

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

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Jan Jelínek**

Ischemická tolerance srdcí hypertenzních potkanů

Cardiac ischemic tolerance of hypertensive rats

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 23. 08. 2013

Podpis

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Janu Neckáři, Ph.D. za odbornou pomoc a trpělivost při vypracování této bakalářské práce. Dále poděkování patří mé rodině a mé přítelkyni, za podporu a porozumění nejen při psaní bakalářské práce.

## **Abstrakt**

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout současné poznatky vlivu ischemicko-reperfuzního poškození na myokard hypertenzních jedinců.

První část je zaměřena na popis ischemie, reperfuze a změn metabolismu myokardu při těchto dějích. Mezi tyto změny patří například nekróza či apoptóza buněk myokardu.

Druhá část popisuje zatím známé kardioprotektivní fenomény. Porovnává jejich účinky a detailněji popisuje signalizaci preconditioningu, druhého okna preconditioningu a postconditioningu.

Třetí část je zaměřena na popis rizikových faktorů souvisejících s ICHS a hypertenzí. Dále také na dělení hypertenze, způsoby klinické a experimentální léčby hypertenze, popis vybraných laboratorních kmenů hypertenzních potkanů.

V poslední části bakalářské práce popisují vliv hypertenze na I-R poškození v laboratorních studiích. Ve většině studií byl použit kmen spontánně hypertenzních potkanů. Jako normotenzní kontrola byl nejčastěji používán kmen Wistar-Kyoto. Pro některé další experimenty byl použit transgenní kmen potkanů TGR.

**Klíčová slova:** hypertenze, ischemie, reperfuze, kardioprotekce, preconditioning, postconditioning, SHR, TGR, myokard, infarkt myokardu

## **Abstract**

The aim of this thesis is to summarize current knowledge about the influence of the ischemic-reperfusion injury at the myocardium of hypertensive subjects.

First part of this thesis is focused on the description of ischemia, reperfusion and changes in the myocardial metabolism during these processes. These changes in the myocardial metabolism are for example necrosis or apoptosis of the myocardial cells.

The second part describes the currently known cardioprotective phenomena. This part also compares their effects. The signalization of preconditioning, the second window of preconditioning and the postconditioning are described here in more details.

Third part is focused on the description of the risk factors connected to the ICHS and hypertension. It describes also classes of hypertension, clinical and experimental methods of hypertension treatment, description of the laboratory breeds of hypertensive rats.

In the last part of this thesis I describe the influence of hypertension on the I-R injury in current laboratory studies. In the most studies spontaneously hypertensive rats (SHR) were used. As a normotensive controls Wistar-Kyoto rats were mostly used. For some other experiments transgenic genetic rats (TGR) were used.

**Keywords:** hypertension, ischemia, reperfusion, cardioprotection, preconditioning, postconditioning, SHR, TGR, myocardium, myocardial infarction

## **Obsah**

Seznam zkratk	2
1. ÚVOD	4
2. ICHS (ischemická choroba srdeční)	5
2.1. Ischemie	6
2.2. Poškození buňky, následná nekróza nebo apoptóza	8
2.3. Reperfuze	8
3. Kardioprotektivní fenomény	10
3.1. Adaptace na chronickou hypoxii	10
3.2. Kardioprotekce – preconditioning	10
3.3. Druhé okno protekce preconditioningu	11
3.4. Preconditioning a jeho působení na myokard	12
3.5. Kardioprotekce - postconditioning	14
4. Rizikové faktory ICHS	16
4.1. Hypertenze	16
4.1.1. Vliv na srdce	17
5. Modely hypertenze	18
5.1. Experimentální modely hypertenze u potkanů	18
5.1.1. Genetické a transgenní modely potkanů	18
6. Způsoby klinické léčby hypertenze	20
7. Ischémie a reperfuze u hypertenzních modelů	22
7.1. Vliv stáří hypertenzních modelů na toleranci myokardu k ischémii	23
7.1.1. Tolerance ischémie u neonatálních potkanů	24
7.2. Vliv pohlaví na projevy ICHS	24
7.3. Vliv blokátorů angiotensinu II na ischemii	25
7.4. Vliv podání erythropoetinu na rozsah infarktu	26
7.5. Vliv stresu na I/R poškození	26
7.6. Helium a jeho kardioprotektivní účinky	27
7.7. Laboratorní studie provedené na transgenních potkanech	27
7.8. Vliv pohybu (cvičení) hypertenzních zvířat na projevy ICHS	29
8. Závěr	30
Seznam použité literatury	31

ACE	Angiotensin converting enzyme	Angiotensin konvertující enzym
AMK	Aminoacid	Aminokyselina
AT1	Angiotensin receptor subtype 1	Angiotensin receptor typ 1
AT2	Angiotensin receptor subtype 2	Angiotensin receptor typ 2
AT II	Angiotensin II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphate	Adenosintrifosfát
B2 receptory	Bradykinin receptors type 2	Bradykininové receptory typ 2
Ca <sup>+</sup>	Calcium ion	Vápenatý ion
c-AUBC	Cis-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyklohexyl-oxy]benzoic acid	Cis-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyklohexyl-oxy]benzoová kyselina
CYP	Cytochrome	Cytochrom
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kyselina deoxyribonukleová
DS	Dahl - Salt sensitive rat	Dahl - Salt sensitivní potkani
EETs	Essential hypertension	Esenciální hypertenze
EH	Epoxide hydrolase	Epoxid hydroláza
EHs	Soluble epoxide hydrolase	Rozpuštěná epoxid hydroláza
EKG	Electrocardiogram	Elektrokardiogram
eNOS	Endothelial NO syntasa	Endoteliální NO syntáza
EPO	Erythropoetin	Erytropoetin
ERK	Extracellular response kinases	Kinázy extracelulární odpovědi
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
DHETE	Dihydroxyeicosanoid acid	Dihydroxyeikosanoidová kyselina
h	-	Tloušťka stěny myokardu
HSP	Heat shock proteins	Proteiny teplotního šoku
ICHS	Ischemic heart disease	Ischemická choroba srdeční
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Indukovatelná NO syntáza
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Inositol(1,4,5)-trisphosphate	Inositol(1,4,5)-trisfosfát
IPC	Ischemic preconditioning	Ischemický preconditioning
IPostC	Ischemic postconditioning	Ischemický postconditioning
I-R	Ischemia-reperfusion cycle	Cyklus ischemie-reperfuze
JNK	Jun amino-terminal kinase	Jun amino-terminální kináza
K <sup>+</sup>	Potassium cation	Draselný kation
KATP	K <sup>+</sup> ATP channels	ATP senzitivní kanály draslíku
L-NAME	L-NG-NitroArginine Methyl Ester	L-NG-NitroArginin Methyl Ester
LVEDP	Left ventricular diastolic pressure	Diastolický tlak levé srdeční komory
LVH	Left ventricular hypertrophy	Hypertrofie levé komory
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases	Mitogen aktivovaná protein kináza
MK	Fatty acids	Mastné kyseliny

MnSOD	Mitochondrial superoxiddismutase	Mitochondriální superoxiddismutáza
Na <sup>+</sup>	Sodium cation	Sodný kationt
NF-κB	Transcriptional nuclear factor κB	Transkripční nukleární faktor κB
NHE	Sodium-hydrogen exchanger	Sodíko-vodíkový výměník
NO	Nitrogen oxide	Oxid dusnatý
P	Pressure	Tlak
p38 MAPK	P38mitogen-activated protein kinase	P38mitogen aktivovaná protein kináza
pH	Potential of hydrogen	Vodíkový exponent
PKC	Protein kinase C	Proteinkináza C
PKCε	Protein kinase Cε	Protein kináza Cε
PLC	Phospholipase C	Fosfolipáza C
PLD	Phospholipase D	Fosfolipáza D
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidilinositol(4,5)-bisphosphate	Fosfatidilinositol(4,5)-bisfosfát
r	Radius	Poloměr komory srdeční
RAS	Renin-angiotensin system	Renin-angiotensin systém
SHR	Spontaneous hypertensive rats	Spontánně hypertenzní kmen potkanů
SHR-SP	Strokeprone hypertensive rats	SHR náchylní k ischemické příhodě
SD	Sprague-Dawley rats	Spargue-Dawley potkani
T	Transmural pressure	Napětí ve stěně
TGR	Transgenic rats	Transgenní potkani
TK	Blood pressure	Krevní tlak
VAT	Ventricold arrythmetic treshold	Práh ventrikulárních arytmii
WHO	World Health Organization	Světová-zdravotnická organizace
WKY	Wistar Kyoto rats	Kmen potkanů Wistar-Kyoto
ROS	Reactive oxygen species	Volné kyslíkové radikály



## 1. Úvod

Choroby, které postihují kardiovaskulární systém člověka, patří k těm vůbec nejčastějším, jež se vyskytují v dnešní moderní společnosti. Na následky těchto chorob či komplikací, zemře nejvíce pacientů a jejich počet bude dle prognóz neustále narůstat. Právě proto je výzkumu, prevenci a léčbě věnováno velké úsilí mnoha vědeckých fyziologických, biomedicínckých a farmaceutických laboratoří po celém světě.

Ischemie a následky, které způsobuje, často bývají smrtelné. Jedním z jejích hlavních rizikových faktorů je hypertenze, na kterou je má bakalářská práce zaměřena především.

Obecně se dá říci, že hypertenze zhoršuje následky a posléze vyrovnání se myokardu s ischemií. Tento jev bývá také nazýván ischemicko-reperfuzní poškození (I-R poškození) [1].

Ve své práci jsem se zaměřil především na podrobnější popis kardioprotektivních fenoménů a jejich účinků na myokard. Snažil jsem se porovnat klinickou praxi léčby ischemie s tou, co probíhá zatím pouze na laboratorních zvířatech a jejíž výsledky mají před zavedením do klinické praxe před sebou ještě mnoho let až desítek let výzkumu.

