

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Učitelství biologie a chemie pro střední školy



**Bc. Pavlína Zajíčková**

Vliv chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce u spontánně hypertenzních potkanů  
The effect of chronic hypoxia on cardiac ischemic tolerance of spontaneously  
hypertensive rats

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Mgr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 6.5.2013

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Mgr. Janu Neckářovi, PhD. za trpělivost, vstřícnost a čas, které mi při psaní této práce věnoval. Dále děkuji za pomoc a konzultace doc. RNDr. Olze Novákové, CSc., RNDr. Kristýně Holzerové, Mgr. Martině Klevstig a Mgr. Ivaně Bučinské. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině, která mě ve studiu vždy podporovala.

Tato práce vznikla za podpory grantu IAAX01110901 Grantové agentury Akademie věd České republiky.

## **Abstrakt**

Cílem této práce bylo zjistit, jak ovlivní adaptace na chronickou hypoxii ischemickou toleranci srdce u dvou různých hypertenzních kmenů laboratorního potkana. Spontánně hypertenzní potkani (SHR) a potkani konplastického kmene SHR/OlaIpcv-mt<sup>BN/Cri</sup>, jimž byl zaměněn mitochondriální genom kmene SHR za mitochondriální genom normotenzního kmene Brown Norway, byli vystaveni kontinuální normobarické hypoxii (10% O<sub>2</sub>) po dobu 3 týdnů. Kontrolní potkani byli chováni v normoxii. Ischemická tolerance srdce a exprese mitochondriální akonitázy byly analyzovány na konci adaptace. Chronická hypoxie vedla k významnému snížení velikosti infarktu myokardu a poklesu počtu reperfuzních arytmií u obou hypertenzních kmenů. U kmene SHR došlo také k poklesu výskytu ischemických arytmií. Chronická hypoxie neměla vliv na expresi mitochondriální akonitázy ani u jednoho ze studovaných kmenů. Tato práce ukázala, že lze zvýšit ischemickou toleranci srdce u SHR. Zdá se však, že mitochondriální genom SHR potkanů nehraje významnější úlohu v mechanismu protekce.

**Klíčová slova:** chronická hypoxie, hypertenze, infarkt myokardu, arytmie, oxidační stres

## **Abstract**

The goal of this thesis was to discover the influence of adaptation to chronic hypoxia on ischemic tolerance of heart – this experiment was carried out on two different hypertension kinds of laboratory rats. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and rats from a conplastic strain SHR/OlaIpcv-mt<sup>BN/Crl</sup>, whose mitochondrial genome of the SHR strain was replaced with a mitochondrial genome of the normotensive strain Brown Norway, were exposed to continuous normobaric hypoxia (10% O<sub>2</sub>) for a period of 3 weeks. On the other hand, the control group of rats was kept in normoxia. At the end of the adaptation period, the ischemic tolerance of heart and the mitochondrial aconitase expression were examined. In the case of both hypertensive strains, the chronic hypoxia led to a significant drop in the size of a myocardial infarction and also to a drop in the number of reperfusion arrhythmias. In the case of the SHR strain, the incidence of ischemic arrhythmias decreased. Chronic hypoxia had no impact on the aconitase expression for both analysed strains. This thesis showed that the ischemic tolerance of heart can be enhanced in the case of the SHR strain. On the other hand, the mitochondrial genome of the SHR strain does not seem to play any significant role in protection mechanism.

Key words: chronic hypoxia, hypertension, myocardial infarction, arrhythmias, oxidative stress

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	10
<b>2</b>	<b>Literární přehled</b> .....	11
2.1	Ischemie .....	11
2.2	Reperfuze .....	12
2.3	Chronická hypoxie .....	12
2.3.1	Kardioprotektivní účinky .....	14
2.3.2	Nepříznivé důsledky adaptace na chronickou hypoxii .....	14
2.3.3	Molekulární mechanismy kardioprotektivního působení chronické hypoxie .....	15
2.4	Hypertenze .....	15
2.4.1	Hypertenze a ischemická tolerance .....	16
2.4.2	Hypertenze a chronická hypoxie .....	17
2.5	Akonitáza .....	17
2.6	Model konplastických SHR potkanů .....	20
<b>3</b>	<b>Cíle diplomové práce</b> .....	21
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	22
4.1	Laboratorní zvířata .....	22
4.2	Model chronické hypoxie .....	22
4.2.1	Model regionální ischemie koronární artérie .....	23
4.2.2	Stanovení exprese enzymu Aco 2 .....	29
4.3	Kvantifikace .....	35
4.4	Statistické zpracování naměřených dat .....	35
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	36
5.1	Základní sledované parametry .....	36
5.2	Velikost infarktu .....	40
5.3	Ischemické a reperfuzní arytmie .....	40
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	51
6.1	Vliv chronické hypoxie na sledované parametry .....	51

6.2	Vliv chronické hypoxie na ischemické poškození srdce.....	52
6.3	Vliv chronické hypoxie na expresi enzymu Aco 2 .....	54
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>57</b>

## Seznam použitých zkratek

Acetyl-CoA	acely-koenzym A
Aco 1	cytosolová akonitáza
Aco 2	mitochondriální akonitáza
Agt	angiotensinogen
ATP	adenosintrifosfát
APS	persíran amonný
AR	ohrožená oblast myokardu
BK <sub>Ca</sub>	mitochondriální draslíkové kanály aktivované Ca <sup>2+</sup>
BPB	bromfenolová modř
BSA	albumin z hovězího séra
BW	tělesná hmotnost
CNH	kontinuální normobarická hypoxie
CuSOD	měď superoxid dismutáza
D	dvojité předčasné komorové stahy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	D,L-dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EKG	elektrokardiogram
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid redukovaný
HR	tepová frekvence
i.p.	intraperitoneálně
I/R	ischemicko-reperfuzní
IRE	železo-citlivá složka
IRP	železo-citlivý protein
IS	velikost infarktového ložiska
K <sub>ATP</sub>	ATP závislý draslíkový kanál
LAD	sestupná větev levé koronární arterie
LCA	levá koronární arterie
LV	levá srdeční komora
MAP	střední arteriální tlak
mK <sub>ATP</sub>	mitochondriální ATP závislý draslíkový kanál
MnSOD	mangan superoxid dismutáza



mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaný
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný
NC	nitrocelulósová membrána
NO	oxid dusný
pO <sub>2</sub>	parciální tlak kyslíku
re.H <sub>2</sub> O	redestilovaná voda
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RV	pravá srdeční komora
S	jednoduché předčasné komorové stahy
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SHR	spontánně hypertenzní potkan
T	trojité předčasné komorové stahy
TBS	fyzilogický roztok pufrovaný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tg	konplastický kmen SHR/OlaIpcv-mtBN/Crl
TTBS	fyzilogický roztok pufrovaný s Tweenem 20
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTC	2, 3, 5 - trifenylnitrotetrazolium chlorid
VF	komorová fibrilace
VT	komorová tachykardie
WB	tělesná hmotnost
v/v	ředění objem/objem
w/v	ředění hmotnost/objem

# 1 Úvod

Onemocnění kardiovaskulárního systému postihující srdce patří mezi nejrozšířenější příčiny úmrtí ve vyspělých státech světa. Řadíme sem především ischemickou chorobu srdeční a její akutní formu - infarkt myokardu.

Důvodem neustále se zvyšujícího se výskytu tohoto onemocnění je kromě genetických predispozic především špatná životospráva, kam se řadí nevhodné stravování, nedostatek pohybu, kouření, nadměrná konzumace alkoholu. S těmito faktory samozřejmě souvisí i další onemocnění, jako jsou např. diabetes či obezita. Za jeden z hlavních rizikových faktorů je považována hypertenze, tedy vysoký krevní tlak, jehož příčiny však dosud nejsou zcela známy. To všechno jsou v současné době důvody k velmi intenzivnímu základnímu a aplikovanému výzkumu v oblasti prevence a léčby hypertenze a ischemické choroby srdeční.

Nejčastějším experimentálním modelem lidské esenciální hypertenze jsou spontánně hypertenzní potkani (SHR), kteří kromě vysokého krevního tlaku mají poruchy metabolismu lipidů a glukózy.

Jednou z možných variant, jak zvýšit odolnost myokardu k ischemickému poškození je adaptace na chronickou hypoxii. Buněčná odpověď respektive mechanismus evokující tuto kardioprotekci je do této chvíle objasněn jen z malé části. Důvodem mohou být odlišná působení jednotlivých protokolů hypoxie neboť kardioprotektivní efekt hypoxie je přímo na modelu adaptace závislý (viz kapitola 2.3.1).

Velmi důležité organely spojované se zvýšenou ischemickou tolerancí srdce jsou mitochondrie produkující nejen energii, ale také reaktivní formy kyslíku (ROS). Se vzrůstající koncentrací ROS dochází k modifikaci nebo inaktivaci různých mitochondriálních enzymů. Jedním z těchto enzymů je i mitochondriální akonitáza (Aco 2), jejíž hlavní funkcí je přeměna citrátu na isocitrát v Krebsově cyklu vedoucí ke vzniku koenzymů důležitých pro dýchací řetězec.

Mým úkolem bylo porovnat odolnost srdce k ischemicko-reperfuznímu (I/R) poškození u dvou kmenů SHR potkanů adaptovaných na kontinuální chronickou hypoxii. Jako kontrola byl použit kmen SHR. Druhou experimentální skupinu tvořil transgenní konplastický kmen odvozený od SHR, jehož mitochondriální genom byl pozměněn za mitochondriální genom kmene Brown Norway, vyznačující se vysokou tolerancí k ischemickému poškození srdce v porovnání s SHR. V biochemických experimentech jsme se pak zabývali expresí Aco 2.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Ischemie

Ischemická choroba srdeční vzniká jako důsledek sníženého koronárního prokrvení myokardu, a to buď v jedné, nebo více oblastech koronárního stromu. Ischemie myokardu vede ke snížení dodávky kyslíku a živin nezbytných pro běžnou funkci a přežití kardiomyocytů. Buněčná homeostáze je závislá na dodávce energetického ATP vzniklého aerobní cestou. Při ischemických podmínkách, kdy je aerobní produkce ATP snížena, musí buňka spoléhat na anaerobní tvorbu ATP, jejíž efektivita je nesrovnatelně menší než během aerobního metabolismu (Halestrap et al., 2004). Výsledkem dlouhotrvající ischemie je nedostatek energie a s ním spojená tvorba anorganického fosfátu, laktátu a  $H^+$ , které dávají vzniknout acidóze přispívající k poškození kardiomyocytů a buněčné smrti. Díky snížené funkci ATP závislých membránových pump a transportérů dochází také k iontové nerovnováze napříč buněčnými membránami. Hlavními důvody nerovnováhy jsou akumulace sodných kationů v intracelulárním prostoru a zároveň vylučování draselných kationů do extracelulárního prostoru. To může způsobit osmotický otok buňky a následně může dojít k poškození sarkolemy. Tato disbalance je výsledkem poškození  $Na^+/K^+$  ATP závislého výměníku a aktivací  $Na^+/H^+$  pumpy (Aschermann et al., 2004).

V časných fázích ischemie dochází k nadměrné akumulaci  $Ca^{2+}$  v intracelulárním prostoru díky aktivaci  $Ca^{2+}$  sensitivních kanálů a  $Na^+/Ca^{2+}$  výměníku. Úbytek vysokoenergetického fosfátu vede k poruše příjmu  $Ca^{2+}$  do sarkoplasmatického retikula, což způsobuje ještě výraznější hromadění vápenatých kationů v cytosolu. Zvýšená hladina  $Ca^{2+}$  v intracelulárním prostoru vede k poškození buněk aktivací  $Ca^{2+}$  dependentních fosfolipáz, proteáz, otoku buňky a jejímu prasknutí (Ferninandy et al., 2007).

Během ischemie jsou buněčné systémy kromě iontové nerovnováhy narušeny zvýšenou produkcí ROS. Oxidační stres vede k poškození všech částí buňky, tj. lipidů, proteinů i DNA, což má za následek vratné, ale i nevratné změny a z nich vyplývající zhoršenou funkci myokardu. Mezi hlavní zdroje ROS vznikající během ischemie patří mitochondriální elektronový dopravní řetězec, xantinoxidázy a NADPH oxidační systém (Aschermann et al., 2004). ROS také přímo ovlivňují membránové transportéry a proteinové kanály, membránové enzymy podílející se na transportu iontů, peroxidaci lipidů a změně membránové propustnosti (Buja and Entman, 1998).

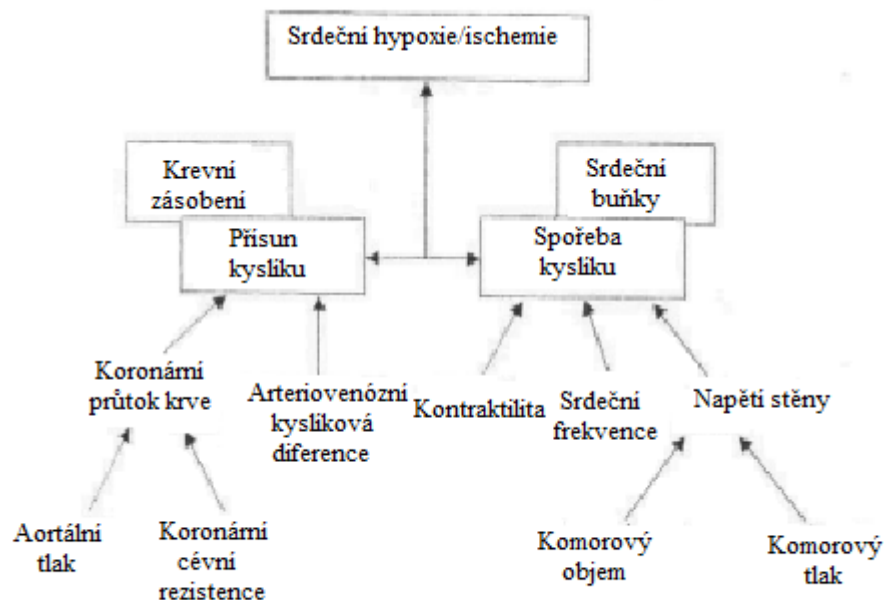
## 2.2 Reperfuze

Reperfuze je obnovení průtoku krve do orgánu nebo do tkáně, a z toho vyplývající opětovné zásobení kyslíkem a živinami. Je to velmi důležitý a nezbytný krok při léčbě akutního infarktu myokardu. Kromě obnovení dodávky živin a kyslíku, jež jsou kritické pro obnovu kontraktilní funkce myokardu, s sebou reperfuze přináší i další poruchy buněčné homeostázy označované jako reperfuční poškození. Výsledkem obnovení průtoku krve v původně ischemickém myokardu je mitochondriální reenergizace, rychlé obnovení pH, vzrůst oxidačního stresu a zvýšená intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Tyto jevy mohou společně vést k otevření mitochondriálních pórů a hyperkontraktilitě (Yellon et al., 2007). Mitochondrie okamžitě využívají opětovný přísun kyslíku a doplňují zásoby energie ztracené během ischemie. Tím, že mitochondrie produkují velké množství kyslíkových radikálů, ovlivňují funkci sarkoplazmatického retikula a zvyšují cytosolickou koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Vysoká hladina  $\text{Ca}^{2+}$  přetrvávající z ischemické fáze ještě umocňuje nekontrolovatelnou myofibrilární aktivitu (Piper et al., 2004). ROS a poškozené kardiomyocyty aktivují mediátory zánětu vyvolávající buněčnou smrt (Yellon et al., 2007).

## 2.3 Chronická hypoxie

Hypoxie je výsledkem nerovnováhy mezi dodávkou a množstvím kyslíku, který srdeční buňka potřebuje. Tkáň myokardu je schopna zlepšit dodávku kyslíku z důvodu velké arteriovenózní diference pouze zvýšením průtoku v koronárních tepnách, nikoliv zvýšenou extrakcí (obrázek č. 1). Existuje více mechanismů, v jejichž důsledku vzniká hypoxie v srdečním svalu, které lze rozdělit do následujících čtyř kategorií. Snížením nebo přerušením průtoku krve v koronárních tepnách je vyvolána tzv. *ischemická hypoxie*, někdy také označovaná jako ischemie myokardu. *Anemická hypoxie* je způsobena sníženou transportní schopností krve pro kyslík při normálním parciálním tlaku kyslíku ( $\text{pO}_2$ ). (např. nižší koncentrace hemoglobinu, otrava oxidem uhelnatým). Naproti tomu *histotoxická hypoxie* je výsledkem sníženého využití kyslíku uvnitř buňky, způsobeného např. otravou kyanidy, nedostatkem vitamínu B či inhibicí oxidativních enzymů při dostatečné saturaci krve a krevním průtoku. *Systémová (hypoxická) hypoxie*, nebo také srdeční hypoxie vzniká v důsledku snížení  $\text{pO}_2$  v tepenné krvi při dostatečném průtoku (Ošťádal a Kolář 1999). Tento stav je u lidí považován za fyziologický ve dvou případech. Prvním z nich jsou

populace trvale žijící ve vysokých nadmořských výškách (např. Andy, Tibet) a druhým je myokard plodu, který je vystaven hypoxii odpovídající nadmořské výšce cca 8000 m.



Obrázek č. 1: Faktory ovlivňující dodávku a spotřebu kyslíku v myokardu (Upraveno podle Ošťádal a Kolář, 1999).

