Moore a kol., 2001).

IL-10 může být exprimován různými buňkami; většinou jde o reakci na nějaký aktivační stimul. Jsou to především Th2 buňky, monocyty a žírné buňky. Během hypoxie se stávají hlavním zdrojem v srdci kardiomyocyty (Mooser a Zhang, 2008).

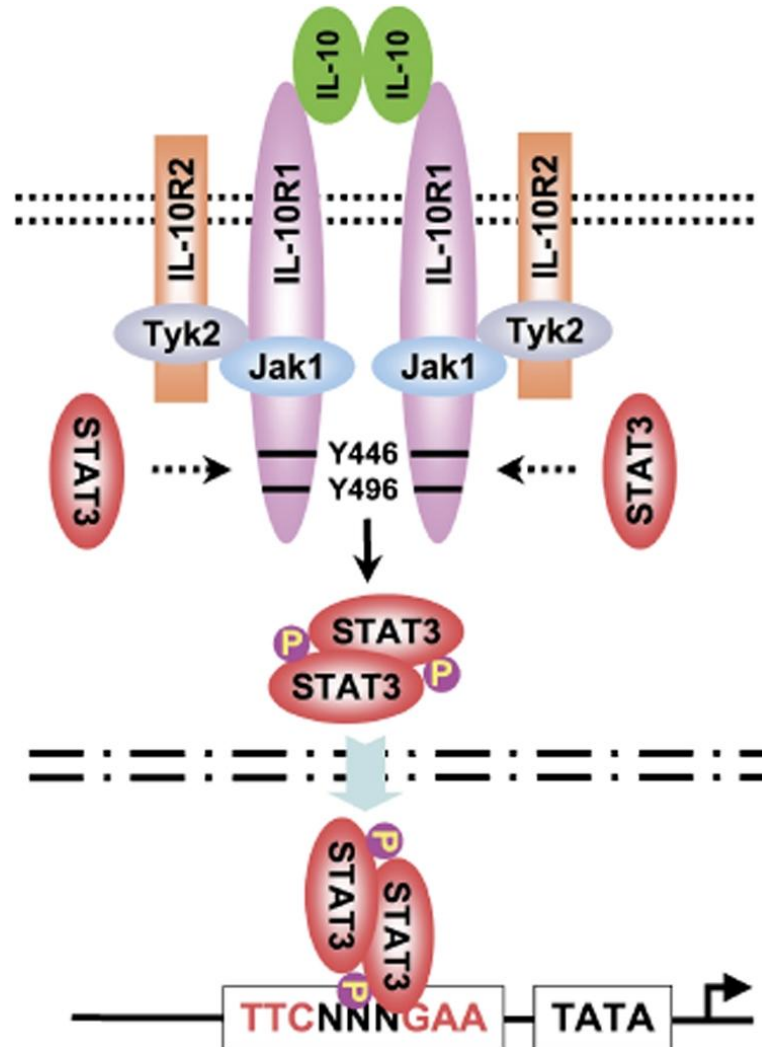
5.1.2. Membránové receptory pro IL-10

Účinky IL-10 závisí na aktivitě jeho receptorů, jejichž dva typy jsou známy. Teprve vazbou IL-10 na tyto receptory dochází k výslednému účinku spočívajícímu např. v potlačení aktivace makrofágů, produkce monokinů a dalších protizánětlivých dějů. Tyto receptory patří do rodiny cytokinových receptorů typu II. IL-10R1 se nachází na hemopoetických buňkách v počtu několik stovek na buňku (Moore a kol., 2001). Byl objeven i na dalších buňkách, které ho exprimují na základě určitého podnětu, např. fibroblasty indukované LPS, epidermální buňky a keranocyty indukované glukokortikoidy a také kardiomyocyty indukované oxidačním stresem. IL-10R2 je konstitutivně exprimován téměř všemi buňkami a tkáněmi. Nejsou žádné známky, že by se nacházel

na buňkách imunitního systému. Není znám žádný aktivační stimul pro zvýšenou expresi tohoto receptoru (Finbloom a Winestock, 1995).

Přenos signálu přes IL-10 receptory (IL10R) využívá Jak/stat systému.

..



Obr. č. 5: IL-10R s navázanými kinázy Jak1 a Tyk2 (převzato z Mooser a Zhang, 2008).

S IL-10R jsou asociovány Jak1 a Tyk2 patřící do rodiny tyrosinových kináz Jak (viz Obr. č. 5). Navázáním IL-10 na receptor se indukuje fosforylace tyrosinových zbytků skrytých transkripčních faktorů stat3, stat1 a stat5 (kromě makrofágů) a tím se aktivují. Inhibice proliferace makrofágů a produkce monokinů prostřednictvím IL-10 jsou řízeny dvěma různými signálními dráhami, vyžadujícími různé formy stat3. Význam stat1 a stat5 v přenosu signálu není zatím znám (Mooser a Zhang, 2008).

IL-10 má také malý vliv na neutrofilů, kde se indukuje exprese Fc receptoru Fc γ RI, který dále vyvolává aktivaci stat1 a stat3 (Kaur a kol., 2009). Rychle indukuje transkripci supresorů cytokinové syntézy SOCS3, který v některých buňkách reguluje gen pro stat3. Nedávná data ukázala, že IL-10 indukuje hemoxygenázu (HO-1), proteiny tepelného stresu (HSP) a hraje základní roli v udržení homeostáze během zánětu (Mooser a Zhang, 2008).

Výsledkem navázání IL-10 na receptor může také být fosforylace ERK1/2, kdy se zároveň snižuje exprese p38 MAPK. Výsledkem fosforylace ERK1/2 jsou 1) blokáce translokace NF κ B prostřednictvím potlačení aktivity IKK (I κ B kinasa), tedy zamezení rozpadu I κ B a 2) inhibice vazebného místa na DNA pro NF κ B přítomností IL-10 v jádře, který zmenšuje jadernou hladinu I κ B. IL-10 indukuje translokaci p50 do jádra a tím je zamezena translokace klasického dimeru p65/p50, který spouští gen pro syntézu prozánětlivých mediátorů jako TNF- α , IL-1 a IL-6 (Dhingra a kol., 2008).

IL-10 indukuje expresi Bcl-2 v CD34+ progenitorech a β -buňkách v germinálním stádiu. V lidských β -buňkách také aktivuje expresi c-Fos (Moore a kol., 2001).

5.2. IL-10 v srdci

5.2.1. Buňky produkující IL-10 v srdeční tkáni

Ve zdravém srdci je koncentrace IL-10 nízká. IL-10 je hlavně lokalizován v buňkách imunitního systému (Th2 buňky, monocyty, makrofágy), dále pak v endoteliích a ve svalových buňkách. Tento typ produkce IL-10 v myokardu je označován jako bazální a slouží pravděpodobně k udržování homeostáze (Kaur a kol., 2009).

Během hypoxie dochází ke zvýšené produkci IL-10. Hlavním zdrojem se stávají kardiomyocyty (Li a kol., 2010).

5.2.3. Molekulární mechanismus produkce IL-10 během hypoxie

IL-10 promoter obsahuje několik míst pro transkripční faktory zodpovědné za spuštění různých elementů. Transkripce IL-10 je regulována transkripčními faktory Sp1 a Sp3, které jsou konstitutivně exprimovány různými druhy buněk (Moore a kol., 2001).

Během hypoxie jsou stimulovány kardiomyocyty k produkci IL-10 díky zvýšené produkci endogenních a exogenních faktorů jako je TNF- α a ROS (Li a kol., 2010).

5.2.4. Vliv IL-10 na ischemicko-reperfuzní poškození

Během ischemie dochází ke zvýšené produkci IL-10. Intenzita produkce IL-10 je přímo úměrná třem faktorům: závažnosti ischemie, velikosti ložiska a přítomnosti srdečního selhání. IL-10 je hlavním zástupce protizánětlivých cytokinů, které se podílejí na ochranných mechanismech proti oxidačnímu stresu a zvyšují tak pravděpodobnost přežití myocytů (Kaur a kol., 2006).

IL-10 potlačuje zánět a zmenšuje remodelaci (dilataci a fibrózu) levé komory po srdečním infarktu prostřednictvím aktivace stat3 a inhibice proteinu HuR stabilizujícího mRNA pro cytokiny (Krishnamurthy a kol., 2009). Potkani léčení IL-10 měli zlepšenou funkci levé komory, sníženou velikost infarktu a menší zeslabení stěny komory (Kaur a kol., 2006). Infarkt myokardu indukuje zvýšenou expresi a aktivitu matrixové metaloproteinázy MMP9, která souvisí se zvýšenou fibrózou a poškozuje extracelulární matrix. IL-10 tyto dva negativní děje omezuje, dále zvyšuje kapilární densitu v postižené části myokardu a zvyšuje fosforylaci stat3. Zprostředkovává zvýšenou produkci tkáňového inhibitoru metaloproteináz TIMP-1 (Mooser a Zhang, 2008).

Potkani léčení rekombinantním lidským IL-10 (rhIL-10) lépe přežívali experimentálně vyvolané srdeční selhání. rhIL-10 je biologicky aktivnější než IL-10, potlačuje proliferaci a syntézu prozánětlivých cytokinů Th1 buňkami. Byly potlačeny především hladiny TNF- α a IL-2, dále pak metaloproteinázy. Naopak byly stimulovány inhibitory metaloproteináz v makrofázích, čímž byla posílena prevence proti degradaci matrix (Lacraz a kol., 1995).

6. Interakce TNF- α a IL-10

TNF- α a IL-10 jsou klíčovými regulátory rovnováhy Th1 a Th2 buněk. Různé infekce, autoimunitní onemocnění, atopie a tumory tuto rovnováhu kriticky vychylují jedním nebo druhým směrem. Poměr IL-10/TNF- α vyjadřuje poměr protizánětlivé/zánětlivé odpovědi na určitý stimul. Tento poměr je ve zdravém srdci okolo 1. Pokud se tento poměr sníží, převažuje zánětlivá odpověď a potenciálně škodlivé účinky (apoptóza buněk, produkce dalších prozánětlivých cytokinů), které vyvolává TNF- α . Vyšší poměr také nepřináší žádné dodatečné ochranné mechanismy. Ideální je tedy, když se poměr těchto dvou cytokinů rovná jedné (Kaur a kol., 2006).

IL-10 se uplatňuje protizánětlivými účinky tím, že blokuje translokaci NF- κ B do jádra. Omezuje tedy produkci prozánětlivých cytokinů, především TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 a IL-8. Je také známo, že zabraňuje fibróze tkání a tím přispívá k hojení poškozeného myokardu. Zvyšuje přežití buněk potlačením fosforylace p38MAPK (Dhingra a kol., 2007).

IL-10 se tedy stává zajímavým kandidátem v léčbě srdečního selhání, protože během oxidačního stresu se poměr IL-10/TNF- α snižuje. Dalšími potenciálními léčivy jsou inhibitor IKK PS-1145, monoklonální protilátky proti TNF- α (např. infliximab) a inhibitor TNF- α etanercept (Kaur a kol., 2009).

TNF- α naopak zvyšuje fosforylaci p38MAPK a IKK. Oxidační stres indukuje tvorbu tohoto cytokinu, který může dále prohlubovat poškození myokardu, ale může se i podílet na indukci protektivních mechanismů (Kaur a kol., 2006). TNF- α tedy hraje, podobně jako ROS, dvojí úlohu v ischemicko-reperfuzním poškození a výsledný účinek závisí na celé řadě faktorů.

7. Oxid dusnatý

NO je nestabilní radikál, který existuje přednostně v plynné formě. Je endogenně produkován v téměř všech savčích tkáních. Hraje celou řadu důležitých biologických úloh, zejména v regulaci hemodynamiky, v zánětu a v nervovém přenosu (Giordano, 2005).

