

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

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Helena Jindrová

Vliv erythropoietinu na ischemické poškození srdce
Effects of erythropoietin on myocardial ischemic tolerance

Diplomová práce

Školitel:

Prof. RNDr. František Kolář, CSc.

Konzultant:

Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 06.05.2013

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. za odborné rady, trpělivost a podporu v období vzniku této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kristýně Slámové za cenné rady a pomoc nejen s metodou perfundovaného myšího srdce. Za podporu a konzultace děkuji rovněž doc. RNDr. Olze Novákové, CSc., a celému Oddělení vývojové kardiologie FgÚ AV ČR děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Chronická hypoxie zvyšuje odolnost myokardu k akutnímu ischemicko/reperfúznímu (I/R) poškození podobně jako aplikace exogenního erythropoietinu (EPO). Není však známo, zda se EPO indukovaný chronickou hypoxií uplatňuje v jejím kardioprotektivním mechanismu. Cílem práce bylo zjistit, zda jsou protektivní účinky exogenního EPO a chronické hypoxie aditivní. Dospělí samci myši kmene ICR byli vystaveni intermitentní hypobarické hypoxii 8 h denně, 5 dní v týdnu po dobu 5 týdnů. Stupeň hypoxie odpovídal 7000 m.n.m. Kontrolní zvířata byla po stejnou dobu chována v normoxickém prostředí. Odolnost k I/R poškození byla hodnocena podle rozsahu infarktu myokardu vyvolaného 45-min globální ischemií a 1-h reperfúzí srdce *in vitro*. 24 h před pokusem byl zvířatům podán EPO v dávkách 200 či 5000 U/kg tělesné hmotnosti. EPO významně omezil rozsah infarktu u normoxických zvířat již v dávce 200 U/kg ($33,56 \pm 2,93$ % vs. $25,71 \pm 2,29$ %). Adaptace na hypoxii zmenšila rozsah poškození na $23,49 \pm 2,30$ %, ale další protektivní účinek EPO se u hypoxických skupin již neprojevil. Výsledky naznačují, že exogenní EPO využívá stejné kardioprotektivní mechanismy jako adaptace na chronickou intermitentní hypoxii. Předběžné výsledky naznačují, že opakované podávání EPO po dobu tří týdnů nemá vliv na velikost infarktu.

Klíčová slova: myokard, hypoxie, kardioprotekce, erythropoietin, ischemie-reperfúze

Abstract

Adaptation to chronic hypoxia increases myocardial resistance to acute ischemia/reperfusion (I/R) injury, similarly to application of exogenous erythropoietin (EPO). Nevertheless, it is not known if EPO induced by chronic hypoxia plays a role in its cardioprotective mechanism. The aim of this study was to find out if protective effect of exogenous EPO adds up to protection offered by chronic hypoxia. Adult male mice (ICR) were adapted to intermittent hypobaric hypoxia 8 hours per day, 5 days per week for 5 weeks. The degree of hypoxia corresponded to 7000 metres. Control animals were housed for the same time in normoxic environment. Resistance to I/R injury was assessed according to size of myocardial infarction induced by 45-min global ischemia and 1-h reperfusion of the heart *in vitro*. Animals were treated 24 h before the experiment with 200 or 5000 U/kg EPO. Treatment with 200 U/kg EPO was sufficient to significantly limit infarct size in normoxic animals ($33,56 \pm 2,93$ % vs. $25,71 \pm 2,29$ %). Hypoxic adaptation decreased infarct area to $23,49 \pm 2,30$ %, but additive effect of EPO in hypoxic group was not detected. The results indicate that exogenous EPO employs the same cardioprotective mechanisms as adaptation to chronic intermittent hypoxia. Preliminary results indicate that repeated application of EPO for three weeks does not affect infarct size.

Keywords: myocardium, hypoxia, cardioprotection, erythropoietin, ischemia-reperfusion

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. Ischémie	11
2.1.1 Metabolické změny při ischémii	11
2.1.2 Funkční změny při ischémii	12
2.1.3 Letální buněčné poškození	12
2.2 Chronická hypoxie	14
2.2.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie	15
2.2.2 Kardioprotektivní mechanismy chronické hypoxie	16
2.3 Kardioprotektivní účinky erythropoietinu	20
2.3.1 Erythropoietin	20
2.3.2 Receptor pro erythropoietin (EPOR)	22
2.3.3 Kardioprotektivní účinky EPO	24
2.3.4 Modifikované molekuly EPO	27
2.3.5 Kardioprotektivní signalizace	28
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	31
4. MATERIÁL A METODY	32
4.1 Použité chemikálie:	32
4.2 Zvířata	32
4.2.1 Experimentální skupiny	33
4.3 PERFUZE IZOLOVANÉHO SRDCE	34
4.4 EXPERIMENTÁLNÍ PROTOKOL	36
4.5 STANOVENÍ VELIKOSTI INFARKTU	36
4.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	37
5. VÝSLEDKY	39
5.1 Určení kardioprotektivní dávky EPO	40
5.2 Vliv chronické hypoxie a jednorázového podání EPO	43
5.3 Působení chronického podávání EPO	49
6. DISKUZE	53
7.1 Metodické přístupy	53

7.2 Stanovení kardioprotektivní dávky EPO.....	54
7.3 Kardioprotektivní účinek kombinace chronické hypoxie a EPO.....	56
7. ZÁVĚR	59
8. POUŽITÁ LITERATURA	60

Seznam použitých zkratek

Δ EPOR	myš s expresí EPOR omezenou na hematopoietickou linii a endoteliální buňky
5-HD	5-hydroxydekanoát
ARNT (<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>)	podjednotka HIF
asialo-EPO	EPO bez zbytků kyseliny sialové
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BK _{Ca}	draslíkový kanál s vysokou vodivostí
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kináza II
cEPO	karbamylovaný EPO
CFU-E (<i>colony-forming unit erythrocyte</i>)	progenitorová buňka pro erytrocyt
E10.5	desátý den embryonálního vývoje
EPO	erythropoietin
EPOR	receptor pro erythropoietin
ERK1/2	extracelulárním signálem regulované kinázy 1 a 2
GM-CSF	granulocytární makrofágový kolonii stimulující faktor
GSK3- β	kináza glykogen syntázy 3 β
HBSP (<i>helix-B surface peptide</i>)	peptid napodobující vodný povrch helixu B molekuly EPO
HIF (<i>hypoxia inducible factor</i>)	hypoxií indukovaný faktor
HRE (<i>hypoxia response element</i>)	element vázající HIF
HSP70 (<i>heat shock protein 70</i>)	protein tepelného šoku 70
I/R	ischemie a následná reperfuze
IA (<i>infarct area</i>)	oblast infarktu
IHH	intermitentní hypobarická hypoxie
IL	interleukin
JAK2	Janusova kináza 2
JNK	c-Jun N-terminální kináza

K_{ATP}	draslíkový kanál citlivý na ATP
mK_{ATP}	mitochondriální K_{ATP}
sK_{ATP}	sarkolemální K_{ATP}
K_{Ca}	draslíkové kanály aktivované vápníkem
L-NAME	L-nitro-L-arginin methyl ester
LV (<i>left ventricle</i>)	levá komora
NF κ B (<i>nuclear factor κB</i>)	jaderný faktor κ B
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
eNOS	endoteliální NOS
iNOS	inducibilní NOS
p38 MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza p38
PCI (<i>percutaneous coronary intervention</i>)	perkutánní koronární intervence
PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLC	fosfolipáza C
pO ₂	parciální tlak kyslíku
PUFA (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)	polynenasycené mastné kyseliny
ROS (<i>reactive oxygen species</i>)	reaktivní formy kyslíku
SH2 (<i>Src homology 2</i>)	doména umožňující vazbu na fosfotyrosin
siRNA (<i>small interfering RNA</i>)	molekula RNA účastnící se RNA interference
STAT5 (<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>)	protein účastnící se signalizace a regulace transkripce
STEMI	infarkt myokardu s elevacemi úseků S-T
TNF- α (<i>tumor necrosis factor α</i>)	tumor nekrotizující faktor
TTC	2,3,5-trifenyltetrazolium chlorid

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění představují hlavní příčinu mortality ve vyspělých zemích včetně České republiky. Mezi nimi zaujímá přední místo ischemická choroba srdeční spolu se svou akutní formou, infarktem myokardu. I přes výrazné zdokonalení angioplastických a trombolytických postupů patří ischemické onemocnění srdce mezi největší nevyřešené problémy v oblasti veřejného zdraví.

V současné době se laboratoře klinické a experimentální kardiologie orientují na dvě základní oblasti – studium mechanismů, které vedou k poškození myokardu, a studium mechanismů, které tomuto poškození brání. Mezi tyto protektivní antiischemické mechanismy patří mimo jiné adaptace na chronickou hypoxii a podávání exogenního erythropoietinu. Ačkoli adaptace na chronickou hypoxii představuje účinnou ochranu proti ischemickému poškození, její molekulární mechanismy nejsou dostatečně objasněné, což brání jejich využití v klinické praxi.

Tato diplomová práce se věnuje možnému působení erythropoietinu v protektivním působení chronické hypoxie. Jelikož jeho endogenní produkce při adaptaci na hypoxii narůstá, je možné, že se tato molekula účastní kardioprotektivního působení chronické hypoxie. Hlubší porozumění této problematice by mohlo pomoci k novému pohledu možnosti zvýšení ischemické odolnosti myokardu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. *Ischémie*

Ischémie je obvykle definována jako nepoměr mezi dodávkou a spotřebou kyslíku a dalších substrátů. Tento stav je způsobený poklesem či zastavením průtoku krve. Příčinou mohou být aterosklerotické léze nebo se může jednat o náhlý následek trombózy či koronárního spasmu. Ischémie může být dočasná a reverzibilní nebo trvalá a ireverzibilní.

Ischémie je užší termín než hypoxie. Při ischémii nedochází - na rozdíl od dalších hypoxických stavů - k odstraňování metabolitů. Důležité je zejména hromadění laktátu a protonů jakožto produktů glykolýzy, což vede k rychlému poklesu pH. Navíc se ischémie týká pouze ohraničené oblasti myokardu, zatímco další typy hypoxie se obvykle týkají celého těla.

Ischémie se projevuje metabolickými, funkčními i strukturními poruchami. S postupujícím trváním ischémie dochází k závažným a nevratným změnám, které mohou vést až k srdečnímu selhání. Patologické změny lze dělit na ischemické poškození, vzniklé v průběhu vlastní ischémie, a reperfuční poškození, způsobené obnovením koronárního průtoku po déle trvající ischémii (Ošťádal a Kolář, 1999).

2.1.1 Metabolické změny při ischémii

Ischémie je ve své podstatě metabolickým jevem. Za normálních podmínek je energie získávána katabolismem substrátů (nalačno zejména volných mastných kyselin, po jídle dochází k většímu využití sacharidů, při tělesné zátěži je hlavním substrátem laktát) a ukládána ve formě vysokoenergetických fosfátových sloučenin – adenosin-5'-trifosfátu (ATP) a kreatinfosfátu. Nedostatek kyslíku způsobuje zastavení oxidativní fosforylace, což vede k rychlému vyčerpání energetických zásob a využití glykolýzy jako hlavního způsobu získávání energie. Glykolýza je málo efektivní - na jeden mol glukózy jsou produkovány pouze tři moly ATP, na rozdíl od 31 molů ATP produkovaných oxidativní fosforylací. Při glykolýze vzniká pyruvát, který je v mitochondriích přeměněn na laktát, konečný produkt anaerobní glykolýzy, který se v buňce hromadí. Využití glykolýzy je pouze dočasné – jelikož je znemožněné odstraňování metabolitů, tak dochází k hromadění protonů a poklesu pH, které je při dlouhotrvající ischémii tak silné, že glykolýzu nakonec inhibuje.

Brzy po začátku ischemie dochází ke zvýšení cytosolického Ca^{2+} , takzvanému vápníkovému přetížení. Většina tohoto vápníku pochází ze sarkoplazmatického retikula – zde dochází k jeho zvýšenému uvolňování (pravděpodobně v důsledku poškození membrány) a zhoršení jeho zpětného čerpání (není dostatek ATP pro aktivní transport). Menší část vápníku pochází také z extracelulárního prostoru (vstupuje do buňky výměnou za Na^+). Vápníkové přetížení je velmi závažným jevem, jelikož vápník má v buňce úlohu druhého posla. Dochází k aktivaci lysosomálních proteáz a fosfolipáz, které poškozují buněčné struktury. Také jsou aktivovány Ca^{2+} -dependentní ATPázy, což urychluje vyčerpání zásob ATP. Akumulace Ca^{2+} v oblasti kontraktálního aparátu vede k poruchám relaxace, které se projeví vzestupem koncového diastolického tlaku.

2.1.2 Funkční změny při ischemii

Při ischemii dochází k vymizení normální kontraktální funkce v postižené oblasti myokardu. To lze považovat za ochranný mechanismus, který výrazně snižuje energetické nároky, takže zbývá energie na udržení základních buněčných funkcí a je oddálen nástup nekrózy. Uprostřed ischemické oblasti dochází k dyskinezi (systolickému vyklenutí), po jejích okrajích k akinezi (vymizení kontrakce) či hypokinezi (oslabení kontrakce). To je doprovázeno hyperkontrakturou neischemické oblasti myokardu, která má kompenzační funkci.

Poškození membránových fosfolipidů, hromadění kladně nabitých iontů a laktátu vedou ke změnám iontové rovnováhy, které se projevují zkrácením akčního potenciálu a vznikem arytmií.

2.1.3 Letální buněčné poškození

S dobou trvání ischemie přibývá nevratných změn, které nakonec vedou k buněčné smrti. Smrt může probíhat jak mechanismem nekrózy, tak mechanismem apoptózy. Začíná v subendokardiální oblasti, a odtud postupuje k subepikardu.

Hlavní příčinou buněčné smrti je poškození buněčných membrán, ke kterému přispívají různé metabolické abnormality. Jednou z příčin je hromadění látek s detergentními účinky. Příkladem jsou lysofosfolipidy produkované fosfolipázami, které jsou aktivovány vysokou hladinou vápníku. Dalšími detergenty jsou meziproducty metabolismu mastných

kyselin s dlouhým řetězcem, jejichž oxidace je při nedostatku kyslíku zastavena. Útlumem dýchacího řetězce dochází k hromadění reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS), které poškozují mastné kyseliny v membráně. Poškozeny jsou také membrány buněčných organel, dochází k uvolnění lytických enzymů do nitra buňky a k autolýze.

V klinické praxi se ireverzibilní buněčné poškození sleduje stanovením enzymů uvolněných ze srdečních buněk do krevního oběhu.

2.2 Chronická hypoxie

Hypoxie je stav, při kterém dochází k nedostatku kyslíku, buďto v celém těle, nebo v určité tkáni. Chronická hypoxie může mít různé příčiny. O ischemické hypoxii pojednává minulá kapitola. Dalším typem je hypoxická hypoxie (pokles parciálního tlaku kyslíku (pO_2) v krvi), která se projevuje při pobytu ve vysoké nadmořské výšce a při některých patologických stavech. Kromě toho existuje ještě anemická hypoxie, u které je pO_2 normální, ale je snížena kapacita krve pro jeho transport, a histotoxická hypoxie, při které nejsou buňky schopny kyslík zužítkovat.

Hypoxická hypoxie je spojena s různými patologickými stavy, ale ve dvou případech ji lze pokládat za normální. Prvním z nich je život ve vysoké nadmořské výšce. Druhým případem je prenatální období vývoje, kdy je plod v těle matky vystaven prostředí s nízkým pO_2 (stupeň hypoxie odpovídá 8000 m.n.m.) (Ošťádal a spol., 1999).

Odpověď organismu na působení hypoxie je komplexní a zahrnuje mnoho mechanismů jako nárůst hematokritu a koncentrace hemoglobinu, změny energetického metabolismu (zvýšené využití sacharidů na úkor β -oxidace, která je z hlediska využití kyslíku méně výhodná), změny srdeční funkce a další. Projevují se jak rychlé signální mechanismy, tak působení na úrovni změn genové exprese.

Zvýšení kapacity krve pro přenos kyslíku je nejznámějším účinkem dlouhodobé hypoxie, a je tradičně považováno za efektivní způsob adaptace. Polycytémie spojená s nárůstem koncentrace 2,3-difosfoglycerátu, který vede k posunu disociační křivky pro kyslík vpravo, je při adaptaci na hypoxii pozorována jak u savců, tak u ptáků (Monge a Leon-Velarde, 1991). Tento efekt je způsobený nárůstem koncentrace erythropoietinu, o kterém blíže pojednává kapitola 2.3.1.

Tyto změny se týkají pouze živočichů pocházejících původně z nízkých nadmořských výšek. Savci a ptáci geneticky adaptovaní na vysokou nadmořskou výšku mají buďto normální nebo pouze mírně zvýšený hematokrit, takže nejsou ohroženi problémy plynoucími ze zvýšené viskozity krve. Zvýšený hematokrit tedy není pro adaptaci nezbytně nutný (Banchemo a spol., 1971).

2.2.1 Kardioprotektivní účinky chronické hypoxie

Kardioprotektivní jevy jsou jevy, které zvyšují odolnost myokardu vůči akutnímu ischemicko-reperfuznímu (I/R) poškození. Tyto jevy se mohou projevovat buďto jako zmenšení ložiska infarktu, omezení ischemických a reperfuzních arytmií, anebo jako zmenšení či odstranění postischemické kontraktilní dysfunkce.

V počátcích zájmu o kardioprotektivní účinky adaptace na vysokou nadmořskou výšku stály epidemiologické studie na obyvatelích Peru, žijících ve výšce 4000 m.n.m. (Hurtado, 1960). V této skupině obyvatel se infarkt myokardu vyskytuje výrazně méně než u obyvatel nížin. Další epidemiologická studie zjistila sníženou mortalitu na kardiovaskulární onemocnění i u lidí žijících ve 2000 m.n.m. (Mortimer a spol., 1977). Je však třeba upozornit, že ačkoli epidemiologické studie na lidech nenašly žádné jiné vysvětlení těchto pozorování, nelze je pokládat za kontrolované studie a nelze vyloučit, že se na protektivních účincích života ve vysoké nadmořské výšce podílí faktory životního stylu.

Tato pozorování byla potvrzena v různých experimentálních studiích. V nich může být modelem buďto přímo vysokohorské prostředí nebo laboratorní podmínky simulované v normobarické (změna složení plynů) či hypobarické (snížení pO_2 částečným odčerpáním vzduchu) komoře. První z nich provedli v Praze v roce 1958 Kopecký a Daum (Kopecký a Daum, 1958). Tyto pokusy potvrdily, že dlouhodobá adaptace na hypoxii má protektivní účinek na srdce vystavené akutní anoxii.

