

Fyziologický ústav AV ČR
Oddělení vývojové kardiologie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Katedra fyziologie živočichů
a vývojové biologie



CENTRUM
EXPERIMENTÁLNÍHO VÝZKUMU
CHOROB SRDCE A CÉV



Vliv odpražení oxidační fosforylace na ischemickou odolnost myšního srdce

Diplomová práce

**Libor Staněk
2007**

Vedoucí diplomové práce : prof. RNDr. Fr. Kolář, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval a sepsal samostatně na základě vlastních výsledků a studia odborné literatury. Souhlasím s jejím zapůjčením pro studijní účely.

V Praze 15. 4. 2007

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Františku Kolářovi, CSc. za pomoc a trpělivost v průběhu studia a cenné připomínky k mé práci.
Dále také chci poděkovat Janu Neckářovi, Ph.D. za možnost konzultovat s ním moje pokusy, Dr. Kopeckému z oddělení tukové tkáně, za laskavé poskytnutí UCP2^(-/-) myši.
V neposlední řadě musím také poděkovat doc. RNDr. Bohumíru Štefloví, CSc. za to, že mi doporučil práci na FgÚ AV ČR.

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1. Ischemie myokardu	9
2.1.1. Metabolické změny v průběhu ischemie	9
2.1.2. Poruchy transportu iontů v ischemii	10
2.1.3. Funkční změny myokardu v průběhu ischemie	11
2.1.3.1. Poruchy kontraktálních funkcí myokardu	11
2.1.3.2. Arytmie v průběhu ischemie	12
2.1.3.3. Letální buněčné poškození	12
2.2 Reperfuční poškození	13
2.3. Kardioprotekce	15
2.3.1. Draslíkové kanály závislé na ATP	15
2.3.1.1. K_{ATP} kanály v srdci	16
2.3.1.2. Molekulární struktura K_{ATP} kanálů	16
2.3.1.3. Regulace K_{ATP} kanálů	17
2.3.1.4. K_{ATP} kanály a farmakologie	17
2.3.1.5. Význam K_{ATP} kanálů v kardioprotekci	18
2.4. Co jsou kyslíkové radikály (ROS)	18
2.4.1. Signální ROS a kardioprotekce	19
2.4.2. Význam mitochondrií v kardioprotekci	19
2.4.2.1. Membránový potenciál mitochondrií	20
2.4.2.2. Princip odpražení – UCP	20
2.5. Odpražení oxidační fosforylace a kardioprotekce	21

3. Cíle práce	23
4. Materiál a metody	24
4.1. Perfuze izolovaného myšního srdce	24
4.2. Experimentální protokol	26
4.2.1. Doba ischemie a reperfuze	27
4.3. Ischemická odolnost myokardu myši s delecí genu pro UCP 2	27
4.4. Sledování účinků FCCP na ischemickou odolnost myokardu	27
4.5. Stanovení velikosti infarktu myokardu	28
4.6. Statistické zpracování výsledků	29
5. Výsledky	31
5.1. Ověření odolnosti myšního srdce k ischemickému poškození	31
5.2. Ischemická odolnost myokardu myši s delecí UCP 2	32
5.2.1. Vliv inhibitoru mitoK _{ATP} kanálů	35
5.3. Vliv FCCP na ischemickou odolnost myokardu	37
6. Diskuze	39
6.1. Experimentální model	39
6.2. UCP a ischemická odolnost	40
6.3. Kardioprotektivní účinek odpráhovače FCCP	42
7. Závěr	44
8. Literatura	45

Seznam zkratek

ADP	adenosin-5' - difosfát
AMP	adenosin-5' - monofosfát
AP	akční potenciál
ATP	adenosin-5' - trifosfát
cAMP	cyklický adenosin-3',5' - monofosfát
DP	diastolický tlak
FAD⁺	flavinadenindinukleotid
FCCP	karbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
5-HD	5 – hydroxydekanoát
HS	hmotnost srdce
HT	hmotnost těla
IFM	interfibrilární mitochondrie
ICHS	ischemická choroba srdeční
IP₃	inositol-1,4,4-trifosfát
IPC	ischemický preconditioning
KP	koronární průtok
Kir	K⁺ <i>inward rectifier protein</i>
LK	levá komora
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MitoK_{ATP}	mitochondriální ATP senzitivní draslíkové kanály
·OH	hydroxylový radikál
PC	preconditioning
PCr	kreatinfosfát

PK	pravá komora
PKC	proteinkináza C
PLA₂	fosfolipáza A2
PLC	fosfolipáza C
PO₂	parciální tlak kyslíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
sarkK_{ATP}	sarkolemální ATP senzitivní draslíkové kanály
SUR	sulfonylureový receptor
UCP	<i>uncoupling protein</i>, odpřahující protein

1. Úvod

Konec 20. století byl ve znamení obrovského pokroku ve vědě, technice a také v medicíně. Literatura uvádí, že v roce 1900 byla průměrná doba dožití celosvětově 50 let, v roce 2000 je více jak 75 let a dnes se blíží osmdesátce (Špínar a kol., 2001). Velkou měrou se na tom podílí cílená léčba kardiovaskulárních onemocnění. Přesto jsou tato onemocnění stále zodpovědná za více než 50 % všech úmrtí.

Nejčastější a nejzávažnější chorobou kardiovaskulárního systému je ischemická choroba srdeční. Rozhodujícím faktorem poškození je doba trvání ischemie. Změny, které nastávají při déle trvající ischemii, jsou ireverzibilní. Proto se pozornost vědců zaměřuje na to, jak zvýšit odolnost myokardu k akutnímu nedostatku kyslíku. Velkou měrou se pravděpodobně na tomto onemocnění podílí životní styl dnešní společnosti, ať je to stres, kouření, nevhodná strava a v neposlední řadě také nedostatek pohybu, spolu s genetickou predispozicí (předpokládá se polygenně podmíněná dědičnost) (Štejfá, 1998) a metabolickými poruchami (Klener a kol., 1997). Lékaři i vědci se snaží hledat metody a nové přístupy léčby tohoto onemocnění a snížit invazivitu některých zákroků. V poslední době se intenzivně studují endogenní kardioprotektivní mechanismy a tak se snaží zlepšit průběh kardiologických onemocnění. Lékařský výzkum a to ve všech oborech medicíny je značně omezen etickými aspekty. Proto zůstává téměř jedinou možností experimentálního výzkumu práce na pokusných zvířatech. Zvířecí experimentální modely poskytují velké množství potřebných informací, i když samozřejmě s určitým omezením. Je možné je použít ke studiu fyziologických a patofyziologických projevů a to jak na úrovni orgánu (jako v mém případě), nebo na úrovni celého organismu (Ošťádal a kol., 2005).

Tato diplomová práce si dala za cíl pokračovat ve sledování ischemické odolnosti myšího srdce s využitím geneticky modifikovaných jedinců. Na modelu izolovaného perfundovaného srdce jsme sledovali rozsah ischemicko-reperfučního poškození myokardu, přičemž jsme se zaměřili na možnou úlohu odpražení oxidační fosforylace.

2. Literární přehled

2.1. Ischemie myokardu

Srdce je striktně anaerobní orgán s velice náročným energetickým metabolismem. Aby mohlo srdce normálně pracovat je nezbytný stálý přísun kyslíku. Pokud je přísun kyslíku zastaven, například při trombotizaci koronární tepny (Kvasnička, 2003), nebo podstatně omezen, například při stenóze, dojde k poškození myokardu v důsledku hypoxie. Toto hypoxické poškození je závislé jednak na době trvání ischemie a jednak na odolnosti myokardu vůči nedostatku kyslíku.

Lze říci, že o ischemii (ischemické hypoxii) hovoříme, pokud dojde k nepoměru mezi dodávkou kyslíku a potřebou energie v dané oblasti myokardu s poklesem průtoku pod 20 % (Štejfa, 1998). Ischemie je obvykle regionální a komplexní, což znamená, že nechybí jen kyslík, ale i metabolické substráty a zároveň se hromadí metabolické produkty (kap. 2.1.1.), což je základním rozdílem od hypoxické hypoxie, která většinou postihuje celý myokard, ale hlavně u ní dochází k odvádění metabolitů. V oblasti postižené ischemií dochází k poklesu koncentrace kyslíku v buňkách a spotřebovává se kyslík vázaný na myoglobin. V této fázi přechází myokard na anaerobní glykolýzu (kap. 2.1.1.).

Jako možnou příčinu ischemie lze uvést aterosklerotický proces ve stěně koronárních cév anebo náhlé uzavření koronární cévy například trombem. Pokud je tento proces rozsáhlejší, dojde k následné buněčné smrti a ke vzniku infarktového ložiska (Katz, 1992).

Je nutné se také zmínit, že k poškození myokardu nedochází jen v průběhu ischemie, ale i v následné reperfuzi (kap. 2.2.).

2.1.1. Metabolické změny v průběhu ischemie

K prvním metabolickým změnám dochází již velice krátce po začátku ischemie; jedná se ovšem o druhově specifickou záležitost. U lidského srdce mohou tyto změny nastat již po 8 – 10 sekundách (Štejfa, 1998). Nastává postupný rozvrat na úrovni energetických rezerv buňky.

Za fyziologických podmínek získává myokard energii katabolizmem volných mastných kyselin a glukózy. Tato energie je ukládána do ATP a vysokomolekulární formy kreatinfosfátu (PCr). Při ischemii ustává oxidativní metabolismus, klesá hladina PCr a ATP, začíná se hromadit ADP, AMP a také anorganický fosfát P_i . Dýchací řetězec a Krebsův cyklus jsou při nedostatku kyslíku omezeny z důvodu nemožnosti regenerace koenzymu $NADH+H^+$ a prostetické skupiny $FADH_2$. Je nastartována anaerobní glykolýza a i za těchto podmínek zůstává zdrojem energie glukóza, ta je redukována na pyruvát, který je laktátdehydrogenázou přesmyknut na konečný produkt laktát (Štejf, 1998). Tvorba pyruvátu je stále udržována přes hexózomonofosfátový zkrat. Glukóza jako zdroj energie však není energeticky výnosná; z jedné molekuly glukózy se v nepřítomnosti kyslíku získají pouze dvě molekuly ATP. Tento proces je značně nevýhodný, jednak musí být zajištěna větší dodávka glukózy do buňky, což zajistí sympatoadrenální aktivace, ale zároveň vzniká velké množství metabolitů, jako je nahromaděný laktát a H^+ atd. Tvorba ATP anaerobní glykolýzou je ovšem pouze přechodný děj, neboť následkem acidózy dojde k zablokování fruktokinázové reakce (Katz, 1992), která je podporována AMP a P_i . Dalším zdrojem energie je intracelulární glykogen, jehož odbourávání je stimulováno proteinkinázovou reakcí.

V ischemii převládá adrenergní stimulace kardiomyocytů jejímž důsledkem je zvýšená produkce cAMP, které urychluje nejen glykolýzu, ale i vstup glukózy do buňky, stimuluje glykogenfosforylázu k degradaci glykogenu a inhibuje glykogensyntázu. Pokračující ischemie však vede k vyčerpání zásob ATP, PCr a degradaci adeninových nukleotidů (kaskáda degradace : ATP – ADP – AMP – adenosin – hypoxantin).

2.1.2. Poruchy transportu iontů v ischemii

K ireverzibilnímu poškození myokardu nejvíce přispívá porucha rovnováhy iontů, především nárůst koncentrace Ca^{2+} v cytosolu (Schaper, 1979). Stanovení cytosolické koncentrace vápníku je stále ještě mnohdy komplikované a nepřesné. Uváděná hodnota se pohybuje v rozmezí $10^{-7} - 10^{-8}$ mol/l.

Bezprostředně po začátku ischemie dochází ke zvýšení cytosolické koncentrace vápníku, tzv. přetížení buňky vápníkem (Ošťádal a Kolář., 1999). Tento stav je důsledkem sníženého odstraňování vápníku vlivem inhibice aktivity sarkolemálního Na^+/Ca^{2+} antiportu, sarkolemální Ca^{2+} pumpy a Ca^{2+} pumpy sarkoplazmatického retikula. Vyčerpání energetických rezerv kardiomyocytů vede k omezení činnosti iontových pump. V neposlední

řadě i vzniklé volné kyslíkové radikály zhoršují funkci iontových transportních systémů. Nárůst koncentrace vápníku má za následek vznik kontraktlní dysfunkce, metabolické abnormality a posléze buněčnou smrt. Bylo prokázáno, že při blokaci Ca^{2+} kanálů a omezení následného intracelulárního hromadění vápníku, došlo ke snížení ischemického poškození myokardu (Katz, 1992). Vlivem zvýšené koncentrace vápníku uvnitř buňky dochází k depenci K^+ . Na^+ pumpa je inhibována, Na^+ se hromadí v buňce a uniká K^+ . Zvýšená koncentrace Na^+ v cytosolu, stimuluje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport k výměně Na^+ z cytosolu za extracelulární Ca^{2+} .