NO je v savčích tkáních syntetizován z L-argininu a molekulárního kyslíku za vzniku L-citrulinu. Reakce je katalyzována komplexním enzymem, zvaným NO syntáza. Existují tři jeho isoformy: neuronální NO syntáza (nNOS); indukibilní NO syntáza (iNOS) a endoteliální NO syntáza (eNOS). Pro všechny tři isoformy NO syntáz je charakteristické, že 1) obsahují v aktivním centru hem, 2) jsou aktivní jako homodimery, 3) jsou stereospecifické (D-arginin není substrátem) a 4) jako kofaktory vyžadují NADPH, 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, FAD, FMN a kalmodulin. iNOS je za normálních podmínek inaktivní a produkuje (relativně neregulovaně) vysoká množství NO pouze po aktivaci imunitního systému. Pro regulaci cévního tonu je důležitá eNOS, která je trvale exprimována. Ta tvoří poměrně menší množství NO, které je však přesně regulováno, zejména intracelulární koncentrací Ca^{2+} (Umar a van der Laarse, 2010).

NO stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklasy, a tím reguluje syntézu cyklického guanosin-monofosfátu (cGMP), který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependenční proteinkinázy vazodilataci. V imunitním systému se účastní nespecifické obrany organismu hlavně proti prvokům, některým bakteriím, virům a nádorům, zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu (Förstermann, 2010). Také indukuje tvorbu interferonu γ , který působí antivirově. V kardiovaskulárním systému se oxid dusnatý podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku, inhibuje adhezi i agregaci trombocytů, tlumí aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek (Bátkai a kol., 2007).

Během hypoxie se zvyšuje koncentrace NO, který reaguje se superoxidem (O_2^-) za vzniku toxického peroxinitritu (OONO^-). Za fyziologického pH existuje OONO^- v protonované formě jako kyselina peroxydusitá, která se rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý. Vzniká tzv. nitrační stres. Toxicita peroxinitritu pramení z oxidace SH skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a z peroxidace lipidů. Může indukovat poškození DNA a apoptózu (Giordano, 2005).

TNF- α i IL-10 ovlivňují tvorbu NO. TNF- α aktivuje iNOS během hypoxie hlavně v kardiomyocytech, dále pak v makrofázích a v endoteliálních buňkách (Wang a Wang, 2007). IL-10 naopak potlačuje expresi mRNA iNOS v těchto buňkách. Nitrotyrosin slouží

jako ukazatel poškození buněk produkty metabolismu oxidu dusnatého (Guilliams a kol., 2009).

8. Cíl práce

Byly stanoveny následující dílčí cíle této diplomové práce:

1. Na základě studia dostupné literatury shromáždit informace o úloze TNF- α a IL-10 v ischemicko-reperfuzním poškození srdce.
2. Zavést metodu ELISA pro měření koncentrace TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu v srdeční tkáni.
3. Porovnat bazální koncentrace TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu v myokardu pravé a levé komory a septa normoxických a chronicky hypoxických potkanů.
4. Stanovit vliv krátkodobé periodické reoxygenace na změny koncentrace a distribuce TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu vyvolané chronickou hypoxií.

9. Materiál a metody

9.1. Pokusná zvířata

Pro pokusy byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar z chovu Velaz, s.r.o. v rozmezí hmotností 250-350 g. Všechna zvířata byla během adaptační i pokusné fáze krmena *ad libitum* standardní laboratorní dietou ST1 (Bergman, Mlýn Kocanda) a měla volný přístup k vodě.

9.1.1. Experimentální skupiny

Skupina č. 1: Kontrola (N)

Všichni laboratorní potkani z této skupiny byli chováni po celou adaptační dobu v normoxických podmínkách (tj. po dobu tří týdnů). Potkani byli usmrceni cervitální dislokací provedenou konzultantem. Srdce bylo rychle vystřiženo z hrudníku a ponořeno do ledového fyziologického roztoku. Dále bylo srdce propláchnuto přes aortu ledovým fyziologickým roztokem, aby se zbavilo krve. Byla odstřižena volná stěna pravé komory, volná stěna levé komory a septum. Vzorky byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -70°C v mrazicím boxu.

Skupina č. 2 a 3: Vystavení hypoxii (10% O₂) po dobu tří dnů (3D) a tří týdnů (3T)

Zvířata byla tři dny, respektive tři týdny, vystavena hypoxickým podmínkám (10% O₂) v normobarické komoře. Tento stupeň hypoxie odpovídá nadmořské výšce 5500 m. Na konci experimentu byli potkani usmrceni a dále byly odebrány vzorky srdce stejně jako u skupiny č.1.

Skupina č. 4: Vystavení hypoxii (10% O₂) po dobu tří týdnů s denní jednohodinovou reoxygenací (3T+R)

Zvířata byla tři týdny vystavena hypoxickým podmínkám (10% O₂) v normobarické komoře. Každý den byla přenesena z komory na jednu hodinu do normoxie. Na konci experimentu byli potkani usmrceni a dále byly odebrány vzorky srdce stejně jako u skupiny č.1.

9.2. Použité chemikálie

Izolace proteinů:

tablety PBS - *Gibco (UK)*

t-oktylfluoxypolyetoxyethanol (TRITON X-100) - *Serva (Německo)*

Měření koncentrace proteinů podle Bradforda:

destilovaná voda (H₂O) - *laboratoř AVČR*

Bradfordův roztok - *Sigma (USA)*

standardy BSA – *Biorad (Německo)*

ELISA Kit – Bender MedSystems (Rakousko):

Destička o 96 jamkách, které jsou pokryty monoklonálními protilátkami pro potkaní TNF- α , respektive IL-10 („*Rat TNF- α (IL-10) Microplate*“)

Biotin-konjugát („*Biotin-Conjugate*“) - polyklonální protilátky proti potkaní TNF- α , respektive IL-10

Streptavidin HRP („*Streptavidin HRP*“) - křenová peroxidáza

TNF- α , respektive IL-10, standard („*TNF- α (IL-10) Standard*“)

Substrátové rozpouštědlo („*Sample Diluent*“)

Koncentrát stanovovacího pufru („*Assay Buffer Concentrate*“)

Koncentrát promývacího pufru („*Wash Buffer Concentrate*“)

Substrátový roztok („*Substrate Solution*“) - TMB

Inhibiční roztok („*Stop Solution*“) – roztok H₂SO₄

Krycí fólie („*Adhesive films*“)

ELISA Kit – Cayman (Česká Republika):

Destička o 96 jamkách, které jsou pokryty králičími protilátkami proti myšimu IgG („*Precoated (Mouse Anti-rabbit IgG) EIA 96-well strip plate*“)

Standardy („*Nitrotyrosine BSA*“)

Činidlo Ellman („*Ellman's reagent*“)

Koncentrát EIA pufru 10x („*EIA Buffer Concentrate*“)

Koncentrát promývacího pufru 400x („*Wash Buffer Concentrate*“)

Roztok značeného nitrotyrosinu enzymem („*Nitrotyrosine AChE Tracer*“)

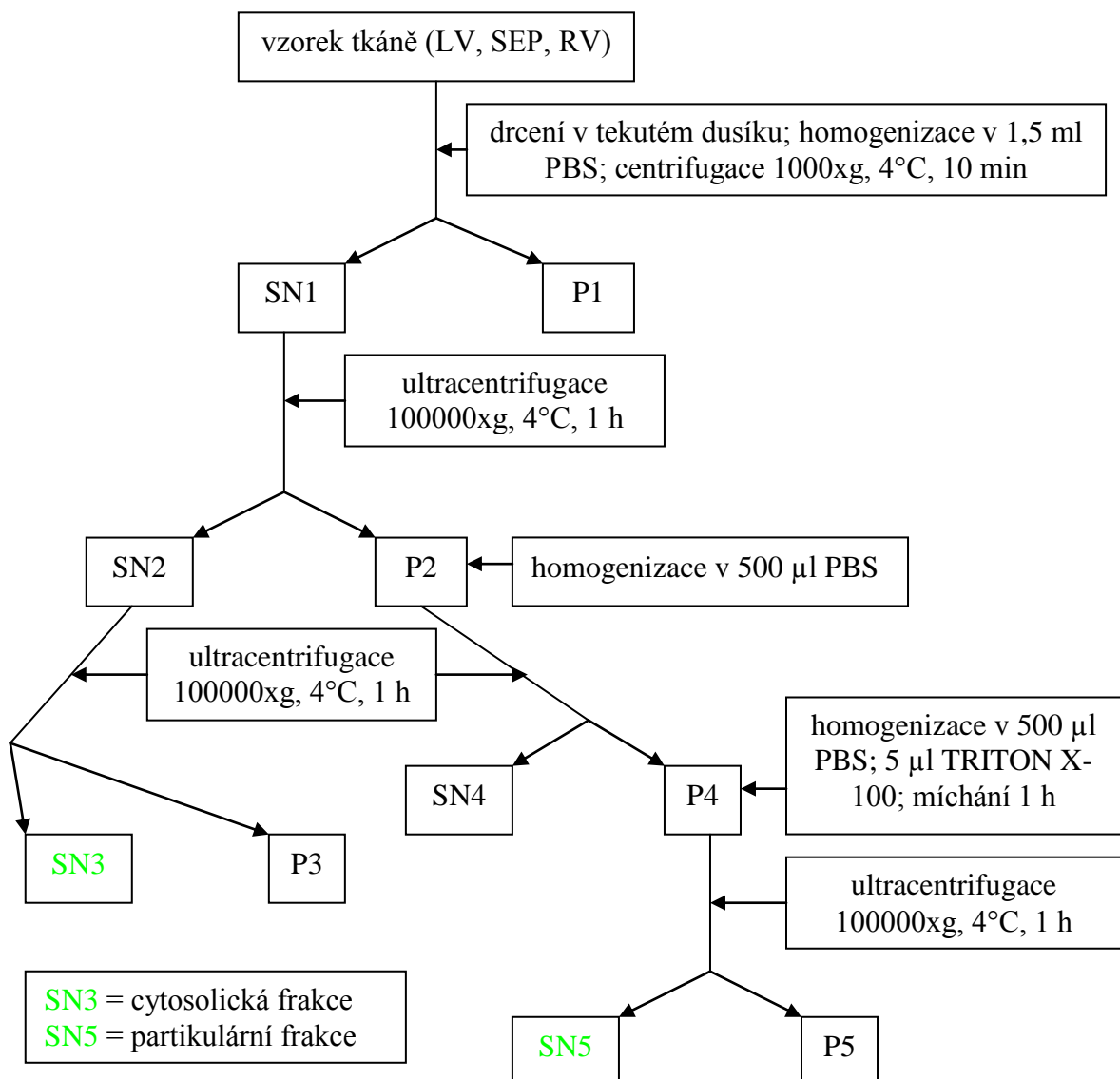
Antisérum EIA nitrotyrosinu („*Nitrotyrosine EIA Antiserum*“)

9.3. Použité metody

9.3.1. Izolace proteinů

Cílem izolace proteinů je separovat cytosolickou a partikulární frakci homogenátu a připravit vzorky pro požadovaná měření.

9.3.1.2. Postup izolace proteinů



Obr. č. 6: Postup při izolaci proteinů. SN označuje supernatant a P označuje pelet.