Protektivní účinky se netýkají pouze permanentní adaptace na hypoxii, ale také intermitentní hypoxie (opakované vystavování hypoxii). Tento efekt může mít i relativně krátká denní expozice (4 hodiny denně, celkem 24 expozic) (McGrath a spol., 1973; Widimský a spol., 1973). V tomto případě je pro výsledný účinek důležité trvání jednotlivých expozic, jejich intenzita, počet opakování a celková délka adaptace, přičemž účinky mohou být pozitivní i negativní. Na konkrétních parametrech intermitentní hypoxie závisí hlavně účinky na arytmie vyvolané akutní ischemií (Asemu a spol., 2000). Milano a spol. (2002) porovnali u potkanů účinky adaptace na kontinuální hypoxii a na intermitentní hypoxii, ve které doba reoxygenace tvořila jednu hodinu denně. I přes tento relativně malý rozdíl měla adaptace na intermitentní hypoxii výraznější prospěšné účinky na odolnost srdečních funkcí k I/R poškození. Oproti tomu práce Neckáře a spol. (2013) zjistila protektivní účinky u potkanů adaptovaných na kontinuální normobarickou hypoxii a vystavení normoxickým podmínkám na jednu hodinu denně tyto protektivní účinky odstranilo. Působení kontinuální hypoxie a krátké reoxygenace tedy zůstává kontroverzním tématem.

Výrazné protektivní účinky proti I/R poškození byly zjištěny také u krátkodobých opakovaných cyklů hypoxie a normoxie – psi byli po dvacet dní vystaveni pěti až osmi denním cyklům hypoxie (5-10 minut) střídané s čtyřminutovou normoxií. Tato adaptace pozitivně ovlivnila jak velikost infarktu, tak funkční parametry (Zong a spol., 2004). S dalším zkracováním hypoxických a reoxygenačních intervalů však protektivní účinky nenarůstají. Pokud byli potkani vystaveni opakovaným minutovým cyklům (40 vteřin hypoxie, 20 vteřin normoxie) trvajícím osm hodin denně, tak jejich citlivost k I/R poškození srdce (stanovená dle rozsahu infarktu) vzrostla více než dvojnásobně. Toto uspořádání experimentu je modelem spánkové apnoe, která často doprovází srdeční onemocnění. Výsledky jsou v souladu s pozorováními z klinické praxe, kdy léčba spánkové apnoe výrazně zlepšuje výsledky celkové léčby u pacientů se srdečními chorobami (Joyeux-Faure a spol., 2005).

V odpovědi na hypoxii také existují pohlavní rozdíly. Ačkoli se kardioprotektivní účinky rozvinou u obou pohlaví, je výsledná rezistence vůči ischemickému poškození vyšší u samic. Lze tedy říci, že dochází ke zvýšení odolnosti, ale pohlavní rozdíly zůstávají zachovány (Ošťádal a spol., 1984).

Zvýšená odolnost vůči ischemickému poškození myokardu je rozvinutá také u novorozenců, díky prenatální adaptaci na prostředí s nízkým pO_2 . Po narození odolnost rychle klesá, ale zároveň vzniká schopnost reagovat na působení protektivních mechanismů (Ošťádal a spol., 1999).

Důležitou vlastností adaptace na hypoxii je skutečnost, že adaptivní změny (včetně kardioprotektivních) přetrvávají relativně dlouhou dobu po poslední expozici. Není známo, za jak dlouho dochází k úplné ztrátě protekce, ale mírně zvýšená odolnost vůči I/R poškození přetrvává nejméně 35 dní. Toto se však týká jen velikosti infarktu, zatímco antiarytmické účinky se ztrácejí již během prvního týdne v normoxických podmínkách (Neckář a spol., 2004). U králíků adaptovaných na hypoxii prvních deset dní po narození přetrvaly kardioprotektivní účinky nejméně dvacet dní od skončení hypoxie (Fitzpatrick a spol., 2005).

2.2.2 Kardioprotektivní mechanismy chronické hypoxie

Dnes je známo, že adaptace na hypoxii může chránit myokard před všemi základními projevy I/R poškození, tzn. vznikem infarktu, poruchami kontraktility a arytmiemi. Otázkou zůstává molekulární podstata protektivního mechanismu. Na experimentální úrovni byla již prokázána úloha některých faktorů, zatímco u jiných, potenciálně důležitých, zatím přesvědčivé důkazy scházejí.

Nelze vyloučit, že role různých faktorů je buďto druhově specifická nebo se liší v závislosti na stupni hypoxie či jejím typu (stálá či intermitentní, délka jednotlivých expozic atd.). Hypoxie nejen aktivuje signální dráhy, ale také ovlivňuje úroveň genové exprese jejich komponent, např. přes HIF-1 α (*hypoxia inducible factor α* , viz kapitola 2.3.1).

Dle současných poznatků mají důležité postavení draslíkové kanály citlivé na ATP (K_{ATP}), které jsou v hypoxii aktivované. Kardiomyocyty obsahují dva podtypy - sarkolemální (sK_{ATP}) a mitochondriální (mK_{ATP}), které mohou být odlišeny na základě citlivosti k různým farmakologickým modulátorům. Selektivní blokátor mK_{ATP} kanálů, 5-hydroxydekanoát (5-HD), vedl u hypoxických potkanů k úplné ztrátě protekce (ve smyslu velikosti infarktu i funkčních parametrů), zatímco u normoxických kontrol byl bez účinku. Selektivní aktivátory těchto kanálů, diazoxid nebo BMS-191095, měly naopak protektivní účinky u normoxických zvířat, ale u hypoxických zvířat k žádnému dalšímu zlepšení nedošlo (Neckář a spol., 2002). Dále se tyto kanály zřejmě podílejí i na antiarytmických účincích, jelikož 5-HD zabránil zmírnění arytmií u *in vitro* perfundovaného srdce z hypoxických zvířat, zatímco diazoxid měl antiarytmické účinky u normoxických (ale nikoli u hypoxických) srdcí (Asemu a spol., 1999). Tyto výsledky naznačují, že mK_{ATP} se účastní ochrany před všemi základními následky I/R poškození. Tato vlastnost však může být druhově či ontogeneticky specifická, jelikož u králíků se pravděpodobně uplatňují jak mK_{ATP} , tak sK_{ATP} . Podání 5-HD hypoxickým neonatálním králíkům vedlo pouze k částečnému odstranění protektivních účinků; pro plné odstranění bylo nutné současné podávání 5-HD a HMR 1098 (selektivní blokátor sK_{ATP}) (Kong a spol., 2001).

Další molekulou, která by mohla hrát roli v protektivních účincích adaptace na hypoxii, jsou mitochondriální vápníkem aktivované draslíkové kanály s vysokou vodivostí (BK_{Ca}). Podávání paxillinu (selektivní blokátor BK_{Ca}) oslabilo zvýšenou odolnost kardiomyocytů z hypoxických potkanů, zatímco působení NS-1619 (aktivátor BK_{Ca}) vedlo ke zvýšené odolnosti buněk z normoxických potkanů. Protektivní účinky hypoxické adaptace a NS-1619 se dále nesčítaly (Borchert a spol., 2011). Prospěšné účinky NS-1619 se projevily u kardiomyocytů z potkanů vystavených hodinové reoxygenaci denně. Jelikož se u těchto zvířat neprojevily protektivní účinky adaptace na hypoxii, je možné, že reoxygenace v principu zabránila otevření BK_{Ca} kanálů (Neckář a spol., 2013).

Role oxidu dusnatého (NO) v působení chronické hypoxie je dosud kontroverzní. Adaptací na hypoxii roste exprese syntázy oxidu dusnatého (NOS) v myokardu, což je

způsobeno tím, že geny pro NOS jsou pod kontrolou HIF-1 α . Zároveň je však produkce NO limitována nedostatkem O₂, který je substrátem pro NOS (Manukhina a spol. 2006). Není jisté, kterou isoformou NOS je produkován NO v ischemickém myokardu. Pro dosažení pozitivních účinků musí být NO ve vhodné koncentraci – příliš vysoká či příliš nízká je škodlivá. To může být důvodem, proč byla zjištěna protektivní funkce jak NO donorů, tak inhibitorů NOS (Kolář a Ošťádal, 2004).

Intermitentní hypoxie je spojená se zvýšenou produkcí ROS. Ačkoli je oxidační stres obvykle pokládán za škodlivý, dnes se zdá, že se ROS podílejí na vzniku hypoxií indukované kardioprotekce. Podávání antioxidantu (N-acetylcystein) během adaptace na intermitentní hypoxii výrazně omezilo její schopnost zmenšit velikost infarktu (Kolář a spol., 2007). Stejný účinek mělo vystavení hyperkapnii (která je známá svými antioxidačními účinky) během adaptace na chronickou hypoxii (Neckář 2003). Skutečnost, že se výraznější protektivní účinky projeví na srdcích potkanů vystavených v průběhu hypoxické adaptace 60 minutám normoxie denně než na srdcích z trvale hypoxických zvířat, by mohla být vysvětlena potřebou ROS signalizace pro aktivaci některých protektivních drah (Milano 2002).

Protektivní účinky ROS mohou alespoň částečně souviset s mK_{ATP}. Zdá se totiž, že aktivace mK_{ATP} vede ke spuštění signální kaskády s pozitivní zpětnou vazbou, která udržuje kanály otevřené.

V kardioprotektivních účincích chronické hypoxie byla zvažována celá řada kináz, například protein kináza C (PKC), mitogeny aktivovaná protein kináza p38 (p38 MAPK), c-Jun N-terminální kináza (JNK), fosfatidylinositol-3 kináza/Akt (PI3K/Akt), protein kináza A (PKA), Ca²⁺/kalmmodulin dependentní kináza II (CaMKII) a jiné. Jasně důkazy existují pouze pro působení PKC, přičemž role jednotlivých jejích isoform zůstává nedostatečně objasněná.

Podání rottlerinu (specifický inhibitor PKC δ) nebo chelerythrinu (obecný inhibitor PKC) před ischemií u potkana vedlo k zablokování protektivního účinku adaptace na hypoxii (Neckář a spol., 2005). Adaptace na IHH (intermitentní hypobarickou hypoxii) odpovídající 7000 m.n.m. vedla k translokaci PKC δ na membrány, přičemž tento jev je závislý na produkci ROS, jelikož podávání antioxidantu v průběhu adaptace ho odstranilo (Kolář a spol. 2007). Stejně tak tomuto efektu zabránila dieta s n-6 PUFA (*polyunsaturated fatty acids*, polynenasycené mastné kyseliny) jakožto zdrojem tuků, ale nikoli dieta s n-3 PUFA (Hlaváčková a spol., 2007). Naopak při stejné adaptaci pokleslo množství PKC ϵ translokované na membrány (Kolář a spol., 2007, Hlaváčková a spol., 2007). U neonatálních

králíků byly výsledky opačné, při adaptaci na kontinuální normobarickou hypoxii došlo naopak ke zvýšení hladiny PKC ϵ a její translokaci na membrány (Rafiee a spol., 2002).

V řadě prací vedlo podání obecného inhibitoru PKC (chelerythrine nebo calphostin C) před ischemií k úplnému odstranění protektivních účinků adaptace na hypoxii (Rafiee a spol., 2002, Ding a spol., 2004, Neckář a spol., 2005, Li a spol., 2007). Tudíž je nutné, aby PKC byla aktivní v průběhu ischemie. Pokles membránově lokalizované PKC ϵ u potkana je nezávislý na interferencích které blokují protektivní účinky, jako podávání antioxidantů nebo dieta s n-6 PUFA, což naznačuje, že tento jev není pro kardioprotektivní účinky hypoxie příliš důležitý (Kolář a spol. 2007, Hlaváčková a spol. 2007).

2.3 Kardioprotektivní účinky erythropoietinu

2.3.1 Erythropoietin

Již více než jedno století uplynulo od doby, kdy byl vysloven předpoklad o existenci humorálního faktoru zodpovědného za produkci červených krvinek. Carnot a Deflandre (1906) provedli experimenty, při kterých použili plasmu z králíků, u nichž vyvolali krvácení. Tato plasma byla aplikována neovlivněným příjemcům, u kterých se po krátké době projevila výrazná retikulocytóza. Předpokládalo se, že erythropoieticky aktivní plasma z krvácejících králíků vyvolala produkci červených krvinek a neznámý faktor zodpovědný za tento účinek byl nazván hematopoietin. Tyto výsledky potvrdilo několik dalších výzkumníků, včetně Hjorta (1936), který pomocí plasmy z anemických králíků vyvolal retikulocytózu. V roce 1950 publikoval Reissmann jeden z nejvýznamnějších článků ve výzkumu EPO (Reissmann, 1950). V té době byl obecně přijímán názor, že produkce červených krvinek je regulována parciálním tlakem kyslíku v arteriální krvi, ale nebylo známo, zda ovlivňuje přímo kostní dřeň anebo působí přes humorální faktor. Reissmann použil parabiotické potkany – umělá siamská dvojčata – a ve speciální komoře nechal jednoho potkana dýchat normální vzduch a druhého vzduch s nízkým obsahem kyslíku. Za těchto podmínek došlo u obou potkanů ke vzniku retikulocytózy a hyperplázie kostní dřeně, což podpořilo teorii o humorální regulaci. O tři roky později Erslev provedl sérii experimentů s transfuzemi velkých objemů plasmy z hypoxických i normoxických zvířat (Erslev, 1953). V té době totiž proti teorii o působení humorálního faktoru stála teorie o tom, že tělo vnímá relativní anemii způsobenou naředěním krve přijatou plazmou. Tyto experimenty ukázaly, že samotné naředění krve přijatou plazmou pocházející z normoxických zvířat nemá žádný vliv na produkci červených krvinek, což významně podpořilo teorii o humorální regulaci.

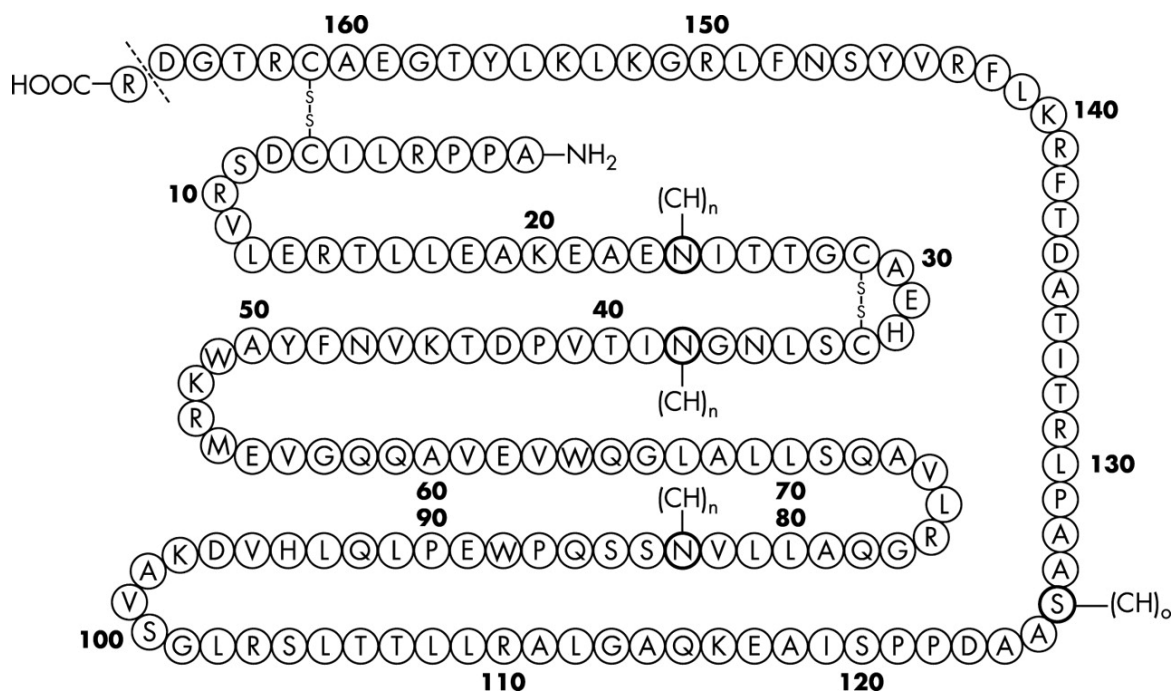
Místo produkce tohoto faktoru zůstávalo neznámé. V roce 1957 Fried a Plzak provedli pokusy na ledvinách. Inspiroval je k tomu rozhovor s Krantzem, v té době studentem medicíny, který si všiml, že pacienti s chronickým selháním ledvin jsou anemičtí, zatímco pacienti s nádory ledvin jsou polycytemičtí, a navrhl, že ledviny by mohly být zdrojem EPO (Fisher, 1998). Následně bylo zjištěno, že odstranění obou ledvin zabrání zvýšení plazmatické hladiny EPO v odpovědi na hypoxii vyvolanou kobaltem nebo krvácením (Jacobson a spol., 1957). Tyto výsledky potvrdili o několik let později Fisher a Birdwell (1961), když použili model perfundované ledviny. Tyto práce potvrdily, že ledviny jsou místem produkce EPO, ale stále nebylo jisté, zda ledviny produkují přímo EPO nebo nějaký enzym, který účinný faktor

vytváří z plazmatického prekursoru (Erslev, 1974). Erslev provedl pokusy na izolovaných perfundovaných ledvinách odebraných ze zvířat, která byla předtím vystavena hypoxii, a zjistil, že ledviny produkují EPO bez ohledu na to, zda perfuzát obsahuje plazmatické proteiny. V roce 1977 bylo zjištěno, že ve fetálním období jsou primárním zdrojem EPO játra (Zanjani a spol., 1977). Ve stejném roce se také podařilo z moči purifikovat lidský EPO (Miyake a spol., 1977).

Jako definitivní důkaz místa produkce EPO posloužila *in situ* hybridizace, která zároveň ukázala, že EPO produkují peritubulární buňky, nikoli buňky glomerulární či tubulární (Lacombe a spol., 1988). Použití *in situ* hybridizace bylo možné díky naklonování genu pro EPO, které se v roce 1985 zdařilo dvěma skupinám nezávisle na sobě (Jacobs a spol., 1985; Lin a spol., 1985). Zároveň tyto práce definitivně prokázaly, že ledviny vytvářejí hotový produkt, který už nevyžaduje další modifikaci.

Erythropoietin je glykoprotein, který je kódován v délce 193 aminokyselin, z toho 27 aminokyselin tvoří signální sekvenci (Lai a spol., 1986). Dále je při vstupu do cirkulace odštěpen N-terminální arginin, takže aktivní hormon má 165 aminokyselin (Recny a spol., 1987). Molekulová hmotnost samotného peptidu je 18 399 Da, ale je silně glykosylován, takže výsledná hmotnost je zhruba 30 400 Da (Davis a spol., 1987; Lai a spol., 1986). EPO obsahuje celkem čtyři postranní řetězce oligosacharidů, z nichž tři jsou vázané přes dusík a jeden přes kyslík (Broudy a spol., 1988). Cukerné zbytky, zejména kyselina sialová, jsou pro funkci EPO velmi důležité – ačkoli samotný peptid dokáže aktivovat receptor EPO, glykosylace je nutná pro stabilizaci v krevním oběhu, která mu umožní dosáhnout k cílovým buňkám (Dordal a spol., 1985). EPO obsahuje čtyři cysteiny, které tvoří dva disulfidické můstky (Lai a spol., 1986).