Pro kardiomyocyt má velké důsledky, pokud dojde ke změnám na membránách během ischemie. Nedostatek kyslíku se projeví hlavně na složení membrány. Dojde k aktivaci buněčných fosfolipáz a to především A_2 a C, které štěpí membránové fosfolipidy na amfifilní lyzofosfolipidy a na signální molekuly („druhé posly“). Nahromadění lyzofosfolipidů vede ke změnám membránové permeability a ke vzniku ischemických arytmií.

2.1.3. Funkční změny myokardu v průběhu ischemie

Mezi tyto změny můžeme zařadit jednak poruchy kontraktlní funkce, jednak poruchy rytmu – arytmie.

2.1.3.1 Poruchy kontraktlních funkcí myokardu

Při ischemii přistupuje k nedostatku kyslíku i pokles přívodu substrátu a zhoršené odplavování metabolických zplodin. Acidóza pak přispívá k rychlému metabolickému, funkčnímu, i strukturnímu rozvratu. Již několik sekund po přerušení dodávky kyslíku do určité oblasti myokardu dojde k desynchronizaci kontrakcí mezi ischemickou tkání a zbytkem myokardu. Systolické kontrakce jsou oslabeny nebo vymizí. Okolní myokard kompenzuje tuto regionální dysfunkci hyperkinézi. Důsledkem poklesu kontraktility v ischemické oblasti dojde k vyklenutí stěny myokardu, neboť selhávající okrsek není schopen odolávat vnitřní tlak. Vlivem vyčerpání zásob ATP dojde ke hromadění vápenatých iontů v cytosolu. Tyto trvalé změny vedou k poruchám svalové relaxace v důsledku nedostatku energie potřebné pro uvolňování aktino-myozinového komplexu sarkomer. Neúplná relaxace

má za následek postupný vzestup nitrokomorového tlaku na konci diastoly a poruchy kontraktury (Danielssen et al., 1991).

2.1.3.2. Arytmie v průběhu ischemie

Hlavními arytmogenními mechanismy jsou abnormality ve vzniku podráždění a jeho vedení (Miller a Pless, 1991). Patří sem změny normální automacie, spouštěná („triggered“) aktivita, návratné podráždění („reentry“) a vznik blokad na různých úrovních převodního systému srdce.

Narušení iontové homeostázy vede k výkyvu hodnot klidového membránového potenciálu, změnám konfigurace akčního potenciálu a mění se refrakterita postižené oblasti. Zvyšuje se odpor na membráně a dochází ke snížení rychlosti depolarizace. V centru infarktového ložiska je refrakterita buněk k podráždění prodloužena, na periférii zasažené oblasti je refrakterní fáze zkrácena a to i na dobu kratší než je doba potřebná k obnově dráždivosti v intaktní tkáni. Důsledkem těchto změn je vznik komorových komplexů, které přecházejí do závažných, životu ohrožujících forem komorových arytmí (tachykardie, fibrilace) (Štejfa, 1998).

2.1.3.3. Letální buněčné poškození

Změny na buněčné úrovni se dostávají bezprostředně po vzniku ischemie. Jde o celý komplex dějů, které spolu souvisejí a navazují na sebe. S přibývajícím dobou trvání ischemie roste závažnost a množství funkčních a ultrastrukturálních změn, které vyústí v ireverzibilní buněčné poškození. Kardiomyocyty odumírají a v postižené oblasti vzniká infarktové ložisko. Změny vyvolané sníženou dostupností kyslíku, byly popsány výše, další děje jako je acidifikace buňky, přetížení vápenatými ionty, zvýšení osmolarity cytozolu, ztráta kontroly mitochondriální respirace, otok mitochondrií a edém celé buňky jsou příčinou letálního buněčného poškození. Poškození membrán vede k uvolnění lytických enzymů, dochází k autolýze a ruptuře buňky (Hearse, 1979).

Klinicky se letální buněčné poškození diagnostikuje přítomností některých intracelulárních enzymů v krevním séru. Jedná se o myokardiální kreatinkinázu (CK) s maximální koncentrací v séru první den a laktát dehydrogenázu (LDH) s maximální

koncentrací v séru třetí až pátý den (Silbernagel a Lang, 2001). Množství LDH v séru se u dospělého jedince pohybuje za fyziologických podmínek do 7,5 $\mu\text{kat/l}$ a fyziologická hodnota CK je u žen do 2,0 $\mu\text{kat/l}$ a mužů 4,0 $\mu\text{kat/l}$ (Wágner, 2000).

2.2. Reperfuční poškození

Ischemie delšího trvání vede k ireverzibilním změnám myokardu. Proto je zapotřebí co nejrychleji obnovit průtok krve (reperfuze) v poškozené oblasti myokardu, z terapeutického hlediska nejnázne trombolýzou nebo invazivně angioplastikou. Pokud během ischemie ještě nedošlo k ireverzibilnímu poškození srdce, vše se vrátí do normálu a myokard může být zachráněn.

Reperfuze zahájena po delší době ischemie, tj. v době, kdy energetické zásoby kardiomyocytů jsou již vyčerpány, kdy došlo k velkému vzestupu cytosolické hladiny vápníku, k osmotickému rozvratu a k vyčerpání antioxidačních kapacit tkáně, může paradoxně vést k poškození i těch buněk, které ještě neodumřely a byly potenciálně léčitelné (Ošťádal, 2005). Reperfuze vede k obnově přísunu kyslíku do mitochondrií, transportní systém elektronů je však narušen, takže se vytvoří velké množství ROS, které převládnu nad přirozenými antioxidačními pochody (oxidační stres) (Zweier a kol., 1987) a dále poškozují membrány a ostatní buněčné komponenty (kyslíkový paradox). Reperfuční poškození je spojeno s produkcí protizánětlivých cytokinů IL-6, IL-8 (Klener a kol. 1997) a oxidací DNA, peroxidací lipidů a aktivaci procesů, které vedou k apoptóze. Dochází ke kontraktuře a zvětšení objemu buněk až o 20 % z důvodů hromadění sodíku a vody, za současné ztráty draslíku a hořčíku, dochází k osmotickému šoku a náhlým snížením pH. Objevují se poruchy mikrocirkulace způsobené poškozením cévního endotelu (Štejf, 1998).

Za reperfuční poškození jsou zodpovědné především dva faktory, a to prudký vzestup kyslíkových radikálů (viz dále) a nekontrolovaný vzestup vápníku v cytozolu (vápníkové přetížení). Při obnově perfuze dochází dochází k masivnímu vstupu Ca^{2+} do buňky, což má za následek mnoho dějů, v jejichž důsledku dojde k aktivaci kontraktilního aparátu. Ca^{2+} se trvale váže na kontraktilní protein a vzniká ireverzibilní kontraktura. K tomuto poškození přispívá deficit ATP. Mitochondrie vlivem vysoké koncentrace Ca^{2+} snižují produkci ATP a nedostatek energie dále ovlivňuje funkčnost na ATP závislých enzymů. Při vápníkovém přetížení buňky dochází vlivem nedostatku Ca^{2+} v extracelulárních

prostředích k porušení mezibuněčných spojení, což vede k poruchám vedení vzruchů – k arytmiím. Důvodů proč dochází k vápníkovému poškození je několik : jednak dojde k poškození glykokalyxu, který udržuje normální permeabilitu pro Ca^{2+} , dále k poškození sarkolemálního Ca^{2+} kanálu, který následně propouští větší množství vápníku a v neposlední řadě také zvýšené pasivní propustnosti pro Ca^{2+} ionty.

Častým rysem radikálových přeměn v buňce je potenciace reaktivity vznikajících forem kyslíku. Hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) je nejreaktivnější a má nejkratší poločas rozpadu (10^{-9} s) (Zima et al., 1995). Reaguje s purinovými a pyrimidinovými bázemi nukleových kyselin (Soška, 1993). Velice citlivé k radikálovému poškození jsou membránové fosfolipidy. Lipoperoxidací jsou nenasycené mastné kyseliny přeměňovány na hydroperoxydy, lipoperoxidy, různé cytotoxické aldehydy a jiné produkty a deriváty. Tyto látky mohou narušit dvouvrstvou membránu a poškodit membránové bílkoviny a dále membránový enzymový aparát. Tím se mění permeabilita a stabilita membrány.

Z funkčního hlediska můžeme reperfuzní poškození myokardu rozdělit do dvou projevů :

- A) Letální reperfuzní poškození, kdy dochází k ireverzibilnímu poškození kardiomyocytů, které byly na počátku reperfuze vlivem ischemie poškozeny jen reverzibilně.
- B) Stunning (omráčení), kdy reverzibilně poškozený myokard v důsledku ischemie vykazuje v průběhu reperfuze dlouhodobě nižší funkční schopnosti oproti kontrolnímu stavu před ischemií, přestože došlo k úplnému či téměř úplnému obnovení koronárního průtoku.

2.3. Kardioprotekce

Možností jak snížit následky poškození způsobené ischemií a následnou reperfuzí, je hledání kardioprotektivních mechanismů. Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu Akademie věd se již dlouhou řadu let zabývá protektivními mechanismy chronické hypoxie, preconditioningem a také na draslíku závislými kanály. Dvěmi naposledy zmíněnými mechanismy se budu ve své práci také zabývat.

Jedním z nejsledovanějších protektivních jevů je ischemický preconditioning (PC), který byl objeven v druhé polovině 80. let a bylo na toto téma publikováno několik tisíc prací. Je definován jako krátkodobá adaptace myokardu na ischemický stres, vyvolaná předcházející krátkou periodou ischemie spojenou s reperfuzí (krátká ischemie myokardu spojená

s reperfuzí dočasně chrání srdce proti následující ischemii) (Murry et al., 1986). Jedná se o endogenní myokardiální protekci, při které se stává myokard rezistentnějším na ischemii. Rozeznáváme časný a pozdní preconditioning. Časný je krátkodobý, v ischemických buňkách prudký pokles koncentrace ATP způsobí otevření draslíkových kanálů závislých na ATP. Zvyšující se koncentrace adenosinu stimuluje adenosinové receptory, které pomocí G proteinu aktivují proteinkinázy. PKC je translokována jednak do buněčných jader, kde exprimuje produkci kardioprotektivních proteinů. Tyto děje jsou podkladem pozdního preconditioningu, který nastává za 24 hodin a jeho účinek je prodloužený. Jsou stimulovány stresové proteiny, které inhibují vápníkové kanály, stabilizují kontrakci, omezují rozsah kontraktilní dysfunkce a působí antiarytmicky; pozdní PC snižuje především výskyt nejzávažnějších arytmií, tj. komorových tachykardií a fibrilací. (Piacentini et al., 1993; Lawson a Hearse, 1996)

2.3.1. Draslíkové kanály závislé na ATP

Jak je patrné z předešlé kapitoly v kardioprotekci mají značný význam draslíkové kanály závislé na ATP. Tyto kanály byly popsány v různých tkáních – ve veškeré svalovině, v pankreatu, ledvinách atd. včetně mozkové tkáně. Ovšem jejich úloha není, jak by se na první pohled zdálo, ve všech těchto tkáních stejná, jak nám podrobně ukazuje tabulka č. 1

Typ tkáně	Úloha
srdeční sval	modulace akčního potenciálu
kosterní sval	regulace excitability
hladký sval	kontrola cévního tonu
hypofýza	sekrece růstového hormonu
hypotalamus	kontrola chutě k jídlu
β -buňky pankreatu	kontrola sekrece inzulínu

Tabulka č. 1: Úloha K_{ATP} kanálů v různých tkáních

V roce 1983 byly také objeveny v srdeční svalovině a prokázalo se, že tyto kanály jsou důležité v mnoha regulačních kaskádách a to jak v excitabilních tak v neexcitabilních

buňkách (Nichols, Lederer, 1991). Velice důležitým poznatkem, který přitáhl pozornost vědců, byl fakt, že aktivace K_{ATP} kanálů za ischemických nebo hypoxických podmínek má kardioprotektivní účinek. Dodnes však není toto protektivní působení kanálů vysvětleno.

2.3.1.1. K_{ATP} kanály v srdci

V srdeční tkáni se vyskytují K_{ATP} kanály dvou podtypů : první je lokalizován v sarkolemě ($sarcK_{ATP}$) a druhý se nachází na vnitřní mitochondriální membráně ($mitoK_{ATP}$). Jako první byly popsány povrchové sarkolemální kanály (Noma, 1983) již před více než dvaceti lety. Mitochondriální kanály byly objeveny až později (Inoue et al., 1991). $SarcK_{ATP}$ se vyskytují v kardiomyocytech ve velkém množství - 3000 až 5000 kanálů na jeden kardiomyocyt. Nacházejí se v síních, komorách a v buňkách převodního systému, vyznačují se vysokou vodivostí pro K^+ ionty. $MitoK_{ATP}$ mají mnohem menší hustotu zastoupení a také nižší vodivost pro K^+ ionty.