Na *obrázku č. 6* (str. 45) je znázorněno pracovní schéma při izolaci proteinů. Postup izolace proteinů byl tedy následný:

- 1) Vzorek tkáně levé komory, septa nebo pravé komory byl rozdrčen tloučkem v tekutém dusíku v třecí misce. Pak byl přesypán do Eppendorfovy zkumavky a rozpuštěn v 1,5 ml PBS.
- 2) Vzorek byl zhomogenizován 10-ti tahy v Potterově homogenizátoru a přelit do nové Eppendorfovy zkumavky.
- 3) Následně byl vzorek centrifugán při 1000xg a 4°C po dobu 10 minut.
- 4) Supernatant 1 byl odpipetován do nové zkumavky a stočen 1 hodinu na ultracentrifuze při 100000xg a 4°C.
- 5) Supernatant 2 byl odpipetován do nové zkumavky. Pelet 2 byl špachtlí uvolněn od stěny zkumavky a zhomogenizován 10-ti tahy v 500 µl PBS v Potterově homogenizátoru. Poté byl přepipetován do čisté zkumavky.
- 6) Supernatant 2 a pelet 2 byly stočeny 1 hodinu na ultracentrifuze při 100000xg a 4°C.
- 7) Supernatant 3 byl odsát pipetou do Eppendorfovy zkumavky a uložen do mrazáku do –70°C. Supernatant 3 představuje cytosolickou frakci. Supernatant 4 byl odsát do kádinky. Následně byl pelet 4 uvolněn špachtlí od stěny zkumavky a zhomogenizován 10-ti tahy v 500 µl PBS v Potterově homogenizátoru. Poté byl přelit do Eppendorfovy zkumavky, do které bylo přidáno 5 µl TRITON X-100. Tato zkumavka byla po dobu 1 hodiny každých pět minut míchána na vortexu.
- 8) Zhomogenizovaný pelet 4 byl stočen 1 hodinu na ultracentrifuze při 100000xg a 4°C.
- 9) Supernatant 5 byl odsát pipetou do Eppendorfovy zkumavky a uložen do mrazáku do –70°C. Supernatant 5 představuje partikulární frakci.

9.3.2. Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda

Bradfordova zkouška je spektroskopický kolorimetrický analytický postup, který slouží ke stanovení koncentrace proteinů v roztoku. Princip této metody je založen na změně absorbance v modrém barvivu („*Coomasie Brilliant Blue G-250*“), které se váže na arginin a hydrofóbní zbytky aminokyselin v proteinech. Barvivo obsahuje dvě složky: první, tvořenou aniontem, která se váže na protein, má modré zbarvení a dosahuje absorpčního maxima při 595 nm. Druhá složka tvoří kation, je zelená a červená a na protein se neváže. Pokles absorbance je úměrný množství navázané modři, a proto i množství proteinu přítomného ve vzorku.

9.3.2.1. Postup stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda

Bradfordův roztok se nechal ohřát na laboratorní teplotu. Do každé jamky mikrotitrační destičky se napipetovalo 10 μl standardu a nebo 1 μl vzorku s 9 μl destilované vody. Dále se do každé jamky napipetovalo 250 μl Bradfordova roztoku a celá destička se jemně protřepala, aby se obsah jamek dokonale promíchal. Vzorky se nechaly inkubovat 15 min. při laboratorní teplotě. Změřila se absorbance vzorků a standardů na přístroji Mikroplate Reader (Victor, Perkin Elmer, USA) při vlnové délce 595 nm a sestrojila se kalibrační křivka, podle jejíž rovnice spektrofotometr vypočítal na základě změřené absorbance koncentraci jednotlivých vzorků.

9.3.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

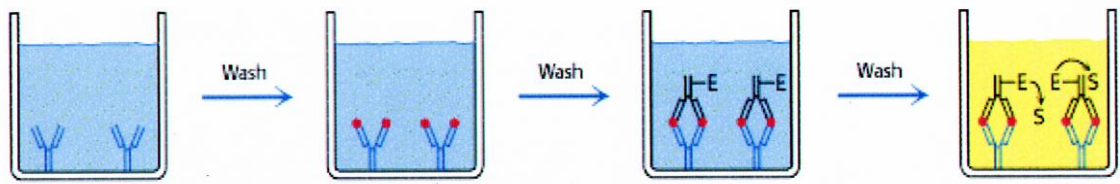
ELISA je imunologická metoda určená k detekci přítomnosti celé řady látek jako jsou například proteiny, hormony, toxiny nebo pesticidy. Podstatou této metody je použití protilátek, které se specificky vážou na detekovanou látku (antigen). Protilátka nebo antigen jsou však nejprve označeny pomocí enzymu. A právě tímto enzymem katalyzovaná reakce, při níž dojde ke změně barvy, slouží k důkazu přítomnosti daného antigenu.

9.3.3.1. Sandwich ELISA

Námi použitý typ ELISA testu se nazývá Sandwich ELISA. Tato metoda využívá dvě protilátky proti danému antigenu (v našem případě proti TNF- α nebo IL-10), které se na něj specificky naváží. Přitom je důležité, aby se obě protilátky navázaly prostorově proti sobě.

První, tzv. krycí protilátka („*coating, capture antibody*“), (Obr. č. 7, *krok 1*, str. 49) - se nejprve naváže na dno mikrotitrační destičky. Poté se do každé jamky přidá v odebraném vzorku dokazovaný antigen – (Obr. č. 7, *krok 2*, str. 49). Po určité době inkubace se antigen naváže na první protilátku.

Druhá tzv. detekční protilátka („*detection antibody*“) – je přidána až po vymytí zbytků vzorku a první protilátky. Na detekční protilátce je navázán enzym (nejčastěji křenová peroxidáza, HRP). Tato detekční protilátka se naváže prostorově proti první protilátce, takže je antigen mezi nimi a vznikne komplex protilátka-antigen-protilátka (odtud název Sandwich ELISA). V dalším kroku po vymytí zbytku nenavázané detekční protilátky se přidá chromogen („*substrate solution*“) TMB (tetramethylbenzidin/peroxid vodíku). TMB se účinkem peroxidu vodíku oxiduje na modře zbarvenou látku a tato reakce je katalyzována HRP. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství navázaného antigenu. Přidáním inhibičního roztoku („*stop solution*“) se barva změní na žlutou.



Obr. č. 7: Sandwich ELISA: První obrázek zobrazuje pokrytí destičky krycí protilátkou, druhý pak přidání antigenu. Třetí obrázek ukazuje tvorbu komplexu protilátka-antigen-protilátka. Detekční látka, která je prostorově navázaná proti krycí protilátce, má na svém konci navázaný enzym. Na posledním obrázku jsou společně zobrazeny reakce chromogenu s peroxidem vodíku katalyzovaná enzymem a inhibiční reakce (převzato z Berg a kol., 2002).

9.3.3.2. Postup metody ELISA pro měření koncentrace TNF- α a IL-10

Každá jamka v destičce se naplnila 300 μ l promývacího pufru a následně vyprázdnila. Tento postup se opakoval 2x. Do jamek určených pro standard se napipetovalo 100 μ l substrátového rozpouštědla a 100 μ l standardu. Do jamek pro vzorky bylo přidáno 50 μ l substrátového rozpouštědla a 50 μ l vzorku. Poté se pomocí multipipety přidalo 50 μ l biotin-konjugátu do všech jamek. Destička se ponechala 2 hod. inkubovat při laboratorní teplotě. Poté se jamky vyprázdnily a promývaly 300 μ l promývacího pufru v každé jamce. Promývání bylo prováděno celkem 4x. Do všech jamek bylo napipetováno 100 μ l streptavidnu HRP a následně se destička inkubovala 1 hod při laboratorní teplotě. Opět se jamky vyprázdnily a 4x promývaly 300 μ l promývacího pufru v každé jamce. Do všech jamek bylo přidáno 100 μ l substrátového roztoku. Destička se vložila na 30 min. do tmavé místnosti. Po vyndání destičky z tmavého místa se do všech jamek napipetovalo 100 μ l inhibičního roztoku. Dále se detekovala absorbance jednotlivých vzorků na přístroji Mikroplate Reader (Victor, Perkin Elmer, USA) při vlnových délkách 450 a 620 nm.

9.3.4. Kompetitivní ELISA

Kompetitivní postup stanovení se provádí s imobilizovaným antigenem, nebo s imobilizovanou protilátkou. Po imobilizaci protilátky a vykrytí volných míst na nosiči některým z blokovacích proteinů se přidá roztok vzorku s přimíchanými značenými antigeny. Pokud je vzorek na stanovovaný antigen negativní, značený antigen se naváže na všechny imobilizované protilátky. V případě vzorku obsahující antigen dochází ke

kompetici mezi antigeny ze vzorku a současně přidanými značenými. Protože předpokládáme, že značení nevyvolá změnu ve vazebných schopnostech, je uskutečnění vazby se značeným antigenem závislé pouze na jeho koncentraci. V rovnovážné směsi jsou obsaženy volně a na imobilizovaných protilátkách (Ab) vázaný antigeny (Ag), značený antigen (Ag*). Imobilizovaného prvku je omezené množství a volného a značeného je dostatečný přebytek, aby se dalo předpokládat, že na všech vazebných místech imobilizovaného prvku se navázal jeho protějšek.

Po promytí od nenavázaných reaktantů a přidání substrátu dojde k enzymatické reakci, při které vzniká barevný produkt, jehož koncentrace je nepřímo úměrná koncentraci antigenu v roztoku vzorku. Koncentrace barevného produktu se obvykle vyjadřuje jako absorbance. Negativní vzorek má tedy větší intenzitu zabarvení a tím i větší absorbanci. Tento formát je zvláště vhodný pro malé molekuly, které nemají více než jedno vazebné místo, čímž k jejich detekci nelze použít sendvičový formát.

Pro výpočet koncentrace neznámého vzorku je třeba nejdříve proměřit kalibrační závislost. Kalibrační závislost se získá změřením absorbancí řady standardních roztoků. Vynášením hodnot absorbance proti hodnotám koncentrace v logaritmickém měřítku se získá sigmoidní standardní (kalibrační) křivka. Křivka je transformací souřadnic na ose x částečně linearizovaná. Na křivce lze nalézt lineární část, jejímuž definičnímu oboru odpovídá interval mezi c_{\min} a c_{\max} zvaný pracovní rozsah metody.

9.3.4.1. Postup metody ELISA pro měření koncentrace nitrotyrosinu

Uspořádání destičky je znázorněno na *obrázku č. 8*.

	1	2	3	4
A	Blk	S1	S1	1
B	Blk	S2	S2	2
C	NSB	S3	S3	3
D	NSB	S4	S4	4
E	B ₀	S5	S5	5
F	B ₀	S6	S6	6
G	B ₀	S7	S7	7
H	TA	S8	S8	8

Obr. č. 8: Uspořádání destičky pro měření nitrotyrosinu metodou ELISA. Blk značí slepý vzorek, NSB značí nespecifickou vazbu, B₀ značí maximální vazbu, TA značí celkovou vazbu, S1-S8 značí standardy.

Do jamek NSB (nespecifická vazba) se napipetovalo 100 μ l pufru EIA. Do jamek B₀ (maximální vazba) se napipetovalo po 50 μ l pufru EIA. Do jamek pro standardy (S1-S8) se napipetovalo po 50 μ l příslušného standardu. Do jamek určených pro vzorky se napipetovalo 50 μ l příslušného vzorku. Do každé jamky kromě jamek Blk (slepý vzorek) a TA (celková vazba) se přidalo 50 μ l roztoku značeného nitrotyrosinu. Dále se do každé jamky kromě jamek Blk (slepý vzorek), TA (celková vazba) a NSB (nespecifická vazba) přidalo 50 μ l antiséra EIA nitrotyrosinu. Destička se nechala inkubovat přes noc v chladničce při 4°C. Další den se každá jamka v destičce naplnila 300 μ l promývacího pufru a následně vyprázdnila. Tento postup se opakoval 5x. Dále se do každé jamky napipetovalo 200 μ l činidla Ellman. Do jamek TA (celková vazba) se ještě přidalo 5 μ l roztoku značeného nitrotyrosinu. Měřila se absorbance v jamkách B₀ při 405 nm každé 2 min dokud nepřesáhla 0,6. Poté se celá destička změřila při 405 nm. Následně se vypočítaly koncentrace nitrotyrosinu ve vzorcích z naměřených hodnot absorbancí.

9.3.5. Statistické vyhodnocení

Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm střední chyba průměru (SEM). Statistické rozdíly mezi dvěma experimentálními skupinami s normálním rozložením dat byly hodnoceny t-testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na hladině $P < 0,05$. Výsledky byli graficky zpracovány v počítačovém programu GraphPad Prism verze č. 3.

