

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Ischemická tolerance srdce u spontánně hypertenzních
potkanů: vliv mitochondriálního genomu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michaela Cyprová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Hošková Ph.D.

Odborný školitel: RNDr. Jan Neckář Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Ischemická tolerance srdce u spontánně hypertenzních potkanů: vliv mitochondriálního genomu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2017

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Janu Neckářovi, Ph.D. za možnost realizovat tuto diplomovou práci na Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, odborné rady a pomoc nejen při zpracování této práce, ale také v průběhu celého mého působení na oddělení. Velký dík patří také všem ostatním zaměstnancům oddělení Vývojové kardiologie za vytvoření přátelského prostředí a ochotnou pomoc při řešení všech problémů, zejména pak Mgr. Markétě Hlaváčkové, Ph.D. a Bc. Danielu Benákovi za neutuchající entuziasmus při práci. Velký dík patří také vedoucí mé diplomové práce Ing. Kristýně Hoškové, Ph.D. za pomoc s finální korekturou.

Souhrn

Předkládaná práce měla za cíl ověřit hypotézu, že adaptace na chronickou hypoxii nebo fyzický trénink ovlivňuje ischemickou toleranci srdce u konplastických kmenů laboratorních potkanů s odlišným mitochondriálním genomem. Dosavadní studie odhalily, že chronická hypoxie i pravidelný fyzický trénink snižují míru ischemicko-reperfučního poškození srdce. Výsledky tohoto projektu by měly přispět k objasnění úlohy mitochondriálního genomu při infarktu myokardu a kardioprotektivní účinek cvičení a hypoxie. Potkani spontánně hypertenzního kmene SHR a unikátního konplastického kmene SHRmt^{LEW} byli vystaveni kontinuální normobarické hypoxii (10 % O₂, 3 týdny) nebo adaptováni na fyzický trénink (běh) za pomoci běžecského pásu pro hlodavce (14 dní). Na konci adaptace byl potkanům proveden podvaz koronární arterie s cílem analyzovat ischemickou toleranci srdce. Velikost infarktu byla hodnocena na řezech perfundované obarvené levé komory. U všech skupin se nelišila velikost ohrožené oblasti levé komory, což značí, že byl podvaz koronární arterie proveden u všech zvířat v podobném rozsahu. Experimenty ukázaly, že rozdílný mitochondriální genom nezpůsobuje změny ve velikosti infarktu, ale byl prokázán kardioprotektivní účinek kontinuální chronické hypoxie u obou kmenů. V průběhu ischemie (20 minut) a v prvních třech minutách reperfuze byla zaznamenávána elektrická aktivita srdce a následně byl z EKG záznamu hodnocen výskyt ischemických a reperfučních komorových arytmií. U potkanů adaptovaných na hypoxii byla také stanovena exprese enzymu superoxidodismutáza v mitochondriích karyomyocytů (MnSOD), která byla u kontrolní i hypoxické skupiny kmene SHRmt^{LEW} prokazatelně nižší oproti SHR potkanům. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a graficky zpracována.

Klíčová slova: srdce, ischemie, hypertenze, mitochondriální genom

Summary

The aim of this work was to verify the hypothesis, that adaptation to chronic hypoxia, or physical training influences ischemic tolerance in the heart of conplastic rat strains with different mitochondrial genomes. Previous studies revealed that chronic hypoxia and regular physical training reduce the level of ischemia-reperfusion injury in the heart. The results of this project should help to clarify the role of the mitochondrial genome in myocardial infarction. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and unique conplastic rat strain SHRmt^{LEW} were exposed to normobaric continuous hypoxia (10 % O₂, 3 weeks), or adapted for physical training (run) using treadmill for rodents (14 days). At the end of adaptation was performed occlusion of coronary artery in order to analyze ischemic tolerance of the heart. Infarct size was assessed in slices of perfused and stained left ventricle. In all groups did not vary the size of the area at risk of the left ventricle, indicating that the ligation of coronary artery performed on all animals in the same range. Different mitochondrial genome does not cause changes in infarct size, but it has been demonstrated cardioprotective effect of chronic hypoxia in both strains. During ischemia (20 minutes) and the first three minutes of reperfusion was recorded electrical activity of heart, and then was the ECG evaluated the incidence of ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias. In rats adapted to hypoxia was also determined superoxide dismutase enzyme expression in mitochondrial cardiomyocytes (MnSOD), which was significantly lower in control and hypoxic SHRmt^{LEW} groups than in SHR. The obtained data were statistically analyzed and graphically processed.

Key words: heart, ischemia, hypertension, mitochondrial genome

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Vědecká hypotéza a cíle práce..... | 2 |
| 3. Literární přehled | 3 |
| 3.1 Ischemie srdce..... | 3 |
| 3.2 Reperfuze | 3 |
| 3.3 Ischemicko-reperfuze poškození srdce..... | 4 |
| 3.4 Mechanismus poškození myokardu | 5 |
| 3.5 Kardioprotektivní intervence | 6 |
| 3.5.1 Preconditioning, postconditioning | 6 |
| 3.5.2 Modely dlouhodobé protekce..... | 7 |
| 3.5.2.1 Fyzická zátěž..... | 7 |
| 3.5.2.2 Chronická hypoxie | 14 |
| 3.3 Model SHR potkanů..... | 16 |
| 3.3.1 Konplastické kmeny..... | 17 |
| 4. Materiál a metody | 19 |
| 4.1 Experimentální zvířata | 19 |
| 4.2 Modely protekce | 19 |
| 4.2.1 Adaptace na fyzickou zátěž..... | 19 |
| 4.2.2 Adaptace na kontinuální chronickou hypoxii (CNH) | 21 |
| 4.3 Experimentální model srdce <i>in situ</i> | 21 |
| 4.3.1 Operační fáze experimentu | 21 |
| 4.3.2 Stanovení velikosti infarktu | 22 |
| 4.3.3 Vyhodnocení experimentálně získaných dat..... | 23 |
| 4.3.3.1 Analýza velikosti infarktu | 23 |
| 4.3.3.2 Analýza ischemických a reperfuze arytmií | 25 |
| 4.4 Stanovení exprese SOD..... | 26 |
| 4.4.1 Příprava vzorků | 26 |
| 4.4.1.1 Homogenizace..... | 26 |
| 4.4.1.2 Stanovení množství proteinů..... | 27 |
| 4.4.1.3 Elektroforéza | 27 |
| 4.4.1.4 Western Blot (WB) | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.4.1.5 Imunodetekce | 29 |
| 4.5 Statistické zpracování dat, grafické zpracování výsledků..... | 29 |
| 5. Výsledky | 30 |
| 5.1 Základní fyziologické parametry | 32 |
| 5.2 Vliv fyzické zátěže..... | 33 |
| 5.3 Vliv CNH..... | 41 |
| 5.4 Exprese SOD..... | 42 |
| 6. Diskuse..... | 44 |
| 6.1 Vliv fyzické zátěže a hypoxie | 44 |
| 6.2 Úloha mitochondriálního genomu v ischemické toleranci srdce | 46 |
| 7. Závěr | 48 |
| 8. Literární zdroje | 49 |

1. Úvod

Onemocnění srdce a cév patří mezi nejzávažnější choroby současnosti. Jsou příčinou mortality ve více než 50 % celkového počtu úmrtí lidských pacientů. Největší podíl na úmrtích má pak jednoznačně akutní forma ischemické choroby srdeční – infarkt myokardu. Tato práce je věnována možnému kardioprotektivnímu vlivu vyvolanému fyzickou zátěží nebo adaptací na chronickou hypoxii u hypertenzních potkanů. Druhou oblastí, kterou se tato práce zabývá, je porovnání vlivu zmíněných kardioprotektivních stimulů na dva kmeny laboratorního potkana s odlišným mitochondriálním genomem. Ve studii byli použiti spontánně hypertenzní potkani (SHR) a unikátní konplastický kmen SHR^{mt^{LEW}} s odlišným mitochondriálním genomem (viz kapitola 3.3).

Vliv fyzické zátěže a tréninku na velikost infarktu je již řadu let předmětem mnoha studií experimentálních i klinických kardiologů. Zátěž lze dělit podle intenzity a doby jejího trvání. V experimentálních podmínkách je pro adaptaci na fyzickou zátěž u laboratorních potkanů využívána řada protokolů. Zvířata jsou trénována zejména s využitím plavacích bazénů a běhacích pásů pro hlodavce. Oba tréninkové modely jsou založeny na využití přirozených pohybových schopností zvířat přenesených do laboratorních podmínek. Druhý kardioprotektivní protokol je založený na dlouhodobém pobytu v hypoxickém prostředí. Zvířata v experimentech jsou adaptována v hypoxických komorách a následně se sledují pozitivní a negativní efekty chronické hypoxie na srdce.

U adaptovaných jedinců jsou spolu s funkcí srdce a jeho fungováním dále hodnoceny také změny hladin a aktivity různých enzymů. Jedním ze základních, které se v souvislosti s ischemií srdce sledují je superoxidodismutáza (MnSOD). Jedná se o enzym s výrazným antioxidačním účinkem, který v organismu zastává obrannou funkci vůči oxidačnímu stresu a následnému poškození buněk. Stanovení hodnot exprese tohoto enzymu u potkanů adaptovaných na chronickou hypoxii bylo také jedním z cílů této diplomové práce.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě dostupné literatury o ischemické toleranci srdcí hypertenzních potkanů a kardioprotektivním účinku chronické hypoxie a fyzického tréninku jsme si definovali následující cíle:

- 1) Ověřit, zda adaptace na pravidelnou fyzickou zátěž má pozitivní vliv na ischemickou toleranci srdce (výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií, velikost infarktu) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} s odlišným mitochondriálním genomem.
- 2) Ověřit, zda adaptace na kontinuální chronickou hypoxii má pozitivní vliv na ischemickou toleranci srdce (výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií, velikost infarktu) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} s odlišným mitochondriálním genomem.
- 3) Zjistit, jak ovlivňuje adaptace na kontinuální chronickou hypoxii aktivitu enzymu MnSOD v myokardu SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} s odlišným mitochondriálním genomem.

3. Literární přehled

3.1 Ischemie srdce

Pojmem ischemie je definováno nedostatečné krevní zásobení tkání nebo celých orgánů, což vede ke snížení dodávky kyslíku a substrátů a je také omezeno odplavování metabolitů, především iontů vodíku a kyseliny mléčné (Ošťádal et al., 2003).

Vztaženo k lidské populaci, převážná většina ischemických epizod vzniká v důsledku tromboembolického nebo artherotrombického vasookluzivního onemocnění (Kalogeris et al., 2012). U člověka má na vznik ischemie vliv mnoho rizikových faktorů. Některé z nich lze kontrolovat a ovlivňovat, zbylé jsou dány genetickou predispozicí a stárnutím organismu. Mezi hlavní známé rizikové faktory patří konzumace alkoholu, kouření tabákových výrobků, nedostatečná fyzická aktivita, diabetes mellitus či hypertenze (Ferdinandy et al., 2007). Není proto překvapující, že ischemie obecně, respektive ischemie myokardu, je předmětem nejen mnoha klinických studií, ale také experimentálních prací využívajících zvířecí modely. Simulované experimentální podmínky s sebou přinášejí řadu pozitiv a již vedly k mnoha klíčovým objevům, které ovlivnily léčbu ischemie myokardu a ukázaly nové terapeutické postupy. V rámci experimentálního výzkumu je nicméně třeba mít na paměti, že v laboratorních podmínkách je využíváno zvířecích modelů, které svým stářím a zdravotním stavem nejsou identickým ekvivalentem lidských pacientů (Kalogeris et al., 2012).

3.2 Reperfuze

Reperfuze je situace, kdy dojde k obnovení krevního zásobení orgánu postiženého ischemií. Do tkáně nebo orgánu se obnoví přísun kyslíku a substrátů potřebných pro metabolismus buněk (Ferdinandy et al., 2007). V experimentálních i klinických podmínkách je reperfuze zcela klíčová a obnova krevního zásobení je hlavním terapeutickým cílem (Buerke et al., 1995). Bylo prokázáno, že reperfuze i přes svůj pozitivní vliv na ischemizovanou tkáň sama o sobě může způsobit další poškození postiženého orgánu (tzv. reperfuze poškození) vlivem vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a také díky zvýšené zánětlivé odpovědi v tkáni poškozené předchozí ischemií (Deng et al., 2015).

3.3 Ischemicko-reperfuzní poškození srdce

Jak již bylo uvedeno výše, míra poškození orgánů nezávisí jen na ischemii nebo reperfuzi, ale jedná se o komplexní vliv obou stavů, a proto je správné používat termín ischemicko-reperfuzní (I/R) poškození. Rozsah poškození myokardu způsobený I/R je možné rozdělit do několika kategorií dle závažnosti; od malé příhody bez trvalého poškození tkáně až po velké poškození myokardu spojené s výrazným snížením jeho funkce a buněčnou smrtí kardiomyocytů. Vážné poškození srdeční tkáně může mít fatální následky vedoucí k selhání celého organismu (Powers et al., 2007).

Obecně lze I/R srdce rozdělit do tří skupin podle délky trvání ischemie. U potkanů se nejnižší stupeň poškození objevuje v případě, že ischemie trvá méně než 5 minut. Tento stupeň poškození je spojován se vznikem ojedinělých poruch srdečního rytmu, tzv. komorových arytmií, nezpůsobuje však změny kontraktilní funkce srdce ani buněčnou smrt kardiomyocytů. Druhý stupeň poškození je popisován při ischemii trvající alespoň 5 – 20 minut. Je charakteristický reversibilní dysfunkcí kontraktility, výskytem závažných komorových arytmií, ale stále bez buněčné smrti kardiomyocytů. Nejtěžší forma poškození nastává při ischemii delší než 20 minut. Za těchto okolností dochází k nevratnému poškození kardiomyocytů a jejich smrti. Myokard ztrácí kontraktilitu a snižuje se jeho schopnost pumpovat krev (Powers et al., 2007). Poškození srdce dlouhotrvající ischemií tkáně je charakteristické vznikem nekrózy (Jennings et al., 1981), která se nejprve rozvíjí v oblasti subendokardu (vnitřní vrstva myokardu) a poté se s prodlužujícím časem ischemie rozšiřuje i na subepikard (Murry et al., 1986).

Arytmie, též poruchy srdečního rytmu, jsou projevem abnormalit vedení vzruchu převodním systémem srdečním a jeho propagací v pracujícím myokardu. Vyskytují se v důsledku různých patologických stavů včetně I/R poškození v různých formách a závažnostech, od zanedbatelných (např. ojedinělé extrasystoly) až po arytmie způsobující oběhové selhání (komorové tachykardie a fibrilace). Nejčastěji se změny srdečního rytmu mohou projevovat jako nepravidelné zrychlené vedení, zpomalení v důsledku poruchy tvorby a převodu vzruchu srdeční svalovinou, jako záchvatovité cykly o různé délce trvání nebo jako arytmie chronické. U pacientů s arytmií o frekvenci vyšší než 100 tepů/min lze sledovat nepravidelný (tachyarytmie) nebo poměrně pravidelný (tachykardie) průběh. Na vzniku tachyarytmií se podílejí tři hlavní faktory – arytmogenní substráty, spouštěcí faktory a modulující faktory, mezi které patří také ischemie (Ošťádal et al., 2003).

3.4 Mechanismus poškození myokardu

V důsledku uzavření některé z koronárních arterií dochází vlivem akutní ischemie k zásadním změnám v metabolismu srdce. I/R je charakteristická změnami v oxidaci mastných kyselin (MK) a glukózy. Tyto změny mají negativní vliv na srdeční funkci a výkonnost (Frank et al., 2012). Při nedostatku kyslíku způsobeném ischemií dochází k rychlému zastavení oxidativní fosforylace MK v mitochondriích, a tím ke ztrátě hlavního zdroje ATP pro energetický metabolismus. Náhradním, avšak nedostatečným zdrojem produkce ATP, se stává anaerobní glykolýza, která vede k akumulaci vodíkových iontů a laktátu. Zvýšení množství těchto látek v postižené tkáni pak vede k vnitrobuněčné acidóze a inhibici glykolýzy. Porucha kontraktility spolu s přetrvávající elektrickou aktivitou se rozvíjí na základě změn transportu iontů přes membrány sarkolemy a buněčných organel. Tento stav vytváří prostředí pro vznik arytmií. Na začátku dochází ke zvýšenému vyplavování K^+ iontů souvisejícímu se zvýšením osmotického zatížení buněk v důsledku akumulace metabolitů a anorganického fosfátu. S výrazným poklesem ATP je inhibována i Na^+/K^+ ATPáza. Utlumení aktivity tohoto enzymu vede k dalšímu poklesu intracelulární koncentrace K^+ iontů a nárustu Na^+ iontů. Zvýšení koncentrace Na^+ a Cl^- iontů v buňce vede k osmotickým změnám vyústujícím až v prasknutí buňky. Počáteční nárůst cytosolických Ca^{2+} iontů je způsoben multifaktoriálními změnami transportních systému na sarkolemě a sarkoplasmatickém retikulu.

Jak ukázaly výzkumy posledních let hlavní roli v letálním I/R poškození sehrává tzv. MPT pór (Mitochondrial Permeability Transition pore), neselektivní kanál na vnitřní membráně mitochondrií. Otevření tohoto kanálu vede ke snížení membránového potenciálu mitochondrie a zastavení oxidativní fosforylace. To má za následek spotřebování zbývající zásoby ATP a buněčnou smrt. Během ischemie myokardu zůstává MTP pór zavřený a otevírá na začátku reperfuze jako odpověď mitochondrie na výrazné zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, změny pH buněk a vyčerpání zásob ATP. Intracelulární změny iontové homeostázy během I/R, jako jsou hromadění Ca^{2+} a H^+ iontů a vedou ke vzniku ROS, které také výrazně ovlivňují citlivost MPT pórů k otevření (Frank et al., 2012).