Konstantní, nepřetržitá dodávka kyslíku je základní podmínkou života. Dlouhodobé vystavení člověka a zvířat hypoxickému prostředí vyvolává kardiopulmonální změny, které umožňují zachovat tkáňovou homeostázu a oběhové požadavky během omezené dostupnosti kyslíku. První zprávy o tom, že adaptace na chronickou hypoxii je účinným fenoménem, který zvyšuje ischemickou toleranci srdce, pochází z konce padesátých let dvacátého století (Hurtado, 1960; Kopecký a Daum, 1958). Jak ukázaly následné studie, nejenom dlouhodobé vystavení permanentní hypoxii, ale i intermitentní charakter hypoxie může být efektivní při vyvolání kardioprotektivní adaptivní odpovědi (Neckář a kol., 2002; Widimský a kol., 1973). Intermitentní hypoxie nastává přirozeně v případě opakovaného pobytu ve vysokohorském prostředí. Může být však také důsledkem tzv. syndromu spánkové apnoe, kdy v průběhu spánku dochází k zástavě dýchání na několik desítek vteřin, po kterých následuje intenzivní nádech a normalizace dýchání. V současnosti se výzkum vlivu hypoxie na odolnost srdce k ischemii zaměřuje především na délku,

intenzitu a počet hypoxických epizod během dne, neboť právě tyto parametry mají významný vliv na kladné či negativní důsledky intermitentní hypoxie (Neckář a kol., 2013; Asemu et al., 2000).

Adaptací na chronickou hypoxii dochází ke zvýšené tvorbě erytrocytů z důvodu zvýšené dodávky kyslíku. Důležitou součástí je i metabolická reorganizace, jejímž úkolem je zvýšit využití efektivnějšího využití substrátu (např. sacharidy) vztaženého na spotřebu kyslíku (Essop, 2007).

### **2.3.1 Kardioprotektivní účinky**

Zvýšená odolnost k I/R poškození vyvolaná chronickou hypoxií se projevuje omezením velikosti infarktu (Meerson et al., 1973), sníženým výskytem a závažností ischemických a reperfučních arytmií (Asemu et al., 1999) a zlepšenou obnovou postischemických kontraktilních funkcí srdce (Kolář a Ošťádal, 2004). Po návratu k normoxickým podmínkám dochází postupně k normalizaci hypoxií indukovaných změn, včetně zvýšené ischemické tolerance srdce. Z klinického hlediska je jistě velmi zajímavým nálezem skutečnost, že kardioprotektivní účinek chronické hypoxie na velikost infarktu přetrvává ještě alespoň pět týdnů od poslední hypoxické expozice (Neckář a kol., 2004). Rozdíly v působení chronické hypoxie na myokard nejsou pouze v délce a míře expozice, ale také v rámci pohlaví. Pokud dojde k vystavení chronické hypoxii v postnatálním věku, samice vykazují vyšší odolnost myokardu k nedostatku kyslíku (Ošťádal a kol., 1984), zatímco při expozici v prenatalním období se v pozdějším věku ukázala zvýšená ischemická tolerance pouze u samců (Netuka a kol., 2010).

### **2.3.2 Nepříznivé důsledky adaptace na chronickou hypoxii**

Jak už to tak bývá, i chronická hypoxie má odvrácenou stranu mince, a to v podobě nepříznivého dopadu na kardiopulmonální systém. Příkladem je přestavba plicních cév, z ní vyplývající rozvoj plicní hypertenze a v jejím důsledku vznik hypertrofie pravé srdeční komory (Hampl a kol., 2006). V případě těchto negativních dopadů se zdá, že není rozdíl mezi vystavením organismu permanentní nebo intermitentní hypoxii v hypoxické komoře (Hampl a kol., 2000).

### 2.3.3 Molekulární mechanismy kardioprotektivního působení chronické hypoxie

Současný výzkum se intenzivně zabývá tímto fenoménem a bylo poukázáno na mnoho buněčných struktur a proteinů hrající důležitou roli v mechanismu protekce, nicméně detailní molekulární mechanismy zůstávají ne zcela objasněny. Jednu z klíčových rolí hrají mitochondrie a jejich ATP závislé draslíkové kanály ( $K_{ATP}$ ), lokalizované na vnitřní membráně ( $mK_{ATP}$ ) (Neckář a kol., 2002). Chronická hypoxie způsobuje tonickou zvýšenou aktivitu těchto kanálů a s tím související zvýšený vtok  $K^+$  do mitochondrie vyvolávající sníženou tvorbu ATP a zvýšenou produkci ROS. Tvzení, že  $mK_{ATP}$  jsou důležitou součástí kardioprotekce vyvolanou hypoxií podporují např. práce Neckář a kol., (2002); Eells et al., (2000), které ukázaly, že aktivátory  $mK_{ATP}$  kanálů zmenšují velikost infarktu u normoxických jedinců, zatímco blokátory  $mK_{ATP}$  kanálů inhibovaly kardioprotektivní efekt chronické hypoxie (Asemu et al., 1999).

Na vnitřní mitochondriální membráně se kromě  $mK_{ATP}$  kanálů nachází ještě draslíkové kanály aktivované vápenatými ionty, tzv.  $BK_{Ca}$  kanály (Borchert et al., 2011). V důsledku jejich otevření a zvyšujícím se vtokem  $K^+$  do matrix, buňka předchází přetížení  $Ca^{2+}$ . Dochází také ke zvýšené produkci ROS, stejně jako v případě otevření  $mK_{ATP}$  kanálů. V mechanismu kardioprotektivního působení chronické hypoxie se podílí ještě celá řada dalších molekul, jakými jsou např. oxid dusný (NO) nebo protein kináza C (viz Kolář a Ošťádal, 2004).

## 2.4 Hypertenze

Vysoký krevní tlak se řadí mezi tzv. civilizační choroby, je významným rizikovým faktorem pro kardiovaskulární choroby, onemocnění ledvin a další nemoci ve většině rozvinutých zemí světa. Jako hypertenzi označujeme zdravotní stav jedince, kdy je při opakovaném měření krevního tlaku hodnota diastolického tlaku vyšší než 90 mm Hg a systolického nad 140 mmHg; u starých jedinců může být zvýšena hodnota systolického tlaku na 160 mm Hg. Následky vysokého krevního tlaku způsobují každý rok 42 % úmrtí v Evropě. Zákeřnost této choroby spočívá v absenci příznaků před nástupem závažných obtíží, kdy už v mnoha případech dochází k nezvratnému poškození tkání a orgánů (Světová zdravotnická organizace). Pro zlepšení preventivních opatření je nutné pochopení časných změn rozvoje hypertenze předcházející klinickým projevům, nebo jiných nemocí s

ní spojených. Znalosti o tom, jak se rizikové faktory mění v průběhu času, umožňuje lépe pochopit současná experimentální kardiologie. Ta využívá vhodných zvířecích modelů, které jsou ekonomicky dostupné, používané v kardiovaskulární fyziologii a jsou geneticky dostatečně definované. Jako nejvhodnější se ukazuje používání laboratorních potkanů. K dispozici je široké spektrum experimentálních hypertenzních modelů lišící se v genetických a environmentálních podmínkách indukujících zvýšení krevního tlaku (Zicha a Kuneš, 1999).

Pro studium esenciální lidské hypertenze, jejíž příčinou je individuální fenotyp, který je výsledkem různého účinku jednotlivých alel, se nejčastěji využívají SHR potkani. Byli vyšlechtěni v šedesátých letech dvacátého století jako patofyziologický model pro lidskou hypertenzi neurogenního původu. Tento kmen, stejně jako mnoho dalších, byl vyšlechtěn z původně nehomogenních populací potkanů, neustálou po řadu generací trvající selekcí jedinců s nejvyšším krevním tlakem. Díky sourozenskému páření se po více jak 20 generacích stali všichni jedinci daného kmene geneticky shodní, tzn. vznik imbredního kmene s fixovanou systémovou hypertenzí (Okamoto, 1963).

#### **2.4.1 Hypertenze a ischemická tolerance**

Kromě hypertenze, byla u SHR potkanů také prokázána řada jiných fyziologických a metabolických odlišností. Patří mezi ně např. srdeční hypertrofie, renální dysfunkce, dyslipidémie nebo inzulinová rezistence. I přes tyto potíže, se u nich neprojevují cévní problémy, nemají tendenci k rozvoji cévní mozkové příhody, aterosklerózy nebo cévní trombózy. (Yamori, 1994). Řada studií však ukazuje na zvýšenou citlivost k I/R poškození srdce (Yano et al., 2011; Kolář a Parratt 1997; Snoeckx et al., 1986). Snížená ischemická tolerance srdce může být dána zhoršenou schopností regulovat vápníkový metabolismus. Trvale vysoká koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu způsobuje zvýšenou kontrakturu, která vede ke kompresi mikrocév myokardu a snížení průtoku krve (Piper et al., 2003). Některé studie naznačují, že i nadměrné množství  $\text{Na}^+$  v intracelulárním prostoru nebo snížený antioxidační potenciál mohou mít významný podíl na citlivosti srdce k I/R poškození (Golden et al., 1994).



## 2.4.2 Hypertenze a chronická hypoxie

Dosud neexistují žádné studie, které by se systematicky zabývaly I/R poškozením srdce u dospělých potkanů kmene SHR v souvislosti s chronickou hypoxií. Charvátová a kol. (2012) publikovala studii, která analyzovala ischemickou toleranci srdce u jednodenních a desetidenních mláďat kmene SHR, která byla adaptována na chronickou intermitentní hypoxii. Ukázalo se, že chronická hypoxie nemá vliv na odolnost neonatálního srdce k I/R poškození. U dospělých potkanů SHR chronická intermitentní hypoxie může potencovat rozvoj hypertenze (Belaidi et al., 2009). Jiné studie zase ukazují chronickou hypoxii jako jeden z možných způsobů snížení systolického krevního tlaku (Janssens et al., 1994; Hentley and Trucker, 1987). Otázky týkající se adaptace SHR potkanů na chronickou hypoxii zůstávají stále předmětem zkoumání a nelze zatím vyvozovat žádné konkrétní závěry.

## 2.5 Akonitáza

Proteiny obsahující vazbu mezi atomem železa a síry (Fe-S) tvoří jednu z nejvíce se vyskytujících a funkčně mnohoúčelových skupin metaloproteinů. Více než 120 bílkovin skládajících se z Fe-S klastrů se podílí na základních procesech jako je dýchání, fotosyntéza, fixace dusíku nebo hrají roli prostředníka v metabolismu. Esenciálním enzymem cyklu kyseliny citrónové (nebo také Krebsův cyklus) obsahující v jádře [4Fe-4S] klastr je akonitáza. V savčích buňkách se vyskytují dvě isoformy lišící se svými funkcemi. Aco 2 má významnou úlohu v Krebsově cyklu, zatímco bifunkční cytosolový enzym (Aco 1) se podílí i na regulaci metabolismu železa (Beinert et al., 1997). Studie na kvasinkách ukázaly, že Aco 2 může hrát významnou úlohu v údržbě mitochondriální DNA (mtDNA) bez ohledu na její enzymatickou aktivitu (Chen et al. 2005). Buněčná i systémová regulace hladiny těchto enzymů může mít vliv na řadu buněčných aktivit, a to jak v rámci normálních i patofyziologických podmínek.

Akonitáza je známá především pro svou schopnost katalyzovat reverzibilní přeměnu citrátu na isocitrát přes cis-akonitát v Krebsově cyklu. Je známo, že citrát patří mezi klíčové meziprodukty některých energeticky významných drah a je nezbytným metabolickým zprostředkovatelem. V mitochondrii, citrát přeměňuje acetyl-CoA na dvě molekuly oxidu uhličitého a zároveň dochází k produkci NADH a FADH<sub>2</sub>. Jejich reoxidací přes elektron transportní řetězec vznikají molekuly ATP (Lawlis and Roche 1980).

Rovnovážná úloha akonitázy a spotřeba citrátu závisí na aktivitě  $\text{NADP}^+$  dependentní isocitrát dehydrogenáze patřící mezi tři rychlost limitující enzymy. Isocitrát dehydrogenáza využívá produkty katalyzované akonitázou a skrz inhibici ATP a NADH řídí jednu z částí citrátového cyklu.

Pokud tedy není potřeba syntézy ATP vysoká, dochází k akumulaci citrátu, který je transportován přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí vhodných přenašečů do cytosolu a směřuje do biosyntézy mastných kyselin, kde je skladován na energetické využití, případně může působit jako reaktant a inhibovat enzymy předchozího kroku. V cytosolu je citrát substrátem pro ATP-citrát lyázu, která dává vnik acetyl-CoA, nepostradatelného pro cholesterol a biosyntézu mastných kyselin v játrech a tukové tkáni. V procesu, kdy je citrát metabolizován Aco 1 a  $\text{NADP}^+$ -dependentní isocitrát dehydrogenázou dochází k redukci  $\text{NADP}^+$  na NADPH za vzniku  $\alpha$ -ketoglutarátu. NADPH je významný kofaktor pro řadu enzymatických reakcí, které jsou součástí biosyntézy lipidů a cholesterolu tak i glutationového metabolismu. Citrát má také významnou regulační roli v glykolýze, syntéze mastných kyselin a oxidaci. Inhibice akonitázy, vzniklá buď nedostatkem železa nebo oxidačním stresem, vede ke snížení produkce ATP, zvyšuje pravděpodobnost hromadění tuku, snížení glykolýzy a snížení oxidace mastných kyselin (Voet, 2008; Comte et al., 2002).

Biochemické a fylogenetické studie naznačují, že během vývoje akonitázové rodiny dochází díky časně genové duplikaci k nezávislému vývoji Aco 1 na vývoji Aco 2. Následná duplikace Aco 1 dává vzniknou dvěma homologům, které poté získávají schopnost vázat se na RNA obsahující železo citlivé složky (IRE). V savčích buňkách má železo-citlivý protein (IRP1) funkci akonitázy i RNA vazebnou funkci, zatímco druhý homolog, IRP2, slouží jako RNA vazebný protein. Pokud není přítomen Fe-S klastr u IRP1 dochází ke ztrátě akonitázové aktivity a ke spojení IREs. Když je železo opět přítomno v dostatečném množství, klastr se regeneruje a dochází tím k obnově akonitázové aktivity. IRP1 a IRP2 jsou vysoce homologní, pracují s cytosolovým železem různými mechanismy. IRP2 je regulovaný přes proteiny degradované železem a kyslíkem, zatímco IRP1 zaznamenává cytosolové železo a oxidační stres skrze Fe-S klastr (Pantopoulos, 2004; Pitula et al., 2004).

I když Aco 2 není považována za limitující faktor, snížení její aktivity v srdečních buňkách vede k poklesu toku citrátového cyklu. Patří také mezi jeden z cílů oxidačního poškození při stárnutí. Buněčná inaktivace je způsobena enzymovou citlivostí k oxidačnímu stresu a dostupností železa, stabilitu Fe-S klastru a proteinu může také

ovlivnit fosforylace. U obou isoformů akonitázy může být Fe-S klastr narušen vystavením ROS, NO, NO<sup>3-</sup>. Uvolnění reaktivního železa může také vyvolat oxidativní poškození buněčných složek (Vásquez-Vivar et al., 2000).

Vystavením myokardu ischemii s následnou reperfuzí dochází k vyčerpání vysokoenergetických fosfátů. Zvýšené mitochondriální produkce ROS vyvolaná oxidačním stresem modifikuje buněčné komponenty, strukturální proteiny, transportní ionty a enzymy. Mezi srdeční enzymy podléhající právě díky ROS různým modifikacím či inaktivacím patří např. enzymy glykolýzy (fosfofruktokináza (Knott et al., 2005; Carperter and Hand, 1986) a glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Ishii et al., 2003)), Krebsova cyklu (mimo jiné akonitáza (Bulteau et al., 2005) a malát dehydrogenáza (Eaton et al., 2002)), intracelulárního transportu energie (kreatinkinázy (White et al., 2005)) a antioxidační obrany (glutathion reduktázy, glutathion peroxidáza (Yim, 1999) a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (Mallet et al., 2002)). Dle závažnosti oxidačního stresu, mohou být enzymatické modifikace reversibilní nebo ireverzibilní. Ukázalo se, že buňky obsahují takové enzymatické systémy, které jsou schopny zvrátit modifikaci proteinu nebo obnovit jeho funkci. Jsou jimi thioredoxin reduktáza/thioredoxin, glutoredoxin, metionin sulfoxid reduktáza a sulfiredoxin. Některé receptor a enzym zprostředkované systémy katalyzují produkci volných radikálů jako odpověď na intracelulární a extracelulární změny (Biteau et al., 2003). Proto je důležité dívat se na volné radikály vzniklé při fyziologických a patofyziologických podmínkách nejen jako na látky vyvolávající škodlivé procesy, ale jako na látky indukující důležité odpovědi na změny v homeostázi.

Akonitáza patří mezi enzymy, jejichž aktivita během akutního infarktu myokardu nebo srdeční zástavy klesá, ale díky obnovení krevního toku se její aktivita vrací do normálního stavu. Pravděpodobné protektivní působení akonitázy je připisována mitochondriálnímu železu vázajícímu proteinu frataxin. Jejich interakce chrání akonitázu výhradně při reperfuzi, a to před rozpadem klastru, ireverzibilní inaktivaci a degradaci. Ztráta aktivity akonitázy je dána odtržením nestálého  $\alpha\text{Fe}$  z  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  klastru, i když některé studie ukazují, že ztráta aktivity akonitázy během reperfuze nekoresponduje se zvyšující se hladinou klastru  $3[\text{Fe-4S}]^{1+}$  (Flint et al., 1993). Stejně tak může prodělat reverzibilní oxidativní inhibici, aniž by došlo ke změně struktury klastru. To nasvědčuje potenciální protekci vyplývající z interakce enzymu s frataxinem, který se jeví jako chaperon protein (Bulteau et al., 2004). Nicméně je velmi podstatné si uvědomit, že tenkou hranici mezi reverzibilní a nevratnou ztrátou mitochondriální funkce tvoří celá řada proměnných. Mohou jimi být délka ischemie, míra oxidačního stresu, věk atd..