### **Cíle práce:**

Cílem mé bakalářské práce bylo popsání vlivu hypertenze na ischemicko-reperfuzní poškození myokardu. Dále také shrnutí doposud známých kardioprotektivních fenoménů a jejich vlivu na hypertenzí poškozený (remodelovaný) myokard.

## **2. ICHS (ischemická choroba srdeční)**

ICHS (ischemická choroba srdeční) patří ke kardiovaskulárním chorobám, které představují jedny z nejzávažnějších zdravotních rizik pro naši současnou společnost. Až 50 % případů je letálních (končí smrtí). Podle předpoklad Světové zdravotnické organizace (WHO, *World Health Organization*) se kardiovaskulární choroby do roku 2020 stanou majoritní příčinou mortality ve vyspělých státech světa [2] .

ICHS není jen jedna porucha či onemocnění, je to systémové onemocnění a pojí se většinou s větším množstvím patologií například: hypertrofie levé srdeční komory (LVH), systémová hypertenze, hypercholesterolemie, dyslipidemie apod.

Příčiny ICHS mohou být různé. Snížení dodávky okysličené krve do myokardu způsobuje pokles absolutního průtoku krve, nebo relativní poptávku ( $O_2$ , živiny). Snížení krevního průtoku může být způsobeno hromaděním krevních destiček. Další příčinou mohou být aterosklerotické pláty, které uzavírají většinou koronární tepnu. V případě úplného uzavření koronární arterie dochází ke vzniku infarktu myokardu.

Při akutním infarktu probíhá řada dějů směřujících k poškození myokardu, které mohou být dočasné a tedy zvrátané (reverzibilní) či nezvrátané (ireverzibilní) [3]. K nezvrátaným změnám tkáně, mezi něž řadíme nekrotizaci a apoptózu buněk myokardu, dochází v případě, že nedojde k reperfuzi (obnovení průtoku krve ischemizovanou tkání) do 20 až 30 minut po ischémii. Tento stav má vliv na metabolické změny.

## 2.1. Ischemie

Energetický metabolismus myokardu je závislý na produkci ATP (adenosin trifosfát) procesem oxidativní fosforylace, která probíhá v mitochondriích. Není proto překvapivé, že energeticky náročná tkáň srdce je tvořena až z jedné třetiny mitochondriemi. Ty obsahují vyšší množství cytochromů než většina mitochondrií jiných orgánů (např. jater). Jako substrát oxidativní fosforylace neslouží myokardu pouze glukóza a glykogen, ale i mastné kyseliny (MK), laktát, ketolátky a aminokyseliny (AMK) [4]. Jelikož se vyskytují MK v plasmě v relativně vysoké koncentraci, využívá myokard jejich oxidaci jako substrát k produkci ATP až z 60-90 % celkového zisku energie [5]. V porovnání s jinými druhy svaloviny (například s kosterní svalovinou) mají buňky srdeční svaloviny pouze malou schopnost získávat ATP anaerobní glykolýzou. Místo potřebných 38 molekul ATP získávají pouze 2 molekuly ATP [6]. To je jedním z důvodů, proč je myokard velmi náchylný k nedostatku kyslíku, respektive ischemii.

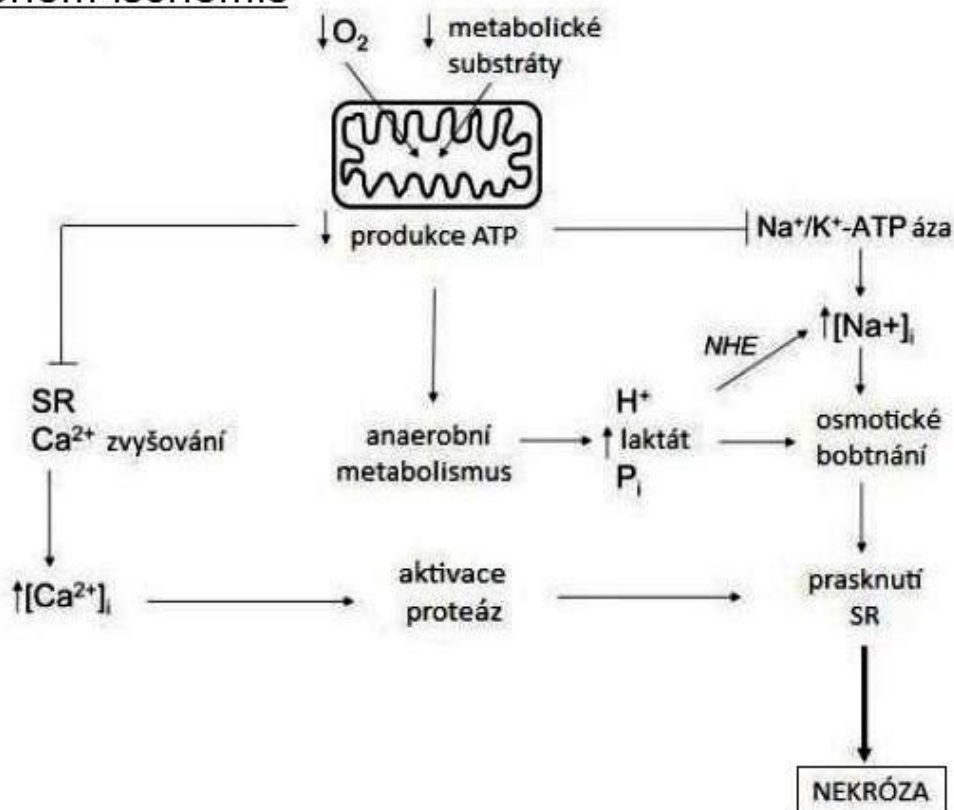
Při snížení dostupnosti molekulárního  $O_2$  a metabolických substrátů dojde k nedostatku vysokoenergetických fosfátů a kreatinfosfátových rezerv, které jsou v krátké době zcela vyčerpány [7]. Vlivem nedostatku  $O_2$ , a tím i nedostatku tolik potřebné energie ve formě ATP, nedokáže myokard udržet standardní elektrickou aktivitu, dochází k jejím poruchám, vznikají arytmie, které jsou spojené s poruchami transportu iontů mezi sarkolemou a membránami buněčných organel. Z počátku se zvyšuje odtok  $K^+$  iontů vlivem zvýšeného osmotického tlaku uvnitř buňky, který je zapříčiněn hromaděním metabolitů a anorganického fosfátu. Dále následuje zvýšení koncentrace volných  $Mg^{2+}$  iontů, na které reaguje buňka snížením celkového obsahu veškerých  $Mg^{2+}$  iontů. S výrazným poklesem ATP dochází k porušení funkce  $Na^+/K^+$ -ATPázy, tudíž i k poklesu  $K^+$  iontů a vzestupu koncentrace  $Na^+$  uvnitř buňky. Příjem  $Na^+$  tím i  $Cl^-$  a vody do buňky vede k bobtnání (otoku) buňky [8].

V důsledku akutní ischemie dochází k poruchám funkce  $Na^+/Ca^+$  výměníku, který za normálních okolností (před vznikem ischemie) zajišťuje aktivní transport  $Ca^{2+}$  ven z buňky přes sarkolemu. Funkce výměníku je narušena změnami metabolismu popsány výše, zejména nedostatkem ATP, které je důležité pro příjem vápníkových iontů. Posléze dochází k hromaděním  $Ca^{2+}$  uvnitř buňky

(intracelulární akumulace). Anaerobní mechanismus je také provázen intracelulárním hromaděním anorganických fosfátů, laktátu a  $H^+$ . Další hromadění  $H^+$  vytěsňuje  $Ca^{2+}$  vázaný v myofibrilách [9].

Vliv již popsaných změn vyvolá aktivaci sodíko-vodíkového výměníku (NHE-*sodium-hydrogen exchanger*). Dále dojde k poklesu pH intracelulárního prostoru. To je umožněno faktem, že potřebné množství ATP ke správné funkci odtoku z buňky (nefunkční  $Ca^{2+}$  pumpa, tudíž i výměna sodíku a vápníku) již bylo dávno vyčerpané buňkou při snaze reagovat na ischemii. Metabolismus se změnil z aerobní glykolýzy na anaerobní metabolismus [7]. Průběh výše popsaných mechanismů schematicky znázorňuje obrázek 1.

### Během ischemie



**Obrázek 1**

Schéma mechanismů vzniku nekrózy myokardu během ischemie (upraveno dle Ferdinandy a kol. [7])

## **2.2. Poškození buňky, následná nekróza nebo apoptóza**

Všechny výše zmíněné změny v metabolismu vedou ke zvyšování osmotického tlaku, narušení iontové homeostázy a acidóze buňky. Dochází k vyplavení a následné aktivaci lysozomálních fosfolipáz a proteáz, jejichž činností jsou myocyty trvale a nevratně poškozovány. V těchto procesech se také významně uplatňují volné kyslíkové radikály (ROS). Působením vysoké intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  zduří a následně praskne sarkolema, tkáň začne nekrotizovat. Nekróza je nekoordinovaný autolytický a energeticky nezávislý proces, při kterém buňky zvětšují svůj objem. Dochází k prasknutí a vylití buněčného obsahu do okolí buněk, což může být příčinou zánětů [7, 9].

K zániku buněk myokardu může docházet i procesem apoptózy. Nicméně pouze v menší míře v porovnání s nekrózou. Apoptóza na rozdíl od nekrózy je předem naprogramovaný proces, který může probíhat buďto aktivací buněčných receptorů iniciující řízený rozklad buněčných organel, či mitochondriální cestou [10]. Při apoptóze dochází k mnoha molekulárním, biochemickým a morfologickým změnám. Změny zahrnují také aktivaci genů programované buněčné smrti, aktivaci kaskády cytosolických-aspartát specifických cysteinových proteáz (kaspázy), změny v mitochondriálních membránách, včetně ztráty membránového potenciálu, uvolnění cytochromu c a degradaci chromozomální DNA. DNA je štěpena na kratší úseky [5, 8].