3.5 Kardioprotektivní intervence

Jako kardioprotektivní intervence jsou označovány zásahy do funkce organismu, které mají za cíl zmenšit nebo výrazně omezit poškození srdce způsobené I/R. V klinické i experimentální praxi jsou za tímto účelem používány krátkodobé i dlouhodobé stimuly nebo farmakologické intervence. Efektivní protekce srdce před I/R poškozením je jedním z nejdůležitějších cílů experimentálních i klinických výzkumů v současné kardiologii (Kolář a Ošťádal, 2004).

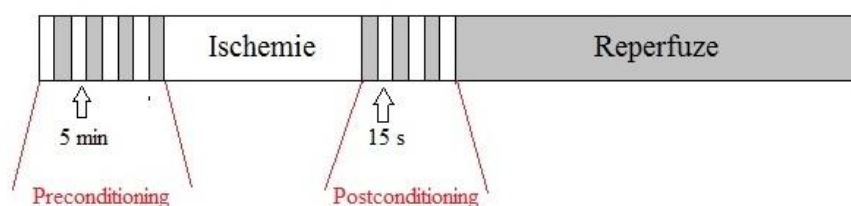
V případě krátkodobých intervencí se jedná o rychlé kardioprotektivní zásahy provedené bezprostředně před začátkem ischemie (tzv. preconditioning) nebo ihned v začátku reperfuze (tzv. postconditioning) (viz. kapitola 3.2.1). Dlouhodobé kardioprotektivní fenomény jsou aktivovány v delším časovém horizontu před nástupem ischemie a jejich účinnost byla sledována i několik hodin či dnů od ischemického stimulu. Známými nástroji dlouhodobé kardioprotekce jsou adaptace na chronickou hypoxii a pravidelný fyzický trénink.

Paradoxní je, že na rozdíl od krátkodobých kardioprotektivních fenoménů objevených u zvířat v laboratořích (tzv. conditioning), protektivní účinky chronické hypoxie a zvýšení fyzické aktivity byly nejprve objeveny v lidské populaci a jejich mechanismus je dnes intenzivně studován.

3.5.1 Preconditioning, postconditioning

Fenomén krátkodobé protekce, tzv. preconditioning, je aktivován vystavením srdce několika krátkým ischemickým epizodám před samotnou déle trvající ischemií. Stěžejní studie o protekci myokardu ischemickým preconditioningem byla publikována v roce 1986 vědeckým týmem Charlese E. Murryho. Tato studie využívající model regionální ischemie u psů ukázala, že v průběhu krátkých ischemických epizod spojených s reperfuzí dochází ke zpomalení rozpadu ATP a také k efektivnímu vyplavování katabolitů, které se v poškozené tkáni během ischemie vytváří. Pro kardioprotektivní účinek preconditioningu je klíčová aktivace protektivní intracelulární signalizace v průběhu krátkých ischemií spojených s reperfuzí vedoucí ke snížení důsledků v následné dlouhodobé ischemii myokardu.

Postconditioning je podobnou formou krátkodobé protekce, nicméně aktivovaný na začátku reperfuze. Je využíván jako protektivní zásah pro zmírnění reperfuzního poškození. Postconditioning efektivně snižuje velikost infarktu myokardu u všech zatím testovaných živočišných modelů a protektivně působí i u lidí. Tato vysoce efektivní protekce musí být aplikována bezprostředně po začátku reperfuze, neboť reperfuzní poškození buněk nastává již během jejích prvních sekund či minut. Mechanismus postconditioningu funguje na základě uvolnění důležitých cytokinů, udržení nízkého pH v průběhu časně reperfuze, aktivaci proteinkináz, ochrany mitochondriálních funkcí a zabránění otevření MPT pórů (Marzilli et al., 2012). Na rozdíl od preconditioningu, protektivní účinek postconditioningu má klinický potenciál, neboť jej lze efektivně využít u pacientů s akutním infarktem myokardu. Model ischemického preconditioningu a postconditioningu je znázorněn na *Obrázku 1*.



Obrázek 1: Protokol ischemického preconditioningu a postconditioningu. Modifikováno z Marzilli et al. (2012).

3.5.2 Modely dlouhodobé protekce

3.5.2.1 Fyzická zátěž

Pravidelné cvičení, jako jedna z forem fyzické zátěže, je známé pro své příznivé účinky na organismus. Je doporučováno pro zdravé jedince jako prevence, stejně tak jako část terapie pro pacienty postižené některými druhy onemocnění včetně nemocí oběhového systému a srdce (Natali et al., 2015). Mezi tato onemocnění patří zejména infarkt myokardu nebo chronické srdeční selhání po ischemické epizodě (Manfroi et al., 2002). Jak bylo ukázáno, fyzický trénink významným způsobem snižuje výskyt rizikových faktorů pro vznik infarktu myokardu, jako jsou hypertenze, obezita a rezistence k insulinu a snižuje mortalitu u pacientů po infarktu myokardu (Morris et al., 1980).

Experimentální výsledky i klinická data dokládají pozitivní vliv cvičení na zlepšení kardiovaskulárních a hemodynamických funkcí srdce. Za hlavní fyziologický mechanismus kardioprotekce vyvolané cvičením bývá považováno snížení oxidativního stresu a zánětu (Masson et al., 2015). Mezi jedny z potenciálních mechanismů kardioprotekce založené na fyzickém tréninku patří dále zlepšení průtoku krve cévami, především pak jeho zvýšení na začátku reperfuze (postischemická hyperaemia). Cvičení zlepšuje reaktivitu cév, jak bylo prokázáno u mnoha pokusných modelů (Laughlin et al., 1998), jen málo studií se však věnovalo sledování průtoku krve a zároveň analyzovalo velikost infarktu indukovanou I/R (Brown et al., 2005).

Fyzickou zátěž lze rozdělit podle několika kritérií, jakými jsou intenzita cvičení a doba jeho trvání. Dle délky trvání rozlišujeme fyzickou zátěž jako na krátkodobou, střednědobou a dlouhodobou. V experimentálních podmínkách, kde se pro adaptaci na fyzickou zátěž velmi často využívají laboratorní potkani, se setkáváme se dvěma základními modely tréninku. Některé vědecké skupiny využívají ve svých studiích plavání laboratorních potkanů v bazénech pro hlodavce (Garciaarena et al., 2008), další pak používají běhací pásy (Bowles et al., 1992; Hamilton et al., 2000; Bertagnolli et al., 2008; Alánová et al., 2017) nebo tzv. kolotoče (Mizuno et al., 2015; Collins et al., 2004). Oba tréninkové modely jsou založeny na využití přirozených vlastností a fyziologických schopností těchto zvířat, tj. běhat a plavat. Ve většině studií bývá pevně stanovena doba tréninku (nejčastěji 60 minut), po kterou zvířata vybranou aktivitu vykonávají. Intenzitu cvičení lze u běhacích pásů regulovat sklonem pásu a rychlostí jeho posunu.

Jak je popsáno níže, vystavení organismu laboratorních potkanů cvičení má pozitivní vliv na ischemickou toleranci srdce. Zvolená fyzická zátěž sama o sobě nemusí být vždy dostatečně intenzivní kardioprotektivní intervencí a jeho vliv na organismus může být tlumen faktory vnějšího prostředí. V dostupných pracích (např. Bowles et al., 1992; Hamilton et al., 2000; Collins et al., 2004; Bertagnolli et al., 2008; Mizuno et al., 2015; Alánová et al., 2017) byla zvířata adaptovaná na zátěž chována ve standartních podmínkách regulovaného světelného dne (12 hodinové cykly světla a tmy) s adaptací na cvičení ve světelné části dne. Potkan je však zvíře s výraznou noční aktivitou a načasování cvičení do světelné části dne by mohlo mít vliv na efektivitu kardioprotektivního účinku. Druhým problémem při adaptaci potkanů na cvičení je nemožnost zvířete zvolit si v experimentálních podmínkách délku a intenzitu zátěže dle individuálních předpokladů. Oba tyto problematické faktory

experimentální adaptace na fyzickou zátěž dosud nebyly cíleným předmětem vědeckých studií a je třeba mít je na paměti.

Zvýšená ischemická tolerance srdce u fyzicky aktivních jedinců je závislá na experimentálním modelu, a to ať již živočišném druhu nebo protokolu fyzické zátěže. Například Brown et al. (2003) ve své práci prokázali, že pro snížení velikosti infarktu myokardu u laboratorních potkanů bylo potřeba alespoň 20 týdnů cvičení. Na druhou stranu Lee et al. (2012) uvedli, že pro zmenšení velikosti infarktu stačilo pouze 3 – 5 dnů fyzické zátěže.

Odolnost srdce k ischemii se také může lišit mezi jednotlivými kmeny. Například Bowles et al. (1992) použili pro sledování vlivu fyzické zátěže na srdce kmen potkanů Fisher 344 (F344). Dospělí samci byli adaptováni na cvičení po dobu 11-16 týdnů s různou intenzitou zatížení. Tři skupiny zvířat byly trénovány na běhacím pásu se shodnou dobou trvání, ale rozdílnou rychlostí běhu a sklonu pásu. Srdeční funkce byla hodnocena před ischemií a ve 25. minutě ischemie na modelu izolovaného perfundovaného srdce. Postischemická kontraktilní funkce byla prokazatelně vyšší u všech trénovaných skupin oproti kontrolním netrénovaným potkanům.

V roce 1998 provedli Powers et al. hodnocení vlivu fyzické zátěže na ischemickou toleranci srdce u samic kmene Sprague-Dawley (SD). Zvířata byla na cvičení adaptována po dobu 10 týdnů a poté jim byla provedena okluze koronární arterie *in vivo* (ischemie 20 minut, reperfuze 10 minut). V porovnání s kontrolní netrénovanou skupinou vykazovala trénovaná zvířata po celou dobu I/R vyšší hodnoty systolického krevního tlaku. U trénovaných samic byla také zaznamenána nižší tepová frekvence. Trénink vyvolal v myokardu pokusných zvířat signifikantní nárůst komorových neproteinových thiolů, proteinů tepelného šoku (HSP), aktivitu SOD, snížil uvolnění laktát dehydrogenázy a hodnoty lipoperoxidace. Všechna tato data potvrzují, že fyzický trénink má pozitivní účinek na kontraktilitu myokardu jak před tak po ischemii. Zvýšení hodnot exprese SOD znamená, že je zvýšená také antioxidační ochrana buňky, která zamezuje poškození buněk vlivem ROS, které se v myokardu tvoří v průběhu ischemie. Z výše uvedených příkladů experimentálních studií vyplývá, že pro studium kardioprotektivních fenoménů lze použít různé kmeny potkanů. Nicméně, citlivostí srdce k ischemii u různých kmenů potkanů vystavených pravidelné fyzické zátěži se dosud nikdo systematicky nevěnoval a neexistuje žádná srovnávací studie.

Kontraktilitou myokardu a expresí HSP v průběhu I/R se v roce 2000 zabýval tým Karyn L. Hamiltonové. Ve své práci použili potkany kmene SD, které vystavili třídnímu fyzickému tréninku na běžeckém pásu v rozdílných teplotních podmínkách. Zvířata byla rozdělena na kontrolní skupinu, trénující skupinu v chladu (4°C) a zvířata běžící při normální teplotě (25°C). Následně vystavili potkany 20 minutám ischemie a 30 minutám reperfuze. V průběhu cvičení sledovali mimo jiné teplotu těla zvířat. U jedinců vystavených cvičení ve 4°C nedošlo po jedné hodině cvičení k prokazatelnému zvýšení tělesné teploty, zatímco u zvířat běžících při standardní teplotě (25°C) došlo vlivem cvičení ke statisticky průkaznému nárůstu tělesné teploty. Oba protokoly tréninku vedly ke kardioprotektivnímu účinku na myokard během I/R. Cvičení při normální teplotě průkazně vedlo ke zvýšení HSP, běhání při nízké teplotě expresi HSP neměnilo. Tyto výsledky ukázaly, že fyzická zátěž je efektivní protektivní intervence nezávislá na vnějších teplotních podmínkách a expresi HSP.

Demirel et al. (2001) naopak sledovali vliv krátkodobého cvičení a tepelného stresu na I/R toleranci srdce *in vivo*. V pokusu byly použity samice kmene SD adaptované na cvičení na běhacím pásu s následnou 30 minutovou okluzí koronární arterie a 30 minutovou reperfuzí. Zvířata byla rozdělena do skupin na kontroly a cvičící potkany (3 nebo 5 po sobě jdoucích dnů, 60 minut cvičení/den). Operační fáze pokusu následovala u všech skupin 24 hodin po posledním tréninku. Vystavení organismu potkanů třem i pěti dnům cvičení vedlo ke zlepšení kontraktility srdce v průběhu ischemie i reperfuze, které dokládá zvýšení hladin redukováného a oxidovaného glutathionu v myokardu a zvýšení exprese MnSOD. Oproti kontrolní skupině byl u všech ostatních zvířat zaznamenán také pokles tepové frekvence v průběhu ischemie a statisticky průkazné zvýšení rozvoje tlaku v levé komoře (LVDP) v průběhu I/R. Oba tyto jevy jsou známkou pozitivní odpovědi srdce na ischemický zásah.

Jak již bylo zmíněno, jedním z diskutovaných problémů spojovaných s experimenty zkoumajícími ischemickou toleranci srdce bylo využívání příliš mladých zvířat, která neodpovídají klinicky ekvivalentním situacím. Touto otázkou se při hodnocení vlivu fyzické zátěže na rozsah postižení myokardu při infarktu se ve své práci věnovali Starnes et al. (2003). V pokusu byli použiti potkani kmene F344 ve věku 4, 12 a 21 měsíců. Podvaz koronární arterie proběhl na izolovaném perfundovaném srdci. Den před usmrcením zvířete a vyjmutím srdce byli potkani vystaveni 60 minutám cvičení. Ischemie trvala 22,5 minuty a po ní následovala 30 minutová reperfuze. V porovnání s kontrolními netrénovanými skupinami potkanů došlo u všech trénovaných skupin ke zlepšení srdeční funkce

a systolického tlaku. Nejlepší efekt cvičení byl pozorován u zvířat ve 12 měsících stáří, tzn. přibližně v polovině běžné délky jejich života. Tyto výsledky potvrzují, že odpověď organismu na I/R a případný vliv kardioprotektivních intervencí včetně pravidelného fyzického tréninku provedených před okluzí koronární arterie může být ovlivněn faktory vnějšího i vnitřního prostředí a věk je jedním z faktorů, který ovlivňuje ischemickou toleranci srdce u potkanů.

V roce 2004 Collins et al. sledovali vliv každodenního cvičení na snížení doby trvání tachyarytmií (komorové tachykardie a fibrilace) vznikajících vlivem ischemického poškozením myokardu. Právě komorové fibrilace jsou hlavní příčinou úmrtí při infarktu myokardu. Collins et al. (2004) použili ve svých pokusech SHR potkany a normotenzní kmen Wistar-Kyoto (WKY). Zvířata byla rozdělena do skupin na netrénující a trénující, kde trénovaná zvířata měla volně k dispozici „kolotoče“ na běhání (4-6 týdnů) před infarktem myokardu. Trénující potkani byli do klecí s kolotoči umístěni také po provedení okluze koronární arterie a zde ponecháni dalších 4-6 týdnů. Před ischemií, v šestém týdnu adaptace na dobrovolný fyzický trénink, dosahovaly naměřené hodnoty uběhnuté vzdálenosti $7,7 \pm 1,3$ km/den. Při měření v 10. týdnu (po okluzi koronární arterie a zavedení telemetrických sond pro snímání elektrické aktivity srdce) byla aktivita zvířat téměř stejná jako před operací ($5,4 \pm 0,9$ km/den). Fyzický trénink prokazatelně snížil hodnoty středního arteriálního tlaku a zkrátil dobu trvání a výskyt tachyarytmií u hypertenzních zvířat oproti normotenzním kontrolám. U cvičících potkanů došlo před okluzí také k výraznému snížení tepové frekvence oproti kontrolním skupinám, ale vlivem I/R došlo k prodloužení doby trvání tachyarytmií oproti normotenzní i kontrolní hypertenzní skupině. Podle výsledků této studie má u hypertenzních potkanů cvičení pozitivní vliv na snížení tepové frekvence, které je pro poškozené srdce prospěšné, ale může působit negativně na rozvoj závažných komorových arytmií.

Z předloženého textu je zřejmé, že v pokusech jsou využívány rozdílné kmeny laboratorních potkanů obou pohlaví. Závislostí vlivu pohlaví na ischemickou toleranci srdce po adaptaci na fyzickou zátěž se zabývali Brown et al. (2005). V jejich pokusu byli použiti samci a samice kmene SD, kteří byli adaptováni na 1 nebo 5 dní fyzického tréninku na běžecském pásu pro hlodavce. Ischemie byla provedena na modelu izolovaného perfundovaného srdce po dobu 1 hodiny s následnou dvouhodinovou reperfuzí. V každém srdci byla hodnocena velikost infarktu, vyvinutý tlak a průtok perfuzního roztoku srdcem. Mezi samci i samicemi nedošlo v období před ischemií ke změnám tlaku a průtoku krve, stejně tak jako nedošlo ke změně těchto hodnot vlivem cvičení. U netrénujících zvířat měly

samice oproti samcům signifikantně menší velikost infarktu. Vlivem krátkodobé adaptace na fyzický trénink došlo u samců ke zmenšení velikosti infarktu po 1 i 5 dnech cvičení. U samic nedošlo k průkaznému zmenšení velikosti infarktu po 1 dni cvičení, ale po 5 dnech cvičení došlo k výraznému zmenšení velikosti oblasti poškozené infarktem. U netrénujících samců SD byla prokázána vyšší aktivita MnSOD oproti samicím a tyto hodnoty se vlivem cvičení neměnily. Dle hodnot aktivity MnSOD jsou samci vnímavější ke kardioprotektivnímu účinku i krátké fyzické zátěže. Naproti tomu k ischemii rezistentnější samice s přirozeně nižšími hodnotami aktivity antioxidantního enzymu MnSOD reagují silněji než samci na stimul dlouhodobějšího tréninku, ale krátkodobý trénink nezpůsobuje prokazatelné snížení již zlepšené ischemické tolerance srdce.