Exprese EPO je regulována hladinou kyslíku (Fisher, 2003). Gen pro EPO obsahuje HRE (*hypoxia response element*), což je vysoce konzervovaná sekvence vyskytující se u většiny, ne-li u všech genů ovlivňovaných hypoxií. Na HRE se váže transkripční faktor HIF-1, který se skládá ze dvou podjednotek, HIF-1 α a HIF-1 β . Podjednotka HIF-1 β je konstitutivně exprimována a je známa také jako ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Podjednotka HIF-1 α je za normoxických podmínek hydroxylována prolin hydroxylázou závislou na železe a kyslíku, což je reakce, která vede k její ubiquitylaci a rychlé degradaci v proteasomu. Za hypoxických podmínek klesá degradace HIF-1 α , obě podjednotky se spojují a za pomoci dalších proteinů aktivují transkripci genu pro EPO.



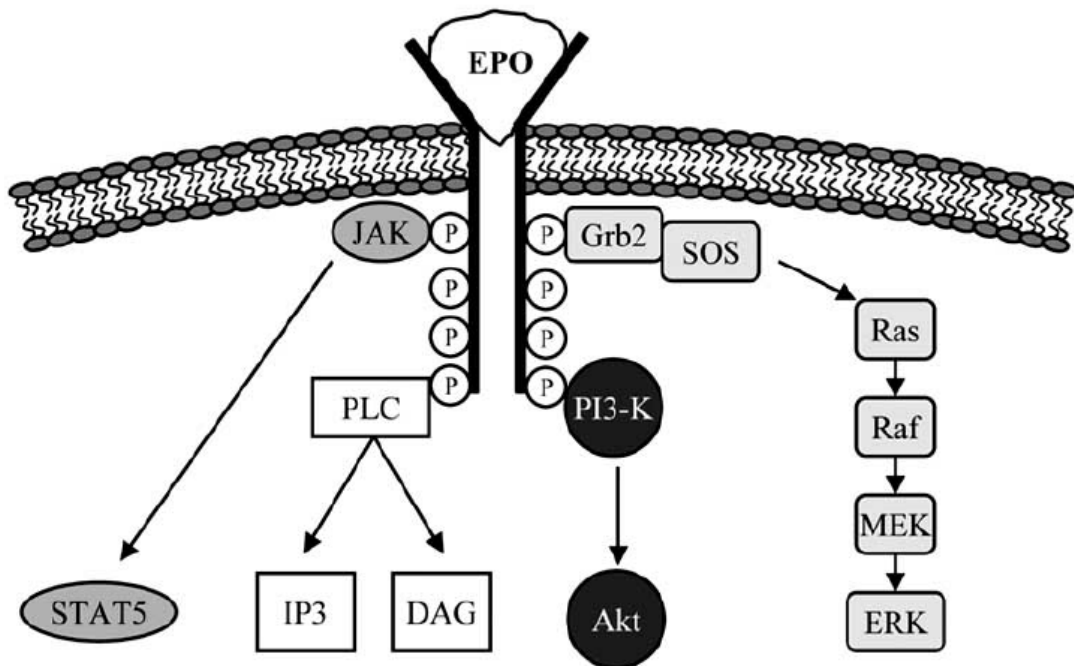
Obr. 1. Erythropoietin. Převzato z Ng a spol., 2003.

2.3.2 Receptor pro erythropoietin (EPOR)

Receptor pro EPO je transmembránový receptor o hmotnosti v rozmezí 66-78 kDa, který má podobu preformovaného homodimeru s konstitutivně asociovanými Janusovými kinázami 2 (JAK2) v intracelulární části (Livnah a spol., 1999). Jedná se o receptor z I. třídy cytokinových receptorů, který má jeden krátký transmembránový segment a postrádá vnitřní kinázovou aktivitu. V neaktivní konformaci jsou od sebe oba intracelulární segmenty příliš vzdálené, ale vazba EPO vede ke změně konformace, při které se segmenty k sobě přiblíží a JAK2 se navzájem aktivují fosforylací. Aktivní JAK2 dále fosforyluje osm tyrosinových zbytků na každé podjednotce vlastního receptoru, které pak slouží jako vazebná místa pro různé proteiny s SH2 (*Src homology 2*) doménou (Miura a spol., 1991). Tyto proteiny mohou být opět aktivovány pomocí JAK2. Signalizace přes EPOR často vede k aktivaci PI3K, extracelulárním signálem regulovaných kináz 1 a 2 (ERK1/2) a fosfolipázy C (PLC). Kromě toho JAK2 přímo aktivují transkripční faktor STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) (Livnah a spol., 1999).

EPOR se na erythroidních progenitorech vyskytuje v počtu zhruba 200 receptorů na buňku, ale v některých fázích vývoje počet narůstá i na 1000 receptorů na buňku (D'Andrea a Zon, 1990). Toto relativně nízké množství receptorů je pro hematopoietické cytokiny charakteristické. EPOR se vyskytuje zejména na buňkách mezi stádií CFU-E (*colony-forming*

unit erythrocyte) a pronormoblastu. S postupující diferenciací EPOR ubývá a retikulocyty a erytrocyty již neobsahují žádný.



Obr. 2. Receptor pro erythropoietin a jeho signalizace. Převzato z Burger a spol., 2009. DAG, diacylglycerol; EPO, erythropoietin; ERK, extracelulárním signálem regulovaná kináza; IP3, inositol trifosfát; JAK, Janusova kináza; MEK, kináza mitogenem aktivované protein kinázy; PI3K, fosfatidylinositol-3 kináza; PLC, fosfolipáza C; SOS, Son of Sevenless

Jak EPO, tak jeho receptor jsou pro přežití nezbytné – myši knockouty EPO i EPOR mají výrazné defekty v krvetvorbě a umírají kolem třináctého dne embryonálního vývoje (Wu a spol., 1995). Kromě toho mají tato zvířata narušený vývoj srdce, mozku a cév. Oba typy knockoutů trpí komorovou hypoplasií, která je zřejmě zapříčiněna menším množstvím proliferujících kardiomyocytů (Wu a spol., 1999). Delece EPOR se projevuje na mozku již v desátém dni embryonálního vývoje (E10.5), pokračuje výraznou apoptózou neuronů v E12.5 a končí smrtí v E13.5 (Yu a spol., 2002). Delece jak EPO, tak EPOR vede k těžkým poruchám angiogeneze, ale na vaskulogenezi nemá vliv (Kertesz a spol., 2004). V této souvislosti je zajímavé, že selektivní obnovení exprese EPOR pouze v erythroidní linii dává vznik myším, které se vyvíjejí normálně a jsou plodné (Suzuki a spol., 2002).

Kromě „klasického“ receptoru v podobě homodimeru byl později objeven také heterodimerický receptor sestávající z receptoru pro EPO a beta podjednotky CD131

receptoru (Jubinsky a spol., 1997). Tato podjednotka je mimo jiné součástí receptorů pro GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), interleukin 3 (IL-3) a interleukin 5 (IL-5). Důležitost interakce s EPOR byla původně zpochybněna, když bylo zjištěno že knockouty CD131 mají normální krevetvorbu (Scott a spol., 2000). Tkáňově protektivní účinky neerytropoietických derivátů EPO, které se neváží k homodimerickému receptoru, jako například karbamylovaný EPO (cEPO), však vedly k myšlence, že heterodimerický receptor je zodpovědný za tkáňovou protekci, nikoli za krevetvorbu. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že EPO ani cEPO nejsou u CD131 knockoutované myši protektivní v modelu staurosporinem indukované apoptózy kardiomyocytů (Brines a spol., 2004). Signální kaskáda aktivována heterodimerním receptorem zatím nebyla přesně popsána (Burger a spol., 2009).

2.3.3 Kardioprotektivní účinky EPO

Zásadní a nepostradatelnou úlohou EPO je role v erythropoezi, ale později byly objeveny také významné tkáňově protektivní účinky, které se uplatňují v mnoha různých patologických situacích – jsou známé v ischemickém poškození nervové tkáně (Sakanaka a spol., 1998) či sítnice (Grimm a spol., 2005), při Alzheimerově chorobě (Chong a spol., 2005), ischemickém poškození ledviny (Patel a spol., 2004), Parkinsonově chorobě (Xue a spol., 2007), jaterní ischemii (Sepodes a spol., 2006) a srdeční ischemii (Calvillo a spol., 2003).

V roce 2003 dvě pracovní skupiny nezávisle na sobě zkoumaly účinky EPO na srdce vystavené ischemii vyvolané okluzí koronární artérie: Calvillo a spol. (2003) na potkanech a Parsa a spol. (2003) na králících. Calvillo a spol. (2003) nezjistili po podání EPO významné zmenšení rozsahu akutního infarktu, jehož velikost byla stanovena po čtyřhodinové reperfuzi. Protektivní účinky se projeví až po sedmi dnech, kdy byla ztráta kardiomyocytů o 50% menší než u kontrolních zvířat, což vedlo k normalizaci hemodynamických funkcí. Skutečnost, že se na akutním infarktu neprojeví žádné protektivní účinky, je v rozporu s většinou pozdějších studií na toto téma. Lze uvažovat o tom, že velikost infarktu v těchto experimentech, která činila 15-20% levé komory, byla příliš malá. V experimentech na kardiomyocytech vystavených hypoxii bylo zjištěno, že EPO snižuje počet apoptotických buněk, ale na nekrozu buněk nemá vliv (Calvillo a spol., 2003). Parsa a spol. (2003) zjistili, že podání EPO králíkům vedlo ke zmenšení infarktu i k funkčnímu zlepšení. V této práci bylo použito jednorázové podání vysoké dávky EPO, které nevyvolalo erythropoezu. Jednalo se o významný výsledek, protože podpořil v té době novou představu o tom, že protektivní účinky

EPO lze oddělit od účinků na hematokrit. V této práci byla také zjištěna aktivace JAK-STAT3, ERK 1/2 a PI3K/Akt, ale jejich role nebyla podrobně zkoumána (Parsa a spol., 2003).

Následovala řada prací, které potvrdily protektivní účinky EPO na rozsah infarktu myokardu. Výjimku tvoří práce z roku 2005, ve které Hale a spol. zkoumali účinky EPO šest týdnů po trvalé okluzi koronární arterie a nepozorovali žádné prospěšné účinky na velikost infarktu nebo srdeční funkci (Hale a spol., 2005).

Jednotlivé experimenty se mezi sebou liší jak použitými pokusnými zvířaty a protokoly I/R, tak dávkováním a načasováním podání EPO, proto je obtížné je mezi sebou navzájem porovnávat. Jednou z možností, která se v literatuře opakovaně objevuje, je podání jednotlivé velké dávky EPO 24 hodin před ischemií. Tento způsob podání má protektivní účinky na potkaním modelu I/R *in vivo* (Liu a spol., 2006; Xu a spol., 2005) i *in vitro* (Cai a spol., 2003). Stejně tak je efektivní na myším modelu I/R *in vivo* (Burger a spol., 2006).

Další častou možností je podání EPO na počátku ischemie nebo krátce před jejím začátkem (obvykle 15 minut). V tomto případě bylo protektivní jednorázové podání velké dávky krátce před ischemií u potkana *in vivo* (Nishihara a spol., 2006) anebo přidání EPO do perfuzátu krátce před ischemií u potkaního srdce *in vitro* (Cai and Semenza, 2004). Dalším efektivním protokolem bylo přidání EPO v dávce 10 U/ml do perfuzátu *in vitro* potkaního srdce krátce před ischemií a následně během celé reperfuze (van der Meer a spol., 2005).

Jiné práce používají aplikaci EPO pouze během reperfuze nebo krátce před ní. Tento postup byl účinný na potkaním srdci *in vitro* i *in vivo* (Bullard a spol., 2005). Při podání erythropoietinu v reperfuzi se projevíly pozitivní účinky, i když nebyly tak výrazné jako při podání před ischemií (Hanlon a spol., 2005). Podání EPO v reperfuzi bylo účinné také na psím modelu *in vivo* (Hirata a spol., 2005).

Moon a spol. (2006a) provedli sérii experimentů, ve kterých jednorázové podání EPO potkanům vyvolalo zmenšení rozsahu infarktu při trvalé okluzi koronární arterie. V tomto případě byla velikost infarktu stanovena až čtyři týdny po okluzi. Bez zajímavosti není nále, že jednorázová dávka EPO vedla ke zmenšení infarktu, zatímco opakované podávání EPO po dobu sedmi dnů nevedlo ke statisticky významnému rozdílu oproti kontrolním zvířatům (Moon a spol., 2006a). Také v jiných studiích používajících model trvalé okluzi koronární arterie u potkana měl EPO pozitivní účinky na rozsah infarktu a srdeční funkci (van der Meer a spol., 2005; Nishiya a spol., 2006).

Zajímavý vhled do mechanismu působení EPO poskytla recentní práce Tenga a spol. (2011). Tato skupina použila model myši s expresí EPOR omezenou pouze na hematopietickou linii a endoteliální buňky (Δ EPOR myš) a zjistila u těchto myší stejnou

míru EPO-indukované protekce jako u kontrolních zvířat, což je první důkaz toho, že endoteliální odověď je postačující pro vyvolání kardioprotektivních účinků (Teng a spol., 2011).

Lipsic a spol. (2006) provedli klinickou studii, ve které byl EPO podán pacientům s akutním infarktem myokardu podstupujícím perkutánní koronární intervenci (PCI). V této studii se EPO ukázal jako bezpečný a dobře tolerovaný, což otevřelo dveře dalším klinickým studiím. V roce 2011 byla provedena klinická studie na 222 pacientech s infarktem myokardu s elevacemi úseků S-T (STEMI), kterým byl jednorázově podán EPO v dáce 60 000 U (zhruba 750 U/kg). EPO byl podán do čtyř hodin po úspěšné PCI. Do studie byli zahrnuti pouze pacienti, kteří podstoupili PCI do osmi hodin od nástupu ischemických symptomů. V této studii nevedlo podání EPO ke zmenšení infarktu a naopak se vyskytlo větší množství nepříznivých vedlejších účinků oproti skupině, které bylo podáno placebo (Najjar a spol., 2011). Tato studie následně inspirovala práci zabývající se terapeutickým oknem pro použití EPO, což je téma, kterému byla do té doby věnována jen malá pozornost. V této studii byl u potkanů vyvolán infarkt buďto trvalou okluzí koronární arterie nebo okluzí s následnou reperfuzí. Podání EPO v dávce 3000 U/kg v okamžiku reperfuze vedlo k výraznému snížení velikosti infarktu o 50% oproti kontrolám, zatímco podání čtyři hodiny po reperfuzi (tedy šest hodin po dočasné okluzi) nebo šest hodin po trvalé okluzi již nemělo žádné účinky (Talan a spol., 2012). Problémem klinického využití je tedy velmi dlouhá doba mezi nástupem příznaků a podáním EPO, které by mělo následovat co nejdříve po potvrzení diagnózy STEMI. V USA se čas mezi nástupem příznaků a PCI pohybuje kolem tří hodin (Gibson a spol. 2008); za těchto podmínek by tedy bylo žádoucí podat EPO ještě před PCI.

Dřívější práce, která se zabývala problematikou terapeutického okna, zjistila prospěšné účinky u dávky 3000 U/kg, pokud byla podána čtyři, osm i dvanáct hodin po trvalé okluzi koronární arterie, ale dávka 150 U/kg byla účinná pouze pokud byla podána do čtyř hodin (Moon a spol., 2005). Je tedy možné, že dávky použité v některých klinických studiích byly vzhledem k časovému zpoždění nedostatečné.

Výsledky různých klinických studií jsou nesourodé a liší se i podmínky, za kterých byly provedeny, proto je obtížné je vzájemně porovnávat. Ve studii, kterou provedli Taniguchi a spol. (2010), bylo pozorováno zlepšení srdeční funkce a zmenšení rozsahu infarktu, bez negativních vedlejších účinků. V jiné studii EPO zmenšil velikost infarktu a vyvolal zvýšenou expresi antiapoptotických proteinů Akt a NFκB (*nuclear factor κB*) (Ferrario a spol., 2011). Také byly zjištěné dlouhodobé prospěšné účinky. Ve studii, která zkoumala vývoj srdeční funkce šest měsíců po infarktu myokardu, se projevilo významné

zlepšení u pacientů, kterým byl po PCI podán EPO v dávce 12 000 U (Ozawa a spol., 2010). Jiné studie tohoto typu ale žádné prospěšné účinky nezjistily. Ve studii, ve které byl podán EPO v dávce 50 U/kg, se neprojevíly pozitivní účinky na rozsah infarktu, ale ani žádné vedlejší účinky ve smyslu hypertenze či zvýšené srážlivosti krve (Suh a spol., 2011). Zde je však nutné vzít v úvahu, že použitá dávka byla výrazně nižší než v předcházejících laboratorních studiích. Kromě toho časovou hranicí pro zařazení do studie bylo dvanáct hodin od nástupu bolesti na hrudi, což může být příliš pozdě. V jiné studii nejen že se neprojevíly pozitivní účinky na rozsah infarktu či na srdeční funkci, ale naopak se ve skupině, které byl podán EPO, objevilo větší množství nežádoucích komplikací (Ott a spol., 2010). V jiné studii se naopak u skupiny, již byl podán EPO, projevilo méně nežádoucích účinků. Nicméně ani v této studii neměl EPO pozitivní účinky na srdeční funkci (Voors a spol., 2010). Podání 30 000 U EPO ihned před léčbou – v tomto případě koronární trombolýzou – také nemělo pozitivní účinky na rozsah infarktu (Binbrek a spol., 2009). Výsledky jednotlivých klinických studií jsou tedy protichůdné a lze předpokládat, že efektivita EPO silně závisí na dávce a načasování aplikace.

2.3.4 Modifikované molekuly EPO

Primárním účinkem EPO je zvýšení množství červených krvinek, které však může vést k trombotickým komplikacím. Z tohoto důvodu budí zájem možnost modifikovat molekulu EPO tak, aby si zachovala tkáňově protektivní účinky, ale nikoli schopnost aktivovat erytropoezi.

Pro dosažení těchto vlastností může být využita skutečnost, že EPO je stabilizován pomocí zbytků kyseliny sialové, díky kterým má plazmatický poločas zhruba 5,8 hodin. Odstranění všech zbytků pomocí enzymu sialidázy vede ke vzniku asialo-EPO s plazmatickým poločasem pouze kolem dvou minut. Již tento krátký čas je dostatečný k nastartování protektivní odpovědi, zatímco ke zvýšení erytropoeze je nutné setrvalé působení. Afinita asialo-EPO k EPOR je obdobná jako u EPO (Erbayraktar a spol., 2003). Na myším modelu měl asialo-EPO prospěšné účinky u různých modelů srdečního selhání – toxické kardiomyopatie (vyvolané doxorubicinem), ischemické kardiomyopatie (vzniklé v důsledku rozsáhlého infarktu) a genetické kardiomyopatie (způsobené delecí genu pro delta-sarkoglykan) (Takeyama a spol., 2012).

Jinou možností je upravit EPO tak, aby se vázal pouze na EPOR/CD131 heterodimer, nikoli na homodimerický EPOR. Takovou molekulou je cEPO. Pomocí jednorázového podání

této látky bylo dosaženo zmenšení rozsahu infarktu (Moon a spol., 2006b). Každodenní podávání cEPO po dobu jednoho týdne po I/R nevedlo ke změně hematokritu, ale mělo významné pozitivní účinky na ztrátu kardiomyocytů a funkční parametry (Fiordaliso a spol., 2005).