## 2.6 Model konplastických SHR potkanů

V poslední době se ukazuje, že velmi důležitou roli v dědičnosti některých závažných onemocnění může hrát mtDNA. Proto byl pro zjišťování genů způsobujících vysoký krevní tlak a metabolické poruchy u kmene SHR vytvořen nový kmen, a to přenesením mtDNA z normotenzního kmene Brown Norway (BN/Crl) na genetické pozadí spontánně hypertenzních potkanů SHR/Ola, ve spolupráci Fyziologického ústavu AV ČR a Biologického ústavu 1. Lékařské fakulty UK. Vzniklý konplastický kmen SHR/OlaIpcv-mt<sup>BN/Crl</sup> se liší od SHR v několika mutacích na mitochondriálním genomu, ale jaderný genom mají oba kmeny shodný (Pravenec a kol., 2007).

V souvislosti s tímto kmenem bylo nedávno ukázáno, že rozdíly v mtDNA mohou být velmi úzce spojeny s rizikovými faktory dědičnosti u diabetu 2 (Pravenec a kol., 2007). Jiné studie zabývající se tímto kmenem dosud nebyly publikovány, ale existují i práce na jiných konplastických kmenech, které se snaží objasnit funkci mtDNA (např. Houštek a kol, 2012).

### 3 Cíle diplomové práce

Na základě dostupné literatury o vlivu chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce u spontánně hypertenzních potkanů jsme si definovali následující cíle:

- 1) Zjistit, zda záměna mitochondriálního genomu hypertenzních potkanů kmene SHR za mitochondriální genom normotenzních zvířat kmene Brown Norway ovlivní ischemickou toleranci srdce k I/R poškození.
- 2) Zjistit, jak adaptace na kontinuální normobarickou hypoxii ovlivní ischemickou toleranci srdce k I/R poškození u spontánně hypertenzních a konplastických potkanů.
- 3) Zjistit, zda je exprese enzymu Aco 2 u spontánně hypertenzních a konplastickým potkanů odlišná a jaký vliv má chronická kontinuální hypoxie na expresi tohoto enzymu.

## **4 Metodika**

### **4.1 Laboratorní zvířata**

Dospělí samci potkanů kmene SHR a konplastického kmene SHR/OlaIpcv-mt<sup>BN/Crl</sup> (Tg) byli rozděleni do dvou experimentálních skupin na normoxické a adaptované na kontinuální normoxickou hypoxii (CNH). Po uplynutí adaptační fáze byly pokusy realizovány na čtyřech skupinách zvířat.

### **4.2 Model chronické hypoxie**

Během adaptační fáze byli potkani vystaveni CNH. Adaptace probíhala po dobu tří týdnů (24hod/den, 7dní/týden) v normobarické hypoxické komoře. Hypoxické podmínky (10% kyslíku) byly vytvořeny pomocí hypoxických generátorů a v komoře byla udržována stálá teplota a vlhkost.

#### **Charakteristika experimentálních skupin**

##### 1.skupina

Potkani kmene SHR chováni po celou dobu adaptace v normoxických podmínkách.

##### 2.skupina

Potkani kmene SHR adaptováni na CNH.

##### 3.skupina

Tg potkani chováni po celou dobu adaptace v normoxických podmínkách.

##### 4.skupina

Tg potkani adaptováni na CNH.

## 4.2.1 Model regionální ischemie koronární artérie

Standardní metodou pro studium ischemické tolerance myokardu u laboratorních potkanů je model srdce *in situ*. Podstatou tohoto přístupu je vyvolání regionální ischemie myokardu okluzí koronární arterie u narkotizovaného a uměle ventilovaného zvířete. V důsledku uzavření cévy dochází k nedostatečnému zásobování srdečních buněk kyslíkem vedoucí k odumírání buněk a vzniku akutního infarktu myokardu. Jedním z dalších projevů akutního infarktu myokardu je také výskyt komorových arytmií, které lze zaznamenávat během ischemie a na začátku reperfuze.

### 4.2.1.1 Operační fáze

Jako anestetikum byl experimentálním potkanů podán pentobarbital sodný intraperitoneálně (i.p.; Sigma-Aldrich) v dávce 60 mg/kg. Hloubka anestezie byla testována před operační fází štípnutím zvířete chirurgickou pinzetou do konce ocasu. Poté byli potkani přemístěni na vyhřívaný operační stolek, který udržoval tělesnou teplotu během celého pokusu v rozmezí 37 až 38 °C, která byla monitorována pomocí rektálního teploměru. Ze vzorku ocasní krve byl měřen hematokrit. Směsná krev byla odebrána do kapilár (Vitrex Medici), které byly centrifugovány (10000 otáček, 5 min) v mikrocentrifuze (Micro 20, Hettich) a následně byl stanoven poměr červených krvinek pomocí odčítacího pravítka.

Operační fáze byla zahájena kanylací levé arterie karotis (pro měření krevního tlaku) heparizovanou polyethylenovou kanylou (Portex) a následným zavedením tracheální kanyly do průdušnice. V dalším kroku došlo k otevření hrudníku asi 1 cm pod spojnici předních končetin v oblasti 4. mezižebří. Následovalo okamžité napojení tracheální kanyly na ventilační pumpu (Ugo Basile), která byla nastavena na frekvenci 65 - 70 cyklů/min a dechový objem 1,2 ml vzduchu/100 g zvířete. Po napojení potkana na umělou ventilaci a stabilizaci dýchání, byl pomocí nůžek zvětšen hrudní otvor pro vložení retraktoru umožňující lepší přístup k srdci. Odstraněním perikardu pomocí chirurgické pinzety byla zpřístupněna sestupná větev levé koronární arterie (LAD), pod kterou bylo podvléknuto šicí vlákno, k provedení okluze, pomocí chirurgické jehly (Chimax). Podvaz byl umístěn 1-2 mm distálně od místa odstupu LAD od levé koronární arterie (LCA). Po zavedení vlákna byla na oba konce nasazena polyethylenová kanyla, která byla zajištěna

chirurgickou svorkou. Aby nedocházelo k osychání tkání v průběhu experimentu, byla operační rána zakrytá vlhkou buničinou. V dalším kroku byl potkan napojen na měření EKG. To bylo měřeno pomocí tří jehlových snímacích elektrod, které byly rozmístěny na povrch potkana tak, aby byl EKG signál co nejčitelnější.

Dále byl měřen arteriální krevní tlak. K monitorování arteriálního krevního tlaku byla využita nakanylovaná arterie karotis. Tlak byl měřen přímo pomocí vnějšího tlakového snímače (Gould P23Gb).

Jak EKG, tak arteriální krevní tlak byly zaznamenávány programem CAR, vytvořeném na oddělení Vývojové kardiologie FgÚ AV ČR. Měření probíhalo od začátku stabilizace, v průběhu celé fáze ischemie a v prvních třech minutách reperfuze.

Po ukončení ischemické fáze pokusu a na začátku fáze reperfuze, byl pomocí několika stehů uzavřen hrudník zvířete. Z hrudní dutiny byl odsát vzduch a sekrety pomocí podtlaku vytvořeného injekční stříkačkou. Potkan byl následně odpojen od dýchací pumpy a spontánně dýchající byl přemístěn na vyhřívanou podložku. V průběhu reperfuze byla pravidelně kontrolována hloubka anestézie.

#### **4.2.1.2 Experimentální protokol**

V průběhu celého experimentu byla monitorována ventilace, teplota a spánek zvířete. Při zvýšené reakci potkana na vnější podněty byl podán pentobarbital sodný i.p. v dávce odpovídající 1/4 dávky původní. Všechny experimentální skupiny podstoupily operační fázi pokusu. Po deseti minutách od napojení na měření EKG a tlaku (stabilizace) byly experimentální skupiny podrobeny regionální ischemii levé komory s následnou reperfuzí. Okluze byla navozena tlakem polyethylenové kanyly proti arterii v místě podvazu a upevněním kanyly na šicím vláknech chirurgickou svorkou. Pro zajištění stability upevněné trubičky byla použita vlhká buničina. Po uplynutí 20 minut byla sejmuta svorka a kanyla byla sejmuta z vlákna. Následovala reperfuze trvající tři hodiny. Po skončení této části bylo vyjmuto srdce z těla potkana a použito pro stanovení velikosti infarktu.



#### 4.2.1.3 Stanovení velikost infarktu

Po ukončení reperfuze bylo srdce pomocí nůžek opatrně vystřiženo z hrudníku zvířete a okamžitě vloženo do kádinky se studeným fyziologickým roztokem. Na kanylu s injekční stříkačkou, která byla napřed propláchnuta heparinem a následně naplněna fyziologickým roztokem, byla napojena aorta. Poté bylo srdce promyto tak, aby krev v koronárním řečišti a dutinách komor byla vypuzena.

Po důkladném promytí byla znovu provedena okluze LAD koronární arterie. Poté bylo srdce jednorázově promyto 2 ml 5 % roztokem  $\text{KMnO}_4$  (Lachema), aby došlo k barevnému odlišení normálně perundované tkáně od okludované oblasti.  $\text{KMnO}_4$  je silné oxidační činidlo, sám se tedy v perfundované části redukoval na  $\text{MnO}_2$  způsobující hnědočerné zbarvení dané tkáně.

Po aplikaci  $\text{KMnO}_4$  byl jeho přebytek v koronárním řečišti a dutinách komor pečlivě vypláchnut injekční stříkačkou s fyziologickým roztokem, která byla nasazena na aortální kanylu. Až poté, co odkapávající fyziologický roztok ztratil fialové zbarvení, byla uvolněna ligatura.

Poté byly z myokardu odstraněny srdeční síně a odstupující cévy. Srdce bylo pomocí filtračního papíru osušeno a zabaleno do potravinářské folie. Takto připravené bylo vloženo do mrazáku ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) na alespoň 1 h z důvodu fixace pro následné nařezání komor na 1mm tenké řezy. První řez byl veden v bazální části komor kolmo na podélnou osu levé komory (LV) těsně pod atrioventrikulární chlopní, což určovalo rovinu pro následující řezy. Tímto způsobem bylo připraveno 6-8 řezů (*obrázek č. 2*). Takto připravené řezy byly perfundovány v 10-ti ml 1 % 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu - (TTC; Sigma-Aldrich) ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (0,1 g TTC+10 ml pufru) (pro příprava pufru o pH 7,4 bylo smícháno: 7,75 ml 0,1 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/100$  ml v dionizované vodě; Penta) a 2,25 ml 0,1 M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/100$  ml dionizované vodě; Penta)) po dobu 30 min ve  $37\text{ }^\circ\text{C}$  vodní lázni. Následně byl roztok TTC vylit a nahrazen 10 % roztokem formaldehydu, který zafixoval obarvené srdeční řezy. Takto připravené řezy byly vloženy do lednice. Po 2-3 dnech byla z řezů odstraněna pravá komora. Poté byly řezy přemístěny na Petriho misku a vyfoceny z apikální i bazální strany digitálním fotoaparátem (Nikon D70) při konstantním osvětlení laboratorní lampou. Vzniklý soubor fotografií byl použit pro analýzu velikosti infarktu pomocí programu Ellipse (ViDiTo). Velikost infarktového ložiska (IS), velikost ohrožené oblasti (AR) a velikost LV byla stanovena pomocí počítačové planimetrie.



Obrázek č. 2: Fotografie řezů obarveného myokardu.

#### 4.2.1.4 Vyhodnocení experimentálně získaných dat

##### 4.2.1.4.1 Velikost infarktu

Pro stanovení velikosti IS byly použity fotografie příčných řezů LV. Pomocí programu Adobe Photoshop byly z každého snímku postupně vyříznuty jednotlivé řezy srdce a uloženy jako samostatné soubory (obrázek č. 3). Poté byl každý ze souboru vyhodnocen v programu Ellipse, umožňující analýzu jednotlivých ploch, a to na principu barevného rozlišení jednotlivých ploch daného řezu vzniklého díky roztoku  $\text{KMnO}_4$  a TTC. Hnědé zbarvení představovalo normálně perfundovanou tkáň neovlivněnou okluzí, bílá barva odpovídala nekrotickému ložisku a tkáň zbarvená do červena představuje oblast, která sice byla oddělena od krevního zásobení v průběhu ischemie, ale přežila.



*Obrázek č. 3:* Příčný řez obarveného srdce. Černohnědá barva - oblast normálně perfundovaná; červená barva - oblast, která odolala ischemickému poškození v ohrožené oblasti; bílá barva - nekrotická tkáň.

Jednotlivé řezy byly proloženy třemi připravenými sítěmi bodů (35 x 35 bodů). V první síti byly vybrány všechny body, které náležely danému řezu. Počet těchto bodů odpovídal velikosti LV. V druhé síti byly označeny body nacházející se v hnědé oblasti, jejichž počet korespondoval s velikostí normálně perfundované tkáně. Rozdíl mezi počtem bodů získaných v první síti a počtem bodů ze sítě druhé odpovídal velikost AR. Třetí síť byla využita na označení bodů ležících v červeně zbarvené oblasti. Odečtení bodů z třetí sítě od velikosti AR jsme získali velikost IS.

#### **4.2.1.4.2 Ischemické a reperfuční arytmie**

Komorové arytmie byly sledovány během celé fáze ischemie a prvních tří minut reperfuze.

Na EKG záznamu jsme hodnotili 5 typů arytmií (*obrázek č. 4*):

Jednoduché předčasné komorové stahy – tzv. singles (S);

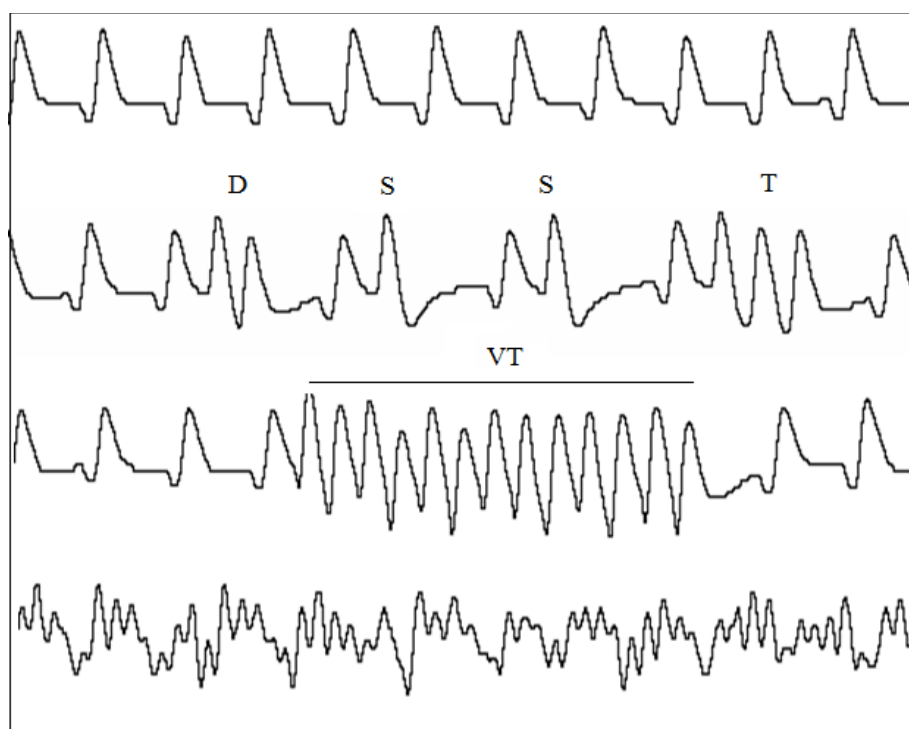
Dvojité předčasné komorové stahy těsně po sobě následující – tzv. doublets (D);

Trojité předčasné komorové stahy těsně po sobě následující – tzv. triplets (T);

Komorové tachykardie (VT) projevující se pravidelnými předčasnými komorovými stahy o minimálním počtu čtyř a více;

Komorové fibrilace (VF) představující rychlé heterogenní stahy komor.

Záznamy EKG pro jednotlivá zvířata byly uloženy v počítači, kde jsme pomocí programu CAR analyzovali jednotlivé typy arytmí. Programem vytvořený dokument obsahující údaje o zastoupení jednotlivých typů arytmí v průběhu času během ischemie a reperfuze jsme dále využili pro statistické zpracování.



Obrázek č. 4: Typy ischemických arytmí: 1. řádek - normální rytmus; 2. řádek - singl (S), doublet (D), triplet (T); 3. řádek - komorová tachykardie (VT); 4. řádek - komorová fibrilace.

Podle zastoupení jednotlivých typů arytmí jsme ke každému ze záznamů přiřadili hodnotu arytmetického skóre (*tabulka č. 1*).

<b>Body</b>	<b>Typ arytmii</b>
0	bez arytmii
1	jednoduché předčasné komorové stahy (singles; S)
2	dvojité (doubles; D) a trojité (triplets T) předčasné komorové stahy
3	komorové tachykardie (VT)
4	reverzibilní komorové fibrilace (VF)
5	ireverzibilní komorové fibrilace

Tabulka č. 1: Bodové hodnocení arytmii (skóre).