10. Výsledky

10.1. Základní hodnocené parametry

Pro měření koncentrací TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu bylo použito celkem 50 potkanů. Jejich rozdělení do skupin ukazuje *tabulka č. 1*. Každé srdce bylo rozděleno na levou a pravou komoru a septum. Následně byl každý komorový oddíl zpracován na cytosolickou a partikulární frakci. Koncentrace TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu byly tedy měřeny celkem v 300 vzorcích.

Tab. č. 1: Počet odebraných srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

skupina	počet srdcí
N	18
3D	10
3T	10
3T+R	12

N - normoxie; 3D – 3 denní hypoxie; 3T – 3 týdenní hypoxie; 3T+R – 3 týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací.

Ve všech pokusech byla zaznamenávána tělesná hmotnost zvířat (BW) a hmotnost odebraných levých a pravých komor a septa srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Tyto parametry ukazuje *tabulka č. 2* (str. 54). Hmotnosti komorových oddílů a celého srdce vztažené na tělesnou hmotnost potkanů ukazuje *tabulka č. 3* (str. 54).

Tab. č. 2: Průměrná tělesná hmotnost (BW) pokusných zvířat. Průměrná hmotnost levých komor (LVW), sept (SEPW) a pravých komor (RVW) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Skupina	BW [g]	LVW [mg]	SEPW [mg]	RVW [mg]
N	329 ± 6	460 ± 19	218 ± 8	184 ± 7
3D	318 ± 9	440 ± 21	189 ± 10*	199 ± 9
3T	311 ± 8	452 ± 19	195 ± 9	253 ± 17*
3T+R	322 ± 4	419 ± 10	233 ± 8 [#]	271 ± 8*

N - normoxie; 3D – 3 denní hypoxie; 3T – 3 týdenní hypoxie; 3T+R – 3 týdenní hypoxie s jednododinovou denní reoxygenací.

*p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. normoxie

[#]p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Tab. č. 3: Hmotnosti levých komor (LVW/BW), sept (SEPW/BW) a pravých komor (RVW/BW) a celého srdce (HW/BW) vztažené na tělesnou hmotnost normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Skupina	LVW/BW	SEPW/BW	RVW/BW	HW/BW
N	1.39 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.56 ± 0.01	2.61 ± 0.06
3D	1.38 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.62 ± 0.02	2.60 ± 0.07
3T	1.45 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.81 ± 0.04*	2.89 ± 0.08*
3T+R	1.30 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.84 ± 0.02*	2.87 ± 0.07*

N - normoxie; 3D – 3 denní hypoxie; 3T – 3 týdenní hypoxie; 3T+R – 3 týdenní hypoxie s jednododinovou denní reoxygenací.

*p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. normoxie

[#]p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Hypoxie významně neovlivnila tělesnou hmotnost zvířat. Ve skupinách 3T a 3T+R došlo k signifikantnímu nárůstu hmotnosti pravé komory, poměr hmotnosti pravé komory k tělesné hmotnosti byl vyšší u skupin oproti normoxickým potkanům. Toto zvýšení se projevilo na relativní hmotnosti srdce u těchto skupin. Hmotnost levé komory nebyla chronickou hypoxií ovlivněna.

10.2. Vliv hypoxie na expresi TNF- α v srdcích pokusných zvířat

V tabulce č. 4 jsou shrnuty hodnoty koncentrací TNF- α v cytosolické a partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Obrázek č. 9 (str. 56) obsahuje tři grafy znázorňující poměr koncentrací TNF- α v partikulární a cytosolické frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Tyto grafy jsou rozděleny podle komorových oddílů.

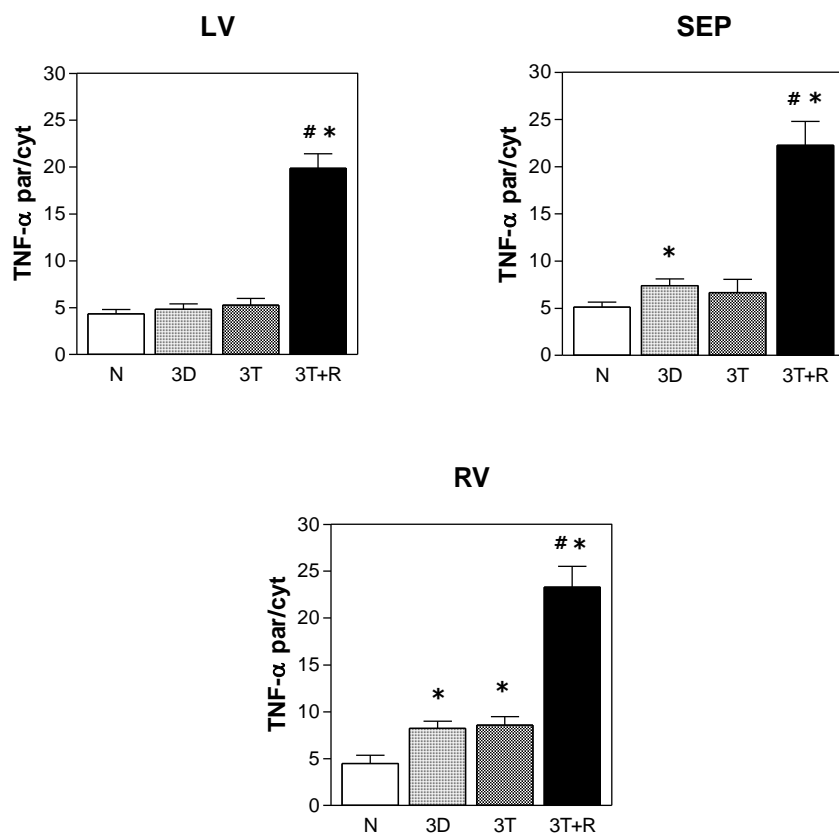
Tab. č. 4: Koncentrace TNF- α v cytosolické a partikulární frakci levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Koncentrace TNF- α [pg/mg]				
Komorový oddíl	N	3D	3T	3T+R
	Cytosolická frakce			
LV	513 \pm 42	477 \pm 44	594 \pm 54	175 \pm 14* [#]
SEP	356 \pm 50	288 \pm 17	578 \pm 99*	147 \pm 12* [#]
RV	418 \pm 69	264 \pm 13	283 \pm 25	119 \pm 9* [#]
Partikulární frakce				
LV	1979 \pm 134	2081 \pm 115	2829 \pm 214*	3429 \pm 277*
SEP	1541 \pm 158	2039 \pm 115*	2691 \pm 226*	2965 \pm 213*
RV	1053 \pm 80	2077 \pm 152*	2258 \pm 157*	2591 \pm 140*

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

*p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. normoxie

[#]p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie



Obr. č. 9: Poměr koncentrací TNF- α v partikulární a cytosolické frakci (TNF- α par/cyt) levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

* $p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. normoxie

$p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Hypoxie významně zvýšila hladinu TNF- α v partikulární frakci všech komorových oddílů u všech hypoxických skupin oproti normoxickým potkanům. V cytosolické frakci byl nárůst koncentrace TNF- α naměřen pouze v septu skupiny 3T. U skupiny 3T+R byla naopak změřena signifikantně nižší koncentrace TNF- α v cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti kontrolám i skupině 3T; k opačnému efektu došlo v partikulární frakci. To ukazuje na redistribuci TNF- α z cytosolu do partikulární frakce (tj. do membrán) v důsledku krátkodobé periodické reoxygenace. Tento přesun je dokumentován významným vzestupem koncentrace TNF- α v partikulární frakci a cytosolu na obrázku č. 9.

10.3. Vliv hypoxie na expresi IL-10 v srdcích pokusných zvířat

V tabulce č. 5 jsou shrnuty hodnoty koncentrací IL-10 v cytosolické a partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Obrázek č. 10 (str. 58) obsahuje tři grafy znázorňující poměr koncentrací IL-10 v cytosolické a partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Tyto grafy jsou rozděleny podle komorových oddílů.

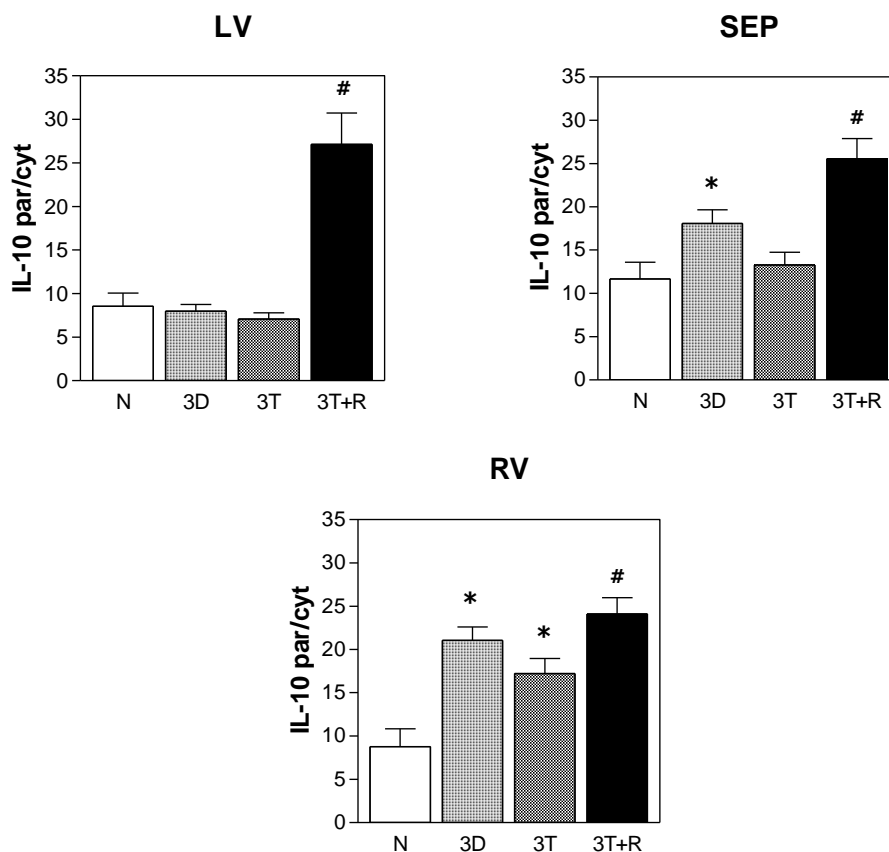
Tab. č. 5: Koncentrace IL-10 v cytosolické a partikulární frakci levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Koncentrace IL-10 [pg/mg]				
Komorový oddíl	N	3D	3T	3T+R
Cytosolická frakce				
LV	489 ± 64	332 ± 34	333 ± 17	111 ± 11* [#]
SEP	403 ± 57	203 ± 13*	245 ± 37	131 ± 12* [#]
RV	466 ± 73	191 ± 17*	158 ± 16*	114 ± 5* [#]
Partikulární frakce				
LV	2909 ± 184	2454 ± 134	2272 ± 183	3490 ± 106* [#]
SEP	3209 ± 251	3699 ± 256	3218 ± 465	3062 ± 128
RV	2024 ± 293	3857 ± 214*	2543 ± 229	2636 ± 97

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

*p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. normoxie

[#]p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie



Obr. č. 10: Poměr koncentrací IL-10 v partikulární a cytosolické frakci (IL-10 par/cyt) levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