Další molekulou, která si zachovává protektivní účinky EPO aniž by způsobovala erytropoezi je HBSP (*helix-B surface peptide*), peptid skládající se z jedenácti aminokyselin, který napodobuje vodný povrch helixu B na molekule EPO. V kultuře potkaních kardiomyocytů výrazně inhibuje apoptózu indukovanou TNF- α (*tumor necrosis factor α*). Tento efekt je závislý na Akt, což bylo dokázáno za použití siRNA (*small interfering RNA*). Stejně tak mělo dlouhodobé podávání HBSP křečkům s dilatační kardiomyopatií pozitivní účinky zjištěné jak stanovením míry apoptózy, tak aktivitou sérové kreatin kinázy a expresí atriálního natriuretického peptidu, což je prognostický marker srdečního selhání. Účinky na myokard byly doprovázeny zvýšenou aktivací Akt a ERK1/2. V souhrnu tyto výsledky naznačují, že HBSP má podobné kardioprotektivní účinky jako EPO (Ueba a spol., 2010).

2.3.5 Kardioprotektivní signalizace

Centrální molekulou kardioprotektivní signalizace je Akt neboli proteinkináza B, která je aktivována přes PI3K. Hanlon a spol. (2005) zjistili výrazně zvýšené množství fosforylované Akt v lyzátech z perfundovaných potkaních srdcí, která byla vystavená krátkodobému působení EPO. Významnost této dráhy byla ověřena použitím wortmanninu, inhibitoru PI3K. Přidání wortmanninu před ischemií zároveň s EPO nenarušilo kardioprotektivní účinky, ale pokud byl přidáván i během ischemie a reperfuze, tak byla EPO-indukovaná kardioprotekce zablokována. V tomto případě byly kardioprotektivní účinky stanoveny měřením hemodynamických parametrů. Stejně tak nedošlo ke zmenšení velikosti infarktu, pokud byl EPO podán v reperfuzi spolu s PI3K inhibitorem LY294002 (Hanlon a spol., 2005). Zdá se tedy, že protektivní účinky zprostředkované PI3K/Akt dráhou jsou kriticky závislé na čase a uplatňují se až během reperfuze, nikoli během ischemie.

Nedostatkem většiny farmakologických prací týkajících se PI3K-Akt dráhy je blokáce PI3K, nikoli přímo Akt. První prací, ve které byla zablokována přímo Akt, je práce Burgera a spol. z roku 2006, ve které byl použit Akt dominantně-negativní adenovirus. Ten v kultuře kardiomyocytů zablokoval ochranný účinek EPO vůči noradrenalinem vyvolané apoptóze (Burger a spol., 2006). O rok později byl se stejným výsledkem použit farmakologický inhibitor Akt (Fu and Arcasoy, 2007).

Akt ovlivňuje řadu dalších efektorů. Ohledně EPO-indukované kardioprotekce byla největší pozornost věnována NO a kináze glykogensyntházy 3 β (GSK3- β).

NO produkovaný endoteliální syntázou NO (eNOS) redukuje apoptózu díky inhibici kaspáz S-nitrosylací, zvýšení exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2, prevenci vápníkového přetížení mitochondrií a snížení oxidativního stresu (Razavi a spol., 2005). Role eNOS byla zkoumána v souvislosti s kardioprotektivními účinky chronického podávání EPO. Zatímco vysoká dávka 1x týdně neměla protektivní účinky, podávání 3x týdně protektivní bylo a tyto účinky odstranilo podání inhibitoru NOS, L-nitro-L-arginin methyl esteru (L-NAME), před začátkem ischemie, nikoli však podání wortmanninu ve stejném čase. Vzhledem k chronickému charakteru pokusu lze uvažovat o možnosti, že aktivace PI3K/Akt je pouze dočasná a nadále je protekce zprostředkována jinými mechanismy (Bullard and Yellon, 2005).

Burger a spol. (2006) provedli sérii pokusů, ve kterých nejprve testovali noradrenalinem indukovanou apoptózu v kultuře kardiomyocytů. Zde měl EPO výrazné anti-apoptotické účinky, které odstranilo přidání L-NAME. Stejně tak se tyto účinky neprojevily u kardiomyocytů izolovaných z myších knockoutů eNOS. Tyto výsledky byly ověřeny na modelu I/R *in vivo* u myši, kdy EPO vyvolal kardioprotektivní účinky u kontrolních myší, ale nikoli u knockoutů eNOS (Burger a spol., 2006).

Na modelu izolovaného perfundovaného potkaního srdce mělo podání EPO hodinu před operací prospěšné účinky na kontraktilitu. Tyto účinky odstranilo podání L-NAME nebo 1400W, specifického inhibitoru inducibilní syntázy NO (iNOS). Zároveň těmto účinkům zabránila blokáde mK_{ATP}, ale nikoli draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem (K_{Ca}). Velikost infarktu nebyla v této studii stanovena (Joyeux-Faure a spol., 2006).

Teng a spol. (2011) zkoumali funkci eNOS na Δ EPOR myších. V endotelu došlo po podání EPO ke stimulaci eNOS a k nárůstu produkce NO, což naznačuje, že endoteliální protektivní odpověď by mohla probíhat touto cestou. Podání EPO v tomto případě vedlo ke stimulaci PI3K/Akt a MEK/ERK drah, ale pouze inhibice PI3K, nikoli MEK, zabránila zvýšené produkci NO (Teng a spol., 2011). Tyto výsledky jsou v souladu s dřívějšími pracemi, které ukazují na nárůst produkce NO závislý na PI3K/Akt signalizaci.

V zajímavém rozporu s těmito výsledky je recentní práce Ahmeta a spol. (2012), ve které použití L-NAME odstranilo příznivé hemodynamické účinky EPO, ale nikoli protektivní účinky na rozsah infarktu. Velikost infarktu byla stanovena 24 hodin po trvalé okluzi koronární arterie na potkaním modelu. Tyto výsledky zpochybňují nutnost zvýšené produkce NO pro dosažení kardioprotektivních účinků. Avšak vzhledem k používání různých

živočišných druhů a různých metod pro vyvolání ischemického či I/R poškození nelze říci, že toto zjištění platí obecně (Ahmet a spol., 2012).

GSK-3 β je serin-threoninová kináza, která se účastní různých dějů energetického metabolismu a morfogeneze. Kromě toho má dvojí úlohu v apoptóze – její aktivita potlačuje apoptózu vyvolanou vnějšími signály, ale podporuje apoptózu vyvolanou vnitřními signály, mimo jiné ischemií či oxidativním stresem (Miura and Miki, 2009). Fu a Arcasoy (2007) zkoumali možnost využití EPO v ochraně kardiomyocytů před toxickým působením doxorubicinu, které omezuje možnost terapeutického využití této látky. EPO se ukázal být efektivní proti doxorubicinem vyvolané apoptóze v *in vitro* podmínkách, přičemž tyto účinky odstranila inhibice PI3K nebo Akt. Kromě toho byla zjištěna zvýšená fosforylace GSK-3 β , kterou rovněž odstranila blokáce PI3K či Akt. Na rozdíl od většiny kináz je GSK-3 β fosforylací inhibována. Podání inhibitorů GSK-3 β , chloridu lithia nebo SB216763, v obou případech vedlo k antiapoptotickým účinkům podobným účinkům EPO (Fu and Arcasoy, 2007).

V modelu I/R poškození na potkaním srdci *in vivo* negativně korelovala fosforylace GSK-3 β s velikostí infarktu a podání inhibitoru GSK-3 β také vedlo k významným protektivním účinkům. Nečekané je, že mezi fosforylací Akt a GSK-3 β byly rozdíly, ačkoli se předpokládalo, že GSK-3 β je aktivována právě prostřednictvím Akt. To může ukazovat i na další mechanismy inaktivace GSK-3 β , například přes PKC (Nishihara a spol., 2006).

Další molekulou, která hraje určitou roli v kardioprotektivním působení EPO je PKC, konkrétně její isoforma ϵ . V srdci vystaveném krátkodobému působení EPO došlo k její zvýšené aktivaci a k translokaci na membrány. Oproti tomu množství PKC δ v cytosolické a membránové frakci se nezměnilo. Podání chelerythrinu před ischemií zároveň s EPO zabránilo jeho protektivnímu působení. V téže práci byla zjištěna také zvýšená aktivace ERK1/2, avšak inhibice této dráhy prospěšné účinky EPO nenarušila (Hanlon a spol., 2005). Je však možné, že ERK1/2 působí kardioprotektivně až v dlouhodobém výhledu, jelikož bylo zjištěno, že čtyři týdny po I/R poškození už EPO není schopný aktivovat Akt, ale nadále aktivuje ERK. (Miki a spol., 2007).

Tyto molekuly nejsou jedinými, které mohou zprostředkovat kardioprotektivní působení EPO. Například Xu a spol. (2005) zjistili zvýšenou aktivaci HSP70 (*heat shock protein 70*) a sníženou aktivaci NF κ B při podání EPO 24 hodin před okluzí koronární artérie. Je možné, že tyto změny mají také prospěšné účinky na ischemickou odolnost myokardu, ale jejich úloha nebyla ověřena pomocí inhibitorů. Stejně tak není známo, zda jsou tyto změny aktivace zprostředkovány přes PI3K či ERK dráhu (Xu a spol., 2005).

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Na základě dostupných literárních zdrojů týkajících se kardioprotektivního působení erythropoietinu a adaptace na chronickou hypoxii jsme si definovali následující cíle:

1. Zjistit optimální dávku EPO pro vyvolání kardioprotektivních účinků u myši kmene ICR při jednorázovém podání
2. Porovnat účinky adaptace na chronickou hypoxii a jednorázového podání EPO a zjistit, zda se kardioprotektivní účinky sčítají
3. Porovnat účinky adaptace na chronickou hypoxii a opakovaného podávání EPO v průběhu adaptace a zjistit, zda se kardioprotektivní účinky sčítají

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie:

Deionizovaná voda (H₂O)

Chlorid sodný (NaCl) (Penta)

Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃) (Penta)

Chlorid draselný (KCl) (Penta)

Síran hořečnatý heptahydrát (MgSO₄·7H₂O) (Penta)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) (Penta)

Chlorid vápenatý dihydrát (CaCl₂·2H₂O) (Penta)

D-Glukosa (Penta)

EDTA (Sigma)

Thiopental (Valeant Czech Pharma s.r.o.)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na₂HPO₄·12H₂O) (Penta)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (NaH₂PO₄·2H₂O) (Lachema a.s.)

2,3,5-Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) (Sigma)

Formaldehyd 36-38% (Penta)

Erythropoietin (NeoRecormon, epoetin beta, 500 IU nebo 2000 IU, Roche)

4.2 Zvířata

V této práci byli použiti dospělí samci myšího kmene ICR od firem VELAZ či Anlab. Jejich tělesná hmotnost se pohybovala v rozmezí 29-44 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek v plastových nádobách s přístupem k čisté vodě a standardní laboratorní dietě ad libitum. V místnosti byla udržována teplota 20°C a světelný režim 12:12. Všechny pokusy byly prováděny po schválení etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR v souladu s pravidly *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publikovanými US National Institute of Health (NIH 85-23, 1996).

4.2.1 Experimentální skupiny

Zvířata byla rozdělena do těchto skupin:

1. zvířata chovaná v normoxických podmínkách, jimž byl intraperitoneálně podán EPO v dávce 200 U/kg jednorázově 24 hodin před pokusem
2. zvířata chovaná v normoxických podmínkách, jimž byl intraperitoneálně podán EPO v dávce 5000 U/kg jednorázově 24 hodin před pokusem
3. kontrolní zvířata chovaná v normoxických podmínkách, jimž byly podávány intraperitoneálně odpovídající objemy fyziologického roztoku
4. zvířata chovaná v hypoxických podmínkách, jimž byl intraperitoneálně podán EPO v dávce 5000 U/kg jednorázově 24 hodin před pokusem
5. zvířata chovaná v hypoxických podmínkách, jimž byly intraperitoneálně podávány odpovídající objemy fyziologického roztoku
6. zvířata chovaná v hypoxických podmínkách, jimž byl intraperitoneálně podáván EPO chronicky v dávce 5000 U/kg třikrát týdně
7. zvířata chovaná v normoxických podmínkách, jimž byl intraperitoneálně podáván EPO chronicky v dávce 5000 U/kg třikrát týdně

Zvířata v hypoxických skupinách byla postupně adaptována na intermitentní hypobarickou hypoxii (IHH). Tento model je tradičně používán na Oddělení vývojové kardiologie ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Adaptace byla zahájena v komoře s barometrickým tlakem odpovídajícím 2000 m.n.m. ($P_B = 79,5 \text{ kPa} = 596 \text{ mmHg}$; $pO_2 = 16,6 \text{ kPa} = 125 \text{ mmHg}$) a stupeň hypoxie byl zvyšován po 330 metrech denně až do dosažení výšky 4000 m.n.m. Poté byla zvyšována po 500 metrech denně. Třináctý den bylo dosaženo finální výšky 7000 m.n.m. ($P_B = 41,1 \text{ kPa} = 308 \text{ mmHg}$; $pO_2 = 8,7 \text{ kPa} = 65 \text{ mmHg}$). Expozice trvaly osm hodin denně, pět dní v týdnu. Celkem byla zvířata adaptována minimálně 25 dní. Všechna zvířata byla vystavena poslední expozici den před pokusem. V místnosti s hypobarickou komorou i v samotné komoře byla stálá teplota 20°C , odpovídající podmínkám v normoxii.

EPO byl zvířatům podáván intraperitoneálně v ranních hodinách. U adaptovaných zvířat tedy předcházelo podání EPO či fyziologického roztoku jejich umístění do hypobarické komory. Zvířata, kterým byl EPO podáván chronicky, dávku v den pokusu nedostávala. Poslední dávka byla tedy podána alespoň 24 hodin před pokusem.

4.3 PERFUZE IZOLOVANÉHO SRDCE

Zvířata byla uspána intraperitoneálně podaným thiopentalem v dávce 180 mg/g. Kůže na hrudníku byla nastřížena od *processus xiphoides* hrudní kosti podél žeber. Stříhem pod *processus xiphoides* byla otevřena břišní dutina a odhalena bránice. Poté byla bránice prostřížena a za současného zdvihání hrudní kosti přestřížena žebra po obou stranách až k prvnímu žeburu. Odklopení volné hrudní kosti se zbytky žeber se odhalila hrudní dutina a srdce bylo povytaženo směrem vzhůru. Toto bylo nutné udělat velmi šetrně, aby nedošlo ke zhmoždění a poškození srdce. Zároveň bylo nutné pracovat rychle, ab srdce nebylo vystaveno hypoxickému preconditioningu (Das a Das, 2008). Poté bylo srdce spolu s částí aorty vystříženo a vloženo do Petriho misky s vychlazeným perfuzním roztokem.

S ohledem na malou velikost myšího srdce byla použita speciální kanylační sestava místo metody používané u potkanů, kdy je srdce kanylováno přímo na Langendorffově aparátu. Tuto sestavu tvořila injekční stříkačka naplněná perfuzním roztokem na které byla nasazena krátká pružná hadička zakončená nerezovou kanylou o vnějším průměru 1 mm. Tato sestava byla umístěna ve stojánku tak, aby se hrot kanyly téměř dotýkal hladiny roztoku v Petriho misce. Volný konec aorty byl nasazen na kanylu a zafixován chirurgickým hedvábím. Poté byla kanyla přenesena na Langendorffův aparát a byl otevřen přívod okysličeného perfuzního roztoku. Od tohoto okamžiku byl měřen čas pokusu.

Z operační rány byla odebrána krev pro stanovení hematokritu. Z každého zvířete byly odebrány dvě kapiláry a byla použita průměrná hodnota. Pro stočení kapilár jsme použili centrifugu MIKRO 20 od Hettrich Zentrifugen, 10 000 rpm, čas 5 minut.

Pro zajištění perfuze myšího srdce jsme použili model perfuze *in vitro* podle Langendorffa za konstantního tlaku. V principu se jedná o perfuzi okysličeným temperovaným fyziologickým pufrem přiváděným retrográdně do aorty. Tlak přitékajícího roztoku uzavírá aortální chlopeč, a roztok vtéká do koronárních arterií odstupujících z aorty.

Perfuzi srdce podle Langendorffa lze provádět buďto za konstantního tlaku nebo za konstantního průtoku. Při perfuzi za konstantního tlaku je průtok variabilní sledovanou veličinou. Byl měřen čas, za který projde srdcem určitý objem roztoku. Specifický průtok byl vypočten vztahem průtoku na hmotnost srdce. Stálý tlak v systému byl udržován probubláváním karbogenem přes pomocný vodní sloupec, odkud byl vyveden do uzavřeného válce s perfuzním roztokem. Celková výška vodního sloupce činila 109 cm, tedy zhruba 80 mmHg. Celá aparatura byla předem temperována na 37°C pomocí termostatu (Thermo

HAAKE DC 10, Fischer Scientific), přivádějícího vodu do dvojitého skleněného pláště kterým byly opatřeny všechny části aparatury včetně nádoby chránící zavěšené srdce.

Pro perfuzi byl použit upravený Kresb-Henseleit roztok ve složení NaCl (118 mM), NaHCO₃ (25 mM), KCl (4,7 mM), MgSO₄ (1,2 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), CaCl₂·2H₂O (2,5 mM), glukóza (11 mM) a EDTA (0,5 mM). Pro přípravu roztoku byla použita deionizovaná voda.

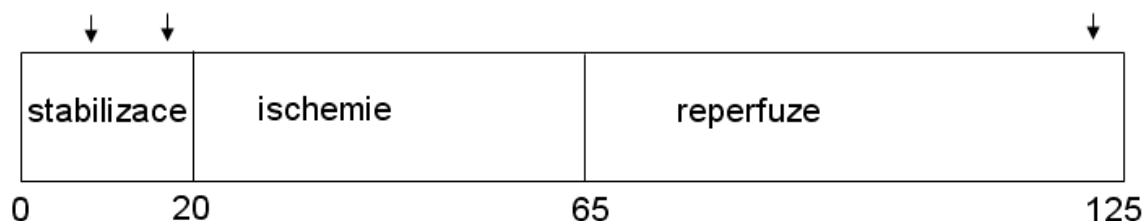
Roztok byl dvacet minut promícháván a probubláván karbogenem (95% O₂, 5%CO₂, Linde). Pokud to bylo potřeba, tak bylo pH upraveno na hodnotu 7,40-7,43. Následně byl roztok zfiltrován pomocí vývěvy přes filtr 1,2 μm. Roztok byl připravován každý den čerstvý.



Obr. 3 Aparát pro in vitro perfúzi myšního srdce dle Langendorffa

4.4 EXPERIMENTÁLNÍ PROTOKOL

Protokol vychází z postupu, který na Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR zavedla Mgr. Adriana Roháčová. Nejdříve srdce prošlo dvacetiminutovou stabilizační fází, při které se ustálila jeho funkce a odezněly případné změny způsobené operací a manipulací se srdcem. V desáté a osmnácté minutě byl měřen koronární průtok odebráním pufru do kalibrované nádobky. Poté následovala 45 minutová ischemie, při které byl přívod perfuzního roztoku uzavřen. Jednalo se tedy o globální ischemii s nulovým průtokem. Aby srdce v této situaci neprochladlo a bylo udržováno v prostředí s konstantní teplotou, byla nádobka se srdcem zespodu uzavřena a napuštěna pufrem, nasyceným směsí 95%N₂ a 5%CO₂ (Linde). Během ischemie byl roztok nadále probubláván touto směsí. Pro tento účel byl použit roztok ve složení NaCl (123,5 mM), NaHCO₃ (25 mM), KCl (4,7 mM), MgSO₄ (1,2 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM) a CaCl₂·2H₂O (1,25 mM). Po skončení ischemie byl pufř vypuštěn a byla obnovena perfuze do aorty a koronárních cév. Fáze reperfuze trvala 60 minut, koronární průtok byl měřen pět minut před jejím ukončením. Poté byl stanoven rozsah infarktu myokardu (viz kapitola 4.5).