2.3.2.2. Molekulární struktura K_{ATP} kanálů

Dnes je uspokojivě objasněna pouze struktura $sarcK_{ATP}$ kanálů, struktura $mitK_{ATP}$ kanálů zatím není známá, i když existuje několik představ o jejich složení.

U $sarcK_{ATP}$ se jedná o oktamer složený ze dvou tetramerních podjednotek a to sulfonylureového receptoru SUR a vlastního draslíkového kanálu, složeného z Kir podjednotek. SUR je protein zodpovědný za regulaci kanálů. Patří do rodiny transmembránových proteinů, obsahujících ATP-vazebnou doménu, nazývaných také ABC transportéry. SUR i Kir podjednotky mohou být různého typu. U $sarcK_{ATP}$ kanály se jedná o podjednotky SUR 2A (čtyři podjednotky) (Aguilar-Bryan, 1995), které reagují na koncentraci ATP a Kir 6.2 (čtyři podjednotky) (Inagaki et al., 1995), které formují K^+ selektivní pór v membráně. Byly popsány také další izoformy zmíněných podjednotek a to SUR1/Kir 6.2 na β -buňkách pankreatických ostrůvků nebo SUR2B/Kir 6.1 přítomných v hladké svalovině cévní stěny.

2.3.2.3. Regulace K_{ATP} kanálů

Regulace K_{ATP} kanálů je velice složitá a ovlivňuje ji mnoho faktorů. Za fyziologických podmínek jsou K_{ATP} kanály inhibovány vysokou intracelulární koncentrací ATP, které je vázáno na inhibiční místo na cytozolické straně kanálu. K této inhibici není zapotřebí fosforylace kanálu. Kromě ATP se na regulaci podílejí také ADP a jiné nukleotidy (GDP, UDP), které snižují afinitu kanálu k ATP. Není zatím prokázáno, jak tyto nukleotidy zabrání inhibičnímu působení ATP. Také látky, aktivující receptory spřažené s G-proteiny (adenosin, acetylcholin), aktivují K_{ATP} kanály v kardiomyocytech (Toombs et al., 1993). Na aktivaci K_{ATP} kanálů se podílejí také ionty H^+ nebo laktát. Pokles pH v buňce snižuje citlivost K_{ATP} kanálů k inhibičním účinku ATP. Další možnou regulací je regulace pomocí fosforylace proteinkinázou A, proteinkinázou G nebo C. Úloha jednotlivých kináz je v různých tkáních odlišná. V srdeční svalovině proteinkináza C působí stimulačně, ale v ostatní kosterní svalovině inhibičně (Garlid et al., 2003).

2.3.3.4. K_{ATP} kanály a farmakologie

Tyto kanály jsou selektivně inhibovány deriváty sulfonylurey a aktivovány jsou skupinou látek nazývanými aktivátory K_{ATP} kanálů. Deriváty sulfonylurey, jsou látky stimulující sekreci inzulínu. Aktivátory K_{ATP} kanálů jsou látky různého chemického složení, např. diazoxid, pinocidil atd.

Farmakologicky lze obě izoformy K_{ATP} kanály odlišit. Mito K_{ATP} kanály, kterými se okrajově zabývá má diplomová práce, jsou selektivně aktivovány diazoxidem, ke kterému mají 2000 krát větší citlivost než sarc K_{ATP} kanály (Garlid et al., 1996). Také se v poslední době začal používat vysoce účinný selektivní aktivátor mito K_{ATP} kanálů, BMS-191195 (Neckář a kol., 2002).

Jako selektivní inhibitor mito K_{ATP} kanálů se nejčastěji používá 5-hydroxydekanoát (5-HD), který ovšem složením nepatří mezi deriváty sulfonylurey.

2.3.2.5 Význam K_{ATP} kanálů v kardioprotekci

Zatím nezodpovězenou otázkou je, jakým mechanismem přispívají mito K_{ATP} kanály ke vzniku ischemické odolnosti myokardu. V současnosti existují tři hlavní hypotézy, které se pokoušejí tento mechanismus vysvětlit. První hypotéza předpokládá, že vstup K^+ mito K_{ATP} kanály do matrix mitochondrií způsobí mírné snížení napětí vnitřní mitochondriální membrány, což sníží vstup Ca^{2+} do mitochondrií během ischemie a zabrání jejich následnému přetížení Ca^{2+} (Holmuhamedov et al., 1998 a 1999). Mírná depolarizace membrány může zároveň omezovat tvorbu kyslíkových radikálů v reperfuzi, kdy jsou jejich účinky škodlivé. Další hypotéza předpokládá, že hlavní úloha otevření mito K_{ATP} kanálů spočívá v regulaci objemu mitochondriální matrix, který je důležitý pro udržení architektury mezimembránového prostoru a účinného přenosu energie mezi mitochondrií a buněčnými ATP-ázami (Garlid, 2000). Třetí hypotéza, předpokládá, že otevření mito K_{ATP} kanálů vede k produkci volných kyslíkových radikálů (ROS) v mitochondriích, které pak aktivují kardioprotektivní mechanismy (Pain et al., 2000). V současné době není jasné, které z výše uvedených představ je blíže skutečnosti.

2.4. Co jsou kyslíkové radikály (ROS)

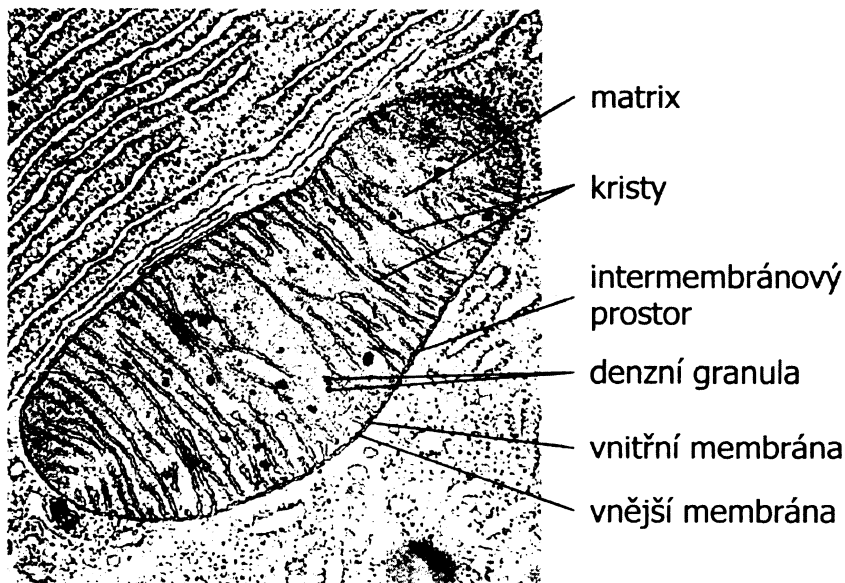
Volné kyslíkové radikály jsou atomy nebo molekuly, které obsahují v elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Hlavní nebezpečí existence těchto radikálů spočívá v tom, že se snaží doplnit si chybějící elektron z okolních molekul, čímž tyto molekuly mění na sekundární radikály a reakce se řetězově šíří. Volné radikály reagují prakticky s každým typem molekul v buňkách a tím je poškozují na všech úrovních. Převážná část volných radikálů vzniká v organismu z molekulárního kyslíku. Hlavní část přijatého kyslíku se redukuje v dýchacím řetězci v mitochondriích za vzniku ATP; zbytek molekulárního kyslíku se podílí na vzniku superoxidu, který pak dále kumuluje na další reaktivní formy, z nichž nejškodlivější jsou hydroxylové radikály a peroxyinitrit. Kyslíkové radikály však nevznikají jen v mitochondriích, ale v cytozolu v řadě buněčných reakcí.

2.4.1. Signální ROS a kardioprotekce

Jak bylo řečeno v kapitole 2.3.2.5. mohou ROS kromě svých toxických účinků fungovat i jako signální prvky v protektivní kaskádě preconditioningu (PC). Mechanismus této protekce není zatím úplně objasněn, ale je dokázána zvýšená produkce signálních ROS vyvolaná PC (Oldenburg et al, 2002) a to jak ischemickým PC nebo PC vyvolaným farmakologicky (Brennan, 2006). Předpokládá se, že otevření mitoK_{ATP} kanálů vede ke zvýšené produkci signálních ROS (viz předešlé kapitoly) a to pravděpodobně v komplexu III transportního řetězce elektronů. Signální ROS aktivují kinázy, které pak zprostředkují přenos signálu až ke konečným strukturám, které jsou zodpovědné za zvýšenou odolnost k ischemickému poškození. Podle aktuálních představ by aktivace mitoK_{ATP} kanálů a mírný vtok K⁺ do matrix způsobil mírnou depolarizaci mitochondriální membrány a v důsledku toho by se produkovalo méně škodlivých radikálů v reperfuzi.

2.4.2. Význam mitochondrií v kardioprotekci

Jak vyplynulo z předešlých kapitol, důležitou úlohu v ischemické odolnosti hrají mitochondrie. Mitochondrie jsou orgány oválného tvaru s variabilní velikostí. V buňkách jsou větveny do složitých retikulárních sítí, vykazujících značnou fluiditu. Struktura mitochondrie je maximálně uzpůsobena hlavní funkci – produkci ATP. Od cytoplazmatického okolí je oddělena dvojitou membránou: vnější, která je propustná pro proteiny do velikosti 5000 Da, a vnitřní, která vymezuje prostor pro mitochondriální matrix a je propustná pouze prostřednictvím specifických transportních proteinů. Vnitřní membrána, na které se nacházejí enzymy oxidativní fosforylace, je tvořena kristami, které zvětšují efektivní povrch pro energetickou přeměnu. Tvar a počet krist je různý a odpovídá intenzitě oxidativního metabolismu v dané buňce – mitochondrie kardiomyocytů mají kristy mnohem hustší než mitochondrie z jiných tkání. Matrix obsahuje především enzymy oxidativní fosforylace a β -oxidace mastných kyselin.



Obr. č. 1. Stavba mitochondrie

2.4.2.1 Membránový potenciál mitochondrií

Aby mohl fungovat respirační řetězec, musí ho tvořit čtyři proteinové komplexy (I, II, III, IV), jejichž úkolem je přenos elektronů z FADH₂ a NADH na konečný akceptor – kyslík. V průběhu transportu elektronů na kyslík pumpují respirační komplexy I, III a IV protony z matrix přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru a na membráně tak vzniká negativní protonový gradient, ten je hlavní součástí mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), jehož velikost charakterizuje energetický stav mitochondrie. Protonový gradient je hybnou silou syntézy ATP. Produkce ATP v mitochondriích probíhá na principu elektrochemického spřažení.

2.4.2.2. Princip odpřažení – UCP

Odpřahovací proteiny (UCP) tvoří podskupinu mitochondriálních ROS transportních proteinů a jsou pravděpodobně odvozeny z protonových/aniontových kanálů. Tyto kanály se ve velkém procentu podílejí v mechanismu tvorby signálních a buněčné antioxidační obrany (Ishizawa et al., 2006) a to prostřednictvím proteinových komplexů (viz kap. 2.5.2.1). UCP se nacházejí na vnitřní mitochondriální membráně, kde umožňují protonům volný prostup ve směru elektrochemického gradientu zpět do mitochondriální matrix. (Sack, 2006). Tím snižují

mitochondriální membránový potenciál, který využívá ATP syntáza při fosforylaci ADP na ATP. Tato depolarizace by podle posledních výzkumů mohla být podkladem zvýšené ischemické odolnosti díky potlačení tvorby ROS a inhibice oxidačního stresu. Toto odpřažení může být pouze krátkodobé, neboť myokard nemůže získávat dostatečné množství energie jiným způsobem.

V současné době je známo pět podtypů UCP 1 – UCP 5, ale jejich úloha v tkáních se liší. Jako první byl v roce 1976 objeven UCP1; tento protein hraje roli v adaptaci na nízkou teplotu a také v mechanismu obrany proti obezitě. Nachází se výhradně v hnědé tukové tkáni a díky tomu je tato tkáň jediným specializovaným orgánem u člověka, jehož fyziologickou funkcí je regulace tvorby tepla. Do popředí zájmu obezitologů se dostal poté, co byla prokázána stimulace jeho syntézy nadměrným příjmem potravy. Ostatní UCP byly nalezeny v celé řadě tkání, především v bílé tukové tkáni, brzlíku, slezině, ale také v srdci. Mají význam např. v regulaci tělesné hmotnosti (Dulloo, Samec, 2000), ale také v kardioprotekci. Nejvíce v této radikálové ochraně a kardioprotekci hraje roly UCP 2. UCP2 a UCP3 patří do podrodiny, které mají vliv na signální ROS (Canon, et al, 2006). Poslední článek ovšem, který v této oblasti byl publikován se zaměřuje konkrétně na UCP 2 a tvrdí, že exprese tohoto proteinu vede k signifikantnímu poklesu ATP a vývoji acidózy, ale nemá vliv na přežívání buňky (Bodyak et al., 2006).