## **2.3. Reperfuze**

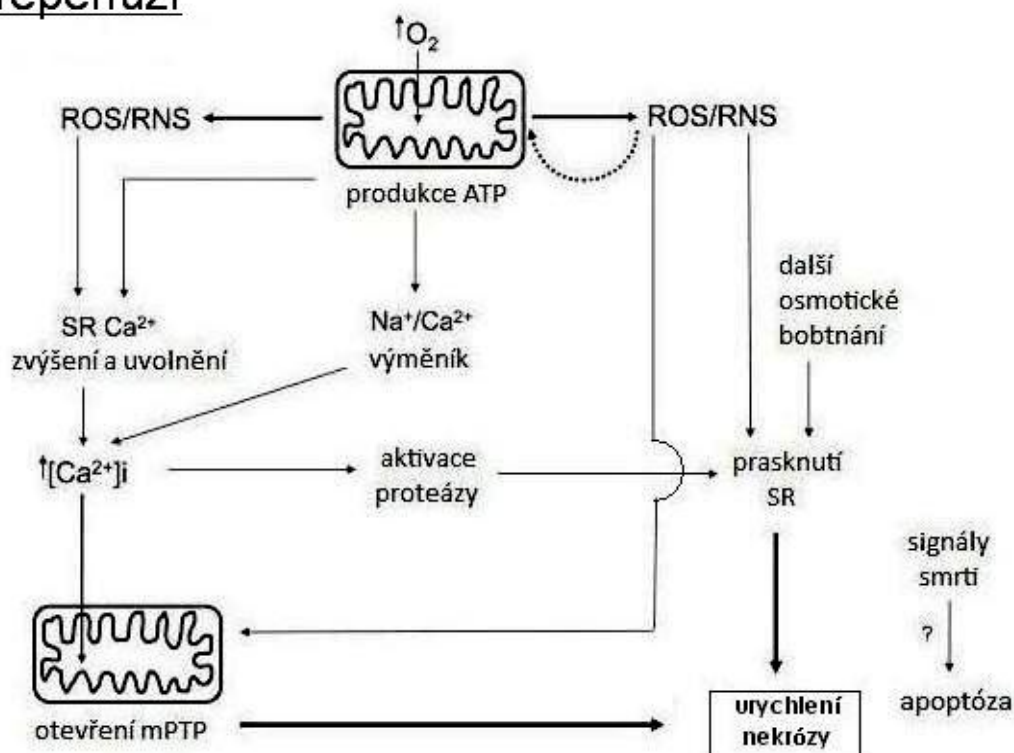
Reperfuze je děj, ke kterému dochází po uvolnění koronární tepny a obnovení průtoku krve ischemizovanou tkání, jež přináší opětovné zásobení myokardu  $\text{O}_2$  a živinami. Reperfuze, prováděné v klinické praxi ovlivňují mnohé faktory, které jsou předmětem výzkumu.

Pakliže dojde k reperfuzi pozdě, v době kdy se v buňce již nahromadilo velké množství  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, tudíž již došlo k ireverzibilnímu snížení intracelulárního pH, a k vyčerpání energetických rezerv, dochází k nečinnosti antioxidantních obranných mechanismů buňky. Při následné reperfuzi po ischemii může dojít k většímu a rychlejšímu poškození tkáně v důsledku vysokého nárůstu ROS a zvýšené aktivity  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku. Jeden z hlavních dějů, k němuž dochází

při reperfuzi, bývá otevření neselektivního mitochondriálního póru (mPTP), což je malý neselektivní napětově ovládaný kanál ve vnitřní mitochondriální membráně [11].

Otevření mPTP depolarizuje mitochondrii, vede k redistribuci látek menších než 1.5 kDa (především NAD(H) a  $\text{Ca}^{2+}$ ) mezi mitochondriální matrix a cytosol buňky [12]. Další hromadění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů má za následek ireverzibilní změny myokardu. Jejich průběh a důsledek na myokard je podobný jako u dlouhotrvající ischemie. Tato situace se nazývá reperfuzní poškození (*reperfusion injury*) [13] [14]. Průběh výše popsaných změn metabolismu kardiomyocytu při reperfuzním poškození popisuje schéma na obrázku 2.

### Při reperfuzi



**Obrázek 2**

Schéma mechanismů vzniku nekrózy myokardu během reperfuze (upraveno dle Ferdinandy a kol. [7])

### **3. Kardioprotektivní fenomény**

#### **3.1. Adaptace na chronickou hypoxii**

Kardioprotektivní účinek adaptace na chronickou hypoxii na myokard byl doložen jako první, ze všech kardioprotektivních metod, a to již v polovině 20. století. Faktem ale zůstává, že tento druh adaptace je, co se týče dlouhotrvající kardioprotektivních účinků, zatím nejúčinnější.

Zatím nebyla provedena studie, která by se zabývala či dokázala pozitivní kardioprotektivní účinky chronické hypoxie na laboratorních zvířatech „trpících“ hypertenzí.

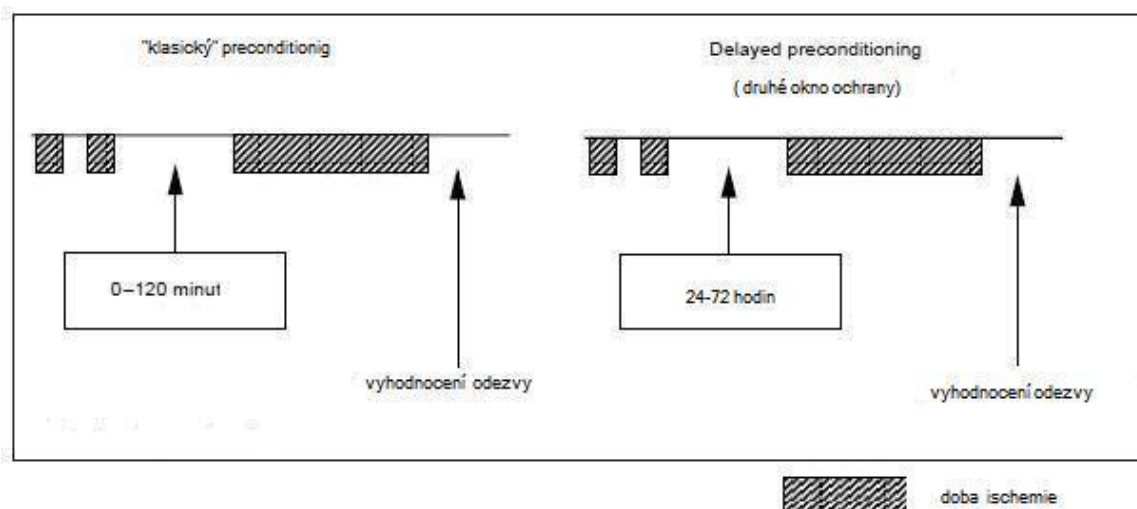
#### **3.2. Kardioprotekce – preconditioning**

Ischemický preconditioning (IPC) je endogenní ochranný mechanismus. Jde o proces krátkodobé adaptace snižující rozsah poškození myokardu po ICHS. Tento jev popsal a doložil Murry a jeho kolegové v roce 1986 [15], kdy IPC značně snižoval rozsah poškozené tkáně infarktem u laboratorních psů. Popisuje akutní a subakutní adaptaci myokardu po jednom či více cyklech krátké ischemie (nevyvolávající ireverzibilní poškození) a následné reperfuzi. Ty slouží kardioprotekčně vůči případné déle trvající následné ischemii (30-60 min.). Ischemie může následovat bezprostředně po cyklech, či až po delší době (do dvou hodin od provedení cyklů ischemie - reperfuze), viz obr.3.

Účinky IPC se nevztahují jen na srdce (tkáň myokardu), ale byly zjištěny i v dalších studiích, na kterých byla analyzována funkce koronárních cév. [16]

V současných vědeckých studiích je více popisován a zkoumán vliv tzv. farmakologického preconditioningu spíše než klasického ischemického preconditioningu, jež je popsán výše [14]. Farmakologický preconditioning spočívá v aplikaci léčiva (látky ovlivňující metabolismus myokardu), která aktivuje buněčné signální dráhy vedoucí ke zvýšené ischemické toleranci srdce. K léčivům, která jsou intenzivně studována na hypertenzních modelech laboratorních potkanů, patří LOSARTAN [17] [18], FONSARTAN [18] [19], RAMIPRIL [20] a CAPTOPRIL [20] [21], BETHANECHOL [22], DANSHENTSU [23]. Vzhledem

k tomu, že efekt IPC není trvalý a výsledky preconditioningu mohou být různé, většinou doba protektivního účinku nepřekročí několik hodin.



**Obrázek 3**

Schéma obou typů preconditioningu (upraveno dle Ferdinandy [14])

### 3.3. Druhé okno protekce preconditioningu

Krátkými cykly ischemie a reperfuze lze také navodit protekci za 24-72 hodin od původního stimulu. [14]. Tomuto jevu se říká „druhé okno protekce“ (*second window of protection*). Buněčné mechanismy pro tuto formu preconditioningu jsou zatím ne zcela jasné. Dosud bylo prokázáno, že se zde mohou uplatňovat podobné endogenní mediátory jako jsou adenosin, NO, ROS, bradykinin a mnoho dalších. Zdá se však, že v tomto případě bude hrát významnou úlohu exprese nových genů.