Obr. 4. Schéma I/R in vitro.

4.5 STANOVENÍ VELIKOSTI INFARKTU

Pro stanovení rozsahu I/R poškození byla změřena velikost infarktu metodou založenou na barvení živé tkáně solemi tetrazolia (2,3,5-trifenylnitrotetrazolium chlorid, TTC). Tato metoda využívá skutečnosti, že TTC reaguje s buněčnými dehydrogenázami za vzniku nerozpustného formazanu, který je jasně červený. Buňky s nepoškozeným enzymatickým aparátem se tedy obarví červeně, nekrotické oblasti zůstanou světlé.

Pro barvení byl použit 1% roztok TTC ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Pro přípravu 10 ml tohoto pufru bylo použito 7,75 ml 0,1 M roztoku Na_2HPO_4 a 2,25 ml 0,1 M roztoku NaH_2PO_4 .

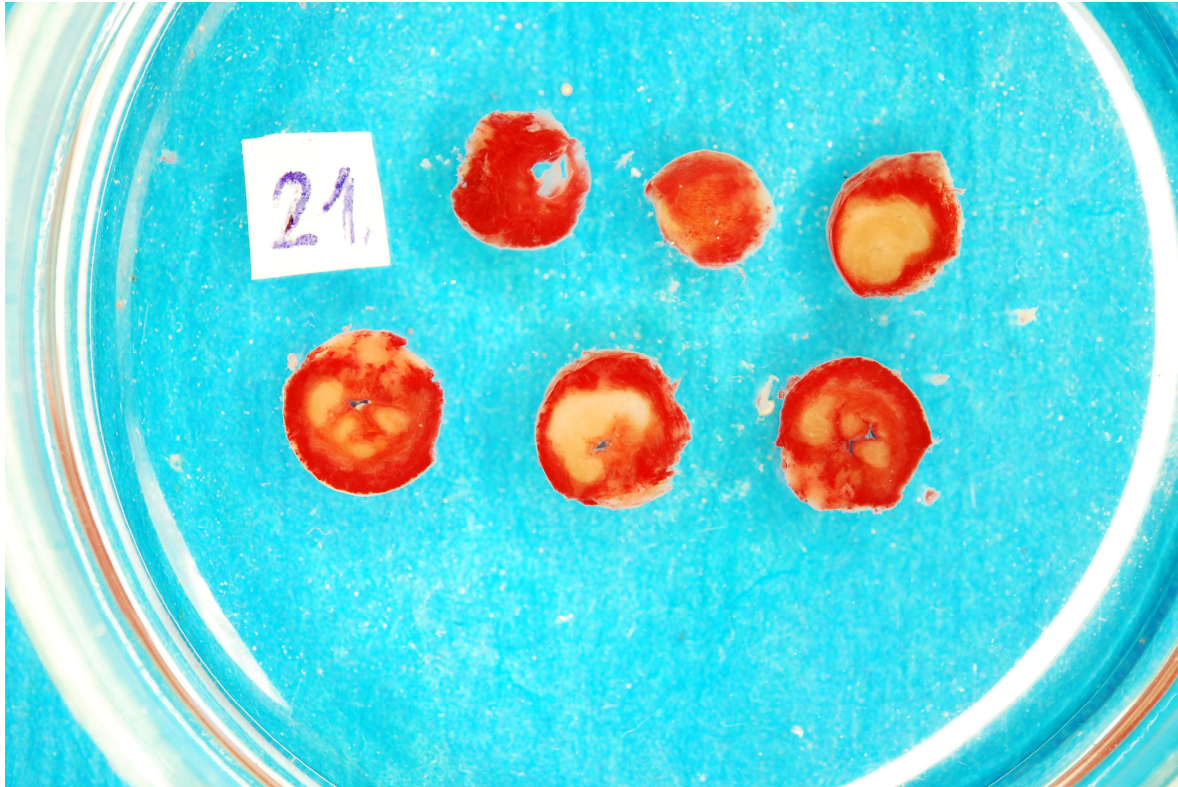
Po sejmutí z aparatury byla srdce ihned propláchnuta přes aortální kanylu 2 ml 1% TTC. Poté byla ponechána 20-40 minut v TTC, přičemž tato reakce probíhala potmě. Po odstrižení síni a zbytků dalších tkání byla srdce zvážena a umístěna alespoň na 24 hodin do 10% formaldehydu, což umožnilo jak zvýraznění obarvení, tak fixaci pro následné krájení. Z obarveného a nafixovaného srdce byla odstraněna pravá komora a levá komora byla příčně nakrájena na řezy o síle zhruba 0,75 mm. Řezy byly ponechány dalších 24 hodin ve formaldehydu pro zvýraznění obarvení.

Následně byly řezy umístěny do Petriho misky s formaldehydem a z obou stran vyfotografovány digitálním fotoaparátem Nikon D60. Pro standardizaci podmínek byly fotografie snímány vždy ze stejné vzdálenosti pomocí stativu, a také osvětlovací zařízení bylo umístěno v pevné vzdálenosti. Jednotlivé řezy byly upraveny v programu Photoshop (Adobe Photoshop 7.0 CE), viz foto 5. Velikost TTC-pozitivní a TTC-negativní plochy byla analyzována planimetricky v programu Ellipse 2 (ViDiTo). Velikost infarktu byla vyjádřena v procentech velikosti levé komory.

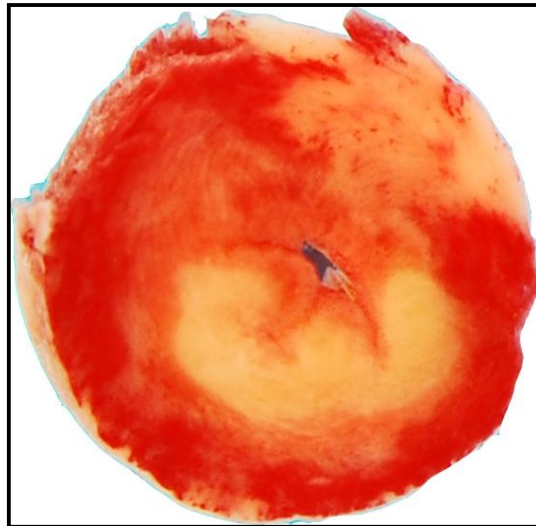
4.6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm střední chyba průměru (S.E.M.) a byly zpracovány programem GraphPad (4.03). Byly vyhodnoceny analýzou variance, statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla zjištěna Newman-Keulsovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na hladině $p < 0,05$.

A.



B.



Obr. 5. Ukázka řezů levou komorou myšního srdce (A) a zvětšený řez (B) pro stanovení rozsahu infarktu. Jasně červená plocha označuje tkáň, která přežila I/R poškození, světlá plocha označuje nekrotickou tkáň.

5. VÝSLEDKY

Pokusy byly provedeny na celkem 76 zvířatech rozdělených do pěti experimentálních skupin. Původní počty zvířat a počty vyhodnocených pokusů uvádí tab. 1. Do hodnocení nebylo zahrnuto celkem 17 pokusů, nejčastěji v případech, kdy byla mezi vyjmutím a kanylací srdce příliš velká časová prodleva. V několika pokusech se objevily abnormální hodnoty koronárního průtoku, v jednom případě došlo k uvolnění kanyly z perfuzního přístroje.

Tab. 1. Počet provedených pokusů a počet zvířat zahrnutých do hodnocení.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

	Počet zvířat v pokusu	Hodnocená zvířata
Kontrola	19	14
EPO 200	15	12
EPO 5000	15	9
IHH	14	12
IHH 5000	13	12

5.1 Určení kardioprotektivní dávky EPO

Tab. 2 uvádí průměrnou tělesnou hmotnost, průměrnou hmotnost srdce a relativní hmotnost srdce vztaženou na hmotnost těla u kontrolních normoxických zvířat (Kontrola) a normoxických zvířat, kterým byl jednorázově podán EPO, buďto v dávce 5000U/kg (EPO 5000) nebo v dávce 200 U/kg (EPO 200). Tyto parametry se mezi jednotlivými skupinami statisticky významně nelišily.

Tab. 2. Tělesná hmotnost, hmotnost srdce a relativní hmotnost srdce vůči hmotnosti těla.

Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

	Tělesná hmotnost (g)	Hmotnost srdce (mg)	Relativní hmotnost srdce (mg/g)
Kontrola	36,54 \pm 0,97	141,4 \pm 4,03	3,89 \pm 0,11
EPO 200	37,33 \pm 1,03	138,4 \pm 5,21	3,71 \pm 0,10
EPO 5000	34,22 \pm 0,72	128,0 \pm 4,29	3,74 \pm 0,11

Tab. 3 ukazuje srovnání hodnot hematokritu u kontrol a po jednorázovém podání EPO. Rozdíly v hodnotách hematokritu mezi těmito skupinami nebyly statisticky významné, což lze očekávat, protože zvýšení hematokritu nastává až čtvrtý den po podání EPO.

Tab. 3. Hodnoty hematokritu (%). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

	Hematokrit (%)
Kontrola	38,07 \pm 1,51
EPO 200	40,00 \pm 1,49
EPO 5000	35,74 \pm 1,95

Tab. 4 ukazuje hodnoty koronárního průtoku ve skupinách Kontrola, EPO 200 a EPO 5000. Koronární průtok je vyjádřený v ml/g srdeční tkáně za min. Průtok byl měřen dvakrát během stabilizační fáze v časech 10 a 18 minut (Průtok 10, Průtok 18) a jednou v 55. min reperfuze, tedy ve 120. min celého pokusu (průtok 120). Hodnoty koronárního průtoku se

mezi skupinami v žádném z těchto časů signifikantně nelišily. Ve všech skupinách však došlo k významnému poklesu průtoku v reperfuzi.

Tab. 4. Koronární průtok měřený v časech 10 a 18 minut (fáze stabilizace) a 120 minut (fáze reperfúze). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

	Průtok 10 (ml/g/min)	Průtok 18 (ml/g/min)	Průtok 120 (ml/g/min)
Kontrola	19,17 \pm 1,16	16,44 \pm 1,29	11,16 \pm 0,83
EPO 200	18,38 \pm 1,26	16,01 \pm 0,80	12,17 \pm 1,39
EPO 5000	20,59 \pm 1,13	18,76 \pm 1,40	11,62 \pm 1,00

Zásadním parametrem pro zjištění kardioprotektivních účinků EPO byla velikost infarktu, kterou uvádí Tab. 5 a obr. 6 jako rozsah infarktové oblasti vztážený na velikost celé levé komory. Při podání EPO v dávce 200 U/kg došlo k významné ($p < 0,05$) redukci relativní velikosti infarktu oproti kontrolním zvířatům (25,71% vs. 33,56%). U dávky 5000 U/kg byl tento pokles ještě výraznější (22,77%). Rozdíl mezi skupinami EPO 200 a EPO 5000 nebyl statisticky významný. Pro další experimenty jsme vybrali dávku 5000 U/kg.

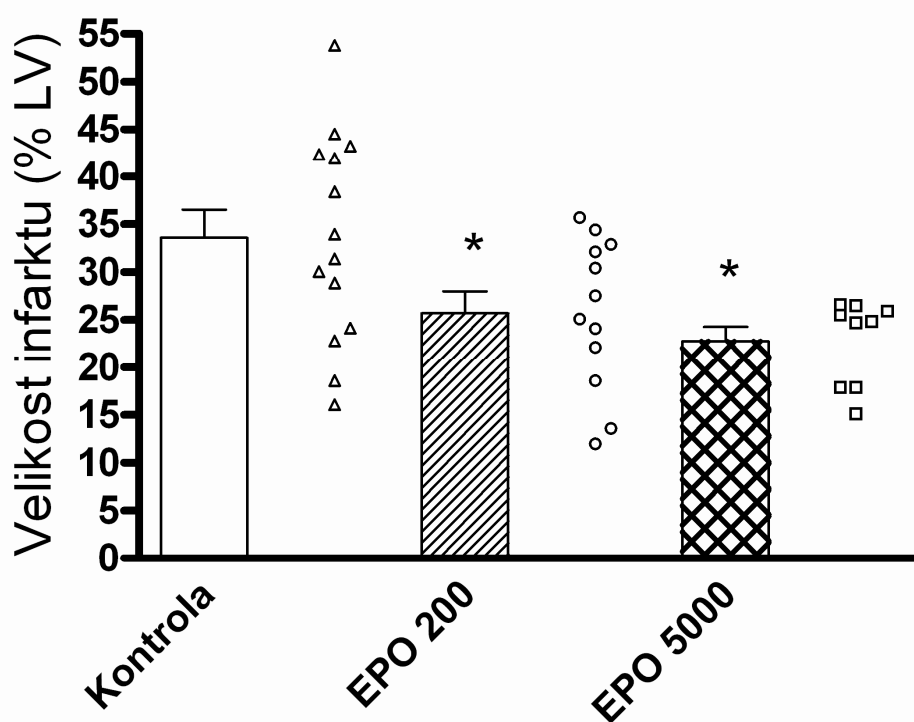
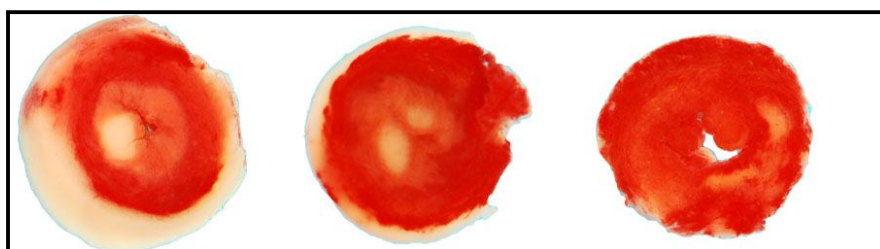
Tab. 5. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

	IA/LV (%)
Kontrola	33,56 \pm 2,93
EPO 200	25,71 \pm 2,29 *
EPO 5000	22,77 \pm 1,49 *



Obr. 6. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora). Sloupce představují průměry hodnot \pm S.E.M a individuální hodnoty v každé skupině jsou vyjádřeny příslušnými symboly. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Nad grafem jsou umístěny fotografie řezu levou komorou reprezentativní pro danou skupinu. Červeně zbarvená je tkáň, která odolala I/R poškození, světlá oblast je nekrotická.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 200 = jednorázové podání 200 U/kg EPO

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

5.2 Vliv chronické hypoxie a jednorázového podání EPO

Tabulka č. 6 uvádí hmotnostní parametry zvířat adaptovaných na chronickou hypoxii v porovnání se zvířaty normoxickými a po podání EPO. U kontrolních hypoxických zvířat (IHH) se neprojevil statisticky významný vliv na tělesnou hmotnost ani hmotnost srdce oproti skupině Kontrola. Ve skupině hypoxických zvířat, kterým byl podán EPO v dávce 5000 U/kg (IHH 5000), byla vyšší tělesná hmotnost oproti kontrolám. Tělesná hmotnost i hmotnost srdce byla u obou hypoxických skupin vyšší než ve skupině EPO 5000. Příčinou těchto rozdílů byl poněkud vyšší věk hypoxických zvířat, nikoli samotná hypoxie. Relativní hmotnost srdce vztažená na hmotnost těla se mezi jednotlivými skupinami nelišila.

Tab. 6. Tělesná hmotnost, hmotnost srdce a relativní hmotnost srdce vůči hmotnosti těla. Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola. ‡ statisticky významný rozdíl oproti skupině EPO 5000. $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

	Hmotnost těla (g)	Hmotnost srdce (mg)	Relativní hmotnost srdce
Kontrola	36,54 \pm 0,97	141,4 \pm 4,03	3,89 \pm 0,11
EPO 5000	34,22 \pm 0,72	128,0 \pm 4,29	3,74 \pm 0,11
IHH	38,08 \pm 0,94 ‡	151,5 \pm 3,41 ‡	3,99 \pm 0,10
IHH 5000	39,79 \pm 0,58 * ‡	153,0 \pm 3,57 ‡	3,85 \pm 0,07

Tabulka č. 7 ukazuje hodnoty hematokritu u normoxických (Kontrola a EPO 5000) a hypoxických (IHH a IHH + EPO) zvířat. Hodnoty hematokritu u hypoxických zvířat byly výrazně zvýšené, a to jak oproti kontrolním normoxickým zvířatům (Kontrola), tak oproti normoxickým zvířatům, kterým byla podána vysoká dávka EPO (EPO 5000). Vzájemné rozdíly mezi oběma hypoxickými skupinami (IHH a IHH + EPO) nebyly statisticky významné.

Tab. 7. Hodnoty hematokritu (%). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

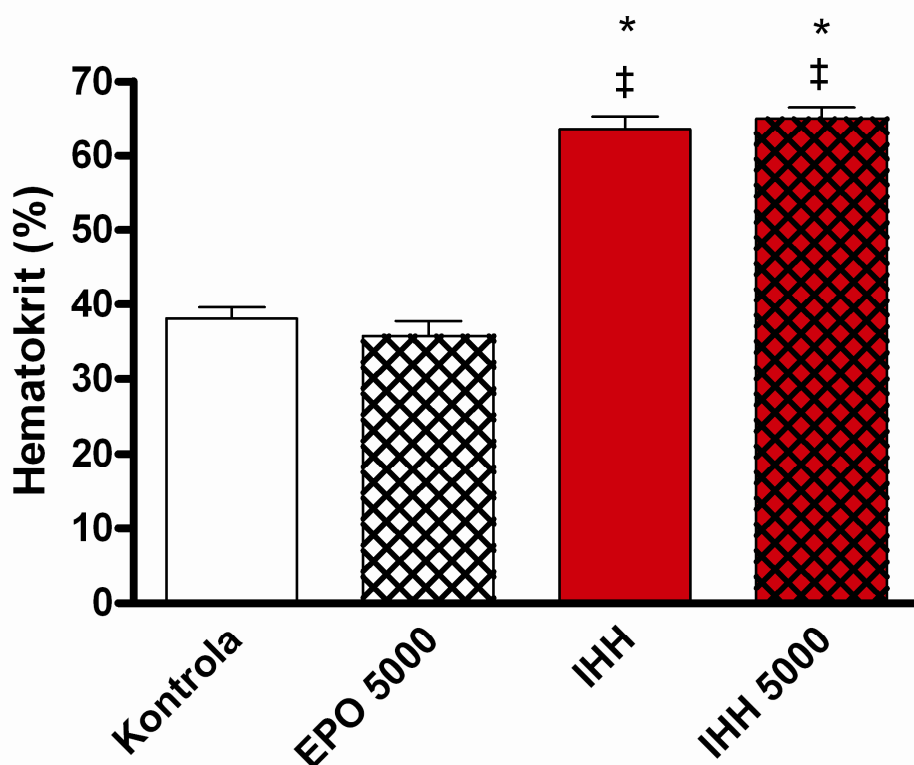
Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

	Hematokrit
Kontrola	38,07 \pm 1,51
EPO 5000	35,74 \pm 1,95
IHH	63,61 \pm 1,67 * ‡
IHH 5000	65,04 \pm 1,48 * ‡



Obr. 7. Hodnoty hematokritu (%). * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola. ‡ statisticky významný rozdíl oproti skupině EPO 5000. $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

U hypoxických zvířat se projevil výrazný nárůst koronárního průtoku, které ukazují následující tabulka (tab. 8). Průtok byl měřen v desáté a osmnácté minutě stabilizační fáze, a v 55. minutě reperfúze, což zároveň odpovídá 120. minutě celého pokusu. V 10. min stabilizační fáze se projevil statisticky významný vzestup pouze u skupiny IHH, v 18. min byl významný rozdíl i u skupiny IHH 5000.