## 4.2.2 Stanovení exprese enzymu Aco 2

### 4.2.2.1 Zdroje používaných chemikálií

V tabulce č. 2 jsou uvedeny zdroje používaných chemikálií.

<b>Zdroj</b>	<b>Chemikálie</b>
Bio-Rad	BSA standard 2 mg/ml
Lachema	glycerol, kyselina octová
Lach-Ner	methanol
Roche	Protein inhibitor cocktails tablets
Sigma	Acrylamid-bisacrylamid (37,5:1) 30%, APS for electrophoresis (98%), bis-TRIS, BPB, BSA, činidlo bradfordové, DTT, EDTA, Glycin for electrophoresis (min. 99%), Ponceau 2S, sacharóza, Tris
Serva	SDS (cryst. Research grade), TEMED, Tween-20 (pure)
Penta	NaCl p.a.
Pierce	Super signal ® West Dura Extended duration substrate

Tabulka č. 2: Zdroje chemikálií.

### 4.2.2.2 Příprava vzorků – homogenizace srdeční tkáně

Po vyjmutí vzorků z tekutého dusíku byla srdeční tkáň (její LV) rozmrazena v homogenizačním pufru (0,250 M sacharóza; 0,020 M Tris; 0,001 M EDTA; pH 7,4) a následně pomocí nůžek roztříhána na stejně velké kousky (cca 1 mm). Vzniklá suspenze byla homogenizována homogenizátorem typu Potter-Elvehjem (10 tahů teflonovým pístem

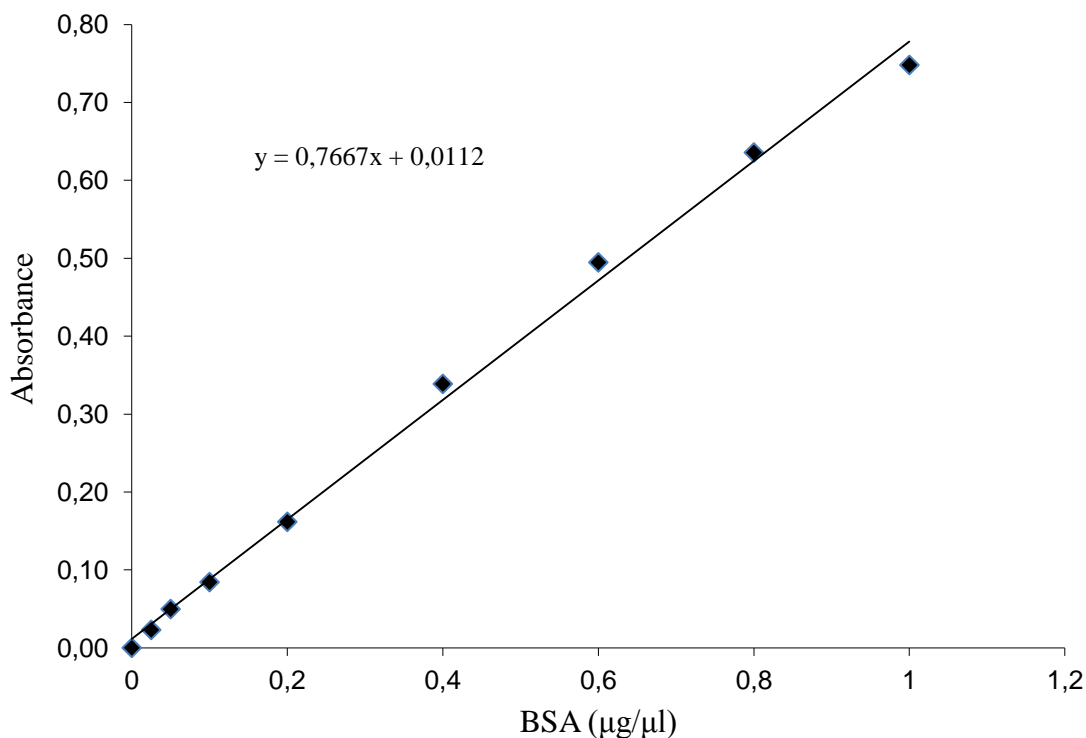
otáčejícím se 1300 rpm). Vytvořený homogenát byl po přefiltrování přes 3 vrstvy gázy opět homogenizován skleněným homogenizátorem typu Tenbroeck. Takto byl připraven desetiprocentní homogenát.

Pro imunodetekci byl ke vzorkům přidán koktejl inhibitorů proteáz (Protease inhibitor cocktail tablets – širokospektrální směs inhibitorů pro inhibici metaloproteáz, serinových a cysteinových proteáz).

#### **4.2.2.3 Stanovení koncentrace proteinů**

Pro zjištění koncentrace proteinů na základě absorbance byla použita metoda podle Bradforda. Základním principem je navázání modrého barviva Coomassie Brilliant Blue (složka činidla Bradfordové) na neznámý protein, kde je jeho množství vztaženo na různá množství standardního proteinu (BSA-hovězí sérový albumin; 2 mg/ml). Koncentrační křivka byla vytvořena v koncentracích 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1  $\mu\text{g}$  BSA/ $\mu\text{l}$ . Na 96-jamkovou destičku typu P (Gama) byly vždy napipetovány blank (redestilovaná voda), standardy a vzorky v tripletu po 10  $\mu\text{l}$ . Do každé jamky bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  Bradfordova činidla. Po desetiminutové inkubaci byla na této destičce spektrofotometricky změřena absorbance na přístroji Varioscan (Varioscan Flash, micro plate reader, Thermo Scientific, software Skanlt pro Varioskan Flash) při vlnové délce 595 nm. Výsledné koncentrace jednotlivých vzorků byly vypočteny z kvadratické rovnice kalibrační křivky (*graf č. 1*).

Koncentrace vzorků byla dále upravena přidáním vzorkového pufru (0,3 M Tris, 10 % (v/v) glycerol, 0,2 % (w/v) BPB, 0,13 M DTT, pH 6,8) do konečné koncentrace 1,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Poté byly umístěny do mrazáku (-80 °C).



Graf č. 1: Kalibrační křivka pro odečtení koncentrace proteinů ve vzorcích.  $y$  – rovnice regrese.

#### 4.2.2.4 Diskontinuální elektroforéza polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

K separaci proteinů byla zvolena denaturační metoda zvaná SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát – polyakrylamid gel elektroforéza) s použitím 8 % dělicího a 5 % zaostřovacího polyakrylamidového gelu. Rozdělení proteinů proběhlo při pokojové teplotě, při napětí 100 mV, které bylo po 40 min zvýšeno na 200 mV, a to do doby, než čelní strana migrujících proteinů dosáhla spodní hranice gelu.

##### 4.2.2.4.1 Příprava gelů

Gely byly připraveny s použitím skel o rozměrech 10 x 8 cm s 0,75 mm mezerou. Ta byla k sobě připevněna pomocí držáku a umístěna do stojanu na těsnící gumičku zabráňující vytékání gelu spodním otvorem mezi skly. Dělicí gel (8 %; příprava viz *tabulka č. 3*) byl nanesen pomocí Pasteuerovy pipety mezi skla, 1cm pod okraj. Pomocí stříčky byl gel

převrstven isopropylalkoholem a ponechán polymerovat 45 min. Poté byl izopropylalkohol odsát pomocí filtračního papíru. Následně byl do zbývajících prostoru mezi skly nad dělicí gel nanesen zaostřovací gel (5 %; viz *tabulka č. 4*) do kterého byl ihned zasunut hřebínek pro vytvoření 15 jamek na nanášení vzorků. Po uplynutí 45 min, kdy gel polymeroval, byl opatrně vyjmut hřebínek a vzniklé jamky pečlivě vypláchnuty redestilovanou vodou (re.H<sub>2</sub>O). Poté byla skla umístěna do elektroforetické soustavy (Bio-Rad) a zalita elektrodoým pufrem (0,1 M Tris, 0,5 % (w/v) SDS, 0,96 M glycin, pH 8,3).

<b>Chemikálie</b>	<b>8%</b>
re.H <sub>2</sub> O	4,7 ml
Acrylamid-bisacrylamid (37,5:1) 30 %	2,7 ml
bis-TRIS pH 8,8	2,5 µl
SDS (cryst. Research grade)	100 µl
APS for electrophoresis (98 %)	50 µl
TEMED	5 µl

*Tabulka č. 3:* Příprava 8 % dělicího gelu na elektroforézu (množství chemikálií odpovídá přípravě dvou gelů).

<b>Chemikálie</b>	<b>5%</b>
re.H <sub>2</sub> O	2,85 ml
Acrylamid-bisacrylamid (37,5:1) 30 %	0,85 ml
bis-TRIS pH 6,8	1,25 µl
SDS (cryst. Research grade)	50 µl
APS for electrophoresis (98 %)	25 µl
TEMED	5 µl

*Tabulka č. 4:* Příprava 5 % zaostřovacího gelu na elektroforézu (množství chemikálií odpovídá přípravě dvou gelů).



#### 4.2.2.4.2 Vzorky – nanáška

Vzorky byly během tuhnutí gelů vyndány z mrazáku (-80 °C) a ponechány na ledu. Po jejich úplném rozmrazení byly 15 s centrifugovány a následně 3 min inkubovány v bločku při 100 °C, vráceny na led a opět stočeny na centrifuze po dobu 15 s.

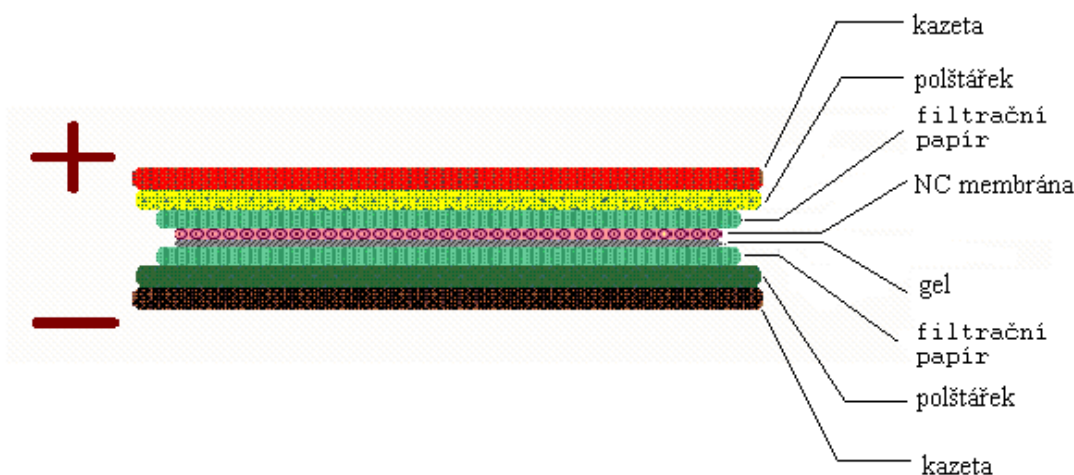
Před nanesením do jamky byl každý vzorek důkladně promíchán pomocí vortexu. Velikost nanášek byla 6 µg. Po aplikaci vzorků byl elektroforetický aparát umístěn do vany k tomu určené a po rysku dolit elektrodový pufir.

Po ukončení elektroforézy byly skla s gely vyjmuty z elektroforetické vany, odděleny ze skel pomocí špachtle, propláchnuty v re. vodě a následně ekvilibrovány 15 min v Towbin pufiru.

#### 4.2.2.5 Western Blotting

Rozdělené proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu (NC; Protran nitrocelulózová membrána, póry 0,45 µm) působením elektrického proudu metodou Western blot (WB).

Blotovací polštářky, filtrační papíry (Bio-Rad) a NC membrány byly inkubovány v Towbin pufiru (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3) 10 min. Následně byl do kazety na WB sestaven sendvič (*obrázek č. 5*) složený z komponent v následujícím pořadí: polštářek, filtrační papír, gel, NC membrána, filtrační papír a polštářek. Opatrným válením zkumavky mezi jednotlivými vrstvami byly vytlačeny případné vzduchové bublinky zabraňující kvalitnímu elektropřenosu. Takto připravené sendviče byly vloženy do blotovacího aparátu, který byl zasunut do vany. Následně bylo přidáno chladící těleso a vše po rysku zalito Towbin pufrem. Takto připravená aparatura byla přemístěna do lednice, kde probíhal elektropřenos při 100 mV po dobu 80 min.



Obrázek č. 5: Sendvič pro elektropřenos proteinů na NC membránu.

Po ukončení transferu byla NC membrána namočená na několik sekund do barvicího roztoku Ponceau 2S (0,1 % (w/v) červeň Ponceau 2S v 1 % (v/v) kyselině octové) pro ověření správného přenosu proteinů. Poté byla opláchnuta v re. vodě a do odbarvení proplachována v roztoku TBS (0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, pH 7,5).

#### 4.2.2.6 Imunodetekce

K detekci proteinů na NC membráně byla použita primární protilátka (ab129105, Abcam) a HPR konjugovaná sekundární protilátka (NA934V GE, Healthcare) proti králičí primární protilátce a chemoluminescenční směs Super West Dura (Thermo Scientific). Závěrečné vyvolání bylo učiněno pomocí přístroje LAS-4000 (Fujifilm).

Promývání membrán a inkubace byla prováděna v plastových miskách za neustálého míchání na laboratorní kývačce.

Po odbarvení membrány v roztoku TBS byla přemístěna do roztoku TTBS (0,1 M Tris, 2,5 M NaCl, pH 7,5 – 0,5 % (v/v) Tween 20), kde byla 15 min inkubována. Poté byla na membráně blokována nespecifická vazebná místa 2 % roztokem nízkotučného sušeného mléka (ProMil) v TTBS po dobu 1 hodiny. Před přidáním primární protilátky byla membrána promyta 3 x 5 min v TTBS pro odstranění přebytečného blokačního média. Poté byla membrána inkubována v primární protilátce přes noc při 4 °C. Primární protilátka byla ředěna 1 % nízkotučným sušeným mlékem v poměru 1:25000. Po slití protilátky, která byla znovu použita, byla membrána znovu promývána 3 x 15 min v TTBS. Posléze

byla inkubována jednu hodinu v sekundární protilátce ředěné 1 % roztokem nízkotučného sušeného mléka v TTBS v poměru 1:50000. Poté byla membrána promyta 3 x 10 min v TBS.

Po osušení membrány filtračním papírem byla umístěna na skleněnou desku s parafinem (p-Lab), který omezil stékání chemoluminescenční směsi z membrány na nerovné desce pracovního stolu. Na takto připravenou membránu byla nanášena chemoluminescenční směs (800  $\mu$ l) a pomocí pipetovací špičky rovnoměrně rozprostřena. Po uplynutí inkubační doby 3 min byla membrána osušena filtračním papírem, přemístěna do průhledné fólie a vložena do tmy. Následovala chemoluminescenční detekce na přístroji uvedeném výše.

### **4.3 Kvantifikace**

Intenzita bandů byla kvantifikována pomocí programu ImageJ verze č. 1.43

### **4.4 Statistické zpracování naměřených dat**

Výsledky jsou uváděny jako průměry  $\pm$  střední chyba průměru (SEM). Pro zjištění statistické významnosti mezi třemi a více skupinami byla použita jednocestná ANOVA s následným Newman - Keulsovým testem. Za statisticky významný byl považován rozdíl s hladinou významnosti  $P < 0,05$ . Data byla graficky zpracována v počítačovém programu GraphPad Prism verze č. 6.

## 5 Výsledky

V rámci diplomové práce bylo celkem provedeno 50 experimentů zaměřených na dva cíle. První série pokusů, analyzující efekt chronické hypoxie na velikost infarktu a výskyt ischemických a reperfučních arytmií, zahrnovala 36 pokusů na 4 definovaných experimentálních skupinách. Velikost skupin, počet vyhodnocených záznamů arytmií a počet analyzovaných velikostí infarktů pro jednotlivé skupiny uvádí *tabulka č. 5*.

Skupina	Počet experimentů	Analýza arytmií	Analýza velikosti infarktů
<i>Normoxie</i>			
<b>SHR</b>	6	6	5
<b>Tg</b>	6	6	5
<i>Hypoxie</i>			
<b>SHR</b>	12	12	10
<b>Tg</b>	12	11	11

*Tabulka č. 5:* Počet provedených pokusů, vyhodnocených záznamů ischemických arytmií a provedených analýz velikosti infarktu u normoxických a chronicky hypoxických potkanů. *SHR* - *spontánně hypertenzní potkani*, *Tg* - *konplastiční potkani*.

Do hodnocení velikosti infarktu nebylo zařazeno 5 experimentů. U jednoho myokardu (ze skupiny SHR) byly špatně nabarveny měřené oblasti. U čtyř potkanů došlo pravděpodobně vlivem výrazného ischemického poškození k srdečnímu selhání během reperfuze. Zastoupení těchto potkanů bylo: 1 z Tg, 1 z Tg adaptovaných na hypoxii a 2 ze skupiny SHR adaptovaných na hypoxii. Jeden záznam EKG (ze skupiny Tg adaptovaných na hypoxii) nebyl zařazen do konečné statistiky z důvodu velmi odlišných hodnot od ostatních ve skupině.

### 5.1 Základní sledované parametry

*Tabulka č. 6* ukazuje tělesnou hmotnost (BW) a tepové frekvence (HR) v definovaných časových intervalech během experimentů pro jednotlivé skupiny.