Jak již bylo uvedeno výše, v části zabývající se studií Collinse et al. (2004), ischemickou tolerancí srdce může negativně ovlivňovat výskyt hypertenze a zní pramenící hypertrofie srdce. V jiné studii Bertagnolli et al. (2008) analyzovali efekt cvičení na odolnost srdce k ischemii u samců SHR potkanů. V experimentu byla zvířata rozdělena do skupin na netrénující a trénující a byl použit desetitýdenní protokol tréninku. Potkani běhali 1 hodinu denně 5 dní v týdnu. U trénovaných zvířat došlo k mírnému nárůstu tělesné hmotnosti a ke statisticky signifikantnímu zmenšení relativní hmotnosti srdce, která je jinak u hypertenzních potkanů vyšší. Tento pokles mohl ukazovat pozitivní vliv cvičení na myokard, který byl v důsledku hypertenze hypertrofován. V pokusu byla u potkanů mimo jiné sledována i tepová frekvence, u které nedošlo na rozdíl od studie Collinse et al. (2004) k výraznějším změnám, a hodnota středního arteriálního tlaku, kde došlo vlivem fyzické zátěže k jeho prokazatelnému snížení, což mohlo pozitivně ovlivnit hmotnost LV.

V jiné studii Masson et al. (2015) použili ve své práci také potkany kmene SHR a WKY, na kterých sledovali vliv krátkodobého cvičení na kardiovaskulární a autonomní funkce. Při porovnání netrénuvaných zvířat vykazovali SHR potkani vyšší tepovou frekvenci a vyšší hodnotu středního arteriálního tlaku krve oproti kontrolní normotenzní skupině WKY. Vlivem 14 dnů tréninku nedošlo ke snížení tlaku krve v rámci jednotlivých kmenů, ale došlo k poměrně výraznému poklesu tepové frekvence u trénovaných SHR potkanů. Snížení tepové frekvence se odrazilo na zmenšení poškození srdeční tkáně v důsledku hypertenze.

Problematikou odpovědi kardiovaskulárního systému SHR potkanů na cvičení se ve své práci zabývali také Mizuno et al. (2015). V pokusech porovnávali změny hodnot vyvolané cvičením u kmenů WKY a SHR. V pokusu byl použit tříměsíční tréninkový protokol adaptace na cvičení s využitím běhacích kol pro hlodavce, která měla zvířata

k dispozici v kleci po celou dobu pokusu a mohla si sama určovat intenzitu a dobu fyzické aktivity. Po třech měsících adaptace u trénované skupiny SHR klesly hodnoty MAP. Trénovaná zvířata vykazovala také vyšší tělesnou hmotnost a nižší poměrnou hmotnost srdce vůči hmotnosti těla oproti kontrolním skupinám. Při kontrole v osmém týdnu tréninku vykazovala trénovaná skupina SHR signifikantně delší uběhnutou vzdálenost oproti trénované skupině WKY. Delší uběhnutá vzdálenost při dobrovolném cvičení u SHR potkanů a zároveň snížení MAP vlivem cvičení může naznačovat, že snížení přirozeně vysokého krevního tlaku pravidelným cvičením působí na tato zvířata pozitivně a zvířata sama dobrovolně efektu cvičení využívají.

Jedna z nejnovějších prací zabývající se fyzickým tréninkem jako kardioprotektivním nástrojem pro zvýšení ischemické tolerance srdce potkanů využívá při cvičení také druhého kardioprotektivního fenoménu, chronické hypoxie (Alánová et al. 2017). V této studii byli použiti samci kmene WKY rozdělení do čtyř skupin na normoxická necvičící, normoxická cvičící, hypoxická necvičící a hypoxická cvičící. Pro adaptaci na fyzický trénink byl použit model běhacího pásu. Zvířata adaptovaná na chronickou normobarickou hypoxii byla adaptována v hypoxické komoře a zde probíhala také adaptace na fyzický trénink. Vlivem cvičení došlo u normoxických trénovaných zvířat ke zmenšení velikosti infarktu oproti kontrolní normoxické netrénované skupině. Vlivem hypoxie došlo u netrénujících potkanů k výraznějšímu snížení velikosti infarktu, ovšem při spojení kardioprotektivního vlivu cvičení a hypoxie již nedošlo k prohloubení kardioprotektivního efektu (Alánová et al., 2017).

Tyto poznatky tedy naznačují, že v důsledku adaptace na chronickou hypoxii došlo k maximální aktivaci endogenních protektivních mechanismů, a proto nedošlo k aditivnímu protektivnímu efektu v kombinaci cvičení a chronické hypoxie. Z výše uvedených poznatků lze souhrnně konstatovat, že fyzický trénink snižuje velikost infarktu myokardu napříč studovanými kmeny laboratorních potkanů. U SHR potkanů dochází vlivem cvičení ke snížení tepové frekvence, a hodnot MAP, ale v účincích tréninku na výskyt a závažnost komorových arytmií se výsledky dosud publikovaných studií neshodují. Pozitivní vliv fyzické zátěže na ischemický myokard pravděpodobně souvisí se zvýšenou expresí enzymu MnSOD, který má v buňkách antioxidační a ochrannou funkci. Byl prokázán vliv věku na ischemickou toleranci srdce k ischemii, a také vliv pohlaví na účinnost protektivní funkce krátkodobé fyzické zátěže.

3.5.2.2 Chronická hypoxie

Chronická hypoxie je stav organismu, který vzniká na základě disproporce mezi přísunem kyslíku do tkání a jejich nárokem na něj. Tento stav může být vyvolán několika způsoby. Nejběžnějším typem chronické hypoxie je hypoxie ischemická, vyvolaná částečným nebo úplným přerušением proudění krve koronárními cévami. Druhým typem je hypoxie systémová, která je charakteristická poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Třetí typ hypoxie tzv. anemická hypoxie vzniká snížením kapacity krve pro přenos kyslíku při normálním parciálním tlaku kyslíku arteriální krve (Ošťádal et al., 2007).

Přirozeným modelem pro studium chronické hypoxie je vysokohorské prostředí. V experimentálních podmínkách však lze hypoxické prostředí simulovat v hypoxických komorách. Prostedí hypoxických komor může být buď normobarické (vzniká řízenou změnou složení plynů) nebo hypobarické (vzniká snížením parciálního tlaku kyslíku částečným odčerpáním vzduchu).

Pozitivní kardioprotektivní vliv chronické hypoxie na organismus může být navozen dvojím způsobem. Prvním je dlouhodobé vystavení daného jedince hypoxickému prostředí (v přirozených podmínkách život ve vysoké nadmořské výšce). Druhým způsobem je intermitentní vystavování organismu hypoxickému prostředí prostřednictvím opakovaných hypoxických expozií. Na rozvoj důsledku intermitentní formy chronické hypoxie má vliv délka a intenzita expozií, počet hypoxických epizod za den a celková doba, po jakou byl organismus hypoxii vystaven (Asemu et al., 2000). Jak bylo nedávno ukázáno, rychle se opakující střídání hypoxie s normoxií (vteřinové intervaly) tzv. model spánkové apnoe je škodlivý, na rozdíl od několikahodinových expozií hypoxie vykazujících protektivní efekt. Škodlivý vliv spánkové apnoe na odolnost srdce k ischemii byl prokázán u hypertenzního kmene SHR i normotenzního kmene WKY (Belaidi et al., 2008).

Kromě hypoxie vyvolané v laboratorních podmínkách existují dva případy přirozené hypoxie. Prvním je již zmíněné permanentní vystavení organismu hypoxii u obyvatel žijících ve vysokých nadmořských výškách, druhým pak myokard plodu, který je *in utero* vystaven hypoxii odpovídající cca 8000 metrů nad mořem. Ošťádalová et al. (2002) ukázala, že hypoxický fetální oběh způsobuje u plodu větší odolnost k ischemii oproti dospělým jedincům. Po narození však dochází k postupnému snižování ischemické tolerance srdce.

Již v 50. letech minulého století byla v rámci klinicko-epidemiologického pozorování poprvé odhalena menší náchylnost k infarktu myokardu u lidí žijících ve vyšších

nadmořských výškách (Hurtado, 1960). Kardioprotektivní účinky hypoxie byly poprvé experimentálně studovány v roce 1958 v Praze (Kopecký et Daum, 1958). V této první studii bylo zjištěno, že vystavení laboratorních potkanů prostředí simulujícímu nadmořskou výšku 7000 m (každý druhý den po dobu 6 týdnů) výrazně zvyšuje postischemickou kontraktilní funkci srdečního svalu v průběhu reperfuze oproti kontrolní skupině. Dále bylo zjištěno, že kardioprotektivní účinky chronické hypoxie lze navodit jak u samců tak samic. Svalovina izolovaného srdce samic laboratorního potkana je více tolerantní k nedostatku kyslíku a tento fenomén přetrvává i přes to, že vlivem chronické hypoxie dochází ke zvýšení tolerance srdce na nedostatek kyslíku u obou pohlaví (Ošťádal et al., 1984). Většina experimentálních studií prokázala, že u dospělých zvířat má adaptace na chronickou hypoxii pozitivní účinek na zmenšení velikosti infarktu a lepší kontraktilní funkce srdce po ischemii. Jak již bylo několikrát zmíněno, I/R poškození srdce s sebou nepřináší pouze nevratné poškození buněk myokardu a vedoucí k postischemické kontraktilní dysfunkci, ale vede také ke vzniku arytmií. Právě arytmiím se ve své práci věnovali Neckář et al. (2002). V práci byl sledován vliv adaptace na intermitentní hypobarickou hypoxii (7000m, 8 h/den, 24-30 expozií) spojený s ischemickým preconditioningem (2 nebo 5 pětiminutových okluzí s následující 5 minutovou reperfuzí) na rozvoj ischemického poškození myokardu. Intermitentní chronická hypoxie měla pozitivní vliv na snížení hodnoty skóre ischemických arytmií, což znamená, že arytmie vyskytující se v průběhu ischemie byly méně závažné. Vlivem adaptace byla také zmenšena velikost infarktu. Ischemický preconditioning významněji snížil hodnotu arytmiického skóre v porovnání s chronickou hypoxií. Použití preconditioningu u adaptovaných zvířat nevedlo k dalšímu zmenšení velikosti infarktu oproti kontrolní skupině. Ze získaných výsledků vyplynulo, že hypoxie a preconditioning nemají aditivní účinek.

Kardioprotektivní účinky hypoxie byly dále zkoumány také ve studii Neckáře et al. (2004), kde byla sledována ischemická tolerance srdce po skončení adaptace, při zotavení v normoxických podmínkách. Zvířata byla adaptována na podmínky intermitentní hypobarické hypoxie (7000 m, 8 hodin/den, 35 epizod). 24, 7, 35 a 90 dní po adaptaci na hypoxii byla potkanům provedena okluze koronární arterie o délce 30 min s následnou čtyřhodinovou reperfuzí. Kardioprotektivní efekt hypoxie na snížení velikosti infarktu byl patrný i v 35 dni po ukončení adaptace na hypoxii. Chronická hypoxie měla také vliv na snížení výskytu ischemických a reperfuzních komorových arytmií. Zde však kardioprotektivní efekt vymizel v průběhu prvního týdne zotavování v normoxii (Neckář et al., 2004). Tyto výsledky ukázaly, že na rozdíl od preconditioningu

nebo postconditioningu, kardioprotektivní účinek chronické hypoxie přetrvává v rámci týdnů, což jej činí velmi zajímavým z klinického hlediska.

3.3 Model SHR potkanů

Inbrední spontánně hypertenzní kmen laboratorního potkana (SHR) byl vyšlechtěn z kmene Wistar-Kyoto (WKY). Jedná se o nejvyužívanější kmen potkana s vrozenou hypertenzí neurogenního původu (Kurtz et al., 1988; Pravenec et al., 2010). Chov SHR potkanů pro laboratorní účely byl Národním institutem pro zdraví povolen až po plné inbredizaci tohoto kmene (po 20 generacích připařování bratrů a sester) v roce 1969. Dodržení této zásady vedlo k vytvoření přirozeně hypertenzního kmene laboratorního potkana, který se neliší schopností růstu ani hodnotami krevního tlaku, i když se jedná o jedince z různých chovatelských zdrojů (Kurtz et Morris, 1992). Hypertenze u kmene SHR způsobuje hypertrofii srdce, periferních arterií a arteriol (Masson et al., 2015). SHR je vhodným modelem geneticky indukované hypertenze, na kterém je možné studovat nemoci spojené s hypertenzí u člověka. Ve specifických podmínkách vnějšího prostředí, například při konzumaci stravy bohaté na fruktózu se mohou u SHR potkanů rozvinout také přidružené jevy metabolického syndromu zahrnující například resistenci k inzulinu. Stejně jako u lidí tvoří i u SHR potkanů spontánní hypertenze a přidružené metabolické poruchy komplexní polygenní znaky. Identifikace genů zodpovědných za hypertenzi u SHR potkanů by mohla posloužit pro studium úlohy lidských orthologních genů v kardiovaskulárních a metabolických onemocněních (Pravenec a Kurtz, 2000).

Dlouhodobá hypertenze může významným způsobem ovlivnit citlivost myokardu k ischemii. Na druhou stranu i v patologicky změněných srdcích hypertenzních zvířat by mohla přetrvávat vnitřní ischemická tolerance myokardu, která může být modifikována dlouhodobým nebo krátkodobým vystavením organismu stresovým podmínkám (Ravingerová et al., 2011). V souvislosti s adaptací na stresové prostředí byl proveden experiment, ve kterém byli použiti samci SHR a WKY. Jako stresový faktor bylo použito umístění většího počtu zvířat (5) do klecí dimenzovaných pro dvě zvířata tzc crowding. Ve stresových podmínkách byla sledovaná zvířata ponechána 8 týdnů. Na konci pokusu byla všem potkanům provedena okluze koronární arterie a následně hodnocena velikost infarktu, tlak krve a další přidružené parametry. U obou stresovaných skupin došlo k signifikantnímu zkrácení doby trvání VT a ke zmenšení velikosti infarktu oproti nestresovaným kontrolám.

Při porovnání stresovaných a nestresovaných hypertenzních zvířat byla doba trvání VT kratší u normotenzních zvířat, stejně jako byla menší velikost infarktu.

Odpovědí organismu na stres je zvýšení ischemické tolerance srdce, které se projeví zmenšením velikosti infarktu i zkrácením doby trvání závažných komorových arytmií. U zvířat, jejichž srdce je ovlivněno změnami v důsledku hypertenze (např. hypertrofie myokardu), která by sama o sobě mohla na organismus působit jako vnitřní stresový faktor, nedochází vlivem působení vnějšího stresoru k tak výrazné protektivní odpovědi myokardu jako u zvířat normotenzních, jejichž organismus není zatížen žádným onemocněním.

3.3.1 Konplastické kmeny

Běžně používané inbrední kmeny laboratorních potkanů lze rozdělit do čtyř skupin podle rozdílných haplotypů DNA mitochondriálního genomu. Tyto kmeny jsou Brown Norway (BN), Lewis (LEW), Fisher 344 (F344) a spontánně hypertenzní potkani (SHR). Ve Fyziologickém ústavu AVČR byly vytvořeny 3 SHR konplastické kmeny potkanů charakteristické tím, že mají totožné jaderné geny, ale liší se mitochondriálním genomem. Mitochondriální proteiny jsou kódovány jak jaderným tak právě mitochondriálním genomem. U savců se na chromozomech nachází přes 1000 mitochondriálních genů kódovaných jaderným genomem, zatímco mitochondriální DNA (mtDNA) obsahuje pouze 37 genů kódujících 13 mRNA pro základní peptidy respiratorního řetězce. I přes to, že mtDNA kóduje vznik pouze malého množství proteinů, mohou právě tyto proteiny mít významný vliv na fungování orgánů včetně srdce (Neckář et al., 2017). Konplastické kmeny vznikly více než 10 zpětnými kříženími samců výše zmíněných kmenů BN, F344 a LEW se samicemi kmene SHR (Houštěk et al., 2014). Tyto kmeny tak představují zajímavý model pro studium úlohy mitochondriálních genů na ischemickou toleranci srdce. Změny v mitochondriálním genomu mohou přispívat ke změně míry buněčné smrti kardiomyocytů zapříčiněné I/R poškozením prostřednictvím vytváření nadměrného množství ROS, Ca²⁺ iontů a změn citlivosti MTP pórů (Muravyeva et al., 2014).

Při tvorbě konplastického kmene SHRmt^{LEW} použitého v našich experimentech byl transportován mitochondriální genom inbredního kmene LEW na genetické pozadí progenitorového inbredního kmene SHR. Pro urychlení šlechtění byla použita Behringerova šlechtitelská strategie. Podle Silverovy formule jsou po 12 kříženích homozygotní všichni jedinci v 99,95 % všech lokusů. Pomocí sekvenování byly prokázány relativně malé rozdíly

mezi mitochondriálními genomy SHR a SHRmt^{LEW}. Kompletní analýza sekvencí mitochondriální DNA (mtDNA), která porovnávala kmen SHR a SHRmt^{LEW} odhalila záměnu aminokyselin v mitochondriálním enzymatickém komplexu NADH dehydrogenáza (komplex I) v podjednotkách 2, 4 a 5. Dvě z těchto variant na podjednotce 4 (mt-Nd4) se nachází blízko genů, které jsou u člověka asociovány s omezenou schopností vyšší fyzické aktivity a diabetem. U konplastického kmene SHRmt^{LEW} bylo prokázáno zvýšení hladin neesterifikovaných MK v séru a resistance k inzulinem stimulované inkorporace glukózy do lipidů tukové tkáně (Houštěk et al., 2011).