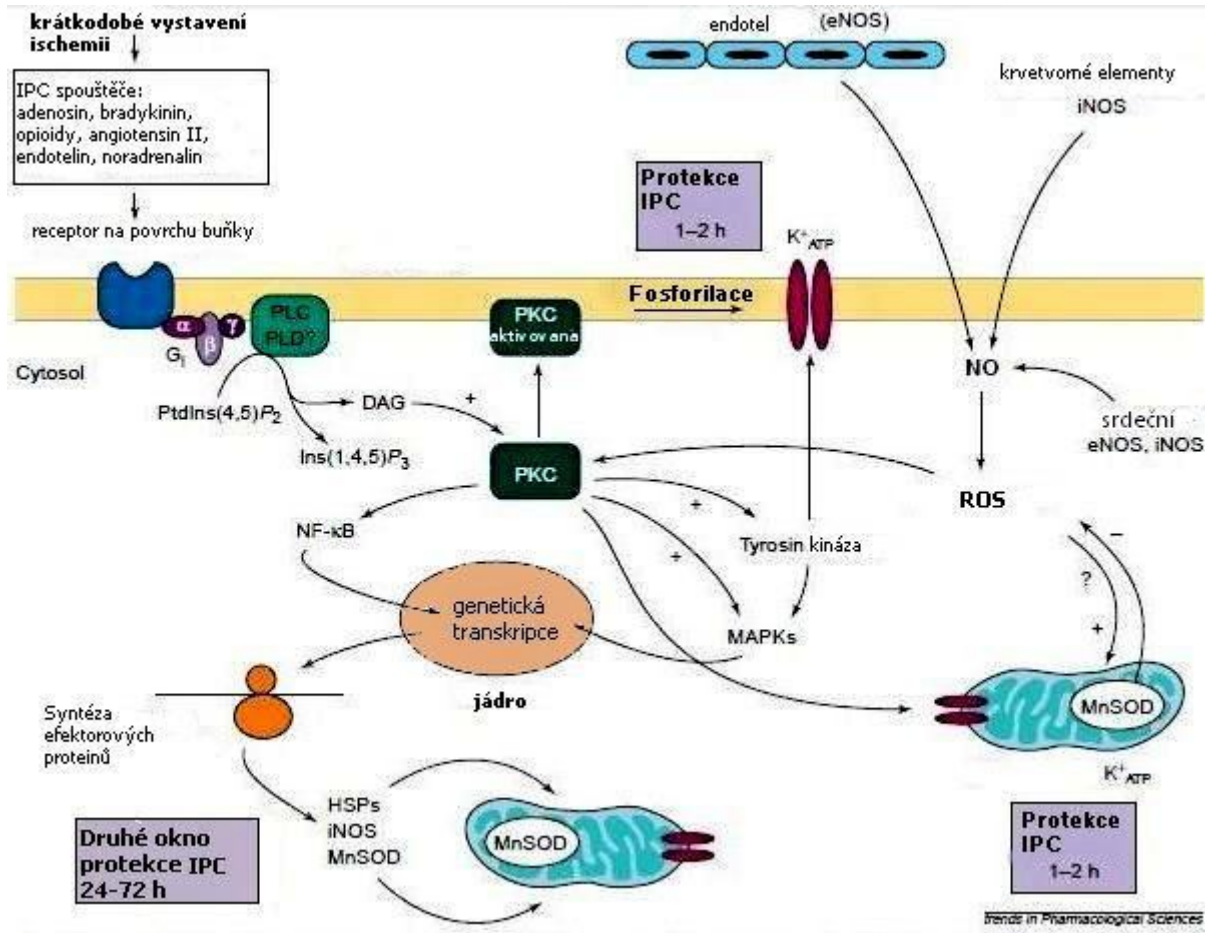
### 3.4. Preconditioning a jeho působení na myokard

IPC u myokardu značně redukuje velikost poškození infarktem (*infarkt size*) způsobenou trvalou ischemií u několika různých laboratorních zvířat (potkani, psi, prasata atd.). Stejně tak i u člověka, což bylo nedávno prokázáno na pacientech při operacích srdečního koronárního bypassu či angioplastice při aortálním upínání (*aortic clamping*).

Adenosin (vazodilatátor závislý na endotelinu) bývá označován jako hlavní spouštěč obou typů IPC, jak klasického, do nějž se řadí i farmaceutický typ, tak i při jevu zvaném druhé okno protekce (popsáno v další kapitole). Mechanismus účinku adenosinu, probíhá přes adenosinové receptory A1 a A3. Podobné účinky jako adenosin má i bradykinin, který aktivuje B2 receptory [16].

K dalším endogenním látkám s kardioprotektivním účinkem, které se využívají v IPC, patří endotelin, angiotensin II, noradrenalin působící přes aktivaci  $\alpha$ -adrenergických receptorů, acetylcholin, erythropoetin a opioidy, působící přes  $\delta$  opioidní receptory [24]. Výše zmíněné látky slouží k aktivaci protein kinázy C (PKC), která je nezbytná k navození adaptace (kardioprotekce). PKC aktivace a její následný transport jsou klíčovými událostmi jak u klasické IPC, tak v pozdějším druhém okně protekce. Studie na transgenních myších prokázaly, že z PKC se nejvíce na tomto účinku podílí izoforma PKC $\epsilon$ . Za mechanickou stabilizaci zodpovídají i jiné druhy kináz, jako například tyrozin kinázy a mitogen aktivované kinázy (MAPKs) [16]. Tyto druhy kináz, především MAPKs, velice úzce souvisí s genetickou expresí v buňce, a proto jsou nyní předmětem zájmu především v molekulární biologii [6]. Každý z podtypů MAPKs, jako jsou ERK, JNK a p38 MAPK, hraje rozdílnou roli při kardioprotektivních krocích, především v metabolických procesech IPC. Jak bylo dokázáno podtyp p38 MAPK se aktivuje při druhé epizodě IPC a mizí ve třetí epizodě IPC, a to v případě, že jsou prováděny tři cykly IPC, což bylo dokázáno [25]. To by mohlo mít za následek otevření ATP sensitivních kanálů draslíku (KATP) v sarkolemě, mitochondriích, nebo obou. Či také přemístění transkripčního nukleárního faktoru kB (NF-kB) na jádro a následnou syntézu ochranných proteinů jako proteiny tepelného šoku (HSP) a mitochondriální formy superoxid dismutázy (MnSOD). Syntéza a uvolňování oxidu dusnatého (NO)

z endoteliálních (eNOS) i indukovatelných (iNOS) NO syntáz , může také přispět k IPC i v druhém okně protekce IPC [26] (viz obr. 4).



Obrázek 4

Schéma signálních drah co se uplatňují při IPC a druhém okně protekce IPC kardiomyocytů (upraveno dle Rubino, Yellon [16])

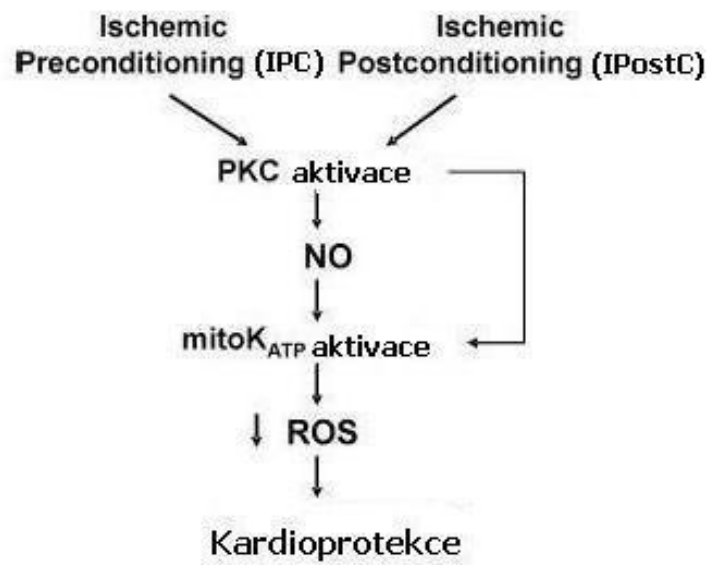
### 3.5. Kardioprotekce – postconditioning

Postconditioning (IPostC) byl popsán jako kardioprotektivní adaptace nejpozději z dosud jmenovaných fenoménů. Proto na IPostC bývá v poslední době zaměřena většina současných vědeckých prací věnujících se kardioprotekci. Druhým důvodem je i jeho jasné klinické využití v porovnání s preconditioningem.

První, kdo popsal a pojmenoval IPostC, byla vědecká skupina kolem Zhaa a Vinten- Johansena [27]. Metoda IPostC spočívá v několika krátkých cyklech koronární okluze prováděné bezprostředně po obnovení koronárního průtoku po ischemii [28]. Porovnáváním účinnosti IPC a IPostC se zabýval Zhao a jeho skupina. Studie spočívala v porovnání jednoho cyklu (5 min.) koronární okluze před hodinovou ischemií s IPostC, která probíhala v několika cyklech (30 sec.) koronární okluze během reperfuze. Reperfuze následovala bezprostředně po ischemii. Kardioprotektivní účinky účinky na myokard byly velmi podobné. [27].

Na rozdíl od IPC, kde jsou signalizační dráhy již celkem dobře popsány a prokázány, signalizační dráhy protekce IPostC nejsou zatím zcela pochopeny a dokázány. Předpokládá se, že některé z drah IPostC jsou podobné IPC signalizaci. Jako hlavní zprostředkovatel kardioprotekce se u IPostC, stejně jak tomu je u IPC, považuje protein kináza C (PKC) a mnoho jejích izoform, které ovlivňují další děje probíhající v buňce myokardu při IPostC. Jako je například snížení ROS, snížením fosforylace záchranných PI3K/Akt (fosfatidylinositol 3 kinázy) a PKB/Akt (protein kinázy B), také mitogen aktivovaných protein kináz (MAPK) p44/p42, extracelulární ERK 1/2 a mnoha dalších [28, 29] (viz obr. 5).

