Vývoj odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku – experimentální aspekty

Bohuslav Ošťádal*, Zuzana Charvátová*, Ivana Ošťádalová*, František Kolář*, Ivan Netuka*^{***}

Centrum výzkumu chorob srdce a cév, *Fyziologický ústav AV ČR, **Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, Česká republika

Vývoj odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku – experimentální aspekty. *Cor Vasa* 2009;51(10):691–697.

Současný zájem o hypoxický nezralý srdeční sval je dán především klinickou potřebou: hypoxické vrozené vady srdeční jsou stále hlavní jednotlivou příčinou úmrtnosti na vrozené vady a ischemická choroba srdeční již není onemocněním pátého a vyšších decenníí, ale její rizikové faktory se objevují již v časných fázích ontogenetického vývoje. V naší dospělé populaci se navíc neustále zvyšuje počet pacientů, kteří byli v časně fázi ontogenetického vývoje úspěšně operováni pro cyanotickou vrozenou vadu srdeční. Tito jedinci se blíží věku, ve kterém se zvyšuje riziko závažných kardiovaskulárních onemocnění, především ischemické choroby srdeční. Experimentální výsledky dokazují, že nezralé srdce je k akutnímu nedostatku kyslíku odolnější než srdce dospělé. Příčiny tohoto rozdílu nejsou dosud objasněny, avšak je velmi pravděpodobné, že se na nich podílí vývojové změny energetického metabolismu, včetně mitochondriálních funkcí. Vysokou odolnost novorozeneckého srdce nelze dále zvýšit ischemickým preconditioningem ani adaptací na chronickou hypoxii; endogenní protektivní mechanismy se objevují až s poklesem odolnosti v průběhu vývoje. Odolnost dospělého srdečního svalu k akutnímu nedostatku kyslíku může významně ovlivnit perinatální hypoxie. Uvedené výsledky dokazují, že vývojový přístup nabízí nové možnosti studia patogeneze, prevence a terapie závažných kardiovaskulárních onemocnění.

Klíčová slova: Ontogenetický vývoj – Tolerance k hypoxii/ischemii – Protekce myokardu – Srdeční mitochondrie

Ošťádal B, Charvátová Z, Ošťádalová I, Kolář F, Netuka I. **Development of myocardial tolerance to oxygen deficiency – experimental aspects.** *Cor Vasa* 2009;51(10):691–697.

The current interest in the hypoxic immature myocardium is due primarily to clinical need as hypoxic congenital heart disease continues to be the leading single cause of death from congenital heart disease and coronary disease is no longer a disease of the fifth and higher decades but its risk factors start appearing already in the early stages of ontogenic development. Moreover, the number of patients undergoing successful surgery for cyanotic congenital heart disease in the early stage of ontogenic development in our adult population continues to grow. These individuals are nearing an age whereby the risk of serious cardiovascular disease, and coronary heart disease in particular, increases. Experimental studies show that the immature heart is more tolerant to acute oxygen deficiency than the adult heart. While the reasons underlying this difference are unclear yet, it is most likely that contributing factors include developmental changes of energy metabolism including mitochondrial function. The high tolerance of the neonatal heart cannot be further enhanced by ischemic preconditioning or adaptation to chronic hypoxia; endogenous protective mechanisms do not set in until tolerance starts to decline in the course of development. Tolerance of the adult myocardium to acute oxygen deficiency may be significantly affected by perinatal hypoxia. The above results show that the developmental approach offers new possibilities in the study of the pathogenesis, prevention and treatment of serious cardiovascular disease.

Key words: Ontogenetic development – Tolerance to hypoxia/ischemia – Myocardial protection – Myocardial mitochondria

Adresa: prof. MUDr. Bohuslav Ošťádal, DrSc., Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika, e-mail: ostadal@biomed.cas.cz

Úvod

Hypoxie srdečního svalu vzniká jako důsledek nerovnováhy mezi množstvím kyslíku, dodávaného srdeční buňce, a množstvím kyslíku, které buňka aktuálně potřebuje k pokrytí metabolických nároků. Nejčastější příčinou jsou bezesporu

hypoxie stagnační, kam patří především ischemie, vyvolaná snížením až zástavou koronárního průtoku, a hypoxie hypoxická (systémová), charakterizovaná poklesem PO₂ v arteriální krvi. Je třeba zdůraznit, že pojmy „hypoxie“ a „ischemie“ jsou často zaměňovány přesto, že důsledky těchto dvou

Práce vznikla v Centru výzkumu chorob srdce a cév, výzkumný projekt MŠMT 1M0510 a s podporou AVOZ 501 10509.

mechanismů se na buněčné úrovni významně liší: u ischemie dochází nejen k poklesu přísunu kyslíku a metabolických substrátů, ale výrazně sníženo je i odstraňování metabolitů; jejich postupná akumulace vede k poklesu pH a hyperosmolaritě. Důsledkem nedostatečné dodávky kyslíku je přechod srdečního svalu na anaerobní metabolismus, hromadění metabolitů a porucha energetické a iontové homeostázy; to vede k poruchám kontraktility a konečným důsledkem může být zánik srdeční buňky. Rozsah hypoxického (ischemického) poškození srdečního svalu však nezávisí jen na intenzitě a trvání hypoxického stimulu, ale i na odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku. A právě tento závažný parametr se v průběhu postnatálního vývoje významným způsobem mění. To není překvapivé, když si uvědomíme, že v průběhu ontogeneze se výrazně mění obě strany shora uvedeného vztahu: dodávka vs. spotřeba kyslíku. Jako příklad lze uvést kvantitativní vývoj kapilarizace srdečního svalu: zatímco po porodu u potkana zásobuje jedna kapilára 16 myocytů, pak 28. den, tedy v době odstavu, je to již jen jediná srdeční buňka.⁽¹⁾ Podobně se brzy po narození mění i výkon srdečního svalu, a tím i jeho energetické nároky: index kontraktility do odstavu prudce stoupá, přičemž vzestup je největší v prvním týdnu po narození (obrázek 1). Změny jsou velmi rychlé; kontraktilní odpověď se u potkana v prvním týdnu života liší každý den.⁽²⁾

Současný zájem o hypoxický nezralý srdeční sval je dán především klinickou potřebou: hypoxické vrozené vady srdeční jsou stále hlavní jednotlivou příčinou úmrtnosti na vrozené vady a ischemická choroba srdeční již není onemocněním pátého a vyšších decenníí, ale její rizikové faktory, jako jsou genetická predispozice, hyperlipoproteinemie, kouření, hypertenze, obezita či diabetes mellitus, jsou často přítomny již v časných fázích ontogenetického vývoje.^(3,4) V krátkém přehledu se pokusíme shrnout současné představy o třech, vzájemně velmi úzce propojených oblastech výzkumu hypoxie nezralého myokardu: jde především o postnatální vývoj odolnosti srdečního svalu, o její možné pozitivní ovlivnění a konečně o pozdní důsledky časně hypoxie. Opírat se budeme především o naše dlouholeté experimentální zkušenosti.

Obrázek 1 Ontogenetický vývoj indexu kontraktility srdečního svalu u laboratorního potkana

DP/dt – rychlost vzestupu tlaku v isovolumické fázi systoly

Postnatální vývoj odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku

První údaje o tom, že odolnost k hypoxii klesá v závislosti na věku, přinesly práce sledující přežití potkana, kočky, psa, morčete a králíka v anoxických podmínkách.⁽⁵⁾ Bylo prokázáno, že u každého druhu je doba přežití nepřímo úměrná zralosti novorozence. Tyto studie však byly prováděny na intaktních zvířatech a výsledek mohl ovlivnit účinek hypoxie na centrální nervový systém.⁽⁶⁾ Koncepty vyšší tolerance neonatálního srdce poprvé publikovali Su a Friedman⁽⁷⁾ a Jarmakani a spol.⁽⁸⁻¹⁰⁾ na modelu izolovaného perfundovaného myokardu ukázali, že 30minutová anoxie měla u novorozeného králíka a psa minimální účinek na kontraktilní funkci; u obou druhů byl negativní vliv hypoxie úměrný věku. U novorozenců byla oproti dospělým jedincům značně zvýšena produkce laktátu, což naznačuje, že novorozenci jsou schopni udržovat dospělé koncentrace myokardiální ATP. Podobná věková závislost byla pozorována i u potkanů:⁽¹¹⁾ tolerance izolované pravé komory k anoxii byla signifikantně vyšší u novorozených samců než u dospělých jedinců. Objevil se rovněž významný pohlavní rozdíl: zatímco od 30. do 60. dne života odolnost samčího srdce klesala, u samic se neměnila. Dospělý samičí myokard tak byl k hypoxii významně odolnější.

Stejně jako k hypoxii je nezralý myokard relativně odolný i k ischemii, jak bylo prokázáno u králíka,⁽¹²⁾ prasete,⁽¹³⁾ psa⁽¹⁴⁾ a potkana.⁽¹⁵⁾ Riva a Hearse⁽¹⁵⁾ pozorovali, že vývoj odolnosti izolovaného srdce ke globální ischemii stoupá od druhého týdne do doby odstavy, poté až do dospělosti klesá. Detailní analýza tolerance izolovaného srdce potkana ke globální ischemii v prvním týdnu života ukázala pokles od prvního do sedmého dne po narození (obrázek 2), což naznačuje možný trifázický profil ontogenetického vývoje citlivosti k ischemii, alespoň u potkana.⁽¹⁶⁾ Citlivost neonatálního myokardu k ischemii může být druhově specifická: srdce neonatálního prasete je citlivější než srdce novorozeného králíka.⁽¹⁷⁾

Příčiny zvýšené odolnosti nezralého myokardu

Mechanismy zvýšené odolnosti nezralého myokardu nejsou dosud uspokojivě objasněny. Při pokusu o vysvětlení této skutečnosti musíme vzít v úvahu, že fetus vyrůstá v hypoxickém prostředí, kde PO_2 je pouhých 47 mm Hg, což odpovídá extrémní nadmořské výšce; hovoříme také o „Mt. Everest in utero“. Plod je však na tuto situaci adaptován: prenatální období je charakterizováno polycytemií, fetálním hemoglobinem a posunem disociační křivky hemoglobinu doleva. K největším změnám dochází při porodu. Musíme si uvědomit, že během krátké doby se plod, a tedy i jeho srdce dostávají z prostředí o nízkém PO_2 a nízké saturaci kyslíku (18 %) do normální atmosféry (PO_2 160 mm Hg a arteriální saturace 97 %). Porod však znamená rovněž přechod z amniové tekutiny na vzduch, výrazný pokles okolní teploty, konec transplacentární výživy; tato význam-

Obrázek 2 Tolerance izolovaného perfundovaného neonatálního srdce laboratorního potkana k akutní ischemii (vyjádřena jako obnovení kontraktility po ischemii)

* – statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) proti prvnímu dni po narození, DF – síla kontrakce.

Údaje: Ošťádalová a spol.⁽¹⁶⁾

ná změna je doprovázena nadprodukcí kyslíkových radikálů. Novorozenec se velmi rychle přizpůsobuje: své funkce se ujímají plíce, fetální cirkulace se mění v neonatální, začíná se uplatňovat termoregulace a stoupá bazální metabolismus. Přesto jsou však první 2–3 hodiny po porodu kritické: plod trpí hladem, žízní, chladem a oxidačním stresem; je však nutno zdůraznit, že jde o situaci fyziologickou. Kuma a spol.⁽¹⁸⁾ prokázali u myši, že právě v tomto období se v srdci ve zvýšené míře uplatňuje autofagie: produkce aminokyselin autofagickou degradací vlastních proteinů umožňuje udržení energetické homeostázy, a tak překonat krátké období hladovění. Úroveň autofagie se v perinatálním období v srdečním svalu významně mění: je velmi nízká před narozením, stoupá v prvních třech hodinách po porodu a v průběhu dalšího vývoje postupně klesá až na fetální úroveň. V této souvislosti je třeba připomenout, že metabolické nároky plodu jsou stejné jako u orgánů matky. Po porodu bazální metabolismus prudce stoupá;⁽¹⁹⁾ podle Rohlicka a spol.⁽²⁰⁾ se může na zvýšené odolnosti neonatálního srdce k hypoxii podílet dočasný návrat k fetální úrovni metabolismu (tzv. „hypoxický hypometabolismus“).

Příčiny vyšší odolnosti srdce v průběhu dalšího vývoje jsou dosud ve stadiu hypotéz (přehled viz Ošťádal a spol.⁽²¹⁾). Lze spekulovat, zda vysvětlení tohoto fenoménu je možno hledat ve vyšší anaerobní glykolytické kapacitě a větších zásobách glykogenu v nezralém srdci,⁽²²⁾ či v lepší schopnosti využívat aminokyseliny transaminací.⁽²³⁾ Během vývoje se mění též míra utilizace ATP;⁽²⁴⁾ ve zralém srdci dojde rychleji k vyčerpání jeho zásob. Naproti tomu v nezralém myokardu se během ischemie akumuluje AMP, což umožňuje rychlé doplnění ATP v reperfuzi. Dalším faktorem, který se může podílet na zvýšené odolnosti nezralého srdce, jsou vývojové změny v transportu vápníku (přehled viz Nijjar a Dhalla⁽²⁵⁾). Homeostáza kalcia je v úzkém vztahu k metabolismu srdeční buňky a jeho zvýšená koncentrace je obecně přijatou determinantou tkáňového poškození.

Transport vápníku se v nezralém a dospělém myokardu významně liší; je známo, že kontrakce myokardu je u savců závislá jak na přestupu vápníku přes sarkolemu, tak na uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula.⁽²⁶⁾ Během vývoje se však výrazně mění vzájemný poměr těchto mechanismů. Kontrakce nezralého myokardu, ve kterém není sarkoplazmatické retikulum plně vyvinuto, je ve velké míře závislá na toku vápníku přes sarkolemu.⁽²⁷⁾ V dalším vývoji se zvyšuje schopnost sarkoplazmatického retikula akumulovat a uvolňovat vápenaté ionty a mění se rovněž distribuce vápníkových kanálů sarkolemy.^(28–30) Podobně se zvyšuje citlivost srdečních myofilament k vápníku; u potkana dosahuje dospělých hodnot po dvou týdnech postnatálního života.⁽³¹⁾ Obdobný průběh má rovněž vývoj citlivosti k přetížení srdeční buňky vápníkem, vyvolaném podáním vysokých dávek isoprenalinu.⁽³²⁾ V této souvislosti je zajímavé zmínit skutečnost, že nezralé srdce je díky větší závislosti na transsarkolemálnímu vstupu vápníku citlivější k negativně inotropnímu účinku antagonistů vápníkových kanálů. Dávky, které u dospělých zvířat vyvolaly jen malý negativně inotropní účinek, u novorozeneckých srdcí kontrakci zastavily.^(33–35) Vysvětlení lze hledat nejspíše ve zkrácení akčního potenciálu, ke kterému vlivem inhibice vápníkových kanálů dochází.⁽³⁶⁾ Důležitou roli v citlivosti srdce k nedostatku kyslíku může hrát též acidóza: negativně inotropní účinek nízkého pH byl překvapivě nižší u neonatálních králíků, což může být podle Solara a spol.⁽³⁷⁾ vysvětleno nižší citlivostí myofibril k Ca při nízkém pH v této věkové skupině. Žádné z těchto pozorování však nemůže zcela vysvětlit rychle se měnící odolnost srdce k ischemii během prvního týdne života potkana.⁽¹⁶⁾

Možná úloha mitochondrií v odolnosti nezralého srdce k nedostatku kyslíku

Jak naznačují shora uvedené studie, pokles odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku v průběhu vývoje je pravděpodobně spojen se zásadními změnami energetického metabolismu. Fetální a novorozené srdce je relativně více závislé na anaerobní glykolýze, zatímco zralý srdeční sval je téměř výlučně aerobní; hlavním substrátem jsou volné mastné kyseliny.⁽³⁸⁾ Stále neznámá je však úloha srdečních mitochondrií v tomto procesu. Jejich ontogeneze je charakterizována výraznými kvantitativními i kvalitativními změnami: stoupá nejen jejich objem, velikost a počet,^(39,40) ale zvyšuje se i jejich enzymatická aktivita.⁽⁴¹⁾ Oxidační metabolismus mitochondrií není při porodu zcela vyvinut: v průběhu prvního postnatálního týdne dochází u potkanů ke zvýšení obsahu a specifické aktivity cytochrom c oxidázy a zvýšenému přestupu adenin nukleotidů přes vnitřní mitochondriální membránu.^(42,43) V našich pokusech jsme ukázali, že obsah cytochromů v srdečních mitochondriích se od porodu do konce období odstavu (30. den) zdvojnásobí, podobně jako exprese adenin nukleotid translokázy 1.⁽⁴⁴⁾ Zjistili jsme rovněž, že u novorozeneckých zvířat existuje pouze jedna populace mitochondrií s poměrně vysokým mitochondriálním membránovým

potenciálem. Počínaje obdobím odstavu se objevuje druhá populace s významně nižším potenciálem. V dospělém myokardu tak můžeme rozlišit dvě populace mitochondrií: interfibrilární s vysokým membránovým potenciálem a subsarkolemální s podstatně nižší hodnotou tohoto funkčního parametru. Uvedené výsledky podporují hypotézu, že ontogenetický vývoj účinnosti mitochondriální přeměny energie může být součástí mechanismů, které ovlivňují změny rezistence myokardu k nedostatku kyslíku. Vyřešení této otázky však rozhodně vyžaduje další podrobnou analýzu.

V posledních letech se ukázalo, že zásadní úlohu v ischemicko/reperfuzním (I/R) poškození dospělého srdce hraje mitochondriální pór, lokalizovaný na vnitřní membráně a odpovědný za změny permeability (mitochondrial permeability transition, MPT).^(45,46) Důkazem pro toto tvrzení jsou především výsledky ukazující, že blokáda otevření póru významně snižuje velikost infarktového ložiska. Příčinou otevření MPT póru jsou děje, ke kterým dochází na počátku reperfuze: vzestup koncentrace vápníku, pokles membránového potenciálu mitochondrií, zvýšená koncentrace anorganického fosfátu, změny v pH, pokles koncentrace makroergních fosfátů a zvýšení koncentrace volných kyslíkových radikálů. Důsledkem otevření póru je pak kolaps membránového potenciálu mitochondrie, pokles úrovně oxidačního metabolismu, bobtnání mitochondrií, vedoucí k redukci krist a k poškození vnější mitochondriální membrány, a konečně zánik mitochondrie se všemi negativními dopady na samotnou buňku. Inhibice otevření póru sanglifehrinem A (ten se váže na cyklofilin D, jednu z komponent MPT póru, a tím ho blokuje⁽⁴⁷⁾) výrazně snižuje rozsah I/R poškození v dospělých srdcích.

Sledováním aktivity MPT póru jsme potvrdili jeho nezastupitelnou úlohu v procesu I/R poškození v dospělých srdcích; ve shodě s výše uvedenými pokusy inhibice sanglifehrinem A výrazně snížila jeho rozsah. Naproti tomu u mládat se inhibicí MPT póru nepodařilo rozsah I/R poškození ovlivnit.⁽⁴⁸⁾ Co může být příčinou této vývojové změny? Pro vysvětlení přichází v úvahu menší množství cyklofilinových receptorů v nezralém srdci či nižší citlivost MPT póru k faktorům, které vedou k jeho otevření. Svou roli ve vývojových změnách odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku může hrát i mitochondriální obsah cyklofilinu D, proteinu, který se podílí na změnách mitochondriální permeability. Bylo totiž prokázáno, že myši, které nemají cyklofilin D, jsou rezistentní jak k I/R poškození *in vivo*,⁽⁴⁹⁾ tak k oxidačnímu stresu a k přetížení buňky vápníkem.⁽⁵⁰⁾ Skutečnost, že sanglifehrin A neměl v nezralém srdci protektivní účinek, naznačuje, že MPT pór není v tomto vývojovém stadiu I/R poškozením aktivován do té míry jako u dospělých. To současně ukazuje, že blokáda sanglifehrinem A není vhodná k hodnocení funkce MPT póru v nezralých srdcích. Vhodnější se zdá být měření bobtnání izolovaných mitochondrií jako indikátoru otevření póru.⁽⁵¹⁾ Zjistili jsme, že u mitochondrií, izolovaných z neonatálních srdcí, je MPT pór méně citlivý k vápenatým iontům než u mitochondrií dospělých jedinců.⁽⁴⁸⁾ Vzhledem

k tomu, že údaje, popisující vývojové změny mechanismů, ovlivňujících otevření MPT póru, nejsou dosud k dispozici, lze se pouze domnívat, že jeho nižší citlivost k vápníkovým iontům může mít souvislost s vyšší tolerancí nezralých srdcí k ischemii. Tato skutečnost podporuje hypotézu, že srdeční mitochondrie – orgány odpovědné za hospodaření s kyslíkem a produkci energie – jsou významným článkem regulace odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku.

Protekce nezralého myokardu

Jak jsme uvedli výše, odolnost nezralého srdečního svalu k nedostatku kyslíku je významně vyšší než v dospělém myokardu. V této souvislosti vyvstává otázka, zda již přirozeně vysoká míra tolerance může být vnějším zásahem dále zvýšena. K neúčinnějším protektivním mechanismům u dospělých jedinců patří v experimentu dlouhodobá adaptace na snížený přívod kyslíku (přehled viz Ošťádal a Kolář⁽⁵²⁾) a krátkodobá adaptace, tzv. ischemický preconditioning (přehled viz Yellon a Downey,⁽⁵³⁾ Bolli⁽⁵⁴⁾). Údaje o vlivu těchto fenoménů na nezralý srdeční sval jsou bohužel jen sporadické. Protektivní účinek tzv. postconditioningu⁽⁵⁵⁾ je srovnatelný s ischemickým preconditioningem (IP) a byl pozorován u řady živočišných druhů i u člověka.⁽⁵⁶⁾ O jeho účinku na vyvíjející se myokard však informace dosud chybějí.

Ischemický preconditioning

Neúčinnější formou dočasné ochrany je ischemický preconditioning (IP), který byl poprvé popsán v roce 1986.⁽⁵⁷⁾ Tento jev byl definován jako zvýšená odolnost srdce k dlouhodobé ischemii, získaná díky předchozí krátké expozici stejnému inzultu. Zatímco o IP v dospělém myokardu jsou údaje velmi rozsáhlé, informace o tomto fenoménu v nezralém myokardu jsou značně omezené. Prokázali jsme,⁽¹⁶⁾ že klasický IP není, minimálně u potkanů, přítomen ihned po narození; jeho protektivní účinek lze poprvé pozorovat na konci prvního postnatálního týdne (obrázek 3). Snižující se odolnost neonatálního srdce po narození je tak kompenzována rozvojem indukovatelného endogenního protektivního mechanismu. Awad a spol.⁽⁵⁸⁾ ukázali, že absence IP v nezralých srdcích nemůže být překonána zvýšením intenzity vyvolávajícího stimulu. Neúspěšný byl rovněž pokus o simulaci ochranného účinku IP farmakologicky.

Molekulární mechanismy IP v dospělém myokardu zůstávají dosud nejasné a totéž platí i pro srdce nezralá. Signalizační kaskádu zřejmě zahajuje uvolnění určitých „ochranných molekul“; patří k nim např. adenosin, bradykinin, prostacyklin a NO (přehled viz Yellon a spol.⁽⁵⁹⁾). Všechny tyto molekuly se mohou vázat na receptory srdečních buněk (spřažených s G proteiny), a tím zahájit aktivaci jedné nebo více signálních drah, což v konečném důsledku vede k fosforylaci cílových proteinů (přehled viz Bolli⁽⁵⁴⁾). Konečným realizátorem této kaskády by mohly být např. mitochondriální draslíkové kanály závislé na ATP.⁽⁶⁰⁾ Baker a spol.⁽⁶¹⁾ prokázali, že IP je spojen s aktivací mitochondriálních K_{ATP} kanálů i v nezralém srdci králíka. Naproti

Obrázek 3 Tolerance izolovaného perfundovaného neonatálního srdce laboratorního potkana k akutní ischemii (vyjádřena jako obnovení kontraktility po ischemii)

* – statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) proti skupině bez preconditioningu, DF – síla kontrakce.

Údaje: Ošťádalová a spol.⁽¹⁶⁾

tomu v nezralém srdci potkana podání 5-hydroxydekanoátu, selektivního blokátoru mitochondriálních K_{ATP} kanálů, protektivní působení IP neovlivnilo.⁽⁶²⁾ Zdá se tedy, že v mechanismu protektivního ovlivnění nezralého myokardu existují značné mezidruhové rozdíly. Shora uvedené výsledky naznačují, že IP jako významný kardioprotektivní mechanismus není, alespoň u potkana, přítomen po narození, ale rozvíjí se teprve během postnatálního života. Zůstává stále otázkou, jak se mechanismy, které se uplatňují v IP nezralého srdce, liší od mechanismů, popsanych v myokardu dospělém.

Adaptace na chronickou hypoxii

Hlavním patofyziologickým rysem hypoxemických vrozených srdečních vad je chronická hypoxie. Dosud však neexistuje adekvátní model, který by simuloval chronickou perfuzi srdce hypoxickou krví, jako je tomu při cyanotických vrozených vadách. Proto jsou používány podobné metody jako u dospělých, to znamená chronická hypoxie, simulovaná v normobarické či hypobarické komoře.

Při chronické hypoxii musí myokard udržet adekvátní kontraktilitu navzdory nižší tenzi kyslíku v koronární cirkulaci. Již na konci padesátých let minulého století bylo pozorováno,⁽⁶³⁾ že populace, žijící ve vysokých nadmořských výškách, mají nižší incidenci infarktu myokardu. Epidemiologická pozorování jsou v souladu s výsledky experimentálních prací, které ukázaly, že odolnost myokardu zvířat, aklimatizovaných na simulovanou vysokou nadmořskou výšku, je významně zvýšena (přehled viz Ošťádal a Kolář⁽⁵²⁾). Bohužel, jen málo autorů studovalo odolnost nezralého srdce, adaptovaného na chronickou hypoxii. Sami jsme prokázali,⁽⁶⁴⁾ že chronická hypoxie (simulovaná v barokomoře) vede u potkanů ke srovnatelnému zvýšení odolnosti srdce k nedostatku kyslíku u zvířat adaptovaných od časných fází postnatálního vývoje či až v dospělosti. Podobně ukázali

i Baker a spol.,⁽¹⁷⁾ že adaptace neonatálních králíků na chronickou hypoxii zvyšuje odolnost myokardu k akutnímu nedostatku kyslíku. Z našich výsledků vyplývá, že protektivní účinek chronické hypoxie není přítomen u novorozeneckých potkanů a ochranný účinek adaptace se – podobně jako u IP – vyvíjí teprve v průběhu prvního týdne života.⁽⁶²⁾ Tyto výsledky naznačují, že se může jednat o obecnější biologický fenomén: maximální odolnost srdečního svalu nemůžeme dále různými protektivními mechanismy ovlivnit. Neonatální myokard není osamocen; s podobnou situací se setkáváme u vysoce odolných srdcí studenokrevných živočichů či u srdcí samičích. Kromě protektivního účinku má však adaptace na chronickou hypoxii řadu vedlejších projevů. Patří k nim především polycytemie, plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory. Ukázali jsme,^(64,65) že stupeň těchto změn je srovnatelný u zvířat, vystavených chronické hypoxii, po narození nebo v dospělosti.

Podobně jako u IP, tak i u adaptace na chronickou hypoxii jsou molekulární mechanismy protekce stále nejasné. Zahrnují zřejmě rovněž na ATP závislé draslíkové kanály, volné kyslíkové radikály, NO, proteinkinazy, opioidy a erythropoetin, nelze však vyloučit, že se mohou podílet i další faktory (přehled viz Kolář a Ošťádal⁽⁶⁶⁾). Naprostá většina prací, studujících možné mechanismy adaptace na chronickou hypoxii, se však týká jen dospělého myokardu. Sami jsme prokázali,⁽⁶²⁾ že blokáda mitochondriálních K_{ATP} kanálů 5-hydroxydekanoátem v perfuzátu (krev nebo Krebsův roztok s albuminem) izolovaného srdce zablokovala u neonatálních potkanů protektivní účinek adaptace; podobný účinek měla i blokáda NO pomocí L-NAME (inhibitor syntázy oxidu dusnatého). Zdá se tedy, že na rozdíl od IP mohou hrát mitochondriální K_{ATP} kanály i NO významnou roli v mechanismu adaptace neonatálních srdcí na chronickou hypoxii.

Vliv časně hypoxie na odolnost dospělého myokardu

V naší dospělé populaci se neustále zvyšuje počet pacientů, kteří byli v časně fázi ontogenetického vývoje úspěšně operováni pro cyanotickou vrozenou vadu srdeční. Tito jedinci se blíží věku, ve kterém se zvyšuje riziko závažných kardiovaskulárních onemocnění, především ischemické choroby srdeční. Otázkou zůstává, jak by mohla tato skutečnost ovlivnit odolnost dospělého srdce k nedostatku kyslíku. V této souvislosti je třeba poznamenat, že v myokardu dětí s vrozenými srdečními vadami byla pozorována metabolická adaptace na chronickou hypoxii: výrazná redukce aerobní kapacity energetického metabolismu a aktivace protektivních kaskád.⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾

Experimentálních prací, zabývajících se pozdními důsledky chronické hypoxie na odolnost dospělého srdečního svalu k nedostatku kyslíku, je stále nedostatečné množství a jejich interpretace není jednoznačná. Nicméně bylo zjištěno, že perinatální hypoxie významně zvyšuje citlivost dospělých potkanů k I/R poškození.^(70,71) Dochází ke zvětšení rozsahu infarktu myokardu a k horší reparaci kontraktilní funkce než u normoxických zvířat. Strukturální změny byly provádě-

zeny diastolickou dysfunkcí levé komory. Naše výsledky⁽⁷²⁾ ukázaly, že pozdní kardiální důsledky časné hypoxie jsou u laboratorních potkanů závislé na pohlaví. Zatímco perinatální expozice chronické hypoxie významně zvýšila odolnost dospělých samic k ischemickým arytmiím, pak odpověď dospělých samců byla zcela opačná (obrázek 4).

Mechanismy pozdních důsledků časné hypoxie na své objasnění teprve čekají. Zdá se však, že perinatální hypoxie může vést ke změně programu některých genů *in utero*, jako např. HSP70, eNOS, β -adrenergických receptorů a G proteinů, což může dlouhodobě ovlivnit odolnost dospělého (samčího) srdce k nedostatku kyslíku.⁽⁷⁰⁾ Tuto hypotézu podporují i další výsledky této laboratoře, které ukázaly, že časná hypoxie vede v srdci k inhibici proteinů tepelného stresu (HSP70), a ruší tak kardioprotektivní působení těchto proteinů.⁽⁷³⁾ Uvedené výsledky podporují hypotézu, že chronická hypoxie v časném období ontogenetického vývoje působí v srdci jako primární programující stimulus, který může významně ovlivnit odpověď dospělého kardiovaskulárního systému na patogenní podněty, jako je akutní nedostatek kyslíku. Dosud však neexistují důkazy možných pohlavních rozdílů v molekulárních mechanismech, odpovědných za protektivní působení chronické hypoxie (přehled viz Ošťádal a spol.⁽⁷⁴⁾).

Obrázek 4 Pozdní kardiální důsledky časné hypoxie u dospělých samců a samic laboratorního potkana: tolerance izolovaného perfundovaného srdce k akutní ischemii (vyjádřena jako celkový počet ischemických arytmií)

* – statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) proti kontrolní skupině. Údaje: Netuka a spol.⁽⁷²⁾

Závěr

Vývojová kardiologie je nyní v molekulární éře a nové poznatky o vývoji srdečního svalu se exponenciálně rozšiřují. Je však nutno konstatovat, že zájem vývojových kardiologů se soustředí především na výzkum prenatálního vývoje; postnatální změny jsou, bohužel, zanedbávány. Je přitom zřejmé, že nové metodické postupy, zvláště pak molekulární biologie a genetika, mohou zásadním způsobem pomoci při hledání patogenetických mechanismů, které se uplatňují v průběhu celého ontogenetického vývoje. Hledání vývojových mechanismů, které se podílejí

na změnách odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku, jsou toho nejlepším dokladem.

Literatura

1. Rakušan K. Vascularization of the heart during normal and pathological growth. *Adv Org Biol* 1999;7:130–53.
2. Ošťádalová I, Ošťádal B, Kolář F. Effect of prenatal hypoxia on contractile performance and responsiveness to Ca^{2+} in the isolated perinatal rat heart. *Physiol Res* 1995;44:135–7.
3. Fejfar Z. Prevention against ischaemic heart disease: A critical review. In: Oliver MF, ed. *Modern trends in cardiology-3*. London and Boston: Butterworths, 1975:465–99.
4. Šamánek M, Urbanová Z. Prevence aterosklerózy v dětském věku. Praha: Galén, 2003:226.
5. Fazekas JF, Aleander FAD, Himwich HE. Tolerance of the newborn to anoxia. *Am J Physiol* 1941;134:281–5.
6. Trojan S. Adaptation of the central nervous system to oxygen deficiency during ontogenesis. *Acta Univ Carol Med Monograph* 1978;85:5.
7. Su JY, Friedman WF. Comparison of the responses of fetal and adult cardiac muscle to hypoxia. *Am J Physiol* 1973;224:1249–53.
8. Jarmakani JM, Nagamoto T, Nakazawa M, Langer GA. Effect of hypoxia on mechanical function in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* 1978;235:H469–74.
9. Jarmakani JM, Nagamoto T, Nakazawa M, Langer GA. Effect of hypoxia on myocardial high-energy phosphates in the neonatal mammalian heart. *Am J Physiol* 1978b;235:H475–81.
10. Jarmakani JM, Nakanishi T, George BL, Bers D. Effect of extracellular calcium on myocardial mechanical function in the neonatal rabbit. *Dev Pharmacol Ther* 1982;5:1–13.
11. Ošťádal B, Procházka J, Janatová T, et al. Developmental aspects of cardiac resistance to hypoxia. *Ber Humboldt Univ Berlin* 1982;24:52–8.
12. Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN. Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;96:717–24.
13. Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN. Is protection of ischemic neonatal myocardium by cardioplegia species dependent. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99:280–7.
14. Julia P, Korfsky ER, Buckberg GD, et al. Studies of myocardial protection in the immature heart. I. Enhanced tolerance of immature versus adult myocardium to global ischemia with reference to metabolic differences. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990a;100:879–87.
15. Riva A, Hearse DJ. Age-dependent changes in myocardial susceptibility to ischemic injury. *Cardioscience* 1993;4:85–92.
16. Ošťádalová I, Ošťádal B, Kolář F, et al. Tolerance to ischemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:857–65.
17. Baker EJ, Boerboom LE, Olinger GN, Baker JE. Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am J Physiol* 1995;268:H1165–73.
18. Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004;432:1032–6.
19. Mühlfeld C, Singer D, Engelhardt N, et al. Electron microscopy and microcalorimetry of the postnatal rat heart (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;141:310–8.
20. Rohlicek CV, Viau S, Trieu P, Hébert TE. Effects of neonatal hypoxia in the rat on inotropic stimulation of the adult heart. *Cardiovasc Res* 2005;65:861–8.
21. Ošťádal B, Ošťádalová I, Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* 1999;79:635–59.
22. Hoerter J. Changes in the sensitivity to hypoxia and glucose deprivation in the isolated perfused rabbit heart during perinatal development. *Pflugers Arch* 1976;363:1–6.
23. Julia P, Young PP, Buckberg GD, et al. Studies of myocardial protection in the immature heart. II. Evidence for importance of amino acid metabolism in tolerance to ischemia. *J Thorac Cardiovasc Res* 1990;100:888–95.
24. Hohl CM. Effect of respiratory inhibition and ischemia on nucleotide metabolism in newborn swine cardiac myocytes. In: Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS, eds. *The developing heart*. Philadelphia, PA: Lippincott, 1997:393–406.

25. Nijjar MS, Dhalla NS. Biochemical basis of calcium handling in developing myocardium. In: Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS, eds. The developing heart. Philadelphia, PA: Lippincott, 1997:189–217.
26. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983;245:C1–14.
27. Vetter R, Studer R, Reinecke H, et al. Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1689–701.
28. Wibo M, Bravo G, Godfraind T. Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors. *Circ Res* 1991;68:662–73.
29. Wibo M, Kolář F, Zheng L, Godfraind T. Influence of thyroid status on postnatal maturation of calcium channels, β -adrenoceptors and cation transport ATPases in rat ventricular tissue. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1731–43.
30. Tanaka H, Shigenobu K. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:1305–13.
31. Vornanen M. Postnatal changes in cardiac calcium regulation. In: Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, Dhalla NS, eds. The developing heart. Philadelphia, PA: Lippincott, 1997:219–29.
32. Ošťádalová I, Ošťádal B. Ontogenetic differences in isoproterenol-induced ⁸⁵Sr uptake in the myocardium. In: Nagano M, Takeda N, Dhalla ND, eds. The cardiomyopathic heart. New York: Raven Press, 1994:395–400.
33. Boucek RJ, Shelton M, Artman M, et al. Comparative effect of verapamil, nifedipine and diltiazem on contractile function in the isolated immature and adult rabbit heart. *Pediatr Res* 1984;18:948–54.
34. Škovránek J, Ošťádal B, Pelouch V, Procházka J. Ontogenetic differences in cardiac sensitivity to verapamil in rats. *Pediatr Cardiol* 1986;7:25–9.
35. Kolář F, Ošťádal B, Papoušek F. Effect of verapamil on contractile function of the isolated perfused heart. *Basic Res Cardiol* 1990;85:429–34.
36. Artman M, Mahony L, Teitel DF. Neonatal cardiology. New York: The McGraw Hill, 2002:272.
37. Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, Allen DG. Effect of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* 1988;63:779–87.
38. Lopaschuk GD. Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *Presse Med* 1998;27:2100–4.
39. Legato MJ. Cellular mechanisms of normal growth in the mammalian heart. II. Qualitative and quantitative features of ventricular architecture in the dog from birth to five months of age. *Circ Res* 1979;44:263–79.
40. Olivetti G, Anversa P, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth and sarcoplasmic alterations. *Circ Res* 1980;46:503–12.
41. Bass A, Stejskalová M, Stieglerová A, et al. Ontogenetic development of energy-supplying enzymes in rat and guinea-pig heart. *Physiol Res* 2001;50:237–45.
42. Schonfeld P, Schild L, Bohnensack R. Expression of the ADP/ATP carrier and expansion of the mitochondrial (ATP+ADP) pool contribute to postnatal maturation of the rat heart. *Eur J Biochem* 1996;241:895–900.
43. Drahota Z, Milerová M, Stieglerová A, et al. Developmental changes of cytochrome c oxidase and citrate synthase in rat heart homogenate. *Physiol Res* 2004;53:119–22.
44. Škárka L, Bardová K, Brauner, et al. Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:321–30.
45. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–85.
46. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovasc Res* 2006;66:222–32.
47. Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002;277:34793–99.
48. Milerová M, Charvátová Z, Škárka L, et al. Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 2009;v tisku.
49. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658–62.
50. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652–8.
51. Balaska D, Halestrap AP, Suleiman M-S, Griffiths EJ. Increased susceptibility to pore-opening in heart mitochondria from neonatal compared with adult rats (Abstract). *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:1002.
52. Ošťádal B, Kolář F. Cardiac adaptation to chronic high altitude hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;158:224–36.
53. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003;83:1113–51.
54. Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H19–27.
55. Vinten-Johansen J. Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. *Heart Fail Rev* 2007;12:235–44.
56. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction; a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65:361–7.
57. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–36.
58. Awad WI, Shattock MJ, Chambers DJ. Ischemic preconditioning in immature myocardium. *Circulation* 1998;98:206–13.
59. Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Sumner MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* 1998;37:21–33.
60. Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, et al. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003;1606:1–21.
61. Baker JE, Holman P, Gross GJ. Preconditioning in immature rabbit hearts. Role of K_{ATP} channels. *Circulation* 1999;99:1249–54.
62. Ošťádalová I, Ošťádal B, Jarkovská D, Kolář F. Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* 2002;52:561–7.
63. Hurtado A. Some clinical aspects of life at high altitudes. *Ann Intern Med* 1960;53:247–58.
64. Ošťádal B, Kolář F, Pelouch V, Widimský J. Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* 1995;44:45–51.
65. Kolář F, Ošťádal B, Procházka J, et al. Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration* 1989;5:57–62.
66. Kolář F, Ošťádal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* 2004;53 (Suppl 1):S3–13.
67. Šamánek M, Bass A, Ošťádal B, et al. Effect of hypoxaemia on enzymes supplying myocardial energy in children with congenital heart disease. *Int J Cardiol* 1989;25:265–70.
68. Ferreira CR, Chagas AC, Carvalho MH, et al. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. *Circulation* 2001;103:2272–6.
69. Rafiee P, Shi Y, Kong X, et al. Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* 2002;106:239–45.
70. Li G, Xiao Y, Estrella JL, et al. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult heart. *J Soc Gynecol Invest* 2003;10:265–74.
71. Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs posts ischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J* 2006;20:1251–3.
72. Netuka I, Szarszoi O, Malý J, et al. Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:714–9.
73. Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, et al. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2001;81:1461–97.
74. Ošťádal B, Netuka I, Malý J, et al. Gender differences in cardiac ischemic injury and protection-experimental aspects. *Exp Biol Med* 2009;234:1011–19.

Došlo do redakce 10. 9. 2009

Přijato k otištění 15. 9. 2009