V rámci studování úlohy mitochondriálního genomu u potkanů s genetickým prozatím SHR byly již provedeny některé experimenty na konplastických kmenech SHRmt^{F344} (Houštěk et al., 2014) a SHRmt^{BN} (Neckář et al., 2017). Při porovnávání konplastického kmene SHRmt^{F344} s kmenem SHR bylo zjištěno mnoho rozdílu v mitochondriální DNA zahrnující substituce v genech kódujících proteiny, mutace v genech tRNA a rRNA, které byly spojeny se snížením funkce enzymů oxidativní fosforylace (OXPHOS) v srdci, svalech a ledvinách. Stejně jako u SHRmt^{BN} a SHRmt^{LEW} byl i u SHRmt^{F344} prokázán snížený obsah a aktivita proteinových komplexů OXPHOS oproti SHR kontrolám. Změnou mitochondriálního genomu u SHRmt^{F344} došlo také k mírnému zvětšení relativní hmotnosti srdce, které nebylo závislé na tlaku krve, neboť SHRmt^{F344} měli podobnou míru hypertenze jako SHR. Zjištěné výsledky ukazují, že původní mitochondriální haplotyp SHR zajišťuje relativní ochranu LV před hypertrofií indukovanou vrozenou hypertenzí, zatímco u mitochondriálního genomu z kmene F344 je tento protektivní efekt nižší, což může být způsobeno již zmíněným snížením obsahu a enzymatické aktivity systému OXPHOS (Houštěk et al., 2014)

U konplastického kmene SHRmt^{BN} byla Neckářem et al. (2017) analyzována úloha mitochondriálního genomu při kardioprotektivním působení chronické hypoxie k ischemii myokardu. U normoxických potkanů nebyl prokázán rozdíl ve velikosti infarktu. Vlivem 3 týdenní adaptace na CNH došlo k signifikantnímu snížení velikosti infarktu jak u kmene SHR, tak i SHRmt^{BN}. U konplastického kmene adaptovaného na CNH byla velikosti infarktu v porovnání s hypoxickými SHR menší, což značí, že mtDNA přenesená z kmene BN je více vnímavá ke kardioprotektivní stimulaci myokardu vyvolanou hypoxií, než původní mtDNA SHR. Při sledování aktivity OXPHOS byl po adaptaci na CNH zjištěn pokles aktivity enzymů komplexu IV respiračního řetězce. U konplastického kmene SHRmt^{LEW} byly změny

v dýchacím řetězci mitochondrií pozorované také v komplexu I, ale vliv kardioprotektivního účinku hypoxie ani fyzické zátěže se neprojevil.

4. Materiál a metody

4.1 Experimentální zvířata

V pokusech byli použiti dospělí samci laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*). Kontrolní skupinu tvořili spontánně hypertenzní potkani (SHR). Dále byli pro adaptaci na fyzickou zátěž a chronickou kontinuální hypoxii (CNH) použiti potkani konplastického kmene Lewis (SHRmt^{LEW}). Charakteristika experimentálních skupin zvířat je uvedena v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Skupiny experimentálních zvířat.

| | |
|------------------------|--|
| SHR | Kontrolní skupina, netrénující, normoxická |
| T-SHR | Kontrolní skupina adaptovaná na fyzickou zátěž |
| H-SHR | Kontrolní skupina adaptovaná na CNH |
| SHRmt ^{LEW} | Skupina konplastického kmene SHRmt ^{LEW} netrénující, normoxická |
| T-SHRmt ^{LEW} | Skupina konplastického kmene SHRmt ^{LEW} adaptovaná na fyzickou zátěž |
| H-SHRmt ^{LEW} | Skupina konplastického kmene SHRmt ^{LEW} adaptovaná na CNH |

4.2 Modely protekce

V diplomové práci byly studovány dva modely protekce myokardu. První série pokusů byla věnována vlivu adaptace na fyzickou zátěž a druhá vlivu adaptace na kontinuální chronickou hypoxii na ischemickou toleranci srdce laboratorního potkana.

4.2.1 Adaptace na fyzickou zátěž

V první části diplomové práce byl sledován vliv pravidelné fyzické zátěže laboratorních potkanů na ischemickou toleranci srdce. Zvířata byla postupně adaptována zvyšující se zátěží po dobu 14 dní. Pro adaptaci na fyzickou zátěž byl použit běhací pás

„Exer-3/6 Treadmill for Mice and Rats“ (Columbus Instruments, USA). Toto zařízení umožňovalo trénink až 3 potkanů najednou. V průběhu adaptace byla navyšována rychlost běhu, doba trvání tréninku a tím se zvyšovala i celková uběhnutá vzdálenost. Potkani absolvovali vždy pět dní tréninku (pracovní dny) a dva dny odpočinku (víkend). Trénink probíhal v dopoledních hodinách. Pořadí skupin v tréninku se střídalo.

Trénované skupiny zvířat (T-SHR, T-SHRmt^{LEW}) zahájily cvičení při počáteční rychlosti pohybu pásu 20 m/min po dobu 10 minut. V průběhu prvního týdne byl čas tréninku vždy prodloužen o 10 minut se zvyšující se rychlostí (viz *Tabulka 2*). Na konci prvního týdne (5. den adaptace) zvířata absolvovala trénink o celkovém čase 50 minut při maximální stanovené rychlosti 30 m/min. Průměrná uběhnutá vzdálenost byla 1445 metrů. Druhý týden adaptace běhali potkani jednu hodinu denně rychlostí 30 m/min s průměrnou uběhnutou vzdáleností 1750 metrů.

Zvířata byla po celou dobu pokusu sledována a individuálně hodnocena. U každého zvířete byla hodnocena adaptabilita na zátěž a ochota běhat pomocí klasického známkovacího schématu na stupnici od 1 (nejlepší) do 5 (nejhorší) (viz *Tabulka 3*).

Tabulka 2: *Protokol tréninku.*

| | Den adaptace – doba trvání zátěže (min) | | | | | |
|----------|---|----|----|----|----|------|
| Rychlost | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7-12 |
| 20 | 5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 22,5 | 5 | - | - | - | - | - |
| 25 | - | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 27 | - | - | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 30 | - | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |

Tabulka 3: *Kritéria hodnocení adaptability na trénink*

| Hodnocení | Popis |
|-----------|---|
| 1 | Běží a nedotýká se drátů, nebo jen výjimečně |
| 2 | Běží a občas se krátce dotkne drátů, nepišťí nebo jen výjimečně |
| 3 | Často se dotýká drátů a pišťí, ale více než 50 % času běží |
| 4 | Často sedí na drátech, občas běží – méně než 50 % |
| 5 | Neběží nebo jen výjimečně |

4.2.2 Adaptace na kontinuální chronickou hypoxii (CNH)

Přirozeným modelem pro výzkum vlivu chronické hypoxie je vysokohorské prostředí (tzv. výšková hypoxie). V experimentálních podmínkách lze pokusná zvířata adaptovat v hypoxických komorách, kde je výsledné hypoxické prostředí normobarické (hypoxie navozená řízenou změnou složení plynů) nebo hypobarické (snížení pO_2 částečným odčerpáním vzduchu z komory). Tyto modely umožňují sledování pozitivních i negativních adaptivních změn na organismus, průběh desadaptace a případně provádět také farmakologickou terapii s cílem zabránit nepříznivým projevům adaptace na chronickou hypoxii. Normobarická i hypobarická hypoxie může mít kontinuální nebo intermitentní průběh.

V diplomové práci byl sledován vliv normobarické chronické kontinuální hypoxie (CNH) na potkany kmene SHR a konplastického kmene SHR^{mt^{LEW}}. Zvířata byla v normobarické hypoxické komoře adaptována pomocí hypoxických generátorů (Hypoxico) po dobu třech týdnů (24 hod/den, 7 dní/týden) při hypoxii 10% O_2 . Požadovaného složení vzduchu v komoře bylo dosaženo před zahájením pokusu. Hypoxické podmínky včetně teploty a vlhkosti se v průběhu adaptace neměnily.

4.3 Experimentální model srdce *in situ*

Model srdce *in situ* je standardní metoda cílená na studium citlivosti buněk myokardu k latentnímu poškození v důsledku infarktu myokardu u laboratorních zvířat. Metoda je založená na akutní okluzi koronární arterie u anestezovaného zvířete, která vyvolá regionální ischemii myokardu. Ke vzniku infarktu myokardu vedou ireverzibilní změny kardiomyocytů způsobené nedostatečným zásobením kyslíkem v průběhu ischemie. Při ischemii, stejně jako v době reperfúze lze sledovat i další projevy akutního infarktu myokardu jako je výskyt komorových arytmií. Na konci experimentu lze histochemicky či histologicky zjistit velikost infarktu.

4.3.1 Operační fáze experimentu

Laboratorní potkani byli anestezováni intraperitoneálně (i.p.) pentobarbitalem sodným (60 mg/kg). Účinek a hloubka anestezie byly kontrolovány korneálním reflexem a štípnutím zvířete do koncové části ocasu. Zvíře v hluboké anestezii bylo přeneseno

na vyhříváný operační stolek. Po celou dobu pokusu byla tělesná teplota monitorována pomocí rektálního teploměru a udržována v rozmezí 36,5 - 37,5°C. Končetiny zvířete byly k operačnímu stolku lehce fixovány gumičkami. Byla provedena kanylace *a. carotis* heparinizovanou polyethylenovou kanylou. Následně byla provedena tracheotomie a do trachey byla zavedena polyethylenová kanyla. Zvíře bylo napojeno na ventilátor pro hlodavce (Ugo Basile, Italy); parametry nastavení byly: 65-70 nádechu/min a dechový objem 12 ml/kg tělesné hmotnosti. Dalším krokem bylo provedení levostranné thorakotomie. Hrudník potkana byl otevřen přibližně 1 cm pod spojnici předních končetin v oblasti 5. mezižebří. Otvor v hrudníku byl zvětšen pomocí nůžek. Pro rozšíření prostoru mezi žebry a snazší přístup k srdci byl použit oftalmologický retraktor. Perikard srdce byl odstraněn chirurgickou pinzetou. Na srdci byla lokalizována sestupná větev levé koronární arterie (LAD). Arterie byla podvázána za pomoci chirurgické jehly a šicího vlákna (Chiramax, Česká republika) přibližně 1-2 mm distálně od odstupu LAD od hlavní větve levé koronární arterie. Oba konce šicího vlákna byly pomocí pinzety provlečeny polyethylenovou kanylou a zajištěny chirurgickou svorkou. Poté byl potkan napojen na měření EKG a tlaku. Arteriální krevní tlak byl měřen pomocí nakanylované *a. carotis* tlakovým snímačem (Gould P23Gb). Pro měření EKG bylo zvíře připojeno na tři jehlové snímací elektrody. Hodnoty z obou měření byly zaznamenávány programem CAR. Záznam hodnot probíhal od začátku stabilizace, v průběhu ischemie (20 min) a v prvních třech minutách reperfuze. Poté byl z hrudníku vyjmut retraktor, operační rána byla zašita několika stehy a z hrudníku byl odsát přebytečný vzduch a tělesné tekutiny. Potkan byl odpojen od ventilátoru a přemístěn na vyhřívanou podložku. Zde byl spontánně dýchající udržován v hluboké anestezii po zbývající dobu reperfuze (3 hodiny).

4.3.2 Stanovení velikosti infarktu

Po třech hodinách reperfuze byla potkanovi v hluboké anestezii rozstřižena břišní dutina, prostřižena bránice, otevřen hrudník a vystřiženo srdce. Srdce bylo přemístěno do kádinky s ledovým fyziologickým roztokem. Srdce bylo napojeno přes aortu na kovovou kanylu napojenou s injekční stříkačkou naplněnou fyziologickým roztokem a připevněna šicím vláknem. Následně bylo důkladně propláchnuto. Infuzí se srdce zbavilo zbytků krve z komor a koronárního řečiště. Na promytém srdci bylo opětovně provedeno uzavření LAD. Pro odlišení okludované a normálně perfundované oblasti bylo v dalším kroku srdce pomocí

injekční stříkačky perfundováno 5% roztokem manganistanu draselného. Poté bylo srdce opět propláchnuto fyziologickým roztokem a byl uvolněn podvaz LAD.

Srdce bylo uvolněno z kovové kanyly a odstřížením zbaveno srdečních síní a odstupujících cév. Následně bylo osušeno filtračním papírem a vloženo do mrazáku. Zmrazené komory byly nakrájeny na 6-8 příčných řezů. Připravené řezy byly vloženy do lahvičky s 10 ml 1% 2, 3, 5 – trifenylnitrazolium chlorid (TTC) ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Roztok TTC byl udržován při teplotě 37 °C tak, že lahvičky s řezy byly vloženy do kádinky s teplou vodou. Po 30 minutách byl roztok TTC v lahvičkách vyměněn za 10% roztok neutrálního formaldehydu. Takto fixovaná srdce byla uložena do lednice.

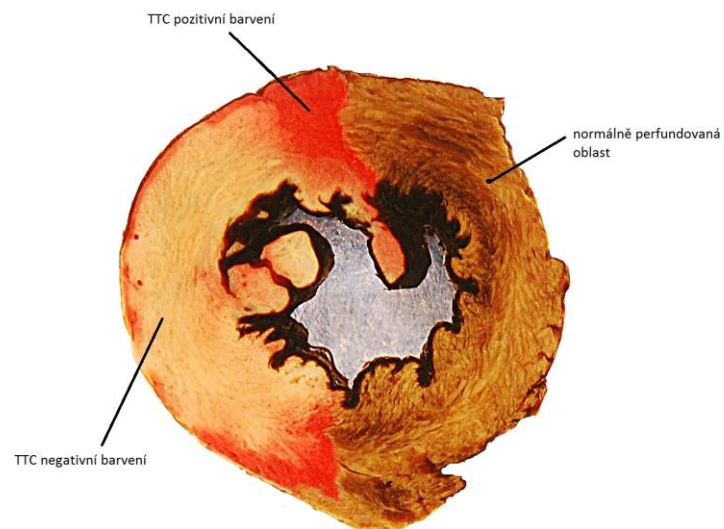
4.3.3 Vyhodnocení experimentálně získaných dat

4.3.3.1 Analýza velikosti infarktu

Velikost infarktu byla stanovena na základě hodnocení příčných řezů levé komory (viz *Obrázek 2*). Šest až osm řezů myokardu levé komory (průměrná tloušťka 1 mm) bylo v Petriho misce rozloženo s malým množstvím fyziologického roztoku. Takto srovnané řezy byly nafoceny z obou stran digitálním fotoaparátem (Nikon D50 s makroobjektivem). Pro dosažení co nejvyšší kvality pořízených snímků a kontrastu byla Petriho miska položena na modrý papír. Do misky byly k řezům přidány také identifikační štítky s číslem vzorku. Nafocené řezy byly přeneseny do počítače. V programu Adobe Photoshop byly ze snímků vyřezány jednotlivé řezy levé komory (viz *Obrázek 3*). Vzniklé soubory byly hodnoceny v programu Ellipse (ViTiDo, Slovenská republika). Tento program umožňuje planimetricky analyzovat velikost infarktu. V programu Ellipse byla stanovena celková velikost LV, AR a oblasti zasažené infarktem (IS). Zjištěné hodnoty byly zaneseny do tabulky v programu Microsoft Excel. V témže programu byla stanovena relativní velikost IS vztažena na velikost AR (IS/AR, %), k velikosti celé LV (IS/LV, %) a relativní velikost AR k celé velikosti LV (AR/LV, %). Reprezentativní výsledek stanovení jednotlivých oblastí srdce je znázorněn na *Obrázku 2 a 3*.



Obrázek 2: Fotografie řezů obarveného myokardu po 20 min okluzi LAD koronární arterie a 3 h reperfuzi.



Obrázek 3: Příčný řez obarveného srdce. Hnědá barva – normálně perfundovaná oblast; červená barva – TTC pozitivní barvení (oblast AR, kde buňky odolaly ischemickému poškození); bílá barva – TTC negativní barvení (oblast AR - nekrotická tkáň).

4.3.3.2 Analýza ischemických a reperfučních arytmií

Elektrická aktivita srdce byla hodnocena po dobu 20 minut ischemie a v prvních 3 minutách reperfuze. V této době jsme sledovali a hodnotili 5 typů arytmií – singly, dably, triplety, komorové tachykardie a komorové fibrilace (viz *Tabulka 4*).

Tabulka 4: *Typy arytmií.*

| | |
|-------------------------|--|
| Singly (S) | Jednoduché předčasné komorové stahy |
| Dably (D) | Dvojité předčasné komorové stahy |
| Triplety (T) | Trojité předčasné komorové stahy |
| Komorové tachykardie | Čtyři a více po sobě jdoucích předčasné komorové stahy |
| Komorové fibrilace (VF) | Heterogenní nekoordinovaná elektrická aktivita |

EKG záznamy byly uloženy v počítači a následně analyzovány. K hodnocení arytmií byl použit program CAR, ve kterém jsme hodnotili celkové počty jednotlivých typů arytmií a dobu trvání nejzávažnějších forem, tj. VT a VF. Po vyhodnocení záznamu EKG byla ke každému zvířeti přiřazena hodnota arytmiického skóre (viz *Tabulka 5*). Toto semikvantitativní hodnocení slouží k rychlé identifikaci výskytu závažných komorových arytmií. Hodnoty získané programem CAR byly převedeny do tabulek programu Microsoft Excel a dále statisticky zpracovány.

