

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physiology**

**Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis**



**Odolnost myokardu k ischemicko/reperfuznímu poškození - možné ochranné
mechanizmy**

**Myocardial tolerance to ischemia/reperfusion injury - possible protective
mechanisms**

Mgr. Petra Alánová

Supervisor: RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

Praha, 2015

CONTENTS/ OBSAH

LIST OF ABBREVIATIONS/SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
ABSTRACT	4
ABSTRAKT	5

ENGLISH PART

1. INTRODUCTION	6
2. AIMS OF THE STUDY	6
3. MATERIAL AND METHODS	7
4. RESULTS AND DISCUSSION	7
4.1. <i>The role of NO/cGMP in the cardioprotective effect of chronic hypoxia</i> (Publication A).....	7
4.2. <i>The role of TNF-α in the cardioprotective effect of chronic hypoxia (Publication B)..</i>	8
4.3. <i>The effect of dexrazoxane on ischemia/reperfusion injury (Publication C)</i>	10
4.4. <i>The effect of epoxyeicosatrienoic acid analog on ischemia/reperfusion injury</i> (Publication D)	12
5. CONCLUSIONS	15

ČESKÁ ČÁST

1. ÚVOD	16
2. CÍLE PRÁCE	16
3. MATERIÁL A METODIKA	17
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	17
4.1. <i>Úloha NO/cGMP v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie (Publikace A)</i>	17
4.2. <i>Úloha TNF-α v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie (Publikace B)</i>	18
4.3. <i>Účinek dexrazoxanu na ischemicko/reperfuzní poškození (Publikace C)</i>	20
4.4. <i>Účinek analogu epoxyeikosatrienových kyselin na ischemicko/reperfuzní poškození</i> (Publikace D)	22
5. ZÁVĚRY	24
REFERENCES/POUŽITÁ LITERATURA	25
CURRICULUM VITAE	27
SELECTED PUBLICATIONS/SEZNAM PUBLIKACÍ	28

LIST OF ABBREVIATIONS/SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2K1C	two-kidney, one-clip/dvě-ledviny, jeden-klip
cGMP	3,5-cyclic guanosine monophosphate/3,5-cyklický guanosin monofosfát
CH	chronic hypoxia/chronická hypoxie
DEX	dexrazoxane/dexrazoxan
EET-A	epoxyeicosatrienoic acids analog/analog epoxyeikosatrienových kyselin
EETs	epoxyeicosatrienoic acids/epoxyeikosatrienové kyseliny
GSH	reduced glutathione/redukovaná forma glutationu
GSSG	oxidized glutathione/oxidovaná forma glutationu
I/R	ischemia/reperfusion/ischemicko/reperfuzní
MDA	malondialdehyde/malondialdehyd
NO	nitric oxide/oxid dusnatý
PVCs	premature ventricular complexes/předčasné komorové stahy
ROS	reactive oxygen species/reaktivní formy kyslíku
SEM	standard error of the mean/střední chyba průměru
TNF- α	tumor necrosis factor alpha/tumor-nekrotizující faktor alfa
TNFR1	tumor necrosis factor alpha receptor R1/ tumor-nekrotizující faktor alfa receptor R1
TNFR2	tumor necrosis factor alpha receptor R2/ tumor-nekrotizující faktor alfa receptor R2

ABSTRACT

Ischemic heart disease is the leading cause of death and disability worldwide. The effects of ischemic heart disease are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. The aim of the thesis was to contribute to current effort to clarify the basis of mechanisms that could save the heart from I/R injury.

The whole thesis is based on four studies; while the first three are published, the fourth one has been under revision. In the first study, we proved the involvement of nitric oxide (NO) in the cardioprotective mechanism of chronic hypoxia (CH). We described that exogenously increased availability of NO as well as inhibition of phosphodiesterase type 5 led to increased myocardial tolerance of normoxic and chronically hypoxic rats. The effects of both interventions were not additive, suggesting that NO is included in cardioprotective signaling of CH. Second study continued in investigating molecular mechanisms underlying cardioprotection induced by CH. We showed that infarct size-limiting effect of adaptation to CH was accompanied by increased myocardial concentration of tumor-necrosis factor alpha (TNF- α) and TNF- α receptor R2. In the third study, we examined the effect of dexrazoxane (DEX), the only clinically approved drug against anthracycline-induced cardiotoxicity, on I/R injury. We found a narrow dose range that could suppress ischemic and reperfusion arrhythmias in isolated perfused hearts, while only the highest dose of DEX reduced infarct size in open-chest rats. Surprisingly, DEX-mediated cardioprotection was not associated with the decrease in oxidative stress, which had been believed as a major cause of anthracycline-induced cardiotoxicity as well as I/R injury. In the last study, epoxyeicosatrienoic acid analog exhibited neither cardioprotective nor blood pressure-lowering effect in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats, a model resembling human renovascular hypertension. Unexpectedly, we found an infarct size-limiting effect in untreated hypertensive rats.

In conclusion, this thesis provided new findings in the field of experimental cardiology. We examined components of molecular signaling pathways leading to cardioprotection provided by CH and described the effects of exogenous drugs with possible beneficial impact on the ischemic myocardium. All these findings could be useful for development of new strategies for protecting the heart against acute I/R injury.

ABSTRAKT

Ischemická choroba srdeční představuje hlavní příčinu mortality v České republice a v dalších ekonomicky vyspělých zemích světa. Účinky ischemické choroby srdeční bývají připisovány patologickým změnám vyvolaným její akutní formou, infarktem myokardu. Tato disertační práce se pokusila přispět k celosvětové snaze o hlubší porozumění mechanismů, které by dokázaly ochránit srdce před důsledky ischemicko/reperfuzního (I/R) poškození.

Disertační práce je založena na čtyřech publikacích - zatímco první tři jsou přijaté do tisku, čtvrtá se nachází v recenzním řízení. V první studii jsme prokázali úlohu oxidu dusnatého (NO) v mechanismu účinku chronické hypoxie (CH). Zjistili jsme, že exogenně zvýšená dostupnost NO stejně jako inhibice fosfodiesterázy typu 5 vede ke zvýšené ischemické toleranci srdcí normoxických i chronicky hypoxických potkanů. Účinky obou zásahů nebyly aditivní, což napovídá o zapojení signalizace spojené s NO v kardioprotektivním účinku CH. Druhá studie pokračovala ve studiu molekulárních mechanismů spojených s kardioprotekcí vyvolanou CH. Ukázali jsme, že protektivní efekt CH na velikost infarktu je spojen se zvýšenou koncentrací tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a TNF- α receptoru R2. Ve třetí studii jsme sledovali účinek dexrazoxanu (DEX), dosud jediného klinicky schváleného léku k prevenci poškození myokardu vyvolaného chronickým podáváním antracyklinů, na I/R poškození. Ukázali jsme úzkou škálu dávek, které byly schopné potlačit ischemické a reperfuzní arytmie na modelu izolovaného perfundovaného srdce. Na druhou stranu pouze nejvyšší dávka snížila velikost infarktu na modelu I/R poškození srdce *in situ*. Kardioprotekce vyvolaná DEX nebyla spojena se sníženým oxidačním stresem, který byl považován za hlavní příčinu kardiotoxicity vyvolané působením antracyklinů a I/R poškození. Ve čtvrté studii jsme neprokázali vliv analogu epoxyeikosatrienových kyselin na krevní tlak ani velikost infarktu u potkanů s Goldblattovskou hypertenzí - modelu lidské renovaskulární hypertenze. Hypertenzní potkani však neočekávaně prokázali menší velikost infarktu.

Závěrem lze říci, že jsme prostudovali komponenty molekulární signalizace vedoucí ke kardioprotekci vyvolané CH. Dále jsme popsali účinky exogenních látek s potenciálním prospěšným dopadem na ischemický myokard. Všechny tyto nálezy mohou být užitečné při vývoji nových terapeutických strategií, které by dokázaly ochránit srdce před důsledky akutního I/R poškozením.

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization, ischemic heart disease is the leading cause of death and disability worldwide. The effects of ischemic heart disease are usually attributable to the detrimental effects of acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. During ischemia, an imbalance between oxygen demand and supply occurs, resulting in damage of the cardiac tissue. Early and fast restoration of blood supply seems to be essential for the salvage of ischemic myocardium. However, it has been observed that reperfusion of the ischemic myocardium can also induce injury. During the crucial moments of reperfusion, significant reversible and irreversible organ damage is initiated, and is referred to as I/R injury. It is, therefore, understandable that clinical and experimental cardiologists would like to understand the underlying molecular mechanism of myocardial I/R injury to find therapeutic strategies ultimately reducing the final extent of damage.