Během začátku reperfuze lze snížit poškození myokardu podáním léčiv v krátkodobých aplikacích. Jedná se o tzv. farmakologický postconditioning. Dosud se podařilo prokázat protektivní účinek u látek podaných na počátku reperfuze jako jsou bradykinin, adenosin, nebo diazoxid.



**Obrázek 5**

Předpokládané signalizační dráhy vedoucí ke kardioprotekci IPostC v porovnání s IPC (upraveno dle Fantinelli [30])

## **4. Rizikové faktory ICHS**

Rizikovými faktory ICHS jsou arteriální hypertenze a s ní související hypertrofie levé srdeční komory (LVH), dále hyperlipémie, arterioskleróza, diabetes mellitus druhého typu a inzulínová rezistence. Mezi rizikové faktory řadíme také stáří jedince, nedostatek pohybové aktivity a obezitu. Nicméně k těm nejzávažnějším a nejdůležitějším patří právě systémová hypertenze a diabetes mellitus druhého typu.

### **4.1. Hypertenze**

Hypertenzi můžeme charakterizovat jako stálé zvýšení systémového arteriálního tlaku. Arteriální tlak určuje srdeční výdej a periferní odpor a to vztahem: tlak = průtok x odpor. Při zvýšeném srdečním výdeji může dojít ke vzniku hypertenze.

Hlediska, podle kterých se rozděluje hypertenze do několika typů, jsou různá. Zde uvedu jen některé. Jedním z důležitých hledisek pro klinickou praxi je rozdělení hypertenze podle výše krevního tlaku (hodnoty platné pro člověka) na tři stupně:

- a) stupeň 1 (mírná), systolický TK 140-159/ diastolický TK 90-99 mm Hg,
- b) stupeň 2 (středně závažná), systolický TK 160-179/ diastolický TK 100-109 mm Hg
- c) stupeň 3 (těžká), systolický TK  $\geq 180$  / diastolický TK  $\geq 110$  mm Hg.

Obecně lze dělit hypertenzi, při pominutí některých speciálních typů dělení (například klasifikace hypertenze podle vývojových stádií), do dvou základních kategorií podle etiologie a patogeneze:

- a) primární - esenciální hypertenzi (EH)
- b) sekundární typ hypertenze (symptomatická hypertenze).

U sekundárního typu, který tvoří zhruba 5-10 % případů pacientů a postihuje spíše pacienty s těžkou hypertenzí, jsou mechanismy vzniku v podstatě známé. Z tohoto důvodu je umožněna efektivní léčba či zmírnění patologicko-fyziologických projevů. Avšak u primárního typu, který je zodpovědný

za zbývající většinu případů ( 90-95 %), nejsou příčiny dosud zcela objasněny. V současné době probíhá v této oblasti mnoho vědeckých studií na laboratorních zvířatech, především na geneticky modifikovaných hypertenzních potkanech. A to z důvodu, že lidská esenciální hypertenze a genetická hypertenze u potkanů jsou velmi podobná chronická onemocnění, způsobená genetickými predispozicemi a vlivem vnějších faktorů v raných fázích ontogeneze [5, 6].

U laboratorních zvířat je většinou trvalá hypertenze uměle navozována zásahy, které nejčastěji postihují ledviny, nadledviny či nervovou soustavu. U určitých kmenů potkanů byla hypertenze navozována genetickým křížením jedinců o vysokém krevním tlaku a vyselektováním hypertenzního kmene (např. spontánně hypertenzní potkan - SHR) nebo stravou (vysokosodná dieta) [31].

#### 4.1.1. Vliv na srdce

Hypertenze u srdeční tkáně vyvolává anatomické i fyziologické změny jak samotného myokardu, tak i věnčitých (koronárních) tepen a velkých cév srdce. Tyto patologické remodelace srdeční tkáně mají za následek zhoršení správné funkce srdce a jeho odolnosti na případnou ischemii,

Jedním ze zásadních vlivů hypertenze na myokard je rozvoj hypertrofie (zbytnění srdeční tkáně). Srdce laboratorních potkanů trpících např. spontánní hypertenzí (kmen SHR a mnohé další) bývají větší a těžší ve srovnání s jedinci normotenzními (stejně stáří a pohlaví). Objevuje se více typů hypertrofie. Vznikem hypertrofií se srdeční tkáň snaží reagovat na změnu a vzrůst tlaku v arteriálním řečišti – TK (blood pressure). Zvýšení tohoto tlaku, který bezprostředně působí na stěnu srdečních komor, patří mezi jedny z nejrizikovějších kardiovaskulárních faktorů.

V důsledku systémové hypertenze dochází k rozvoji hypertrofie levé komory – LVH. Jak se stěna komory stává silnější, její pružnost se zmenšuje. Docílit optimální tlak při plnění v diastole je obtížnější a vše závisí na síňové systole. Zvýšení tloušťky stěny popisuje Laplaceův zákon – *Laplace law*. Ten stanovuje, že roztažený transmuranální tlak (P) v roztažitelném dutém předmětu (céva, srdce) je za rovnovážného stavu roven napětí ve stěně (T), vynásobenému podílem poloměru komory (r) a tloušťky stěny (h).  $T = P \times r/h$  [32].

## 5. Modely hypertenze

### 5.1. Experimentální modely hypertenze u potkanů

Experimentální modely hypertenze u potkanů se dělí na několik skupin podle využití pro různé experimentální cíle. Ty mohou být:

- a) systémové hypertenze
- b) pulmonální hypertenze
- c) infarktu myokardu
- d) hypertrofie srdečního svalu
- e) ischemická mozková příhoda

#### 5.1.1. Genetické a transgenní modely potkanů

Do této kategorie experimentálních zvířat (genetické modely potkanů) spadají čtyři podkategorie: genetické modely pro výzkum systemové hypertenze, genetické modely pro výzkum pulmonální hypertenze, genetické modely pro výzkum srdečního selhání, genetické modely pro výzkum ischemie mozku.

Pro mou bakalářskou práci je nejvýznamnější podkategorií první zmíněná (genetické modely pro výzkum systematické hypertenze). Zvláště významným hojně využívaným modelem v této kategorii je SHR model (*spontaneous hypertensive rats*) [33]. Jako normotenzní kontroly ke kmeni SHR potkanů se většinou používají laboratorní potkani kmene WKY (Wistar-Kyoto). Tyto dva kmeny nebyly vyšlechtěny současně, ale WKY byl vyšlechtěn o deset let dříve. Od vyšlechtěného základního typu SHR kmene potkanů docházelo k šlechtění dalších variant kmene SHR, varianty byly šlechtěny v různých laboratořích, a to dle účelu, ke kterému byly zapotřebí. Jako příklad uvedu jen některé, se kterými jsem se při studiu problematiky související s tématem mé bakalářské práce setkal.

SHR kmeny jsou používány k experimentům zaměřených na studium neurogenetické hypertenze a srdeční hypertrofie. Metabolismus tohoto kmene potkanů je specifický. Vyznačuje se abnormalitami metabolismu vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a problémy s udržením rovnováhy  $\text{Ca}^{2+}$ , což úzce souvisí

s potencionálními elektrofyziologickými poruchami srdce. Dochází též ke snížení prahu pro vznik komorových arytmii srdce. Ten může způsobit až letální arytmie, např. ventrikulární (komorové) fibrilace (vysvětleno v kapitole 7) [34].



## 6. Způsoby klinické léčby hypertenze

V současné klinické praxi bývá využíván jen zlomek z již popsaných laboratorních výsledků a v nich používaných postupů a látek. Látky, které se používají na léčbu hypertenze se nazývají antihypertenziva. Tyto látky se dělí do pěti základních skupin: beta-blokátory, blokátory kalciových kanálů, inhibitory ACE, blokátory angiotensinu II (AT1), thiazidová antidiuretika (saluretika) [35].

Z výsledků klinických pokusů vyplývá, že pouze malá část pacientů trpících hypertenzí může být léčena jedním typem farmaka (tzv. může být léčena monoterapií). Ve většině případů se kombinuje více typů antihypertenziv, nicméně kombinace a dávkování, jsou ještě ve fázi klinických studií[36].

Nejběžněji se využívají beta-blokátory. Beta -blokátory jsou látky, které jak již jejich název napovídá, blokují aktivitu adrenergních katecholaminů na beta-adrenergní receptory, vyskytující se v sympatickém nervovém systému.

Nejvíce se v lidském kardiovaskulárním systému vyskytují tyto adrenergní receptory: beta1, beta2 a alfa receptory [37, 38].

Dalším z cílených skupin, které se používají v klinické praxi, jsou léčiva indukující činnost různých složek renin-angiotenzin systému (RAS), včetně angiotensinogenu, reninu, angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE) a angiotensinových receptorů. Farmakologická inhibice dráhy RAS (podáním inhibitorů reninu, ACE inhibitorů, blokátorů receptorů angiotensinu) prokázala kardioprotektivní účinek na vývoj patologických procesů infarktu myokardu. Nicméně potenciální mechanismy, proč je vlastně inhibice RAS kardioprotektivní, nejsou známy.

V souvislosti s účinky angiotensinu II (AT II), jsou většinou spojovány látky inhibující jeho receptory. Ať už jde o receptor typu 1 (AT1), či o receptor typu 2 (AT2). Blokátory působí příznivě na potlačení projevů ischemie.

Další možností je inhibovat rovnou vznik AT II, nejenom jeho receptorů, a to inhibitory AT konvertujícího enzymu (toto umožňuje např. RAMIPRIL). Inhibicí AT II konvertujícího enzymu (ACE) je zabráněno silnější vasokonstrikční reakci vznikem AT II, který u srdce stimuluje srdeční frekvenci. Také AT II

prostřednictvím AT1 působí na strukturu srdce a cév a ovlivňuje tvorbu růstových faktorů (RF) v kardiomyocytech. Při dlouhodobém působení AT II se rozvíjí srdeční hypertrofie, která je rizikovým faktorem vzniku hypertenze[39].