Jsou exprimovány převážně v kosterní svalovině, v hnědém tuku, bílé tukové tkáni atd.

2.5. Odřažení oxidační fosforylace a kardioprotekce

Význam odřažení oxidační fosforylace v kardioprotekci není ještě doposud zcela objasněna a dosavadní poznatky jsou kontroverzní. Je ovšem prokázáno, že je možné farmakologické odřažení oxidační fosforylace, které by mohlo vést k mírné disipitaci mitochondriálního membránového potenciálu, což má kardioprotektivní účinky. Jako možný odřahovač je možno použít karbonyl cyanid 4-(trifluorometoxy) phenylhydrazon (FCCP). Tato látka výrazně omezuje rozsah infarktu myokardu, avšak působila takto projektivně pouze v úzkém rozhraní koncentrací. Dosud publikované práce ukázaly, že podání nízké koncentrace protonoforu (100 nM) FCCP, před globální ischemií vede ke kardioprotekci, zatímco vyšší koncentrace (300nM) buňku poškodí (Brennan, 2006). Používané koncentrace jsou mnohem nižší ve srovnání s koncentracemi, které se používají v biochemických experimentech k úplnému odřažení oxidační fosforylace a transportu elektronů. Protektivní

spouštěcí mechanismus FCCP zahrnuje signální ROS (kap. 2.5.1.) a jeho důsledkem je omezení produkce škodlivých ROS v reperfuzi. To lze ověřit zablokováním účinku FCCP látkami, které působí jako antioxidanty. Již v zmíněném článku se snaží objasnit mitochondriální odpověď na různou koncentraci FCCP.

3. Cíle práce

Na základě studia dostupných literárních zdrojů byly stanoveny následující cíle diplomové práce :

Zvládnout techniku izolovaného perfundovaného myšního srdce a měření velikosti infarktu myokardu, vystaveného globální ischemii a reperfuzi.

Zjistit, zda delece genu pro odpřahovací protein 2 (UCP2) ovlivní ischemickou odolnost myšního srdce.

Zjistit, zda akutní podání protonoforu FCCP ovlivní ischemickou odolnost myšního srdce a změřit závislost účinku na dávce.

4. Materiál a metody

K pokusům byli použiti dospělí samci myši s delecí genu pro protein UCP2 a jim odpovídající kontrolní zvířata kmene B6. Tyto myši, nám byly poskytnuty dr. Kopeckým z Oddělení tukové tkáně Fyziologického ústavu AVČR.

Ke studiu účinků FCCP byli použiti dospělí samci komerčního kmene ICR od firmy VELAŽ. Jejich průměrná hmotnost se pohybovala v rozmezí 26 – 36 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek v plastových nádobách, které velikostí odpovídají chovným normám. V místnosti, byla udržována stálá teplota (22 ± 2 °C) a střídání tmy a světla v dvanácti hodinovém intervalu. Zvířata byla krmena standardní dietou s volným přístupem k pitné vodě.

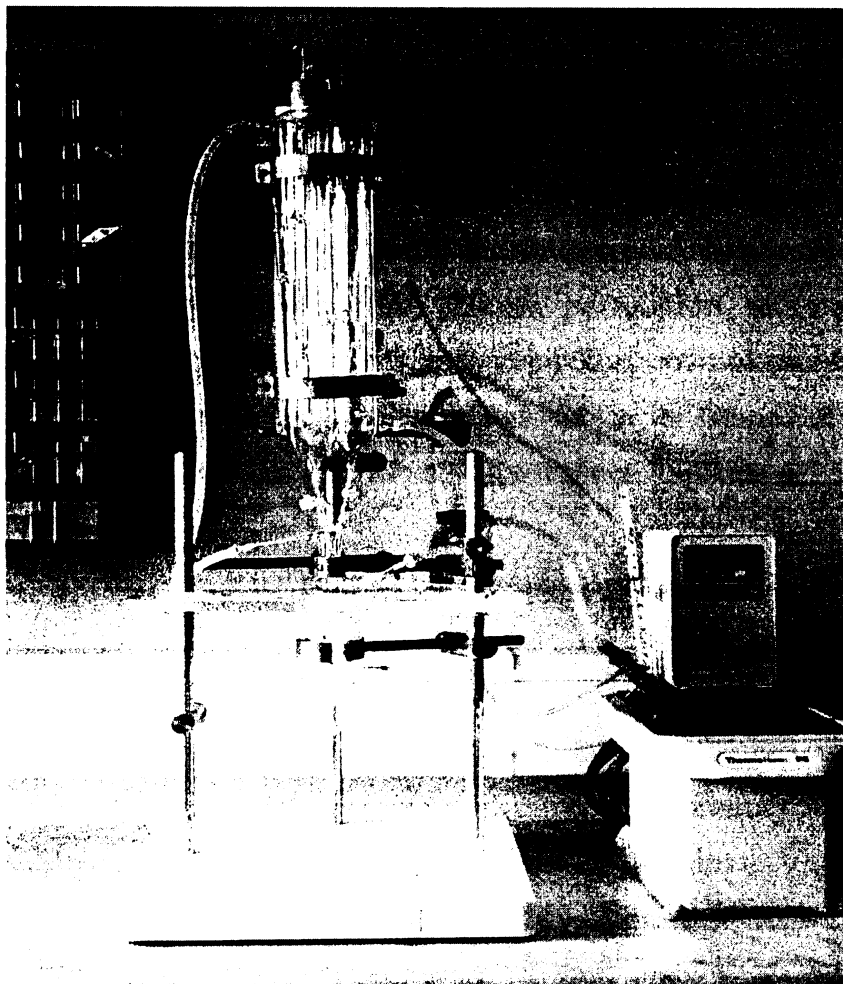
4.1. Perfuze izolovaného myšního srdce

Zvířata jsem anestetizovali jednorázovým intraperitoneálním podáním thiopentalu v dávce 100 mg/kg hmotnosti. Tato dávka byla dostačující pro celkové usnutí zvířete a následné vyjmutí srdce. Thiopental patří do skupiny barbiturátů; tyto látky obecně potlačují aktivitu dechového centra a proto je nutné zvířata sledovat, aby nedošlo k hypoxii ještě před započítím pokusu.

Jakmile bylo zvíře plně anestetizováno, přemístili jsme je na operační podložku a zafixovali. Kůži na hrudníku jsme nastříhli od *processus xiphoides sterna* až k *jugulu* a mírným laterálním tahem odpreparovali pokožku a tím odkryli svalovinu hrudníku. Krátkým stříhem v úrovni bránice otevřeli břišní dutinu a prostříhli bránici. V této fázi již museli velice obezřetně sledovat čas, protože vstupem do hrudní dutiny znemožnili zvířeti dýchání, čímž dochází k hypoxii myokardu. Poté jsme rychle stříhali žebra v laterální úrovni směrem kranálně až k prvnímu žeburu, odklopili hrudní koš a tím odkryli celou hrudní dutinu. Srdce lehce podebrali, povytáhli a vystříhli kolmo k páteři v oblasti horního pólu brzlíku. Ihned po vyjmutí srdce vložili do Petriho misky s vychlazeným perfuzním roztokem, tento roztok je ochlazován kousky ledu. Podchlazení vyjmutého srdce zpomalí průběh následků ischemie a umožní nám prodloužit čas potřebný ke kanylaci aorty. Jemnou preparací odhalili vzestupnou část oblouku aorty a zde odstříhnuli, zároveň odpreparovali kousky plic, popřípadě tukové tkáně a co nejrychleji volný konec aorty nasadili a zafixovali chirurgickým hedvábím na nerezovou kanylu perfuzního systému, z níž pomalu odkapává perfuzní roztok.

Poté, co je srdce zavěšeno na perfuzní kanylu a zafixováno, je přívod perfuzního roztoku úplně otevřen. Od tohoto okamžiku je měřen čas pokusu.

Byl použit perfuzní systému dle Langendorfa pro perfuzi srdce *in vitro* (obr. 4).



Obr. 4 Langendorffův aparát pro perfuzi srdce in vitro

Tato technika je založena na perfuzi koronárního řečiště oxygenovaným a temperovaným (37 °C) krystaloidním roztokem přiváděným retrográdně do aorty. Perfuzní tlak v aortě uzavře aortální chlopeč a tím zabrání vtékání a hromadění krve v levé komoře. Takto může roztok pronikat přímo do koronárního řečiště, které odstupuje z báze vzestupné aorty. Srdeční svalovina je velice dobře vaskularizována a roztok se tedy dostane ke každé buňce. Výhoda perfuze srdce *in vitro* spočívá v jejich izolaci od neurohumorální regulace, což nám umožňuje sledovat odpovědi na úrovni samotného myokardu.

Perfuzi srdce lze provádět ve dvou základních modifikacích: za konstantního tlaku nebo za konstantního průtoku. V našem případě byla použita perfuze za konstantního tlaku. Tlak perfuzního roztoku byl udržován probubláváním oxygenačního plynu (karbogen), což je

směs 95 % O₂ a 5 % CO₂, přes vodní sloupec, ve válci spojeném s uzavřenou nádobou s perfuzním roztokem. Celková výška sloupce kapaliny byla 109 cm, což odpovídá hydrostatickému tlaku 80 mmHg. Celá aparatura dle Langendorfa má dvojitý plášť, který je temperovaný cirkulačním termostatem na teplotu 37 °C. Perfundované srdce je také chráněno od okolí - je umístěno ve skleněné nádobě, která je také temperována.

K perfuzi srdce byl použit modifikovaný roztok Krebs-Henseleitův (složení ukazuje tabulka č. 2); k jeho přípravě byla vždy použita deionizovaná voda. U připraveného roztoku se muselo upravit pH na 7,4. Důležitou podmínkou je připravovat každý den čerstvý roztok, vždy před začátkem pokusu. Tímto roztokem je srdce perfundováno celou dobu pokusu, kromě ischemické periody.

V průběhu pokusu je také měřen koronární průtok, což se provádí zachycením perfuzátu protékajícího srdcem za čas do kalibrované nádoby.

NaCl	NaHCO ₃	KCl	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	Glukóza
118 mM	25 mM	4,7 mM	1,2 mM	1,2 mM	1,25 mM	11 mM

Tabulka č.2. Složení Krebs-Henseleitova pufu

4.2. Experimentální protokol

Experimentální protokol vycházel z postupu, který na Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR zavedla Mgr. Adriana Roháčová. Jako první proběhla stabilizační fáze s dobou trvání dvacet minut. Účelem této periody je docílit rovnovážného stavu tak, aby se funkční parametry srdce již neměnily, to znamená, že srdce mělo normální akci a bylo bez arytmií. Tyto poruchy jsou obvykle vyvolané manipulací ze srdcem při jeho vyjmutí. Na začátku period byl změřen koronární průtok. Od dvacáté minuty byla navozena globální ischemie a to úplným zastavením perfuzního roztoku k srdci. Srdce bylo v této periodě ponořeno v temperovaném roztoku o teplotě 37 °C. Jedná se opět o Krebs-Henseleitův roztok, tentokrát ovšem bez glukózy, který je syčen po celou dobu směsí 95 % N₂ a 5 % CO₂.

Další perioda začíná otevřením přívodu roztoku do aorty a obnovením koronárního průtoku. Na konci reperfuze byl opět změřen koronární průtok.

V poslední fázi pokusu po ukončení reperfuze je stanoven rozsah poškození (velikost infarktu myokardu; kap. 4.4)

4.2.1. Doba ischemie a reperfuze

V první sérii experimentů na srdcích myši kmene B6 byla zvolena doba ischemie 45 min. Jak vyplynulo z předešlých pokusů (Roháčová, 2005), je tato ischemie při pokusech na srdcích kmene ICR dostatečným inzultem k vyvolání ireverzibilních změn. Ukázalo se však, že kmen B6 je k ireverzibilnějšímu poškození odolnější než kmen ICR, a proto byla v další sérii pokusů doba ischemie prodloužena na 55 min. V pokusu, ve kterém byl sledován účinek FCCP na samce kmene ICR, byla doba ischemie 45 min.

Doba reperfuze byla zvolena na 60 min. a to ve všech sériích pokusů. Tato doba je pro naše pokusy plně dostačující.

4.3. Ischemická odolnost myokardu myši s delecí genu pro UCP 2

Experimenty na srdcích těchto myši probíhaly podle výše uvedeného protokolu. Jako kontroly byly použity myši kmene B6. V další sérii pokusů jsme na těchto srdcích testovali úroveň inhibice $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ kanálů. Použili jsme selektivní blokátor těchto kanálů, 5-hydroxydekanoát (5-HD), který byl podáván během 10-min periody před 45-min ischemií. 5-HD byl rozpuštěn ve vodě v koncentraci 10 mM/l a dávkován infuzní pumpou rychlostí 0,05 ml/min postranním infuzním portem, vyvedeným těsně nad aortální kanylou. Při průměrném koronárním průtoku 2 ml/min byla výsledná koncentrace 5-HD v perfuzním mediu 250 $\mu\text{mol/l}$. Na konci periody i během aplikace blokátoru byl měřen koronární průtok.