The extent of ischemic injury depends not only on the intensity and duration of ischemic insult, but also on the degree of myocardial tolerance to oxygen deprivation. The effective cardioprotective phenomena such as adaptation to chronic hypoxia (CH) and different types of conditioning are useful for finding novel signal transduction complexes of cardioprotection and understanding the underlying intracellular mechanisms. Cardioprotective strategies are therefore highly desirable. With the exception of early reperfusion, none has been translated into clinical practice, although a limited number appear to be quite promising in initial clinical studies.

This thesis tried to contribute to the clarification of possible mechanisms which could defend the heart against I/R injury. From possible cardioprotective interventions, we chose three - adaptation to CH, acute dexrazoxane (DEX) pretreatment before the ischemic insult and chronic treatment with epoxyeicosatrienoic acids analog (EET-A).

2. AIMS OF THE STUDY

The specific aims of the thesis were:

- 1.) To investigate the role of signaling pathways including nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in the cardioprotective mechanism of CH.
- 2.) To find out whether DEX can reduce myocardial I/R injury in rats.
- 3.) To evaluate the effects of EET-A on myocardial infarct size in 2-kidney, 1-clip (2K1C) Goldblatt hypertensive rats.

3. MATERIAL AND METHODS

Model of continuous normobaric hypoxia

Adult male Wistar rats (250 - 300 g body weight) were adapted to continuous normobaric hypoxia (inspired O₂ fraction 0.1) in a normobaric chamber for 3 - 4 weeks. No reoxygenation occurred during this period. The control rats were kept for the same period of time at room air.

Model of 2K1C Goldblatt hypertension

Male Hannover Sprague-Dawley rats (100 - 120 g body weight) were anesthetized. The right renal artery was isolated through a flank incision, while a silver clip was placed on the renal artery. Sham-operated rats underwent the same surgical procedure except placing the arterial clip.

The methods, performed completely or at least partly by the author consisted of following procedures:

- Infarct size and ventricular arrhythmias determination in open-chest rats
- Ventricular arrhythmias determination in isolated perfused hearts
- Analysis of oxidized and reduced glutathione
- Analysis of malondialdehyde
- Electrophoresis and western blot analysis
- Analysis of nitrite and nitrate

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. The role of NO/cGMP in the cardioprotective effect of chronic hypoxia (Publication A)

Normoxic and chronically hypoxic male Wistar rats were treated acutely with NO donor molsidomine (10 mg/kg) or phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil (0.7 mg/kg). We confirmed that adaptation to CH improves cardiac ischemic tolerance (Asemu et al., 2000; Neckář et al., 2004; Wang et al., 2011; Maslov et al., 2014). Acute administration of molsidomine or sildenafil decreased infarct size in both normoxic and chronically hypoxic rats. We showed more profound infarct size-lowering effect in rats adapted to CH without an additive result of CH and drugs administration. Therefore, we assume that NO/cGMP signaling pathway is included in the acute phase of cardioprotection induced by CH.

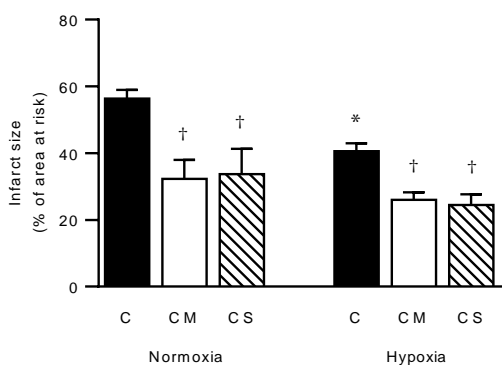


Figure 1 Myocardial infarct size expressed as the percentage of area at risk in normoxic and chronically hypoxic rats untreated (C) or treated acutely with molsidomine (CM) or sildenafil (CS). Data are expressed as mean±SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding normoxic group, † $P < 0.05$ vs. corresponding untreated group.

In the second part of the project (not published yet), normoxic and chronically hypoxic rats were treated chronically with sildenafil (1.5 mg/kg/day). Sildenafil treatment started 3 days before the hypoxic exposure and lasted during the whole adaptation period. The second major result was that chronically increased availability of cGMP reduced myocardial infarction in normoxic rats and potentiated cardioprotective effect of CH. Therefore, it seems that signaling via cGMP does not play a key role in the induction of cardioprotection induced by CH.

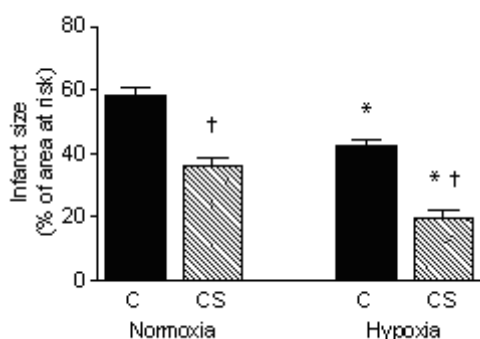


Figure 2 Myocardial infarct size expressed as the percentage of area at risk in normoxic and chronically hypoxic rats untreated (C) or treated chronically with sildenafil (CS). Data are expressed as mean±SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding normoxic group, † $P < 0.05$ vs. corresponding untreated group.

4.2. The role of TNF- α in the cardioprotective effect of chronic hypoxia (Publication B)

The aim of this study was to characterize the role of TNF- α in myocardium of rats adapted to CH untreated or treated with a monoclonal antibody against TNF- α infliximab (5 mg/kg/week) during the whole adaptation to CH. Adaptation to CH improved cardiac ischemic tolerance; this effect was weakened by administration of infliximab.

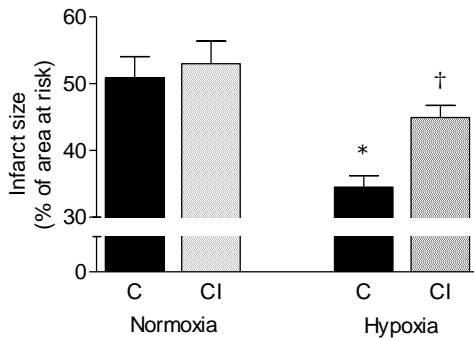


Figure 3 Myocardial infarct size expressed as the percentage of area at risk in normoxic and chronically hypoxic rats untreated (C) or treated with infliximab (CI). Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding normoxic group, † $P < 0.05$ vs. corresponding untreated group.

In our experiments, adaptation to CH was accompanied by the increased myocardial concentration of TNF- α and TNF- α receptor R2 (TNFR2). This finding is in agreement with the increased expression of TNF- α and proinflammatory genes observed in hearts of chronically hypoxic adult rats and fetal guinea pigs (Chen et al., 2007; Klusoňová et al., 2009). TNF- α is generated as a precursor called transmembrane TNF- α , which is cleaved to the secreted form of TNF- α that mediates its action through TNF- α receptor R1 (TNFR1) and TNFR2 (Vandenabeele et al., 1995). The activation of TNF- α receptor-specific response was shown as an important event in cardiac ischemic tolerance. While an excessive TNF- α expression and subsequent TNFR1 activation are deleterious, a lower TNF- α concentration and TNFR2 activation are protective (Flaherty et al., 2008; Lacerda et al., 2009). Our results revealed increased expression of TNFR2 but not TNFR1 in rats adapted to CH. Moreover, chronic treatment with infliximab abolished the increased TNFR2 level and blunted infarct size-limiting effect of CH. These data suggest that CH improved cardiac ischemic tolerance of rat hearts by activation of protective TNFR2 signaling, but had no effect on detrimental signaling mediated by TNFR1. Not only secreted TNF- α but also its transmembrane form exerts biological actions (Horiuchi et al., 2010). Transmembrane TNF- α mediates its biological activities through TNFR2 (Grell et al., 1995) which is the key receptor for beneficial role of TNF- α in cardiac I/R injury. With this background, we analysed the expression of TNF- α in both cytosolic and particulate fractions of LV in normoxic and chronically hypoxic rats. CH increased TNF- α levels equally in both fractions, therefore, we can not decide whether it is transmembrane or secreted form of TNF- α , which contributes to the cardioprotective phenotype of CH.

It has been suggested that reactive oxygen species (ROS) play an important role in the cell survival and death triggered by TNF- α signaling. We found that adaptation to CH increased myocardial oxidative stress and induced overexpression of manganese superoxide dismutase that were both abolished by infliximab treatment. Therefore, it seems that TNF- α

contributes to the improved cardiac ischemic tolerance via activation of protective redox signaling with increased antioxidant defence.

Adaptation to CH was associated also with the increased expression of inducible NO synthase. However, chronic infliximab treatment only slightly reduced its expression in chronically hypoxic rats. On contrary to many studies demonstrating the important role of NO in preconditioning (Andrukhiv et al., 2006) or CH (Shi et al., 2000), this result showed that NO signaling did not play a key role in induction of cardioprotective signaling during adaptation to CH, as was metioned above.