Při kardioprotekci se uplatňují i inhibitory AT 2, jako je specifický inhibitor PD 123, 319 (PD). Inhibitory AT 2 ovlivňují IP3R a PKCε signalizaci a mohou ovlivňovat i signalizaci závislou na NO. Je dokázáno, že kardioprotekční účinek inhibitorů AT 2 souvisí právě s těmito signalizacemi.

Dalším z léčiv jsou blokátory kalciových kanálů (*calcium channels blockers*-CCB). CCB dilatují cévy a periferní arterie. Podáním jakéhokoliv typu CCB (např. VERAPAMILu a dalších) se signifikantně snižuje TK, a to jak v jednorázovém, tak i při opakovaném podání pacientovi. Mechanismus účinku každého CCB je specifický. Obecně se dá říci, že je založen na regulaci přestupu vápníku přes buněčnou membránu a to různými mechanismy, kterými jsou například: napětově řízené kanály (L-kanály), receptorově řízené kanály, NHE a transport specifickými vápník vázícími proteiny [38].

Poslední velkou skupinou léčiv, která se užívají v klinické praxi, jsou diuretika, především thiazolová diuretika. Ovlivňují extracelulární transportní procesy. Thiazolová diuretika patří mezi distální diuretika blokující symport Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup> a také vylučování Ca<sup>2+</sup>. Proto jsou vhodná k dlouhodobé terapii hypertenze. [39, 40]

Mechanismy jednotlivých léčiv spojených s léčbou hypertenze a jejich vzájemných kombinací nejsou zatím zcela objasněny a v této problematice probíhá intenzivní výzkum.

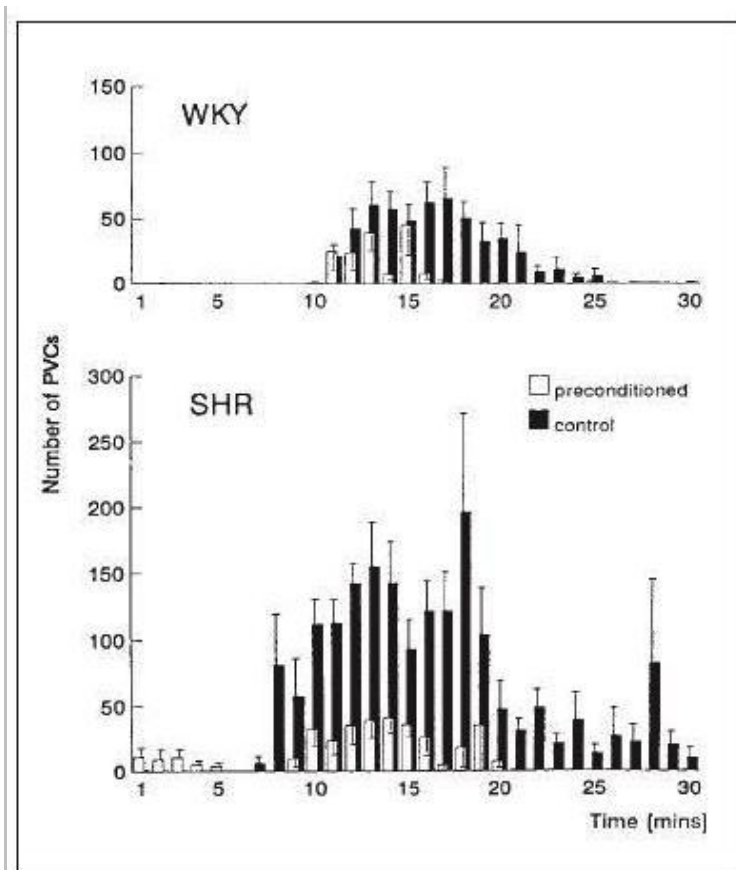
## **7. Ischémie a reperfuze u hypertenzních modelů**

Při navození ischemie zúžením (stenózou) levé koronární arterie bylo zjištěno mnoho funkčních změn u obou kmenů, jak u SHR tak i u WKY . Více změn, způsobených vzrůstem diastolického tlaku, postihovalo jedince SHR [41].

Po 30 minutách trvající ischemii byly patrné funkční změny na myokardu u obou studovaných kmenů, více u SHR jedinců, u kterých byl pozorován až trojnásobný nárůst vzniku předčasných komorových kontrakcí (komplexů) – *premature ventricular complexes*. Tento stav lze vysvětlit asociací v souvislosti s LVHP (viz. dříve uvedena).

Předčasné ventrikulární komplexy (stahy) - PVC se vyskytovaly v různých formách. Ve formě singlů, což je děj, kdy dochází v srdci k jednoduchým předčasným stahům komory. Další formou byly salvy, což je větší množství singlů za sebou. Poslední z forem byly ventrikulární tachykardie, což jsou poruchy srdečního rytmu způsobené rychlými stahy srdečních komor. Tento stav může přejít až do stádia fibrilace komor, kdy dochází funkčním poruchám jednotlivých kardiomyocytů v srdečních komorách. Začnou se stahovat zcela nekoordinovaně (chaoticky) což může mít za následek až srdeční selhání.

Ke všem výše uvedeným stavům jsou náchylnější po ischemii (ale i během ní) jedinci kmene SHR, než normotenzní kontroly kmene WKY, což dokazuje i graf 1.



Graf 1

Výskyt předčasných ventrikulárních stahů v závislosti na délce trvání ischemie u potkanů WKY a SHR, převzato z [41].

### 7.1. Vliv stáří hypertenzních modelů na toleranci myokardu k ischemii

Myokard během stárnutí jedince prochází mnohými strukturálními změnami, srdce se stává náchylnější k rozvoji ICHS či k jiným kardiologickým patologiím. Tyto změny jsou často provázeny hypertenzí [42].

IPC udržuje silný kardioprotektivní potenciál i v průběhu stárnutí, a to jak u normotenzních potkanů kmene WKY tak i u kmene SHR (prokázáno na velikosti hypertrofie srdcí), a tudíž i snižuje velikost a pravděpodobnost infarktu [42]. Podobné výsledky popisuje ve své práci Bešík J. [43], kde se zaměřuje pouze na studium dospělých jedinců kmenů SHR a WKY. I zde potvrdil, že SHR jedinci jsou k ischemii méně odolní než WKY.

Efekt provázanosti vlivu stárnutí (*agingu*) a dlouhotrvající hypertenze popsal Ebrahim a Yellon. V experimentu prokazují, že aging má vliv na výsledky IPC. Ve studii jsou porovnávány modely SHR a WKY, každý kmen je rozdělen do tří skupin podle stáří zvířat. Výsledkem bylo, že IPC prováděná na všech skupinách měla účinek na kardioprotekci u prvních dvou skupin, tzn. u mladých jedinců a dospělých. U starých jedinců se již kardioprotektivní účinek nedostavil, ani po použití CAPTOPRILU (inhibitor ACE) se odolnost starých SHR nezvýšila, pozitivní účinek měl jen na staré jedince WKY [44].

#### *7.1.1. Tolerance ischemie u neonatálních potkanů*

Problematikou tolerance neonatálního myokardu k ischemii se zatím nezabývalo mnoho studií. Nicméně studie provedená Z. Charvátovou a kol. přišla s velmi překvapivým výsledkem v porovnání s výzkumy na dospělých jedincích. Izolovaná srdce jedno- a desetidenních potkanů kmene SHR byla k ischemii více odolná než izolovaná srdce stejně starých normotenzních kontrol kmene WKY. Což je situace opačná než u dospělých jedinců, kde jsou potkani kmene SHR méně odolní ischemicko-reperfúznímu poškození.

Ze srdcí zkoumaných jedinců byly také izolovány mitochondrie, u kterých byla prokázána mnohem nižší citlivost k iontům  $Ca^{2+}$ . Což poukazuje na vývojové změny mitochondrií v srdci, jakožto organel zodpovědných za energetickou produkci a zacházení s vápníkem. Skrze mPTP je také ovlivněna tolerance myokardu k nedostatku kyslíku [45].

## **7.2. Vliv pohlaví na projevy ICHS**

Skupina kolem Bešíka, zmíněna již výše v textu, se dále zaměřila i na porovnání ischemické tolerance mezi pohlavími potkanů kmene SHR a WKY. Z výsledků studie vyplývá, že více postiženou skupinou byla SHR, jelikož vlivem hypertenze jsou srdce zvířat ovlivněna hypertrofií a tudíž i méně odolná I-R poškození. Mezi srdci záleželo na pohlaví. Prokázalo se, že srdce dospělých samic potkanů kmene SHR jsou odolnější než srdce samců. Stejně výsledky, i když v menší míře vykazovala i pozorování u zdravých WKY kontrol, tedy, že srdce samic byly odolnější než srdce samců [43]. Jelikož se ve většině pokusů používají

pouze samci, může se naskytnout otázka, zda by použití samic ovlivnilo výsledky experimentů.

### 7.3. Vliv blokátorů angiotensinu II na ischemii

V práci W. Linze et al. byla provedena studie na účinky inhibitoru receptoru AT 1 angiotensinu II – FONSARTANu, dlouhodobě podávaném mladým jedincům SHR-SP. Podávání inhibitoru mělo pozitivní efekt na LVH [19]. Toto zjištění se shoduje s výsledky studie provedené Yen Mei Leem na SHR potkanech, ve které byl podáván mimo FONSARTANu i LOSARTAN, a to před navozením ischemie v různých dávkách. Zajímavé bylo, že efekt byl patrný spíše při podávání nižších dávek. Při zvýšení dávky již zlepšení kardioprotektivních účinků nebylo pozorováno. LOSARTAN signifikantně snížil jak TK, tak i výskyt a délku trvání ventrikulárních fibrilací. Podání LOSARTANu v jakékoliv dávce snížilo u SHR rozsah poškození infarktem myokardu [46].