4.4. Sledování účinků FCCP na ischemickou odolnost myokardu

V dalším pokusu jsme sledovali zda podání protonoforu FCCP ovlivní ischemickou odolnost myšího srdce. Tyto pokusy byly prováděny na srdcích kmene ICR. Nejprve byla zvolena koncentrace, která dle dostupných konkrétních údajů (Brennan, 2006) měla mít protektivní účinek a následně jsme sledovali vliv vyšších a nižších koncentrací a tak sestavili

křivku koncentrační závislosti. Experiment byl prováděn podle výše popsaného protokolu (45-min ischemie). Na konci stabilizační fáze před ischemií byl po dobu 5-min infuzní pumpou podáván protonofor FCCP průtokovou rychlostí 0,03 ml/min. Výsledné koncentrace látky v pufrčním médiu byly 10, 30, 100 a 300 nmol/l. kontrolním srdcím bylo stejným způsobem podáváno rozpouštědlo v odpovídající koncentraci. Jako rozpouštědlo pro FCCP byl použit čistý etanol.

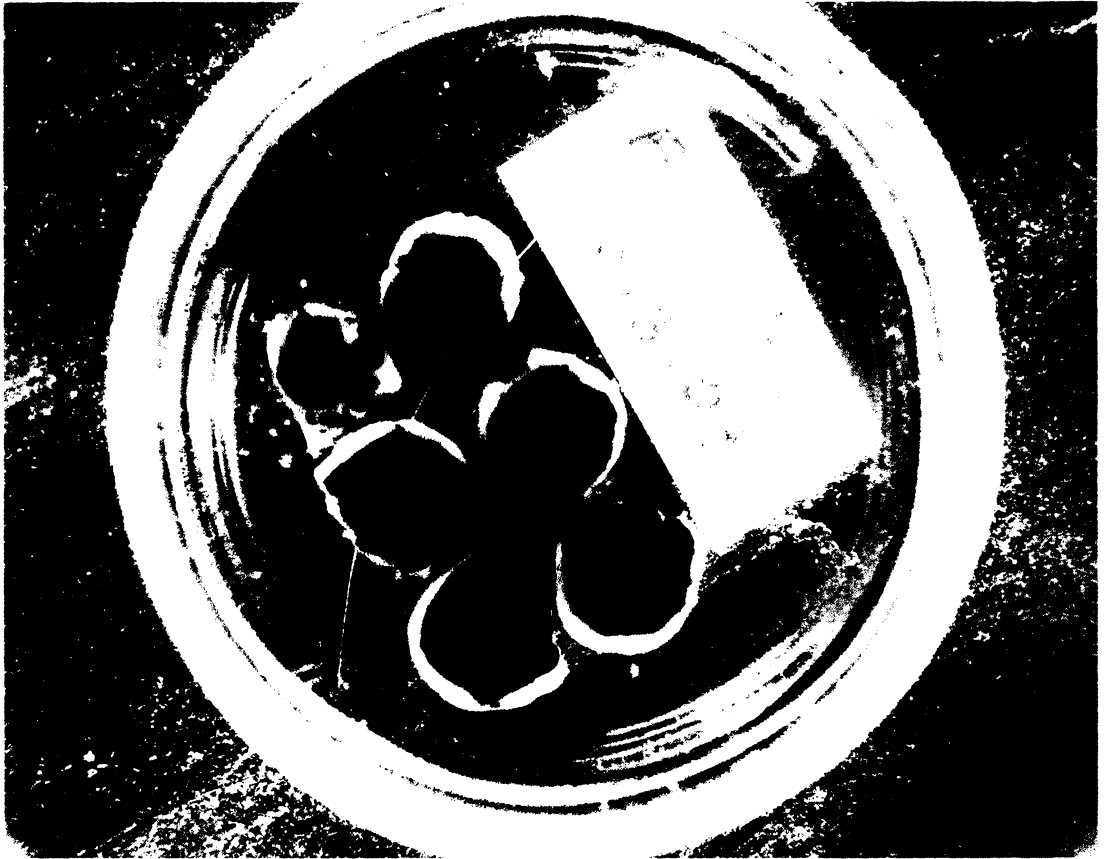
4.5. Stanovení velikosti infarktu myokardu

Ke stanovení rozsahu ischemicko–reperfučního poškození myokardu jsme zvolili měření velikosti živé srdeční tkáně obarvené tetrazoliovými solemi. Srdce bylo ihned po skončení pokusu propláchnuto za pomoci injekční stříkačky 2 ml 1% roztoku TTC (2,3,5-trifenyltetrazolium), který byl připraven vždy každý den před pokusy rozpuštěním TTC ve fosfátového pufru. Roztok TTC se aplikuje do aortální kanyly. TTC účinně reaguje s buněčnými dehydrogenázami za vzniku nerozpustné barevné sloučeniny formazanu (Klein et al, 1981). Buňky, které nemají poškozený enzymatický aparát reagují s tetrazoliem a obarví se červeně. Buňky, které jsou již poškozené a dehydrogenázy již nemohou s tetrazoliem reagovat, zůstanou neobarvené. Srdce bylo po propláchnutí roztokem TTC, do tohoto roztoku ještě ponořeno na 30 minut při teplotě 37 °C. Po dokonalém obarvení bylo srdce ponořeno na dalších 24 hodin do 10 % formalínu, kdy došlo ke zvýraznění nekrotických oblastí. Fixace ve formalínu umožnila i snadnější krájení srdce na řezy.

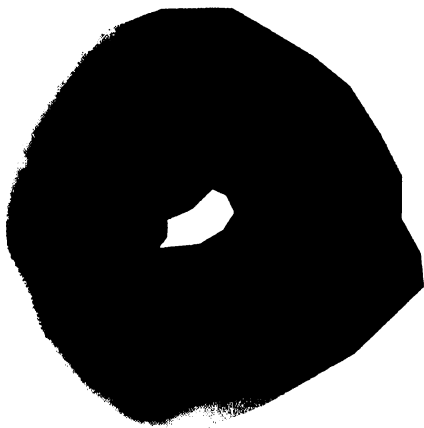
Takto obarvené a fixované srdce bylo zbaveno síní a pravé komory a levá komora byla nakrájena na 0,75 mm řezy kolmo k dlouhé ose komory (obr. č. 5). Tyto řezy byly z obou stran nafoceny digitálním fotoaparátem (Olympus C4040 Zoom) a upraveny programem pro zpracování fotografií (Adobe Photoshop 7.0) (obr. č. 6). Jednotlivé řezy byly analyzovány planimetry pomocí programu Elipse (obr. č. 7), vyvinutého ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Velikost infarktu byla vyjádřena v procentech velikosti levé komory.

4.6. Statistické zpracování výsledků

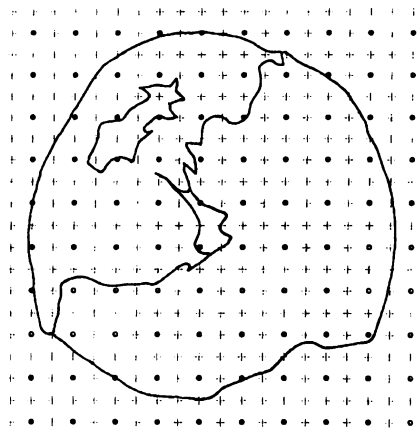
Výsledky jsou prezentovány jako průměry \pm střední chyba průměru (SEM). Byl použit t-test. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na hladině $p < 0,05$. Veškeré výsledky jsou zpracovány v programu Excel.



Obr. 5 Řezy srdce po nafocení



Obr. 6 Řez srdce po zpracování v programu Adobe Photoshop 7.0



Obr. 7 Ukázka analýzy infarktu myokardu v programu Elipse

5. Výsledky

5.1. Ověření odolnosti myšího srdce k ischemickému poškození

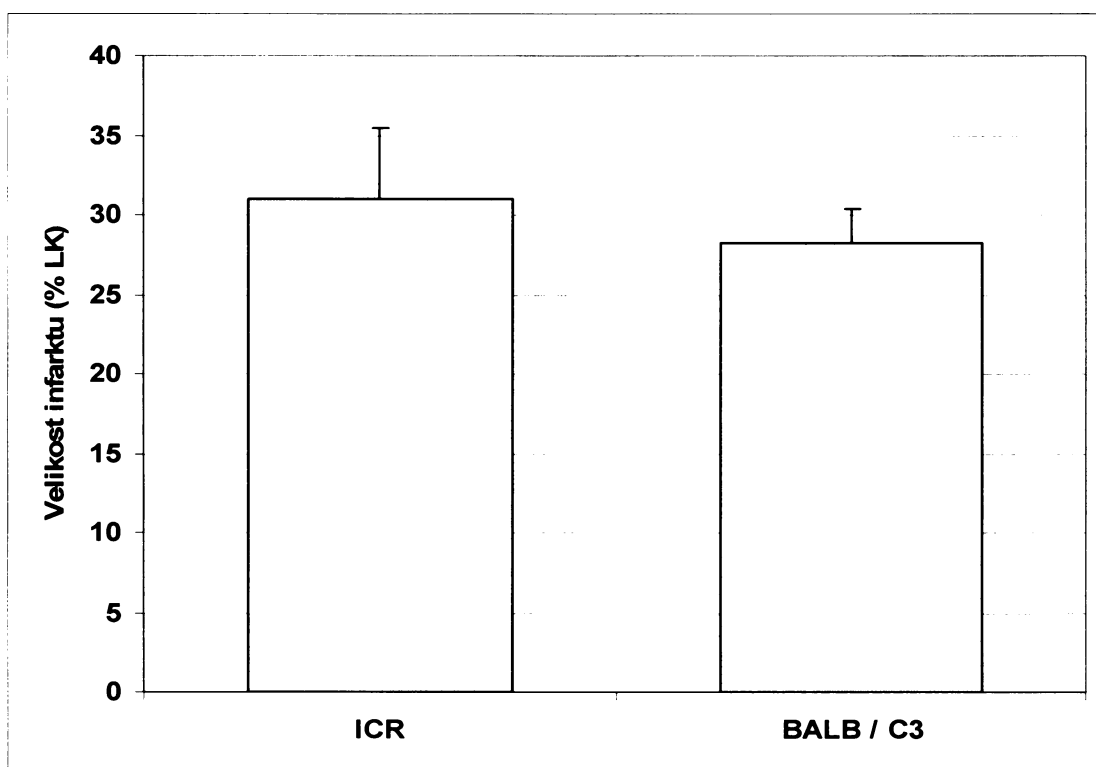
Prvním úkolem bylo ověřit pokusy Mgr. Adriany Roháčové, zda kmen, bude stejně citlivý k ischemickému poškození, při použití modelu 45 min ischemie, jako v jejím případě.

Byly testovány dva kmeny myši a to kmen ICR a kmen BALB/C3. Vždy se jednalo o stejně staré (3 měsíční) samce.

Výsledky dokumentuje tabulka č. 3 a graf č. 1 :

	ICR	BALB/C3
počet zvířat	7	7
hmotnost těla (g)	39 ± 1,04	28 ± 0,40
KP výchozí (ml/min)	2,3 ± 0,10	2,1 ± 0,04
KP v reperfuzi (ml/min)	2,2 ± 0,08	2,0 ± 0,04
velikost infarktu (% LK)	31 ± 4,4	28 ± 2,24

Tabulka č. 3 . Hmotnost těla, koronární průtok (KP) a velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) u myši kmenů ICR a BALB/C3, počet zvířat.



Graf č. 1. Velikost infarktu myokardu vyjádřena v procentech levé komory u myších kmenů ICR a BALB/C3.

Velikost infarktu byla u kmene ICR v průměru 31 %, což je velmi podobné údajům, které ve svých experimentech měla Roháčová (2005). Ischemická citlivost samců kmene BALB/C3 se od kmene ICR výrazně nelišila.