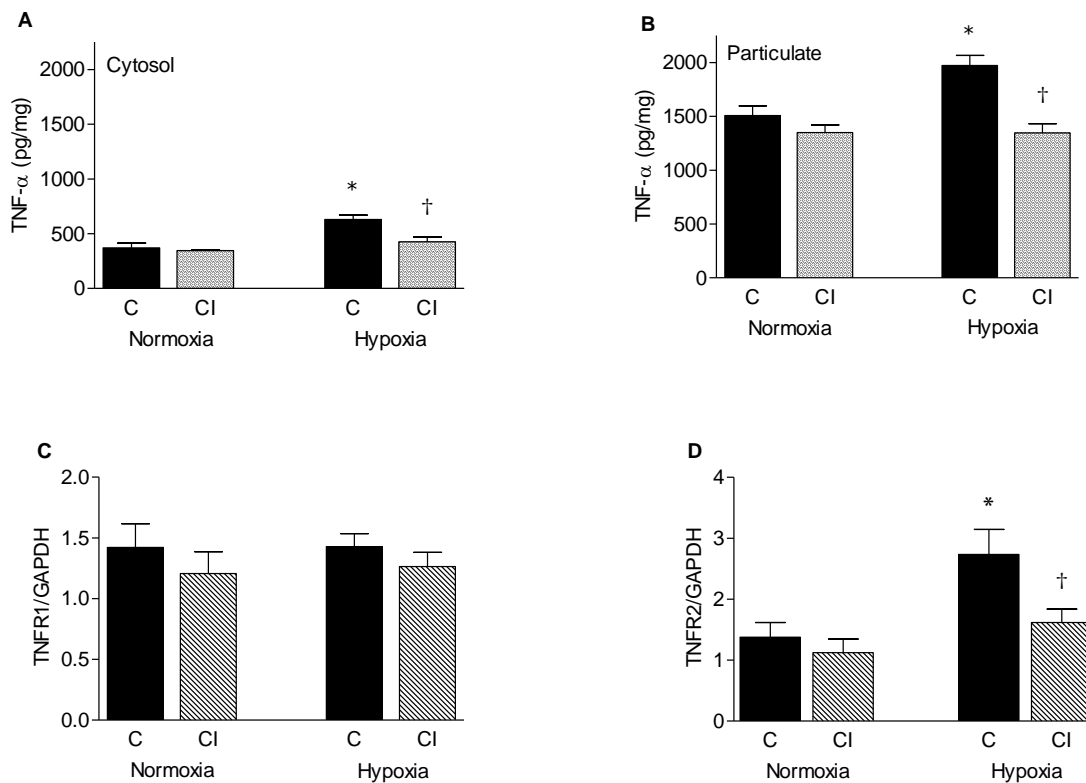


Figure 4 Myocardial levels of TNF- α in cytosolic (A) and particulate (B) fractions of left ventricle and levels of TNF- α receptor R1 (TNFR1; C) and TNF- α receptor R2 (TNFR2; D) in normoxic and chronically hypoxic rats untreated (C) or treated with infliximab (CI). Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding normoxic group, † $P < 0.05$ vs. corresponding untreated group.

4.3. The effect of dexrazoxane on ischemia/reperfusion injury (Publication C)

The aim of the study was to find out whether DEX exhibits cardioprotective effect against I/R injury. DEX was administered in doses of 50, 150 and 450 mg/kg 60 min before the induction of myocardial ischemia. To the best of our knowledge, the infarct size and the susceptibility to ischemia and reperfusion arrhythmias in DEX-treated animals were assessed for the first time. We found that a single dose of 150 mg/kg effectively suppressed ventricular

arrhythmias in isolated perfused hearts, but it was insufficient to reduce arrhythmias in open-chest animals.

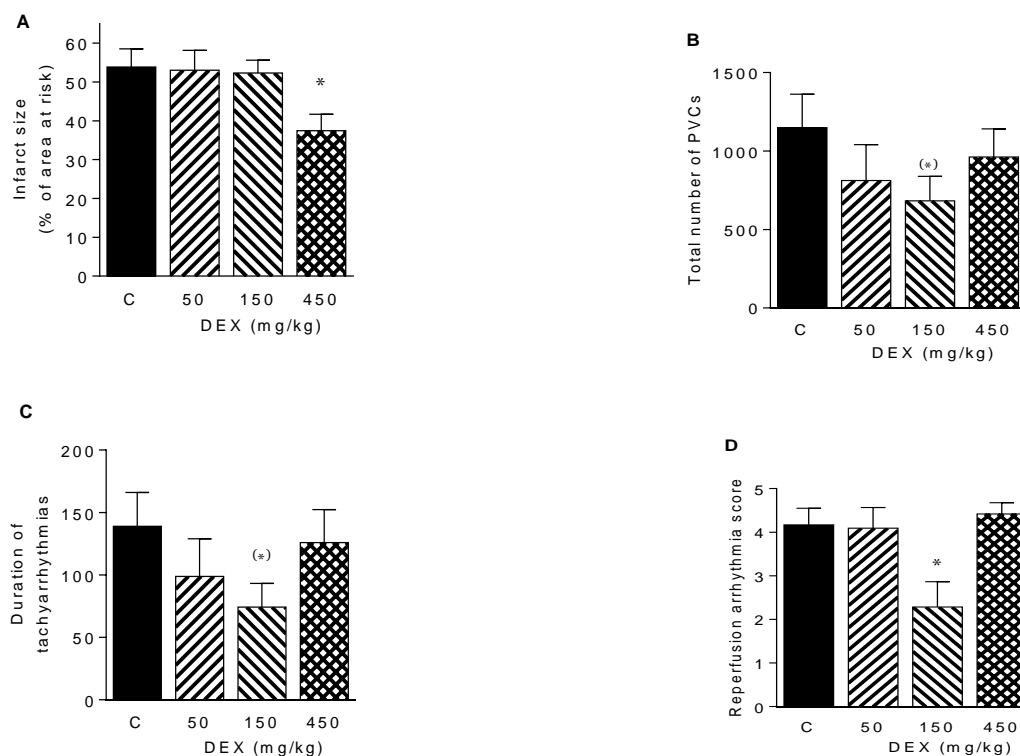


Figure 5 Myocardial infarct size expressed as the percentage of area at risk in open-chest (A), total number of premature ventricular complexes during ischemia (PVCs, B), duration of tachyarrhythmias during ischemia (C), ventricular arrhythmia score during reperfusion (D) of isolated perfused hearts of control (C) and dexrazoxane (DEX)-treated rats. Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. C, (*) $P < 0.1$ vs. C.

The reason for the different effect of DEX on arrhythmias in open-chest rats and in isolated perfused hearts is not clear. Asemu et al. (2000) reported also a distinct effect of CH on susceptibility of rat hearts to ischemia arrhythmogenesis assessed under *in vitro* and *in vivo* conditions. The cause is unknown, but the presence of blood components and neurohumoral control mechanisms in open-chest rat may take part in this discrepancy.

On the other hand, only the highest dose of DEX significantly reduced infarct size in open-chest rats. Our observation of the infarct-size limiting effect of DEX is in line with results of Ramu et al. (2006), who showed improved postischemic recovery of contractile function in isolated perfused rat hearts subjected to global I/R injury after DEX-pretreatment. Hasinoff (2002) detected lower lactate dehydrogenase release from DEX-treated neonatal cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation. Based on current knowledge, both anthracycline-induced cardiotoxicity and I/R injury seem to share the involvement of ROS

with a supposed catalytic role of free iron. Hence, intracellular iron chelation can be considered as a promising approach. In the present study, we determined two different markers of oxidative stress: reduced and oxidized form of glutathione and malondialdehyde. The aim was to test the hypothesis that the protective effects of DEX were associated with the decreased ROS formation during I/R insult.

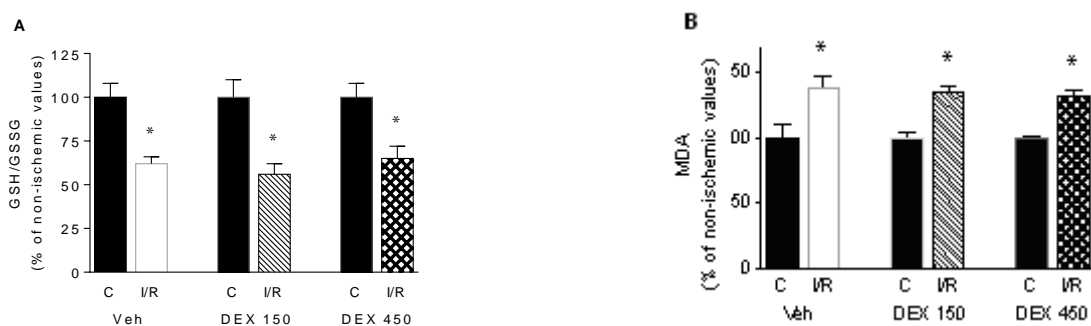


Figure 6 Myocardial reduced to oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG, A) and myocardial concentration of malondialdehyde (MDA, B) in open-chest control (Veh) and dexrazoxane (DEX)-treated rats. Effects of ischemia and reperfusion (I/R) are expressed as a percentage of corresponding non-ischemic (C) values. Data are expressed as mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. C.