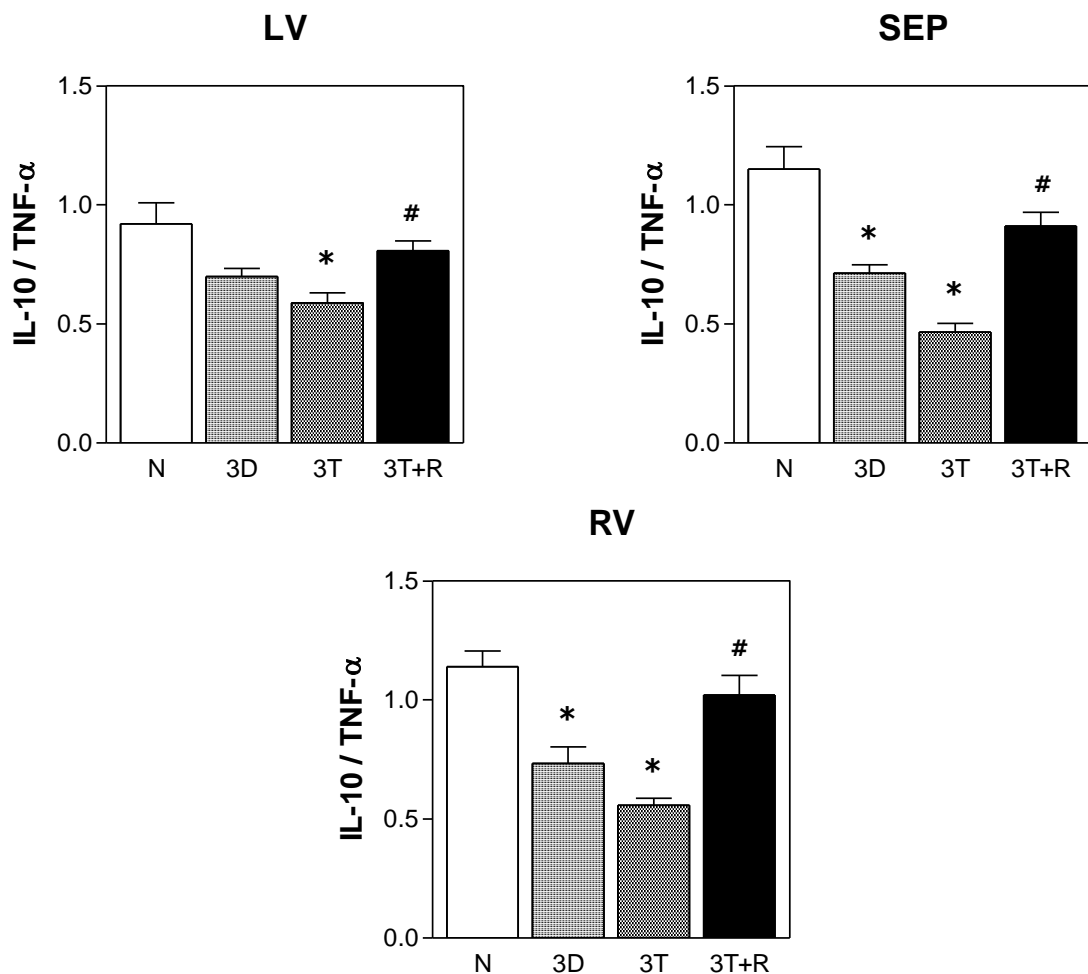
* $p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. normoxie

$p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Ve skupinách 3D a 3T byly také naměřeny nižší koncentrace IL-10 v cytosolické frakci septa a pravé komory. Signifikantně vyšší hladina IL-10 v partikulární frakci pravé komory byla zaznamenána ve skupině 3D oproti kontrolám. U skupiny 3T+R byla zaznamenána podobná redistribuce IL-10, jaké došlo v případě TNF- α . Tato skupina měla významně nižší koncentrace IL-10 v cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti normoxickým potkanům. V partikulární frakci byla zjištěna signifikantně vyšší koncentrace IL-10 pouze v levé komoře. Reoxygenace tedy významně zvýšila poměr hladin IL-10 v partikulární a cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti skupině 3T. To opět ukazuje na přesun tohoto cytokinu z cytosolu do membrán.

10.4. Poměr koncentrací IL-10/TNF- α v srdcích normoxických a chronicky hypoxických potkanů

Obrázek č. 12 je souborem tří grafů, na kterých je ukázán poměr koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.



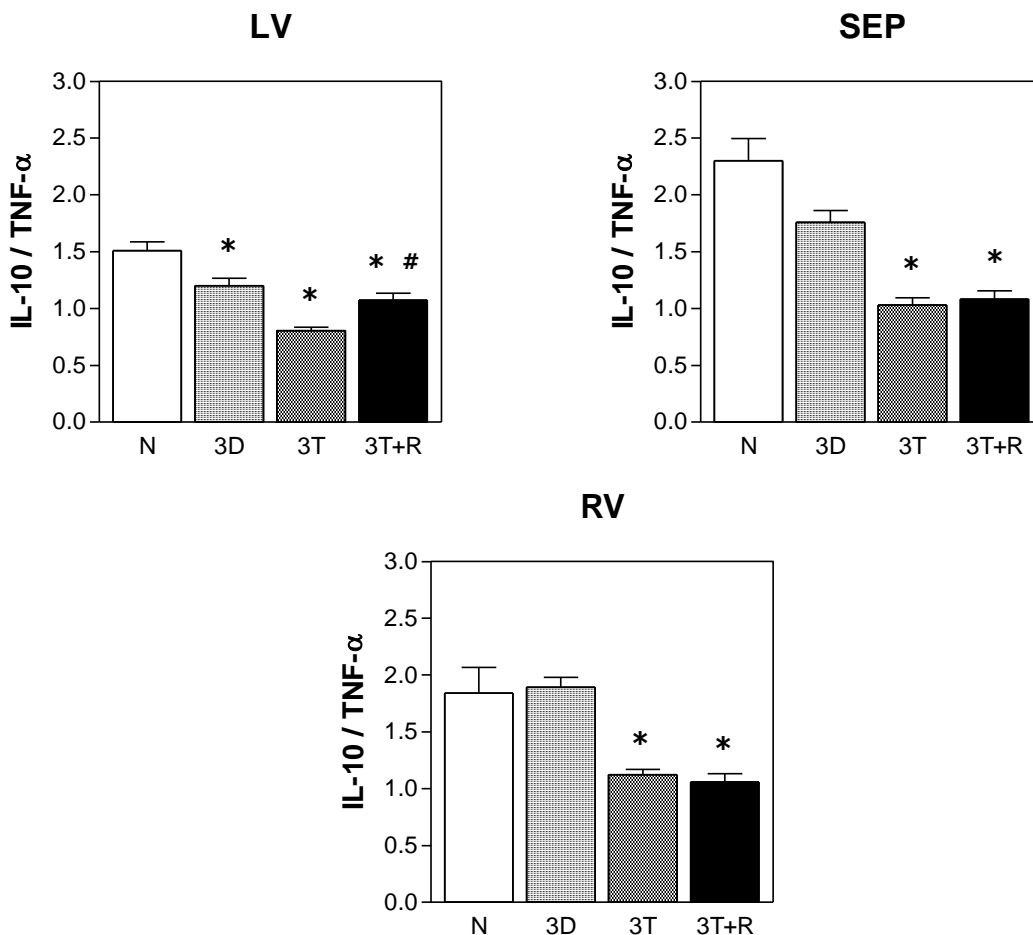
Obr. č. 12: Poměr koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

* $p < 0.05$ statistický významný rozdíl vs. normoxie

$p < 0.05$ statistický významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Obrázek č. 13 je souborem tří grafů, na kterých je ukázán poměr koncentrací IL-10/TNF- α v partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických a chronicky hypoxických potkanů.



Obr. č. 13: Poměr koncentrací IL-10/TNF- α v partikulární frakci levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

*p < 0.05 statistický významný rozdíl vs. normoxie

#p < 0.05 statistický významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Kontinuální hypoxie (skupiny 3D a 3T) snížila poměr koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti kontrolám. Reoxygenace (skupina 3T+R) tomuto poklesu zabránila. K významnému poklesu poměru těchto dvou cytokinů došlo také u skupiny 3T v partikulární frakci všech komorových oddílů. U skupiny 3T+R se poměr hladin IL-10/TNF- α v partikulární frakci všech komorových oddílů snížil oproti kontrolám.

10.5. Vliv hypoxie na produkci nitrotyrosinu v srdcích pokusných zvířat

V tabulce č. 6 jsou shrnuty hodnoty koncentrací nitrotyrosinu v cytosolické a partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Obrázek č. 11 (str. 62) obsahuje tři grafy znázorňující poměr koncentrací nitrotyrosinu v cytosolické a partikulární frakci levé komory, septa a pravé komory srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů. Tyto grafy jsou rozděleny podle komorových oddílů.

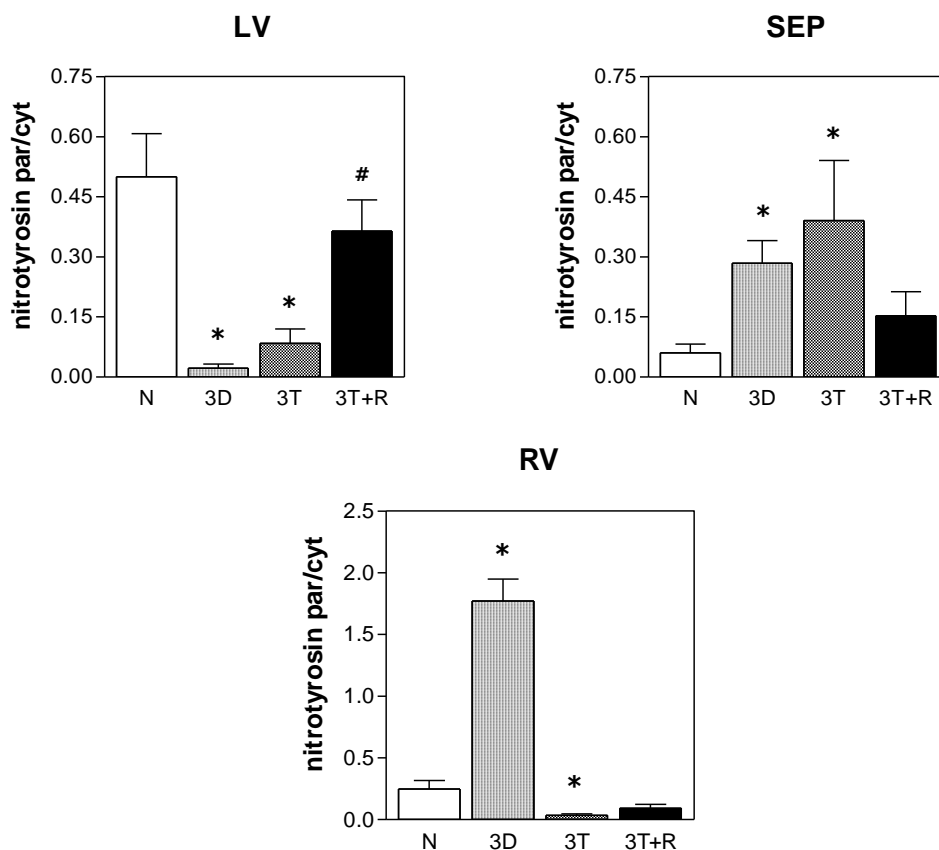
Tab. č. 6: Koncentrace nitrotyrosinu v cytosolické a partikulární frakci levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

Koncentrace nitrotyrosinu [ng/mg]				
Komorový oddíl	N	3D	3T	3T+R
	Cytosolická frakce			
LV	1.698 ± 0.295	2.759 ± 0.556*	1.985 ± 0.276	2.715 ± 0.283* [#]
SEP	3.35 ± 0.358	0.881 ± 0.229*	1.598 ± 0.219*	3.02 ± 0.245 [#]
RV	3.08 ± 0.296	2.438 ± 0.152	1.637 ± 0.118*	3.699 ± 0.545 [#]
	Partikulární frakce			
LV	4.18 ± 0.475	0.04 ± 0.02*	0.152 ± 0.068*	0.733 ± 0.105* [#]
SEP	0.1697 ± 0.06	0.27 ± 0.074*	0.535 ± 0.256*	0.333 ± 0.109*
RV	0.792 ± 0.213	4.2 ± 0.361*	0.061 ± 0.02*	0.194 ± 0.04* [#]

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednodinovou denní reoxygenací

*p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. normoxie

[#]p < 0.05 statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie



Obr. č. 11: Poměr koncentrací nitrotyrosinu v partikulární a cytosolické frakci (nitrotyrosin par/cyt) levé komory (LV), septa (SEP) a pravé komory (RV) srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů.