Ve fázi reperfúze byly tyto rozdíly ještě výraznější. U hypoxických kontrolních zvířat dosahoval průtok v průměru 22,88 ml/g/min, což je oproti 11,16 ml/g/min u kontrolních zvířat rozdíl více než dvojnásobný. U hypoxických zvířat kterým byl podán EPO byl rozdíl méně markantní, ale stále statisticky významný. Průtoky v reperfúzi u obou hypoxických skupin se lišily také oproti skupině EPO 5000. Signifikantní ($p < 0,05$) rozdíl byl i mezi skupinami IHH a IHH + EPO. Zároveň

Tab. 8. Koronární průtok měřený v časech 10 a 18 minut (fáze stabilizace) a 120 minut (fáze reperfúze). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola. † statisticky významný rozdíl oproti skupině EPO 5000. # statisticky významný rozdíl oproti skupině IHH. $p < 0,05$.

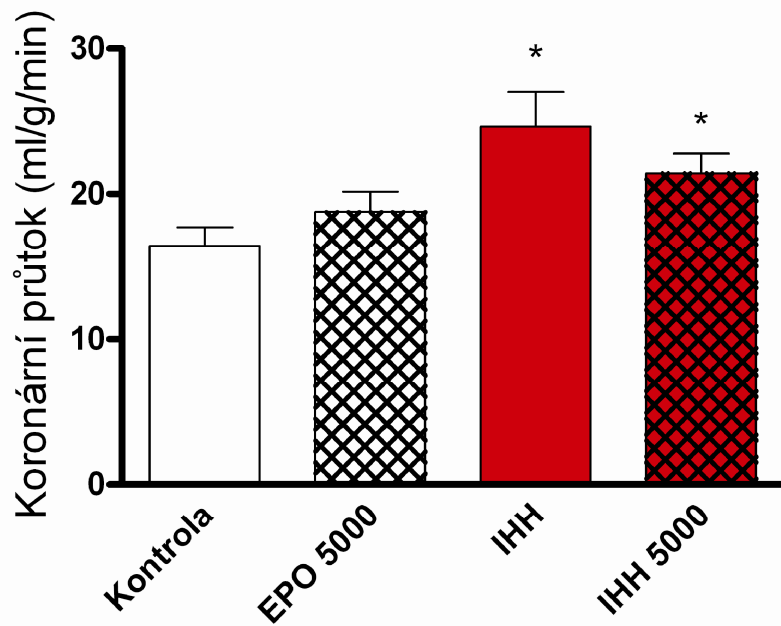
Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

	Průtok 10 (ml/g/min)	Průtok 18 (ml/g/min)	Průtok 120 (ml/g/min)
Kontrola	19,17 \pm 1,16	16,44 \pm 1,29	11,16 \pm 0,83
EPO 5000	20,59 \pm 1,13	18,76 \pm 1,40	11,62 \pm 1,00
IHH	26,54 \pm 2,76 *	24,61 \pm 2,42 *	22,88 \pm 1,96 * †
IHH 5000	22,41 \pm 1,65	21,40 \pm 1,36 *	17,99 \pm 1,27 * † #



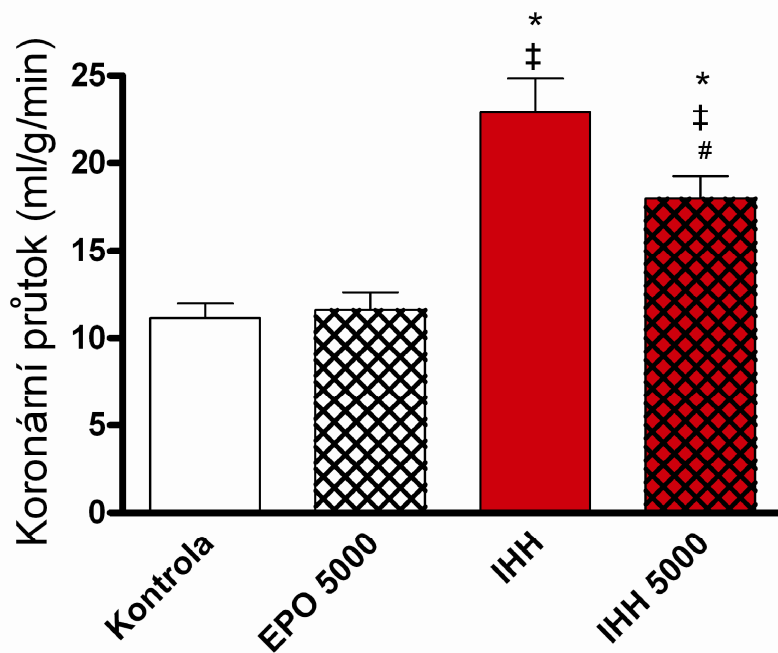
Obr. 8. Koronární průtok měřený v čase 18 minut (fáze stabilizace). * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg



Obr. 9. Koronární průtok měřený v čase 120 minut (fáze reperfuze). * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola. ‡ statisticky významný rozdíl oproti skupině EPO 5000. # statisticky významný rozdíl oproti skupině IHH. $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

Relativní velikost infarktu vůči levé komoře byla u obou hypoxických skupin statisticky nižší ve srovnání s hodnotami u kontrolních normoxických zvířat. Mezi skupinami EPO 5000, IHH a IHH 5000 nebyly statisticky významné rozdíly. Nebyly tedy pozorovány aditivní účinky adaptace na IHH a jednorázového podání EPO na velikost infarktu.

Tab. 9. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

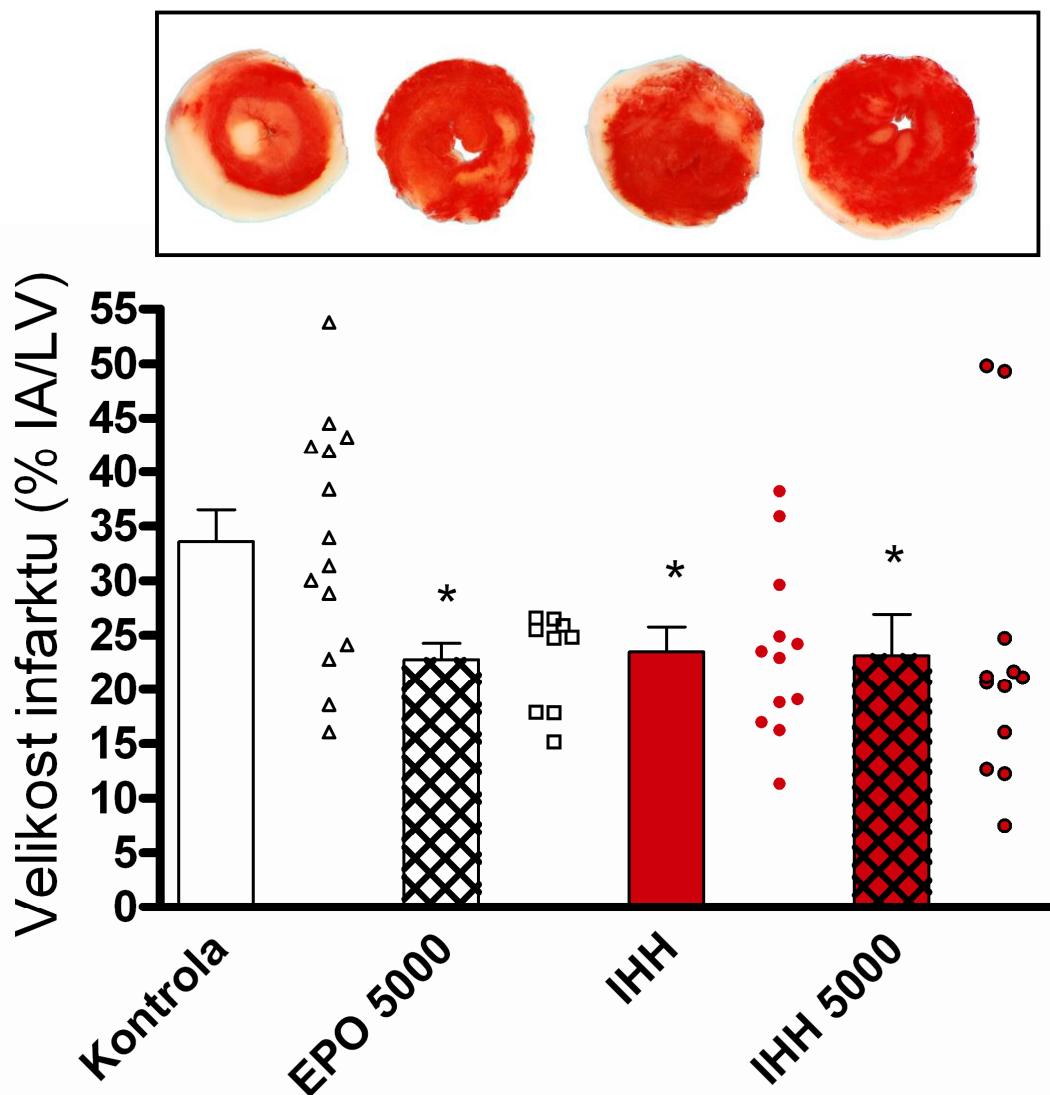
Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

	IA/LV (%)
Kontrola	33,56 \pm 2,93
EPO 5000	22,77 \pm 1,49 *
IHH	23,49 \pm 2,30 *
IHH 5000	23,10 \pm 3,84 *



Obr. 10. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora). Sloupce představují průměry hodnot \pm S.E.M a individuální hodnoty v každé skupině jsou vyjádřeny příslušnými symboly. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Nad grafem jsou umístěny fotografie řezu levou komorou reprezentativní pro danou skupinu. Červeně zbarvená je tkáň, která odolala I/R poškození, světlá oblast je nekrotická.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000 = jednorázové podání 5000 U/kg EPO

IHH = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii

IHH 5000 = adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii spojená s jednorázovým podáním EPO v dávce 5000 U/kg

5.3 Působení chronického podávání EPO

V době sepisování této práce experimenty s chronickým podáváním EPO ještě probíhaly, proto jsou zde prezentovány pouze předběžné výsledky. Celkem budou tyto experimenty zahrnovat 12 kontrolních normoxických zvířat, 12 normoxických zvířat po chronickém podávání EPO, 13 kontrolních hypoxických zvířat a 13 hypoxických zvířat po chronickém podávání EPO. Experimenty budou prováděny ve dvou sériích vždy po 25 zvířatech.

Zde prezentované výsledky byly získány na normoxických zvířatech z první série pokusů. Do hodnocení byla zahrnuta čtyři zvířata ze skupiny Kontrola a pět zvířat ze skupiny EPO 5000x9 (normoxická zvířata kterým byl chronicky podáván EPO). Tři zvířata byla vyřazena kvůli technickým problémům v průběhu pokusu. Vzhledem k nízkému počtu zvířat v obou skupinách nejsou žádné výsledky statisticky signifikantní, s výjimkou nárůstu hematokritu ve skupině EPO 5000x9.

Tab. 10. Tělesná hmotnost, hmotnost srdce a relativní hmotnost srdce vztažená na hmotnost těla. Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

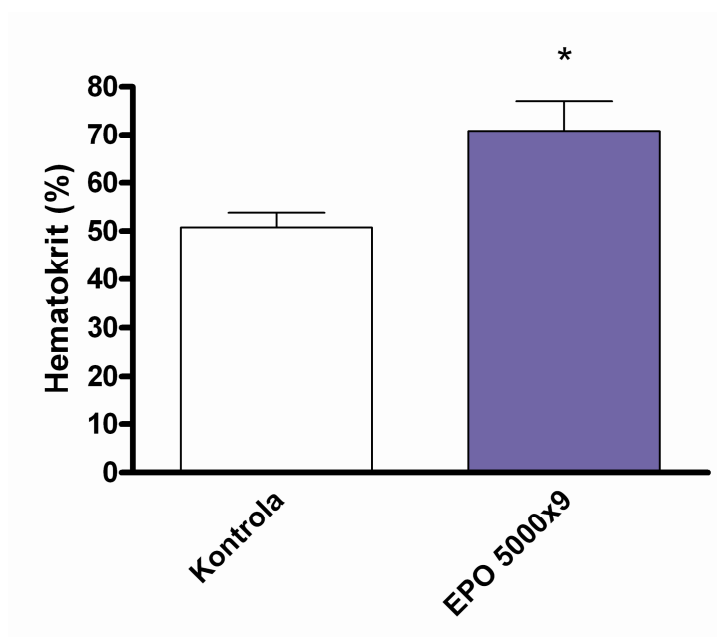
	Tělesná hmotnost (g)	Hmotnost srdce (mg)	Relativní hmotnost srdce (mg/g)
Kontrola	40,90 \pm 2,07	189,9 \pm 19,47	4,62 \pm 0,30
EPO 5000x9	39,20 \pm 1,46	167,4 \pm 9,34	4,27 \pm 0,22

Tab. 11. Hodnoty hematokritu (%). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M. * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

	Hematokrit (%)
Kontrola	50,75 \pm 3,11
EPO 5000x9	70,80 \pm 6,22 *



Obr. 11. Hodnoty hematokritu (%). * statisticky významný rozdíl oproti skupině Kontrola na $p < 0,05$.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

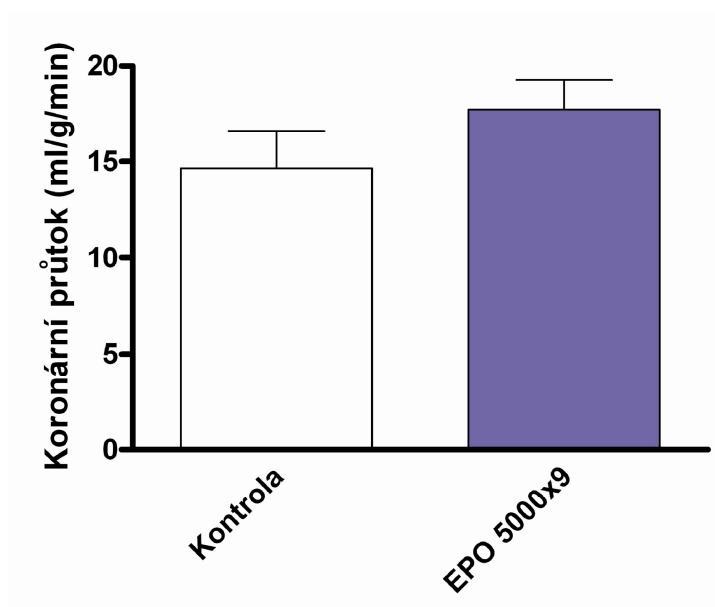
EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

Tab. 12. Koronární průtok měřený v časech 10 a 18 minut (fáze stabilizace) a 120 minut (fáze reperfuze). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

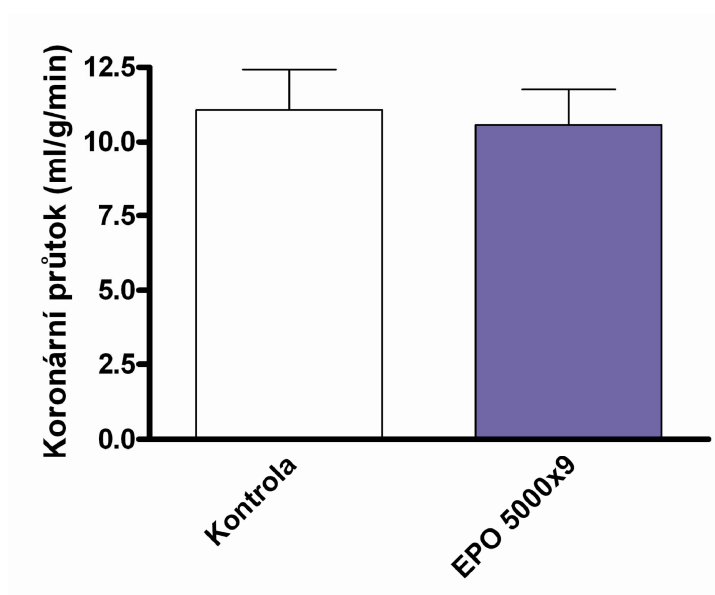
	Průtok 10 (ml/g/min)	Průtok 18 (ml/g/min)	Průtok 120 (ml/g/min)
Kontrola	14,84 \pm 2,71	14,65 \pm 1,98	11,08 \pm 1,35
EPO 5000x9	17,87 \pm 1,84	17,74 \pm 1,53	10,57 \pm 1,19



Obr. 12. Koronární průtok měřený v čase 18 minut (fáze stabilizace).

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů



Obr. 13. Koronární průtok měřený v čase 120 minut (fáze reperfuze).

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

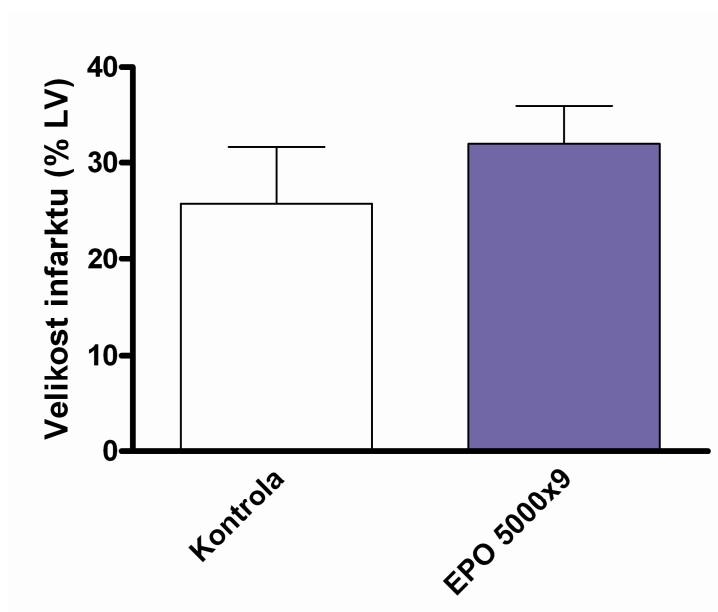
EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

Tab. 13. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora). Data představují průměry hodnot \pm S.E.M.

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

	IA/LV (%)
Kontrola	25,80 \pm 5,81
EPO 5000x9	31,93 \pm 4,06



Obr. 14. Relativní velikost infarktu (LV = levá komora).