However, none of these markers showed any significant effect of DEX treatment, which strongly argues with the above-proposed and generally anticipated mechanism of action. This result was later proved also by Štěrba et al. (2013) who demonstrated that stronger and more selective iron chelators failed to provide better or at least the comparable cardioprotection as DEX in chronic anthracycline cardiotoxicity models. It suggests that other protective mechanism than limitation of ROS formation might play a role.

4.4. The effect of epoxyeicosatrienoic acid analog on ischemia/reperfusion injury (Publication D)

The effects of treatment with EET-A (10 mg/kg/day) on blood pressure and myocardial infarct size were evaluated in 2K1C Goldblatt hypertensive rats. The first major finding of the study was that the size of the myocardial infarction induced by acute I/R insult was significantly smaller in 2K1C Goldblatt hypertensive rats than in sham-operated normotensive controls. This finding contradicts generally accepted view that the hypertrophic myocardium shows decreased tolerance to I/R injury. However, our findings are not exceptional; it has been observed that hypertensive animals with left ventricular hypertrophy exhibit either comparable or reduced infarct size (Mozaffari and Schaffer, 2003; Saupe et al., 2000; Matsuhisa et al., 2008). Neckář et al. (2012) recently showed that Ren-2 transgenic hypertensive rats exhibited higher myocardial resistance to I/R injury as compared with

normotensive rats. It is obvious that the influence of hypertension on cardiac tolerance to I/R injury has not been completely understood until now. It could depend on the phase of hypertension or it may activate a protective mechanism. EET-A treatment significantly reduced infarct size in normotensive sham-operated rats. Chronic treatment with EET-A did not reduce myocardial infarct size in 2K1C Goldblatt hypertensive rats suggesting that 2K1C rats already exhibited the maximal activation of cardioprotective signaling.

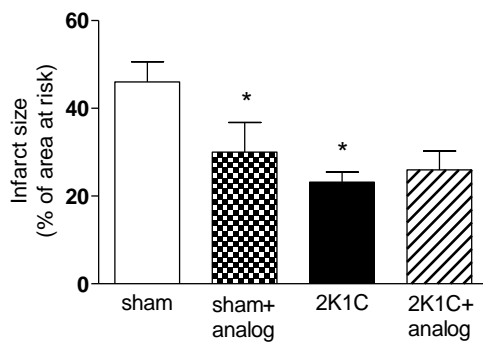


Figure 7 Myocardial infarct size expressed as a percentage of area at risk in sham-operated and 2K1C rats untreated or treated with EET analog. Data are expressed as mean±SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding sham-operated group.

The second major result of the study with epoxyeicosatrienoic acids (EETs) was that in the sustained phase of 2K1C Goldblatt hypertension, EET-A treatment did not decrease blood pressure and did not attenuate cardiac hypertrophy in 2K1C Goldblatt hypertensive rats.

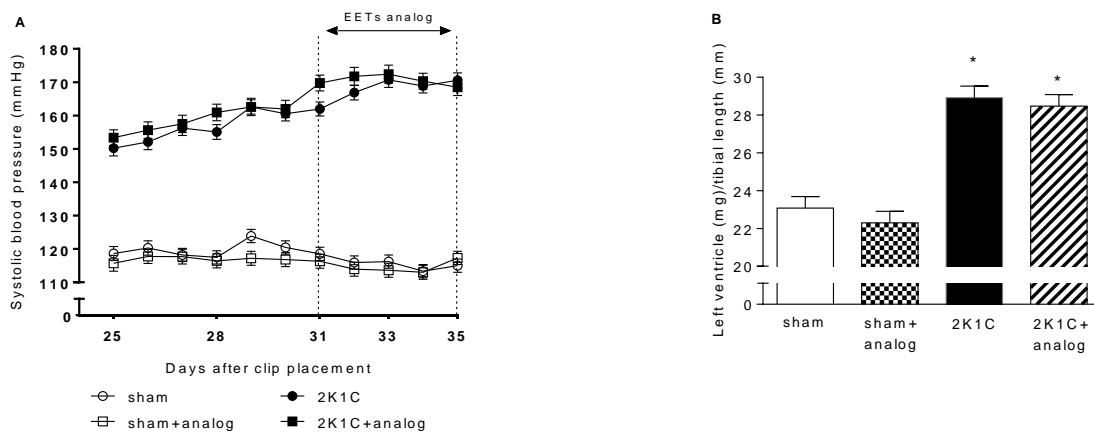


Figure 8 Systolic blood pressure (A) and left ventricular hypertrophy expressed as left ventricular weight to tibia length ratio (B) in sham-operated and 2K1C rats untreated or treated with EET analog. Data are expressed as mean±SEM; * $P < 0.05$ vs. corresponding sham-operated group.

These unexpected findings are not easy to explain, because recent studies have clearly shown that increased availability of EETs in the kidney of animals with angiotensin II-dependent hypertension is associated with improvement of the impaired renal autoregulatory capacity and blunted pressure-natriuresis relationship (Elmarakby, 2012, Sporková et al.,

2011). Moreover, 2K1C hypertensive animals in the sustained phase of hypertension were shown to have a deficit of EETs in the nonclipped kidney as a consequence of their enhanced degradation (Sporková et al., 2011; Kopkan et al., 2012). Based on these findings, it was proposed that the reduced intrarenal bioavailability of EETs contributes to the angiotensin II-induced derangement of the pressure-natriuresis relationship in the nonclipped kidney of 2K1C hypertensive rats; it plays also a crucial role in the pathophysiology of sustained hypertension. It was reported that in Ren-2 transgenic rats, chronic inhibition of EETs degradation led to the marked elevation of intrarenal EETs levels (Varcabová et al., 2013). Considering the above evidence, it is difficult to explain why chronic EET-A treatment did not lower blood pressure in 2K1C Goldblatt hypertensive rats. This failure can not be ascribed to the low dosage of EET-A, because in a recent study the same dose proved to be effective (Imig et al., 2010). The possible explanation might be that, in contrast to soluble epoxide hydrolase inhibition, EET-A treatment did not normalize the availability of endogenous intrarenal EETs (Sporková et al., 2011). We assumed that the decreased intrarenal EETs bioavailability in 2K1C rats was accompanied by the lack of antihypertensive effect.

5. CONCLUSIONS

- a) NO/cGMP signaling pathway plays a role in the acute phase of cardioprotection induced by CH. The acute preischemic treatment with NO donor molsidomine and phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil enhanced cardiac ischemic tolerance not only in normoxic but also in chronically hypoxic rats. Chronic sildenafil treatment was able to provide an additional protection in chronically hypoxic rats.
- b) Adaptation to CH exhibited the increased levels of TNF- α in both cytosolic and particulate fractions of left ventricular myocardium as well as an increased expression of receptor TNFR2 without change in TNFR1. TNF- α contributes to the improved cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats via its receptor TNFR2 and increased oxidative stress.
- c) The mild dose of DEX exhibited significant protective effect against reperfusion-induced arrhythmias in isolated perfused hearts. In open-chest animals, the high dose of DEX significantly reduced infarct size. According to the unchanged markers of oxidative stress, we suggest that DEX-induced protective mechanism is not mediated by limitation of ROS formation.
- d) 2K1C Goldblatt hypertensive rats during the sustained phase of hypertension exhibited increased cardiac tolerance to I/R injury as compared to the normotensive controls. Treatment with EET-A did not induce any antihypertensive and cardioprotective actions in this animal model of human renovascular hypertension; however, it reduced infarct size in normotensive animals.

1. ÚVOD

Podle světové zdravotnické organizace je ischemická choroba srdeční hlavní příčinou mortality nejen v České republice, ale i v ostatních zemích světa. Nepříznivé účinky ischemické choroby srdeční bývají připisovány akutnímu ischemicko/reperfuznímu (I/R) poškození. Během ischemie dochází ke vzniku disproporce mezi dodávkou a nárokem tkání na kyslík, což následně vede k poškození srdeční tkáně. Rychlé obnovení krevního průtoku se tak zdá být nezbytné pro záchranu ischemického myokardu. Avšak bylo prokázáno, že i během klíčových okamžiků reperfuze dochází ke vzniku dalšího reverzibilního a irreverzibilního poškození. Z tohoto důvodu je pochopitelné, že kliničtí i experimentální kardiologové se snaží porozumět molekulárním mechanismům stojícím za vznikem I/R poškození myokardu a nalézt kardioprotektivní postupy, které by dokázaly zmenšit výsledný rozsah poškození.