N – normoxie; 3D – tři denní hypoxie; 3T – tři týdenní hypoxie; 3T+R – tři týdenní hypoxie s jednohodinovou denní reoxygenací

* $p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. normoxie

$p < 0.05$ statisticky významný rozdíl vs. 3T hypoxie

Chronická kontinuální hypoxie (skupiny 3D a 3T) snížila hladinu nitrotyrosinu v cytosolické frakci septa a pravé komory oproti normoxickým potkanům; v levé komoře naopak došlo k nárůstu. V partikulární frakci levé komory těchto skupin byla koncentrace nitrotyrosinu snížena; zatímco v septu a v pravé komoře byla naopak zvýšena (kromě pravé komory skupiny 3T, kde došlo k poklesu). Vliv hypoxie v cytosolické frakci byl tedy opačný než v partikulární frakci. To se projevilo na poměru koncentrací nitrotyrosinu v partikulární a cytosolické frakci. Tento poměr byl u hypoxických zvířat (skupiny 3D a 3T) v levé komoře snížen, v septu naopak zvýšen a v pravé komoře u skupiny 3D zvýšen a u skupiny 3T snížen. Periodická reoxygenace (skupina 3T+R) zabránila hypoxií vyvolanému poklesu koncentrace nitrotyrosinu v cytosolické frakci septa a pravé komory a zvýšila hladinu nitrotyrosinu v partikulární frakci levé a pravé komory oproti hypoxické

skupině 3T. Poměr hladin nitrotyrosinu v partikulární a cytosolické frakci byl významně vyšší v levé komoře oproti potkanům adaptovaným na chronickou kontinuální hypoxii (skupiny 3D a 3T).

11. Diskuse

11.1. Používané metody pro měření cytokinů

K měření koncentrací TNF- α a IL-10 v tkáni se nejčastěji používá: ELISA (Kaur a kol., 2006), fluoroimmunoassay (Kimura a kol., 2006) nebo Western blot (Stamm a kol., 2001). My jsme pro naše experimenty zvolili metodu ELISA. Její výhodou je vysoká citlivost: lze jí detekovat velmi malé koncentrace proteinu (pg/ml). Protilátky, které tato metoda používá, se specificky vážou na stanovovaný protein. Její další nemalou výhodou je i to, že nevyžaduje použití speciálních drahých přístrojů a je časově ekonomická. Pro naše pokusy jsme zvolili ELISA kity dodané firmou Cayman. Tyto kity se ukázaly jako spolehlivé; standardy ukazovaly vždy velmi podobné hodnoty a příbalový protokol nebylo potřeba modifikovat.

11.2. Vliv chronické hypoxie a reoxygenace na expresi TNF- α

Zjistili jsme, že chronická hypoxie zvýšila hladinu membránově vázaného TNF- α ve všech komorových oddílech srdce potkana. Největší nárůst však byl zaznamenán v pravé komoře, která je kromě hypoxie vystavená zvýšené pracovní zátěži v důsledku hypoxické plicní hypertenze. Hypoxie však neměla zásadní vliv na hladinu volného TNF- α (cytosolická frakce). Ke zvýšení tohoto cytokinu došlo jen v septu skupiny 3T. Produkce TNF- α v hypoxickém myokardu je zřejmě vyvolána ROS, které se v průběhu adaptace tvoří ve zvýšeném množství. Je známo, že ROS indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů včetně TNF- α , přičemž se uplatňuje pozitivní zpětná vazba (Meldrum, 1998).

Lam a kol. (2008) zjistili u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii (10% O₂, 4 týdny) zvýšenou expresi prozánětlivých cytokinů, konkrétně IL-1 β , IL-6 a TNF- α , včetně jejich receptorů IL-1r1, gp130 a TNFR1. Pomocí imunohistochemie prokázali lokalizaci těchto cytokinů a receptorů v ledvinných buňkách. Podávání TNF- α během hypoxie mělo za následek zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. U adaptovaných potkanů také zjistili zvýšenou expresi iNOS a chemokinů (MCP-1, CCR2, MIP-1 α a ICAM-1) v těchto buňkách. Za zvýšenou expresi iNOS je zřejmě zodpovědná zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů, které aktivují transkripční faktor NF κ B. NF κ B spouští transkripci řady genů včetně genů pro iNOS (Wang a Wang, 2007).

Smith a kol. (2001) ukázali na myším modelu, že chronická hypoxie (10% O₂, 4 týdny) aktivuje TNF- α v plicích, kde přispívá k rozvoji plicní vasokonstrikce. Zjistili i zvýšenou produkci TNF- α v srdci. Hypoxické myši měli vyšší systolický tlak v plicním oběhu a hypertrofované pravé komory. U myši s chybějícím genem pro TNF- α však hypoxie k hypertrofii pravé komory nevedla. Tato skutečnost svědčí pro významnou úlohu TNF- α v remodelaci myokardu vyvolané chronickou hypoxií.

Je známo, že TNF- α přispívá k poškození myokardu způsobenému akutním nedostatkem kyslíku. Během srdeční ischemie se zvyšuje koncentrace TNF- α v kardiomyocytech i v séru. Vzestup koncentrace TNF- α koreluje s rozvojem srdeční nekrózy (Gilles a kol., 2003). Protilátky proti TNF- α podané před ischemií snižují velikost infarktu u králíků (Belosjorow a kol., 2003) a zlepšují kontraktilní funkci po mikroembolizaci u psů (Gu a kol., 2006). Koncentrace TNF- α v séru pacientů se srdečním onemocněním slouží jako nezávislý prediktor mortality (Schulz a kol., 2003).

Během srdeční ischemie vzniká TNF- α hlavně v makrofázích, monocytech a mastocystech, odkud je pak vyplaven během reperfuze (Gilles a kol., 2003). V prvních 60-90 minutách reperfuze je indukována syntéza TNF- α v kardiomyocytech (Shames a kol., 2002) a fibroblastech (Shivakumar a kol., 2008). Tato zvýšená produkce aktivuje kinázu p38 MAPK. Během ischemie a reperfuze TNF- α ovlivňuje jak reversibilní děje (endotheliální dysfunkci a kontraktilní dysfunkci), tak ireversibilní děje (nekróza) (Zhang, 2008). TNF- α zhoršuje kontraktilní funkci komor tím, že zvyšuje produkci NO, rozvíjí oxidační stres a ovlivňuje funkci myofilament (Skyschally a kol., 2007). Naproti tomu některé studie prokázaly, že TNF- α může aktivovat protektivní signální dráhy a tím přispívat k ochraně myokardu před ischemicko-reperfuzním poškozením (Kostopanagiotou a kol., 2009). Dosud však není známo jakou roli hraje TNF- α v ischemické odolnosti chronicky hypoxického myokardu.

Dále jsme zjistili, že krátkodobá periodická reoxygenace v průběhu adaptace na hypoxii významně snížila hladinu TNF- α v cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti kontrolní (N) i hypoxické skupině bez reoxygenace (3T). Koncentrace membránově vázaného TNF- α se naopak zvýšila oproti těmto skupinám. Reoxygenace tedy vedla k redistribuci tohoto cytokinu z cytosolu do membrán.

Vlivem reoxygenace během hypoxické adaptace na expresi TNF- α se zatím nezabývala žádná práce. Bylo však zjištěno, že hodinová denní reoxygenace během

třítýdenní adaptace na hypoxii zcela zruší protektivní efekt chronické hypoxie (Neckář a kol., 2010). Potkani adaptovaní na chronickou hypoxii měli signifikantně nižší velikost infarktu oproti kontrolám, zatímco potkani vystavení reoxygenaci se od kontrol nelišili. Naše výsledky však nedovolují posoudit, zda mezi redistribucí TNF- α a protektivním vlivem chronické hypoxie existuje kauzální vztah.

11.3. Vliv chronické hypoxie a reoxygenace na expresi IL-10

Zjistili jsme, že chronická kontinuální hypoxie (skupiny 3D a 3T) snížila koncentraci IL-10 v cytosolické frakci všech komorových oddílů oproti normoxickým potkanům. Koncentrace membránově vázaného IL-10 se naopak zvýšila pouze v pravé komoře hypoxických potkanů. Poměr hladin IL-10 v partikulární a cytosolické frakci byl u těchto zvířat významně vyšší oproti kontrolám.

Na rozdíl od našich výsledků, Li a kol. (2010) naměřili zvýšenou expresi IL-10 v potkaních mezenchymálních buňkách, které inkubovali v médiu obsahující 4% O₂. Tento cytokin inhibuje proliferaci srdečních fibroblastů a expresi kolagenu a působí tak proti rozvoji fibrózy. Lin a kol. (2010) také naměřili vyšší hladinu IL-10 v izolovaných potkaních kardiomyocytech v anoxii (12 hodin). Tyto buňky inkubovali před anoxií s bacilinem (10 μ M), který snížil produkci NF κ B a tedy i prozánětlivých cytokinů a prohloubil protizánětlivý účinek IL-10. Výše uvedené výsledky však nelze srovnávat s našimi, které byly získány za fyziologických podmínek na modelu chronické hypoxie „*in vivo*“.

Úloha IL-10 v chronicky hypoxickém myokardu nebyla dosud objasněna. Zdá se, že IL-10 může tlumit některé nepříznivé účinky hypoxie. Bennett a kol. (2007) ukázali, že zvýšená produkce IL-10 má protektivní vliv proti hypoxii: snižuje její prozánětlivý účinek. Hypoxií vyvolaná zvýšená produkce IL-10 má také neuroprotektivní efekt: snižuje hyperexcitabilitu v CA1 pyramidálních neuronech v odpovědi na akutní hypoxii (Levin a kol., 2007). Podávání lidského rekombinantního rhIL-10 ve vyšších dávkách (75 mg/kg/den) redukuje u potkanů poškození kosterních svalů indukované chronickou hypoxií (Ozturk a kol., 2006). Podávání rhIL-10 také chrání ledviny před ischemicko-reperfučním poškozením u potkanů, jak je patrné z poklesu koncentrace malondialdehydu (MDA) a omezení tubulární nekrózy (Ozturk a kol., 2006).

Reoxygenace (skupina 3T+R) v našich pokusech významně snížila koncentraci volného IL-10 (cytosolická frakce) ve všech komorových oddílech srdce potkana oproti kontrolám a hypoxickým potkanům skupiny 3T. Koncentrace membránově vázaného IL-10 se naopak v levé komoře u skupiny 3T+R zvýšila oproti skupinám N i 3T. K výrazné redistribuci tohoto cytokinu tedy došlo především v levé komoře. Vlivem reoxygenace během hypoxie na expresi IL-10 se zatím nezabývala žádná práce a k vysvětlení našeho pozorování je nutné provést další experimenty.

11.4. Poměr koncentrací TNF- α a IL-10 během hypoxie a reoxygenace

Hypoxie snížila poměr koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci všech komorových oddílů u skupin 3D a 3T oproti kontrolám. Tento poměr u hypoxických skupin byl snížen také v partikulární frakci, avšak pouze u skupiny 3T. Reoxygenace zabránila hypoxií vyvolanému poklesu poměru koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci všech komorových oddílů. Hodnoty tohoto poměru byly u skupiny 3T+R srovnatelné s hodnotami normoxických potkanů. Naproti tomu hodnoty poměru koncentrací IL-10/TNF- α v partikulární frakci všech komorových oddílů byly obdobné jako u potkanů adaptovaných na kontinuální chronickou hypoxii (skupina 3T).