M. Hropot et al., pak ve své práci také použil k FONSARTAN i LOSARTAN. Pokus byl proveden na potkanech, kteří měli dlouhodobou inhibici NO navozenou uměle farmaceuticky N<sup>6</sup>-nitro-L-argininem-metyl-esterem (L-NAME). Tato inhibice u nich měla za následek zřetelné zvýšení TK a způsobila hypertenzi. Obě tyto látky měly pozitivní vliv na kardio-dynamické, kardio-metabolické a morfologické změny způsobené hypertenzí u L-NAME potkanů [18].

Při kardioprotekci se uplatňují i inhibitory AT 2, jako je specifický inhibitor PD 123, 319 (PD). Inhibitory AT 2 ovlivňují IP3R a PKCε signalizaci a mohou ovlivňovat i signalizaci závislou na NO. Je dokázáno, že kardioprotekční účinek inhibitorů AT 2 souvisí právě s těmito signalizacemi.

Ještě pro úplnost přehledu inhibitorů, spojených s AT II, uvádím inhibitory ACE, jako je například RAMIPRIL, jehož hlavním efektem je zvýšení aktivity NO syntázy (eNOS). Tudiž i zvýšení NO, který je důležitým faktorem pro udržení stálého normálního zdravého TK a má pozitivní vliv na snižování LVH [20].

Mechanismy jednotlivých inhibitorů spojených s hypertenzí, nejsou zatím zcela objasněny a v této problematice probíhá intenzivní výzkum.

#### **7.4. Vliv podání erythropoetinu na rozsah infarktu**

Komorová hypertrofie spojená s hypertenzí představuje mechanický stres myokardu, který ovlivňuje signalizaci v buňce. Modifikuje signální dráhu vedoucí k otevření mPTP, což zapříčiní následnou nekrózu buňky.

Podávání EPO před ischemií indukuje fosforylaci GSK-3 $\beta$ , jak u normotenzních WKY tak i u hypertenzních SHR-SP. U WKY navíc EPO zvýšilo interakci mezi nãfosforylovaným GSK-3 $\beta$  a ANT. ANT je regulační podjednotka mPTP, hraje důležitou roli ve stanovení prahu pro otevření tohoto mitochondriálního póru. Tudíž tato interakce vedla ke snížení rozsahu infarktu.

Tento efekt EPO, se však nedostavil u jedinců kmene SHR-SP. Přestože fosforylace GSK-3 $\beta$  proběhla stejně jako u WKY, nicméně se nezvýšila interakce GSK-3 $\beta$  s ANT. Což může mít dvě různá vysvětlení, a to defekty v translokaci GSK-3 $\beta$  do mitochondrií, nebo následnou defosforylaci GSK-3 $\beta$ , způsobenou ROS při reperfuzi. Na rozdíl od EPO, IPC může snížit úroveň oxidace mitochondriálních proteinů tedy i modifikovat prãh pro otevření mPTP a následně snížit rozsah infarktu u kmene SHR [47].

#### **7.5. Vliv stresu na I/R poškození**

Chronický sociální stres vyvolaný chovem pěti potkanů v kleci určené pro dva jedince a následný akutní stres vyvolaný cykly I-R vedl k větším ultrastrukturním změnám na myokardu normotenzních potkanů kmene WKY než u SHR chovaných ve stejných podmínkách. U kmene SHR byla ultrastruktura myokardu v porovnání s kontrolami (SHR bez sociálního stresu) takřka nezměněna. Celkově chronický sociální stres zvýšil odolnost k I-R poškození u kmene SHR, v čemž může hrát roli zvýšená aktivita srdeční NOS, tudíž i limitovaná produkce reaktivních sloučenin dusíku. U WKY nebyla změna aktivity NOS pozorována. U normotenzních potkanů kmene WKY chronický sociální stres také způsobil zhoršenou perfuzi myokardu. SHR kmen tedy lépe toleroval oxidativní stres a byl již přizpůsoben chronickému nedostatku O $_2$ . [48]

Chronický sociální stres nicméně také představuje vyšší riziko letálních arytmií. Psychosociální stres vyvolaný *residence-intruder* testem také potvrdili zvýšenou náchylnost k arytmiím. Nejvyšší riziko vykazovaly tři testované skupiny a to: starší jedinci (22-24 měsíců) kmene Wistar, jedinci kmene SHR a jedinci kmene Wistar se značně omezeným průtokem krve aortou.[49]

### **7.6. Helium a jeho kardioprotektivní účinky**

Zajímavý nedávný výzkum (výsledky publikovány v roce 2012) provedla laboratoř pod vedením Oeie. V experimentech bylo podáno (inhalací) helium ve všech zatím známých schématech kardioprotektivních fenoménů, tzn. jak v klasickém IPC, tak i v druhém okně protekce a IPostC.

Jako podstata kardioprotektivních účinků helia se předpokládala jeho provázanost s funkcí (fosforylací) glykogen syntázové kinázy  $\beta$  (GSK  $\beta$ ), která, společně s PKC $\epsilon$ , je kardioprotektivní. Tato provázanost účinku helia a GSK  $\beta$  byla prokázána podáním blokátoru (SB 216763) GSK  $\beta$  při IPC, po němž se nedostavil pozitivní účinek helia.

Studie byla prováděna na mladých jedincích kmene SHR a WKY . Bylo zjištěno, že nejvíce účinné na obranu myokardu potkanů kmene SHR před I-R poškozením, bylo trojitě podání helia v IPC a to v kombinaci IPC (klasického), druhého okna protekce a IPostC, kde helium signifikantně pozitivně ovlivnilo velikost plochy srdce zasažené infarktem- *infarct size*. Jiné kombinace IPC, nebo pouze IPostC, nebyly účinné na jedince kmene SHR. Oproti nim jedinci kmene WKY, vykazovali pozitivní účinek nejen na kombinaci IPC a ale i na podání helia v IPostC [50].

Toto zjištění je ještě relativně nové a jistě proběhnou v budoucnu i další studie zaměřené na účinky helia na ischemizovaná srdce hypertenzních zvířat.

### **7.7. Laboratorní studie provedené na transgenních potkanech**

Studií prodevených na transgenních potkanech (TGR) zatím není mnoho. Výhodou transgenních potkanů je fakt, že přesně víme, co způsobuje Ang II dependentní hypertenzi. Tím bývá gen mREN-2 získaný z myšího genomu a implikovaný (vnesený) do genomu potkanů. Jednou z prvních studií zaměřenou



na TGR byla práce M. Randla, kdy podrobil izolovaná srdce TGR a kontrolních normotenzních potkanů kmene SD preconditioningu a zkoumal jeho průběh a signalizaci. Výsledky této studie jasně prokázaly, že IPC je účinnější u TGR potkanů než u jejich normotenzních kontrol SD. Izolovaná srdce, na která nebyl použit IPC, vykazovala stejné výsledky zotavení po ischemii bez rozdílu, zda byla srdce TGR či SD [17].

Další studie, která také prokázala lepší zotavování TGR srdcí po ischemii byla skupinou kolem J. Neckáře. Ve studii se snažili dokázat kardioprotektivní účinek c-AUBC, což je inhibitor sEH (epoxid oxidázy), která ovlivňuje biologickou přeměnu EETs na biologicky neaktivní DHETEs. EETs je arachidonová kyselina jedna z CYP dependentních metabolitů (cytochrom P40). Výrazně ovlivňuje regulaci vaskulárního tonu a homeostázu vnějšího prostředí buňky. Při snížení dostupnosti biologicky aktivní EETs, vzrůstá její přeměna na DHETEs, což jednoznačně vede ke vzniku patologickofyzilogických příčin hypertenze u TGR.

Předchozí studie již prokázali kardioprotektivní účinky EETs na mnohých modelech I-R poškození [51].

TGR potkanům trpícím monogenní Ang II dependentní hypertenzí, byl podán inhibitor sEH (c-AUCB), což mělo za následek signifikantní snížení TK u TGR. Dále mělo podání c-AUBC pozitivní vliv na zvýšení poměru mezi EETs a DHETEs, více patrné u TGR než u SD. EETs má antihypertenzní účinky, kvůli tomu, že brání zpětné resorpci sodíku v proximálním tubulu ledviny pomocí NHE. Vyvolává vasodilataci a působí jako antagonist Ang II (který působí vasokonstrikčně) [52].

Toto zjištění poukazuje na překvapivé a zásadní zjištění, že srdce TGR jsou odolnější vůči I-R poškození v porovnání s jejich normotenzními kontrolami SD. Do nedávné doby se předpokládalo, že srdce hypertenzních jedinců jsou méně odolná než srdce zdravých kontrol.

Posledním zjištěním bylo, že c-AUCB snižuje oblast poškození myokardu infarktem, což souvisí s kardioprotektivními účinky biologicky aktivní EETs. Účinek byl prokázán pouze u jedinců TGR, ne u kontrol SD [53].

### **7.8. Vliv pohybu (cvičení) hypertenzních zvířat na projevy ICHS**

Laboratorní studie provedené skupinou kolem Noakese tvrdí, že trénink (pravidelný pohyb) zvyšuje arytmetizační práh VAT (*ventricold arrhythmic treshold*) během okluze koronární tepny u izolovaných hypertenzních srdcí SHR. Cvičení také zvyšuje toleranci myokardu k ischemii u anestetizovaných zvířat [54].

Heidi L. Colins porovnal sedavé typy hypertenzních potkanů kmene SHR, sedavé typy normotenzních potkanů kmene WKY a potkanů kmene SHR denně trénujících. Prokázal, že sedavé formy ať SHR či WKY mají značný pokles VAT, což ukazuje na kardioprotektivní účinky tréninku [55].