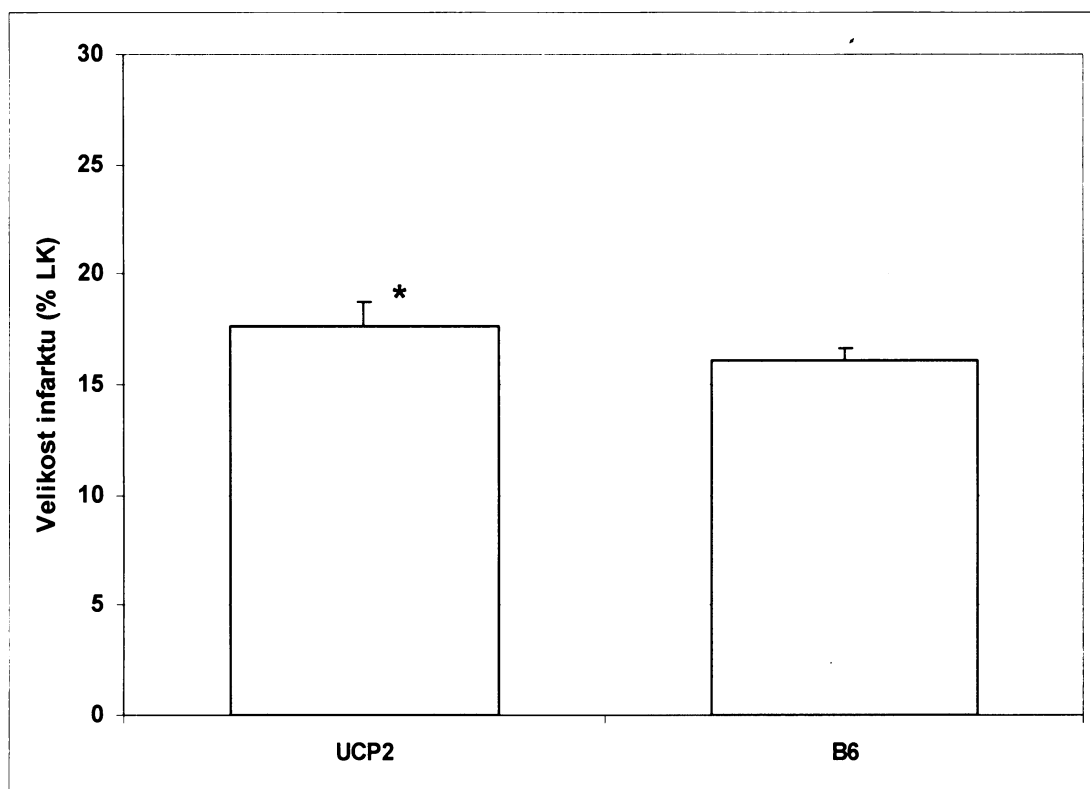
5.2. Ischemická odolnost myokardu myši s delecí UCP 2

V tomto pokuse byl použit kmen myši s delecí genu pro tento protein a odpovídající kontroly kmene B6. Vzhledem k úloze UCP v produkci kyslíkových radikálů jsme předpokládali, že myši s delecí tohoto genu budou citlivější k ischemckému poškození. Tento předpoklad se však nepotvrdil.

Výsledky dokumentuje tabulka č. 4 a graf č. 2 :

	UCP 2	B6
počet zvířat	9	8
hmotnost zvířat (g)	34 ± 0,67	32 ± 0,25
KP výchozí (ml/min)	2,3 ± 0,08	2,2 ± 0,07
KP v reperfuzi (ml/min)	2,2 ± 0,08	2,0 ± 0,05
velikost infarktu (% LK)	18 ± 1.11*	16 ± 0.53

Tabulka č.4 . Hmotnost těla, koronární průtok (KP) a velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK), u UCP 2^(-/-) a kontrol B6, počet zvířat, *P < 0,05 versus kontoly B6.



Graf. č.2. Velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) u UCP 2^(-/-) a kontrol B6, *P < 0,05 versus kontoly B6.

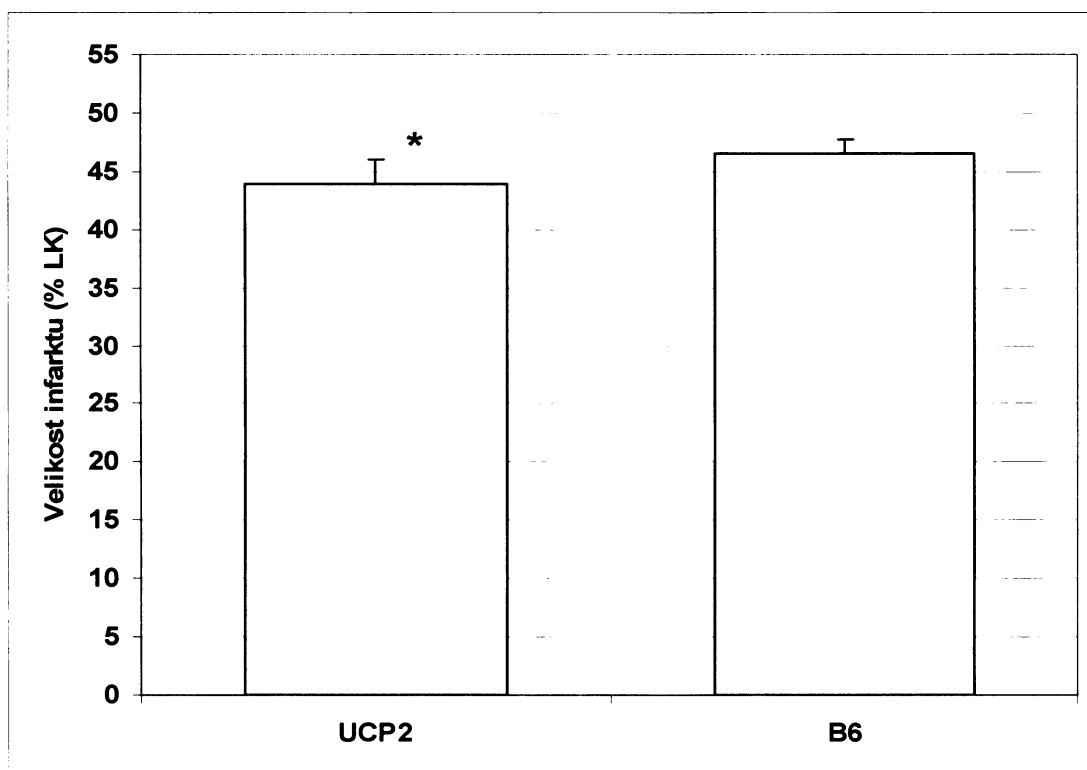
Jak je patrné z tabulky č. 4 a grafu č. 2 jsou rozsahy infarktu myokardu u myši s delecí genu pro UCP 2 protein a kontrol B6 téměř shodné. Rozsah infarktu byl v rozmezí 15 – 20 % velikosti LK a to jak u myši s delecí genu, tak u kontrol. Zdá se tedy, že tento kmen je vůči ischemii odolnější než kmeny ICR, kde se velikost infarktu pohybovala nad 30 %.

Vzhledem k tomu, že rozsah poškození byl poměrně malý, prodloužili jsme ischemickou periodu ze 45 min na 55 min. Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda předpokládaný rozdíl ischemické odolnosti obou skupin by se mohl projevit při větším stupni poškození.

Výsledky dokumentuje tabulka č. 5 a graf č. 3 :

	UCP 2	B6
počet zvířat	8	7
hmotnost zvířat (g)	34,5 ± 0,37	34 ± 0,29
KP výchozí (ml/min)	2,3 ± 0,06	2,2 ± 0,03
KP v reperfuzi (ml/min)	2,1 ± 0,06	2,1 ± 0,06
velikost infarktu (% LK)	44 ± 2,06*	47 ± 1,22

*Tabulka č. 5 . Hmotnost těla, koronární průtok (KP) a velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) u UCP 2^(-/-) a kontrol B6 po prodloužení ischemie na 55 min, počet zvířat, *P < 0,05 versus kontroly B6.*



Graf. č. 3. Velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) u UCP 2^(-/-) a kontrol B6 po prodloužení ischemie na 55 min, * $P < 0,05$ versus kontroly B6.

Jak je patrné z tabulky č. 5 a grafu č. 3, prodloužení ischemie o 10 min vedlo ke zvětšení infarktu na 45 %. Ani v této situaci jsme však nezaznamenali žádný rozdíl ve velikosti infarktu myokardu mezi UCP 2^(-/-) a kontrolami B6.

5.2.2. Vliv inhibitoru mitoK_{ATP} kanálů

Výše uvedené výsledky lze vyvodit dvěma způsoby; buď UCP 2 protein nehraje v ischemické odolnosti myokardu významnou úlohu nebo je chybění tohoto proteinu kompenzováno jinými mechanismy.

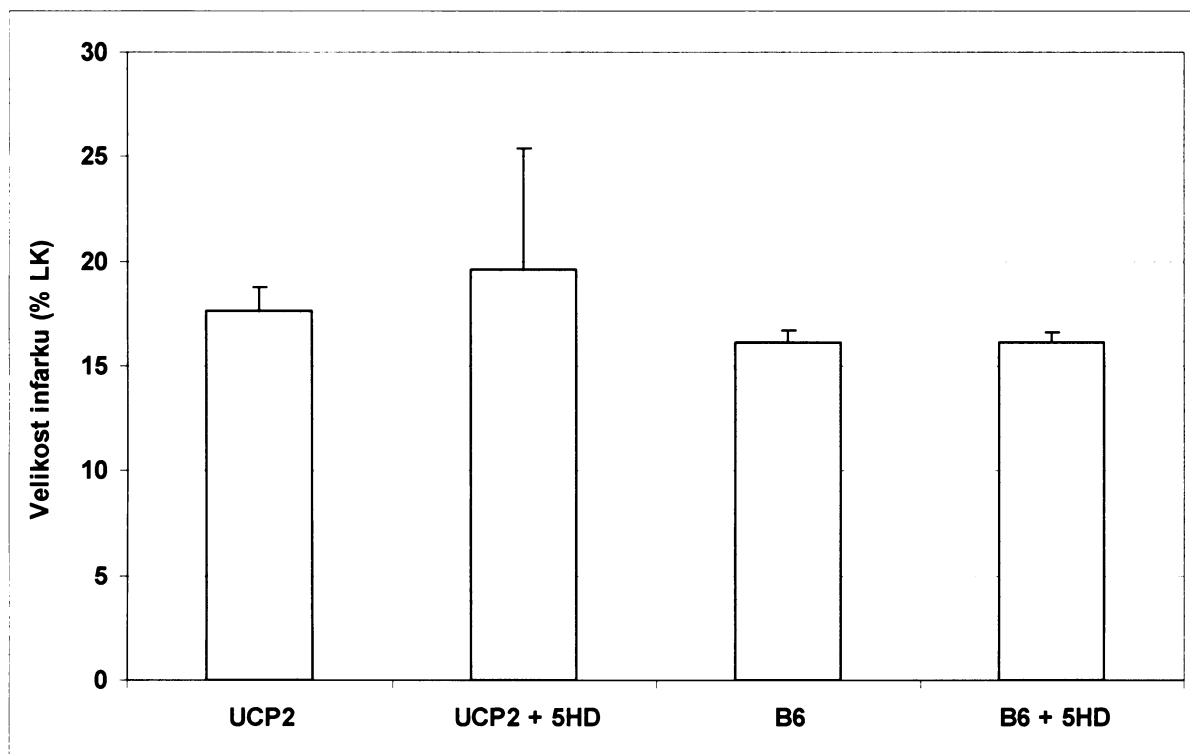
Jednou z možností je aktivace mitoK_{ATP} kanálů na vnitřní mitochondriální membráně, která by mohla vést k její depolarizaci a tím chránit myokard před poškozením, takže chybění UCP 2 by se nemohlo projevit.

Proto jsme použili inhibitor těchto kanálů 5-HD.

Výsledky dokumentuje tabulka č. 6 a graf č. 4:

	UCP 2	UCP2 + 5 HD	B6	B6 + 5 HD
počet zvířat	9	7	8	8
hmotnost zvířat (g)	34 ± 0,67	35 ± 0,86	32 ± 0,25	33 ± 0,05
KP výchozí (ml/min)	2,3 ± 0,08	2,3 ± 0,07	2,2 ± 0,07	2,3 ± 0,06
KP v reperfuzi (ml/min)	2,2 ± 0,08	2,1 ± 0,06	2,0 ± 0,05	2,2 ± 0,01
velikost infarktu (% LK)	18 ± 1.11	20 ± 5.79	16 ± 0.53	16 ± 0.43

Tabulka č. 6. Hmotnost těla, koronární průtok (KP) a velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) při inhibici K_{ATP} senzitivních kanálů selektivním inhibitorem 5-HD se zvířaty, kde nebyl 5-HD použit, počet zvířat.



Graf. č. 4. Velikost infarktu myokardu, vyjádřena v procentech levé komory (LK) při inhibici K_{ATP} senzitivních kanálů selektivním inhibitorem 5-HD se zvířaty, kde nebyl 5-HD použit.

Jak je patrné z tabulky č. 6 a grafu č. 4, inhibice mitoK_{ATP} kanálů 5-HD výrazně neovlivnila velikost infarktu u srdcí kmene B6 ani u srdcí UCP 2^(-/-). Zdá se tedy, že předpokládané důsledky chybění genu pro UCP 2 nejsou kompenzovány aktivací mitoK_{ATP} kanálů.