Naše výsledky můžeme porovnat pouze se studií Kaura a kol. (2006), která se zabývala změnami hladin TNF- α a IL-10 vyvolanými infarktem myokardu u potkana. Množství TNF- α se v 1. a 4. týdnu po infarktu signifikantně zvýšilo oproti kontrole, v 8. a 16. týdnu došlo k návratu k výchozím hodnotám. Tyto změny se projevíly jak v partikulární frakci tak v cytosolické frakci. Koncentrace IL-10 v partikulární frakci byla naopak snížena během celého sledovaného období. V cytosolické frakci se množství IL-10 neměnilo. Poměr koncentrací IL-10/TNF- α v partikulární frakci byl u experimentální skupiny po celou dobu signifikantně nižší oproti kontrole; podobný pokles byl zaznamenán i v cytosolické frakci 4 týdny po infarktu (Kaur a kol., 2006). Snížený poměr IL-10/TNF- α v myokardu potkana po infarktu je, podobně jako v případě chronické hypoxie, ukazatelem prozánětlivého stavu, který souvisí se zvýšenou tvorbou ROS a může se tak podílet na remodelačních procesech.

Kaurova skupina naměřila poměr koncentrací IL-10/TNF- α v cytosolické frakci u kontrolních potkanů kolem 1, který odpovídá i našim hodnotám. Poměr IL-10/TNF- α v partikulární frakci měli kolem 3, zatímco naše výsledky ukázaly na hodnotu 2. Tento rozdíl lze vysvětlit použitím jiného potkaního kmene, odlišným zpracováním a analýzou vzorků.

11.5. Vliv hypoxie a reoxygenace na expresi nitrotyrosinu

Zjistili jsme, že chronická kontinuální hypoxie (skupiny 3D a 3T) snížila hladinu nitrotyrosinu v cytosolické frakci septa a pravé komory oproti normoxickým potkanům; v levé komoře naopak došlo k nárůstu. V partikulární frakci levé komory těchto skupin byla koncentrace nitrotyrosinu snížena, zatímco v septu a v pravé komoře byla naopak zvýšena (kromě pravé komory skupiny 3T, kde došlo k poklesu). Vliv hypoxie v cytosolické frakci byl tedy opačný než v partikulární frakci. To se projevilo na poměru koncentrací nitrotyrosinu v partikulární a cytosolické frakci. Tento poměr byl u hypoxických zvířat (skupiny 3D a 3T) v levé komoře snížen, v septu naopak zvýšen a v pravé komoře u skupiny 3D zvýšen a u skupiny 3T snížen.

Nitrotyrosin, peroxynitrit a ROS slouží jako ukazatelé poškození buněk produkty metabolismu oxidu dusnatého. Hypoxie vyvolává zvýšenou produkci oxidu dusnatého, která působí proti hypoxické plicní vazokonstrikci a tlumí rozvoj plicní hypertenze (Wolin a kol., 2010). Chronická hypoxie také zvyšuje produkci NO v kardiomyocytech (Giordano, 2005). Za tuto zvýšenou produkci je pravděpodobně zodpovědný oxidační stres, který indukuje tvorbu prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α . Ty aktivují transkripční faktor NF κ B, který spouští transkripci genů pro NO syntázy. IL-10 produkci NO naopak potlačuje fosforylací kinázy ERK1/2, která zasahuje do dráhy NF κ B a tím zabraňuje aktivaci příslušných genů (Kaur a kol., 2006). Námi zjištěné změny hladin a distribuce nitrotyrosinu však neodpovídaly hladinám těchto cytokinů, což svědčí pro úlohu jiných regulačních mechanismů. Různé hladiny nitrotyrosinu v jednotlivých oddílech pravděpodobně souvisí s různým stupněm zátěže levého a pravého srdce v podmínkách chronické hypoxie.

Dále jsme zjistili, že periodická reoxygenace (skupina 3T+R) brání hypoxií vyvolanému poklesu koncentrace nitrotyrosinu v cytosolické frakci septa a pravé komory

a zvyšuje hladinu nitrotyrosinu v partikulární frakci levé a pravé komory oproti hypoxické skupině 3T. Poměr hladin nitrotyrosinu v partikulární a cytosolické frakci se ukázal významně vyšší v levé komoře oproti potkanům adaptovaným na chronickou kontinuální hypoxii (skupiny 3D a 3T). Podobný efekt v levé komoře jsme naměřili i u poměru koncentrací TNF- α v těchto frakcích. Tyto výsledky tedy mohou odrážet souvislost mezi tvorbou TNF- α a NO.

11.6. Shrnutí všech výsledků

Je potřeba si uvědomit, co obsahuje cytosolická a partikulární frakce. V první z těchto frakcí se nachází cytokiny v zásobní formě, jsou k dispozici pro zakotvení do membrány nebo k vypuštění do extracelulárního prostoru. Partikulární frakce obsahuje cytokiny, které byly vázané na membránách buněk a jsou tedy biologicky aktivní. Největší změny koncentrací TNF- α a IL-10 jsme zaznamenali v partikulární frakci. Tyto membránově vázané cytokiny jsou zodpovědné za změny zánětlivého stavu srdečního svalu.

Naše výsledky tedy ukázaly, že chronická hypoxie je spojena s aktivací prozánětlivého stavu srdečního svalu. Změny hladin obou cytokinů vyvolané chronickou kontinuální hypoxií (protektivní forma hypoxie) a hypoxií přerušovanou 60-ti minutovou denní reoxygenací (která brání rozvoji odolného fenotypu) se významně lišily. Na základě našich výsledků však nemůžeme posoudit, zda se TNF- α uplatňuje v indukcii zvýšené ischemické odolnosti chronicky hypoxických srdcí. Na tuto otázku by měl odpovědět probíhající experiment, ve kterém analyzujeme velikost infarktu myokardu u potkanů, kterým byla během adaptace na hypoxii podávána protilátka proti TNF- α , infliximab.

12. Závěr

Hlavní splněné cíle této diplomové práce shrnují následující body:

- 1) Byla provedena detailní analýza odborné literatury zabývající se úlohou TNF- α a IL-10 v srdci s ohledem na adaptivní změny vyvolané chronickou hypoxií.
- 2) Podařilo se zavést metodu ELISA pro měření koncentrace TNF- α , IL-10 a nitrotyrosinu v srdeční tkáni.
- 3) Zjistili jsme, že chronická kontinuální hypoxie zvýšila hladinu TNF- α ve všech komorových oddílech a snížila poměr IL-10/TNF- α v cytosolické i partikulární frakci. Periodická reoxygenace vedla k výrazné redistribuci TNF- α z cytosolu do membrán a zabránila hypoxií vyvolanému poklesu IL-10/TNF- α pouze v cytosolické frakci. Hypoxie zvýšila hladinu nitrotyrosinu v cytosolické frakci všech komorových oddílů, v partikulární frakci nastal opačný efekt; oba účinky byly ještě zesíleny periodickou reoxygenací.

Seznam použité literatury

- Aguilar-Bryan L., Clement J.P., Gonzales G., Kunjilwar K., Babenko A., Bryan J.: Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* 78, 227-245 (1998)
- Asemu G., Papoušek F., Ošťádal B., Kolář F.: Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K_{ATP} channel. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1821-1831 (1999)
- Bajaj G., Rajendry K.S.: TNF- α -mediated apoptosis involves caspase-12 and calpin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1558-1564 (2006)
- Baker J.E., Boerboom L.E., Olinger G.N., Baker J.E.: Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 268, H1165-H1173 (1995)
- Baker J.E., Holman P., Kalyanaraman B., Griffith O.W., Pritchard K.A. Jr.: Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 874, 236-53 (1999)
- Bátkai S., Rajesh M., Mukhopadhyay P., Haskó G., Liaudet L., Cravatt B.F., Csiszár A., Ungvári Z., Pacher P.: Decreased age-related cardiac dysfunction, myocardial nitrative stress, inflammatory gene expression, and apoptosis in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 293, H909-18 (2007)
- Belosjorow S., Bolle I., Duschin A., Heusch G., Schulz R.: TNF- α antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H927-30 (2003)
- Bennett B.L., Garofalo R.P., Cron S.G., Hosakote Y.M., Atmar R.L., Macias C.G., Piedra P.A.: Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* 195, 1532-40 (2007)
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Struer L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Co., New York (2002)
- Cameron J.S., Baghdady R.: Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress. *Cardiovasc. Res.* 28, 788-96 (1994)
- Chouabe C., Amsellem J., Espinosa L., Ribaux P., Blaineau S., Megas P., Bonvallet R.: Reversibility of electrophysiological changes induced by chronic high-altitude hypoxia in adult rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H1452-H1460 (2002)
- Das U. N.: Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 215, 145-152 (2000)

- Dawn B., Guo Y., Rezazadeh A.: Tumor necrosis factor- α does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 51-61 (2004)
- Dhingra S., Sharma A.K., Singla D.K., Singal P.K.: p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF- α and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 293, H3524-31 (2007)
- Dhingra S., Sharma A.K., Arora R.C., Slezak J., Singal P.K.: IL-10 attenuates TNF- α -induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 82, 59-66 (2009)
- Djeu J.Y., Blanchard D.K., Richards A.L., Friedman H.: Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. *J. Immunol.* 141, 4047-52 (1988)
- Durán W. N.: The double edge sword of TNF- α in ischemia reperfusion injury. *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H2221-2 (2008)
- Eddly L. J., Goeddle D. V., Wong G. H. W.: Tumor necrosis factor- α pretreatment is a protective in rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1056-1059 (1992)
- Felaco M., Grilli A., Gorbunov N., DiNapoli P., DeLutiis M. A., DiGiulio C., Taccardi A., Barsotti A., Barbacane R. C., Reale R. C., Conti P.: Endothelial NOS expression and ischemia-reperfusion in isolated working rat heart from hypoxic and hyperoxic condition. *Biochim. Biophys. Acta* 1524, 203-211 (2000)
- Feldman A. M., Combes A., Wagner D., Kadakomi T., Kubota T., Yun You L., McTiernan C.: The role of tumor necrosis factor in the Pathophysiology of heart failure. *J. Am. Cell. Cardiol.* 35, 537-44 (2000)
- Finbloom D.S., Winestock K.D.: IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J. Immunol.* 155, 1079-90 (1995)
- Forbes R.A., Steenbergen C., Murphy E.: Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 88, 802-9 (2001)
- Förstermann U.: Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers. Arch.* 459, 923-39 (2010)
- Giachini F.R., Zemse S.M., Carneiro F.S., Lima V.V., Carneiro Z.N., Callera G.E., Ergul A., Webb R.C., Tostes R.C.: Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1 via effects on ERK1/2-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H489-96 (2009)

- Gilles S., Zahler S., Welsch U., Sommerhoff C.P., Becker B.F.: Release of TNF- α during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc. Res.* 60, 608-16 (2003)
- Giordano F.J.: Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 115, 500-8 (2005)
- Gregor P., Widimský P.: *Kardiologie*. Galén, Praha (1999)
- Gu Q., Yang X., Bonde P., DiPaula A., Fox-Talbot K., Becker L. C.: Inhibition of TNF- α reduces myocardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 48, 320-328 (2006)
- Guilliams M., Movahedi K., Bosschaerts T., VandenDriessche T., Chuah M.K., Hérin M., Acosta-Sanchez A., Ma L., Moser M., Van Ginderachter J.A., Brys L., De Baetselier P., Beschin A.: IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J. Immunol.* 182, 1107-18 (2009)
- Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2005)
- Hrbasová M., Novotný J., Hejnová L., Kolár F., Neckár J., Svoboda P.: Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* 94, 2423-32 (2003)
- Hurtado A.: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann. Intern. Med.* 53, 247-258 (1960)
- Inagaki N., Tsuura Y., Namba N., Masuda K., Gono T., Horie M., Senio Y., Mizuta M., Seino S.: Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* 270, 5691-5694 (1995)
- Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T.: ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 352, 244-247 (1991)
- Isomoto S., Kondo C., Yamada M., Matsumoto S., Higashiguchi O., Horio Y., Matsuzawa Y., Kurachi Y.: A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. *J. Biol. Chem.* 271, 24321-4 (1996)
- Jones B.C., Logsdon N.J., Josephson K., Cook J., Barry P.A., Walter M.R.: Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 9404-9 (2002)
- Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK.: Interplay of TNF- α and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 1023-30 (2006)