Tabulka 5: *Skóre ischemických a reperfučních arytmií.*

| Skóre | Typ arytmií |
|-------|--|
| 0 | Bez arytmií |
| 1 | Pouze jednoduché komorové stahy (S) |
| 2 | Dvojité (D) a trojité (T) předčasné komorové stahy |
| 3 | Komorové tachykardie |
| 4 | Reverzibilní komorové fibrilace |
| 5 | Ireverzibilní komorové fibrilace |

4.4 Stanovení exprese SOD

V biochemických experimentech jsme se zaměřili na stanovení MnSOD v myokardu potkanů. MnSOD je důležitým enzymem nacházejícím se v matrix mitochondrií a přispívajícím k antioxidační a antiapoptické ochraně kardiomyocytů.

V pokusech byli použiti dospělí samci laboratorních potkanů kmene SHR a konplastického kmene SHRmt^{LEW}. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin (viz kapitola 3.1). Kontrolní skupiny (SHR, SHRmt^{LEW}) byly po celou dobu pokusu umístěny v normoxických podmínkách. Sledované skupiny (H-SHR, H-SHRmt^{LEW}) byly adaptovány v hypoxické komoře. V podmínkách 10% kontinuální hypoxie byla zvířata ponechána po dobu 3 týdnů (viz kapitola 3.2.2).

4.4.1 Příprava vzorků

Pro biochemické analýzy byly adaptovány samostatné skupiny potkanů na CNH. Na konci experimentu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací. Bezprostředně poté byla rozstřižena dutina břišní, otevřen hrudník a vystřiženo srdce, které bylo umístěno na chlazenou Petriho misku. Srdce bylo rozděleno na 5 částí – pravou komoru, septum a levou komoru (3 části). Každá část byla zamrazena v tekutém dusíku, zvážena, uložena do alobalu a popsána pro pozdější identifikaci. Takto připravené vzorky byly uloženy do mrazicího boxu při -80°C.

4.4.1.1 Homogenizace

Pro stanovení exprese MnSOD byl použit vždy jeden vzorek LV o hmotnosti cca 200 mg. Zmražený kousek LV byl z alobalu přemístěn do třecí misky, kde byl spolu s tekutým dusíkem rozmělněn do konzistence prášku. Poté byl vzorek přenesen do 1 ml homogenizačního pufru o následujícím složení: 12,5 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 2,5 mM EGTA, 250 mM sacharóza, 6 mM β-mercaptoethanol, destilovaná voda). Zkumavka s pufrem byla zvážena před i po přidání vzorku a z výsledného rozdílu bylo stanoveno množství pufru potřebného k doplnění celkového objemu. Připravené vzorky doplněné o pufr byly převedeny do homogenizační aparatury (skleněná zkumavka s hrdlem, keramický homogenizátor na tyčince). Vzorek v aparatuře byl 15x promíchán a hotový homogenát byl přepipetován zpět

do zkumavky o objemu 5 ml. Ze zásobního vzorku bylo odebráno 4x10 µl pro stanovení množství proteinu metodou podle Bradforda a 4x10 µl pro Western blot. Připravené alikvoty i zásobní homogenát byly umístěny do mrazicího boxu. Celý proces homogenizace vyžadoval umístění zkumavek i homogenizační aparatury v ledové tříšti, aby se předešlo degradaci proteinů v důsledku vyšší teploty.

4.4.1.2 Stanovení množství proteinů

Celkové množství proteinu ve vzorcích bylo stanoveno Bradfordovou metodou. Ta je založená na navázání proteinů ve vzorku na barevné činidlo, čímž dochází k posunu absorpčního maxima k vlnové délce 595 nm a následném spektrofotometrickém stanovení. Nejprve byly připraveny roztoky pro stanovení kalibrační křivky (destilovaná voda, Bovinní sérový albumin). Poté se rozmražené vzorky homogenátu naředily 20× (10 µl vzorku, 190 µl vody). Obsah každé zkumavky byl řádně promíchán na vortexu a poté bylo naneseo 10 µl vzorku v tripletech na 96 jamkovou destičku. Do jamek bylo přidáno 250 µl Bradfordova činidla a 10 minut inkubováno. Po uplynutí doby inkubace byla vyhodnocena absorbance vzorků na reederu Synergy HT (Bio Tek) při vlnové délce 595 nm. Hodnoty z přístroje byly v počítači převedeny do tabulky v programu Microsoft Excel.

4.4.1.3 Elektroforéza

Pro elektroforézu byla použita standardní aparatura Mini-Protean III apparatus (Bio-rad, Herkules, CA, USA). Dělení proteinů v jednotlivých vzorcích bylo provedeno v 10% BIS-akrylamidových gelech za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Připravený gel byl nalit mezi skla, zbylý prostor nad gelem byl vyplněn pomocí injekční stříkačky redestilovanou vodou. Doba tuhnutí gelu byla 40 minut. Před uplynutím doby tuhnutí prvního gelu byl připraven 4% zaostřovací gel. Po uplynutí doby tuhnutí prvního gelu byla z aparatury odstraněna přebytečná voda a mezera mezi skly byla vysušena filtračním papírem. Poté byl nalit do aparatury až po okraj skel zaostřovací gel. Do zaostřovacího gelu byly vloženy plastové hřebeny pro vytvoření jamek na vzorky. Doba tuhnutí zaostřovacího gelu byla 30 minut. Po uplynutí doby tuhnutí druhého gelu byly vyjmuty hřebeny a jamky vypláchnuty redestilovanou vodou. Skla byla vyjmuta z aparatury a očištěna z vnějších stran od přebytečného gelu. V průběhu tuhnutí zaostřovacího gelu byly připraveny vzorky,

kteře byly ředěny pufr̄em 40× (10 μl homogenátu + 390 μl ředícího pufru). Pufr̄ byl připraven z 2× koncentrovaného Sample buffer (Biorad, Praha, Česká republika) a β-merkaptοethanolu.

Ke každému vzorku bylo přidáno stanovené množství pufru a byly ponechány 3 minuty inkubovat při 100 °C. Po inkubaci byly vzorky stočeny na minicentrifuze (30 s). Skla s gely byla vložena aparatury pro elektroforézu. Prostor mezi skly byl vyplněn ředěným elektronovým pufr̄em (10× TGS). Vzorky byly nanášeny pipetou se speciálními špičkami do jamek v gelu dle nanášecího protokolu. Jako první byl na gel nanesen standard, do druhé jamky kontrolní vzorek mozku a do zbylých jamek analyzované vzorky. Mezi nanáškami byla špička 3× propláchnuta redestilovanou vodou pro možnost opakovaného použití. Po nanesení vzorků byl doplněn do prostoru mezi skly a také z vnější strany skel až pod okraj nanášek ředěný elektronový pufr̄. Aparatura byla připojena ke zdroji s nastaveným konstantním napětím (U) a proudem (I) – pro dva gely 30 mA/85 min dle molekulové hmotnosti stanovovaného proteinu. Po zanořeni nanášek do gelu (cca 10 - 15 minut) byl zvýšen proud na dvojnásobnou hodnotu a elektroforéza běžela po zbytek času. Po skončení elektroforézy byly gely přeneseny do plastových krabiček naplněných čerstvým transferovým pufr̄em (10× TG).

4.4.1.4 Western Blot (WB)

Pro Western blot byla použita standartní aparatura (BioRad, Praha, Česká republika). Do držáku byly vloženy černé houbičky, PVDF membrána (BioRad, Praha, Česká republika), gel a papír pro western blot. Houbičky a papíry (10×7,5 cm) pro WB byly namočeny do transferového pufru (10× TG). PVDF membrány byly na 5 minut vloženy do plastové misky s methylalkoholem. Všechny připravené komponenty byly postupně navrstveny do držáku a připravená aparatura byla umístěna do plastové vaničky. Do vzniklého prostoru mezi vaničkou a aparaturou byla vložena chladicí destička. Vanička s aparaturou byla vložena do polystyrenové krabice naplněné ledovou tříští a do vaničky byl doplněn transferový pufr̄. Aparatura byla připojena ke zdroji s proudem nastaveným na 350 mA na 60 minut. Po skončení přenosu bylo provedeno kontrolní obarvení membrány Ponceau S.

4.4.1.5 Imunodetekce

Membrány byly vloženy do krabiček s 50 ml 5% sušeného mléka rozpuštěného v TTBS (5g sušeného mléka do 100ml TTBS) a 60 minut inkubovány na „kývače“. Po blokaci membrány v roztoku sušeného mléka byla připravena primární protilátka. Ta byla ředěna dle doporučení s roztokem 10% sušeného mléka. Protilátku s membránou byla vložena do velké zkumavky a ponechána přes noc inkubovat na rotátoru. Po konci inkubace s primární protilátkou byla membrána promyta v TTBS (3×5 minut). Pro stanovení MnSOD bylo pro 2 membrány připraveno 15 ml roztoku s primární protilátkou z TTBS 10% sušeného mléka a primární protilátky (MnSOD – Sigma S5069, rabbit) s ředěním 1:2000. Po ukončení doby inkubace s primární protilátkou a opláchnutí membrán byl k membránám přidán roztok sekundární protilátky (Bio-Rad anti-rabbit 170-6515) s ředěním 1:30 000 a membrány byly inkubovány 60 minut. Na konci inkubace se sekundární protilátkou byly membrány opět 3× po 5 minutách propláchnuty v roztoku TTBS. Opláchnuté membrány byly zality čerstvým roztokem TTBS a tím připraveny k vyvolání. Pro vyvolání membrány jsme použili vyvolávací roztok z peroxidu vodíku a luminolu. Obě složky byly napipetovány do zkumavky a promíchány. Poté byla každá membrána přesunuta do prázdné krabičky, kde byla zalita 500 µl připraveného vyvolávacího roztoku a takto ponechána 5 minut. Poté byla vyvolána na přístroji LAS s expozicí 10 s. Data získaná metodou Western Blot byla hodnocena v programu ImageJ, který analyzuje množství proteinu ve vzorku.

4.5 Statistické zpracování dat, grafické zpracování výsledků

Grafické a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Statistické rozdíly mezi dvěma experimentálními skupinami byly hodnoceny t-testem nebo Mann – Whitneyho testem v případě dat s nenormálním rozložením. Pro zjištění statistické významnosti mezi třemi a více skupinami byla použita jednocestná ANOVA s následným New-Keuls post-testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly na úrovni $P < 0,05$.

5. Výsledky

V rámci diplomové práce bylo provedeno 103 experimentů, jejichž účelem bylo analyzovat stanovené cíle (viz kapitola 3.2). První série pokusů byla určena pro stanovení ischemické tolerance srdcí potkanů SHR a SHRmt^{LEW} adaptovaných na dlouhodobou fyzickou zátěž. U zvířat byla stanovena velikost infarktu a výskyt ischemických a reperfučních komorových arytmií. Velikost skupin a počet sledovaných zvířat je uveden v *Tabulce 6*.

Tabulka 6: Počet provedených pokusů, stanovení velikosti infarktu a výskyt komorových arytmií (ARH) LV u experimentálních skupin.

| Skupina | Počet zvířat | I/R poškození | ARH |
|------------------------|--------------|---------------|-----|
| SHR | 13 | 11 | 11 |
| T-SHR | 15 | 10 | 10 |
| SHRmt ^{LEW} | 13 | 9 | 9 |
| T-SHRmt ^{LEW} | 15 | 7 | 7 |

Legenda: SHR – kontrolní skupina, T-SHR – kontrolní skupina adaptovaná na fyzickou zátěž, SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW), T-SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW) adaptovaná na fyzickou zátěž.

V tabulce 6 chybí 19 stanovení velikosti I/R poškození a 19 hodnocení výskytu arytmií. Důvodem bylo úmrtí 1 potkana ze skupiny T-SHR a 1 potkana ze skupiny T-SHRmt^{LEW} v průběhu reperfuze, špatné obarvení vyjmutého srdce u 1 potkana ze skupiny SHR, 1 potkana skupiny SHRmt^{LEW}, 1 potkana skupiny T-SHR a 1 potkana ze skupiny T-SHRmt^{LEW}. Ve zbylých případech nebyla hodnocena velikost infarktu nebo výskyt a závažnost arytmií z důvodu velkých odchylek sledovaných hodnot, především malé velikosti podvázané oblasti.

Druhá série pokusů byla zaměřena na vliv chronické kontinuální hypoxie na ischemickou toleranci srdce a výskyt komorových arytmií u potkanů SHR a SHRmt^{LEW} adaptovaných na podmínky kontinuální normobarické hypoxie. U zvířat byla stanovena velikost infarktu I/R poškození LV a výskyt komorových arytmií. Velikost skupin a počet sledovaných zvířat jsou uvedeny v *Tabulce 7*.

Tabulka 7: Počet provedených pokusů, stanovení I/R poškození a výskyt komorových arytmií (ARH) LV u experimentálních skupin.

| Skupina | Počet zvířat | I/R poškození | ARH |
|------------------------|--------------|---------------|-----|
| SHR | 13 | 11 | 11 |
| H-SHR | 10 | 10 | 10 |
| SHRmt ^{LEW} | 13 | 9 | 9 |
| H-SHRmt ^{LEW} | 13 | 10 | 10 |

Legenda: SHR – kontrolní skupina, H-SHR – kontrolní skupina adaptovaná na CNH, SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW), H-SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW) adaptovaná na CNH.

V tabulce 7 chybí 9 stanovení velikosti I/R poškození a 9 hodnocení výskytu arytmií. Důvodem bylo špatné obarvení vyjmutého srdce u 1 potkana ze skupiny SHR a 1 potkana skupiny SHRmt^{LEW}. Ve zbylých případech nebyla hodnocena velikost infarktu nebo výskyt komorových arytmií z důvodu velkých odchylek sledovaných hodnot, především malé velikosti podvázané oblasti.

Třetí série pokusů byla zaměřena na stanovení množství MnSOD v LV potkanů. Zvířata v tomto pokusu byla adaptována na CNH. Počet zvířat a charakteristika skupin je uvedena v *Tabulce 8*.

Tabulka 8: Počet provedených pokusů, počet použitých vzorků.

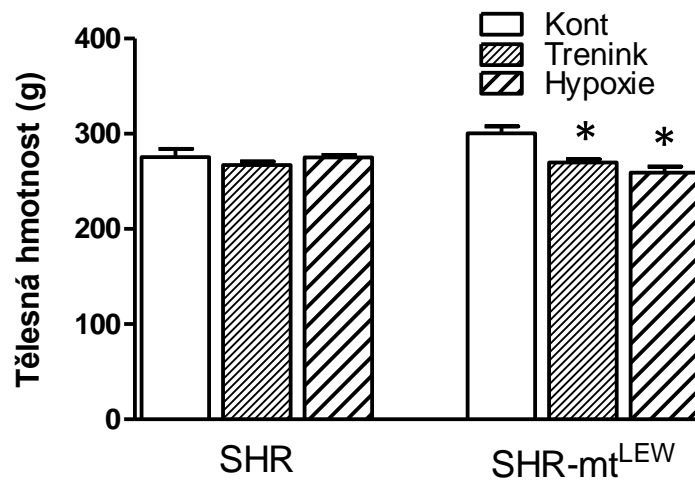
| Skupina | Počet zvířat | Počet použitých vzorků |
|------------------------|--------------|------------------------|
| SHR | 6 | 6 |
| H-SHR | 6 | 6 |
| SHRmt ^{LEW} | 6 | 6 |
| H-SHRmt ^{LEW} | 6 | 6 |

Legenda: SHR – kontrolní skupina, H-SHR – kontrolní skupina adaptovaná na CNH, SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW), H-SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW) adaptovaná na CNH.

V pokusu bylo použito celkem 24 zvířat. Šest samců kmene SHR a 6 samců konplastického kmene SHRmt^{LEW} bylo ponecháno v normoxických podmínkách jako kontrolní skupina. Šest samců kmene SHR a 6 samců konplastického kmene SHRmt^{LEW} bylo po dobu třech týdnů adaptováno na CNH. Ze získaných homogenátů (viz kapitola 3.3.1) byly použity reprezentativní vzorky z každé experimentální skupiny.

5.1 Základní fyziologické parametry

Mezi sledovanými základními fyziologickými parametry, které jsou zároveň významnými ukazateli vlivu fyzické zátěže resp. CNH na kardiovaskulární systém patří tělesná hmotnost (BW), tepová frekvence (HW) a střední arteriální tlak krve (MAP). Rozdíly v tělesných hmotnostech u jednotlivých experimentálních skupin jsou ukázány v *Grafu 1*. Snížení hmotnosti u kmene SHRmt^{LEW} vlivem tréninku i hypoxie byl statisticky signifikantní.



Graf 1: Průměrná tělesná hmotnost (g) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

* $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: Kont vs. Trénink i Hypoxie

Hodnoty tepové frekvence (HR) spolu se středním arteriálním tlakem krve (MAP) byly zaznamenávány ve stabilizační fázi pokusu (před ischemií), na konci dvacetiminutové ischemie a na konci tříhodinové reperfuze. Hodnoty HR a MAP jsou u jednotlivých skupin zvířat zaznamenány v souhrnné *Tabulce 10*.