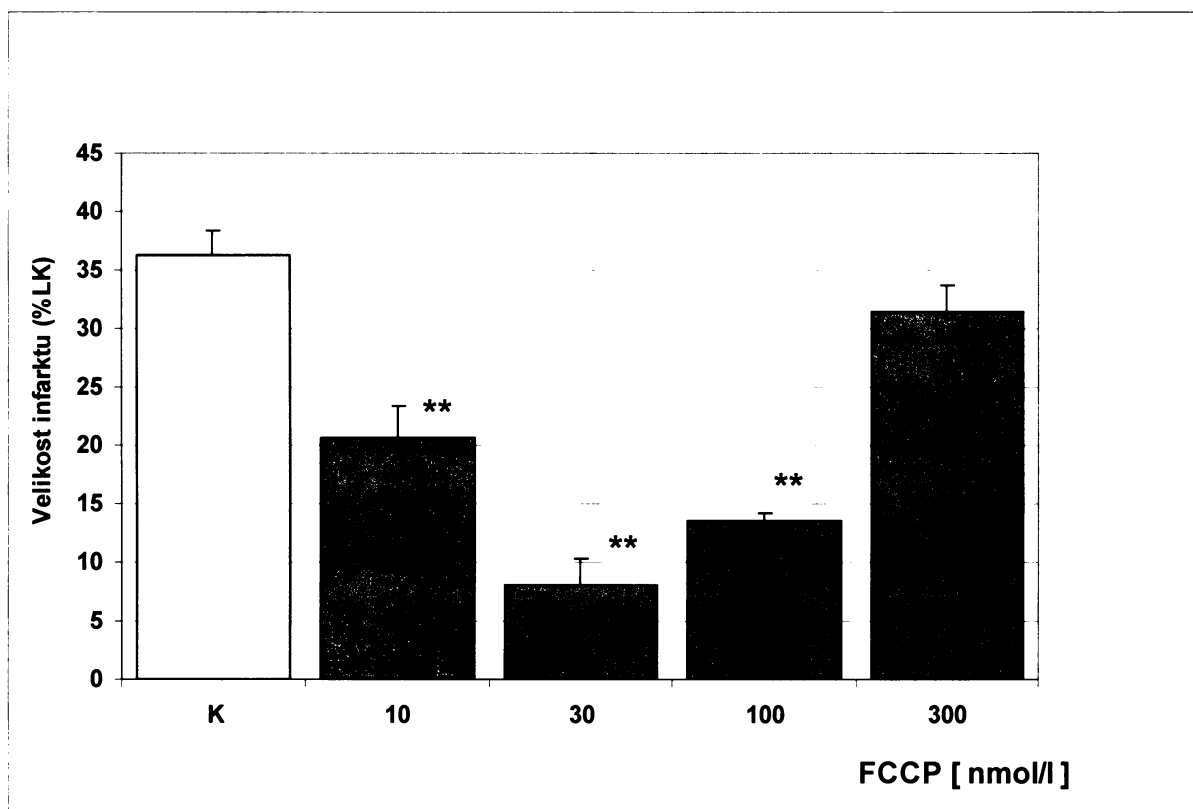
5.3. Vliv FCCP na ischemickou odolnost myokardu

Odpřažení oxidační fosforylace a pokles mitochondriálního membránového potenciálu lze vyvolat také farmakologicky podáním různých odpřahovačů. V našem případě byly podány nízké koncentrace protonoforu FCCP.

Výsledky dokumentuje tabulka č. 7 a graf č. 5 :

	K	10 nM	30 nM	100 nM	300 nM
počet zvířat	7	7	8	8	6
hmotnost zvířat (g)	38 ± 0,85	34 ± 0,28	34 ± 0,5	39 ± 0,5	33 ± 0,66
KP výchozí (ml/min)	2,4 ± 0,02	2,3 ± 0,02	2,4 ± 0,07	2,4 ± 0,02	2,3 ± 0,06
KP během aplikace FCCP (ml/min)	2,4 ± 0,02	2,3 ± 0,02	2,4 ± 0,07	2,4 ± 0,02	2,3 ± 0,06
KP v reperfuzi (ml/min)	2,1 ± 0,05	2 ± 0,07	2,1 ± 0,05	2,1 ± 0,05	2,1 ± 0,03
velikost infarktu (% LK)	36 ± 2,12	21 ± 2,77**	8 ± 2,12**	14 ± 0,67**	32 ± 2,16

Tabulka č. 7. Vliv různých koncentrací FCCP na koronární průtok (KP) a velikost infarktu myokardu, vyjádřeného v procentech levé komory (LK), počet zvířat, ***P* < 0,01 versus kontroly (K).



Graf č. 5. Vliv různých koncentrací FCCP na velikost infarktu, vyjádřeného v procentech levé komory, ** $P < 0,01$ versus kontroly (K).

Zjistilo se, že FCCP zmenšuje velikost infarktu při koncentraci 10 nmol/l. Zvýšení koncentrace na 30 nmol/l vedlo k dalšímu prohloubení kardioprotektivního účinku na maximum : velikost infarktu byla zredukována víc jak na čtvrtinu kontroly. Další zvýšení koncentrace na 100 nmol/l působilo ještě stále protektivně; účinek koncentrace byl sice menší než u koncentrace 30 nmol/l, ale větší než u koncentrace 10 nmol/l. Rozsah poškození při podání koncentrace 300 nmol/l se příliš nelišil od kontrol.

6. Diskuze

6.1. Experimentální model

Hlavním záměrem této diplomové práce bylo objasnit některé mechanismy, které se uplatňují v kardioprotekci při ischemicko-reperfuzním poškození.

Jako model jsme zvolili myš, protože je nejrozšířenějším savčím modelem, je k dispozici řada kmenů s cílenými genetickými modifikacemi, které jsou vhodné pro výzkum zaměřený na ischemicko-reperfuzní poškození, techniky genových manipulací jsou u tohoto druhu nejlépe propracovány, myš se rychle množí, roste a její chov je ekonomicky nenáročný, myš byla zvolena jako modelový organizmus, u kterého má být sekvenován každý gen (Ošťádal, Vízek, 2005). Možnou nevýhodou je ovšem její malá velikost, která představuje značný problém při manipulaci a spolehlivém a přesném měření kardiovaskulárních funkcí. Práce na tak malém srdci, které má milimetrové rozměry znamená změnu přístupu k některým stávajícím technikám, ale tyto techniky byly zvládnuty Roháčovou (2005). Já jsem zvládnutí této techniky ověřil na myších kmene ICR a BALB/C3.

Ke studiu akutní ischemie lze použít řadu metod. V detailu lze tyto metody rozdělit do dvou základních skupin : na experimenty *in vivo* a *in vitro*. Pro pokusy na myších, jsme zvolili metodu *in vitro*, to znamená, že jsme upřednostnili model izolovaného perfundovaného myšního srdce podle Langendorfa, který se dnes používá pro experimenty na srdci. Jedná se o standardní metodu, která poskytuje reprodukovatelné výsledky a je hojně používána v mnoha laboratořích. Lze ji používat jak pro funkční tak pro farmakologické pokusy. Z hlediska farmakologie je izolované srdce vynikající preparát pro testování přímého účinku biologicky aktivních látek.

V průběhu perfuze se sleduje koronární průtok a to v době stabilizační i v době reperfuze. Velikost koronárního průtoku je určen funkčním stavem tepajícího myokardu a stavem jeho koronárního řečiště. V mém případě jsem počítal koronární průtok z objemu tekutiny prošlé za čas. V některých případech hodnoty koronárního průtoku mohou lišit. Důvodů této variability hodnot koronárního průtoku může být několik : jednak se může jednat o technický problém – nebo o nepřesnosti při stanovení koronárního průtoku. V úvahu přicházejí také nepřesnosti při odebírání tekutiny do kalibrované nádoby a chyby způsobené únikem perfuzního roztoku z kanyly mimo aortu pravděpodobně v důsledku nedokonalého upevnění volného konce aorty ke kanyle. V mém případě byly hodnoty velice homogenní.

Sledování koronárního průtoku bylo velice důležité, abych mohl posoudit funkční stav pozorovaného myokardu. Dalším neméně důležitý důvodem sledování koronárního průtoku bylo zjistit zda v době aplikace chemických preparátů (5-HD, FCCP) nebude funkční stav myokardu narušen. Dostupné literární zdroje se o těchto funkčních problémech nezmiňují a mě se jen potvrdilo, že koronární průtok v době stabilizační fáze a v době aplikace chemických preparátů nezaznamenal žádné signifikantní rozdíly, což svědčí o tom, že podání preparátů nemá na funkční stav myokardu „žádný“ vliv.

V konečné fázi je třeba stanovit rozsah poškození, což lze několika způsoby; jednak je možné měřit funkční parametry testovaného izolovaného perfundovaného srdce jako v případě Brennana (2006) zjišťováním obnovy kontraktálních funkcí.

Další metodou zjištění ischemicko-reperfuzního poškození je sledování výskytu ischemických a reperfuzních komorových arytmií. Při *in vitro* perfuzi se elektrokardiogram snímá přímo z povrchu srdce. Elektrody se obvykle umísťují na srdeční bázi a hrot. Zde ovšem hrozí traumatizace tkáně a vzhledem k tomu, že pracujeme na myším myokardu není tato metoda příliš vhodná.

Dle mého názoru je nejvhodnější metoda měření ischemicko-reperfuzního poškození, stanovení rozsahu infarktu myokardu, kterou jsme používali. Její výsledky lze snadno porovnat s literaturou a především umožňuje jednoznačné odlišení tkáně, která přežila ischemický a reperfuzní inzult, od letálně poškozených oblastí myokardu.

Jedná se o techniku barvení tetrazoliovými solemi, která je velice spolehlivá a proto značně rozšířená. V našem případě byla barvena srdce, která byla vystavena globální ischemii, kdy je úplně zastaven přívod perfuzního roztoku. K barvení jsme použili již zmíněné tetrazoliové barvivo (TTC), které přímo odlišilo infarkt myokardu od intaktní tkáně. Tetrazoliové soli reagují s buněčnými dehydrogenázami, které oxidují buněčné substráty. Redukční ekvivalenty jsou odnímány substrátu a přenášeny na akceptory elektronů - koenzym NAD^+ , NADP^+ nebo FAD^+ . Regenerace těchto skupin probíhá právě redukcí TTC, jehož redukováná forma formazan, je stabilní a nerozpustný.

6.2. UCP a ischemická odolnost

Odpřahovací proteiny, které se nacházejí na vnitřní mitochondriální membráně způsobují částečnou disipaci protonového elektrochemického gradientu a pokles

membránového potenciálu. Tato funkce je nejlépe dokumentována v případě UCP1, který je exprimován výhradně v hnědé tukové tkáni a jeho hlavní úlohou je tvorba tepla (Ricquier et al., 2000). V ostatních tkáních včetně myokardu se nachází jiný člen rodiny UCP a to UCP2. Jeho úloha je ve srovnání s UCP1 mnohem méně prostudována. V poslední době se objevily práce, které se zabývají UCP (včetně UCP2) v souvislosti s ochranou tkání a buněk před oxidačním stresem. Ukázalo se, že UCP2 je indukován a aktivován oxidačním stresem (Echtay et al., 2002) a jeho funkce vede k útlumu produkce ROS (Teshima et al., 2003, Ishizawa et al., 2006). Existuje tedy zpětná vazba, jejímž prostřednictvím mohou UCP regulovat produkci ROS. Tvorba ROS závisí na hodnotě mitochondriálního membránového potenciálu – zvýšení tvorbu ROS stimuluje, pokles v důsledku mírného odpražení naopak omezuje. K hyperpolarizaci vnitřní mitochondriální membrány dochází v reperfuzní tkáni, která byla vystavena ischemickému insultu a tato situace je spojena s velkým nárůstem tvorby ROS, které mají v této fázi škodlivé účinky a přispívají k ischemickému poškození. Mírné odpražení oxidační fosforylace a nízký pokles membránového potenciálu vyvolaného UCP mohou tedy mít protektivní účinky, které jsou důvodem snížení oxidačního stresu v reperfuzi. Existuje několik prací, které v souladu s touto představou, že UCP mohou ochránit srdce před ischemicko-reperfuzním poškozením například Hoerter et al. (2004) zjistili, že srdce transgenních myšič, která exprimovala velké množství UCP1, byla odolnější k poškození než srdce myšič kontrolních, což se projevilo mnohem lepší odolností funkční kontraktility během reperfuze. Zvýšená exprese UCP2 v kardiomyocytech zrušila tvorbu ROS, zabránila vápníkovému přetížení a oddálila nástup buněčné smrti (Teshima et al., 2003). Dále bylo prokázáno, že opožděná fáze ischemického preconditioningu je spojena s indukcí UCP2 a UCP3 v myokardu (McLeod et al., 2005).

Výsledky naší práce však výše uvedené studie nepotvrdily. Používali jsme myšič s vyřazeným genem pro UCP2, jejichž srdce nevykazovala sníženou odolnost k ischemicko-reperfuznímu poškození ve srovnání s kontrolním kmenem B6. Na základě výsledků výše uvedených studií jsme očekávaly, že chybění UCP2 se projeví zvýšenou citlivostí k poškození, což se nestalo. Velikost infarktu, vyvolaného globální ischemií a reperfuzí *in vitro* se u obou skupin výrazně nelišil ani po prodloužení ischemie a zvýšení podílu nekrotické tkáně. Vysvětlení tohoto nálezu nemáme, ale lze spekulovat o několika možnostech.