Kontrola = kontrolní normoxická zvířata

EPO 5000x9 = podávání EPO v dávce 5000U/kg třikrát týdně po dobu tří týdnů

6. DISKUZE

Tato diplomová práce se pokusila přispět k objasnění úlohy EPO v kardioprotektivním působení chronické hypoxie. Adaptace na přirozenou či simulovanou chronickou hypoxii patří mezi způsoby, jak zvýšit odolnost myokardu vůči akutnímu I/R poškození (Ošťádal a Kolář, 2007). Tato cesta si zaslouží zvláštní pozornost, jelikož její efekty přetrvávají po delší dobu (řádově týdny) od ukončení stimulu. Mechanismus kardioprotektivního působení této adaptace však není dosud uspokojivě objasněn, což stojí v cestě jeho využití v klinické praxi, například pomocí farmakologického ovlivnění účinných protektivních drah.

Je známo, že působením hypoxie dochází ke vzestupu plazmatického EPO. Jelikož u molekuly EPO byly prokázány protektivní účinky proti I/R poškození celé řady tkání včetně myokardu, rozhodli jsme se zjistit, zda se EPO podílí také na protektivním působení adaptace na hypoxii. Za tímto účelem jsme zjišťovali, zda se u myší adaptovaných na chronickou hypoxii projeví aditivní protektivní účinky EPO, nebo zda je hypoxickou adaptací dosaženo plné kapacity protektivních drah.

7.1 Metodické přístupy

Použitou metodou byla perfuze srdce *in vitro* dle Langendorffa, což je tradičně používaná metoda ve výzkumu I/R poškození. Velkou výhodou této metody je skutečnost, že na rozdíl od metod *in vivo* není srdce ovlivněno systémovými vlivy nebo anestezií a všechny pozorované účinky lze přičítat výhradně změnám na úrovni myokardu. Dlouho však byla používána zejména na větších srdcích (například potkana), přičemž zájem o perfundované myší srdce vzrostl až s rozvojem molekulárně biologických metod a dostupností transgenních myší.

Drobná velikost a vysoká srdeční frekvence představují určité komplikace oproti metodě používané na potkaním srdci. Z tohoto důvodu jsme nepoužili balonek pro měření vyvinutého tlaku nebo elektrody pro snímání EKG, jelikož při tak malé velikosti srdce je obtížné vyhnout se traumatizaci tkáně. Ze stejného důvodu jsme srdce kanylovali na externí sestavě pro tento účel, místo přímo na perfuzním přístroji, jak je obvyklé u potkaního srdce.

Pro přenos srdce na kanylu jsme použili vychlazený perfuzní roztok. Tento postup má dvě výhody. Zaprvé dojde k minimalizaci následků ischemie v krátkém čase mezi vystřižením a perfuzí srdce, zadruhé se srdce v této situaci přestane kontrahovat, což urychlí celý proces.

Sutherland a spol. (2003) provedli sérii experimentů, ve kterých porovnávali účinky preparace v teplém ($37,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$) a chladném ($5,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$) perfuzním roztoku na funkční parametry myšího srdce, a to včetně funkce po I/R. Existovaly totiž obavy, že ochlazení srdce bude mít vliv na jeho funkci. Srdeční funkce se mezi těmito preparacemi nelišila, tudíž lze tuto metodu používat bez ovlivnění výsledků pokusu.

Při zavádění metody se u myší ICR ukázalo, že délka ischemie 20 či 35 minut, používaná v experimentech *in vivo* (Neckář a spol., 2002), je v našem uspořádání nedostatečná pro dosažení potřebné velikosti infarktu, proto jsme používali 45 minut. Hodinová reperfuze je na modelech *in vitro* dostatečná (Ferrera a spol., 2009). Zároveň by celková doba pokusu neměla přesáhnout zhruba dvě hodiny, jelikož perfuzní roztok z praktických důvodů neobsahuje plazmatické bílkoviny. Za podmínek *in vivo* vytváří plazmatické bílkoviny onkotický tlak, který napomáhá návratu tekutiny z tkáně do intravaskulárního prostoru. Při absenci tohoto působení může docházet k retenci tekutiny v tkáni, postupnému otoku a narušení srdeční funkce.

Metoda barvení tkáně, která přežila I/R poškození, je založená na redukci solí tetrazolia buněčnými dehydrogenázami, čímž dochází ke vzniku nerozpustného barevného formazánu (Klein a spol., 1981). Pro činnost těchto enzymů je nutná přítomnost koenzymů NADH, jejichž koncentrace v nekrotické oblasti rychle klesá. Pro stanovení rozsahu infarktu pomocí tetrazolia je nutná dostatečná délka reperfuze, která umožní jak vyčerpání zbylých kofaktorů v poškozených buňkách, tak reparaci enzymatického aparátu v přeživších buňkách.

Tato metoda je běžně používána pro stanovení rozsahu infarktu, a její výsledky se shodují s výsledky, kterých bylo dosaženo pomocí klasické histologie, což bylo ověřeno v několika srovnávacích studiích (Fishbein a spol., 1981, Ytrehus a spol., 1994). Barvení tetrazoliem je preferováno pro menší časovou a technickou náročnost. Histologie je obvykle používána jen v případech, kdy by mohlo dojít k ovlivnění enzymatické reakce.

7.2 Stanovení kardioprotektivní dávky EPO

Před porovnáváním případných aditivních vlivů EPO a IHH bylo nutné stanovit vhodnou dávku EPO, která u myší kmene ICR vyvolá významné kardioprotektivní účinky. Na základě literárních zdrojů (Moon a spol., 2005, Shen a spol., 2010) jsme se rozhodli použít EPO v dávkách 200U/kg a 5000 U/kg podané intraperitoneálně. Volba těchto dávek

vycházela především z výsledků experimentů na srdci potkanů *in vivo*, publikovaných v diplomové práci Petra Koláře (Kolář, 2006).

V obou případech se po podání projevil významný pokles velikosti infarktu oproti kontrolním zvířatům. Pro následné experimenty jsme se rozhodli použít dávku 5000 U/kg. Ačkoli je tato dávka suprafyziologická a kardioprotektivního účinku bylo dosaženo již při dávce 200 U/kg, upřednostnili jsme vyšší dávku z několika důvodů. Zaprvé, ačkoli rozdíly mezi skupinami EPO 200 a EPO 5000 nebyly statisticky významné, byla pozorována tendence k dalšímu snižování velikosti infarktu při dávce 5000 U/kg (22,77% vs. 25,71%) a výsledky byly homogennější. Vzhledem k tomu, že jsme nadále hodlali porovnávat účinky dvou různých kardioprotektivních fenoménů, bylo vhodné, aby byl efekt co nejvýraznější a umožnil odhalit případné aditivní účinky. Zadruhé, tuto dávku s úspěchem používala řada dalších studií, a ačkoli lze v literatuře nalézt široké rozmezí dávek EPO, většina prací se kloní k používání suprafyziologických dávek. Tyto dávky také poskytují robustnější protektivní účinky. Například Moon a spol. (2005) zjistili u dávky 3000 U/kg nejméně dvanáctihodinové terapeutické okno, zatímco dávka 150 U/kg byla účinná pouze tehdy, pokud byla podána do čtyř hodin po ischemii. V jiné práci byl porovnán účinek dávek 100 U/kg, 1000 U/kg a 5000 U/kg na arytmiie. Dávka 5000 U/kg vedla k signifikantnímu zlepšení ve všech hodnocených parametrech (předčasné komorové komplexy, komorové fibrilace a komorové tachykardie), zatímco účinky nižší dávky zlepšily pouze skóre předčasných komorových komplexů, a dávka 100 U/kg neměla žádné významné účinky. Podobně pouze dávky 1000 U/kg a 5000 U/kg byly účinné proti vzestupu prozánětlivých cytokinů, přičemž jejich hodnoty byly u dávky 5000 U/kg nižší než u dávky 1000 U/kg (Shen a spol., 2010).

Ve všech hodnocených skupinách došlo v reperfuzi k poklesu koronárního průtoku oproti hodnotám naměřeným ve stabilizační fázi. Hodnoty mezi jednotlivými skupinami se navzájem nelišily, a nebyl zde ani patrný trend ke zlepšení. Lze tedy říci, že jednorázové podání EPO nevedlo ke změnám perfuze.

Ani jedna z použitých dávek neměla vliv na hodnotu hematokritu, což je očekávatelný výsledek, jelikož erythropoietický účinek EPO nejen že vyžaduje dlouhodobé podávání, ale také se projevuje až čtvrtý den po aplikaci (Parsa a spol., 2003).

7.3 Kardioprotektivní účinek kombinace chronické hypoxie a EPO

Po zvolení vhodné dávky EPO jsme zjišťovali, jak se projevuje kombinované působení jednorázového podání EPO a adaptace na IHH. Zvířata ve skupině IHH 5000 měla vyšší tělesnou hmotnost oproti kontrolám, a v obou hypoxických skupinách byla průměrná tělesná hmotnost i hmotnost srdce vyšší než u zvířat ve skupině EPO 5000. Tento výsledek však není způsoben adaptací na hypoxii, ale skutečností, že hypoxická zvířata byla o několik týdnů starší. Průměrná hmotnost zvířat ze skupiny EPO 5000 byla oproti odpovídající kontrolní skupině mírně snižena přičemž oproti hypoxickým zvířatům již tento rozdíl dosáhl statistické významnosti. Obvyklým následkem působení chronické hypoxie je zpomalení tělesného růstu a zvýšení relativní hmotnosti srdce, zejména pravé komory (Ošťádal a Kolář, 1999).

Působením adaptace na IHH došlo k výraznému vzestupu hematokritu z průměrné hodnoty 38,07% u kontrolních normoxických zvířat na 63,61% u kontrolních hypoxických zvířat. Jednorázové podání EPO již nemělo další účinky na hematokrit, což lze očekávat - zvířata ve skupině IHH 5000 měla hodnoty hematokritu v průměru 65,04%, což není statisticky odlišné od hodnot, které jsme pozorovali u kontrolních hypoxických zvířat.

U obou hypoxických skupin se projevil významně zvýšený koronární průtok již ve stabilizační fázi. Zejména při druhém měření průtoku by již měly odeznít případné změny, způsobené manipulací se srdcem, a proto lze tyto změny přičíst pozitivnímu působení hypoxie na angiogenezi. Je známo, že v prvních týdnech adaptace se projevuje zvýšená angiogeneze, ale zdá se, že se jedná spíše o střednědobý adaptační mechanismus, jehož význam s pokračujícím trváním hypoxie klesá (Ošťádal a Kolář, 2007).

Pokles průtoku v reperfuzi byl u skupin IHH a IHH 5000 menší než u normoxických zvířat ze skupin Kontrola i EPO 5000. U skupiny IHH byl nižší i oproti skupině IHH 5000. Pokles průtoku v reperfuzi je důsledkem poškození tkáně, a vyšší hodnoty průtoku u srdcí IHH skupiny lze proto přičíst jejich zvýšené ischemické odolnosti.

U zvířat adaptovaných na hypoxii se v obou případech projeví významné pozitivní účinky na velikost infarktu: z průměrné velikosti 33,56% u normoxických kontrol na 23,49% u skupiny IHH a 23,10% u skupiny IHH 5000. Míra poškození byla srovnatelná u kontrolních hypoxických zvířat a normoxických zvířat, jimž byl podán EPO (průměrná velikost infarktu 22,77%). Velikost infarktu u skupiny IHH EPO nebyla statisticky významně odlišná, a průměrné hodnoty byly podobné, jako u skupiny IHH nebo u skupiny EPO 5000, avšak v této

skupině se vyskytly dva abnormálně rozsáhlé infarkty, u kterých míra poškození výrazně přesahovala průměrné hodnoty u kontrolních normoxických zvířat. Tyto výsledky nebyly důsledkem technických problémů v průběhu samotného pokusu nebo jiných vlivů na pokusná zvířata. I po vyřazení těchto odlehklých hodnot nevznikl mezi skupinami IHH a IHH 5000 statisticky významný rozdíl, avšak byla by zde patrná tendence ke snížení průměrné velikosti infarktu u skupiny IHH 5000 oproti odpovídající kontrolní skupině. Předběžný závěr z těchto experimentů tedy je, že účinky chronické hypoxie a jednorázového podání EPO na rozsah akutního infarktu myokardu nejsou aditivní, což by svědčilo pro využití společného protektivního mechanismu. Pro definitivní závěr však bude nutné tento pokus zopakovat na větším počtu zvířat.

V literatuře lze naše výsledky porovnat s výsledky práce, kterou provedli Shi a spol. (2004). V této práci byli neonatální králíci adaptováni na hypoxii, a zároveň jim byl podáván EPO. Každý z těchto stimulů sám o sobě vedl ke zlepšení ischemické odolnosti myokardu, stanovené dle stupně obnovy kontraktilní funkce, avšak jejich kombinace už tuto odolnost dále neprohloubila. Autoři uzavírají tím, že působení obou mechanismů je redundantní. Naše dosavadní výsledky jsou tedy v plném souladu s touto studií. Stejně tak jsou naše výsledky v souladu s diplomovou prací Petra Koláře (2006), ve které bylo EPO jednorázově podáno potkanům adaptovaným na IHH a následně byla hodnocena velikost infarktu po I/R poškození *in vivo*. Ani v tomto případě nedošlo působením EPO k zesílení protektivních účinků hypoxie.

Ve studii na heterozygotních myších knockoutech HIF-1 α došlo ke ztrátě protektivního působení hypoxické adaptace (Cai a spol., 2003). Tento efekt byl spojen mimo jiné s poklesem plazmatické koncentrace EPO. Ačkoli tento výsledek podporuje spojení hypoxií indukované protekce se vzestupem EPO, nelze ho pokládat za jednoznačný, neboť pod kontrolou HIF-1 α je celá řada genů včetně genu pro iNOS (Jung a spol., 2000), která se taktéž účastní protektivního působení.

Jako možný mechanismus se nabízí ovlivnění syntézy NO, které je společné oběma protektivním mechanismům (Burger a spol., 2006, Kolář a Ošřádal, 2004). Dále je známo, že jak chronická hypoxie, tak EPO zprostředkovaně aktivují mitochondriální K_{ATP} kanály, které by také mohly představovat bod konvergence obou protektivních drah (Neckář a spol., 2002a, Shi a spol., 2004). V úvahu připadá taktéž využití PKC. Ačkoli současné poznatky o působení hypoxie ukazují spíše na využití isoformy PKC δ (Kolář a spol., 2007, Hlaváčková a spol., 2007), nelze u jednotlivých isoform této kinázy vyloučit druhově či vývojově specifické účinky, jelikož u neonatálních hypoxických králíků byla naopak zjištěna aktivace PKC ϵ (Rafiee a spol., 2005). Jelikož výše uvedené výsledky týkající se PKC δ byly získány na

potkanech (Kolář a spol., 2007, Hlaváčková a spol., 2007), nelze vyloučit, že u myši je naopak aktivována PKC ϵ . K její aktivaci a translokaci na membrány dochází také působením EPO. V signální dráze PKC ϵ se podle Rafiee a spol. (2005) uplatňuje p38 MAPK, která by následně mohla aktivovat mitochondriální K_{ATP} kanály.

Dále byla v protektivním působení chronické hypoxie zvažována také PI3K/Akt dráha, o které je známo, že se účastní protektivního působení EPO. Nabízí se tedy hned několik možností, kterými by tyto dva kardioprotektivní fenomény mohly spolupůsobit, k jejich odhalení jsou však nutné další cílené pokusy.

U normoxických zvířat, kterým byl po dobu tří týdnů podáván EPO, došlo k výraznému zvýšení hematokritu (48,42% vs. 72,58%), neprojevíly se však protektivní účinky na velikost infarktu; naopak, byla patrná mírná tendence k nárůstu velikosti infarktu (25,80 vs. 31,93). Tento výsledek naznačuje, že dlouhodobé podávání EPO myším nevede ke zvýšení ischemické odolnosti srdce. Vzhledem k malému počtu dosud provedených a vyhodnocených experimentů však lze tento závěr považovat pouze za předběžný. Teprve po doplnění experimentálních skupin a dokončení experimentů na chronicky hypoxických zvířatech, kterým byl EPO podáván v průběhu adaptace, bude možné dospět ke konečnému závěru.

Takový výsledek by byl v rozporu s výsledku práce od Bullarda a Yellona (2005), ve které podávání EPO třikrát týdně v dávce 5000 U/kg vedlo k významnému zmenšení infarktu. Tato práce však probíhala na potkanech, takže nelze vyloučit druhově specifickou odpověď. V tomto experimentu také nedošlo k tak dramatickému nárůstu hematokritu, hodnoty u takto ošetřených zvířat dosahovaly 60% (Bullar a Yellon, 2005). V jiné studii však pouze jednorázová aplikace EPO po trvalé okluzi koronární arterie vedla k významnému zmenšení infarktu, zatímco při opakovaném podávání EPO po dobu sedmi dnů nevedlo ke zlepšení, které by bylo statisticky významné (Moon a spol., 2006a).

U zvířat, kterým byl chronicky podáván EPO, byl mírně zvýšený koronární průtok ve stabilizační fázi. Je možné, že se v této skupině projevují proangiogenní účinky EPO (van der Meer a spol., 2005, Nishiya a spol., 2006).

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala kardioprotektivním působením exogenně podaného EPO a adaptace na hypoxii. Na základě provedených experimentů jsme dospěli k těmto závěrům:

- 1) Jednorázové podání EPO vede u myší ke zvýšení ischemické odolnosti myokardu již v dávce 200 U/kg.
- 2) Adaptace myší na IHH zvyšuje ischemickou odolnost myokardu, přičemž jednorázové podání EPO tyto účinky nadále neprohlubuje.
- 3) Předběžné výsledky naznačují, že chronické podávání EPO u myší nezvyšuje ischemickou odolnost myokardu.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Ahmet, I., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2012). Acute hemodynamic effects of erythropoietin do not mediate its cardioprotective properties. *Biol. Open* 1, 1049–1053.

Asemu, G., Neckář, J., Szárszoi, O., Papoušek, F., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2000). Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 49, 597–606.

Asemu, G., Papoušek, F., Ošťádal, B., and Kolář, F. (1999). 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.

Banchero N., Grover R.F., and Will J.A. (1971). Oxygen transport in the llama (*Lama lama*). *Respir. Physiol.* 52, 245-255.

Binbrek, A.S., Rao, N.S., Al Khaja, N., Assaqqaf, J., and Sobel, B.E. (2009). Erythropoietin to augment myocardial salvage induced by coronary thrombolysis in patients with ST segment elevation acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 104, 1035–1040.

Borchert, G.H., Yang, C., and Kolář, F. (2011). Mitochondrial BKCa channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 300, H507–H513.

Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.W., Smart, J., Su-Rick, C.J., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., and Cerami, A. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14907–14912.

Broudy, V.C., Tait, J.F., and Powell, J.S. (1988). Recombinant human erythropoietin: purification and analysis of carbohydrate linkage. *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 329–336.

Bullard, A.J., Govewalla, P., and Yellon, D.M. (2005). Erythropoietin Protects the Myocardium Against Reperfusion Injury in Vitro and in Vivo. *Basic Res. Cardiol.* 100, 397-403.

Bullard, A.J., and Yellon, D.M. (2005). Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 19, 333–336.