Rozsah ischemického poškození nezávisí pouze na intenzitě a délce trvání ischemického podnětu, ale také na stupni odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku. Studium kardioprotektivních fenoménů, jako je adaptace na chronickou hypoxii (CH) nebo různé formy conditioningu, je proto nezbytné pro porozumění buněčných mechanismů a nalezení nových signálních drah vedoucích ke kardioprotekci. Nové kardioprotektivní přístupy jsou velmi žádoucí. Prozatím žádný z těchto terapeutických postupů, kromě včasné reperfuze, nebyl aplikován do klinické praxe, avšak několik z nich se v počátečních fázích klinických studií jeví nadějně.

Tato disertační práce se snažila přispět k objasnění možných mechanismů, které by dokázaly ochránit srdce před I/R poškozením. Studovali jsme tyto tři - adaptaci na CH, akutní podání dexrazoxanu (DEX) a chronické podávání analogu epoxyeikosatrienových kyselin (EET-A).

2. CÍLE PRÁCE

Specifické cíle práce byly:

- 1.) Zjistit úlohu signalizačních drah zahrnujících oxid dusnatý (NO)/cyklický guanosin monofosfát (cGMP) a tumor-nekrotizující faktor alfa (TNF- α) v kardioprotektivním mechanismu CH.
- 2.) Zjistit, zda dexrazoxan dokáže zmenšit I/R poškození.
- 3.) Posoudit vliv EET-A na velikost infarktu u 2-kidney, 1-clip (2K1C) potkanů s Goldblattovskou hypertenzí.

3. MATERIÁL A METODIKA

Model kontinuální normobarické hypoxie

Dospělí potkani kmene Wistar (250 - 300 g body weight) byli adaptováni na chronickou kontinuální hypoxii (10% O₂) v normobarické komoře po dobu 3 - 4 týdnů. Během této doby nedošlo k reoxygenaci. Kontrolní potkani byli po celou dobu adaptační fáze chováni v normoxických podmínkách.

Model 2K1C Goldblattovské hypertenze

Potkanům kmene Hannover Sprague-Dawley (100 - 120 g) byla pod celkovou anestézií naložena stříbrná svorka na pravou renální arterii. Sham-operovaní potkani prošli stejnou operací kromě umístění svorky.

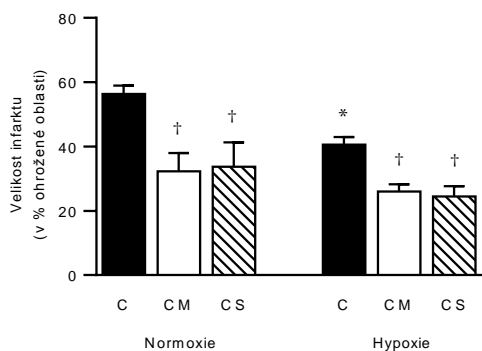
Experimenty, provedené úplně nebo alespoň částečně autorkou, se skládaly z následujících postupů:

- Hodnocení velikosti infarktu a komorových arytmií na modelu srdce *in situ*
- Hodnocení komorových arytmií na modelu izolovaného perfundovaného srdce
- Analýza oxidované a redukované formy glutationu
- Analýza malondialdehydu
- Elektroforéza a Western blot
- Analýza nitritu a nitrátu

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

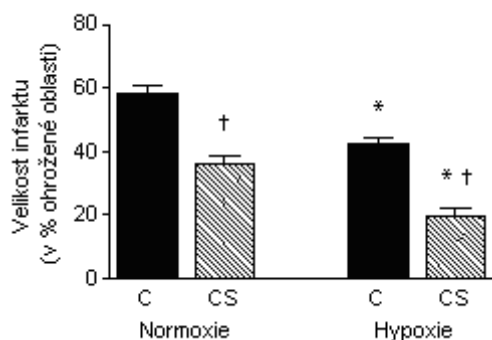
4.1. Úloha NO/cGMP v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie (Publikace A)

Normoxickým a chronicky hypoxickým dospělým samcům potkanů kmene Wistar byl akutně podán NO donor molsidomin (10 mg/kg) nebo inhibitor fosfodiesterázy typu 5 sildenafil (0.7 mg/kg). Potvrdili jsme, že adaptace na CH zvyšuje ischemickou odolnost srdce (Asemu et al., 2000; Neckář et al., 2004; Wang et al., 2011; Maslov et al., 2014). Akutní podání molsidominu nebo sildenafilu snížilo velikost infarktu nejen u normoxických, ale i u chronicky hypoxických potkanů, u kterých byl tento účinek silnější. Aditivní účinek NO a adaptace na CH zde ale nebyl, proto lze předpokládat, že NO/cGMP se podílí na vzniku akutní fáze kardioprotektivního účinku CH.



Graf 1 Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti u normoxických a chronicky hypoxických potkanů, bez (C) nebo po akutním podání molsidominu (CM) nebo sildenafilu (CS). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina, [†] $P < 0.05$ vs. odpovídající kontrolní skupina.

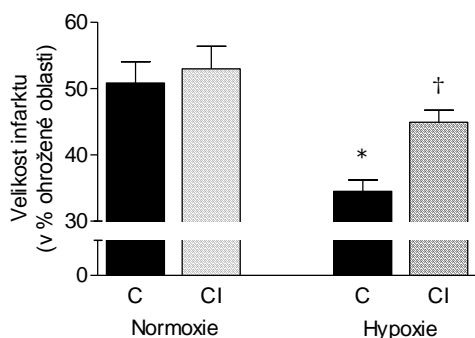
V druhé části této studie (dosud nepublikované) byl sildenafil (1.5 mg/kg/den) podáván normoxickým a chronicky hypoxickým potkanům dlouhodobě. Podávání sildenafilu začalo tři dny před a trvalo po celou dobu adaptace na CH. Hlavním výsledkem bylo zjištění, že chronicky zvýšená dostupnost cGMP snížila velikost infarktu u normoxických a dále zesílila protektivní efekt u chronicky hypoxických potkanů. Zdá se tedy, že cGMP nehraje příliš významnou úlohu při vyvolání kardioprotektivního účinku CH.



Graf 2 Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti u normoxických a chronicky hypoxických potkanů bez (C) nebo po chronickém podávání sildenafilu (CS). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina, [†] $P < 0.05$ vs. odpovídající kontrolní skupina.

4.2. Úloha TNF- α v kardioprotektivním účinku chronické hypoxie (Publikace B)

Cílem této studie bylo určit úlohu TNF- α v myokardu potkanů adaptovaných na CH po chronickém podávání monoklonální protilátky proti TNF- α infliximabu (5 mg/kg/týden) po celou dobu adaptace na CH. Adaptace na CH zvýšila ischemickou odolnost, tento účinek byl oslaben podáváním infliximabu.

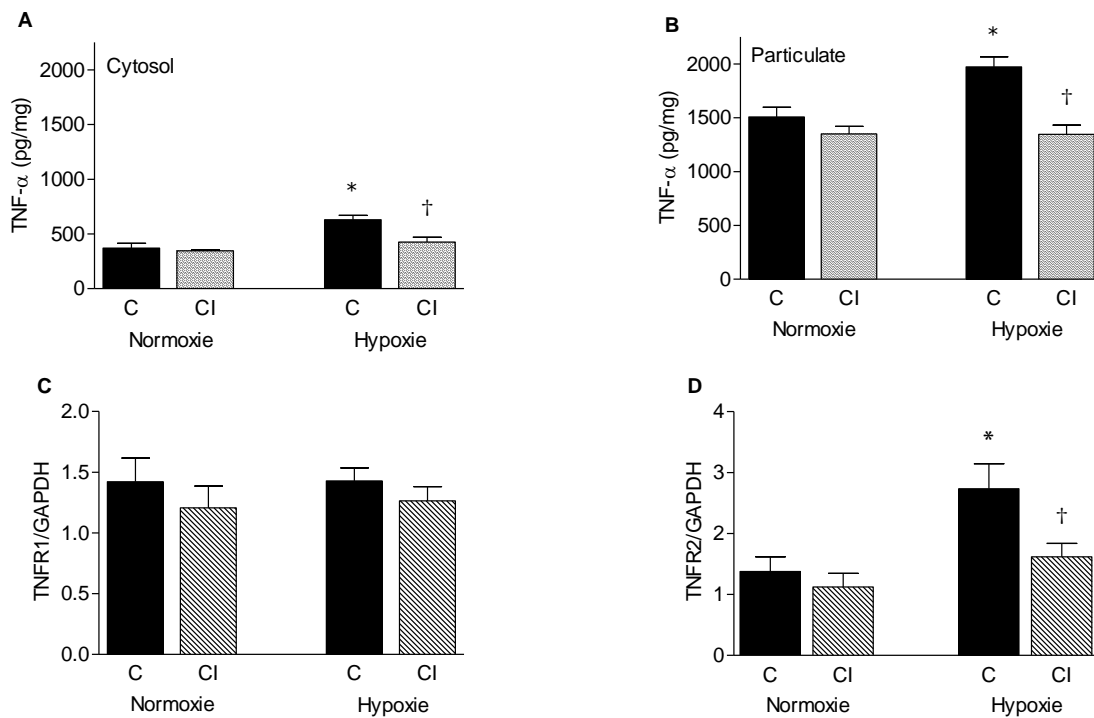


Graf 3 Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti u normoxických a chronicky hypoxických potkanů bez (C) nebo po chronickém podávání infliximabu (CI). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina, [†] $P < 0.05$ vs. odpovídající kontrolní skupina.

V našich experimentech byla adaptace na CH spojena se zvýšenou hladinou TNF- α a TNF- α receptoru R2 (TNFR2). Tento náleze je ve shodě se zvýšenou expresí TNF- α a prozánětlivých genů nalezenou u srdcí chronicky hypoxických dospělých potkanů a fetálního stádia morčat (Chen et al., 2007; Klusoňová et al., 2009). TNF- α je tvořen jako transmembránový TNF- α prekurzor, který je štěpen za vzniku sekretorické formy TNF- α působící přes TNF- α receptor R1 (TNFR1) a TNFR2 (Vandenabeele et al., 1995). TNF- α receptorově-specifická odpověď byla prokázána jako důležitý moment v ischemické odolnosti srdce. Zatímco nadměrná exprese TNF- α a následná aktivace receptoru TNFR1 je škodlivá, nižší koncentrace TNF- α spojená s aktivací receptoru TNFR2 je protektivní (Flaherty et al., 2008; Lacerda et al., 2009). Naše výsledky ukázaly zvýšenou expresi receptoru TNFR2 v levé komoře potkanů adaptovaných na CH. Chronicky podávaný infliximab tento nárůst v expresi potlačil a zmařil protektivní účinek CH. Zdá se tedy, že CH zvyšuje ischemickou toleranci srdce tím, že aktivuje protektivní signalizaci přes receptor TNFR2, ale nijak neovlivňuje škodlivou signalizační dráhu receptoru TNFR1. Nejen sekretorická, ale také transmembránová forma TNF- α vykonává své biologické funkce (Horiuchi et al., 2010). Transmembránová forma TNF- α aktivuje receptor TNFR2 (Grell et al., 1995). Na základě těchto znalostí jsme stanovili expresi TNF- α jak v cytosolické, tak v membránové frakci levé komory normoxických a chronicky hypoxických potkanů. CH zvýšila hladinu TNF- α rovnoměrně v obou frakcích, a proto nemůžeme posoudit, zda se kardioprotektivního účinku CH účastní sekretorická nebo transmembránová forma TNF- α .

Předpokládá se, že reaktivní formy kyslíku (ROS) hrají důležitou roli v signalizaci vedoucí od TNF- α . Ukázali jsme, že adaptace na CH zvyšuje míru oxidačního stresu a expresi manganové superoxid dismutázy. Oba tyto jevy byly potlačeny chronicky podávaným infliximabem. Zdá se tedy, že TNF- α přispívá ke zvýšené ischemické odolnosti srdce tím, že aktivuje prospěšnou redoxní signalizaci a zároveň posiluje antioxidační obranné mechanismy.

Adaptace na CH byla dále spojena se zvýšenou expresí indukibilní NO syntázy. Chronické podávání infliximabu tento nárůst zmírnilo. Na rozdíl od studií, které potvrzují úlohu NO v preconditioningu (Andrukhiv et al., 2006) či CH (Shi et al., 2000), naše výsledky naznačily, že signalizace související s NO nehraje příliš významnou úlohu v kardioprotektivním účinku CH, jak již bylo zmíněno dříve.

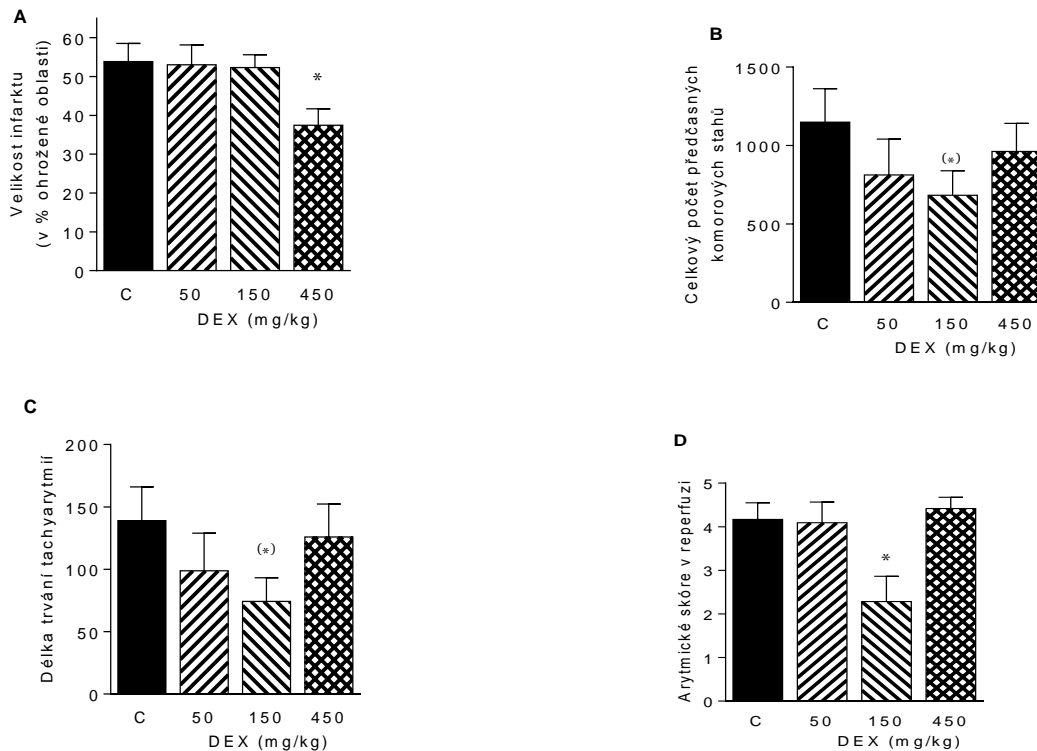


Graf 4 Koncentrace TNF- α v cytosolické (A) a membránové (B) frakci levé komory a koncentrace TNF- α receptoru R1 (TNFR1; C) a TNF- α receptoru R2 (TNFR2; D) u normoxických a chronicky hypoxických potkanů bez (C) nebo po chronickém podávání infliximabu (CI). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. odpovídající normoxická skupina, † $P < 0.05$ vs. odpovídající kontrolní skupina.

4.3. Účinek dexrazoxanu na ischemicko/reperfuzní poškození (Publikace C)

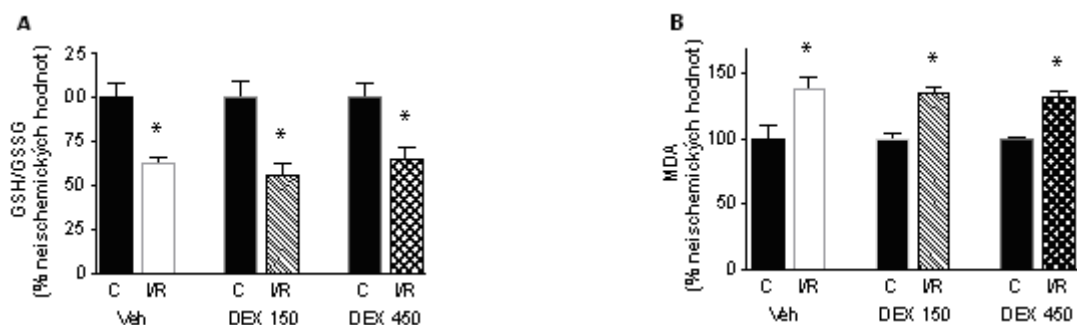
Cílem této studie bylo zjistit, zda DEX dokáže ochránit srdce před důsledky I/R poškození. DEX byl podán v dávkách 50, 150 a 450 mg/kg 60 min před ischemií. Zjistili jsme, že pouze dávka 150 mg/kg efektivně potlačuje komorové arytmie na modelu izolovaného perfundovaného srdce, ale není dostačující pro snížení arytmogeneze u modelu *in situ*. Důvod odlišného působení DEX na arytmie na modelu srdce *in situ* a izolovaného perfundovaného srdce není jasný. Asemu et al. (2000) také popsal odlišný účinek CH na vznik arytmií za podmínek *in vitro* a *in situ*. Příčina je neznámá, ale vysvětlením by mohla být přítomnost krevních buněk a neurohumorálních kontrolních mechanismů u modelu srdce *in situ*.

Pouze nejvyšší DEX dávka dokázala významně snížit velikost infarktu na modelu srdce *in situ*. Tento nález je ve shodě s prací Ramu et al. (2006), která ukázala zlepšenou postischemickou obnovu kontraktility funkce na modelu izolovaného perfundovaného srdce potkana po podání DEX v podmínkách globální ischemie. Hasinoff (2002) prokázal snížené uvolňování laktát dehydrogenázy z neonatálních kardiomyocytů, které byly po podání DEX vystaveny anoxii-reoxygenaci.



Graf 5 Relativní velikost infarktu vztážená na velikost ohrožené oblasti na modelu srdce in situ (A), celkový počet předčasných komorových stahů v ischemii (B), délka trvání tachyarytmií v ischemii (C), arytmiické skóre v reperfuzi (D) na modelu izolovaného perfundovaného srdce u potkanů bez (C) nebo po podání dexrazoxanu (DEX). Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. C, ^(*) $P < 0.1$ vs. C.

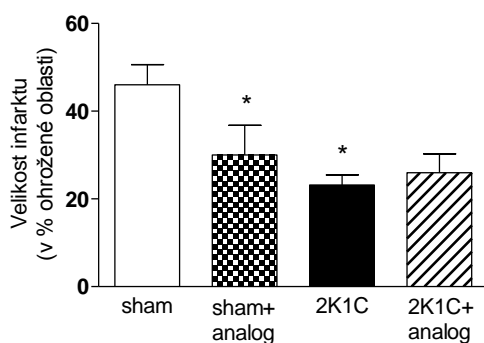
Na základě současných znalostí se zdá, že kardiotoxicita vyvolaná působením antracyklinů a I/R poškození sdílí společnou vlastnost. Jedná se o úlohu ROS, a proto vnitrobuněčná chelatace železa by mohla být slibným terapeutickým postupem. V této studii jsme stanovili koncentrace dvou různých ukazatelů oxidačního stresu, redukované a oxidované formy glutationu a malondialdehydu. Cílem bylo otestovat, zda protektivní mechanismus DEX během I/R poškození je způsoben sníženou produkcí ROS. DEX neměl vliv ani na jeden z těchto ukazatelů, což vyvrací původní hypotézu. Tento náš výsledek byl dále ověřen Štěrbou et al. (2013), který ukázal, že dokonce i silnější a selektivnější chelátory železa nedokázaly poskytnout lepší nebo alespoň srovnatelný kardioprotektivní účinek jako DEX na modelu kardiotoxicity vyvolané působením antracyklinů. Ukazuje se tedy, že se zde uplatňuje jiný protektivní mechanismus než je snížená produkce ROS.



Graf 6 Poměr redukované a oxidované formy glutationu (GSH/GSSG, A) a koncentrace malondialdehydu (MDA, B) na modelu srdce in situ u potkanů bez (Veh) a po podání dexrazoxanu (DEX). Účinek ischemie a reperfuze (I/R) je vyjádřen jako procento odpovídajících neischemických (C) hodnot. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. C.

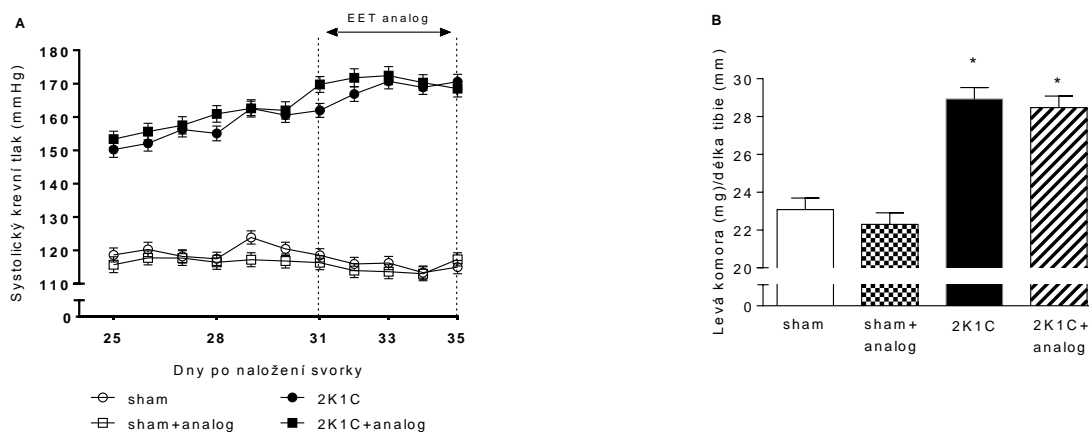
4.4. Účinek analogu epoxyeikosatrienových kyselin na ischemicko/reperfuční poškození (Publikace D)

Účinek léčby EET-A (10 mg/kg/den) na krevní tlak a velikost infarktu byl hodnocen u 2K1C potkanů s Goldblattovskou hypertenzí. Prvním hlavním výsledkem této práce bylo, že 2K1C potkani měli nižší velikost infarktu myokardu v porovnání s normotenzními sham-operovanými kontrolami. Tento nálezní protirečí dlouhodobému názoru, že hypertrofický myokard má sníženou toleranci k I/R poškození. Nicméně náš výsledek není ojedinělý. Exisují důkazy, kdy hypertenzní zvířata s hypertrofií levé komory měla stejně velkou nebo dokonce menší velikost infarktu (Mozaffari and Schaffer, 2003; Saupe et al., 2000; Matsuhisa et al., 2008). Neckář et al. (2012) prokázal vyšší odolnost myokardu k I/R poškození u Ren-2 transgenních hypertenzních potkanů. Je tedy zřejmé, že vliv hypertenze na toleranci srdce k I/R poškození prozatím není dostatečně objasněn. Možným vysvětlením by mohla být fáze hypertenze nebo aktivace ochranných mechanismů, jak tomu pravděpodobně bylo i v případě našich experimentů. EET-A dokázal významně snížit velikost infarktu pouze u normotenzních potkanů.



Graf 7 Relativní velikost infarktu vztažená na velikost ohrožené oblasti u sham-operovaných a 2K1C potkanů bez nebo po podávání EET analogu. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * $P < 0.05$ vs. odpovídající sham-operovaná skupina.

Druhým důležitým výsledkem bylo zjištění, že EET-A nedokázal snížit krevní tlak ani míru srdeční hypertrofie u 2K1C potkanů. Tyto neočekávané výsledky není jednoduché vysvětlit, protože předchozí studie ukázaly, že zvýšená dostupnost epoxyeikosatrienových kyselin (EETs) v ledvině zvířat s angiotensin II-dependentní hypertenzí je doprovázena zlepšením narušené regulační funkce ledvin stejně jako vztahu mezi exkrecí Na⁺ a středním arteriálním tlakem (Elmarakby, 2012, Sporková et al., 2011). U 2K1C potkanů byl dále prokázán nedostatek EETs v neklipované ledvině jako důsledek jejich zvýšené degradace (Sporková et al., 2011; Kopkan et al., 2012). Dále bylo zjištěno, že u Ren-2 transgenních potkanů chronická inhibice degradace EETs vede ke zvýšení renální hladiny EETs (Varcabová et al., 2013). Předpokládali jsme tedy, že snížená renální dostupnost EETs u 2K1C potkanů hraje klíčovou roli v patofyziologii hypertenze. Na základě výše uvedených argumentů je těžké vysvětlit, proč chronické podávání EET-A nedokázalo snížit krevní tlak u 2K1C potkanů s Goldblattovskou hypertenzí. Toto selhání nelze připisovat nízké použité dávce, neboť v nedávné studii byla tato dávka prokázána jako účinná (Imig et al., 2010). Možné vysvětlení by mohlo být v tom, že při léčbě EET-A nedochází k normalizaci hladiny endogenních renálních EETs na rozdíl od inhibice solubilní epoxid hydrolázy (Sporková et al., 2011). Zdá se tedy, že nepřítomnost antihypertenzního účinku u 2K1C potkanů při léčbě EET-A byla způsobena nedostatečnou dostupností renálních EETs.



Graf 8 Systolický krevní tlak (A) a hypertrofie levé komory vyjádřená jako poměr hmotnosti levé komory a délky tibie (B) u sham-operovaných a 2K1C potkanů bez nebo po léčbě EET analogem. Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SEM; * P<0.05 vs. odpovídající sham-operovaná skupina.

5. ZÁVĚRY

- a) Signální kaskáda zahrnující NO/cGMP hraje úlohu v akutní fázi kardioprotektivního mechanismu CH. Akutní preischemické podání NO donoru molsidominu a inhibitoru fosfodiesterázy typu 5 sildenafilu zvýšilo ischemickou odolnost srdce nejen u normoxických, ale i u chronicky hypoxických potkanů. Chronicky podávaný sildenafil umocnil kardioprotektivní účinek CH.
- b) Prokázali jsme zvýšenou hladinu TNF- α v cytosolické i membránové frakci myokardu levé komory potkanů adaptovaných na CH. Dále jsme našli zvýšenou expresi receptoru TNFR2 na rozdíl od receptoru TNFR1. TNF- α přispívá ke zvýšené ischemické odolnosti srdce díky signalizaci přes TNFR2 a zvýšenému oxidačnímu stresu.
- c) DEX podaný v dávce 150 mg/kg měl ochranný účinek proti reperfuzním arytmiím na modelu izolovaného perfundovaného srdce. DEX podaný v dávce 450 mg/kg významně snížil velikost infarktu na modelu *in situ*. Podle nezměněných ukazatelů míry oxidačního stresu lze usuzovat, že kardioprotektivní účinek DEX je zprostředkován jiným způsobem než omezením produkce ROS.
- d) 2K1C potkani s Goldblattovskou hypertenzí vykazovali zvýšenou odolnost srdce k I/R poškození v porovnání s normotenzními kontrolními potkany. Léčba EET-A neměla na tyto hypertenzní potkany žádný antihypertenzní ani kardioprotektivní účinek, ale dokázala snížit velikost infarktu u normotenzních potkanů.

REFERENCES/POUŽITÁ LITERATURA

Andrukhiv A, Costa AC, West IC, Garlid KD: Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2067 - H2074, 2006.

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

Chen LM, Kuo WW, Yang JJ, Wang SG, Yeh YL, Tsai FJ, Ho YJ, Chang MH, Huang CY, Lee SD: Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. *Exp Physiol* 92: 409 - 416, 2007.

Elmarakby AA: Reno-protective mechanisms of epoxyicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *Am J Physiol* 302: R321 - R330, 2012.

Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B: The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 45: 735 - 741, 2008.

Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P: The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793 - 802, 1995.

Hasinoff BB: Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against hypoxia-reoxygenation damage. *Cardiovasc Toxicol* 2(2): 111 - 118, 2002.

Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T: Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF- α agents. *Rheumatology* 49: 1215 - 1228, 2010.

Imig JD: Targeting epoxides for organ damage in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 329 - 335, 2010.

Klusoňová P, Řeháková L, Borchert G, Vagnerová K, Neckář J, Ergang P, Mikšík I, Kolář F, Pácha J: Chronic intermittent hypoxia induces 11- β hydroxysteroid dehydrogenase in rat hearts. *Endocrinology* 150: 4270 - 4277, 2009.

Kopkan L, Husková Z, Sporková A, Varcabová Š, Honetschlägerová Z, Hwang SH, Tsai HJ, Hammock BD, Imig JD, Kramer HJ, Bürgelová M, Vojtíšková A, Kujal P, Vernerová Z, Červenka L: Soluble epoxide hydrolase inhibition exhibits antihypertensive actions independently of nitric oxide in mice with renovascular hypertension. *Kidney Blood Press Res* 35: 595 - 607, 2012.

Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S: Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res* 84: 201 - 208, 2009.

Maslov LN, Naryzhnaya NV, Prokudina ES, Kolar F, Gorbunov AS, Zhang Y, Wang H, Tsibulnikov SY, Portnichenko AG, Lasukova TV, Lishmanov YB: Preserved mitochondrial

function and reduced ischaemia/reperfusion injury afforded by chronic continuous hypoxia: Role of opioid receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014 (ahead of print)

Matsuhisa S, Otani H, Okazaki T, Yamashita K, Akita Y, Sato D: Angiotensin II type 1 receptor blocker preserves tolerance to ischemia-reperfusion injury in Dahl salt-sensitive rat heart. *Am J Physiol* 294: H2473 - H2479, 2008.

Mozaffari MS, Schaffer SW: Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension* 42: 1042 - 1049, 2003.

Neckář J, Kopkan L, Husková Z, Kolář F, Papoušek F, Kramer HJ, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD, Malý J, Netuka I, Ošťádal B, Červenka L: 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* 122: 513 - 525, 2012.

Neckář J, Ošťádal B, Kolář F: Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res* 53: 621 - 628, 2004.

Ramu E, Korach A, Houminer E, Schneider A, Elami A, Schwalb H: Dexrazoxane prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 20(5): 343 - 348, 2006.

Saupe KW, Lim CC, Ingwall JS, Apstein CS, Eberli FR: Comparison of hearts with 2 types of pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 35: 1167 - 1172, 2000.

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

Sporková A, Kopkan L, Varcabová Š, Husková Z, Hwang SH, Hammock BD: Role of cytochrome P450 metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney, 1-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 300: R1468 - R1475, 2011.

Štěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, Šimůnek T: Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological protection. *Antioxid Redox Signal* 18(8): 899 - 929, 2013.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W: Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5(10): 392 - 399, 1995.

Varcabová Š, Husková Z, Kramer HJ, Hwang SH, Hammock BD, Imig JD: Antihypertensive action of soluble epoxide hydrolase inhibition in Ren-2 transgenic rats is mediated by suppression of the intrarenal renin-angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40: 273 - 281, 2013.

Wang ZH, Chen YX, Zhang CM, Wu L, Yu Z, Cai XL, Guan Y, Zhou ZN, Yang HT: Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1695 - H1705, 2011.

CURRICULUM VITAE

Petra Alánová (née Mandíková)

Born February 26th, 1986 in Prague, Czech Republic

Employment:

2014-present Institute for Clinical and Experimental Medicine, Centre for Experimental Medicine
2012-present National Institute of Public Health
2008-present Department of Developmental Cardiology, Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences

Education:

2010-present Ph.D. studies, Department of Physiology, Charles University in Prague, Czech Republic
2005-2010 Physiology at the Faculty of Science, Charles University in Prague; Master in Science, Thesis: The role of nitric oxide in cardioprotective effect of chronic hypoxia

Teaching experience:

2012-present Surgical demonstrations in the course “ Special Practical Course on Animal Physiology”, Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Languages:

English Advanced (Certificate in Advanced English, University of Cambridge)
French Upper-intermediate (Diplôme d’Etudes en Langue Française B1, B2)

Grants:

2011-2013 Grant Agency of Charles University (GAUK 411911); The role of nitric oxide in cardioprotection induced by chronic hypoxia

SELECTED PUBLICATIONS/SEZNAM PUBLIKACÍ

List of publications used for this thesis:

Publication A: P. Alánová, F. Kolář, B. Ošťádal, J. Neckář: Role of NO/cGMP pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats. *Physiol Res* 2015 (accepted)

Publication B: A. Chytilová, GH Borchert, P. Mandíková-Alánová, AH Khan, JD Imig, F. Kolář, J. Neckář: TNF- α contributes to improved cardiac ischemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiol* 2015 (accepted)

Publication C: J. Neckář, A. Boudíková, P. Mandíková, M. Štěrbá, O. Popelová, I. Mikšík, L. Dabrowská, J. Mráz, V. Geršl, F. Kolář: Protective effects of dexrazoxane against acute ischaemia/reperfusion injury of rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 90: 1303 - 1310, 2012.

Publication D: P. Alánová, Z. Husková, L. Kopkan, A. Sporková, Š. Jíchová, J. Neckář, JD Imig, M. Klevstig, F. Kolář, NR Reddy, JR Falck, J Sadowski, HJ Kramer, L. Červenka: Orally active epoxyeicosatrienoic acid analog does not exhibit antihypertensive and reno- or cardioprotective actions in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. (under revision in *Vascular Pharmacology*)

Other publication:

T. Ravingerová, S. Čarnická, V. Ledvényiová, E. Barlaka, E. Galatou, A. Chytilová, P.Mandíková, M. Němčková, A. Adameová, F. Kolář, A. Lazou: Upregulation of genes involved in cardiac metabolism enhances myocardial resistance to ischemia/reperfusion in the rat heart. *Physiol Res* 62 (Suppl. 1): S151 - S163, 2013.