## 8. Závěr

Hypertenze je jedním z rizikových faktorů ICHS. Provázanost a mechanismy působení hypertenze na myokard v ischemii (na I-R poškození) nejsou zatím plně popsány a pochopeny. Proto je v tomto ohledu na fyziologický a patologický vliv hypertenze na myokard a potlačení jeho účinku, především vzniku LVH, vyvíjeno velké úsilí z řad odborných laboratoří.

Podáním některých antihypertenziv, v klinické i experimentální praxi, má vliv nejen na průběh a snížení důsledků hypertenze, ale i na kardioprotekci myokardu vůči případné ischemii.

Remodelace myokardu vlivem hypertenze jako je např. LVH, vede ke změnám správné funkce myokardu, dochází ke vzniku arytmií, které mohou vést až k srdečnímu selhání.

Všechny výše zmíněné body představují stále větší riziko pro obyvatele dnešního světa. Kardiovaskulárních choroby mají na svědomí 49 % celkových úmrtí v ČR (údaje platné pro rok 2012), a tento podíl se bude neustále zvyšovat.

Úkolem dalších výzkumů bude objasnění mechanismů vzniku primárních (esenciálních) hypertenzí, provázanost hypertenze s ICHS, popsání mechanismů inhibice RAS a syntéza nových účinnějších léčiv na potlačení a léčbu jak ICHS, tak i hypertenze.

## Seznam použité literatury

1. Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB: **The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection.** *J Mol Cell Cardiol* 1993, **25**(7):759-800.
2. Ostadal B: **The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection.** *Pharmacol Rep* 2009, **61**(1):3-12.
3. Hearse DJ: **Myocardial protection during ischemia and reperfusion.** *Mol Cell Biochem* 1998, **186**(1-2):177-184.
4. Nečas E: **Obecná patologická fyziologie**, 2 edn: Karolinum; 2006.
5. Aschermann M: **Kardiologie**: Galén; 2004.
6. Ošťádal BK, F: **Cardiac ischemia: from injury to protection**, 1 edn: Boston: Kluwer Academic; 1999.
7. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF: **Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning.** *Pharmacol Rev* 2007, **59**(4):418-458.
8. Buja LM: **Myocardial ischemia and reperfusion injury.** *Cardiovasc Pathol* 2005, **14**(4):170-175.
9. Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, Lukas A, Chapman D, Dhalla NS: **Ischemia-reperfusion alters gene expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase isoforms in rat heart.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **306**(2):457-462.
10. Reed JC: **Mechanisms of apoptosis.** *Am J Pathol* 2000, **157**(5):1415-1430.
11. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM: **Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury.** *Mol Cell Biochem* 1997, **174**(1-2):167-172.
12. Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B: **Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death.** *J Bioenerg Biomembr* 1999, **31**(4):305-319.
13. Buja LM, Weerasinghe P: **Unresolved issues in myocardial reperfusion injury.** *Cardiovasc Pathol* 2010, **19**(1):29-35.
14. Ferdinandy P, Szilvassy Z, Baxter GF: **Adaptation to myocardial stress in disease states: is preconditioning a healthy heart phenomenon?** *Trends Pharmacol Sci* 1998, **19**(6):223-229.
15. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986, **74**(5):1124-1136.
16. Rubino A, Yellon DM: **Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart?** *Trends Pharmacol Sci* 2000, **21**(6):225-230.
17. Randall MD, Gardiner SM, Bennett T: **Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic ((mREN-2) 27) hypertensive rat.** *Cardiovasc Res* 1997, **33**(2):400-409.

18. Hropot M, Langer KH, Wiemer G, Grotsch H, Linz W: **Angiotensin II subtype AT1 receptor blockade prevents hypertension and renal insufficiency induced by chronic NO-synthase inhibition in rats.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003, **367**(3):312-317.
19. Linz W, Heitsch H, Scholkens BA, Wiemer G: **Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade with fonsartan doubles lifespan of hypertensive rats.** *Hypertension* 2000, **35**(4):908-913.
20. Linz W, Wohlfart P, Schoelkens BA, Becker RH, Malinski T, Wiemer G: **Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1999, **34**(2):291-295.
21. Penna C, Tullio F, Moro F, Folino A, Merlino A, Pagliaro P: **Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats.** *Basic Res Cardiol* 2010, **105**(2):181-192.
22. Boutros A, Wang J: **Ischemic preconditioning, adenosine and bethanechol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts.** *J Pharmacol Exp Ther* 1995, **275**(3):1148-1156.
23. Tang Y, Wang M, Chen C, Le X, Sun S, Yin Y: **Cardiovascular protection with danshensu in spontaneously hypertensive rats.** *Biol Pharm Bull* 2011, **34**(10):1596-1601.
24. Gross ER, Gross GJ: **Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning.** *Cardiovasc Res* 2006, **70**(2):212-221.
25. Lochner A, Marais E, Genade S, Huisamen B, du Toit EF, Moolman JA: **Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning.** *Cardiovasc J Afr* 2009, **20**(1):43-51.
26. Aguilera-Aguirre L, Gonzalez-Hernandez JC, Perez-Vazquez V, Ramirez J, Clemente-Guerrero M, Villalobos-Molina R, Saavedra-Molina A: **Role of intramitochondrial nitric oxide in rat heart and kidney during hypertension.** *Mitochondrion* 2002, **1**(5):413-423.
27. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: **Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, **285**(2):H579-588.
28. Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, Schaub MC, Zaugg M: **Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway.** *Cardiovasc Res* 2006, **72**(1):152-162.
29. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J: **Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion.** *Cardiovasc Res* 2004, **62**(1):74-85.
30. Fantinelli JC, Mosca SM: **Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR).** *Mol Cell Biochem* 2007, **296**(1-2):45-51.
31. Ganong WF: **Přehled lékařské fyziologie**, 20 edn: Galen; 2005.

32. Prisant LM: **Hypertensive heart disease.** *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2005, **7(4):**231-238.
33. Bader M: **Rat models of cardiovascular diseases.** *Methods Mol Biol* 2010, **597:**403-414.
34. Zaugg CE, Wu ST, Lee RJ, Wikman-Coffelt J, Parmley WW: **Intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and vulnerability to ventricular fibrillation in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1997, **30(3 Pt 1):**461-467.
35. McVeigh GE, Flack J, Grimm R: **Goals of antihypertensive therapy.** *Drugs* 1995, **49(2):**161-175.
36. Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS: **Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis.** *JAMA* 2003, **289(19):**2534-2544.
37. Straughan JL: **Beta-blockers in 2007?** *Cardiovasc J Afr* 2007, **18(2):**90-92.
38. Souček M: **Klinická patofyziologie hypertenze**, 1 edn: Grada; 2002.
39. Hynie S: **Farmakologie v kostce**; 2001.
40. Wile D: **Diuretics: a review.** *Ann Clin Biochem* 2012, **49(Pt 5):**419-431.
41. Kolar FPJR: **Antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning in hearts of spontaneously hypertensive rats.** *Experimental Cardiology* 1997, **2(2):**124-127.
42. Dai W, Simkhovich BZ, Kloner RA: **Ischemic preconditioning maintains cardioprotection in aging normotensive and spontaneously hypertensive rats.** *Exp Gerontol* 2009, **44(5):**344-349.
43. Besik J, Szarszoi O, Kunes J, Netuka I, Maly J, Kolar F, Pirk J, Ostadal B: **Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats.** *Physiol Res* 2007, **56(3):**267-274.
44. Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF: **Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: independent effects of aging and longstanding hypertension.** *Exp Gerontol* 2007, **42(8):**807-814.
45. Charvatova Z, Ost'adalova I, Zicha J, Kunes J, Maxova H, Ost'adal B: **Cardiac tolerance to ischemia in neonatal spontaneously hypertensive rats.** *Physiol Res* 2012, **61 Suppl 1:**S145-153.
46. Lee YM, Peng YY, Ding YA, Yen MH: **Losartan attenuates myocardial ischemia-induced ventricular arrhythmias and reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats.** *Am J Hypertens* 1997, **10(8):**852-858.
47. 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* 2011, **57(1):**110-115.
48. Ravingerova T, Bernatova I, Matejikova J, Ledvenyiova V, Nemcekova M, Pechanova O, Tribulova N, Slezak J: **Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress.** *Exp Clin Cardiol* 2011, **16(3):**e23-29.

49. Stilli D, Berni R, Sgoifo A, Costoli T, Bocchi L, Cacciani F, Manghi M, Olivetti G, Musso E: **Social stress, myocardial damage and arrhythmias in rats with cardiac hypertrophy.** *Physiol Behav* 2001, **73**(3):351-358.
50. Oei GT, Huhn R, Heinen A, Hollmann MW, Schlack WS, Preckel B, Weber NC: **Helium-induced cardioprotection of healthy and hypertensive rat myocardium in vivo.** *Eur J Pharmacol* 2012, **684**(1-3):125-131.
51. Nithipatikom K, Gross GJ: **Review article: epoxyeicosatrienoic acids: novel mediators of cardioprotection.** *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2010, **15**(2):112-119.
52. Imig JD: **Targeting epoxides for organ damage in hypertension.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2010, **56**(4):329-335.
53. Neckar J, Kopkan L, Huskova Z, Kolar F, Papousek F, Kramer HJ, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Maly J *et al*: **Inhibition of soluble epoxide hydrolase by cis-4-[4-(3-adamantan-1-ylureido)cyclohexyl-oxy]benzoic acid exhibits antihypertensive and cardioprotective actions in transgenic rats with angiotensin II-dependent hypertension.** *Clin Sci (Lond)* 2012, **122**(11):513-525.
54. Noakes TD, Higginson L, Opie LH: **Physical training increases ventricular fibrillation thresholds of isolated rat hearts during normoxia, hypoxia and regional ischemia.** *Circulation* 1983, **67**(1):24-30.
55. Collins HL, Loka AM, Dicarlo SE: **Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, **288**(2):H532-540.