Průměrná tělesná hmotnost stejně starých potkanů kmene SHR byla  $284 \pm 18$  g, u Tg potkanů  $323 \pm 11$  g. U skupin adaptovaných na chronickou hypoxii byla průměrná váha SHR potkanů  $266 \pm 7$  g a  $281 \pm 9$  g u skupiny Tg, což je významný pokles o 13 % oproti normoxickým zvířatům kmene Tg. Adaptace SHR na chronickou hypoxii neměla významný vliv na tělesnou hmotnost. *Graf č. 2* znázorňuje BW jednotlivých experimentálních skupin. Naměřené hodnoty HR se mezi jednotlivými skupinami na počátku experimentu a ani v jeho průběhu signifikantně nelišily. V rámci skupiny SHR došlo po prvním změření (HR1) tepové frekvence k signifikantnímu poklesu u obou následujících měření (HR2, 3).

Skupina	Tělesná hmotnost (g)	Tepová frekvence ( $\text{min}^{-1}$ )		
	BW	HR1	HR2	HR3
<i>Normoxie</i>				
<b>SHR</b>	$284 \pm 18$	$396 \pm 6$	$363 \pm 14$ &	$348 \pm 9$ &
<b>Tg</b>	$323 \pm 11$	$382 \pm 12$	$369 \pm 9$	$388 \pm 13$
<i>Hypoxie</i>				
<b>SHR</b>	$266 \pm 7$	$383 \pm 5$	$374 \pm 6$	$356 \pm 11$
<b>Tg</b>	$281 \pm 9^*$	$389 \pm 7$	$387 \pm 7$	$385 \pm 8$

**Tabulka č. 6:** Tělesná hmotnost (BW) a tepová frekvence (HR) ve vybraných časových intervalech: HR1 - před ischemií, HR2 – na konci ischemie, HR3 - na konci 3 hod reperfuze. *SHR - spontánně hypertenzní potkani, Tg - konplastiční potkani.*

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina

&  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. HR1

V *tabulce č. 7* jsou uvedeny hodnoty středních arteriálních tlaků (MAP) změřené ve vybraných časových intervalech. U kmene Tg adaptovaného na hypoxii došlo k signifikantnímu poklesu tlaku oproti normoxickým zvířatům pouze na konci ischemie. U druhého kmene nebyl významný rozdíl v žádném ze tří měření MAP. Na konci ischemie došlo také k významnému poklesu tlaku u normoxických Tg oproti SHR. Jiné změny mezi kmeny v rámci hypoxie a normoxie nebyly statisticky signifikantní.

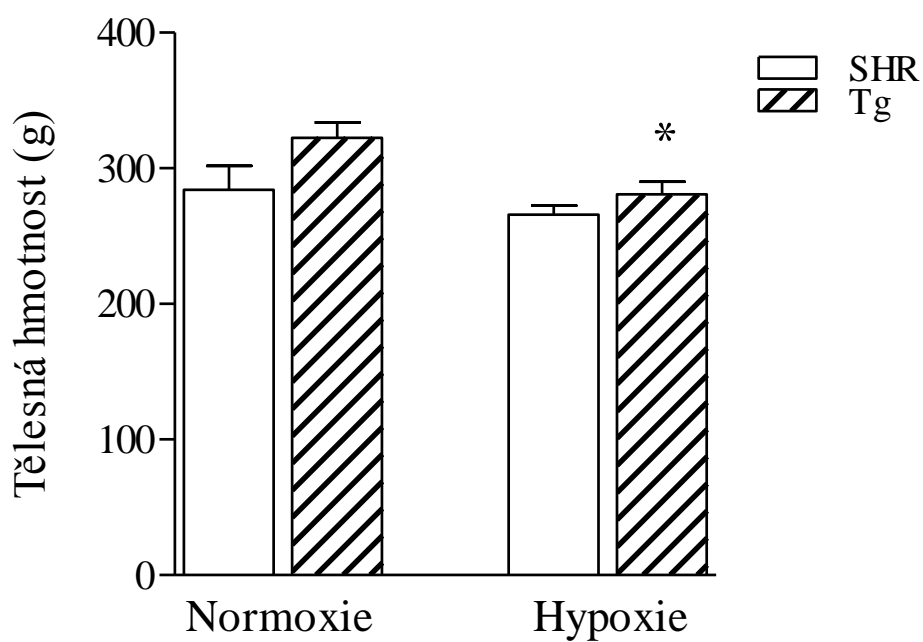
Skupina	Arteriální tlak (mmHg)		
	P1	P2	P3
<i>Normoxie</i>			
<b>SHR</b>	149 ± 14	152 ± 15	118 ± 19
<b>Tg</b>	117 ± 10	113 ± 9 <sup>#</sup>	116 ± 9
<i>Hypoxie</i>			
<b>SHR</b>	152 ± 2	151 ± 2	132 ± 10
<b>Tg</b>	145 ± 10	149 ± 8 <sup>*</sup>	128 ± 8

**Tabulka č. 7:** Střední arteriální tlak (MAP) ve vybraných časových intervalech: P1 - před ischemií, P2 - na konci ischemie, P3 - na konci reperfuze. *SHR* - *spontánně hypertenzní potkani*, *Tg* - *konplastiční potkani*.

\* P < 0,05: statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina

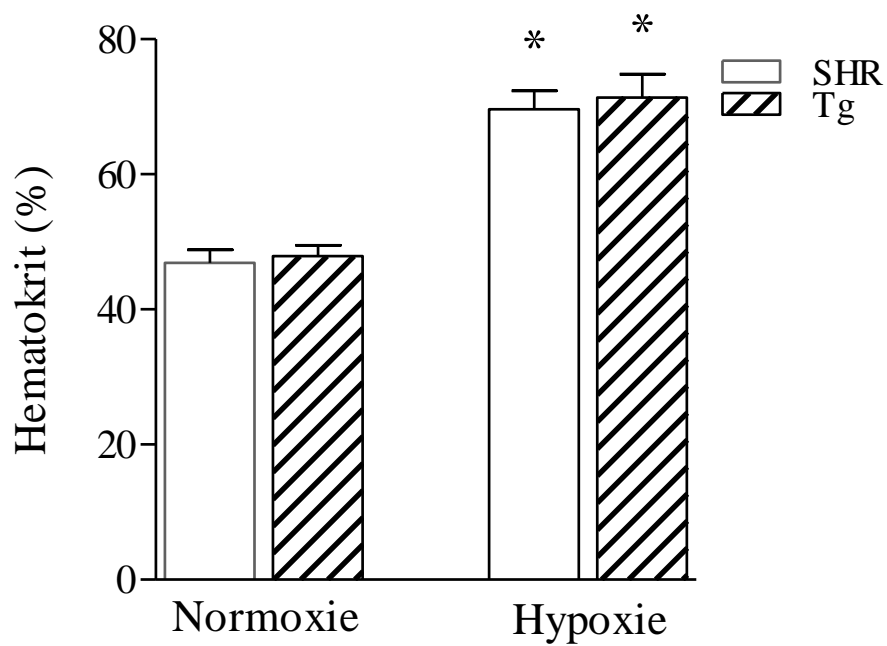
# P < 0,05: statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající SHR skupina

*Graf č. 3* ukazuje hodnoty hematokritu (normoxie – SHR 46,9 ± 0,8 %; Tg 47,9 ± 0,7 %; hypoxie – SHR 69,7 ± 0,8 %; Tg 71,4 ± 1,0 %). U obou kmenů adaptovaných na hypoxii došlo ke statisticky významnému nárůstu hematokritu. U kmene SHR i Tg to bylo o 49 %. K významným změnám mezi kmeny nedošlo.



**Graf č. 2:** Průměrná tělesná hmotnost potkanů v jednotlivých experimentálních skupinách. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina



**Graf č. 3:** Hematokrit stanovený ze vzorku krve odebrané z ocasu. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl vs. odpovídající normoxická skupina

## 5.2 Velikost infarktu

*Graf č. 4* ukazuje relativní velikost ohrožené oblasti vztažené na velikost levé komory (AR/LV) u jednotlivých skupin. Hodnoty AR/LV se mezi experimentálními skupinami nelišily (normoxie – SHR  $41,2 \pm 3,0$  %; Tg  $44,1 \pm 6,2$  %; hypoxie – SHR  $42,0 \pm 3,1$  % Tg  $48,4 \pm 3,3$  %). Mohli jsme proto hodnotit průměrnou relativní velikost infarktu v jednotlivých skupinách, protože nemohlo dojít ke zkreslení výsledků rozdílnou velikostí ohrožené oblasti.

Na *grafu č. 5* jsou zobrazeny relativní velikosti infarktů vztažené na velikost ohrožené oblasti (IS/AR) u jednotlivých skupin (normoxie – SHR  $71,2 \pm 4,4$  %; Tg  $63,9 \pm 6,5$  %; hypoxie – SHR  $48,9 \pm 5,9$  %; Tg  $39,7 \pm 5,6$  %). U obou kmenů adaptovaných na hypoxii došlo k významnému poklesu IS, u kmene SHR o 31 % a u kmene Tg o 38 %. Mezi kmeny, v rámci normoxie a hypoxie, k žádným významným změnám nedošlo především v důsledku vyšší variability. Nicméně jak u normoxických tak hypoxických Tg potkanů byl jasný trend k menší velikosti infarktu v porovnání s SHR potkany.

## 5.3 Ischemické a reperfuční arytmie

*Graf č. 6* znázorňuje celkový počet předčasných komorových stahů během ischemie u jednotlivých skupin (normoxie – SHR  $1386,0 \pm 164,6$ ; Tg  $1505,0 \pm 182,3$ ; hypoxie – SHR  $765,3 \pm 189,0$ ; Tg  $1502,0 \pm 332,3$ ). Významné statistické snížení o 45 % vykazoval kmen SHR adaptovaný na hypoxii oproti normoxickým potkanům.

*Graf č. 7* ukazuje typové zastoupení ischemických arytmií u jednotlivých skupin – počet singlů, salv a komorových tachykardií. (A) Singly (normoxie – SHR  $352,8 \pm 78,2$ ; Tg  $258,5 \pm 45,5$ ; hypoxie – SHR  $119,9 \pm 21,2$ ; Tg  $153,1 \pm 49,6$ ). K signifikantnímu poklesu počtu jednoduchých stahů došlo pouze u kmene SHR adaptovaného na hypoxii, a to o 66 %. (B) Salvy (normoxie – SHR  $142,0 \pm 29,0$ ; Tg  $133,2 \pm 24,2$ ; hypoxie – SHR  $55,1 \pm 17,1$ ; Tg  $73,83 \pm 20,0$ ). Opět došlo k významnému poklesu, o 61 %, pouze u potkanů SHR adaptovaných na hypoxii. (C) komorové tachykardie (normoxie – SHR  $974,7 \pm 262,5$ ; Tg  $1364 \pm 330,4$ ; hypoxie – SHR  $590,3 \pm 183,3$ ; Tg  $1275 \pm 322,2$ ). U tohoto typu arytmií jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl.

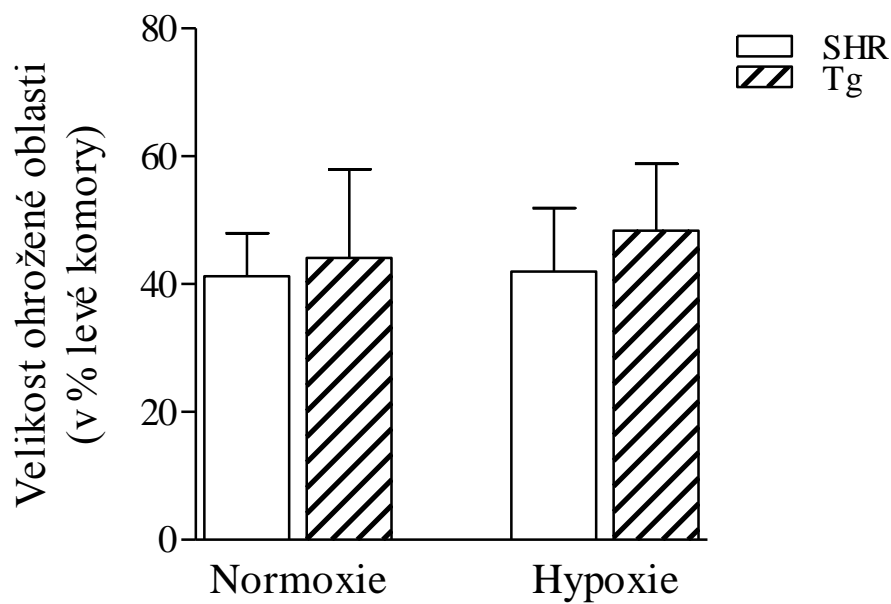


*Graf č. 8* ukazuje parametr závažnosti ischemických arytmií, bodovou hodnotu tzv. skóre arytmií (normoxie – SHR  $3,3 \pm 0,2$ ; Tg  $3,5 \pm 0,2$ ; hypoxie – SHR  $2,9 \pm 0,3$ ; Tg  $3,4 \pm 0,2$ ). Adaptace na chronickou hypoxii vyvolala pokles u obou kmenů, ale jen o nevýznamný rozdíl 12 % u SHR a o 2 % u Tg.

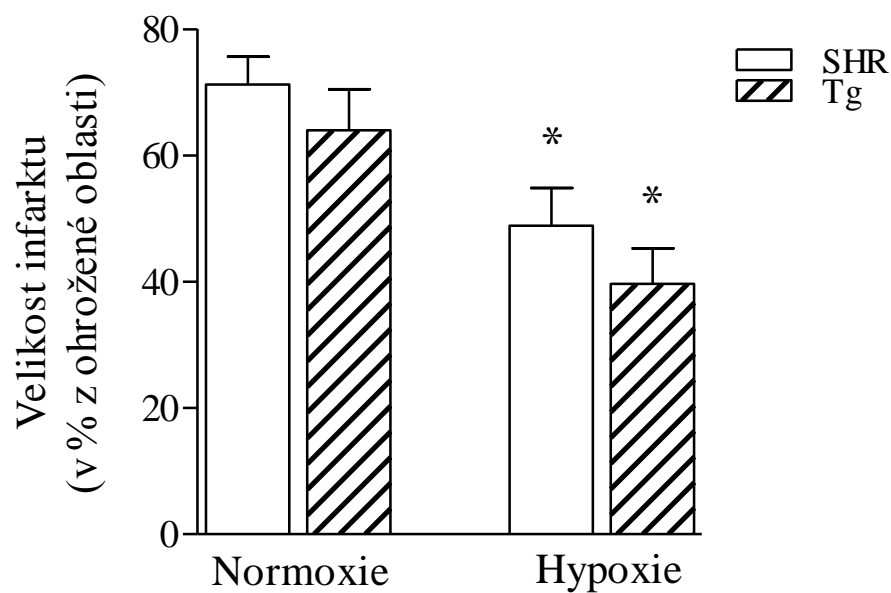
Na *grafu č. 9* je znázorněna časová distribuce ischemických arytmií v průběhu 20 min ischemie. Arytmogeneze u všech skupin začala okolo 5. minuty a arytmie téměř odezněly ke konci 20 min ischemie. U hypoxické skupiny SHR potkanů je patrné dřívější odeznění ischemické arytmiogeneze v porovnání s hypoxickým kmenem Tg.

Na *grafu č. 10* je znázorněn celkový počet předčasných komorových arytmií během reperfuze u jednotlivých skupin (normoxie – SHR  $155,8 \pm 39,3$ , Tg  $262,2 \pm 58,5$ ; hypoxie – SHR  $17,8 \pm 5,2$ , Tg  $50,3 \pm 23,0$ ). U obou kmenů adaptovaných na hypoxii došlo k signifikantnímu poklesu reperfuzních arytmií. U kmene SHR došlo k poklesu o 89 % a u skupiny Tg o 81 %.

*Graf č. 11* znázorňuje závažnost reperfuzních arytmií, bodové hodnoty (normoxie – SHR  $2,5 \pm 0,5$ ; Tg  $3,2 \pm 0,2$ ; hypoxie – SHR  $2,2 \pm 0,3$ ; Tg  $1,7 \pm 0,5$ ). Stejně jako u ischemických arytmií, vyvolala chronická hypoxie pokles bodových hodnot u obou kmenů. K signifikantně významnému poklesu, o 47 %, došlo u skupiny Tg.

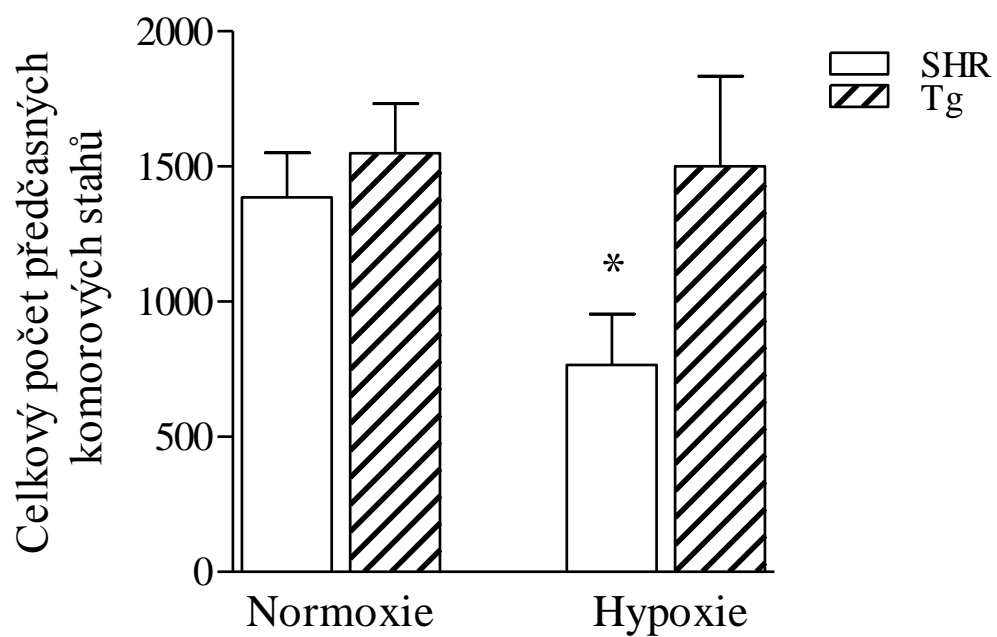


**Graf č. 4:** Relativní velikost ohrožené oblasti vztažené na velikost levé komory (AR/LV). *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani.