Tabulka 6: Hodnoty tepové frekvence (HW) a středního arteriálního tlaku (MAP).

| Skupina | HR (tep/min) | | | MAP (mmHg) | | |
|------------------------|--------------|----------|----------------------|-------------|----------|-----------------------|
| | Preischemie | Ischemie | Reperfuze | Preischemie | Ischemie | Reperfuze |
| SHR | 421 ± 15 | 413 ± 10 | 388 ± 19 | 136 ± 15 | 111 ± 13 | 81 ± 10 [#] |
| T-SHR | 394 ± 9 | 403 ± 6 | 410 ± 9 | 126 ± 9 | 110 ± 10 | 100 ± 6 [#] |
| H-SHR | 383 ± 5 * | 374 ± 6 | 356 ± 11 | 152 ± 2 | 151 ± 2 | 132 ± 10 |
| SHRmt ^{LEW} | 417 ± 12 | 425 ± 10 | 389 ± 9 [#] | 135 ± 8 | 113 ± 10 | 102 ± 10 |
| T-SHRmt ^{LEW} | 392 ± 8 | 405 ± 9 | 386 ± 6 | 128 ± 10 | 117 ± 13 | 96 ± 9 [#] * |
| H-SHRmt ^{LEW} | 428 ± 8 | 434 ± 7 | 409 ± 11 | 156 ± 4 * | 130 ± 6 | 119 ± 7 [#] |

Legenda: SHR – kontrolní skupina, H-SHR – kontrolní skupina adaptovaná na CNH SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW), H-SHRmt^{LEW} – skupina konplastických SHR potkanů s mitochondriálním genomem kmene Lewis (LEW) adaptovaná na CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

[#] P < 0,05: statisticky významný rozdíl: Preischemie vs. Reperfuze

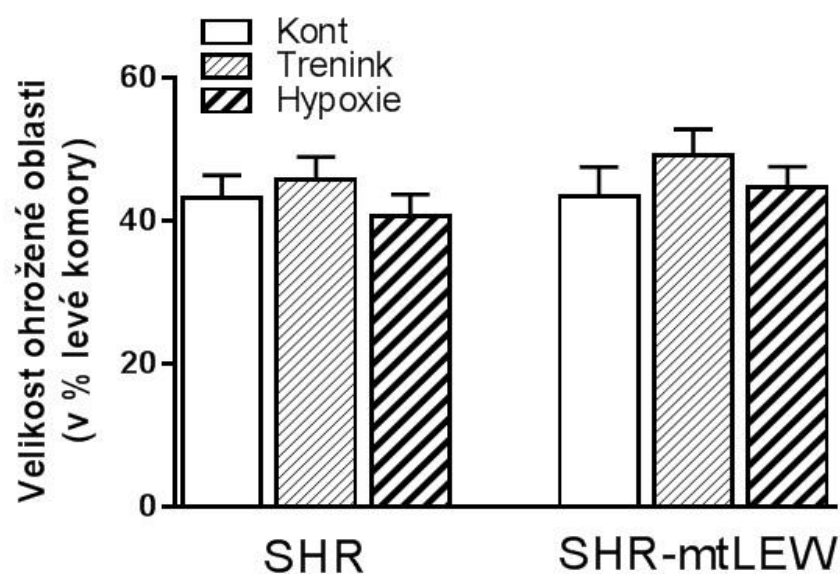
* P < 0,05: statisticky významný rozdíl: Kont. vs. Trénink, Hypoxie

5.2 Vliv fyzické zátěže

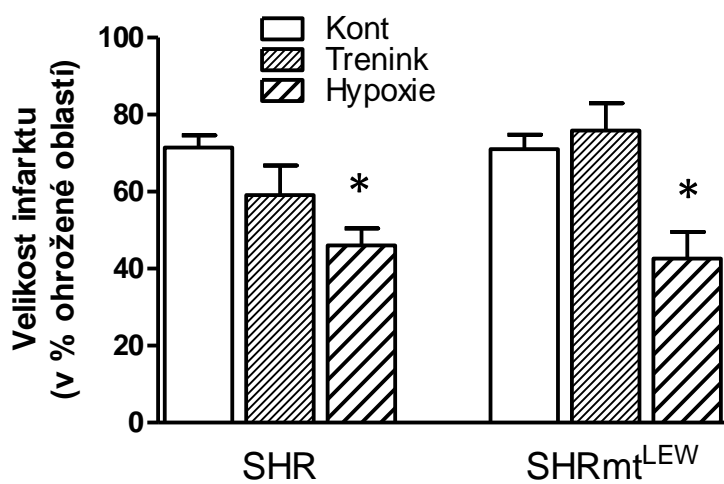
Při sledování ischemické tolerance srdce a vlivu protektivních faktorů je důležitou velikost AR a poté velikost infarktu myokardu v této oblasti. Žádaným kardioprotektivním cílem je zmenšení oblasti postižené infarktem. V diplomové práci jsme se věnovali porovnání dvou hodnot. První byl vliv kardioprotektivních opatření (trénink a CNH) na SHR a SHRmt^{LEW}. Druhým pak vliv genetického pozadí (SHR vs. SHRmt^{LEW}) na ischemickou toleranci.

Poměr velikosti AR vzhledem k velikosti celé LV (AR/IS, %) je zobrazen v *Grafu 2*. U obou kmenů se relativní velikost AR významně nelišila, což napovídá, že u všech experimentálních skupin byl proveden podobný podvaz koronární artérie.

Následující *Graf 3* ukazuje relativní velikost infarktu normalizovanou na velikost AR. Pravidelný fyzický trénink mírně zmenšil velikost infarktu ze 71 ± 3,2 % u kontrolních SHR potkanů na 59 ± 7,7 %. Tento pokles však nedosahoval statisticky významného rozdílu. U SHRmt^{LEW} nebyl trend ke zmenšení velikosti infarktu pozorován.

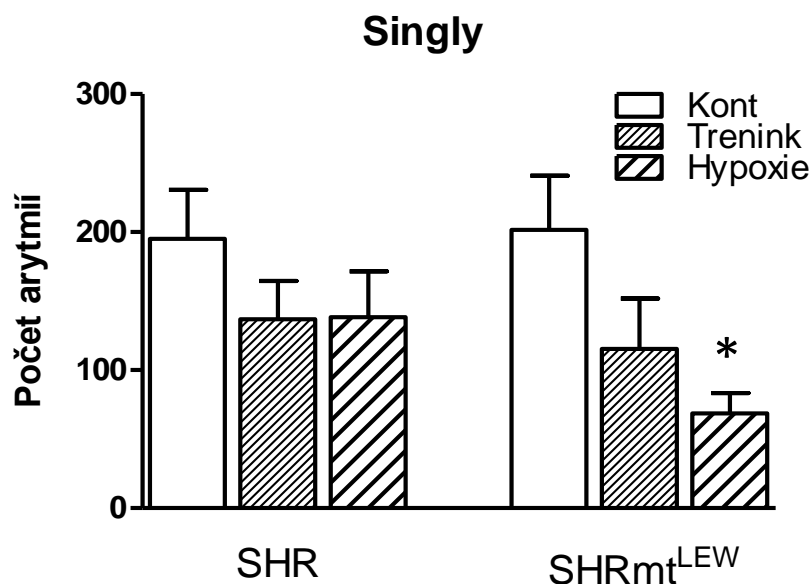


Graf 2: Relativní velikost ohrožené oblasti normalizovaná na velikost levé komory (AR/LV, %) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

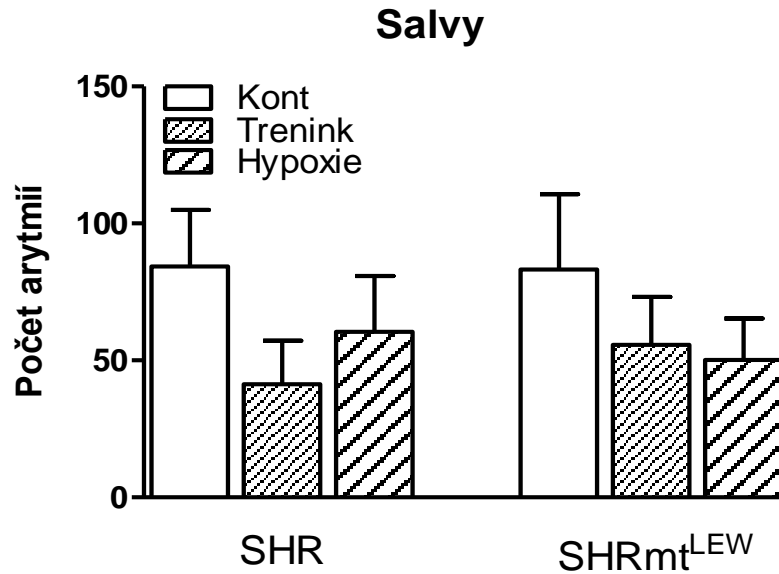


Graf 3: Relativní velikost infarktu normalizovaná na velikost ohrožené oblasti (IS/AR, %) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru. * $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: Kont vs. Hypoxie

Další parametr, který byl v rámci našich experimentů sledován, byl výskyt a závažnost ischemických a reperfučních arytmií (viz kapitola 2.1.3.3). Celkový počet jednoduchých předčasných komorových stahů (singly) a dvojitých a trojitých předčasných komorových stahů (souhrnně salvy) je zobrazen v *Grafech 4 a 5*. Při porovnání počtu singlů v rámci kmene SHR i SHRmt^{LEW} je v obou případech patrné snížení jejich počtu vlivem cvičení (SHR 195 ± 37; T-SHR 137 ± 29; SHRmt^{LEW} 202 ± 42; T-SHRmt^{LEW} 115 ± 39). Tyto rozdíly však nebyly signifikantní. Snížení počtu předčasných komorových stahů bylo patrné i na množství salv. Zde došlo vlivem fyzické zátěže k poklesu z 84 ± 22 u SHR na 41 ± 17 u T-SHR a z 83 ± 29 u SHRmt^{LEW} na 56 ± 19 u T-SHRmt^{LEW}. Rozdíl v četnosti výskytu salv nebyl statisticky signifikantní.

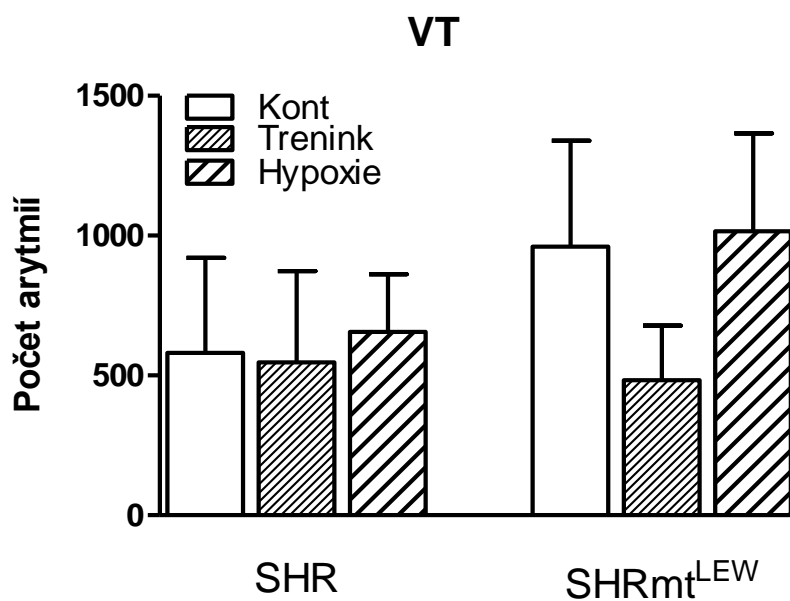


Graf 4: Počet jednoduchých komorových stahů u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru. * $P < 0,05$; statisticky významný rozdíl: Kont vs. Hypoxie

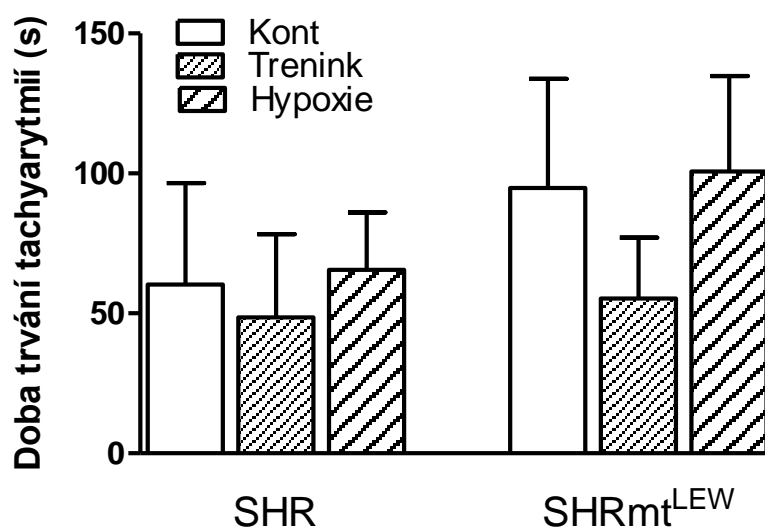


Graf 5: Počet dvojitých a trojitých komorových stahů (salvy) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

Mezi velmi závažné poruchy srdečního rytmu vznikající v průběhu ischemie patří VT. Jejich celkový počet ukazuje *Graf 6*. U kmene SHR nedošlo vlivem adaptace na fyzickou zátěž k významné změně počtu VT (SHR 580 ± 357 a T-SHR 547 ± 343). U konplastického kmene SHRmt^{LEW} došlo ke zvýšení množství komorových tachykardií v porovnání s kmenem SHR (580 ± 357 vs. 961 ± 401). V rámci skupin konplastického kmene SHRmt^{LEW} pak došlo u trénovaných zvířat k výraznému snížení počtu VT z 961 ± 401 na 483 ± 211 . Díky vysoké variabilitě výskytu však tyto změny nedasahovaly statistické signifikance. S hodnotami počtu VT koreluje také doba trvání tachyarytmií (VT + VF). Při porovnání skupin na základě rozdílného mitochondriálního genotypu byla doba trvání tachyarytmií výrazně delší u konplastického kmene SHRmt^{LEW} (100 ± 42 s) oproti kontrolní skupině SHR (62 ± 38 s). Porovnáním kontrolních a trénovaných skupin bylo zjištěno mírné snížení doby trvání tachyarytmií v důsledku fyzické zátěže (SHR 62 ± 38 s; T-SHR 49 ± 31 s; SHRmt^{LEW} 100 ± 42 s, T-SHRmt^{LEW} 64 ± 23 s). Zjištěné rozdíly však ani v tomto případě nedosahovaly prahu statistické významnosti.



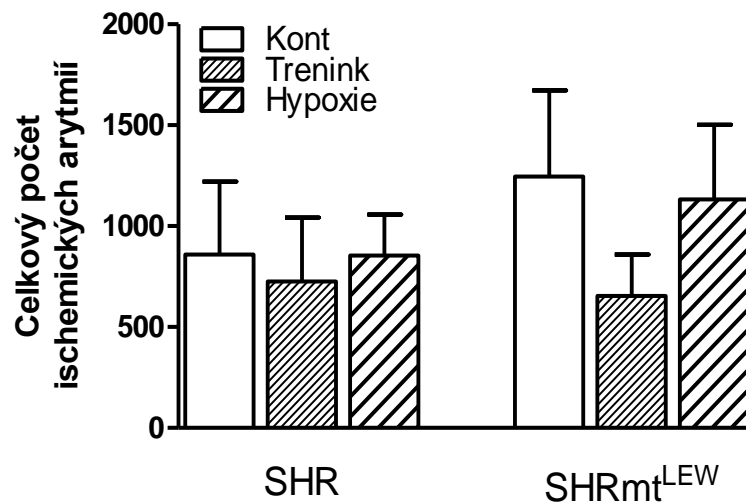
Graf 6: Počet komorových tachykardií u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



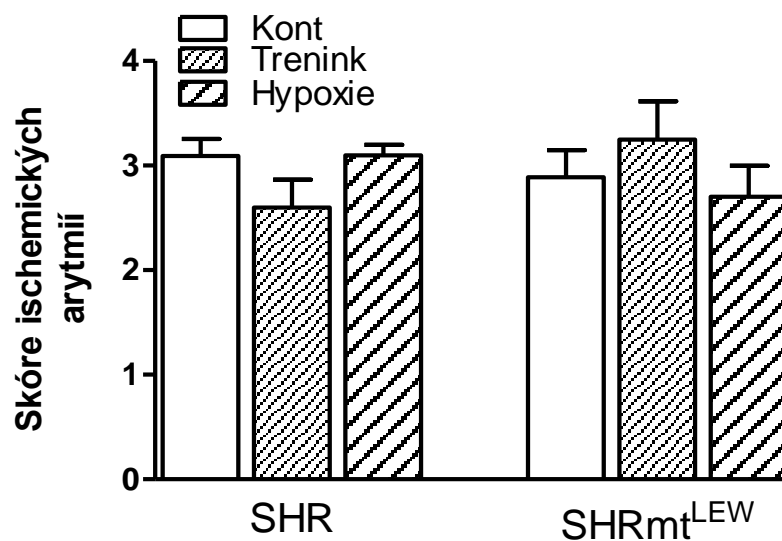
Graf 7: Doba trvání tachyarytmii (s) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

Celkový počet ischemických arytmií je vyobrazen v *Grafu 8*. Při porovnání mezi kmeny je patrný mírně vyšší výskyt počtu arytmií u konplastického kmene SHRmt^{LEW} (1246 ± 453) v porovnání s SHR (860 ± 379) v důsledku zvýšeného výskytu komorových tachykardií. U kmene SHR došlo vlivem tréninku ke snížení počtu ischemických arytmií na 725 ± 335. Stejný pokles byl pozorován i u konplastického kmene SHRmt^{LEW}, kde bylo snížení počtu ischemických arytmií patrnější (SHRmt^{LEW} 1246 ± 453; T-SHRmt^{LEW} 654 ± 223), nicméně ani tento pokles o 52,5 % nedosahoval statistické významnosti.