Burger, D., Lei, M., Geoghegan-Morphet, N., Lu, X., Xenocostas, A., and Feng, Q. (2006). Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.* 72, 51–59.

Burger, D., Xenocostas, A., and Feng, Q.P. (2009). Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2, 56–69.

- Cai, Z., Manalo, D.J., Wei, G., Rodriguez, E.R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J.L., and Semenza, G.L. (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* *108*, 79–85.
- Cai, Z.Q., and Semenza, G.L. (2004). Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* *109*. 2050-2053.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., and Brines, M. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 4802–4806.
- Carnot, P., and Deflandre, C., (1906). Sur l'activite hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. [Haemopoietic activity of the serum in blood regeneration.] *C. R. Acad. Sci.* *143*, 384–386.
- D'Andrea, A.D., and Zon, L.I. (1990). Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.* *86*, 681–687.
- Das, M., and Das, D.K. (2008). Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* *60*, 199–203.
- Davis, J.M., Arakawa, T., Strickland, T.W., and Yphantis, D.A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry (Mosc.)* *26*, 2633–2638.
- Ding, H.-L., Zhu, H.-F., Dong, J.-W., Zhu, W.-Z., and Zhou, Z.-N. (2004). Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci.* *75*, 2587–2603.
- Dordal, M.S., Wang, F.F., and Goldwasser, E. (1985). The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* *116*, 2293–2299.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q.W., Coleman, T., Kreilgaard, M., Torup, L., Sager, T., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., et al. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6741–6746.
- Erslev, A. (1953). Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* *8*, 349–357.
- Erslev, A. (1974). Invitro Production of Erythropoietin by Kidneys Perfused with a Serum-Free Solution. *Blood* *44*, 77–85.
- Ferrario, M., Arbustini, E., Massa, M., Rosti, V., Marziliano, N., Raineri, C., Campanelli, R., Bertoletti, A., De Ferrari, G.M., Klersy, C., Angoli, L., Bramucci, E., Marinoni, B., Ferlini, M., Moretti, E., Raisaro, A., Repetto, A., Schwartz, P.J., and Tavazzi, L. (2011). High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study. *Int. J. Cardiol.* *147*, 124–131.

- Ferrera, R., Benhabbouche, S., Bopassa, J.C., Li, B., and Ovize, M. (2009). One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* *23*, 327–331.
- Fiordaliso, F., Chimenti, S., Staszewsky, L., Bai, A., Carlo, E., Cuccovillo, I., Doni, M., Mengozzi, M., Tonelli, R., Ghezzi, P., Coleman, T., Brines, M., Cerami, A., and Latini, R. (2005). A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* *102*, 2046-2051.
- Fishbein, M.C., Meerbaum, S., Rit, J., Lando, U., Kanmatsuse, K., Mercier, J.C., Corday, E., and Ganz, W. (1981). Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am. Heart J.* *101*, 593–600.
- Fisher, J.W. (1998). A quest for erythropoietin over nine decades. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *38*, 1–20.
- Fisher, J.W. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* Maywood Nj *228*, 1–14.
- Fisher, J.W., and Birdwell, B.J. (1961). The production of an erythropoietic factor by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol.* *26*, 224-232.
- Fitzpatrick, C.M., Shi, Y., Hutchins, W.C., Su, J., Gross, G.J., Ošťádal, B., Tweddell, J.S., and Baker, J.E. (2005). Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *288*, H62–68.
- Fu, P., and Arcasoy, M.O. (2007). Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 372–378.
- Gibson, C.M., Pride, Y.B., Frederick, P.D., Pollack, C.V. Jr., Canto, J.G., Tiefenbrunn, A.J., Weaver, W.D., Lambrew, C.T., French, W.J., Peterson, E.D., and Rogers, W.J. (2008). Trends in reperfusion strategies, door-to-needle and door-to-balloon times, and in-hospital mortality among patients with ST-segment elevation myocardial infarction enrolled in the National Registry of Myocardial Infarction from 1990 to 2006. *Am. Heart J.* *156*, 1035-1044.
- Grimm, C., Hermann, D.M., Bogdanova, A., Hotop, S., Kilic, U., Wenzel, A., Kilic, E., and Gassmann, M. (2005). Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 531–538.
- Hale, S.L., Sesti, C., and Kloner, R.A. (2005). Administration of erythropoietin fails to improve long-term healing or cardiac function after myocardial infarction in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *46*, 211–215.
- Hanlon, P.R., Fu, P., Wright, G.L., Steenbergen, C., Arcasoy, M.O., and Murphy, E. (2005). Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1323–1325.

Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O., Wakeno, M., Myoishi, M., Okada, K.-I., Koyama, H., et al. (2005). Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 19, 33–40.

Hjort, E. (1936). Reticulocyte increase after injection of anemic serum. *Mag Laegevidensk* 270–277.

Hlaváčková, M., Neckář, J., Jezková, J., Balková, P., Staňková, B., Nováková, O., Kolář, F., and Novák, F. (2007). Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp. Biol. Med.* Maywood 232, 823-832.

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

Chong, Z.Z., Li, F., and Maiese, K. (2005). Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr. Neurovasc. Res.* 2, 387–399.

Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S., Kaufman, R., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S., Hewick, R., Fritsch, E., et al. (1985). Isolation and Characterization of Genomic and Cdna Clones of Human Erythropoietin. *Nature* 313, 806–810.

Jacobson, L., Goldwasser, E., Fried, W., and Plzak, L. (1957). Role of the Kidney in Erythropoiesis. *Nature* 179, 633–634.

Joyeux-Faure, M., Ramond, A., Béguin, P.C., Belaïdi, E., Godin-Ribuot, D., and Ribuot, C. (2006). Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 51–56.

Joyeux-Faure, M., Stanke-Labesque, F., Lefebvre, B., Béguin, P., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Launois, S.H., Bessard, G., and Lévy, P. (2005). Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J. Appl. Physiol.* 98, 1691–1696.

Jubinsky, P.T., Krijanovski, O.I., Nathan, D.G., Tavernier, J., and Sieff, C.A. (1997). The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 90, 1867–1873.

Jung, F., Palmer, L.A., Zhou, N., and Johns, R.A. (2000). Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 86, 319–325.

Kertesz, N., Wu, J., Chen, T.H.-P., Sucov, H.M., and Wu, H. (2004). The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev. Biol.* 276, 101–110.

Klein, H.H., Puschmann, S., Schaper, J., and Schaper, W. (1981). The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Archiv A* 393, 287-297.

Kolář, F., Ježková, J., Balková, P., Breh, J., Neckář, J., Novák, F., Nováková, O., Tomášová, H., Srbová, M., Ošťádal, B., Wilhelm, J., and Herget, J. (2007). Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H224–230.

Kolář, F., and Ošťádal, B. (2004). Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 53 *Suppl 1*, S3–13.

Kolář, P. (2006) Kardioprotektivní účinky erythropoietinu v normoxickém a hypoxickém myokardu. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

Kong, X., Tweddell, J.S., Gross, G.J., and Baker, J.E. (2001). Sarcolemmal and mitochondrial K(atp)channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1041–1045.

Kopecký M., and Daum S. (1958). Tissue adaptation to anoxia in rat myocardium. *Cs. Fyziol.* 7, 518-521.

Lacombe, C., Da Silva, J.L., Bruneval, P., Fournier, J.G., Wendling, F., Casadevall, N., Camilleri, J.P., Bariety, J., Varet, B., and Tambourin, P. (1988). Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 81, 620–623.

Lai, P.H., Everett, R., Wang, F.F., Arakawa, T., and Goldwasser, E. (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 261, 3116–3121.

Li, J., Zhang, H., Zhu, W.-Z., Yu, Z., Guo, A., Yang, H.-T., and Zhou, Z.-N. (2007). Preservation of the pHi during ischemia via PKC by intermittent hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 329–333.

Lin, F., Suggs, S., Lin, C., Browne, J., Smalling, R., Egrie, J., Chen, K., Fox, G., Martin, F., Stabinsky, Z., et al. (1985). Cloning and Expression of the Human Erythropoietin Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7580–7584.

Lipsic, E., van der Meer, P., Voors, A.A., Westenbrink, B.D., van den Heuvel, A.F., de Boer, H.C., van Zonneveld, A.J., Schoemaker, R.G., van Gilst, W.H., Zijlstra, F., and van Veldhuisen, D.J. (2006). A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 20, 135-141.

Liu, X., Xie, W., Liu, P., Duan, M., Jia, Z., Li, W., and Xu, J. (2006). Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 78, 2255–2264.

Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1999). Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science* 283, 987.

Manukhina, E.B., Downey, H.F., and Mallet, R.T. (2006). Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med.* Maywood Nj 231, 343–365.

McGrath, J.J., Procházka, J., Pelouch, V., and Ošťádal, B. (1973). Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J. Appl. Physiol.* *34*, 289–293.

Van der Meer, P., Lipsic, E., Henning, R.H., Boddeus, K., van der Velden, J., Voors, A.A., van Veldhuisen, D.J., van Gilst, W.H., and Schoemaker, R.G. (2005). Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *46*, 125–133.

Miki, T., Miura, T., Yano, T., Takahashi, A., Sakamoto, J., Tanno, M., Kobayashi, H., Ikeda, Y., Nishihara, M., Naitoh, K., Ohori, K., and Shimamoto, K. (2006). Alteration in erythropoietin-induced cardioprotective signaling by postinfarct ventricular remodeling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *317*, 68–75.

Milano, G., Corno, A.F., Lippa, S., von Segesser, L.K., and Samaja, M. (2002). Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction. *Exp. Biol. Med.* *Maywood* *227*, 389–397.

Miura, O., D'Andrea, A., Kabat, D., and Ihle, J.N. (1991). Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 4895–4902.

Miura, T., and Miki, T. (2009). GSK-3 beta, a Therapeutic Target for Cardiomyocyte Protection. *Circ. J.* *73*, 1184–1192.

Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* *252*, 5558–5564.

Monge C., and León-Velarde F. (1991). Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol. Rev.* *71*, 1135–1172.

Moon, C., Krawczyk, M., Paik, D., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2005). Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* *19*, 243–250.

Moon, C., Krawczyk, M., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2006a). Therapeutic effectiveness of a single vs multiple doses of erythropoietin after experimental myocardial infarction in rats. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *20*, 245–251.

Moon, C., Krawczyk, M., Paik, D., Coleman, T., Brines, M., Juhaszova, M., Sollott, S.J., Lakatta, E.G., and Talan, M.I. (2006b). Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *316*, 999–1005.

Mortimer, E.A., Jr, Monson, R.R., and MacMahon, B. (1977). Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N. Engl. J. Med.* *296*, 581–585.

Najjar, S.S., Rao, S.V., Melloni, C., Raman, S.V., Povsic, T.J., Melton, L., Barsness, G.W., Prather, K., Heitner, J.F., Kilaru, R., et al. (2011). Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *Jama J. Am. Med. Assoc.* *305*, 1863–1872.

Neckář, J., Borchert, G.H., Hloušková, P., Míčová, P., Nováková, O., Novák, F., Hroch, M., Papoušek, F., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2013). Brief Daily Episode of Normoxia Inhibits Cardioprotection Conferred by Chronic Continuous Hypoxia. Role of Oxidative Stress and BKCa Channels. *Curr. Pharm. Des.* 2013 April [Epub ahead of print]

Neckář, J., Marková, I., Novák, F., Nováková, O., Szárszoi, O., Ošťádal, B., and Kolář F. (2005). Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, 566-572.

Neckář, J., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2004). Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 53, 621–628.

Neckář, J., Szárszoi, O., Herget, J., Ošťádal, B., and Kolář, F. (2003). Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res.* 52, 171-175.

Neckář, J., Szárszoi, O., Koten, L., Papoušek, F., Ošťádal, B., Grover, G.J., and Kolář, F. (2002). Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc.Res.* 55, 567-575.

Ng, T., Marx, G., Littlewood, T., and Macdougall, I. (2003) Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad. Med. J.* 79, 367-376.

Nishihara, M., Miura, T., Miki, T., Sakamoto, J., Tanno, M., Kobayashi, H., Ikeda, Y., Otori, K., Takahashi, A., and Shimamoto, K. (2006). Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H748–755.

Nishiya, D., Omura, T., Shimada, K., Matsumoto, R., Kusuyama, T., Enomoto, S., Iwao, H., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., and Yoshiyama, M. (2006). Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 31–39.

Ošťádal, B., and Kolář, F. (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158, 224–236.

Ošťádal, B., and Kolář, F.: *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999.

Ošťádal, B., Ošťádalová, I., and Dhalla, N.S. (1999). Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: Comparative and ontogenetic aspects. *Physiol. Rev.* 79, 635–659.

Ošťádal, B., Procházka, J., Pelouch, V., Urbanová, D., and Widimský, J. (1984). Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol. Bohemoslov.* 33, 129–138.

Ott, I., Schulz, S., Mehilli, J., Fichtner, S., Hadamitzky, M., Hoppe, K., Ibrahim, T., Martinoff, S., Massberg, S., Laugwitz, K.-L., et al. (2010). Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 3, 408–413.

Ozawa, T., Toba, K., Suzuki, H., Kato, K., Iso, Y., Akutsu, Y., Kobayashi, Y., Takeyama, Y., Kobayashi, N., Yoshimura, N., et al. (2010). Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study -. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *74*, 1415–1423.

Parsa, C.J., Matsumoto, A., Kim, J., Riel, R.U., Pascal, L.S., Walton, G.B., Thompson, R.B., Petrofski, J.A., Annex, B.H., Stamler, J.S., et al. (2003). A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest.* *112*, 999–1007.

Patel, N.S.A., Sharples, E.J., Cuzzocrea, S., Chatterjee, P.K., Britti, D., Yaqoob, M.M., and Thiemermann, C. (2004). Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int.* *66*, 983–989.

Rafiee, P., Shi, Y., Kong, X., Pritchard, K.A. Jr., Tweddell, J.S., Litwin, S.B., Mussatto, K., Jaquiss, R.D., Su, J., and Baker, J.E. (2002). Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* *106*, 239-245.

Razavi, H.M., Hamilton, J.A., and Feng, Q. (2005). Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol. Ther.* *106*, 147–162.

Recny, M.A., Scoble, H.A., and Kim, Y. (1987). Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J. Biol. Chem.* *262*, 17156–17163.

Reissmann, K.R. (1950). Studies on the Mechanism of Erythropoietic Stimulation in Parabolic Rats During Hypoxia. *Blood* *5*, 372–380.

Sakanaka, M., Wen, T.-C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., and Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 4635–4640.

Scott, C.L., Robb, L., Papaevangeliou, B., Mansfield, R., Nicola, N.A., and Begley, C.G. (2000). Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood* *96*, 1588–1590.

Sepodes, B., Maio, R., Pinto, R., Sharples, E., Oliveira, P., McDonald, M., Yaqoob, M., Thiemermann, C., and Mota-Filipe, H. (2006). Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *19*, 919–926.

Shen, Y., Wang, Y., Li, D., Wang, C., Xu, B., Dong, G., Huang, H., and Jing, H. (2010). Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates heart ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing the systemic inflammatory response. *Transplant. Proc.* *42*, 1595–1597.

Shi, Y., Rafiee, P., Su, J., Pritchard, K.A., Jr, Tweddell, J.S., and Baker, J.E. (2004). Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res. Cardiol.* *99*, 173–182.

- Suh, J.-W., Chung, W.-Y., Kim, Y.-S., Kim, K.-I., Jeon, E.-J., Cho, Y.-S., Youn, T.-J., Chae, I.-H., Kim, C.-H., and Choi, D.-J. (2011). The effect of intravenous administration of erythropoietin on the infarct size in primary percutaneous coronary intervention. *Int. J. Cardiol.* *149*, 216–220.
- Sutherland, F.J., Shattock, M.J., Baker, K.E., and Hearse, D.J. (2003). Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *30*, 867–878.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., Higuchi, M., Mukai, H.Y., Nakahata, T., Imagawa, S., and Yamamoto, M. (2002). Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* *100*, 2279–2288.
- Takeyama, T., Takemura, G., Kanamori, H., Kawaguchi, T., Ogino, A., Watanabe, T., Morishita, K., Tsujimoto, A., Goto, K., Maruyama, R., et al. (2012). Asialoerythropoietin, a Nonerythropoietic Derivative of Erythropoietin, Displays Broad Anti-Heart Failure Activity Clinical Perspective. *Circ. Heart Fail.* *5*, 274–285.
- Talan, M.I., Ahmet, I., and Lakatta, E.G. (2012). Did clinical trials in which erythropoietin failed to reduce acute myocardial infarct size miss a narrow therapeutic window? *Plos One* *7*, e34819.
- Taniguchi, N., Nakamura, T., Sawada, T., Matsubara, K., Furukawa, K., Hadase, M., Nakahara, Y., Nakamura, T., and Matsubara, H. (2010). Erythropoietin prevention trial of coronary restenosis and cardiac remodeling after ST-elevated acute myocardial infarction (EPOC-AMI): a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Circ. J.* *74*, 2365-2371.
- Teng, R., Calvert, J.W., Sibmooh, N., Piknova, B., Suzuki, N., Sun, J., Martinez, K., Yamamoto, M., Schechter, A.N., Lefer, D.J., et al. (2011). Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. *Basic Res. Cardiol.* *106*, 343–354.
- Ueba, H., Brines, M., Yamin, M., Umemoto, T., Ako, J., Momomura, S., Cerami, A., and Kawakami, M. (2010). Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 14357-14362.
- Voors, A.A., Belonje, A.M.S., Zijlstra, F., Hillege, H.L., Anker, S.D., Slart, R.H.J.A., Tio, R.A., Hof, A. van 't, Jukema, J.W., Peels, H.O.J., et al. (2010). A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.*
- Widimský, J., Urbanová, D., Ressler, J., Ošťádal, B., Pelouch, V., and Procházka, J. (1973). Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc. Res.* *7*, 798–808.
- Wu, H., Lee, S.H., Gao, J., Liu, X., and Iruela-Arispe, M.L. (1999). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3597–3605.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* *83*, 59–67.
- Xu, B., Dong, G., Liu, H., Wang, Y., Wu, H., and Jing, H. (2005). Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates myocardial infarct size: a possible mechanism involves

heat shock Protein 70 and attenuation of nuclear factor-kappaB. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 35, 161–168.

Xue, Y.-Q., Zhao, L.-R., Guo, W.-P., and Duan, W.-M. (2007). Intrastriatal administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 146, 1245–1258.

Ytrehus, K., Liu, Y., Tsuchida, A., Miura, T., Liu, G.S., Yang, X.M., Herbert, D., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (1994). Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am. J. Physiol.* 267, H2383–2390.

Yu, X., Shacka, J.J., Eells, J.B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R.M., Beleslin-Cokic, B., Lin, C.-S., Nikodem, V.M., Hempstead, B., Flanders, K.C., et al. (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Dev. Camb. Engl.* 129, 505–516.

Zanjani, E., Poster, J., Burlington, H., Mann, L., and Wasserman, L. (1977). Liver as Primary Site of Erythropoietin Formation in Fetus. *J. Lab. Clin. Med.* 89, 640–644.

Zong, P., Setty, S., Sun, W., Martinez, R., Tune, J.D., Ehrenburg, I.V., Tkatchouk, E.N., Mallet, R.T., and Downey, H.F. (2004). Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. *Exp. Biol. Med.* Maywood Nj 229, 806–812.