**Graf č. 5:** Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti (IS/AR). *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani.

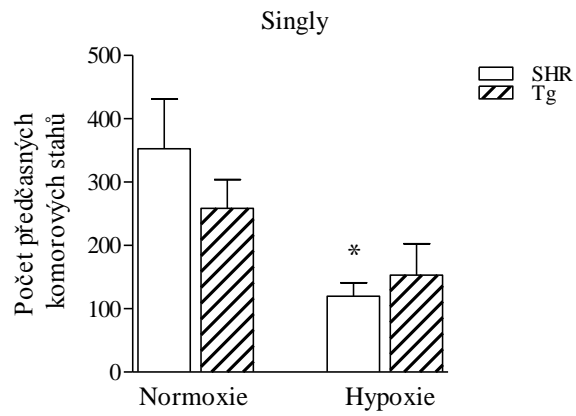
\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: : vs. odpovídající normoxická skupina



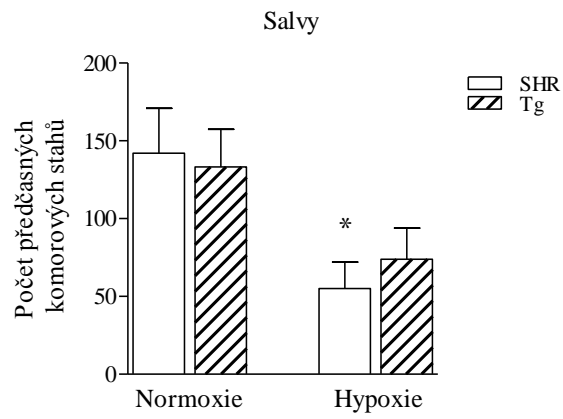
**Graf č. 6:** Celkový počet předčasných komorových stahů během ischemie. *SHR* - *spontánně hypertenzní potkani*, *Tg* - *konplastiční potkani*.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina

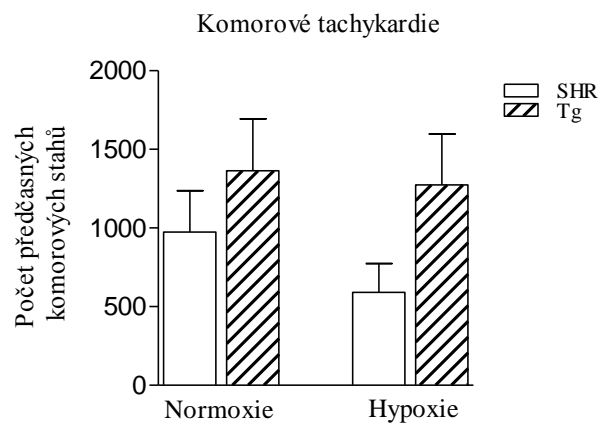
A



B

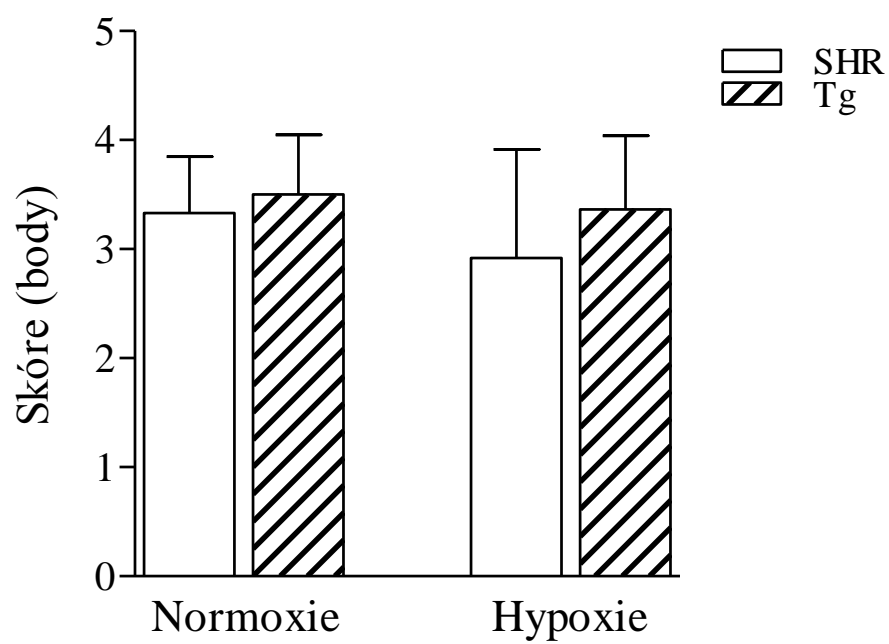


C



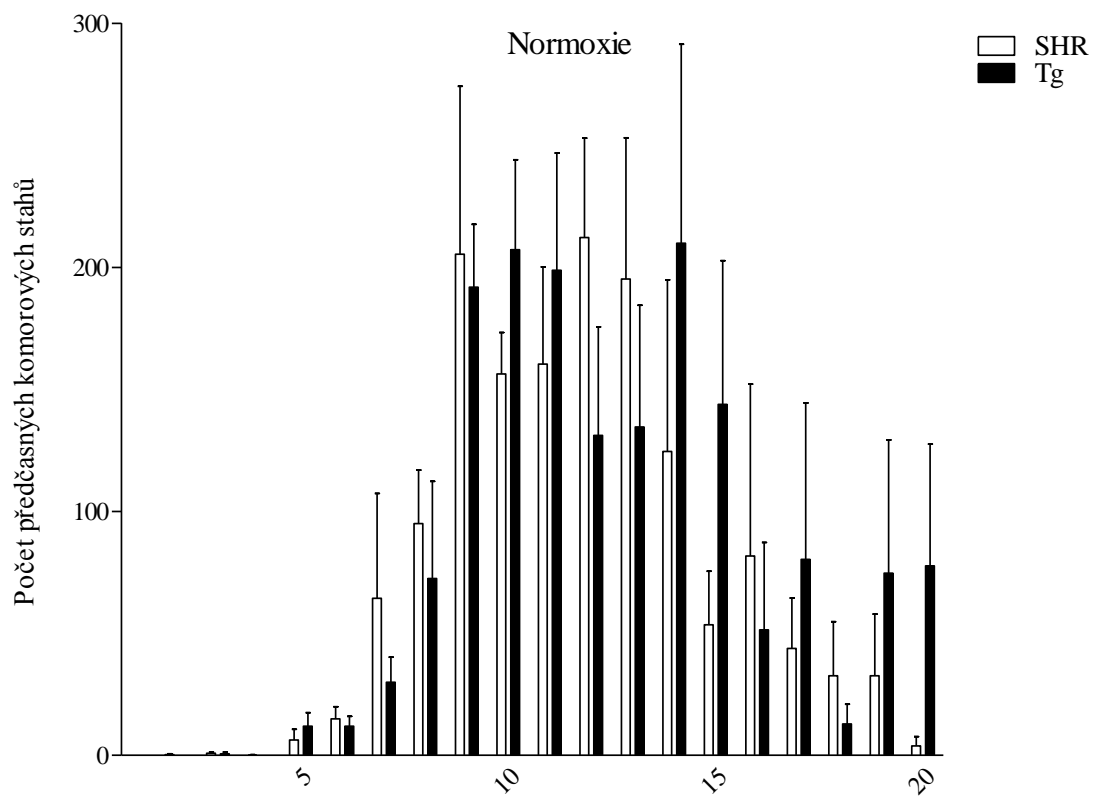
**Graf č. 7:** Typové zastoupení ischemických arytmií: A - jednoduché stahy, B - salvy, C - komorové tachykardie. SHR - *spontánně hypertenzní potkani*, Tg - *konplastiční potkani*.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina

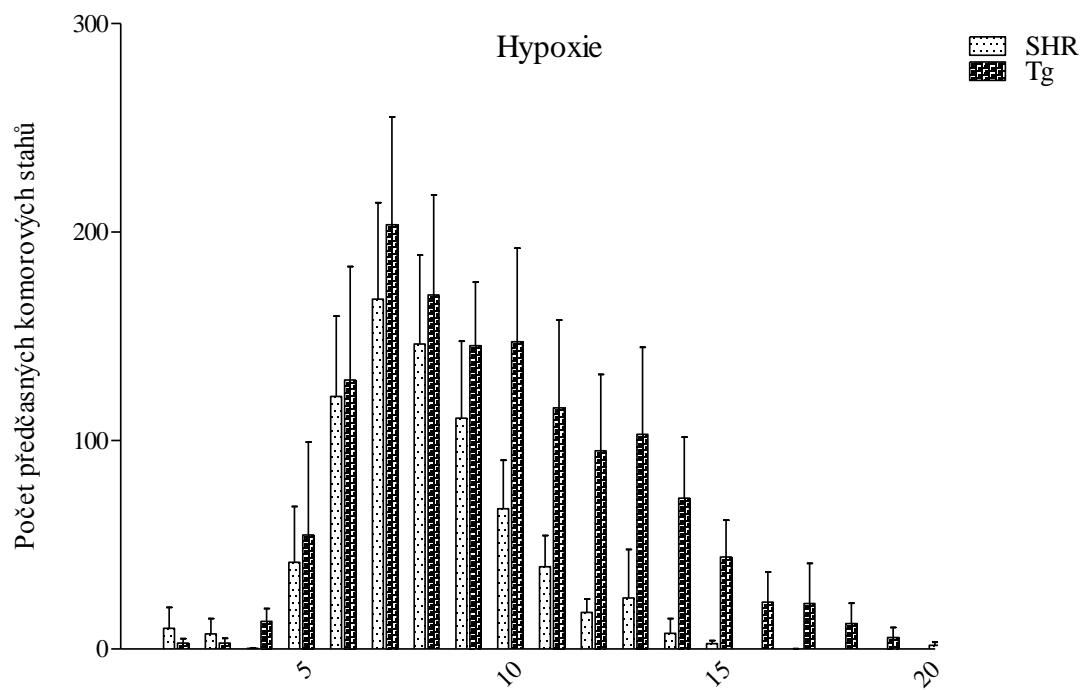


**Graf č. 8:** Bodové hodnocení ischemických arytmií (skóre). *SHR* - *spontánně hypertenzní potkani*, *Tg* -*konplastiční potkani*.

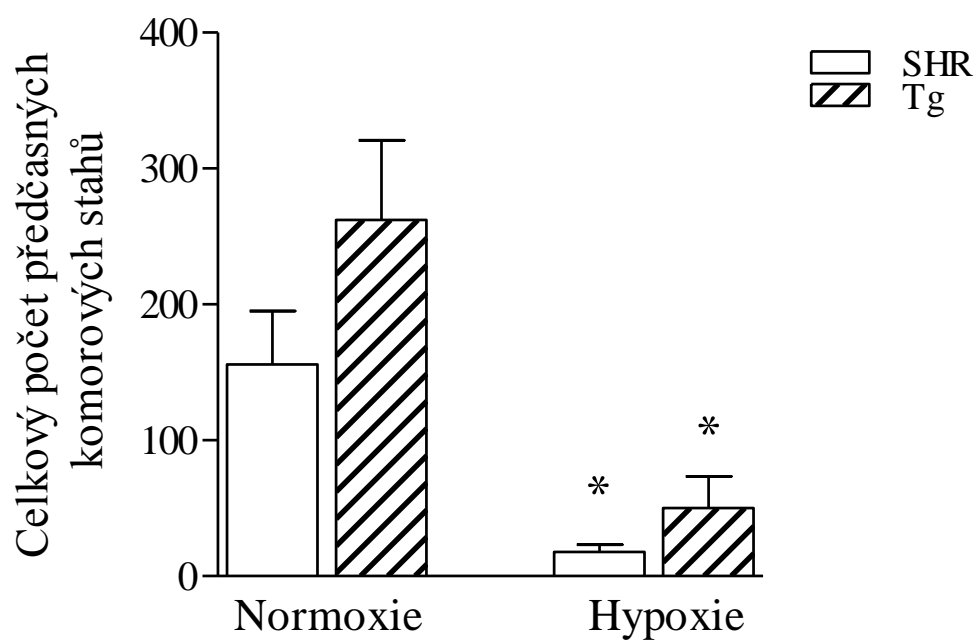
A



B

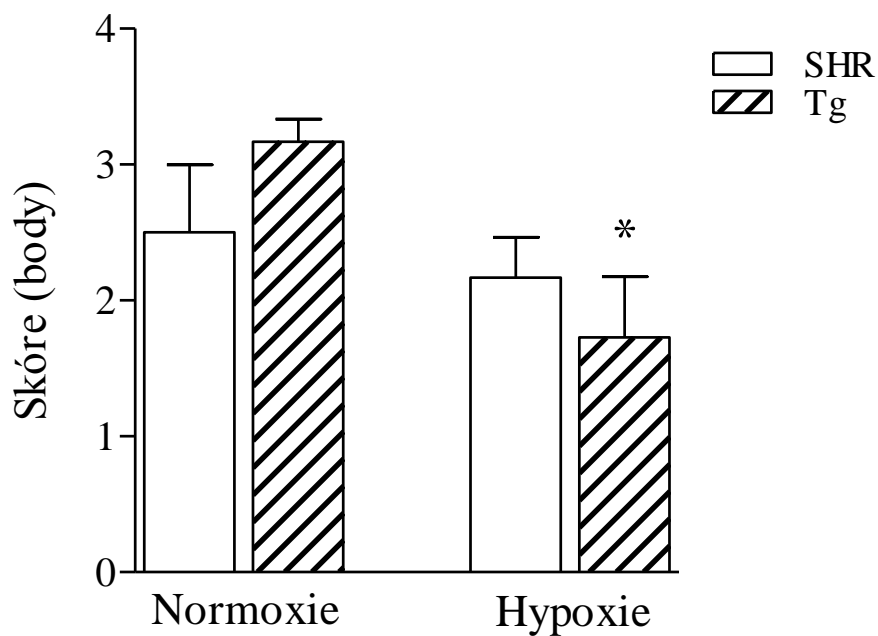


**Graf č. 9:** Časové rozložení ischemických arytmií v průběhu 20 min ischemie: A - u normoxických skupin, B - u hypoxických skupin. SHR - spontánně hypertenzní potkani, Tg - konplastičí potkani.



**Graf č. 10:** Celkový počet předčasných komorových stahů během reperfuze. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina



**Graf č. 11:** Bodové hodnocení reperfučních arytmií (skóre). *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastiční potkani

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina

Druhá série pokusů byla určena k analýze exprese enzymu Aco 2 v homogenátu srdcí 4 experimentálních skupin. Velikost skupin a počet měření shrnuje *tabulka č. 8*.

Skupina	Počet experimentů	Analýza množství Aco 2
<i>Normoxie</i>		
<b>SHR</b>	6	6
<b>Tg</b>	6	6
<i>Hypoxie</i>		
<b>SHR</b>	6	6
<b>Tg</b>	6	6

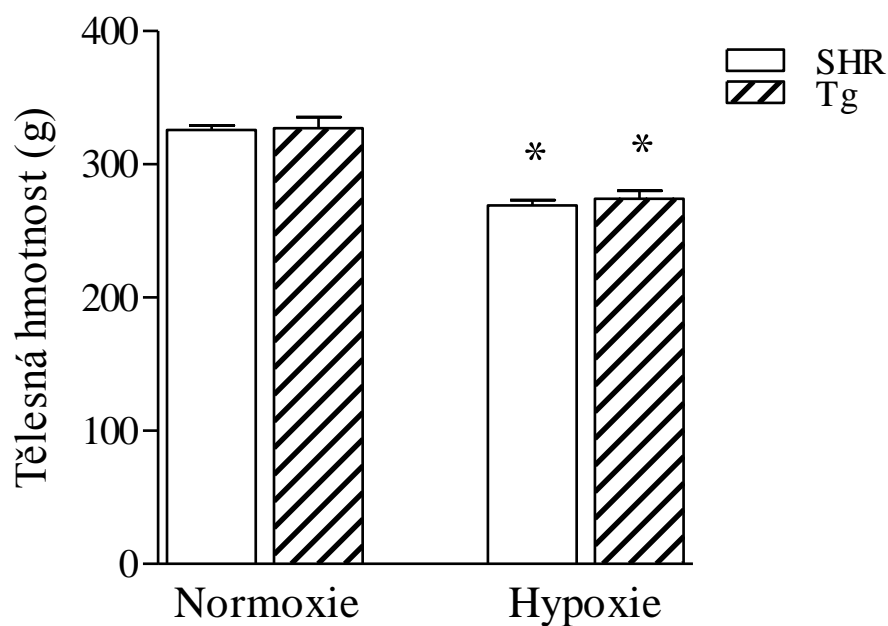
**Tabulka č. 8:** Počet provedených pokusů a provedených analýz množství Aco 2 u homogenizovaných srdcí normoxických a chronicky hypoxických potkanů. *SHR* - *spontánně hypertenzní potkani*, *Tg* - *konplastiční potkani*.