Jednou z možností je, že UCP2 je sice pro ischemickou odolnost myokardu důležitý, ale jeho absence je u použitých transgenních myšič kompenzována jiným mechanismem. V těchto srdcích by mohla být například zvýšená exprese UCP3, který se také může

uplatňovat v kardioprotekci (McLeod et al., 2005) a mohl by plnit funkci UCP2. Tuto možnost však nemůžeme prokázat neboť jsme expresi UCP3 neměřili. Jinou teoretickou možností je, že u UCP2^(-/-) myši je zvýšená exprese nebo aktivita mitoK_{ATP} kanálů, které mohou také způsobovat mírné odpřažení a pokles mitochondriálního membránového potenciálu (Huppertz et al., 2001) a maskovat tak nepříznivé důsledky ztráty UCP2. V důsledku aktivace mitoK_{ATP} kanálů by došlo ke zvýšení ischemické odolnosti, které by mohlo právě kompenzovat zhoršení odolnosti způsobené absencí UCP2. Naše experimenty však ukázaly, že tato možnost je velmi nepravděpodobná. Pokud by výše uvedená hypotéza platila pak by blokáda mitoK_{ATP} kanálů způsobila zvětšení infarktu myokardu ve skupině UCP2^(-/-). To se však nestalo a 5-HD neměl žádný vliv na srdce s deficitem UCP ani na srdce kontrolní.

Nemůžeme vyloučit ani možnost, že UCP2 nehraje za daných podmínek v ischemické odolnosti myšního srdce významnou úlohu. Neexistují jiné studie na tomto modelu, které by se zabývaly srdcem, musíme však vzít v úvahu práce, které se zabývají možností úlohy UCP2 v neuroprotekcii. Většina z nich prokázala zvýšenou expresi UCP2 v mozku za podmínek oxidačního stresu, což však nemusí mít přímou souvislost s odolností k poškození (Cannon et al., 2006). U transgenních myši se zvýšenou expresí UCP2 však bylo pozorováno menší poškození mozku vyvolané ischemií než u kontrol (Mattiasson et al., 2003). V jiné studii byl však vysloven opak: UCP2^(-/-) myši vykazovali menší ischemické poškození než kontroly (de Bilbao et al., 2006), což by nasvědčovalo tomu, že UCP2 je spíše škodlivý než protektivní. Dosavadní nálezy tedy zatím neumožňují jednoznačně interpretovat úlohu UCP2 v ischemické odolnosti a je nutné této otázce věnovat hlubší experimentální pozornost.

6.3. Kardioprotektivní účinek odpřahovače FCCP

Poté, co jsme zjistili, že chybění genu pro UCP2 nemá vliv na odolnost myšního srdce k ischemii, jsme se rozhodli ověřit zda farmakologické odpřažení oxidační fosforylace, které by mohlo vést k mírné disipaci mitochondriálního membránového potenciálu, má kardioprotektivní účinky. Použili jsme nízké koncentrace protonoforu FCCP. Tato látka výrazně omezuje rozsah infarktu myokardu, avšak působila takto protektivně pouze v úzkém

rozhraní nízkých koncentrací. Nejvýraznější účinek se projevil v koncentraci 30 nmol/l, kdy se velikost infarktu myokardu snížila na čtvrtinu oproti kontrolám. Snížení či zvýšení této koncentrace vedlo k oslabení protektivního účinku a koncentrace 300 nmol/l již ischemickou odolnost neovlivnila. Je nutné připomenout, že tyto koncentrace jsou mnohem nižší ve srovnání s koncentracemi, které se používají v biochemických experimentech k úplnému odpřažení oxidační fosforylace a transportu elektronů. V tomto koncentračním rozmezí lze tedy očekávat jen mírné odpřažení a případně mírnou depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány.

Podářilo se nám tedy prokázat, že mírné odpřažení je kardioprotektivní a hypotézy, které předpokládají, že tento proces se uplatňuje v mechanismech preconditioningu, i jiných protektivních jevů, jsou smysluplné. Naše studie je první, která charakterizovala vliv FCCP na velikost infarktu na myším srdci a výsledky jsou zcela v souladu s nedávno publikovaným článkem, který demonstroval podobný účinek na perfundovaném srdci potkana, kdy jako projev poškození byl hodnocen stupeň kontraktlní dysfunkce (Brennan et al., 2006). V této práci byl nejmenší protektivní účinek FCCP zjištěn při podání vyšší koncentrace 100 nmol/l než v našich experimentech, což může být důsledkem rozdílů v intenzitě energetického metabolismu myšího a potkaního srdce, který je důsledkem např. odlišné tepové frekvence. Protektivní účinek FCCP ve výše uvedené práci (Brennan et al., 2006) byl zablokován látkami, které působí jako antioxidanty. Zdá se tedy pravděpodobné, že protektivní spouštěcí mechanismus FCCP zahrnuje signální ROS a jeho důsledkem je omezení produkce škodlivých ROS v reperfuzi. Je zajímavé, že o podobném mechanismu účinku se uvažuje v souvislosti s kardioprotektivním mechanismem aktivace mitoK_{ATP} kanálů, čímž by bylo možné vysvětlit skutečnost, že blokáda těchto kanálů nemá na protektivní účinek FCCP vliv (Brennan et al., 2006).

Také další práce potvrdily úlohu odpřažení odolnosti myokardu k poškození. Jiný typ odpřahovače, 2,4-dinitrofenol zmenšil rozsah infarktu a zlepšil kontraktlní funkce srdce potkana vystaveného ischemii a reperfuzi.

Lze tedy uzavřít, že naše výsledky spolu s dostupnými literárními údaji jsou v souladu s názorem, že mírné odpřažení oxidační fosforylace a transportu elektronů, navozené před ischemickým insultem, má významné ochranné účinky, které se mohou uplatňovat v řadě kardioprotektivních mechanismů.

7. Závěr

Hlavní výsledky diplomové práce, kterou předkládám, lze shrnout do následujících bodů :

1. Byla zvládnuta technika perfundovaného myšního srdce *in vitro*, stanovení rozsahu infarktu myokardu histochemickou technikou.
2. Experimenty prováděné na srdcích myši s delecí genu pro odpráhuující protein (UCP2) neprokázaly jejich změněnou odolnost k letálnímu ischemicko-reperfuznímu poškození ve srovnání s odpovídajícími kontrolami.
3. Zdá se, nezměněná ischemická odolnost srdcí UCP 2 ^(-/-) myši není důsledkem kompenzace na úrovni mitochondriálních K_{ATP} kanálů.
4. Zjistili jsme, že mírné odprážení oxidační fosforylace akutním podáním protonoforu FCCP má výrazný kardioprotektivní účinek. Tento účinek se projevil v úzkém rozmezí nízkých koncentrací výrazným zmenšením rozsahu infarktu myokardu.

Literatura

Aguilar-Bryan L., Clement J.P., Gonzales G. (1998). Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev* 78, s. 227 – 245

Brennan J. P., Berry R. G., Baghai M. (2006). FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation. *Cardiovasc. Res.* 72, s. 322 – 330

Brennan J. P., Southworth R., Medina R. A. (2006). Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS – dependent cardioprotection independent of K_{ATP} channel activation. *Cardiovas. Res.* 72, s. 313 – 321

Cannon B., Shabalina I. G., Kramarova T. V. (2006). Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species – or not?. *Biochim. Et Biophys. Acta* 1757, s. 449 – 458

Danielsen R. (1991). Left ventricular diastolic dysfunction in myocardial ischaemia. In: *Myocardial ischaemia*, Thygesen K., Kjekshus J. (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991

De Bilbao F. (2004). Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels, *J. Neurochem.* 89, s. 1283 – 1292

Dulloo A. G., Samec S. (2000). Jsou odpráhovací proteiny významné pro regulaci tělesné hmotnosti? *News in Physiol. Sciences* 15

Echtay K. S., Roussel D., St – Pierre J. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415 (6867), s. 96 – 99

Garlid K.D., Dos Santos P., Xie Z. J. (2003). Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim. Et Biophys. Acta* 1606, s. 1 – 21

Garlid K.D.: Cation transport in mitochondria-the potassium cycle. *Biochim.Biofys.Acta* 1275: 123-126, 1996.

Hearse D. J. (1979). Oxygen deprivation and early myocardial contractile failure: a reassessment of their possible role of adenosin triphosphate. *Am. J. Cardiol* 44, s. 1115 – 1121

Hoerter J., Barroso M., Couplan E. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic- reperfusion damage. *Circulation* 110, s. 528 – 533

Holmuhamedov El., Jahangir A., Oberlin A. (2004). Potassium channel openers are uncoupling protonophores: implication in cardioprotection. *FEBS Lett.* 568, s. 167 – 170

Huppertz C., Fischer B. M., Kim Y. B. (2001). Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3 – kinase – dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276 (16), s. 12520 – 12529

Inagaki N., Tsuura Y., Namba N. (1995). Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* 270, s. 5691 – 5694

Inoue I., Nagase H., Kishi K. (1991). ATP- sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352, s. 244 – 247

Ishizawa M., Mizushige K., Noma T. (2006). An antioxidant treatment potentially protects myocardial energy metabolism by regulating uncoupling protein 2 expression in a chronic β -adrenergic stimulation rat model. *Life Sciences* 78, s. 2974 – 2982

Katz A. M. (1992). *Physiology of the Heart.* (Eds) Raven Press, New york, 1992

Klener P. et al. (1997). Cytokiny ve vnitřním lékařství. Eds. Grada Publishing, 1997

Kvasnička J. (2003). Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Eds. Grada Publishing, 2003

Lawson C.S., Hearse D.J.: Anti-arrhythmic protection by ischaemic preconditioning in isolated rat hearts is not due to depletion of endogenous catecholamines. *Cardiovasc.Res.* 31:655-662, 1996.

Mattiasson G., Shamloo M., Gido G. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat. Med.* 9, s. 1062 – 1068

McLeod Ch. J., Aziz A., Hoyt R. F. (2005). Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *Journal of biolog. chem.* 280 (39), s. 33470 – 33476

Murray A. J., Anderson R. E., Watson G. C. (2004). Uncoupling proteins in human heart. *Lancet* 364, s. 1786 – 1788

Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circ.* 74, s. 1124 – 1136

Neckář J., Szárszoi O., Koten L. (2002). Effect of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc. Res.* 55, s. 567 – 575

Nichols C. G., Lederer W. J. (1991). Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.* 261, s. 1675 – 1686

Noma A. (1983). ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, s. 147 – 148

Oldenburg O., Cohen M. V., Yellon D. M. (2002). Mitochondrial K_{ATP} channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 55, s. 429 – 437

Ošťádal B., Kolář F. (1999). Cardiac ischemia: from injury to protection. Eds. Kluwer academic publishers, 1999

Ošťádal B., Vízek M. et al. (2005). Patologická fyziologie srdce a cév. Eds. Karolinum, 2005

Pain T., Yang X. M., Critz S. d., Yue Y. (2000). Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87, s. 460 – 466

Piacentini L., Wainwright C.L., Parrat J.R.: The antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning in isolated rat heart involves a pertusis toxin sensitive mechanism. *Cardiovasc.Res.* 27: 674-680, 1993.

Ricquier D. et al. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 345, s. 161 – 179

Sack M. N. (2006). Mitochondrial depolarization and role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc. Re.* 72, s. 210 – 219

Schaper W., Frenzel H., Hort W.: Experimental coronary Artery occlusion. *Basic.Res.Cardiol.* 74: 46-53, 1979.

Silbernagl S., Lang F. (2001). Atlas patofyziologie člověka. (Eds.) Grada, Praha, 2001

Soška V. (1993). Volné kyslíkové radikály a jejich scavengery. *Klin. Biochem. Metab.* 22, s. 57 – 61

Špinar J., Vítovec J., Kubecová L., Pařenica J. (2001). Klinické studie v kardiologii. Eds. Grada Publishing, 2001

Štejfá M. et al. (1998). Kardiologie. Eds. Grada Publishing, 1998

Teshima Y., Akao M., Jones S. P. (2003). Uncoupling protein – 2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res.* 93, s. 192 – 200

Toombs C.F., McGee D.S., et al.: Protection from ischemic-reperfusion injury with adenosin pretreatment is reversed by inhibition of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovasc.Res.* 27: 623-629, 1993.

Wagner P. (2000). *Laboratorní referenční hodnoty*. Eds. Triton, 1995

Zima T. Štípek S., Tesař V. (1995). Volné radikály v patogenezi vybraných onemocnění. *Čas Lék. čes.* 134, s. 291 -295

Zweier J., Flaherty J. T., Weisfeldt M. L. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, s. 1404 – 1407

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
knihovna kateder zoologie
Viničná 7, 128 44 Praha 2
UK-84