Závažnost ischemických arytmií ukazuje *Graf 9*, který hodnotí semikvantitativní parametr skóre. Je patrné, že u kontrolních skupin se hodnoty skóre téměř nemění (SHR 3 ± 0,17; SHRmt^{LEW} 2,9 ± 0,28). Vlivem fyzické zátěže bylo skóre ischemických arytmií sníženo u skupiny T-SHR na 2,6 ± 0,28 a u skupiny T-SHRmt^{LEW} naopak zvýšeno na 3,3 ± 0,39. Rozdíly v závažnosti ischemických arytmií vyjádřených v hodnotách skóre nebyly statisticky průkazné.



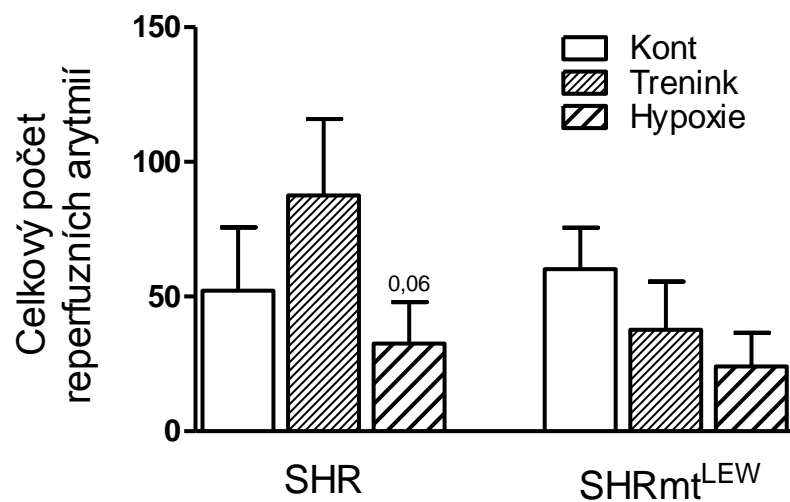
Graf 8: Celkový počet ischemických arytmií u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



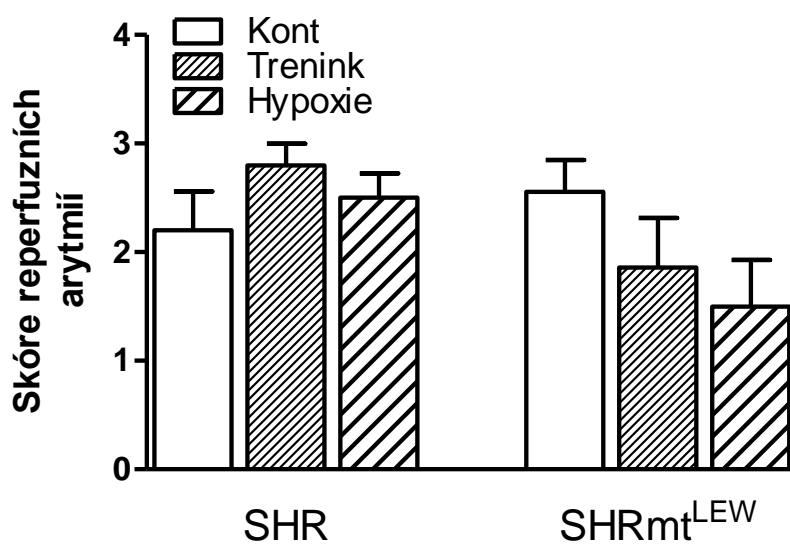
Graf 9: Skóre ischemických arytmií u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako \pm střední chyba průměru.

Stejně jako v ischemii lze i v reperfuzi sledovat výskyt arytmií a hodnotit jejich závažnost. Výskyt reperfuzních arytmií se ukázal odlišný v porovnání s ischemickými arytmiemi. Celkový počet reperfuzních arytmií (Graf 10) se v rámci porovnání kmenů s rozdílným mitochondriálním genomem výrazněji neměnil (SHR 52 ± 24 ; SHRmt^{LEW} 60 ± 16). U kmene SHR došlo vlivem tréninku k nárůstu množství reperfuzních arytmií na 88 ± 30 . U trénovaných jedinců konplastického kmene naopak došlo ke snížení počtu reperfuzních arytmií na 38 ± 19 .

Graf 11 hodnotí závažnost reperfuzních arytmií parametrem skóre. Na základě získaných údajů je zřejmé, že s rostoucím počtem reperfuzních arytmií u skupiny T-SHR rostla i jejich závažnost (skóre SHR $2,2 \pm 0,36$; skóre T-SHR $2,8 \pm 0,21$). U konplastického kmene SHRmt^{LEW} byla hodnota skóre u trénovaných zvířat (T-SHRmt^{LEW} nižší ($1,9 \pm 0,5$) oproti SHRmt^{LEW} ($2,6 \pm 0,31$). U T-SHRmt^{LEW} se v reperfuzi vyskytovalo menší množství méně závažných arytmií.



Graf 10: Celkový počet reperfučních arytmií u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.



Graf 11: Skóre reperfučních arytmií u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na fyzický trénink nebo CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru.

5.3 Vliv CNH

Druhým kardioprotektivním modelem, který byl v rámci této diplomové práce sledován, byla adaptace na chronickou kontinuální hypoxii. Grafické zpracování dat bylo provedeno pomocí souhrnných grafů (viz kapitola 4.2) znázorňujících vliv tréninku i hypoxie.

Stejně jako u fyzické zátěže i u kontinuální hypoxie byla analyzována velikost AR, velikost IS a poruchy srdečního rytmu vyvolané I/R poškozením. Velikost AR se významně nelišila mezi normoxickými a chronicky hypoxickými kmeny (SHR 43 ± 3 %; H-SHR 41 ± 3 %; SHRmt^{LEW} 44 ± 4 %; H-SHRmt^{LEW} 45 ± 3 %). Následná analýza velikosti infarktu (*Graf 3*) ukazuje statisticky významné snížení u obou sledovaných kmenů v důsledku adaptace na CNH. Velikost infarktu u kmene H-SHR klesla ze 71 ± 3 % na 46 ± 4 %. Velikost infarktu u konplastického kmene H-SHRmt^{LEW} byla 43 ± 7 % oproti 71 ± 4 % u normoxických SHRmt^{LEW}.

Hypoxie měla také významný vliv na množství singlů a salv. Stejně jako při cvičení došlo i po adaptaci na CNH ke zmenšení jejich počtu (*Grafy 4 a 5*). U kmene SHR bylo u adaptovaných jedinců zaznamenáno 138 ± 35 singlů (u kontrolních SHR 195 ± 37), u adaptovaných jedinců konplastického kmene SHRmt^{LEW} pouze 69 ± 16 singlů (u kontrolních SHRmt^{LEW} 202 ± 42). Celkový pokles počtu singlů u konplastického kmene H-SHRmt^{LEW} dosáhl statistické signifikance v porovnání s normoxickou skupinou. U kmene SHR bylo zaznamenáno 84 ± 22 salv a jejich počet klesl na 60 ± 22 po adaptaci na CNH. U konplastického kmene SHRmt^{LEW} byl zaznamenán podobný pokles (83 ± 29 vs. 50 ± 16). Rozdíly mezi skupinami však nedosahovaly statistické významnosti.

CNH neměla výrazný vliv na množství komorových tachyarytmií (*Graf 6*) ani na délku jejich trvání (*Graf 7*). U obou kmenů došlo k nevýraznému zvýšení počtu VT a prodloužení doby jejich trvání, které nebylo statisticky signifikantní (SHR 580 ± 357 a 62 ± 38 s; H-SHR 656 ± 217 a 68 ± 23 s; SHRmt^{LEW} 961 ± 401 a 100 ± 42 s; H-SHRmt^{LEW} 1016 ± 369 a 101 ± 36 s).

U ischemických arytmií nedošlo k výraznějšímu poklesu celkového počtu ischemických arytmií ani hodnoty skóre (SHR: 860 ± 379 a $3 \pm 0,17$; H-SHR: 855 ± 214 a $3,1 \pm 0,11$; SHRmt^{LEW}: 1246 ± 453 a $2,9 \pm 0,28$; H-SHRmt^{LEW}: 1132 ± 391 a skóre $2,7 \pm 0,32$) (*Grafy 8 a 9*).

V případě reperfuzních arytmií (*Graf 10*) a jejich skóre (*Graf 11*) došlo ke snížení počtu jejich výskytu (SHR 52 ± 24 ; H-SHR 33 ± 16), ale současně k mírnému zvýšení

hodnoty jejich skóre (SHR $2,2 \pm 0,36$; H-SHR $2,5 \pm 0,24$), což znamená výskyt závažnějších forem reperfučních arytmií. Rozdíly však nebyly statisticky významné. U konplastického kmene SHRmt^{LEW} došlo ke snížení počtu reperfučních arytmií i hodnoty jejich skóre (SHRmt^{LEW} 60 ± 16 a skóre $2,6 \pm 0,31$; H-SHRmt^{LEW} 24 ± 13 a skóre $1,5 \pm 0,45$).

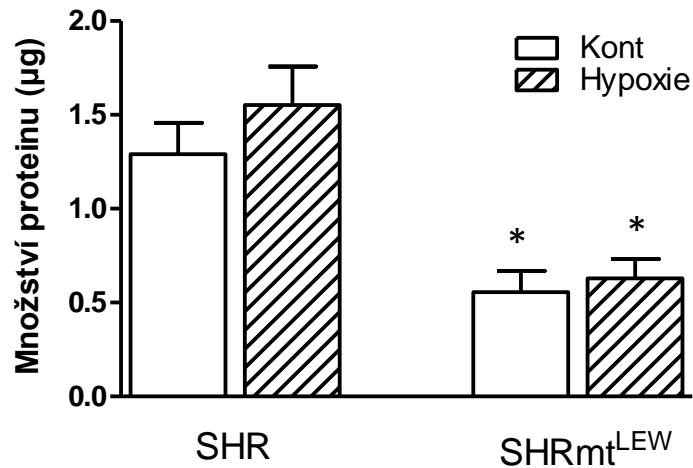
5.4 Exprese SOD

V homogenátech z části LV bylo nejprve stanoveno celkové průměrné množství proteinu ve vzorcích u jednotlivých skupin zvířat. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v *Tabulce 10*.

Tabulka 10: Množství proteinu v části LV (velikost cca 200 µg) u SHR potkanů a konplastického kmene SHRmt^{LEW} adaptovaných na CNH. Výsledky jsou uváděny jako průměr ± střední chyba průměru

| Skupina | Množství proteinu (µg) |
|-------------------------|------------------------|
| SHR | $14,7 \pm 0,53$ |
| H-SHR | $13,68 \pm 0,59$ |
| SHRmt ^{LEW} | $15,2 \pm 0,46$ |
| H- SHRmt ^{LEW} | $12,48 \pm 0,6$ |

MnSOD je mitochondriální enzym hrající v buňkách antioxidační a ochrannou úlohu a je v rámci kardioprotektivních stimulů sledovaným ukazatelem. V případě této diplomové práce jsme se zaměřili na jeho stanovení v myokardu SHR a SHRmt^{LEW} potkanů adaptovaných na CNH a normoxických kontrol. Změny v expresi MnSOD jsou zobrazeny v *Grafu 12*.



Graf 12: Množství MnSOD (μg) u SHR potkanů a konplastického kmene $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$ adaptovaných na CNH. Výsledky jsou uváděny jako \pm střední chyba průměru.
 * $P < 0,05$: statisticky významný rozdíl: SHR vs. $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$; H-SHR vs. H- $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$

Expres MnSOD byla signifikantně nižší v normoxických srdcích konplastických potkanů kmene $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$ ($0,56 \pm 0,11$; $0,63 \pm 0,1$) v porovnání s kontrolními SHR ($1,29 \pm 0,16$; $1,55 \pm 0,2$). Vlivem adaptace na CNH nedošlo k výraznějším změnám v expresi MnSOD u kmene SHR ani u konplastického kmene $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$. U H-SHR skupiny vzrostla exprese SOD o 20,1% ($1,29 \pm 0,16$; $1,55 \pm 0,2$); u H- $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$ pak o 13% ($0,56 \pm 0,11$; $0,63 \pm 0,1$). Tyto rozdíly nejsou statisticky průkazné. Pro ověření správnosti měření bylo provedeno hodnocení exprese enzymu citrát syntázy tzv. housekeeping protein, které správnost zjištěných hodnot MnSOD potvrdilo (SHR 1,96 μg ; H-SHR 2,8 μg ; $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$ 1,63 μg ; H- $\text{SHRmt}^{\text{LEW}}$ 1,71 μg).

6. Diskuse

V rámci této diplomové práce jsme se pokusili přispět k objasnění kardioprotektivního účinku fyzické zátěže a chronické hypoxie na myokard laboratorních potkanů se systémovou hypertenzí. Kardioprotekce aktivovaná těmito stimuly se u normotenzních jedinců projevuje zmenšením velikosti infarktu myokardu a snížením výskytu závažných komorových arytmí v ischemii a reperfuzi. Dále jsme se v rámci práce zaměřili na rozdíly v ischemické toleranci srdce mezi hypertenzními potkany kmene SHR a u unikátním konplastickým kmenem SHRmt^{LEW}. Tyto experimenty měly blíže objasnit vliv mitochondriálního genomu na sledované parametry ischemické tolerance srdce. V rámci studia kardioprotektivního účinku hypoxie, který je v naší laboratoři předmětem zájmu, byla analyzována také exprese antioxidantního enzymu MnSOD.

6.1 Vliv fyzické zátěže a hypoxie

Dostupné vědecké články analyzující vliv fyzické zátěže na ischemickou toleranci srdce u laboratorních potkanů se zabývají různými modely fyzického tréninku, které byly aplikovány na obě pohlaví vybraných kmenů potkanů (SD, F344, WKY a SHR). V naší práci byli použiti potkani spontánně hypertenzního kmene SHR a od něj odvozená transgenní konplastická zvířata SHRmt^{LEW}. Heterogenita studovaných experimentálních modelů zužuje možnost porovnat námi dosažené výsledky s literárními prameny, nicméně je možné využít zjištěných poznatků pro další výzkum studující rozdíly u konplastických zvířat vytvořených z těchto jednotlivých potkaních kmenů.

Stejně jako v našich pokusech Hamilton et al. (2000), Demirel et al. (2001), Brown et al. (2005) nebo Bertagnolli et al. (2008) a jiní použili pro trénink potkanů běžecké pásy, kdy byli potkani nuceni běhat. Když pomíneme fakt, že v každé z výše uvedených prací byl použit jiný kmen laboratorního potkana, vedly experimenty těchto autorů k podobným výsledkům. Vlivem cvičení došlo v průběhu adaptace, ale i v průběhu ischemie, ke snížení tepové frekvence a k jejímu zvýšení v průběhu reperfuze v porovnání s netrénovanými jedinci. Stejný trend vykazovaly hodnoty středního arteriálního tlaku. Tato data se také shodují s výsledky Collinse et al. (2004), kteří ve svých pokusech použili potkany SHR a WKY. Výsledky této studie ukazují prospěšné snížení krevního tlaku vlivem pravidelného

cvičení u hypertenzních zvířat a snížení tepové frekvence před ischemií u všech trénovaných zvířat.

V našich pokusech došlo vlivem cvičení k mírnému snížení velikosti infarktu myokardu, avšak pouze u kmene SHR, změny však nedosahovaly statistické významnosti. Snížení velikosti infarktu vlivem cvičení u SHR částečně koresponduje s výsledky Alánové et al. (2017), kdy stejný protokol fyzické zátěže významně snížil velikost infarktu u normotenzních potkanů kmene WKY. Zdá se tedy, že pro aktivaci kardioprotekce u SHR kmenů nebyl námi zvolený protokol fyzické zátěže dostatečný. Nelze proto vyloučit, že prodloužení doby běhání, respektive jeho intenzity, by mohlo ke zvýšení ischemické tolerance srdce vést.

Vlivem adaptace na kontinuální hypoxii došlo v naší práci ke statisticky významnému zmenšení velikosti infarktu myokardu jak u SHR tak i SHRmt^{LEW} potkanů. Získaná data odpovídají dříve publikovaným výsledkům experimentů provedených v naší laboratoři (Neckář et al., 2002; 2004) a také výsledkům nejnovější práce vzniklé na oddělení Vývojové kardiologie AV ČR (Alánová et al., 2017). Všechny tři zmíněné studie ukázaly silný kardioprotektivní účinek hypoxie, který byl prokázán i v kombinaci s dalšími kardioprotektivními stimuly jako je ischemický preconditioning nebo fyzická zátěž. Při použití dvou kardioprotektivních stimulů (chronická hypoxie + cvičení), měla hypoxie vždy větší účinnost, nicméně aditivní působení s cvičením nebylo prokázáno. Tyto výsledky naznačují, že chronická hypoxie by mohla být dostatečně silným stimulem i pro zmenšení velikosti infarktu u hypertenzních zvířat, zatímco intenzita fyzické zátěže, v námi stanoveném protokolu, byla pro SHR kmene nedostatečná. U SHR adaptovaných na chronickou hypoxii došlo také ke statisticky významnému snížení tepové frekvence před ischemií v průběhu ischemie i reperfuze. Na druhou stranu, CNH vedla ke zvýšení hodnot MAP u obou hypertenzních skupin zvířat, což může naznačovat zlepšení kontraktilní funkce především v reperfuzi.

Kardioprotektivní účinek obou fenoménů se projevil i na výskytu předčasných komorových stahů a závažných komorových tachyarytmií. U SHR došlo ke snížení výskytu singlů, stejně jako u SHRmt^{LEW}, kde jejich pokles v důsledku adaptace na CNH dosahoval statistické významnosti. Cvičení i CNH vedly k nižšímu výskytu salv, ale výrazněji neovlivnily výskyt tachykardií ani dobu jejich trvání. To je v rozporu s prací Collinse et al. (2004), kde bylo pozorováno zkrácení doby trvání tachyarytmií u SHR i WKY potkanů vlivem cvičení. Změny v době trvání tachyarytmií v práci Collinse et al. (2004) mohly být

způsobeny výběrem odlišného tréninkového protokolu fyzické zátěže, který se od námi použitého modelu cvičení lišil délkou adaptace (6 týdnů, oproti 2 týdnům v naší práci) i použitým tréninkovým modelem (dobrovolné běhání v běhacím kole, oproti řízenému běhání na běhacím pásu). Souhrně v naší práci nedošlo vlivem kardioprotektivních intervencí k statisticky signifikantním změnám v celkovém počtu komorových tachyarytmií, byť v řadě sledovaných parametrů jsme zaznamenali jasné trendy k jejich redukcii. Nelze také vyloučit, že navýšením počtu zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách by bylo dosaženo statisticky významných rozdílů.

Závažnost arytmií v ischemii i perfuzi nevykazovala vlivem hypoxické adaptace či fyzické zátěže statisticky průkazné změny, nicméně trend ke snížení hodnoty skóre ischemických arytmií u trénovaných SHR potkanů byl zjevný. U konplastického kmene SHRmt^{LEW} došlo vlivem cvičení i CNH ke zmenšení počtu perfuzních arytmií a snížení jejich závažnosti. Tyto výsledky se shodují s pracemi Neckáře et al. (2002) a Szároszie et al. (2017), kde byl prokázán pozitivní vliv chronické hypoxie na výskyt a závažnost perfuzních arytmií u normotenzních potkanů. Zdá se tedy, že snížení výskytu ischemických a perfuzních arytmií vlivem chronické hypoxie může přispívat (alespoň z části) ke zvýšené odolnosti hypertenzních potkanů k ischemicko-perfuznímu poškození srdce.

6.2 Úloha mitochondriálního genomu v ischemické toleranci srdce

Jak ukázaly naše experimenty, modifikace mitochondriálního genomu neměla vliv na ischemickou toleranci srdce u obou hypertenzních kmenů potkanů. Otázkou proto zůstává, zda by se rozdíl v mitochondriálním genomu projevil za výraznějších nároků na fyzickou zátěž. Těmto otázkám se chceme věnovat v následujících studiích.

Po adaptaci na chronickou hypoxii bylo naopak prokázáno signifikantní snížení velikosti infarktu jak u kmene SHR, tak i u konplastických zvířat SHRmt^{LEW}. Protekce vyvolaná CNH však vykazovala u obou kmenů podobnou intenzitu. Vlivem chronické hypoxie na ischemickou toleranci srdce u transgenních hypertenzních potkanů kmene SHRmt^{BN} (konplastický kmen s mitochondriálním genomem z kmene BN) se ve své práci zabývali Neckář et al. (2017). Výsledky této studie ukázaly, že chronická hypoxie významně snížila velikosti infarktu u obou kmenů, nicméně její silnější protektivní účinek byl prokázán u konplastického kmene SHRmt^{BN}. Z dostupné literatury studující proteiny komplexů dýchacího řetězce vyplývá, že u konplastického kmene SHRmt^{LEW}

dochází ke změně dýchacího řetězce na komplexu I (Houštěk et al., 2012). Naproti tomu ve studii Neckáře et al. (2017) bylo zjištěno u kmene SHRmt^{BN}, že v dýchacím řetězci došlo ke změně na komplexu IV, což bylo provázeno zvýšenou ischemickou tolerancí v porovnání s kontrolními SHR potkany. Právě těmito změnám na úrovni tohoto komplexu jsou mimo jiné přiřítány kardioprotektivní účinky CNH u konplastického kmene SHRmt^{BN}, který je k protekci chronickou hypoxií vnímavější než výchozí kmen SHR. Možným vlivem změn komplexů dýchacího řetězce se zabývali také Houštěk et al. (2014), kteří prokázali sníženou přirozenou kardioprotektivní funkci srdce u konplastického kmene SHRmt^{F344}, která mohla být vyvolána právě změnou na některém z komplexů. V naší práci jsme se však změnami v komplexech dýchacího řetězce v mitochondriích srdce SHRmt^{LEW} nezabývali, a proto nelze potvrdit ani vyloučit jejich úlohu v ischemické toleranci srdce u konplastických hypertenzních zvířat. Nicméně o jejich bližší analýze vážně uvažujeme v následujících studiích.

Ukazatelem zvýšené ischemické tolerance srdce a přirozené kardioprotektivní funkce myokardu je stanovení exprese enzymu MnSOD. Úloha MnSOD v protekci srdce vyvolané CNH u normotenzních potkanů byla prokázána v práci Chytilové et al. (2015). V této studii byli použiti potkani kmene WKY adaptovaní na podmínky CNH, u kterých došlo k signifikantnímu nárůstu exprese MnSOD oproti normoxickým kontrolám, který byl provázen zvýšenou ischemickou tolerancí srdce.

Při měření exprese MnSOD v naší práci jsme u konplastického kmene SHRmt^{LEW} zjistili nižší hodnoty exprese tohoto antioxidačního enzymu oproti zvířatům kmene SHR. Vlivem CNH nedošlo ke změnám exprese MnSOD ani u jednoho z kmenů. Na základě těchto výsledků by se dalo usuzovat, že chronická hypoxie by neměla mít kardioprotektivní účinek. Adaptace na CNH však vedla ke zmenšení velikosti infarktu, její pozitivní účinek na ischemickou toleranci srdce se tedy projevil nezávisle na nezměněné expresi MnSOD. Podobných výsledků ve své práci dosáhli také Hahnová et al. (2017), kteří mimo jiné sledovali expresi MnSOD po vystavení potkanů chronické hypoxii u konplastického kmene SHRmt^{BN}. Stejně jako v naší práci nedošlo vlivem chronické hypoxie ke změnám v expresi MnSOD, ale byl prokázán její kardioprotektivní účinek na velikost infarktu u SHR i SHRmt^{BN}. Výsledky těchto experimentů naznačují, že MnSOD nehraje klíčovou roli v ischemické toleranci srdce u hypertenzních potkanů SHR ani z nich odvozených konplastických kmenů a je pravděpodobné, že se v přirozené protekci myokardu těchto zvířat mohou uplatňovat spíše jiné antioxidační enzymy nebo kardioprotektivní mechanismy.

7. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala kardioprotektivním vlivem fyzické zátěže a chronické kontinuální hypoxie na ischemickou toleranci srdce hypertenzních potkanů kmene SHR a konplastického kmene SHRmt^{LEW}. Kromě použití přirozených kardioprotektivních intervencí, jsme se také zabývali vlivem mitochondriálního genomu ve schopnosti srdce odolat I/R poškození. Na základě provedených experimentů a stanovených cílů jsme dospěli k těmto závěrům:

- 1) Adaptace na fyzickou zátěž nevedla u kmene SHR ani konplastického kmene SHRmt^{LEW} k signifikantním změnám ve velikosti infarktu myokardu ani ke změnám ve výskytu komorových ischemických a reperfuzních arytmií a jejich závažnosti.
- 2) Adaptace na chronickou hypoxii vedla u kmene SHR i konplastického kmene SHRmt^{LEW} k signifikantnímu zmenšení velikosti infarktu myokardu a ke snížení množství výskytu jednoduchých předčasných komorových stahů.
- 3) Adaptace na CNH neovlivnila expresi MnSOD v rámci jednotlivých kmenů, ale u konplastického kmene SHRmt^{LEW} byla exprese MnSOD signifikantně nižší oproti SHR.

8. Literární zdroje

ALÁNOVÁ, P., Chytilová, A., Neckář, J., Hrdlička, J., Míčová, P., Holzerová, K., Hlaváčková, M., Mácháčková, K., Papoušek, F., Vašinová, J., Benák, D., Nováková, O., Kolář, F. Článek v tisku. 2017. Myocardial ischemic tolerance in rats subjected to endurance exercise training during adaptation to chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology*.

ASEMU, G., Neckář, J., Szárszoi, O., Papoušek, F., Ošťádal, B., Kolář, F. 2000. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiological Research*. 49 (5). 597 – 606.

BELAIDI, E., Joyeux-Faure, M., Ribuot, Ch., Launois, S. H., Levy, P., Godin-Ribuot, D. 2009. Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *Journal of the American College of Cardiology*. 53 (15). 1309 – 1317.

BERTAGNOLLI, M., Schenkel, P. C., Campos, C., Mostarda, C. T., Casarini, D. E., Belló-Klein, A., Irigoyen, M. C., Rigatto, K. 2008. Exercise Training Reduces Sympathetic Modulation on Cardiovascular System and Cardiac Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*. 1 – 6.

BOWLES, D. K., Farrar, R. P., Starnes, J. W. 1992. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 263 (3). H804 – H809.

BROWN, D. A., Jew, K. N., Sparagna, G. C., Musch, T. I., Moore, R. L. 2003. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *Journal of Applied Physiology*. 95. 2510 – 2518.

BROWN, D. A., Lynch, J. M., Armstrong, C. J., Caruso, N. M., Ehlers, L. B., Johnson, M. S., Moore, R. L. 2005. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *The Journal of Physiology*. 564.2. 619-630.

BUERKE, M., Murohara, T., Carsten, S., Nuss, Ch., Tomaselli, K., Lefer, A. M. 1995. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92. 8031 – 8035.

COLLINS, H. L., Loka, A. M., DiCarlo, S. 2004. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 288. H532 – H540.

DEMIREL, H. A., Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Combes, J., Naito, H. 2001. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Journal of Applied Physiology*. 91. 2205 – 2212.

DENG, Y., Yang, M., Xu, M., Zhang, Q., Zhao, Q., Yu, H., Li, D., Zhang, G., Lu, A., Cho, K., Teng, F., Wu, P., Wang, L., Wu, W., Liu, X., Guo, D., Jiang, B. 2015. Combined Salvianolic Acid B and Ginsenoside Rg 1 Exerts Cardioprotection against Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *PLoS ONE* 10 (8). 1 – 15.

FERDINANDY, P., Schulz, R., Baxter, G. F. 2007. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacological Reviews*.

FRANK, A., Bonney, M., Bonney, S., Weitzel, L., Koeppen, M., Eckle, T. 2012. Myocardial ischemia reperfusion injury – from basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 16 (3). 123 – 132.

HAHNOVÁ, K., Brabcová, I., Neckář, J., Weissová, R., Chytilová, A., Žurmanová, J., Kalous, M., Pravenec, M., Kolář, F., Novotný, J. V recenzním řízení 2017. B-Adrenergic signaling, monoamine oxidase A and antioxidant defence in the myocardium of SHR and SHR-mtBN conplastic rat strains: the effect of hypoxia. *The Journal of Physiological Sciences*.

HAMILTON, K. L., Powers, S. K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., Mehta, J. L. 2001. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 281. H1346 – H1352.

HOUŠTĚK, J., Hejzlarová, K., Vrbacký, M., Drahota, Z., Landa, V., Zídek, V., Mlejnek, P., Šimáková, M., Šilhavý, J., Mikšík, I., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Kurtz, T., Pravenec, M. 2012. Nonsynonymous variants in mt-Nd2, mt-Nd4, and mt-Nd5 are linked to effects on oxidative phosphorylation and insulin sensitivity in rat conplastic strains. *Physiological Genomics*. 44. 487 – 494.

HOUŠTĚK, J., Vrbacký, M., Hejzlarová, K., Zídek, V., Landa, V., Šilhavý, J., Šimáková, M., Mlejnek, P., Kazdová, L., Mikšík, I., Neckář, J., Papoušek, F., Kolář, F., Kurtz, T. W., Pravenec, M. 2014. Effect of mtDNA in SHR-mt^{F344} versus SHR conplastic strains on reduced OXPHOS enzyme levels, insulin resistance, cardiac hypertrophy, and systolic dysfunction. *Physiological Genomics*. 46. 671 – 678.

HURTADO, A. 1960. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Annals of Internal Medicine*. 53 (2). 247 – 258.

CHYTILOVÁ, A., Borchert, G. H., Mandíková-Alánová, P., Hlaváčková, M., Kopkan, L., Hye Khan, Md. A., Imig, J. D., Kolář, F., Neckář, J. 2015. Tumour necrosis factor- α contributes to improved cardiac ischaemic tolerance in rats adapted to chronic continuous hypoxia. *Acta Physiologica*. 214. 97 – 108.

JENNINGS, R. B., Reimer, K. A. 1981. Lethal Myocardial Ischemic Injury. *American Journal of Physiology*. 102 (2). 241 – 255.

KALOGERIS, T., Baines, Ch. P., Krenz, P., Korthuis, R. J. 2012. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 298. 229 – 317.

KOLÁŘ, F., Ošťádal, B. 2004. Molecular Mechanisms of Cardiac Protection by Adaptation to Chronic Hypoxia. *Physiological Research*. 53 (1). S3 – S13.

KOPECKÝ, M., Daum, S. 1958. Adaptation of the myocardium to altitude anoxia. *Ceskoslovenska Fysiologie*. 7 (3). 218 – 219.

KURTZ, T. W., Montano, M., Chan, L., Kabra, P. 1989. Molecular Evidence of Genetic Heterogeneity in Wistar-Kyoto Rats: Implications for Research With the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*. 13 (2). 188 – 192.

KURTZ, T. W., Morris, R. C. 1987. Biological Variability in Wistar-Kyoto Rats: Implications for Research with Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*. 10 (1). 127 – 131.

LAUGHLIN, M. H., Oltman, C. L., Bowles, D. K. 1998. Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 30 (3). 352 – 360.

LEE, Y., Min, E. E., Kavazis, A. N., Smuder, A. J., Willis, W. T., Powers, S. K. 2012. Exercise Protects Cardiac Mitochondria against Ischemia-Reperfusion Injury. *Medicine & Science in sports & exercise*. 397 – 405.

MANFROI, W. C., Peukert, C., Berti, C. B., Noer, C., de Ávila Gutierrez, D., Silva, F. T. B. G. C. 2002. Acute Myocardial Infarction. The First Manifestation of Ischemic Heart Disease and Relation to Risk Factors. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 78. 392 – 395.

MARZILLI, M., Morrone, D., Guarini, G. 2012. Postconditioning. *Heart and Metabolism*. 54. 20 – 24.

MASSON, G. S., Nair, A. R., Soares, P. P. S., Michelini, L. C., Francis, J. 2015. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 309. H1115 – H1122.

MIZUNO, M., Iwamoto, G. A., Vongpatanasin, W., Mitchell, J. H., Smith, S. A. 2015. Dynamic exercise training prevents exercise pressor reflex overactivity in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 309. H762 – H770.

MORRIS, J. N., Pollard, R., Everitt, M. G., Chave, S. P. W., Semmence, A. M. 1980. Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. *The Lancet*. 316. 1207 – 1210.

MURAVYEVA, M., Baotic, I., Bienengraeber, M., Lazar, J., Bosnjak, Z. J., Sedlic, F., Warltier, D. C., Kersten, J. R. 2014. The role of Mitochondrial DNA. *Anesthesiology*. 120 (4). 870 – 879.

MURRY, CH. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74. 5. 1124 – 1136.

NATALI, A. J., Fowler, E. D., Calaghan, S. C., White, E. 2015. Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 309. H421 – H424.

NECKÁŘ, J., Ošťádal, B., Kolář, F. 2004. Myocardial infarct size limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiological Research*. 53. 621 – 628.

NECKÁŘ, J., Papoušek, F., Nováková, O., Ošťádal, B., Kolář, F. 2002. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Research in Cardiology*. 97 (2). 161 – 167.

NECKÁŘ, J., Svatoňová, A., Weissová, R., Drahota, Z., Zajíčková, P., Brabcová, I., Kolář, D., Alánová, P., Vašinová, J., Šilhavý, J., Hlaváčková, M., Tauchmannová, K., Milerová, M., Ošťádal, B., Čevenka, L., Žurmanová, J., Kalous, M., Nováková, O., Novotný, J., Pravenec, M., Kolář, F. 2017. Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*. 00. 1 – 17.

OŠŤÁDAL, B., Kolář, F. 2007. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: Beneficial and adverse effects. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 158. 224 – 236.

OŠŤÁDAL, B., Procházka, J., Pelouch, V., Urbanová, D., Widimský, J. 1984. Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiologia Bohemoslovaca*. 33 (2). 129 – 138.

OŠŤÁDAL, B., Vizek, M. 2003. *Patologická fyziologie srdce a cév*. Karolinum. Praha. 168 stran. ISBN 80-246-0597-X

OŠŤÁDALOVÁ, I., Ošťádal, B., Jarkovská, D., Kolář, F. 2002. Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatric Research*. 52. 561 – 567.

POWERS, S. K., Demirel, H. A., Vincent, H. K., Coombes, J. S., Naito, H., Hamilton, K. L., Shanely, R. A., Jessup, J. 1998. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *The American Physiological Society*. 0363-6119/98. R1468 – R1477.

POWERS, S. K., Murlasist, Z., Wu, M., Kavazis, A. N. 2007. Ischemia-Reperfusion-Induced Cardiac Injury: A Brief Review. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1529 - 1536.

PRAVENEK, M., Kurtz, T. W. 2010. Recent Advances in Genetics of Spontaneously Hypertensive Rat. *Current Hypertension Reports*. 12. 5 – 9.

RAVINGEROVÁ, T., Bernátová, I., Matějíková, J., Ledvényiová, V., Nemčeková, M., Pecháňová, O., Tribulová, N., Slezák, J. 2011. Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Experimental & Clinical Cardiology*

STARNEK, J. W., Taylor, R. P., Park, Y. 2003. Exercise improves postischemic function in aging hearts. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 285. H347 – H351.

SZÁRSZOI, O., Fialová, M., Asemu, G., Neckář, J., Ošťádal, B., Kolář, F. 2017. Tempol and Melatonin Blunt Antiarrhythmic Effect of Chronic Intermittent Hypoxia in Rats. *Adaptation Biology and Medicine*. 8. 299 – 309.