*Graf č. 12* ukazuje BW jednotlivých experimentálních skupin (normoxie – SHR 325,8 ± 3,4 g; Tg 327,2 ± 8,2 g; hypoxie – SHR 260,0 ± 4,2 g; Tg 274,2 ± 5,9 g). K signifikantnímu poklesu průměrné tělesné hmotnosti došlo u obou skupin adaptovaných na chronickou hypoxii. U skupiny SHR o 20 % a u Tg o 16 %.

Na *grafu č. 13* je znázorněna hmotnost pravé komory (RV) vztažená na tělesnou hmotnost zvířete (normoxie – SHR 0,6 ± 0,02 mg/g; Tg 0,6 ± 0,02 mg/g; hypoxie – SHR 1,4 ± 0,05 mg/g; Tg 1,4 ± 0,03 mg/g). U obou skupin adaptovaných na chronickou hypoxii je patrný signifikantní nárůst hmotnosti RV, a to o 133 % u obou.

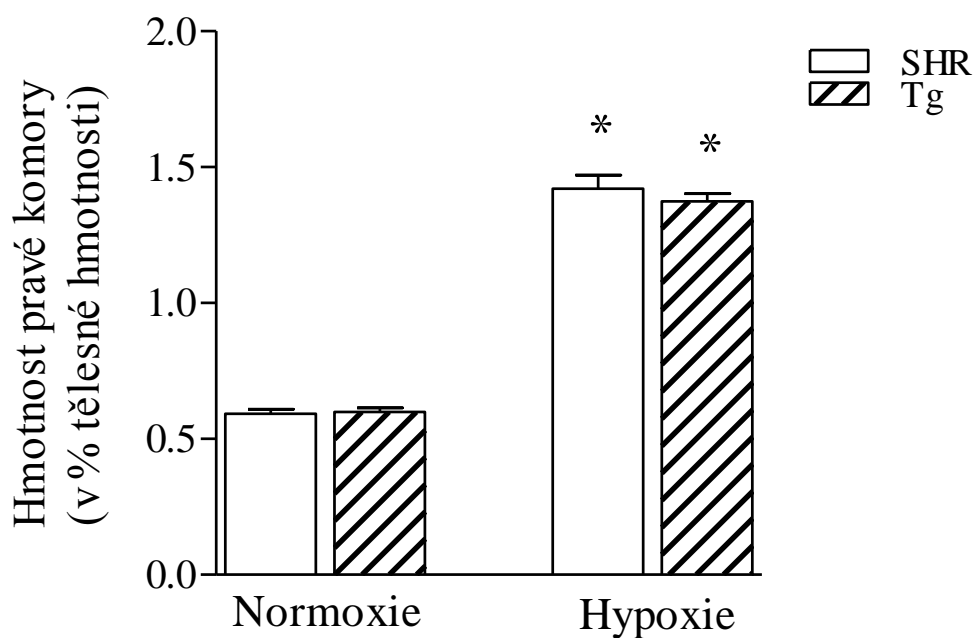
V případě měření exprese Aco 2 pomocí western blottingu jsme nezaznamenali, ať už v rámci adaptace na chronickou hypoxii nebo mezi skupinami, žádný rozdíl jak ukazuje *graf č. 14*.





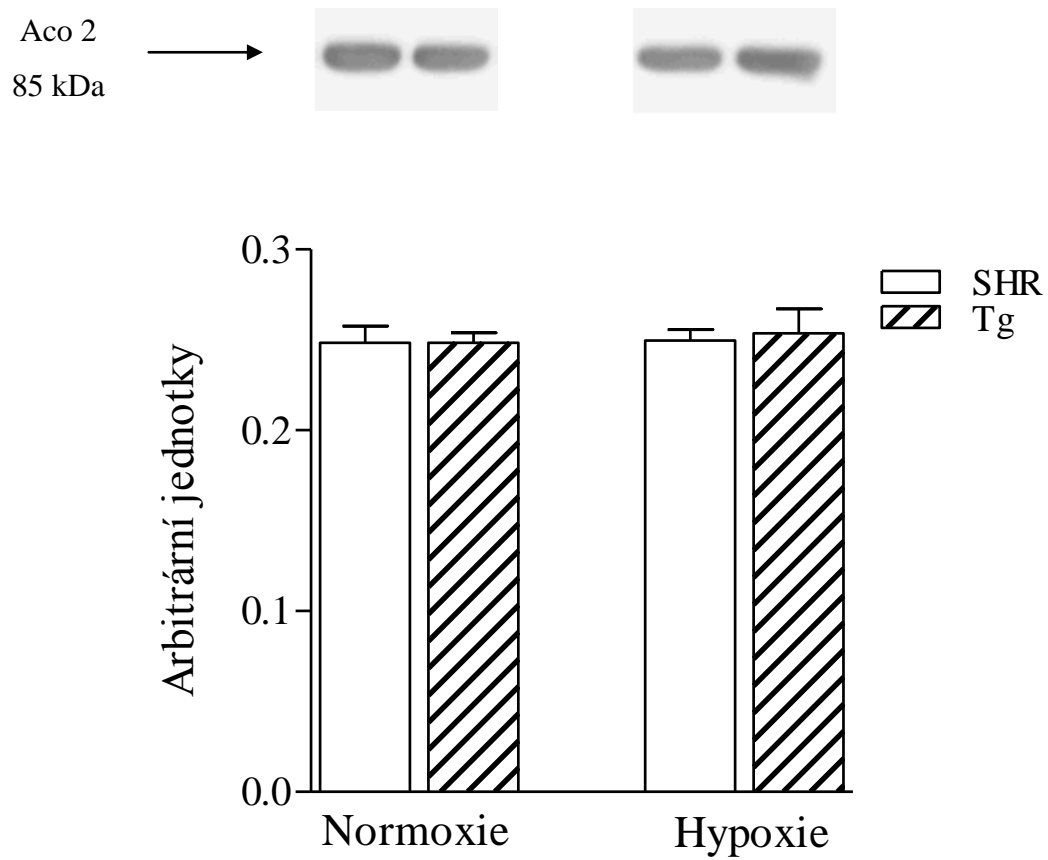
**Graf č. 12:** Tělesná hmotnost jednotlivých experimentálních skupin. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastičtí potkani.

\*  $P < 0,05$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina



**Graf č. 13:** Hmotnost pravé komory vztážené na tělesnou hmotnost. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastičtí potkani.

\*  $P < 0,0001$ : statisticky významný rozdíl: vs. odpovídající normoxická skupina



**Graf č. 14:** Množství Aco 2 stanovené western blottem. *SHR* - spontánně hypertenzní potkani, *Tg* - konplastičtí potkani.

## 6 Diskuze

Řešení otázek týkajících se úlohy mitochondriálního genomu u řady různých onemocnění budí v poslední době značnou pozornost (Pravenec a kol., 2007; Calvo et al., 2006; Lowell and Shulman, 2005; Wallace, 2005). Nejinak tomu je i v případě vlivu chronické hypoxie na kardiovaskulární systém. Obecně platí, že chronická hypoxie pozitivně i negativně ovlivňuje kardiovaskulární systém. Mezi prospěšné důsledky adaptace řadíme zvýšenou ochranu srdce proti ischemii, mezi nežádoucí patří např. hypertrofie RV v důsledku hypoxické plicní hypertenze (Neckář, 1998; Ošťádal a Widimský, 1985; Widimský a kol., 1973). Dosud však neexistují žádné studie, které by se přímo zabývaly vlivem chronické hypoxie ve spojení s kardioprotektivními účinky a hemodynamickými změnami u hypertenzních potkanů. Zabývali jsme proto významem mitochondriálního genomu v I/R poškození srdce u SHR potkanů a transgenních SHR jedinců s mitochondriálním genomem normotenzního kmene BN, kteří byli adaptováni na chronickou hypoxii.

### 6.1 Vliv chronické hypoxie na sledované parametry

Naše výsledky ukázaly, že kontinuální normobarická hypoxie vede ke zpomalení tělesného růstu a zároveň k významnému zvýšení hematokritu u obou skupin. Mezi kmeny jsme ale žádné významné změny nepozorovali. Tato zjištění se shodují s výsledky experimentů prováděných na normotenzních potkanech kmene Wistar, kde je efekt chronické hypoxie závislý na formě (intermitentní vs. kontinuální), celkové době expozice a také na typu použité komory (normobarická vs. hypobarická) (Zemanová, 2007; Neckář a kol., 2004). Teprve další studie ukáží, zda bude mít adaptace SHR potkanů na intermitentní hypobarickou hypoxii v porovnání s kontinuální normobarickou hypoxií výraznější vliv na zpomalení tělesného růstu a produkci červených krvinek, tak jak tomu bylo u potkanů Wistar (Zemanová, 2007).

Dalším analyzovaným parametrem byla HR v určitých časových intervalech, a to před ischemií, během ischemie a v průběhu reperfuze. V našich pokusech jsme zaznamenali signifikantní pokles srdečního rytmu v průběhu měření u normotenzních SHR potkanů. Je známo, že chronická hypoxie může vyvolat, mimo jiné, hyperpolarizaci plazmatické membrány, tedy zkrácení akčního potenciálu, v jehož důsledku se zvyšuje HR

(Kuwahira et al., 1993). Zajímavé také je, že u pacientů sledovaných pro větší predispozici k ischemii myokardu, docházelo před vznikem akutního infarktu ke zvýšení HR v klidu (bez fyzické zátěže). Ukazuje se, že doba trvání vyšší HR může být jedním z parametrů předpovídajících akutní srdeční příhodu (McLenechan et al., 1991).

MAP byl měřen stejně jako HR ve třech časových intervalech a nevyozorovali jsme žádný jednoznačný trend v rámci jednotlivých normoxických či hypoxických skupin. U hypoxické Tg skupiny jsme zjistili nárůst MAP ve všech třech měřeních, jako signifikantní se ukázal pouze druhý časový interval, oproti normoxickým kontrolám. K menšímu nárůstu došlo i u hypoxické skupiny SHR oproti normoxické kontrole. To je v souladu s výsledky populačních studií, které ukazují, že adaptací organismu na chronickou hypoxii dochází ke zvýšení MAP (Calbet, 2003). Faktory, které mohou být spojeny se zvýšením arteriálního tlaku chronickou hypoxií, jsou zvýšená viskozita krve, snížená základní produkce NO (Fletcher, 2001) nebo zvýšené odstraňování NO kvůli vyšší koncentraci hemoglobinu v krvi (Pawloski et al., 2001). Na rozdíl od lidí, kteří mají významné geny regulující krevní tlak situované v blízkosti genu pro angiotensinogen (Agt) na chromozomu 1 (Caulfield et al., 1996; Jeunemaitre et al., 1992), SHR potkani mají takové místo na chromozomu 19. Zdá se tedy, že u SHR potkanů nebude existovat vztah mezi Agt a krevním tlakem (Hübner et al., 1994). Proto byl vytvořen nový kmen SHR.BN-Agt kongenní kmen, který by měl sloužit jako model pro zkoumání jiných genů na chromozomu 19, které by mohly přispívat k rozvoji hypertenze (St Lezin et al., 1999).

Je známo, že chronická hypoxie způsobuje hypertrofii RV. Naše výsledky ukazují, že adaptace na chronickou hypoxii u obou kmenů vyvolala signifikantní zvětšení hmotnosti RV. Tyto výsledky jsou v souladu s řadou provedených studií (např. Blumberg et al., 2002; Elmedal et al., 2004).

## **6.2 Vliv chronické hypoxie na ischemické poškození srdce**

Adaptace potkanů na hypoxické podmínky vede k větší odolnosti srdce k I/R poškození. Důsledkem je zmenšení velikosti infarktu myokardu, nižší počet ischemických arytmií a výrazně lepší obnova kontraktility myokardu. Naše výsledky ukázaly, že CNH (10% O<sub>2</sub>, 3 týdny) snižuje velikost infarktu u obou skupin hypertenzních potkanů. Žádné rozdíly v normoxii a hypoxii v rámci kmenů jsme nezaznamenali.

Už v roce 1986 vznikla studie (Snoeckx et al., 1986), která ukázala na modelu globálního I/R poškození, že dospělí potkani SHR oproti normotenzním potkanům Wistar mají výrazně zhoršenou postischemickou obnovu kontraktilní funkce myokardu. Na jiném modelu srdeční hypertrofie, vyvolaného konstrikcí aorty, došlo po vystavení potkanů akutní ischemii myokardu ke zvýšené pooperační úmrtnosti v důsledku výskytu letálních arytmií (Linz et al., 1996). Ukazuje se, že v mnoha modelech srdeční hypertrofie je výskyt arytmií z velké části závislý na tvorbě ROS (Ravingerová a kol., 1999), respektive souvisí se změnami oxidačního stresu a redox stavu myokardu (Šimko a Pechaňová, 2010). Abnormální produkce NO v srdci také může přispívat k výraznějšímu I/R poškození srdce SHR potkanů (Berges et al., 2003). Zvýšená aktivita syntézy NO v srdci SHR (Ravingerová a kol., 2011), zvýšená produkce ROS spojená s abnormální intracelulární homeostázou vedoucí ke snížené expresi proteinů a genů sarkoplazmatického retikula  $Ca^{2+}$  ATPázy v srdci hypertenzním zvířat (Kang et al., 2007), může mít negativní vliv na zotavení po I/R poškození a zvýšenou arytmogenezi u SHR zvířat (Ravingerová a kol., 2011).

Existuje řada studií potvrzujících kladný účinek adaptace na chronickou hypoxii, ať už jde o kontinuální či intermitentní expozice, na IS u potkanů kmene Wistar (např. Neckář a kol., 2004; Asemu et al., 2000). U SHR potkanů takové studie dosud chybí, respektive dosud byly publikovány velmi omezeně. Charvátová a kol. (2012) se zabývali vlivem chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce 1 a 10 dní starých mládřata kmene SHR a Wistar. Ukázali, že jednodenní normoxická mládřata kmene SHR mají zvýšenou srdeční toleranci k ischemii oproti stejně starým mládřatům kmene Wistar. Desetidenní mládřata obou kmenů vykazovala pokles odolnosti myokardu, která se ani preconditioningem či adaptací na intermitentní výškovou hypoxii nezvýšila. Jiná studie ukazuje, že adaptace na chronickou intermitentní hypoxii simulující syndrom spánkové apnoe (rychlé střídání normoxie a hypoxie v řádu sekund) zvyšuje IS a rozvíjí hypertenzi u devítidenních SHR potkanů ve srovnání se stejně starými potkany kmene Wistar (Belaidi et al., 2009). Zdá se tedy, že i pro hypertenzní potkany platí, že odolnost myokardu k ischemii, u jedinců adaptovaných na chronickou hypoxii, je závislá na modelu adaptace (Neckář a kol., 2013).

Dalším sledovaným parametrem byl výskyt ischemických arytmií - jejich počet a závažnost. Jak ukázaly naše výsledky, mezi kmeny nebyl zjištěn významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů při normoxických podmínkách. Adaptace na chronickou hypoxii způsobila významné snížení výskytu a počtu ischemických arytmií

pouze u kmene SHR a u obou kmenů došlo k signifikantnímu poklesu reperfučních arytmií. U singlů a salv jsme pozorovali jejich snížený výskyt u obou kmenů, ale pouze u SHR potkanů byl zjištěn statisticky významný rozdíl oproti normoxii. Počet nejzávažnější ischemických arytmií - VT, se u obou skupin snížil, nicméně se jednalo pouze o trend.

Myokard SHR potkanů je charakterizován, nejen srdeční hypertofií (Lindpaintner et al., 1996) a sníženou tolerancí k ischemii (Yano et al., 2011), ale také zvýšenou pravděpodobností výskytu ischemických komorových arytmií (Leenen and Yuan, 2001). To potvrzuje i studie Kolář a Parratt (1997), kde po ischemické periodě trvající 30 min byl celkový počet komorových arytmií signifikantně vyšší u SHR ve srovnání s potkany Wistar. Snížení incidence všech typů komorových arytmií vyvolala u obou kmenů ischemický preconditioning. Dalším z možností, jak lze snížit arytmogenezi u SHR potkanů je léčba pomocí inhibitorů angiotensin konvertujícího enzymu jako je např. enalapril nebo ramipril, jak ukázaly studie (Nguyen et al., 1998; Pahor et al., 1991).

Chronická hypoxie má protektivní účinek, na výskyt a závažnost ischemických arytmií, jehož velikost závisí na použitém modelu (Neckář a kol., 2004; Asemu et al., 2000). Hledání nejvhodnějšího protokolu je stále předmětem probíhajících studií, ale ve spojení s SHR potkany tuto problematiku zatím nikdo nezkoumal.

### **6.3 Vliv chronické hypoxie na expresi enzymu Aco 2**

V rámci této diplomové práce jsme také sledovali, jak ovlivní chronická hypoxie expresi enzymu Aco 2 v myokardu levé komory srdeční. Námi zjištěné výsledky ukázaly, že množství tohoto enzymu se neliší v rámci kmenů a ani chronická hypoxie neměla vliv na jeho množství. Je známo, že při ischemii myokardu dochází k nárůstu oxidačního stresu, a tedy k ovlivnění exprese a aktivity celé řady enzymů Krebsova cyklu, oxidační fosforylace a k nárůstu koncentrace antioxidantních enzymů (Dhalla et al., 1999). Při adaptaci na chronickou hypoxii také dochází k odpovědi tkání a orgánů na oxidační stres ve formě nárůstu antioxidantní kapacity (Balková a kol., 2011; Nakanishi et al., 1995). Nicméně ROS tvořené v závislosti na adaptaci na chronickou hypoxii nemusí pouze negativně ovlivňovat myokard, ale mohou se také podílet na kardioprotektivní signalizaci (Kolář a Ošťádal, 2004). Experimenty, provedené v rámci grantového projektu zabývajícího se vlivem chronické hypoxie na myokard Tg a SHR potkanů, respektive na expresi klíčových metabolických enzymů ukazují, že antioxidantní systémy (enzymy

CuSOD, MnSOD), s výjimkou katalázy, nemusí pravděpodobně hrát významnější roli v kardioprotektivním působení chronické hypoxie. Za zmínku také stojí, že chronická hypoxie vyvolala u obou kmenů snížení množství podjednotek komplexu IV oxidační fosforylace (Weissova, 2013; Brabcová, 2013).

## 7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala ischemickou tolerancí srdce a expresí mitochondriální akonitázy u normoxických a chronicky hypoxických srdcí hypertenzních potkanů kmene SHR a konplastického kmene SHR/OlaIpcv-mt<sup>BN/Crl</sup>. Na základě realizovaných experimentů jsme dospěli k těmto závěrům:

- 1) Záměna mitochondriálního genomu hypertenzních potkanů kmene SHR za mitochondriální genom normotenzních zvířat kmene Brown Norway významně neovlivnila citlivost jejich srdcí k projevům akutního I/R poškození (ischemické a reperfuční arytmie, velikost infarktu).
- 2) Adaptace na chronickou hypoxii významně snížila velikost infarktu myokardu a výskyt reperfučních arytmií u obou hypertenzních kmenů. V důsledku chronické hypoxie došlo také k významnému poklesu výskytu ischemických arytmií, ale pouze u kontrolního kmene SHR.
- 3) Expresí mitochondriální akonitázy se nelišila mezi oběma kmeny; chronická hypoxie neměla vliv na expresi tohoto enzymu.



## 8 Použitá literatura

- Aschermann M., Toman J., Špinarová J.: Kardiologie, Galén, 2004.
- Asemu G., Neckář J., Szárszoi O., Papoušek F., Ošťádal B., Kolář F.: Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rat *Physiol Res* 49(5):597-606, 2000.
- Asemu G., Papoušek F., Ošťádal B., Kolář F.: Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial  $K_{ATP}$  channel. *J Mol Cell Cardiol* 31:1821-1831, 1999.
- Balková P., Hlaváčková M., Milerová M., Neckář J., Kolář F., Novák F., Nováková O.: N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiol Res* 60(3):467-74, 2011.
- Beinert H., Holm R.H., Munck E.: Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653-659, 1997.
- Belaidi E., Joyeux-Faure M., Ribuot Ch., Launois S.H., Levy P., Godin-Ribuot D.: Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *Jam Coll Cardiol* 53(15):1309-17, 2009.
- Berges A., Van Nassauw L., Bosmans J., Timmermans J.P., Vrints C.: Review Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. *Acta Cardiol* 58(2):119-32, 2003.
- Biteau B., Labarre J., Toledano M.B.: ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425:980-984, 2003.
- Blumberg F.C., Lorenz C., Wolf K., Sandner P., Riegger G.A., Pfeifer M.: Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 55(1):171-7, 2002.
- Borchet G.H., Yang Ch., Kolář F.: Mitochondrial  $BK_{Ca}$  channels contribute to protection of cardiomyocytes isolated from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(2): H507-H513, 2011.
- Brabcová I.: Úloha mitochondriálního genomu v ischemicko-reperfuzním poškození srdce u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) adaptovaných na hypoxii. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2013.

- Bulteau A.L., Lundberg K.C., Ikeda-Saito M., Isaya G., Szweda L.I.: Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5987–5991, 2005.
- Bulteau A., O'Neill H.A., Kennedy M.C., Ikeda-Saito M., Isaya G., Szweda L.I.: Frataxin Acts as an Iron Chaperone Protein to Modulate Mitochondrial Aconitase Activity. *Science* 305(5681):242-5, 2004.
- Buja L.M., Entman M.L.: Modes of Myocardial Cell Injury and Cell Death in Ischemic Heart Disease. *Circulation* 98:1355-1357, 1998.
- Calbet J.A.L.: Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. *J Physiol* 551(Pt 1):379–386, 2003.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S.A., Chang, B., Goldberger, O.A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A., Mootha, V.K.: Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat. Genet* 38:576–582, 2006.
- Carpenter J.F., Hand S.C.: Reversible dissociation and inactivation of phosphofructokinase in the ischemic rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 250:R512–R518, 1986.
- Caulfield L., Lavender P., Newell-Price J., Kamdar S., Farrall M., Clark A.: Angiotensinogen in human essential hypertension. *Hypertension* 28:1123–1125, 1996.
- Comte B., Vincent G., Bouchard B., Benderdour M., Des Rosiers C.: Reverse flux through cardiac NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1505–H1514, 2002.
- Dhalla N.S., Golfman L., Takeda S., Takeda N., Nagano M.: Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review. *Can J Cardiol* 15(5):587-93, 1999.
- Eaton P., Shattock M.J.: Purification of proteins susceptible to oxidation at cysteine residues: identification of malate dehydrogenase as a target for S-glutathiolation. *Ann NY Acad Sci* 973: 529–532, 2002.
- Eells J.T., Henry M.M., Gross G.J., Baker J.E.: Increased mitochondrial K(ATP) channel activity during chronic myocardial hypoxia: is cardioprotection mediated by improved bioenergetics?. *Circ Res* 87(10):915-21, 2000.

- Elmedal B., de Dam M.Y., Mulvany M.J., Simonsen U.: The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *Br J Pharmacol* 141(1):105-13, 2004.
- Essop MF.: Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 584.3: 715–726, 2007.
- Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G. F.: Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev* 59:418–458, 2007.
- Flint D.H., Tuminello J.F., Emptage M.H.: The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268(30):22369-76, 1993.
- Fletcher E.C.: Review Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90(4):1600-5, 2001.
- Golden A.L., Bright J.M., Pohost G.M., Pike M.M.: Ischemic dysfunction and impaired recovery in hypertensive hypertrophied hearts is associated with exaggerated intracellular sodium accumulation. *Am J Hypertens* 7(8):745-54, 1994.
- Halestrap A. P., Clarke S. J., Javadov S. A.: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection, *Cardiovasc Res* 61:372-385, 2004.
- HAMPL V., Bíbová J., Baňasová A., Uhlík J., Miková D., Hniličková O., Lachmanová V., Herget J.: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:11 - 20, 2006.
- HAMPL V., Herget J.: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* 80:1337 - 1372, 2000.
- Hentley W.N., Tucker A.: Hypoxic moderation of systemic hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 252(3 Pt 2):R554-61, 1987.
- Houštek J, Hejzlarová K, Vrbacký M, Drahotka Z, Landa V, Zídek V, Mlejnek P, Šimáková M, Šilhavy J, Mikšík I, Kazdová L, Oliyarnyk O, Kurtz T, Pravenec M.: Nonsynonymous variants in mt-Nd2, mt-Nd4, and mt-Nd5 are linked to effects on oxidative phosphorylation and insulin sensitivity in rat conplastic strains. *Physiol Genomics* 44(9):487-94, 2012.
- Hübner N., Kreutz R., Takahashi S., Ganten D., Lindpaintner K.: Unlike human hypertension, blood pressure in a hereditary hypertensive rat strain shows no linkage to the angiotensinogen locus. *Hypertension* 23:797–801, 1994.

- Hurtado A.: Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann InternMed* 53:247–258, 1960.
- Charvátová Z., Ošťádalová I., Zicha J., Kuneš J., Maxová H., Ošťádal B.: Cardiac Tolerance to Ischemia in Neonatal Spontaneously Hypertensive Rats. *Physiol Res* 61 (Suppl. 1):S145-S153, 2012.
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Butow RA. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307(5710):714-7, 2005.
- Ishii T., Tatsuda E., Kumazawa S., Nakayama T., Uchida K.: Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 42: 3474–3480, 2003.
- Janssens S.P., Thompson B.T., Spence C.R., Hales C.A.: Functional and structural changes with hypoxia in pulmonary circulation of spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 77(3):1101-7, 1994.
- Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y.V.: Lifton R.P., Williams C.S., Charru A., Hunt S.C., Hopkins P.N., Williams R.R., Lalouel J.M., Corvol P.: Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71:169–180, 1992.
- Kang L., Fang Q., Hu S.J.: Regulation of phospholamban and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase by atorvastatin: implication for cardiac hypertrophy. *Arch Pharm Res* 30(5):596-602, 2007.
- Knott E.M., Ryou M.G., Sun J., Heymann A., Sharma A.B., Lei Y., Baig M., Mallet R.T., Olivencia-Yurvati A.H.: Pyruvate-fortified cardioplegia suppresses oxidative stress and enhances phosphorylation potential of arrested myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1123–H1130, 2005.
- Kolář F., Ošťádal B.: Molecular Mechanisms of Cardiac Protection by Adaptation to Chronic Hypoxia. *Physiol Res* 53 (Suppl. 1):S3-S13, 2004.
- Kolář F., Parratt J.R.: Antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning in hearts of spontaneously hypertensive rats. *Exp Clin Cardiol* 2:124-7, 1997.
- Kopecký M., Daum S.: Adaptation of the myocardium to altitude anoxia. *Cesk Fysiol* 7(3):218-9, 1958.
- Kuwahira I., Heisler N., Piiper J., Gonzalez N.C.: Effect of chronic hypoxia on hemodynamics, organ blood flow and O<sub>2</sub> supply in rats. *Respir Physiol* 92(2):227-38, 1993.

- Lawlis V.B., Roche T.E.: Effect of micromolar  $\text{Ca}^{2+}$  on NADH inhibition of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and possible role of  $\text{Ca}^{2+}$  in signal amplification. *Mol Cell Biochem* 32:147–152, 1980.
- Leenen F.H., Yuan B.: Mortality after coronary artery occlusion in different models of cardiac hypertrophy in rats. *Hypertension* 37:209–15, 2001.
- Lindpaintner K., Lee M., Larson M.G., Rao V.S., Pfeffer M.A., Ordovas J.M., Schaefer E.J., Wilson A.F., Wilson P.W., Vasan R.S., Myers R.H., Levy D.: Absence of association or genetic linkage between the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med* 334:1023–1028, 1996.
- Linz W., Wiemer G., Schmidts H.L., Ulmer W., Ruppert D., Schölkens B.A.: ACE inhibition decreases postoperative mortality in rats with left ventricular hypertrophy and myocardial infarction. *Clin Exp Hypertens* 18(5):691-712, 1996.
- Lowell B.B., Shulman G.I.: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387, 2005.
- Mallet R.T., Squires J.E., Bhatia S., Sun J.: Pyruvate restores contractile function and antioxidant defenses of hydrogen peroxide-challenged myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34:1173–1184, 2002.
- McLenachan J.M., Weidinger F.F., Barry J., Yeung A., Nabel E.G., Rocco M.B., Selwyn A.P.: Relations between heart rate, ischemia, and drug therapy during daily life in patients with coronary artery disease. *Circulation* 83:1263-1270, 1991.
- Meerson F.Z., Gomzakov O.A., Shimkovich M.V.: Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* 31(1):30-4, 1973.
- Nakanishi K., Tajima F., Nakamura A., Yagura S., Ookawara T., Yamashita H., Suzuki K., Taniguchi N., Ohno H.: Effect of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol Lond* 489:869-876, 1995.
- Neckář J.: Protektivní vliv chronické hypoxie na akutní ischemické poškození myokardu. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 1998.
- Neckář J., Borchert G.H., Hloušková P., Míčová P., Nováková O., Novák F., Hroch M., Papoušek F., Ošťádal B., Kolář F.: Brief Daily Episode of Normoxia Inhibits Cardioprotection Conferred by Chronic Continuous Hypoxia. Role of Oxidative Stress and BKCa Channels. *Curr Pharm Des* [Epub ahead of print], 2013.

- Neckář J., Ošťádal B., Kolář F.: Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* 53(6):621-8, 2004.
- Neckář J., Papoušek F., Nováková O., Ošťádal B., Kolář F.: Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* 97(2):161-7, 2002.
- Neckář J., Szárszoi O., Kóten L., Papoušek F., Ošťádal B., Grover G.J.: Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55(3):567-75, 2002.
- Netuka I., Szárszoi O., Malý J., Říha H., Turek D., Ošťádalová I., Ošťádal B.: Late effect of early hypoxic disturbance in the rat heart: gender differences. *Physiol Res* 59(1):127-31, 2010.
- Nguyen T., El Salibi E., Rouleau J.L.: Postinfarction Survival and Inducibility of Ventricular Arrhythmias in the Spontaneously Hypertensive Rat: effects of ramipril and hydralazine. *Circulation* 98:2074-2080, 1998.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japan Circ J* 27:282–293, 1963.
- Ošťádal B., Kolář F.: Cardiac ischemia: from Injury to protection. Kluwer Academic Publishers, 1999.
- Ošťádal B., Procházka J., Pelouch V., Urbanová D., Widimský J.: Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov* 33(2):129-38, 1984.
- Ošťádal B., Widimský J.: Intermittant hypoxia and cardiopulmonary system. Academia, Prague, 1985.
- Pahor M., Bernabei R., Sgadari A., Gambassi G. Jr, Lo Giudice, Pacifici L., Ramacci M.T., Lagrasta C., Olivetti G., Carbonin P.: Enalapril prevents cardiac fibrosis and arrhythmias in hypertensive rats. *Hypertension* 18:148-157, 1991.
- Pantopoulos K.: Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012:1–13, 2004.
- Pawloski J.R., Hess D.T., Stamler J.S.: Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409(6820):622-6, 2001.
- Piper H.M., Abdallah Y., Schäfer C.: The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61(3):365-71, 2004.
- Piper H.M., Meuter K., Schäfer C.: Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 75(2):S644-8, 2003.

- Pitula J.S., Deck K.M., Clarke S.L., Anderson S.A., Vasanthakumar A., Eisenstein R.S.: Selective inhibition of the citrate-to-isocitrate reaction of cytosolic aconitase by phosphomimetic mutation of serine-711. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30):10907-12, 2004.
- Pravenec M., Hyakukoku M., Houštek J., Zídek V., Landa V., Mlejnek P., Mikšik I., Dudová-Mothejzická K., Pecina P., Vrbacký M., Drahota Z., Vojtíšková A., Mracek T., Kazdová L., Oliyarnyk O., Wang J., Ho Ch., Qi N., Sugimoto K., Kurtz T.: Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains. *Genome Res* 17(9):1319–1326, 2007.
- Ravingerová T., Bernátová I., Matejíková J., Ledvényiová V., Nemčková M., Pechaňová O., Tribulová N., Slezák J.: Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Exp Clin Cardiol* 16(3):e23-9, 2011.
- Ravingerová T., Slezák J., Tribulová J., Džurba A., Uhrík B., Ziegelhoffer A.: Reactive oxygen species contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci* 18/19:1927–31, 1999.
- Snoeckx L.H., van der Vusse G.J., Coumans W.A., Willemsen P.H., van der Nagel T., Reneman R.S.: Myocardial function in normal and spontaneously hypertensive rats during reperfusion after a period of global ischaemia. *Cardiovasc Res* 20(1):67-75, 1986.
- St Lezin E., Zhang L., Yang Y., Wang J.M., Wang N., Qi N., Steadman J.S., Liu W., Kren V., Zidek V., Krenova D., Churchill P.C., Churchill M.C., Pravenec M.: Effect of chromosome 19 transfer on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 33(1 Pt 2):256-60, 1999.
- Šimko F., Pechaňová O.: Remodelling of the heart and vessels in experimental hypertension: advances in protection. *J Hypertens* 28 Suppl 1:S1-6, 2010.
- Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M.C.: Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem* 275(19):14064-9, 2000.
- Voet, Donald, Judith G. Voet, and Charlotte W. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level*. New York: John Wiley & Sons, p. 578-579, 2008.
- Wallace D.C.: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet* 39:359–40, 2005.

- Weissová R.: Úloha mitochondrií v adaptaci na chronickou hypoxii u spontánně hypertenzních a konplastických potkanů. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2013.
- White M.Y., Cordwell S.J., McCarron H.C., Prasan A.M., Craft G., Hambly B.D., Jeremy R.W.: Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems. *Proteomics* 5:1395–1410, 2005.
- Widimský J., Urbanová D., Ressler J., Ošťádal B., Pelouch V., Procházka J.: Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* (1973) 7 (6):798-808, 1973.
- Yamori Y.: Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular disease. in: Ganten D, de Jong W (volume editors) Birkenhager WH, Reid JT (series editors). *Handbook of hypertension, Volume 16: Experimental and genetic models of hypertension*. Amsterdam: Elsevier, 1994.
- Yano T., Miki T., Tanno M., Kuno A., Itoh T., Takada A., Sato T., Kouzu H., Shimamoto K., Miura T.: Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection. *Hypertension* 57:110–115, 2011.
- Yellon D.M., Hausenloy D.J.: Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357(11):1121-35, 2007.
- Yim T.K., Ko K.M.: Schisandrin B protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing myocardial glutathione antioxidant status. *Mol Cell Biochem* 196:151–156, 1999.
- Zemanová L.: Vliv různých forem chronické hypoxie na tělesný růst, hematokrit a myokard laboratorního potkana. *Středoškolská odborná činnost (SOČ)*, 2007.
- Zicha J., Kuneš J.: Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 79(4):1227-82, 1999.



*Internetové zdroje:*

Světová zdravotnická organizace:

<http://www.who.cz/index.php/13-dny-who-a-osn/82-svetovy-den-zdravi-2013-7-dubna-2013>