- Kaur K., Sharma K., Singal P. K.: Significance of changes in TNF- α and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, 106-113 (2006)
- Kaur K., Dhingra S., Slezak J., Sharma A.K., Bajaj A., Singal P.K.: Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 14, 113-23 (2009)
- Kimura H., Shuntani-Ishida K, Nakajima M., Liu S., Matsumoto K., Yoshida K.: Ischemic preconditioning or p38 MAP kinase inhibition attenuates myocardial TNF- α production and mitochondrial damage in brief myocardial ischemia. *Life Sci.* 78, 1901-1910 (2006)
- Klener P. a kol.: Cytokiny ve vnitřním lékařství. Grada Avicenum, Praha (1997)
- Kolář F., Ošťádal B.: Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res.* 53, 3-13 (2004)
- Kolář F., Szarszoi O., Neckář J., Ošťádal B.: Improved cardiac ischemic tolerance in rats adapter to chronic hypoxia is reduced by simultaneous treatment with N-acetylcysteine. *Eur. J. Heart Failure. Suppl* 2/1, 46 (2003)
- Kolář F., Jezková J., Balková P., Břeh J., Neckář J., Novák F., Nováková O., Tomášová H., Srbová M., Ošťádal B., Wilhelm J., Herget J.: Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H224-30 (2006)
- Kopecký M., Daum S.: Tkáňová adaptace na anoxii v myokardu krysy. *Čs. Fyziol.* 7, 518-521 (1958)
- Kostopanagiotou G., Avgerinos E.D., Markidou E., Voiniadis P., Chondros C., Theodoraki K., Smyrniotis V., Arkadopoulou N.: Protective Effect of NAC Preconditioning Against Ischemia-Reperfusion Injury in Piglet Small Bowel Transplantation: Effects on Plasma TNF, IL-8, Hyaluronic Acid, and NO. *J. Surg. Res.* (v tisku) (2009)
- Krishnamurthy P., Rajasingh J., Lambers E., Qin G., Losordo D.W., Kishore R.: IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ. Res.* 104, e9-18 (2009)
- Kurrelmeier K. M., Michael L. H., Baumgarten G.: Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5456-5461 (2000)
- Kwak EL, Laroche DA, Beaumont C, Torti SV, Torti FM.: Role for NF-kappa B in the regulation of ferritin H by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 70, 15285-93 (1995)
- Lacraz S., Nicod L.P., Chicheportiche R., Welgus H.G., Dayer J.M.: IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 96, 2304-10 (1995)

- Lam S.Y., Tipoe G.L., Liong E.C., Fung M.L.: Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body. *Histochem. Cell. Biol.* 130, 549-59 (2008)
- Lecour S., Rochette L., Opie L.: Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 65, 239-43 (2005)
- Levin S.G., Burkovetskaia M.E., Godukhin O.V.: Protecting effect of tumour necrosis factor (TNF) upon hyperexcitability of the field CA1 pyramidal neurons evoked by hypoxia episodes in the rat hypothalamus sections. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 93, 442-7 (2007)
- Li Y.Y., McTiernan C.F., Feldman A.M.: Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc. Res.* 42, 162-72 (1999)
- Li Z., Wei H., Deng L., Cong X., Chen X.: Expression and secretion of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *FEBS. J.* 278, 859 (2010)
- Lin L., Wu X.D., Davey A.K., Wang J.: The anti-inflammatory effect of baicalin on hypoxia/reoxygenation and TNF-alpha induced injury in cultural rat cardiomyocytes. *Phytother. Res.* 24, 429-37 (2010)
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J.: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104, 487-501 (2001)
- Maekawa D. R., Wada H., Kanda T.: Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 1229-1235 (2000)
- Marber M., Walker D., Yellon D.: Spinal cord stimulation or ischaemic preconditioning? *BMJ.* 307, 477-80 (1993)
- Maroko P.R., Libby P., Ginks W.R., Bloor C.M., Shell W.E., Sobel B.E., Ross J. Jr.: Coronary artery reperfusion I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* 51, 2710-6 (1972)
- Mcgrath J., Procházka J., Pelouch V: Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J. Appl. Physiol.* 34, 289-293 (1973)
- Meldrum D. R.: Tumor necrosis factor alpha in the heart. *Am. J. Physiol.* 274, 577-595 (1998)
- Meerson F.Z., Ustinova E.E., Orlova E.H.: Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin. Cardiol.* 10, 783-9 (1987)

- Monden Y., Kubota K., Inoue T., Tsutsumi T., Kawano S., Ide T., Tsutsui H., Sunagawa K.: Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 50, 165-134 (2007)
- Morel O.E., Buvry A., Le Corvoisier P., Tual L., Favret F., León-Velarde F., Crozatier B., Richalet J.P.: Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. *Pflugers. Arch.* 446, 356-64 (2003)
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765 (2001)
- Mosser D.M., Zhang X.: Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 226, 205-18 (2008)
- Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74, 1124-1136 (1986)
- Neckář J., Szárszoi O., Kóten L., Papoušek F., Ošťádal B., Grover G. J., Kolář F.: Effect of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, 567-575 (2002)
- 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., Marková I., Novák F., Nováková O., Szárszoi O., Ost'ádal B., Kolár F.: Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288, H1566-72 (2005)
- Neckář J., Borchert G.H., Balková P., Nováková O., Novák F., Hroch M., Ošťádal B., Kolář F.: Cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia is abolished by brief daily reoxygenation. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 48-162 (2010)
- Noma A.: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature.* 305, 147-148 (1983)
- Novák F., Tvrzická E., Pelouch V., Ježková J., Smik D., Nováková O.: Phospholipid composition of immature rat myocardium exposed to chronic hypoxia and the effect of normoxic recovery. *Collet. Czech Chem. Commun.* 69, 1-15 (2004)
- Ošťádal B., Kolář F.: *Cardiac Ischemia: From Indry to protection.* Kluwer Academic Publisher, Norwell (1999)
- Ošťádal B., Kolář F.: Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158, 224-36 (2007)
- Ošťádal B., Vízek M.: *Patologická fyziologie srdce a cév.* Karolinum, Praha (2003)

- 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, 129-138 (1984)
- Ošťádal B., Procházka J., Pelouch V., Urbanová D., Widimský J., Staněk V.: Pharmacological treatment and spontaneous reversibility of cardiopulmonary changes induced by intermittent high altitude hypoxia. *Prog. Resp. Res.* 20, 17-25 (1985)
- Ošťádal B., Ošťádalová I., Kolář F., Pelouch V., Dhalla N. S.: Cardiac adaptation to chronic ischemia. *Adv. Exp. Biol. Med.* 6, 43-60 (1998)
- Ošťádalová I., Ošťádal B., Kolář F., Parratt J.R., Wilson S.: Tolerance to ischemia and ischemic preconditioning in neonatal rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 857-65 (1998)
- Ošťádalová I., Ošťádal B., Jarkovská D., Kolář F.: Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr. Res.* 52, 561-567 (2002)
- Oztürk K., Demir B., Oke R., Durmaz H.: Dose-related effects of recombinant human interleukin-10 on hypoxia-induced skeletal muscle injury in immature rats. *J. Orthop. Sci.* 11, 620-5 (2006)
- Oztürk H., Onen A., Oztürk H., Buyukbayram H.: Exogenous human recombinant interleukin-10 protects the kidney against hypoxia-induced renal injury in immature rats. *Int. J. Urol.* 13, 397-400 (2006)
- Pelouch V., Kolář F., Ošťádal B., Milerová M., Cihák R., Widimský J.: Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 11, 177-85 (1997)
- Pěnička M., Gregor P.: Cytokiny u kardiovaskulárních onemocnění. Účast v pathogenezi, ovlivnění prognózy, vyhlídky na léčbu. *Vnitřní lékařství* 46, 398-402 (2000)
- Pfeffer K., Matsuyama T., Kündig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Krönke M., Mak T.W.: Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-67 (1993)
- Poupa O., Krofta K., Procházka J.: Acclimatization to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed. Proc.* 25, 1243-1246 (1966)
- Sack M.: Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and potential role of for the anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol. Ther.* 94, 123-135 (2002)
- Schulz R.: TNF α in myocardial ischemia/reperfusion: Damage vs. protection. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 45, 712-4 (2008)

- Shames B.D., Barton H.H., Reznikov L.L., Cairns C.B., Banerjee A., Harken A.H., Meng X.: Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 17, 114-9 (2002)
- Shivakumar K., Sollott S.J., Sangeetha M., Sapna S., Ziman B., Wang S., Lakatta E.G.: Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2653-8 (2008)
- Skyschally A., Gres P., Hoffmann S., Haude M., Erbel R., Schulz R., Heusch G.: Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ. Res.* 100, 140-6 (2007)
- Smith R. M., McCarthy J., Sack M.: TNF-alpha is required for hypoxia-mediated right ventricular hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 219, 139-143 (2001)
- Stamm Ch., Friehs I., Cowan D. G., Moran A. M., Cao-Dahn H., Deubener L. F., Nido P. D., McGowan F.: Inhibition of tumor necrosis factor- α improves postischemic recovery of hypertrophied hearts. *Circulation* 104, 350-355 (2001)
- Szárszoi O., Asemu G., Ošťádal B., Kolář F.: Cardioprotection by chronic hypoxia: role of nitric oxide. *Physiol. Res.* 51, 69P (2002)
- Szárszoi O., Asemu G., Ošťádal B., Kolář F.: The role of reactive oxygen species and nitric oxide in ischemia/reperfusion injury of chronically hypoxic rat heart. *Eur. J. Heart. Failure. Suppl.* 2/1, 53 (2003)
- Tracey K.J., Cerami A.: Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr. Opin. Immunol.* 1, 454-61 (1989)
- Trojan S.: *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha (1999)
- Turek Z., Kubat K., Ringnalda B.: Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res. Cardiol.* 75, 544-553 (1980)
- Umar S., van der Laarse A.: Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 191-201 (2010)
- Urbanova D., Ressler J., Widimsky J., Ostadal B., Pelouch V., Prochazka J.: Pulmonary vascular changes induced by intermittent altitude hypoxia and their reversibility in rat. *Beitr. Pathol.* 50, 389-99 (1973)
- Wang J.Y., Wang J.Y.: Hypoxia/Reoxygenation induces nitric oxide and TNF-alpha release from cultured microglia but not astrocytes of the rat. *Chin. J. Physiol.* 50, 127-34 (2007)
- Widimský J., Urbanová D., Ressler J.: The effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in rat. *Cardiovasc. Res.* 7, 798-808 (1973)

- Wolin M.S., Gupte S.A., Neo B.H., Gao Q., Ahmad M.: Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling. *Cardiol. Rev.* 8, 89-93 (2010)
- Yokoyama T., Vaca L., Rossen R.D., Durante W., Hazarika P., Mann D.L.: Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J. Clin. Invest.* 92, 2303-12 (1993)
- Yokoyama T., Nakano M., Bednarczyk J., McIntyre B.W., Entman M., Mann D.L.: Tumor Necrosis Factor-alpha provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 95, 1247-52 (1996)
- Ytrehus K., Liu Y., Downey J.M.: Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol.* 266, H1145-52 (1994)
- Zhang C.: The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic. Res. Cardiol.* 103, 398-406 (2008)
- Zhong N., Zhang Y., Fang Q.Z., Zhou Z.N.: Intermittent hypoxia exposure-induced heat-shock protein 70 expression increases resistance of rat heart to ischemic injury. *Acta. Pharmacol. Sin.* 21, 467-72 (2000)
- Zhong N., Zhang Z., Zhu H. F., Wang J. C., Fang Q. Z., Zhou Z. N.: Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance by adaption to intermittent high altitude hypoxia. *Acta. Pharmacol. Sin.* 23, 305-310 (2002)
- Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z., Ding H.L., Zhou Z.N.: ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life. Sci.* 73, 1275-87 (2003)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka