

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Petr Kafka

Mechanismy regulace fetoplacentárního cévního řečiště při hypoxii

Regulatory mechanisms of fetoplacental vasculature in hypoxia

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 5. 2016

MUDr. Petr Kafka

Identifikační záznam:

KAFKA, Petr. Mechanismy regulace fetoplacentárního cévního řečiště při hypoxii. *[Regulatory mechanisms of fetoplacental vasculature in hypoxia]*. Praha, 2016. 72 stran, 2 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav fyziologie 2. LF UK. Školitel: Cvachovec, Karel.

OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3. CÍLE A HYPOTÉZY	31
4. MATERIÁL A METODY	34
5. VÝSLEDKY	42
6. DISKUZE	54
7. ZÁVĚR.....	61
8. ABSTRAKT	62
9. LITERATURA	64
10. PŘÍLOHY	72

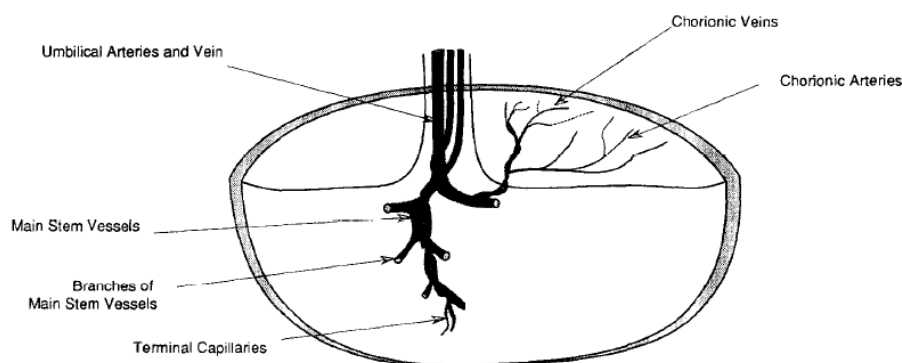
1. ÚVOD

Placenta a její funkce

Placenta je jedinečný orgán, jehož vývoj a existence je omezena pouze na období těhotenství, tj. u člověka asi na 280 dní. Funkčně je placenta velmi složitý orgán nepostradatelný pro plod: 1. chová se jako plíce při výměně kyslíku a CO₂; 2. pracuje jako trávicí systém, zajišťující transfer potřebných živin pro vývoj a růst plodu; 3. plní funkci ledvin a odvádí zplodiny fetálního metabolismu; a za 4. se chová jako imunitní bariéra, která chrání rostoucí plod během těhotenství proti imunologickému ataku matky, ale chrání i novorozence krátce po porodu. Je selektivní bariérou pro molekuly, viry i bakterie. Kromě toho je placenta také důležitý endokrinní orgán pro výrobu mnoha hormonů a růstových faktorů, které regulují průběh těhotenství, podporují růst plodu a vyvolávají porod. Placenta je schopna produkovat jak bílkovinné hormony (tato fáze převažuje během prvního trimestru), tak i steroidní hormony (především v pokročilé fázi těhotenství). Placenta je složená z fetální části (choriová ploténka a klky) obrácené do nitra plodového vejce a mateřské části (bazální ploténka - decidua basalis) obrácené ke stěně děložní. Funkční jednotkou placenty je choriový klk, který obsahuje vrstvy syncytiotrofoblastu, pod ním je nesouvislá vrstva cytotrofoblastu, uvnitř je klk vyplněn řídkým vazivem s Hofbauerovými buňkami (primitivní makrofágy) a sítí kapilár.

Lidská placenta je tedy hemochoriální - trofoblast klků je vystaven přímo maternální krvi. Fetální a mateřský oběh v placentě vytváří protiproudový systém:

1. fetoplacentární cirkulace (Obr. 1.1) - odkysličená krev proudí z plodu do placenty umbilikálními arteriemi v pupečníku. Na spojení pupečníku s placentou se tyto arterie dělí do množství placentárních arterií, které se volně větví v choriové ploténce. Odtud pak pronikají dolů do kmenových klků a větví se ve stromovitém uspořádání postranních klků dolů do kapilární sítě terminálních klků. Okysličená venózní krev se tenkostěnými žilkami vrací zpět do choriové ploténky a dále do umbilikální žíly, která vede krev pupečnickovou šňůrou do ductus venosus plodu.



Obr. 1.1 - Schématické znázornění fetoplacentárního oběhu (Poston et al., 1995).

2. uteroplacentární cirkulace - krev je vedena z obloukových větví děložních spirálních arterií skrz otvory v basální ploténce a omývá placentární klky. Krev se vrací dilatovanými žilami v decida basalis.

Lidská placenta má na konci gravidity tloušťku 2-3 cm, průměr cca 20 cm a hmotnost 500-600 g. Anatomicky je rozdělena na podjednotky variabilní hmotnosti (5 až více než 50 g) nazvané kotyledony, které mohou být laboratorně izolované a perfundované současně in vitro z mateřské i fetální strany. Kotyledony jsou určené konečnými větvemi umbilikální arterie. Celková délka téměř 500 km kapilár představuje plochu pro látkovou výměnu cca 15 m².

Předpokladem správné činnosti placenty je její normální vaskulární vývoj, jehož selhání je příčinou fetální a neonatální morbidity a mortality. Poruchy placentace, zhoršená invaze trofoblastu do spirálních arterií placentárního lůžka či selhání dostatečné remodelace spirálních arterií jsou často společné znaky nepříznivých výsledků těhotenství, včetně intrauterinní růstové retardace (IUGR) a preeklampsie.

Jak již bylo zmíněno, jednou z hlavních funkcí placenty je výměna krevních plynů a zajištění dostatečného okysličení fetální krve. V dospělosti disponuje savčí organismus samozřejmě hlavním orgánem specializovaným na okysličení krve a odstraňování CO₂ – plicemi. Příliš proto nepřekvapuje, že plicní a fetoplacentární cévní řečiště mají řadu podobných vlastností, jimiž se odlišují od cévního zásobení ostatních orgánů. Průtok krve plicemi i placentou je podstatně vyšší než v jiných orgánech, a to i při nižším tlaku, který je v plicním oběhu zhruba pět až šestkrát nižší než ve velkém oběhu (Harris a Heath, 1977; Peacock et al., 2011). Cévní odpor v obou řečištích je tedy oproti systémové cirkulaci nízký. To souvisí s tenkostěnnou strukturou cév v obou těchto orgánech (Hislop a Reid, 1978), téměř úplnou absencí bazálního tonu hladkého svalů plicních cév (Emery et al., 1981) a s absencí

sympatického vazokonstrikčního tonu (Peacock et al., 2011), tolik charakteristického pro systémový oběh. Vysoký tlak v systémové cirkulaci je nezbytný pro efektivní transport okysličené krve i na velké vzdálenosti a proti gravitaci, což odpadá u plicního oběhu, kde by naopak vysoký tlak vedl k poškození alveolokapilární membrány (West et al., 1995).

Fetoplacentární řečiště má malý hemodynamický odpor. To je dáno jednak odlišnou morfologickou stavbou a jednak nízkým bazálním tonem placentárních arterií. Ačkoli placentární arteriální krevní tlak nikdy nebyl přímo změřen, na základě dopplerovského ultrazvukového měření krevního průtoku pupečnickem byl odvozen tlak v rozmezí od 65 mmHg při pupečnickovém konci do 25 mmHg při placentárním konci (Kleiner-Assaf et al., 1999). Z těchto informací vyplývá, že cévy choriové ploténky jsou vystaveny tlakům okolo 20 mmHg.

Anatomicky se fetoplacentární oběh skládá z pupečnickových arterií a žíly, arterií a žil na povrchu choriové ploténky, cév kmenových klků a cév terminálních částí klků. Různé studie pátraly po nalezení anatomického místa ve fetoplacentární cirkulaci, které je zodpovědné za zvýšení cévního odporu a které je v ostatních cévních řečištích obecně označováno jako „rezistentní arterie“, tedy malé arterie (s vnitřním obvodem < 300 μm) a arterioly. V placentě se jim nejvíce podobají malé arterie na povrchu choriové ploténky (Mulvany a Aalkjaer, 1990), ale není jasné, zda tyto cévy jsou místem odporu celého cévního řečiště nebo zda se toto místo vyskytuje ještě po proudu v cévách kmenových klků.

Funkční odlišnost arterií fetoplacentárních cév od ostatních systémových cév tkví v jejich strukturální odlišnosti. Experimentálně byly srovnány izolované arterie choriových klků ze zdravých placent s arteriemi izolovaných z dělohy a omenta těhotných žen (Sweeney et al., 2006). V placentárních arteriích nebyla popsána výrazná lamina elastica interna. Předpokládá se, že to usnadňuje průnik vazoaktivních látek přenášených krví přes cévní stěnu k hladkému svalu a ovlivňuje tak kontraktilitu arterie. Vzhledem k absenci vysokých tlaků v placentě se zřejmě lamina elastica interna nedokázala vyvinout. Fetoplacentární cévy měly silnou vrstvu tunica media, narozdíl od systémových cév měly cirkulárně orientované, atypické hladké svalové buňky (s dobře vyvinutým drsným endoplazmatickým retikulem a malo četnými myofilamenty) oddělené velkým množstvím mezibuněčné hmoty.

Vraťme se zpět k plicnímu oběhu. Zde je narozdíl od cév velkého oběhu nervová regulace mnohem méně významná (Peacock et al., 2011) a je řízená prakticky výhradně na lokální úrovni. Významným faktorem ovlivňující cévní tonus je hypoxie (Barer, 1979). Většina orgánů reaguje na pokles parciálního tlaku kyslíku vazodilatací, což jim umožňuje zajistit si dostatečný průtok krve a dodávku kyslíku při momentální hyposaturaci. Již více než

před půl stoletím bylo objeveno, že v plicních cévách je tomu zcela opačně – na akutní hypoxii reagují vazokonstrikcí (von Euler a Liljestrand, 1946). Tento mechanismus odklání proud krve z oblastí, kde je nedostatečně oxygenována, do míst, kde bude okysličeána lépe. Tato hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV) tím minimalizuje žilní příměs a tedy i optimalizuje okysličeání arteriální krve. Zvýšeání periferní cévní rezistence především způsobuje konstrikce prekapilárních malých arteriol (Peacock et al., 2011).

Řada regulačních mechanismů, které fungují v plicích, má obdobu i v regulaci cév placentárních (Barer, 1979). Jak již bylo zmíněno, mezi fetoplacentární a postnatální plicní cirkulací existuje řada analogií. Fetoplacentární cévy nejsou autonomně inervovány, proto bude významná regulace lokálními a/nebo humorálními mechanismy (Poston et al., 1995). Roli budou hrát myogenní mechanismy a místně produkované vazoaktivní látky (z krve, endotelu, trofoblastické tkáně). Fetoplacentární průtok tak podléhá více nepřímým vlivům včetně srdečního výdeje plodu, viskozity krve a změnám v krevním tlaku matky. Stejně jako v malém oběhu, i v placentárních cévách bude hypoxie vůdčím regulátorem fyziologických i patofyziologických pochodů. Na tomto místě bych rozdělil účinky akutní a chronické hypoxie na placentární cévy.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Vliv akutní hypoxie na fetoplacentární cévy

Již v roce 1979 byla uveřejněna práce, podle které by měl i v placentárních cévách existovat lokální kompenzační mechanismus regulující krevní průtok podobný mechanismu pro lokální regulaci průtoku krve v plicích při hypoxii (Rankin a McLaughlin, 1979). Tento mechanismus by v mateřské i fetální části placenty udržoval konstantní perfuzně/perfuzní poměr podobně jako mechanismus udržující konstantní ventilačně/perfuzní poměr v plicích. Jinými slovy by oblasti placenty s nízkým fetálním krevním průtokem měly odpovídající nízký mateřský krevní průtok a naopak. Roli mediátoru by měl plnit prostaglandin E₂, který je produkován ve velkém množství fetální částí ovčí placenty a který by měl regulovat utero-fetální krevní průtok tak, aby působil opačným efektem na mateřské a fetální straně placenty. Tím by došlo k normalizaci perfuzně/perfuzního poměru a pupečnicková krev by byla směřována do lépe perfundovaných oblastí placenty (Rankin, 1976).

Rankin vycházel z výsledků některých starších experimentů. V prvním z nich se autoři zabývali distribucí krevního průtoku mezi mateřské a fetální placentární cévy u březích ovcí a psů (Power et al., 1967). Byly použity makroagregáty albuminu značené radioaktivním izotopem jódu. V prvním případě zvířata dýchala atmosférický vzduch a pak jim byla podvázána větev umbilikální arterie, ve druhém byla vystavena hypoxii (10-12% O₂). V obou případech došlo k vyrovnání distribuce průtoků mezi matkou a plodem, čímž se zvýšila účinnost výměny kyslíku v placentě.

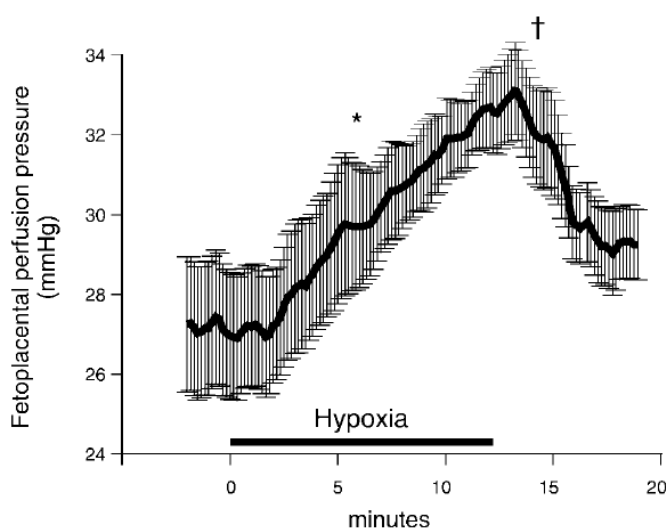
V jiném starším experimentu byla redukce průtoku krve dělohou u ovcí provázena poklesem fetálního průtoku placenty (Stock et al., 1980). Byla tak podpořena myšlenka lokální regulace krevního průtoku placentou, kde krevní průtok fetální částí je závislý na sousední mateřské.

Howard (1987) navazuje na předchozí experimenty a teprve on je prvním, který popisuje, že fetoplacentární cévní rezistence je řízena lokálně a sice reverzibilní hypoxickou fetoplacentární vazokonstrikcí (HFPV), která vzniká jako odpověď na sníženou dodávku kyslíku z mateřské části placenty. Výsledkem je redistribuce fetoplacentárního krevního průtoku z hypoxických do normoxických nebo lépe perfundovaných oblastí placenty. Tento mechanismus funguje proto, aby maximalizoval efektivitu výměny kyslíku, nutrientů a odpadních látek mezi mateřskou a fetální krví. Dojde k preferenční distribuci průtoku krve

do těch oblastí fetální části placenty, které mají odpovídající nejlepší perfuzi i na mateřské straně.

V experimentu na izolovaném, dvojité perfundovaném kotyledonu lidské placenty bylo prokázáno, že HFPV je promptní reakcí (nastává za 2 až 4 minuty po zahájení perfuze perfuzátem syčeného směsí plynů s 94% N₂ a 6% CO₂), reverzibilní do 2 až 4 minut po ukončení akutní hypoxie a opakuje se znovu při opakování hypoxického podnětu (Howard et al., 1987). V pokusu byly použity placenty z nekomplikovaných těhotenství, jako perfuzát byl použit Earlov solný roztok s dextranem.

V pokusu Hampla et al. (2002) HFPV začala během 5 minut po zahájení akutní hypoxie a dosáhla plató tlaku během 10 až 20 minut (Obr. 2.1). Byla ze zhruba 80% reverzibilní během prvních minut reoxygenace. Kvantitativně byla velikost vazokonstrikce vyjádřená rozdílem fetoplacentárního tlaku (za konstantního průtoku) podstatně větší (> 20%) ve srovnání se starším experimentem Howarda (cca 10%) (Howard et al., 1987). Pravděpodobně to bylo způsobené optimalizací experimentálních podmínek.



Obr. 2.1 - Hypoxická fetoplacentární vazokonstrikce v izolovaném, perfundovaném kotyledonu lidské placenty (Hampl et al., 2002). Perfuzní tlak byl významně vyšší v 6.minutě hypoxie než na začátku hypoxie (* $p < 0,05$). Perfuzní tlak byl významně nižší ve 2.minutě reoxygenace než na vrcholu odpovědi na akutní hypoxii († $p < 0,05$, párový t-test).

Ramasubramanian et al. (2006) se zabýval účinkem složení hypoxické směsi v perfuzátu (0%, 5%, 12% a 15% koncentrace O₂ v 5% CO₂ a N₂) na změny tlaku v umbilikální arterii. Zjistil, že velikost HFPV závisí na stupni hypoxie a je nepřímo úměrná procentuálnímu zastoupení kyslíku v sytící směsi plynů.

HFPV byla experimentálně prokázána i na perfundované placentě laboratorního potkana (Jakoubek et al., 2008) - kvalitativně byla odpověď (měřená jako změna perfuzního tlaku za konstantního průtoku) podobná jako v izolovaném kotyledonu lidské placenty (Hampl et al., 2002), kvantitativně byly ale odpovědi u kontrolních potkanů relativně menší

(o cca > 6%) ve srovnání s předchozími pokusy na izolovaném kotyledonu lidské placenty (Hampl et al., 2002). Lze to vysvětlit tím, že u potkana šlo o HFPV celé placenty a nikoliv jen izolované části; pro lidskou placentu mohl dále porod představovat trauma s možnými následnými neznámými fyziologickými změnami.

Na základě elektrofyzilogických měření bylo prokázáno, že (stejně jako v případě plic) vazokonstrikce jako reakce na hypoxii probíhá v placentě v malých rezistentních cévách, zatímco zcela chybí ve velkých cévách (Hampl et al., 2002). Vysvětlením by mohlo být to, že parenchym placenty odpovídá na hypoxii uvolněním konstričních faktorů, které následně zvyšují cévní tonus. HFPV tudíž nevznikne, pokud se velké cévy izolují ve vodní lázni tak, jak tomu bylo v pokusu (Hampl et al., 2002). Byla popsána i dilatace velkých cév v odpovědi na hypoxii (Figuroa et al., 1993).

V plicích mechanismus HPV spočívá v převedení informace o hypoxii od senzoru až k efektoru, který nakonec zajistí výsledný účinek, tj. vazokonstrikci. Dle současného výzkumu, blíže např. viz review (Weir a Olschewski, 2006), je senzorem změna tzv. redoxního potenciálu, kdy hypoxie posune poměr oxidovaných forem k redukovaným ve prospěch forem redukovaných (molekuly jako glutathion, GSH/GSSG nebo NADH/NAD), a/nebo útlum oxidativní fosforylace. Hypoxickou plicní vazokonstrikci pak zajišťuje: 1. inhibice funkce a exprese O_2 senzitivních draslíkových kanálů, zejména jejich podskupiny řízených napětím, což vede ke změně membránového potenciálu - depolarizaci buňky hladkého svalu periferních plicních arteriol, 2. otevření napěťově řízených vápníkových kanálů typu L (jako výsledek inhibice draslíkových kanálů nebo jako primární děj), 3. uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula buňky hladkého svalu přes ryanodinový (RyR) a inositol-trisfosfátový (IP_3) senzitivní receptor, a za 4. Ca^{2+} senzitivizace zahrnující Rho kinázu.

Krátce se zmíníme o nomenklatuře draslíkových kanálů. Je to důležité pro vysvětlení mechanismu HFPV. Studie analyzující jejich strukturu (Hebert et al., 2005) hovoří o existenci tří velkých tříd. První třídu tvoří kanály, jejichž podjednotky mají šest či sedm transmembránových segmentů a jeden pór. Patří sem např. napětím ovládané draslíkové kanály (K_v) a draslíkové kanály aktivované vápníkem (K_{Ca} , též starším názvem BK_{Ca}). Druhou třídou jsou kanály nazývané „inward rectifier channels“ (K_{ir}). Jejich podjednotky mají dva transmembránové segmenty a jeden pór. Tato skupina zahrnuje kanály citlivé na ATP (K_{ATP}). Poslední a nejrozmanitější třídou jsou „two pore“ kanály (2-P). Jejich podjednotky mají dva póry a čtyři transmembránové segmenty.

Nyní se budeme věnovat řídicím mechanismům HFPV.

V práci Hampla et al. (2002) se vycházelo z analogie placentárního řečiště s plicním a předpokládaly se podobné mechanismy HFPV jako ty, které zodpovídají za HPV. Byly vypreparovány fetoplacentární arterie z fyziologických těhotenství a z cév vyizolována frakce proteinů, která obsahovala proteiny K_v kanálů. Po předchozím elektroforetickém rozdělení na polyakrylamidovém gelu byly pomocí specifických protilátek metodou imunoblottingu identifikovány jednotlivé typy kanálů. V placentě byly prokázány napětově řízené draslíkové kanály K_v 1.5, K_v 2.1 a K_{Ca} 1.1, naopak nebyl prokázán kanál K_v 1.2.

V plicních cévách snížení parciálního tlaku kyslíku inhibuje jeden nebo více draslíkových kanálů, což způsobuje depolarizaci membrány, aktivaci Ca^{2+} kanálu v sarkolemě, influx Ca^{2+} a následnou vazokonstrikci. Hampl předpokládal, že se O_2 senzitivní draslíkové kanály podílí i na mechanismu HFPV (Hampl et al., 2002). Izolovaný perfundovaný kotyledon lidské placenty zakanyloval z mateřské i fetální části a perfundoval Earlovým solným roztokem při konstantním průtoku. Perfuzát byl syčený směsí plynů s 40% O_2 , 5% CO_2 a 55% N_2 . Hypoxická vazokonstrikční odpověď byla vyvolána výměnou směsi plynů sytící perfuzát za 95% N_2 a 5% CO_2 . Prokázal, že hypoxie v placentě inhibuje podobně jako v plicích jen některé členy velké rodiny napětově řízených draslíkových kanálů. Specifická farmakologická inhibice těchto kanálů vedla k poznání, který z nich se účastní klidového membránového napětí a který z nich se podílí na vzniku HFPV. V pokusu po ověření viability preparátu podáním angiotensinu II do fetálního oběhu a po provedení 20minutového akutně hypoxického podnětu byl do perfuzátu přidán specifický inhibitor K_v kanálů 4-aminopyridin (4-AP). Došlo ke statisticky signifikantnímu vzestupu perfúzního tlaku podobné velikosti jako při akutní hypoxii. Hypoxický podnět aplikovaný v přítomnosti 4-AP již další zvýšení tlaku nevyvolal. Naproti tomu dodatečné podání angiotensinu II ano. Potlačení HFPV v přítomnosti 4-AP tedy nebylo v důsledku dosažení maxima vazokonstrikce. Selektivní blokátor K_{Ca} kanálů iberiotoxin neměl vliv na bazální tlak a pouze částečně redukoval HFPV. Hypoxická inhibice K_v kanálů tedy hraje klíčovou roli v mechanismu HFPV. Dojde při ní k depolarizaci buňky hladkého svalu cév. To vede k otevření napětově řízených vápníkových kanálů a k influxu Ca^{2+} iontů. Jejich zvýšená koncentrace v cytoplasmě působí vazokonstrikci. Vápníkem řízené draslíkové kanály (K_{Ca}) se rovněž účastní mechanismu HFPV, jejich podíl je však podstatně menší. Měření metodou patch-clamp nepotvrdilo podíl K_{ir} kanálu (použitím jejich inhibitoru BaCl) ani ATP senzitivních draslíkových kanálů (K_{ATP}) (jejich inhibicí glyburidem) na HFPV.

Také v jiném pokusu byla prokázána pomocí RT-PCR přítomnost napěťově řízených draslíkových kanálů v lidské placentě - K_v 2.1, K_v 9.3, BK_{Ca} , K_{ir} 6.1 (K_{ATP}) a TASK 1 (Wareing et al., 2006). Malé arterie a vény choriové ploténky byly zkoumány pomocí myografu za podmínek různého parciálního tlaku kyslíku s použitím selektivních blokátorů zmíněných kanálů, tj. 4-AP pro K_v kanály, iberiotoxinu pro BK_{Ca} kanály, glibenklamidu pro K_{ATP} kanály, anandamidu pro TASK 1 kanály a agonisty pro K_{ATP} kanály pinacidilu. K porovnání cévní reaktivity byla podávána vzestupná koncentrace tromboxanového mimetika U-46619. S podáním 4-AP byl zvýšený bazální tonus fetoplacentárních cév, potencovaný zvyšující se koncentrací mimetika. Iberiotoxin nezměnil bazální tonus ani reaktivitu. Po podání pinacidilu došlo k poklesu cévního tonu i ke snížení odpovědi na mimetikum.

Dalším z možných mediátorů, který se účastní mechanismu HFPV, by mohl být oxid dusnatý (NO). Jde o významný regulátor tonu a proliferace komponent cévní stěny. Kvůli absenci inervace lze v placentě očekávat prominentní úlohu právě lokálních působků jako NO. Oxid dusnatý je tvořen v endotelu přeměnou L-argininu na L-citrulin enzymem NO syntázou (NOS). Existuje jedna inducibilní forma NO syntázy a dvě formy konstitutivní: endoteliální a mozková. Pro regulaci cévního tonu je důležitá endoteliální NOS (eNOS). Tvoří menší množství oxidu dusnatého, které je regulováno hlavně intracelulární koncentrací Ca^{2+} . Inducibilní NO syntáza je nezávislá na kalciumu a kalmodulinu. Je exprimována hlavně makrofágy ale i jinými buňkami (např. chondrocyty, neutrofilů, hepatocytů, hladkými svalovými buňkami) po stimulaci zánětlivými cytokiny nebo lipopolysacharidem cévní stěny. V plicích působí NO vazodilataci aktivací cytoplazmatické formy guanylátcyklázy a následným zvýšením intracelulární hladiny cGMP. Jeho produkce v plicním oběhu stoupá při HPV (Hampl et al., 1995) i při chronické hypoxické plicní hypertenzi. V plicním oběhu podání specifického inhibitoru NO syntázy N-nitro-L-arginin metylesteru (L-NAME) potencovalo hypoxickou plicní vazokonstrikci (Isaacson et al., 1994).

NOS je také součástí endotelu mateřské i fetální části placenty (Myatt et al., 1993). Možností zapojení NO při HFPV se zabýval ve své práci Byrne et al. (1997). Ověřoval hypotézu, že HFPV je způsobena sníženou produkcí NO. Použil preparát izolovaného, dvojité perfundovaného kotyledonu lidské placenty. Experiment byl proveden ve dvou po sobě jdoucích obdobích - v kontrolním a v intervenčním. Placenta byla z mateřské i fetální části perfundována Earlovým solným roztokem syceným směsí 95% O_2 a 5% CO_2 . V obou obdobích byly dělohy po dobu 20 minut vystaveny akutní hypoxii tak, že perfuzát byl sycen směsí 94% N_2 a 6% CO_2 . V kontrolním období byly všechny placenty perfundované

standardním médiem, v intervenčním období bylo buď pokračováno v této perfuzi, nebo do společného perfuzního roztoku byl přidán samotný blokátor L-NAME, nebo samotný nitroglycerin, nebo kombinace L-NAME a nitroglycerin. Po přidání samotného L-NAME se významně zvýšil fetoplacentární tlak a další hypoxická odpověď byla zcela zablokována. Přidání samotného nitroglycerinu ani kombinace L-NAME a nitroglycerinu na perfuzní tlak nemělo vliv, ale také již nedošlo ke zvýšení tlaku při akutní hypoxii.

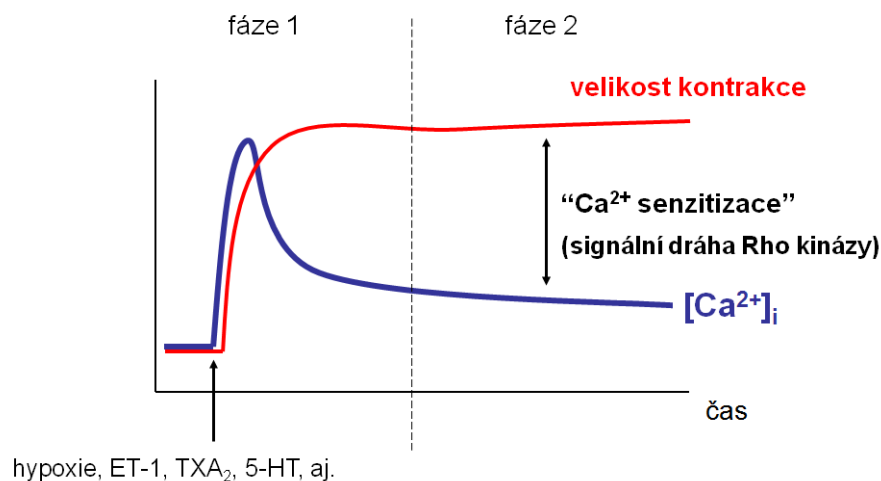
Ovšem možné zapojení NO v mechanismu HFPV je sporné. Hampl ve své práci (Hampl et al., 2002) dospěl ke zcela opačnému výsledku - zablokování produkce NO sice také vedlo k vazokonstrikci při normoxii, ale zablokování HFPV vůbec nenastalo. Vysvětluje to možnou stálou bazální, "tonickou" produkcí NO, jejíž inhibice zvyšuje cévní tonus a která není ovlivněna během akutní hypoxie. Hampl dále poukazuje na mnohem vyšší koncentraci blokátoru použitou ve studii Byrneho (0,3 mM) (Byrne et al., 1997) oproti své studii (50 μ M) (Hampl et al., 2002) a na nižší dosažený parciální tlak kyslíku ve výtokové kanyle při akutní hypoxii v Byrneho studii, což by mohlo vést k diskrepanci ve výsledcích navzájem mezi těmito dvěma studiemi.

Jedním z dalších možných faktorů ovlivňující hypoxickou vazokonstrikci fetoplacentárních cév by mohla být signální dráha Rho kinázy.

Vraťme se opět k plicním cévám a věnujme nejprve pozornost roli vápníku při hypoxické plicní hypertenzi. Kontrakce hladké svalové buňky je obecně zprostředkována zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). U izolovaných plicních cév je průběh zvýšení tlaku při akutní hypoxii bifázický (Leach et al., 1994; Obr. 2.2). První fází je rychlá vazokonstrikce charakterizovaná prudkým vzestupem $[Ca^{2+}]_i$ úměrnému snížení parciálního tlaku kyslíku. Následuje postupné snížení $[Ca^{2+}]_i$ a jeho ustálení na určité hodnotě plató, která je ale stále vyšší než normoxická klidová hodnota (Robertson et al., 1995). Pomalá vazokonstrikce během této druhé fáze je zprostředkována zvýšením citlivosti (senzitivity) k Ca^{2+} . V první fázi dochází k mobilizaci Ca^{2+} z intracelulárních zásob prostřednictvím ryanodinových (RyR) a inositol-trisfosfátových (IP_3) receptorů na sarkoplazmatickém retikulu (Weigand et al., 2005). Ve druhé, setrvalejší fázi hypoxické plicní vazokonstrikce dochází k influxu Ca^{2+} z extracelulárního prostředí, který je aktivovaný prostřednictvím napěťově řízených vápníkových kanálů v buněčné membráně (voltage-operated calcium channels, VOCC) nebo poklesem zásob vápníku v sarkoplazmatickém retikulu (store-operated calcium channels, SOCC). SOCC kanály přímo přispívají nejen ke zvýšené $[Ca^{2+}]_i$, ale zajišťují i opětovné plnění sarkoplazmatického retikula vápníkem (kapacitivní influx vápenatých iontů). Tyto kapacitivní kanály zřejmě náleží do rodiny TRP (transient receptor potential).

Názory o tom, zda je při HPV hlavní zdroj Ca^{2+} intra či extracelulární ale dosud nejsou jednotné (Sylvester et al., 2012).

Existují dva typy napětově řízených vápníkových kanálů v buněčné membráně - T (tranzientní) a L (dlouhodobé, long-lasting). Byla prokázána významná role kanálů typu L při HPV. Selektivní antagonisté těchto kanálů (např. dihydropyridiny) blokují nebo snižují intracelulární koncentraci vápníku při hypoxii.



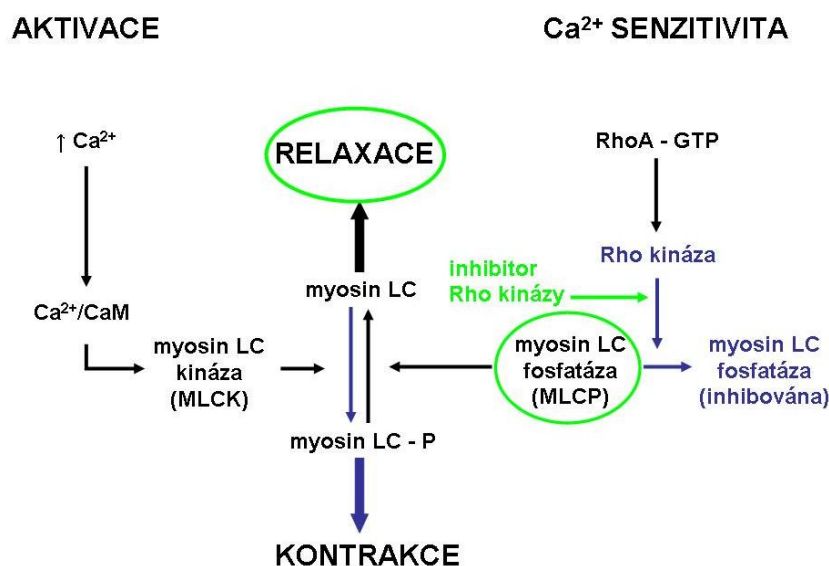
Obr. 2.2 - Dvě fáze hypoxické plicní vazokonstrikce. Obě se vyznačují zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), ale jsou zprostředkovány různými mechanismy.

Kontrakce hladké svalové buňky může být regulována dvěma způsoby (Somlyo a Somlyo, 1994) (Obr. 2.3). Při zvýšené intracelulární koncentraci se vápník váže na kalmodulin, společný komplex Ca^{2+} -kalmodulin se naváže na kinázu lehkého řetězce myosinu (MLCK). Dojde k aktivaci kinázy a ta katalyzuje fosforylaci serinu 19 regulačního lehkého řetězce myosinu (myosin LC → myosin LC-P). Fosforylace způsobuje pohyb hlavy myosinu, která se díky tomu ocitá v kontaktu s aktinem, zároveň stimuluje adenosintrifosfátázovou aktivitu. ATP se štěpí za uvolnění energie, která je využita k vzájemnému posunu aktinových a myosinových filament a tím ke kontrakci hladké svalové buňky.

Zvýšená fosforylace serinu 19 nemusí být pouze důsledkem aktivace MLCK, ale také důsledkem sníženého odbourávání fosforylovaného myosinu při inhibici fosfatázy lehkého řetězce myosinu (MLCP). Míra fosforylace lehkých řetězců myosinu (a tedy velikost tonu cévy nebo vazokonstrikce) je dána rovnováhou aktivity těchto dvou enzymů. MLCK

fosforyluje lehký řetězec myosinu a tím působí vazokonstrikci. MLCP odštěpuje fosfát z lehkého řetězce myosinu a tím brání konstrikci a působí vazodilataci.

Zvýšení kontraktility při dané konstantní hladině intracelulárního vápníku je nazýváno vápníková senzitivace. Senzitivita (citlivost) hladké svalové buňky k vápníku je definována jako vztah mezi $[Ca^{2+}]_i$ a velikostí kontrakce (Obr. 2.2). Kontrakce hladké svaloviny cév je tedy obecně vyvolána buď aktivací MLCK či vápníkovou senzitivací (Obr. 2.3). MLCK je v konečném důsledku aktivována zvýšením $[Ca^{2+}]_i$ při hypoxii. Kontraktilní stav buňky hladké svaloviny cévy je tedy dán dynamickou rovnováhou mezi fosforylací (enzym MLCK - vede ke kontrakci) a defosforylací (enzym MLCP - vede k relaxaci) lehkého řetězce myosinu (myosin LC).



Obr. 2.3 - Ca^{2+} aktivace kalmodulinem (CaM) a Ca^{2+} senzitivace. Kontraktilní stav buněk hladké svaloviny cév je dán dynamickou rovnováhou mezi fosforylací a defosforylací lehkého regulačního řetězce myosinu (myosin LC). Tuto rovnováhu zajišťují kináza lehkého řetězce myosinu (MLCK) a fosfatáza lehkého řetězce myosinu (MLCP).

Rho kináza (ROCK) je klíčovým enzymem vápníkové senzitivace (Uehata et al., 1997). Jde o serin/threonin kinázu, která je aktivována malou monomerní GTPázou RhoA. Inhibuje aktivitu enzymu MLCP (Fukata et al., 2001), který MLC defosforyluje. MLCP není závislá na $[Ca^{2+}]_i$.

Rho kinázy mají v organismu mnoho funkcí a mohou přispívat k různým fyziologickým a patologickým stavům v buňkách (např. hypertenze, vazospazmy cerebrálních i koronárních cév, astma bronchiale nebo endoteliální dysfunkce). Hrají klíčovou

roli ve stavech přetrvávající kontrakce hladkých svalových buněk, vazokonstrikci nebo při tvorbě strukturálních komponent buněk. Existují dvě isoformy těchto enzymů: ROCK I (β) a II (α).

Řada studií potvrdila významnou roli Rho kinázy při hypoxii v plicním řečišti. Při akutní HPV inhibice Rho kinázové signální dráhy zrušila inhibici MLCP, což vedlo k defosforylaci lehkých řetězců myosinu a tudíž k relaxaci hladké svaloviny (Wang et al., 2001). Bylo také prokázáno signifikantní oslabení HPV v izolovaných perfundovaných myších plicích po podání specifického inhibitoru Rho kinázy (Y-27632) (Fagan et al., 2004).

Nyní se zaměříme blíže na podíl Ca^{2+} v mechanismu HFPV. Jakoubek et al. (2006) se zabýval objasněním podílu extracelulárního Ca^{2+} . Vycházel z hypotézy depolarizace buněčné membrány hladkého svalu snížením aktivity draslíkových kanálů a následné aktivaci napětím řízených vápníkových kanálů typu L a průniku Ca^{2+} do buňky. Potvrdil tuto hypotézu - podáním selektivního inhibitoru těchto kanálů nifedipinu zcela zablokoval HFPV. Naproti tomu v kontrolní skupině velikost HFPV ovlivněna nebyla. Již v předchozích pracích byla prokázána přítomnost L typu napětově řízených vápníkových kanálů (rodiny Ca_v1) v buněčné membráně lidských fetoplacentárních cév (Hampl et al., 2002). Pokus prováděl na izolovaném, dvojité perfundovaném kotyledonu lidské placenty. Autoři připustili, že vzhledem k přítomnosti mnoha molekul vážících Ca v cytoplazmě by se extracelulární Ca^{2+} vstupující skrze kanály nemusely dostat až ke kontraktilnímu aparátu, který je relativně značně vzdálen od plasmatické membrány, v dostatečném množství. Dostatek vápníku na uskutečnění kontrakce by tak mohlo zajistit jeho sekundární uvolnění ze sarkoplasmatického retikula vyvolané vtokem vápníku přes kanály L typu v buněčné membráně. Vychází se z analogie plicních cév, kde byla prokázána pomocná role sarkoplasmatického retikula na hypoxické kontrakci buňky hladkého svalu, v literatuře ale panuje nejednotnost, zda je při HPV hlavní zdroj vápenatých iontů intra či extracelulární (Sylvester et al., 2012). Deplece zásob vápníku v sarkoplasmatickém retikulu vede aktivací TRP kanálů k influxu Ca^{2+} a opětovnému plnění sarkoplasmatického retikula vápníkem (tzv. kapacitní influx vápenatých iontů). Tyto kanály jsou přítomné v placentárních cévách, ale nejsou citlivé na nifedipin a výsledky pokusu tak nepodporovaly významnou roli TRP kanálů a kapacitního influxu v mechanismu HFPV. Kromě svého hlavního účinku by mohl blokátor vápníkových kanálů ve vyšších dávkách uvolňovat Ca^{2+} ze sarkoplasmatického retikula, avšak vzhledem k úplnému zablokování HFPV v tomto pokusu ve zcela minimální míře, i díky použité velmi malé koncentraci nifedipinu (1nM).

Dalším z možných faktorů, které se mohou účastnit reakce placentárních cév na hypoxii, jsou metabolity kyseliny arachidonové - prostaglandiny, prostacykliny, thromboxany a leukotrieny. Mají celou řadu funkcí, zajišťují buněčnou signalizaci, také ovlivňují kontrakci a relaxaci hladké svaloviny. Hampl se zabýval hypotézou, zda inhibice cyklooxygenázy a tím i produkce vazodilatačních prostaglandinů nemůže ovlivňovat v placentě odpověď na hypoxii (Hampl et al., 2002). Podání blokátoru (meklofenamátu) ale nemělo vliv ani na bazální fetoplacentární perfúzní tlak ani na velikost HFPV. Tento výsledek je konzistentní s výsledkem jiného pokusu, ve kterém zablokování enzymu cyklooxygenázy nemělo vliv na fetální perfúzní tlak a ani nezesilovalo účinek analoga thromboxanu U-46619 v perfundované části lidské placenty (King et al., 1995). Ani v jiném pokusu podání prostacyklinu u ovce in vivo nezpůsobilo významnou změnu fetoplacentárního cévního odporu (Parisi a Walsh, 1989).

Jedním z posledních možných humorálních regulačních činitelů v placentě bude systém renin-angiotensin (RAS). Fetoplacentární jednotka má vlastní RAS se všemi svými součástmi. Podání bolusu angiotensinu II do fetálního oběhu vyvolalo prudkou, reverzibilní vazokonstrikci v izolovaném preparátu dvojité perfundované placenty laboratorního potkana (Jakoubek et al., 2008).

2.2 Vliv chronické hypoxie na fetoplacentární cévy

Časný vývoj lidské placenty (do 8. - 10. týdne těhotenství) probíhá v hypoxických podmínkách (parciální tlak kyslíku pO_2 je 15-20 mmHg nebo $\sim 2\%$ O_2), kdy obstrukcí uteroplacentárních cév je oddělen intervilózní prostor od dělohy. Toto hypoxické prostředí je kritické pro časný embryonální vývoj. V 8. - 10. týdnu gestace následuje endovaskulární invaze. Je známo, že pO_2 tento proces reguluje. S invazí se zvyšuje pO_2 v intervilózním prostoru na 55-60 mmHg ($\sim 8\%$ O_2). Na konci 3. trimestru klesá pO_2 na 40 mmHg jako následek zvyšujících se nároků placenty a plodu (Soleymanlou et al., 2005).

Hypoxie placenty může být způsobená chronickými cévními onemocněními matky (při hypertenzi, diabetu, renálních onemocněních), hypoxémií matky (zejména perzistující maternální hypoxémie ve vysoké nadmořské výšce, těžká plicní či kardiální onemocnění, anémie), poruchami placentace (především abnormální trofoblastická invaze, kalcifikace nebo infarzace) nebo poruchami prokrvení placenty (Brodsky a Christou, 2004). Tato chronická hypoxie je považována za klíčový faktor vzniku preeklampsie u matky a vážných novorozeneckých poruch, zejména intrauterinní růstové retardace (IUGR) (Brodsky a Christou, 2004; Kingdom a Kaufmann, 1997). IUGR plod má prenatální váhový deficit. Jeho váhový odhad (EFW – estimated fetal weight) se vyskytuje pod 10. percentilem pro daný gestační věk a obvod břicha (AC – abdominal circumference) je pod percentilem 2,5 (Peleg et al., 1998).

Vliv chronické hypoxie na placentární cévy je prozkoumán v mnohem menší míře než vliv akutní hypoxie. Lze očekávat, že intrauterinní hypoxie povede k nárůstu fetoplacentárního cévního odporu (podobně jako hypoxická vazokonstrikce v plicích) a následně k placentární hypoperfuzi a tedy zhoršení výživy plodu a zbrždění jeho růstu. Dopplerovským měřením průtoku v umbilikální arterii u matek plodů s IUGR se ve III. trimestru těhotenství zjistila zvýšená fetoplacentární rezistence v porovnání s plody u normálního těhotenství (Arbeille, 1997). Hodnoty pulsatilního indexu PI se zvýšily. Enddiastolický tlak klesl na nulu a v konečných stádiích se registroval dokonce zpětný tok v umbilikální arterii.

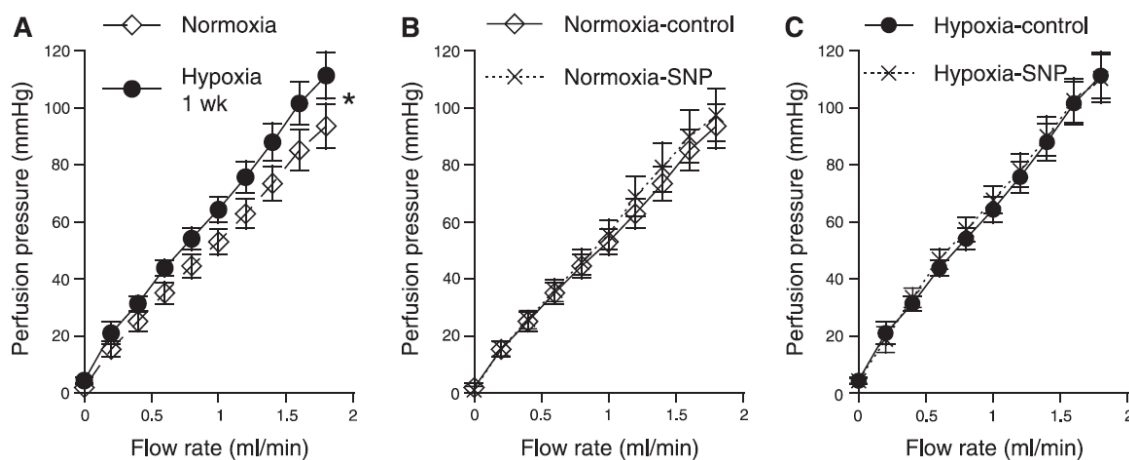
V rozvinutých zemích je incidence IUGR 5-7 % ze všech narozených dětí, v rozvojových zemích až 30%, představuje tedy, zvláště v kombinaci s nedonošeností, velký problém současné neonatální péče (Brodsky a Christou, 2004). Je spojena s významným zvýšením perinatální morbidity (vyšší výskyt bronchopulmonální dysplazie, respiratory

distress syndromu, hypoglykémie, trombocytopenie, nekrotizující enterokolitidy, hyperbilirubinémie a retinopatie) i mortality (Aucott et al., 2004). Nepříznivé důsledky IUGR ale nezůstávají omezeny pouze na dětský věk, ale i v dospělosti vedou k vyššímu riziku diabetu, hypertenze, infarktu, hypercholesterolémie a obezity (Barker et al., 2002). Tato Barkerova hypotéza fetálního původu nemocí předpokládala změnu v programování metabolických a endokrinních procesů související se zpomalením růstu plodu (Barker et al., 2002). Dále bylo zjištěno, že přítomnost prenatální hypoxie ovlivňuje vývoj plicních cév a cévní reaktivitu v dospělosti (Hampl et al., 2000). Je proto překvapující, že vliv chronické hypoxie byl dosud minimálně studován. Její mechanismus působení a možnosti kauzální intervence nejsou zcela jasné.

Dosud v literatuře chyběl vhodný experimentální model, který by potvrdil spojení mezi hypoxií matky na straně jedné a fetoplacentární vazokonstrikcí a podvýživou plodu na straně druhé. Jakoubkova studie se vůbec poprvé v literatuře zabývala vlivem chronické hypoxie na fetoplacentární cévy (Jakoubek et al., 2008). Pokus byl proveden na izolované, dvojitě perfundované placentě laboratorního potkana, přičemž pokusná skupina strávila posledních 7 dní březosti (z celkových 21 dnů) v hypoxické izobarické komoře s 10% O₂. Jako perfuzát byl použit Krebsův roztok, probublávaný normoxickou směsí plynů s 21% O₂, 5% CO₂ a 74% N₂. Po počáteční stabilizaci preparátu bylo provedeno měření závislosti průtoku na tlaku, kdy při základním průtoku 1 ml/min byla na fetální straně nejprve na několik desítek sekund zcela zastavena perfuze, a pak byl postupně průtok zvyšován stupňovitě po 0,2 ml/min až na 1,8 ml/min, kdy každý krok trval cca 2 min. Pak byl do perfuzátu přidán silný vazodilatátor nitroprusid sodný (SNP) a podruhé byl změřena závislost tlaku na průtoku.

Ve druhém pokusu byl preparát stabilizován a poté při bazálním průtoku 1 ml/min byly intervalech aplikovány 3 dávky angiotensinu II za sebou. Pak byl proveden první hypoxický stimulus změnou směsi plynů probublávající perfuzát na 95% N₂ + 5% CO₂. Poté byla vrácena směs plynů zpět na normoxickou a poté byl proveden druhý hypoxický stimulus. Bylo zjištěno signifikantní zvýšení fetoplacentárního tlaku u chronicky hypoxické skupiny ve srovnání s kontrolní normoxickou a to jak při bazální perfuzi, tak při zvyšujícím se průtoku (Obr. 2.4A). Toto zvýšení cévní rezistence při chronické hypoxii bylo alespoň zčásti rezistentní jak vůči akutní reoxygenaci, tak během normoxické perfuze i k podanému vazodilatačnímu SNP – bylo tak vyloučeno, že by se na zvýšeném perfuzním tlaku u hypoxické skupiny podílel zvýšený cévní tonus. Přidání SNP do perfuzátu totiž nezměnilo v kontrolní ani experimentální skupině cévní odpor (Obr. 2.4B, C). Dále bylo zjištěno zvýšení

vasokonstriční reaktivity placentárních cév v chronické hypoxii a to jak v reakci na angiotensin II, tak v odpovědi na akutní hypoxický podnět.



Obr. 2.4 - Vztah tlak - průtok měřený na fetální straně placenty (Jakoubek et al., 2008). Křivka u skupiny s chronickou hypoxií se významně liší od kontrolní skupiny (A). SNP neměl vliv na křivku u normoxické skupiny (B), ani u hypoxické skupiny (C). * $p < 0.05$, ANOVA pro opakovaná měření.

V systémové cirkulaci vede chronická hypoxie k tvorbě nových kapilár a tedy spíše k poklesu periferního odporu. V plicích způsobuje chronická hypoxie plicní arteriální hypertenzi, která je charakteristická trvalou strukturální remodelací stěny cév a kde zvýšení tlaku přetrvává i během akutní reoxygenace (Reeves a Herget, 1984). Na vzniku hypoxické plicní hypertenze se podílí dva základní mechanismy - vazokonstrikce a morfologická přestavba cévní stěny. Vazokonstrikce má na zvýšení cévní rezistence podíl v iniciální fázi vystavení hypoxii, postupem času je významnější fixní, remodelační složka. Mění se stavba cévní stěny, zvětšuje se množství hladkého svalu ve stěně prealveolárních plicních arterií a venul (Reid, 1986), hladký sval v medii hypertrofuje a proliferuje směrem k menším plicním arteriím, při těžších formách plicní hypertenze hladký sval proliferuje až do intimy. Je zvýšen metabolický obrat bílkovin pojivové tkáně a dochází k fibróze převážně adventicie a také medie (Bishop et al., 1990). Hemodynamickým následkem morfologické přestavby je zúžení lumen a snížení poddajnosti periferních plicních cév.

Zatímco v plicním cévním řečišti nastávají chronickým působením hypoxie morfologické změny stěny cév se zvýšením arteriálního tlaku a vznikem hypoxické plicní hypertenze, působení chronické hypoxie na fetoplacentární cévy bylo popsáno jako uteroplacentární ischemie s trvalým snížením nebo zastavením fetálního krevního průtoku do chronicky hypoxických oblastí se zvýšením fetoplacentární cévní rezistence (Howard,

1987). Vzhledem ke kolaterálnímu průtoku krve v placentě zde zvýšená fetoplacentární rezistence vyústí v redukci průtoku krve spíše než k hypertenzi (jak je tomu při sériovém průtoku v plicích). Bude pravděpodobné, že u fetoplacentárních tepen může dojít k remodelaci stěn podobně, jako k tomu dochází u plicních tepen v případě hypoxické plicní hypertenze.

Teprve nedávný výzkum (Hvizdošová - Kleščová et al., 2013) potvrdil trvalé strukturální změny cévní stěny chronicky hypoxických placent - signifikantní zúžení vnitřních průměrů intraplacentárních (prelabyrinthních) arterií (IPA) i arterií choriové ploténky (CPA) u obou pohlaví a nepravidelně zesílené sektory arteriálních stěn IPA pouze u samců odpovídající ztluštění tunica adventitia. V pokusu byli použiti březí potkani, kteří strávili celkem 14 dnů (6. - 19. den březosti) v hypoxii (10% O₂) v hypoxické izobarické komoře. Po vyjmutí z komory byla zvířata usmrcena a placenty vypreparovány. Řezy placenty byly fixovány formalínem a histochemicky zpracovány. Morfometricky byly zhodnoceny počty CPA i IPA. Byla posouzena také tloušťka jejich stěny a vnitřní průsvit. Počet CPA na jednom řezu byl u hypoxických placent signifikantně nižší jak u samčích, tak samičích placent. V počtu IPA na jednom řezu se hypoxické a normoxické placenty nelišily. Vnitřní průměry u CPA i u IPA byly u hypoxických placent významně menší u obou pohlaví. Světelnou a emisní elektronovou mikroskopií byla zkoumána tunica media a adventitia. Nepravidelná ztluštění a ztenčení arteriálních stěn tvořila nahromadění vláknité (kolagenní a retikulární) i amorfní složky mezibuněčné hmoty. Morfologický obraz se podobal znakům při fibromuskulární dysplazii cévní stěny, zejména fibroplazii adventicie. V placentárním labyrintu nebyla ve stěně cév nalezena téměř žádná hladká svalová vlákna, lze ale spíše uvažovat o významu pericytů (jako kontraktálních elementů), které byly u arteriol četně přítomny. Uvedený morfologický nález je v souladu s fyziologickým měřením (Jakoubek et al., 2008) a alespoň částečně by vysvětloval pozorované zvýšení fetoplacentárního cévního odporu při chronické hypoxii.

V lidských hypoxických placentách, pocházejících s vysoké nadmořské výšky, byla popsána nižší četnost buněčných elementů (pericyty nebo hladké svalové buňky) v dilatovaných fetoplacentárních kapilárách (Zhang et al., 2002). Reakce arterií a kapilár na hypoxii se tedy zdá být odlišná.

Placenty růstově retardovaných plodů vykazují pod elektronovým mikroskopem morfologické změny - ztluštění cévní stěny terciálních kmenových klků, zúžení průsvitu, klky jsou štíhlé, méně větvené a se zvýšenými depozity kolegeny a lamininu ve stromatu. Tyto změny by mohly přispívat ke zvýšení cévního odporu.

Přesné anatomické umístění místa zodpovědného za regulaci fetoplacentární perfuze není stále jasné. Je možné, že leží mezi klky kmenovými a terminálními (Poston et al., 1995), přičemž signifikantně větší množství hladkých svalových buněk, identifikovaných nikoli světelnou, ale transmisní elektronovou mikroskopií, obsahují pouze stěny cév v kmenových klcích a jejich bezprostředním větvení, což u laboratorního potkana odpovídá intraplacentárním arteriím. Množství hladkých svalových buněk bylo také popsáno ve stěnách lidských arterií choriové ploténky, měly dobře vyvinuté endoplazmatické retikulum, hůře vyvinutá myofilamenta, chyběla lamina elastica interna (Sweeney et al., 2006).

Matka a plod tvoří rovnocennou součást fetoplacentární jednotky, a proto je nutné pro úplnost tohoto přehledu se zde ještě zmínit o aspektech placentace a poruchách uteroplacentárního řečiště. Toto téma je v literatuře dobře popsáno a již bylo zmíněno v úvodu. Při fyziologickém těhotenství trofoblastická invaze do deciduy způsobuje, že průměr spirálních arterií vyplňuje intervilózní prostor a tyto artérie ztrácí hladkou svalovinu, elastické laminy a kontraktilitu. Jde o tzv. konverzi či remodelaci spirálních arterií. Je klíčem k úspěšnému těhotenství. Probíhá ve dvou vlnách. Začíná v 8. týdnu gravidity a kompletní je přibližně v 18. týdnu. Patologická remodelace, tzn. mělká invaze fetálními trofoblasty v mateřských spirálních artériích, způsobí přetrvávání hladké svaloviny a schopnosti kontraktility, tedy selhání konverze, což vede k redukci uteroplacentární perfuze a vzniku placentární hypoxie (Kingdom a Kaufmann, 1997). Snížená perfuze byla spojena se zvýšením zánětlivých procesů, oxidačního stresu a infarktů placenty. Nedostatek konverze je považován za jeden z důvodů nedostatečné výživy a oxygenace plodu a s tím spojených komplikací jako je preeklampsie a IUGR. V důsledcích dominuje v poškození reologie placentárních cév více než chronická hypoxie (Burton et al., 2009). Mateřská cévní onemocnění, zmíněná na začátku kapitoly, rovněž snižují uteroplacentární perfuzi a mohou být příčinou IUGR.

V případě preeklampsie nelze jednoznačně určit, zda se jedná o důsledek nebo příčinu placentární hypoxie (nebo obojí). Experimentálně byla srovnána globální exprese genů v placentách matek, které prožily těhotenství a porodily ve vysoké nadmořské výšce, s tkáňovými kulturami placent kultivovaných za hypoxických (3% O₂) i normoxických (21% O₂) podmínek (Soleymanlou et al., 2005). Dále byly srovnány placenty pacientek postižených preeklampií s oběma zmíněnými typy tkáňových kultur. Výsledky ukázaly podobnost globální genové exprese mezi oběma modely placentární hypoxie (in vivo a in vitro) s preeklamptickými placentami.

O působení chronické hypoxie na uteroplacentární cévy máme poměrně dostatek informací. Placenty matek žijících ve vysoké nadmořské výšce představují experimentální

model placentární hypoxie. Morfologicky mají placenty matek pocházejících z vysokých nadmořských výšek také snížený počet remodelovaných cév stejně jako placenty plodů s IUGR (Tissot van Patot et al., 2003). Dále mají tyto placenty zvýšenou vaskularizaci klků a větší průměr kapilár v klcích, což pravděpodobně slouží jako kompenzatorní mechanismus při hypoxii. Tyto změny by podle očekávání měly spíše snížit než zvýšit odpor na úrovni kapilár. Tyto změny ale nemusí odrážet změny v odporové části řečiště. Globální zvýšení odporu prokázané Jakoubkem (Jakoubek et al., 2008) by mohlo být na úrovni rezistentních arteriol. Jejich změny při chronické hypoxii bohužel nejsou známy. Při chronické plicní hypertenzi je průměr lumen odporových arteriol snížený navzdory vyšší kapilaritě (Farber a Loscalzo, 2004).

Roli v regulaci placentace hraje roli mimojiné také rodina transkripčních faktorů HIF (hypoxia-inducible factor) (Zamudio et al., 2007b). Jde o molekulární senzor v trofoblastu, který registruje změny parciálního tlaku kyslíku. Skrze svou transkripční aktivitu řídí zásadní procesy placentace - erytropoezu a angiogenezu. Skládá se z heterodimerů složených z jedné nebo třech α podjednotek (HIF-1 α , HIF-2 α a HIF-3 α) a β podjednotky označované jako aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT). Aby se stal komplex funkční, musí se obě podjednotky spojit. Degradace HIF-1 α proteinu je inhibována při hypoxii, protein se hromadí se v jádře, kde je navázán na ARNT. Při normoxii je HIF-1 α protein naopak rychle rozložen a/nebo inaktivován. U preeklampsie i v placentách pocházejících z vysoké nadmořské výšky, tedy při stavech placentární hypoxie, byla prokázána dysregulace HIF regulovaných proteinů. Byla prokázána zvýšená exprese HIF-1 α v placentách pocházejících z nadmořské výšky > 2700 m n.m. (Zamudio et al., 2007b). Na zvýšeném oxidačním stresu se z rodiny HIF proteinů podílí HIF-2 α .

Důležité místo v utero a fetoplacentární cirkulaci a ve vývoji plodu má peptid endothelin (Paradis a Zhang, 2013). Endothelin-1 (ET-1) je nejsilnější současně známou vazokonstrikční látkou, hraje roli v placentě v odpovědi na hypoxii a podílí se na uzavření ductus arteriosus po narození. Nadměrná exprese ET-1 byla pozorována u preeklampsie v těhotenství a při IUGR u plodů i matek.

Řídící mechanismy vlivu chronické hypoxie na fetoplacentární řečiště nejsou známy. Zvýšení cévní rezistence fetoplacentárního oběhu vlivem chronické hypoxie nelze vysvětlit jednoduchou hypoxickou vasokonstrikcí, neboť do určité míry přetrvává i po obnovení normálního tlaku okolního prostředí (Jakoubek et al., 2008). Pravděpodobná je účast podobných faktorů, které hrají roli i při chronické hypoxické plicní hypertenzi. Zahrnují radikálové poškození stěn cév reaktivními sloučeninami kyslíku a dusíku s následnou

akumulací extracelulární matrix, zprostředkovanou částečně žírnými buňkami, Rho kinázou zprostředkovanou vápníkovou senzitivací, NO, zvýšení množství žírných buněk, zvýšení aktivity chymázy a markerů zánětu, produkci reninu žírnými buňkami s následnou aktivací renin-angiotensinového systému, depolarizaci membrány buňky při poklesu aktivity některých draslíkových kanálů anebo změny v serotoninové signalizaci (Jakoubek et al., 2008).

Nyní se budeme věnovat blíže jednotlivým patofyziologickým mechanismům působení chronické hypoxie na fetoplacentární cévy.

NO je nestabilní radikál a velmi účinný vazodilatátor, který hraje významnou roli v regulaci tonu systémového řečiště. Při expozici chronické hypoxii v iniciální fázi chronické plicní hypertenze roste syntéza NO v plicích při zvýšení inducibilní NO syntázy, ve vydechaném vzduchu laboratorních potkanů byl naměřen významný vzestup koncentrace NO během prvního týdne expozice chronické hypoxii (Hampl et al., 2006). NO zde může mít dva protikladné účinky - vazodilatační a antiproliferativní účinky mohou omezovat rozsah elevace plicní cévní rezistence a/nebo může přispívat k oxidačnímu poškození stěn plicních cév, což může zahájit jejich morfologickou remodelaci (Hampl et al., 2006). Ve fetoplacentárních cévách se předpokládá, že za fyziologických podmínek udržuje bazální produkce závislá na aktivitě endoteliální NO syntázy nízký cévní tonus. Při hypoxii byla prokázána snížená produkce endoteliální NO syntázy (Bíbová et al., 2005), což by mohlo přispívat ke zvýšení cévního odporu a snížení průtoku placentou při chronické hypoxii. Potkan byl v této studii vystaven hypoxii (10% O₂) v hypoxické izobarické komoře posledních 10 dnů březosti. Expres eNOS byla imunodetekována králičí protilátkou a kvantifikována denzitometrií. Endoteliální NO syntáza hraje u potkana významnou roli zhruba až do 19. dne březosti, kdy je její vliv převyšena inducibilní NO syntázou, která může hrát roli při narůstající hypoxii v placentě podobně jako v plicích.

Úloha Rho kinázy v regulaci senzitivity k vápníku v hladké svalové buňce plicních cév je v úvodu již popsána. Dosud existuje pouze málo literárních údajů, které nastiňují roli Rho kinázové signální dráhy v placentárních cévách při normálním i patologickém těhotenství. Friel et al. (2008) zkoumal metodou RT-PCR hladinu exprese mRNA Rho kináz na vzorcích zdravých placent a srovnal je se vzorky placent žen postižených preeklampií. Dále zkoumal, zda vliv isoprostanů na odpor placentárních a myometrálních cév je zprostředkován Rho kinázami. Vycházel z myšlenky, že Rho kinázou zprostředkovaná vápníková senzitivace je spojena s přetrvávající kontrakcí hladkého svalu. Stejně tak při preeklampsií dochází k intenzivní a setrvalejší vazokonstrikci. Naměřil významně vyšší

expresi mRNA Rho kináz z preeklamptických placent ve srovnání s kontrolními. Zjistil, že vazokonstrikční vliv isoprostanů byl antagonizován inhibitorem Rho kinázy (Y-27632) pouze v placentárních cévách, nikoli v myometrálních. Rho kinázová dráha tedy pravděpodobně stojí za modulaci placentárních cév u preeklampsie. V jiné práci (Ark et al., 2005) byla prokázána zvýšená exprese isoenzymu ROCK II v buňkách syncytiotrofoblastu placent rodiček s preeklampsií, což by mohlo přispívat k etiologii nebo patogenezi této patologie.

Expozice hypoxií vede k oxidativnímu poškození, které je způsobeno peroxidací lipidů. V časných fázích expozice hypoxii se tvoří v izolovaných buňkách různých tkání včetně buněk endotelu reaktivní formy kyslíku (ROS), což je skupina radikálů, která zahrnuje superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový anion. V periferních plicních cévách je poškození radikály příčinou zvýšení jejich tonu, oxidační poškození stěny prealveolárních cév je navíc příčinou jejich strukturální přestavby (Novotná a Herget 2002). Nabízí se paralela, že i v placentách bude chronická hypoxie zvyšovat oxidační stres. Vanderlelie et al. (2005) zkoumal ze vzorků normálních a preeklamptických placent tkáňové hladiny endogenních antioxidačních proteinů (superoxiddismutázy, glutathionperoxidázy, thioredoxinreduktázy a thioredoxinu) a stupeň peroxidace lipidů a oxidace proteinů. Prokázal sníženou antioxidační schopnost a zvýšenou peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů u preeklamptických placent.

V jiném pokusu byly srovnány placenty matek pocházejících z vysoké nadmořské výšky (3100 m n.m.) s kontrolními (z výšky 1600 m n.m.) (Zamudio et al., 2007a). Jako míra oxidačního stresu se měřila oxidace proteinů a peroxidace lipidů. Jako markery antioxidační aktivity sloužila aktivita superoxiddismutázy, glutathiontransferázy a thioredoxinu. Jako marker apoptózy sloužila aktivita kaspasy 3. Jako marker nitrace bílkovin byl zkoumán nitrotyrosin. Byla prokázána snížená aktivita antioxidačních enzymů a zjištěno významně více nitrotyrosinu především v syncytiotrofoblastu placent pocházejících z vysoké nadmořské výšky ve srovnání s kontrolními. Naopak oxidační stres byl snížen, stejně tak ani nedošlo k větší apoptóze u těchto chronicky hypoxických placent. Snížená koncentrace antioxidantů by mohla přispívat k rozvoji preeklampsie u těhotných žen ve vysoké nadmořské výšce. Chronická hypoxie v lidské placentě tedy zvýšila nitrační stres.

2.3 Vliv hyperglykémie matky na fetoplacentární cévy

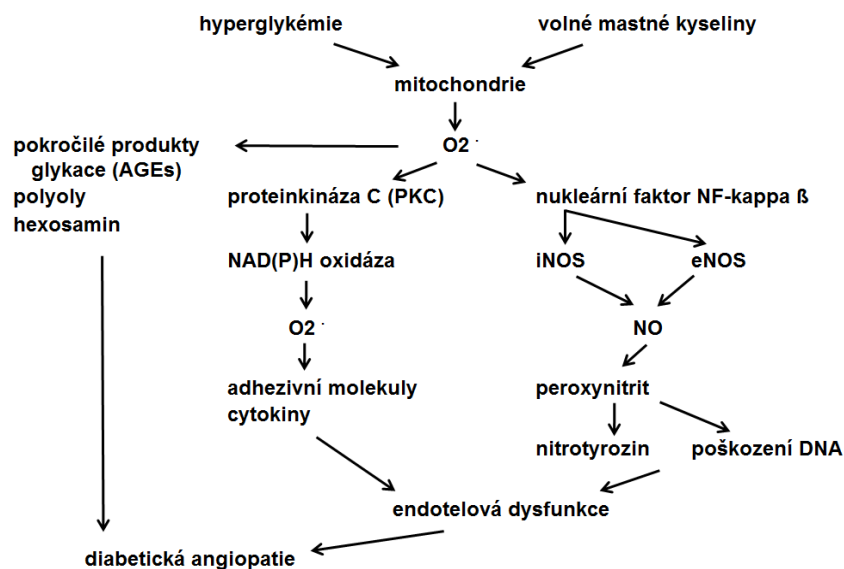
Diabetes mellitus je nejčastější interní komplikací v těhotenství a jeho incidence dále stoupá se zvyšujícím se výskytem obezity v populaci. Diabetes je členěn na pregestační diabetes (tj. 1. a 2. typu), gestační diabetes a specifické typy (sekundární diabetes). Dále se budeme v práci zabývat mechanismy u gestačního diabetu.

Gestační diabetes je každá porucha metabolismu cukru poprvé zjištěná v těhotenství, o níž není známo, že byla přítomna před těhotenstvím. Spontánně odezní během šestinedělí. Vyskytuje se až u 14% všech těhotenství ročně (DeSisto et al., 2014). Diabetické matky mají zvýšené riziko hypertenze a preeklampsie během těhotenství a diabetu mellitu 2. typu po konci těhotenství. Novorozenci diabetických matek mají vyšší riziko mnoha komplikací souhrnně označovaných jako diabetická fetopatie (např. makrosomie, respiratory distress syndrom, hypoglykémie, hyperbilirubinémie, hypokalcémie, kardiomegalie). Mají riziko zvýšeného výskytu obezity a diabetu 2. typu v dospělosti (American Diabetes Association 2004).

Glukóza v krvi matky velmi dobře prochází placentou do krve plodu. Hyperglykémie plodu způsobuje hypertrofiu fetálních ostrůvků β -buněk pankreatu a rozvíjí se fetální hyperinzulinismus. Inzulin jakožto bílkovina makromolekulární struktury nemůže prostoupit přes placentu do krve matky. Dochází k „vychytávání“ glukózy z krve matky a aktivaci nadměrných anabolických dějů, při kterých roste tuková tkáň, svaly a kosti plodu. Aktivuje se metabolismus, stoupá spotřeba kyslíku a dochází k relativní hypoxémii. Existují důkazy, že u diabetických těhotenství plod podstupuje chronickou hypoxii. Erythropoetin nepřestupuje placentární bariérou a byl popsán jeho vyšší obsah v plodech matek s gestačním diabetem (Salvesen et al., 1993a). Vede k vystupňované erytropoeze, která může být detekována zvýšeným počtem retikulocytů (Mimouni et al., 1986), dále v pupečníku plodů diabetických matek byl prokázán vyšší hematokrit i hemoglobin (Salvesen et al., 1993a; Salvesen et al., 1993b). Přímý důkaz o nižší saturaci hemoglobinu v pupečnickové žilní krvi při diabetu popsal Taricco et al. (2009). Autoři odebírali krev ihned po vybavení plodu z umbilikální žíly a prokázali zároveň i snížený obsah kyslíku, hyperglykémii a hyperlaktatémii.

Podobně jako hypoxie, i diabetes indukuje oxidační stres. Právě oxidační stres je hlavní příčinou rozvoje komplikací diabetu (Rolo a Palmeira, 2006; Giacco a Brownlee, 2010; Maritim et al., 2003). Na toto téma existuje velké množství literatury a není účelem této práce popsat všechny známé mechanismy. Zmíníme se jen o některých aspektech. Vyvolávacím

faktorem změn je chronická hyperglykémie (Rolo a Palmeira, 2006; Obr. 2.5), která působí na krevní elementy, endotel a nepřímo i na fibroblasty a buňky interstitia. Podstatou změn je samotná struktura glukózy, která umožňuje, aby reagovala s proteiny a měnila jejich vlastnosti anebo aby se spontánně oxidovala a vytvářela tak reaktivní meziprodukty a přitom umožnila vznik reaktivním formám kyslíku (ROS). Oxidační stres je vyjádřením nepoměru mezi tvorbou ROS a jejich „odklížením“ scavengerovým systémem. Při hyperglykémii dojde k přestupu glukózy do cytoplazmy endotelové buňky, což vystupňuje glykolýzu s následným zpracováním pyruvátu v Krebsově cyklu. Tím se zvýší nabídka elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích, sníží se gradient napětí na membráně mitochondrie a nadbytečné elektrony vytvářejí z kyslíku superoxidový radikál. Ten aktivuje polymerázu ADP-ribózy, která blokuje klíčový enzym glykolýzy – glycerinaldehydfosfátdehydrogenázu, což ve svém důsledku vede k řetězci reakcí, na jejímž konci stojí inhibice glykolýzy. Pak dochází ke kumulaci nezmetabolizovaných substrátů, které se mohou zpracovat v alternativních cestách, které jsou patogenetickými mechanismy rozvoje komplikací (neenzymová glykace s tvorbou pokročilých produktů glykace (AGEs), aktivace proteinkinázy C (PKC), hexozaminová cesta a polyolová cesta). Stejným mechanismem jako hyperglykémie působí volné mastné kyseliny, které jsou vlivem inzulínové rezistence rovněž zvýšené (Giacco a Brownlee, 2010).



Obr. 2.5 - Vliv hyperglykémie a volných mastných kyselin na tvorbu superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot -}$) a jeho vztah k reaktivním formám dusíku.

Antioxidační mechanismy (scavengerový systém) udržuje hladinu oxidačního stresu na fyziologické hladině. Více antioxidantů může vyvážit mírný oxidační stres. Zablokování tvorby superoxidového radikálu přidáním enzymu superoxiddismutázy (SOD) vedlo k poklesu tvorby produktů oxidačního stresu. Hyperglykemie zvyšovala genovou expresi antioxidačních enzymů (Ceriello et al., 1996).

Vlivem zvýšené koncentrace glukózy reaguje NO v buňce endotelu se superoxidovým radikálem za vzniku peroxynitritového radikálu. Ten reaguje s tyrosinem za vzniku nitrotyrosinu, který má cytotoxické účinky. Pomocí specifických protilátek bylo metodou imunohistochemie prokázáno významné zvýšení nitrotyrosinu v endotelu cév syncytiotrofoblastu a stromatu klků placent matek s diabetem (Lyall et al., 1998).

Zatímco radikálové poškození endotelu cév při hyperglykémii je tedy relativně dobře popsáno a je doloženo, že plod je při zvýšené glykémii matky ohrožen hypoxií, neprozkoumanou otázkou zůstává vliv gestačního diabetu na rezistenci placentárních cév. Mohli bychom očekávat zvýšenou rezistenci podobnou té, která nastává při působení chronické hypoxie na fetoplacentární cévy, což je spojeno také s radikálovým poškozením i s alterací růstu plodu. Přesto, že gestační diabetes je závažnou a častou komplikací těhotenství s významnou perinatologickou i mateřskou morbiditou, doposud nebyla publikována žádná práce týkající se vlivu hyperglykémie matky na odpor fetoplacentárních cév.

Vodítkem by mohly být změny v utero a fetoplacentárním průtoku krve při gestačním diabetu. Prostřednictvím radionuklidem označených mikrokuliček bylo změřeno významné snížení uteroplacentárního průtoku krve u potkanů s experimentálně vyvolaným diabetem ve srovnání s normálními zvířaty (Eriksson a Jansson, 1984). Také u diabetických myší bylo prokázáno snížení uteroplacentární perfuze s významným nárůstem odporu v děložní arterii (Stanley et al., 2011). Bylo popsáno snížení průtoku krve v pupečnickové žíle u hyperglykemických ovcí (Crandell et al., 1985). Dopplerovské ultrazvukové měření průtokových poměrů v cévách u těhotenství s gestačním diabetem ale přineslo rozporuplné výsledky. Abnormální flowmetrie pupečnickové tepny u těhotných se špatnou kontrolou glykémie naznačovala zvýšenou cévní rezistenci (Bracero et al., 1986), zatímco dobře kontrolované diabetičky měly normální fetální dopplerovskou flowmetrii (Salvesen et al., 1993b). I v jiné studii byl abnormální fetoplacentární průtok krve popsán pouze u 5% diabetických rodiček (Pietryga et al., 2006).

Na základě mnoha důkazů (spotřeba kyslíku při hyperglykémii sekundárně se vznikem hypoxie, radikálové poškození jako při hypoxii, vliv na růst plodu) se lze domnívat,

že gestační diabetes bude mít stejně jako chronická hypoxie vliv na hemodynamiku fetoplacentárních cév.

3. CÍLE A HYPOTÉZY

Hlavním cílem řešení práce je výzkum mechanismů regulace fetoplacentárního cévního řečiště při hypoxii. Dle studia literárních pramenů je oblast regulace placentárních cév překvapivě neprobádaná oblast a vliv hypoxie málo známý, přestože poruchy dodávky okysličené krve do placenty vzácné nejsou a předpokládá se, že jsou podkladem významných poruch prenatálního vývoje. Předpokládáme, že náš výzkum může přispět k terapeutickému řešení poruch vývoje plodu během patologického těhotenství (intrauterinní růstové retardace (IUGR), preeklampsie a gestační diabetes).

Rho kinázy v mechanismu HFPV

Signální dráha Rho kináza hraje důležitou roli v regulaci senzitivity cévního hladkého svalu k intracelulárním iontům Ca^{2+} . Cestou inhibice myosinové fosfatázy zvyšuje fosforylaci lehkých řetězců myosinu a působí vazokonstrikci (Fukata et al., 2001). Rho kinázy mohou být inhibovány fasudilem. Rho kinázy mají významnou roli při hypoxické plicní vazokonstrikci i hypoxické plicní hypertenzi.

Fetoplacentární cévy reagují na akutní hypoxii vazokonstrikcí (Hampl et al., 2002). Domníváme se, že aktivace Rho kinázové signální dráhy ve fetoplacentárních cévách přispívá k akutní hypoxické fetoplacentární vazokonstrikci (HFPV). Domníváme se, že HFPV je přetrvávající reakcí zprostředkovanou zvýšením citlivosti (senzitivity) k Ca^{2+} . Analogicky v plicních cévách se v této fázi již snižuje intracelulární koncentrace Ca^{2+} a ustálí se na určité hodnotě (plató), která je ale stále vyšší než klidová normoxická hodnota (Robertson et al., 1995). Plicní a fetoplacentární cévy hrají podobnou roli v oxygenaci dospělé, respektive fetální krve. Vzhledem k této funkční podobnosti plicní a placentární cirkulace předpokládáme účast podobných mechanismů v odpovědi na hypoxii u obou řečišť. Domníváme se, že inhibice Rho kinázy redukuje bazální cévní rezistenci a vazokonstrikční odpověď na hypoxii na fetální straně placenty. Při testování hypotézy se zaměříme na vztah perfuzního tlaku na zvyšujícím se průtoku v izolované, dvojité perfundované placentě.

Zvýšení fetoplacentárního cévního odporu při chronické hypoxii

Chronická hypoxie za podmínek průtoku solného perfuzního roztoku působí trvalé zvýšení fetoplacentárního cévního odporu, které je alespoň zčásti rezistentní k akutní reoxygenaci (Jakoubek et al., 2008). Není způsobené jenom prostou vazokonstrikcí. Nicméně numerický rozdíl v rezistenci hypoxických a normoxických placent (ač statisticky významný), byl ve studii Jakoubka et al. (2008) relativně malý (pouze kolem 20% při nejvyšším nastaveném stupni průtoku). Není zatím známo, jaký odpor klade fetoplacentární cévní řečiště za fyziologických podmínek, tedy při perfuzi krví.

Zvýšení fetoplacentárního cévního odporu při chronické hypoxii je v souladu se všeobecně přijímanou, byť dosud experimentálně nedostatečně podloženou představou, že hypoxické omezení průtoku fetální stranou placenty je podkladem IUGR (Kingdom a Kaufmann, 1997).

Domníváme se, že perfuze fetoplacentárních cév nikoli solným roztokem, ale roztokem o vysoké viskozitě, např. krví, zvýší rozdíly v cévním odporu u chronicky hypoxických placent ve srovnání s placentami kontrolními normoxickými. Tuto hypotézu budeme testovat na modelu placenty zvířat vystavených chronické hypoxii + perfundované krví. Experimentální uspořádání bude lépe odpovídat skutečným fyziologickým poměrům v placentě.

Změna fetoplacentárního cévního odporu při hyperglykémii matky

Hypoxie působí radikálový stres. Předchozí experimenty naznačily, že by se tento radikálový stres mohl podílet na zvýšení fetoplacentárního cévního odporu při chronické hypoxii. Diabetes mellitus je onemocnění, jehož průvodním znakem je také radikálový stres. Byla popsána hypoxémie v umbilikální žíle plodů diabetických matek (Taricco et al., 2009). Hypoxická hypoperfuze fetální části placenty se pravděpodobně podílí na syndromu růstové retardace plodu. Hypoxie tedy ovlivňuje fetální růst a jak je prokázáno i fetoplacentární hemodynamiku. Gestační diabetes mellitus je také známým faktorem ovlivňující růst plodu.

Domníváme, že i diabetická hyperglykémie bude mít vliv na fetoplacentární hemodynamiku a že plody diabetických matek potkanů budou mít ve fetoplacentárním cévním řečišti zvýšený odpor. Dále se domníváme, že oxidační stres během hypoxie bude

potencován oxidačním stresem při gestačním diabetu a to bude mít aditivní účinek na rezistenci fetoplacentárních cév. K průkazu této hypotézy bude použit model vyvolání diabetu streptozotocinem, který má toxické účinky na pankreatické β buňky (Hellerström et al., 1985).

4. MATERIÁL A METODY

K průkazu hypotézy naší práce byl zvolen experimentální model placenty laboratorního potkana. S ním měla naše laboratoř Ústavu fyziologie 2. lékařské fakulty UK již delší zkušenost i adekvátní instrumentální vybavení (Jakoubek et al., 2008). Model mohl být také použit k posouzení vlivu chronické hypoxie na placentu, kde z etických důvodů lidský model nebyl akceptovatelný.

Všechny pokusy byly prováděny po schválení Odbornou komisí pro ochranu zvířat 2. lékařské fakulty UK podle vyhlášky č. 207/2004 Sb. a v souladu s pravidly Směrnice Evropského parlamentu a rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

4.1 Laboratorní zvířata

K pokusům byli použiti březí samice potkanů kmene Wistar z chovu firmy BioTest (Konárovice) (Experiment 1 + 2) a firmy Velaz (Praha) (Experiment 3A + 3B). Zvířata byla umístěna do naší laboratoře k aklimatizaci 2 týdny před plánovaným termínem porodu. Po celou dobu měla volný přístup k vodě a standardní laboratorní stravě. V místnosti, kde byla chována, byla udržována stálá teplota 22 ± 2 °C a osvětlení s 12 hodinovým režimem střídání světla a tmy.

4.2 Isolovaná, dvojité perfundovaná placenta laboratorního potkana

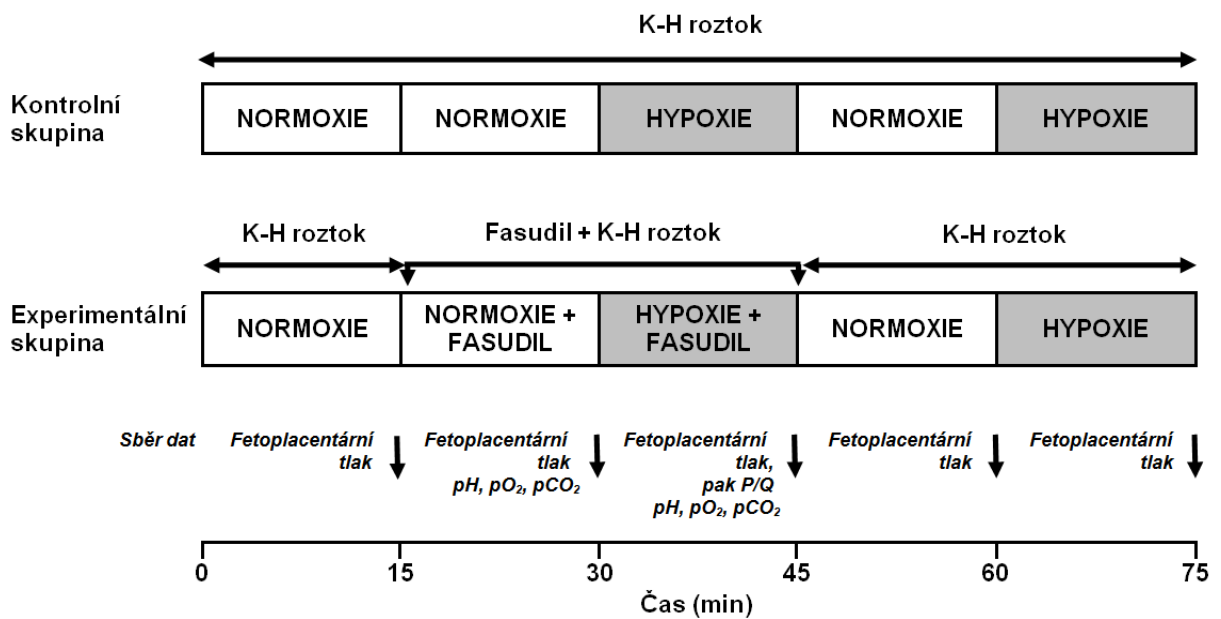
Den před plánovaným termínem porodu (tj. 20. den gravidity) byl potkan uveden do anestézie jednorázovým intraperitoneálním podáním Thiopentalu (Valeant, Praha) v dávce 50 mg/kg a byl fixován v lázni s Ringerovým roztokem ohřívaném na teplotu 37 °C. Březí samice potkanů byly preparovány dle již dříve popsaného postupu (Štulc a Štulcová, 1986). Ze střední laparotomie byly vybaveny oba rohy dělohy, jeden z nich byl vypodložen vlhkým mulem a byl ponechán částečně ponořený do Ringerova roztoku. Vizuálně byla objasněna každá jednotka placenta – plod a byla zvolena jedna, která byla dále součástí experimentu. Do uterinní arterie, která vedla k námi zvolené placentě, byla zavedena i.v. kanyla o velikosti 24 G a pak byla zahájena perfuze mateřské části placenty Krebsovým roztokem (Krebs-Henseleitovým roztokem; K-H roztokem) o složení (mmol/l): NaCl 118,0, KCl 4,7, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, KH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 1,25 a dextroza 7,0. Roztok byl udržován

při konstantní teplotě 37 °C a byl sycený normoxickou směsí plynů (se složením 21% O₂, 5% CO₂ a 74% N₂) ve společném rezervoáru. Průtok byl postupně navyšován na 1 ml/min a poté udržován konstantní. Uterinní žíla za zvolenou placentou a ostatní cévy oddělující zvolenou fetoplacentární jednotku byly současně podvázány a před podvazem propíchnuty jehlou, aby se zabránilo hromadění perfuzátu v placentě. Poté byla rozrušena děložní stěna a byly obnaženy jednotlivé plody. Dále byl vybaven pupečník a ozřejmeny pupečnickové cévy (u potkana jsou pouze 2). Umbilikální arterie zvolené fetoplacentární jednotky byla zakatetrizována opět kanylou o velikosti 24 G a fetální část placenty byla perfundována stejným perfuzátem jako mateřská část ze společného rezervoáru průtokem 1 ml/min. Umbilikální žíla pak byla zakatetrizována obdobným způsobem a byla ponechána otevřená v úrovni placenty, aby umožnila volný odtok perfuzátu. Byla využita také pro odběr vzorků na vyšetření pH, pO₂ a pCO₂ (ABL 5, Radiometer, Kodaň, Dánsko). Všechny plody poté byly utraceny nadměrnou dávkou Thiopentalu. Perfuzní tlak na obou stranách placenty (fetální i mateřské) byl měřen v reálném čase pomocí transduceru (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Německo). Změny naměřeného perfuzního tlaku při konstantním průtoku odpovídaly změnám rezistence fetoplacentárních cév. Na konci každého pokusu byly matky utraceny nadměrnou dávkou Thiopentalu. Dále byly zváženy matky, plody i placenty a byly srovnány hmotnosti placent, které byly součástí pokusu, s hmotnostmi ostatních placent. Před začátkem pokusu byl každý den připravován čerstvý perfuzní roztok.

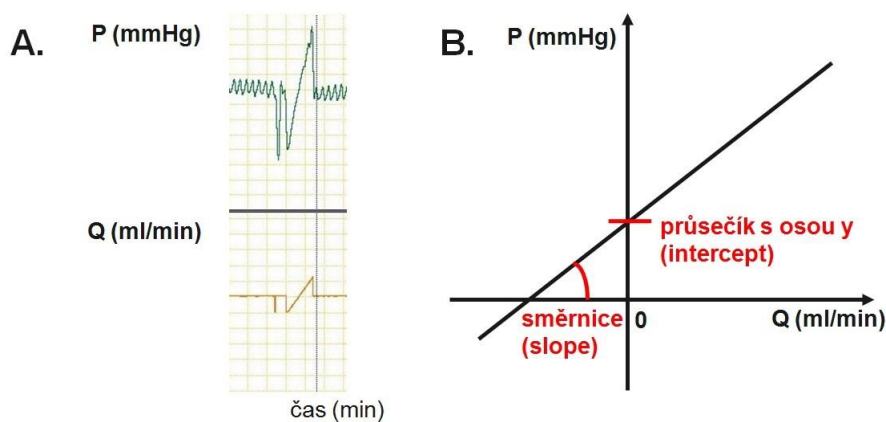
4.3 Experiment 1 - Vliv inhibice Rho kináz na reaktivitu fetoplacentárních cév při normoxii a akutní hypoxii

Potkani byli náhodně rozděleni do dvou skupin: kontrolní (n = 11) a experimentální (n = 11), kdy do perfuzního roztoku byl přidán inhibitor Rho kinázy fasudil (HA-1077, Dihydrochlorid Salt; LC Laboratories, Woburn, Massachusetts, USA) v cílové koncentraci 10 μM. Poté, co byla zahájena perfuze obou částí placenty ze společného rezervoáru, jsme postupovali podle experimentálního protokolu (Obr. 4.1). Akutní hypoxický podnět byl vyvolán výměnou normoxické směsi plynů saturující perfuzát za hypoxickou směs (složení 95% N₂ + 5% CO₂) (Hampl et al., 2002). Stimulus trval 15 min, než se perfuzní tlak stabilizoval, a poté byla směs plynů změněna na původní. K posouzení odporových vlastností placentárních cév byla měřena závislost fetoplacentárního tlaku a průtoku (P/Q) v akutní hypoxii. Perfuzní pumpa byla nejdříve zcela zastavena. Po ustálení perfuzního tlaku (cca za dobu 5-10 s) byl průtok perfuzního roztoku na fetální straně placenty kontinuálně

zvyšován od 0 do 2 ml/min během 2 min a byly zaznamenávány odpovídající změny perfuzního tlaku. Z těchto hodnot byla vypracována závislost tlaku na zvyšujícím se průtoku (Obr. 4.2), z jejichž parametrů lze porovnat kritický uzavírací tlak a vaskulární rezistenci. Byly porovnány parametry přímky P/Q obou skupin. V experimentální skupině byl po provedení P/Q vyměněn perfuzát, který obsahoval fasudil, za čistý perfuzát bez fasudilu a pokračovali jsme v měření. Směs plynů saturující perfuzát byla vyměněna za původní normoxickou, na samém konci pokusu byl navozen poslední druhý hypoxický stimulus.



Obr 4.1 - Experimentální protokol - rozdělení skupin a časový průběh experimentu. Nad časovou osou jsou uvedeny šipky, kdy byla odečítána měřená data (K-H roztok - Krebs-Henseleitův roztok).



Obr. 4.2 - Závislost P/Q. Kopie části experimentálního záznamu, která ukazuje záznam fetálního perfuzního tlaku (nahore) v závislosti na zvyšujícím se průtoku (dole) (A). Hodnocení parametrů

závislosti P/Q (B). Pro každý preparát bylo statisticky testováno, zda vztah mezi průtokem krve a perfuzním tlakem je lineární. Protože v rozmezí používaných průtoků tomu tak bylo při všech měřeních, byla pro každou skupinu konstruována jedna regresní přímka. Ta je hodnocena pomocí dvou parametrů: směrnice (sklon, slope) a průsečíku s osou perfuzního tlaku (intercept). Pro každou skupinu byla vypočtena průměrná hodnota směrnice a průsečíku.

4.4 Hypoxická izobarická komora

Březí samice byly vystaveny izobarické hypoxii (10% O₂) po dobu 7 dnů v izobarické komoře v posledním trimestru gravidity. Toto posloužilo k vytvoření podmínek chronického nedostatku kyslíku ve fetoplacentárních cévách (Hampl a Herget, 1990). Jedná se o vzduchotěsnou komoru, opatřenou víkem, vstupní průchodkou a přetlakovým ventilem, ke které je připojen analyzátor kyslíku a čerpadlo vzduchu. K výstupu je připojena nádoba s hydroxidem draselným a odlučovač vodních par. Vzniku přetlaku uvnitř komory brání vodou naplněná drážka dosedací plochy víka komory. V komoře byla udržována konstantní frakční koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu, v našem případě 10%. Výhodou je, že zařízení pracuje automaticky s minimálními nároky na údržbu a dohled, udržuje stálou vlhkost a teplotu vzduchu, při poklesu koncentrace kyslíku pod nastavenou mez dojde automaticky k zapnutí čerpadla, které dočerpá do komory vzduch, dokud obsah kyslíku znovu nedosáhne požadované úrovně. Samice snášely pobyt v této komoře dobře. Nebyla třeba adaptace zvířat tak, jak by to bylo nutné u hypobarické expozice.

4.5 Experiment 2 - Vliv chronické hypoxie na periferní cévní odpor placenty laboratorního potkana při perfuzi krví

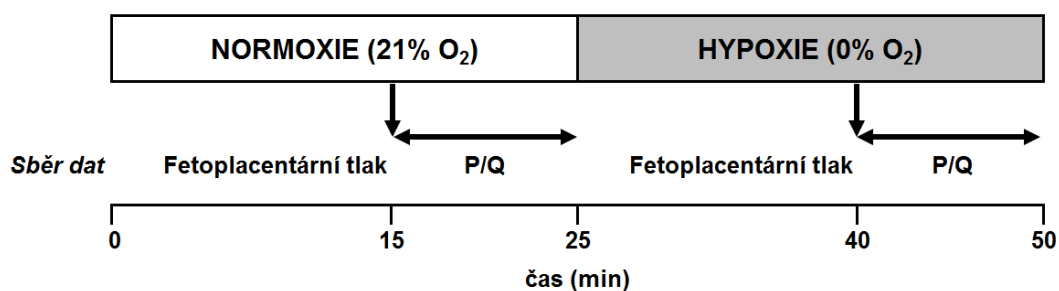
Potkani byli rozděleni do dvou skupin. Normoxická kontrolní skupina (n = 6) byla po celou dobu březosti chována za standardních, normoxických podmínek (F_iO₂ = 0,21), zatímco hypoxická skupina (n = 8) strávila posledních 7 dnů březosti v hypoxické izobarické komoře (F_iO₂ = 0,1). V den pokusu byly samice z komory vyjmuty a ihned použity k přípravě preparátu izolované, dvojité perfundované placenty stejným již popsaným postupem (kapitola 4.2). Po 15minutové stabilizaci preparátu byl Krebsův roztok nahrazen heparinizovanou plnou krví, která byla kontinuálně saturovaná rovněž normoxickou směsí plynů (o složení 21% O₂, 5% CO₂ a 74% N₂), promíchávána ve společném rezervoáru a udržována o stálé teplotě 37 °C. Z rezervoáru byly nabírány vzorky pro měření pH, pO₂ a pCO₂ (ABL 5, Radiometer, Kodaň, Dánsko). Jako dárci krve byli použiti dospělí samci potkanů, kteří byli uvedeni do inhalační anestézie v narkotizační komoře s malým množstvím éteru. Do preheparinizovaných stříkaček

jim bylo kardiální punkcí odebráno cca 15-25 ml krve určené pro perfuzi. Po 10 min perfuze krví byl ke zhodnocení odporových vlastností fetoplacentárních cév odečten perfuzní fetoplacentární tlak (měřený během pokusu kontinuálně) při konstantním bazálním průtoku 1 ml/min u obou skupin potkanů. Poté byla změřena závislost průtoku na tlaku stejným způsobem jako v předchozím pokusu (kapitola 4.3).

4.6 Experiment 3A – Vliv diabetu matky na fetoplacentární cévní rezistenci

V tomto pokusu byl studován vliv hyperglykémie matky na fetoplacentární cévní odpor na modelu diabetického březího potkana (Schroeder et al., 1997, Damasceno et al., 2013). Byly použity 2 skupiny potkanů: kontrolní a diabetická. K indukci diabetu byl použit streptozotocin (STZ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) rozpuštěný ve 20 mM roztoku pufru citrátu sodného (pH 4,5; Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo), byl jednorázově podán březím samicím v dávce 50 mg/kg intraperitoneálně 14. den březosti. Kontrolní skupině (K, n = 7) bylo aplikováno adekvátní množství rozpouštědla. Opakovaně, a to 16. a 20. den březosti byla kontrolována glykosurie a ketonurie diagnostickými proužky, také glykémie březích matek glukometrem. Krev byla získána odříznutím špičky ocasu a odkapáním. Do diabetické skupiny (D, n = 7) byly zahrnuty všechny březí samice, které měly glykémii v den pokusu > 10 mmol/l (Thamotharan et al., 2003). Den před plánovaným termínem porodu (tj. 20. den březosti) byl proveden vlastní pokus na izolované, dvojité perfundované placentě (den páření = den 0).

Během pokusu byl měřen perfuzní tlak na fetální i mateřské straně placenty (PowerLab, ADInstruments, Německo). Po 15minutové normoxii, kdy byl perfuzát (K-H roztok) na obou stranách placenty sycen normoxickou směsí plynů, byl zaznamenán fetoplacentární tlak při klidovém bazálním průtoku 1 ml/min (Obr. 4.3). Poté bylo provedeno měření závislosti tlaku na průtoku - na fetální straně byla nejprve zcela zastavena perfuze a pak postupně průtok zvyšován nikoli kontinuálně, ale stupňovitě po 0,2 ml/min až na 1,8 ml/min, kdy každý jednotlivý krok trval 1 min. Po provedení měření byla změněna směs plynů sytících perfuzát za hypoxickou (složení 95% N₂ + 5% CO₂). Po 15 min hypoxie byl opět zaznamenán fetoplacentární tlak při bazálním průtoku. Poté byla změněna směs plynů sytících perfuzát zpět na normoxickou a po 15 min byl opět zaznamenán fetoplacentární tlak.



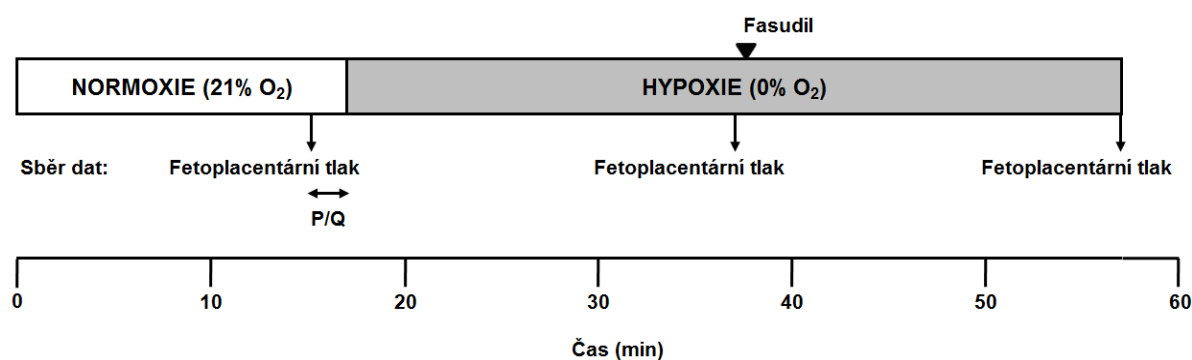
Obr. 4.3 - Protokol experimentu 3A.

4.7 Experiment 3B – Vliv diabetu matky a chronické hypoxie na fetoplacentární cévní rezistenci (neonatální model diabetu)

V tomto pokusu byly použity 4 skupiny potkanů: první skupina měla experimentální diabetes (D, $n = 9$), druhá byla vystavena chronické hypoxii (H, $n = 9$), třetí měla diabetes a současně byla vystavena hypoxii (DH, $n = 9$) a čtvrtá skupina zahrnovala zdravá kontrolní zvířata žijící v normoxii (K, $n = 10$). K indukci experimentálního diabetu byl použit model regenerace β -buněk pankreatu po neonatální aplikaci STZ (King, 2012). K indukci diabetu byl použit STZ v dávce 100 mg/kg rozpuštěný ve 20 mM roztoku pufru citrátu sodného, který byl podán mláďatům subkutánně 2. nebo 3. den po jejich narození. Kontrolním zvířatům bylo aplikováno adekvátní množství rozpouštědla. K potvrzení diabetu byla kontrolována glykémie glukometrem v období mezi 6. - 10. postnatálním týdnem. Dle literárních údajů se hyperglykémie objevuje až od 6. týdne po podání STZ v důsledku malého množství β -buněk a jejich dysfunkce (Bonner-Weir et al., 1981). Krev byla získána odříznutím špičky ocasu a odkapáním. Průměrná glykémie u potkanů je dle literatury 6,5 mmol/l (Braslasu et al., 2007) a horní limit normální postprandiální glykémie je 7,9 mmol/l (Wang et al., 2010). Do diabetické skupiny byla v pokusu zařazena pouze zvířata s glykemií > 8 mmol/l naměřenou aspoň jednou během daného období. V dospělosti (11. týden života) byly samice s diabetem i bez diabetu připuštěny přes noc s nediabetickými samci. Pokud došlo k březosti, samice byly náhodně rozděleny na 2 podskupiny: normoxická strávila celou dobu březosti v normoxických podmínkách ($F_iO_2 = 0,21$), hypoxická podskupina strávila posledních 7 dnů březosti v hypoxické izobarické komoře ($F_iO_2 = 0,1$). Vlastní experiment byl proveden na preparátu izolované, dvojité perfundované placenty podle již popsaného postupu den před plánovaným termínem porodu.

Na začátku pokusu po 15minutové normoxii, kdy byl perfuzát na obou stranách placenty sycen normoxickou směsí plynů, byl zaznamenán perfuzní fetoplacentární tlak (Obr.

4.4). Byla zachována konstantní hodnota průtoku. Poté byla změřena závislost perfuzního tlaku na zvyšujícím se průtoku, kdy průtok byl zvyšován kontinuálně od 0 do 2 ml/min během 120 s. Dále byl průtok perfuzátu vrácen zpět na 1 ml/min a byla změřena reaktivita k akutní hypoxii, byla změněna směs plynů, která probublávala perfuzát, na hypoxickou směs plynů, která tedy obsahovala 95% N₂ a 5% CO₂. Po 15 min akutní hypoxie byl opět zaznamenán fetoplacentární tlak. Ke zhodnocení vazokonstrikční komponenty zvýšeného fetoplacentárního odporu byl do společného perfuzátu při akutní hypoxii přidán inhibitor Rho kinázy fasudil (10 μM). Po 20 min perfuze byl pak zaznamenán poslední fetoplacentární tlak.



Obr. 4.4 - Protokol experimentu 3B.

Na začátku každého měření byly ze špičky ocasu odebrány vzorky krve na změření hematokritu a glykémie. Z fetální krve, odebrané z těl fětů po jejich dekapitaci, byla metodou ELISA měřena koncentrace sérového 3-nitrotyrosinu (3NT) jako indikátoru reaktivních substancí kyslíku a dusíku, především peroxynitritu (Fisárková et al., 2004) jako markeru oxidačního stresu.

4.8 Statistické hodnocení

Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (SEM), n označuje počet zvířat ve skupině. K analýze dat byl použit program StatView 5 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla určena pomocí párového t-testu respektive jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA) a Fisherova PLSD post hoc testu. K analýze dat získaných z měření závislosti tlaku a průtoku pro každý preparát byla použita lineární regrese a její parametry (slope a intercept) byly porovnány mezi skupinami použitím nepárového t-testu. Rozdíly mezi daty stejné skupiny byly porovnány párovým t-testem. Pro srovnání hodnot perfuzního tlaku a průtoku

mezi skupinami získaných při měření závislosti P/Q v experimentu 3A byla použita ANOVA pro opakovaná měření. Jako statisticky významná byla považována hladina významnosti $p < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

5.1 Experiment 1 - Vliv inhibice Rho kináz na reaktivitu fetoplacentárních cév při normoxii a akutní hypoxii

(příloha 1)

V tomto pokusu se kontrolní ani experimentální skupina mezi sebou navzájem nelišila v hmotnostech těl matek, placent ani plodů (Tab. 5.1). K vyloučení edému placent během perfuze byly mezi sebou porovnány hmotnosti perfundovaných placent (na konci experimentu) a hmotnosti ostatních neperfundovaných placent (které nebyly součástí našeho experimentu) v obou skupinách. Nebyl mezi nimi významný rozdíl (kontrolní skupina $p = 0,16$, experimentální skupina $p = 0,26$) (Tab. 5.1).

Tab. 5.1 - Hmotnosti těl matek, placent a plodů.

skupina	Hmotnost těl matek (g)	Vlhká hmotnost perfundovaných placent (mg)	Vlhká hmotnost neperfundovaných (nepokusných) placent (mg)	Hmotnost plodů (g)
Kontrolní	438 ± 12	580 ± 22	591 ± 19	$4,782 \pm 0,613$
Experimentální	440 ± 12	645 ± 45	668 ± 33	$5,718 \pm 0,158$
hodnoty p (kontrolní vs. experimentální)	0,8855	0,2423	0,0760	0,1405

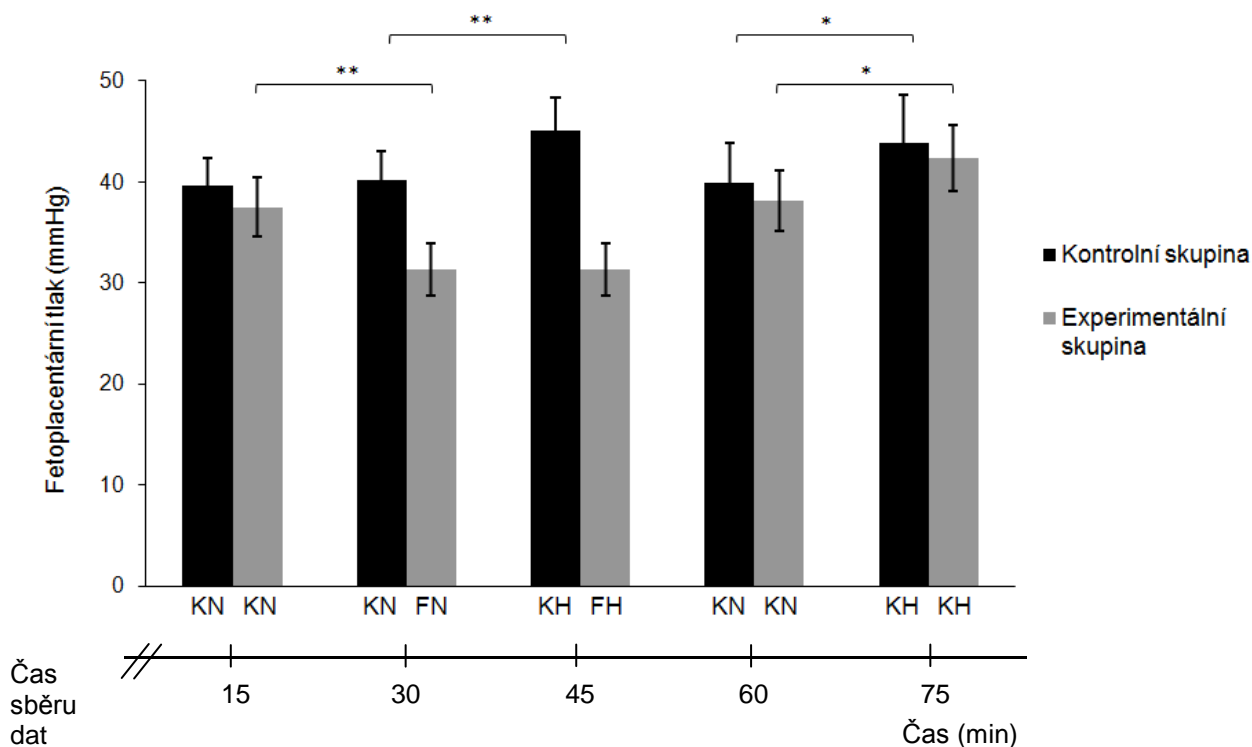
Hypoxické stimuly způsobily v obou skupinách pokles pO_2 (o 48 ± 11 mmHg v kontrolní skupině a o 43 ± 5 v experimentální skupině, $p = 0,72$) perfuzátu ve výtokové kanyle, totéž platí pro pH (pokles o $0,05 \pm 0,18$ mmHg v kontrolní skupině a o $0,04 \pm 0,18$ mmHg v experimentální skupině, $p = 0,24$) (Tab. 5.2).

Tab. 5.2 - Vlastnosti perfuzátu z výtokové kanyly zavedené do v. umbilicalis.

skupina	Normoxie			Akutní hypoxická challenge		
	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)	pH	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
Kontrolní	7,28 ± 0,02	93 ± 6	32 ± 1	7,23 ± 0,03	46 ± 5*	36 ± 1*
Experimentální	7,29 ± 0,03	92 ± 3	31 ± 0	7,25 ± 0,02**	49 ± 4**	35 ± 1**

* p < 0,05 vs. kontrolní skupina při normoxii. ** p < 0,01 vs. experimentální skupina při normoxii.

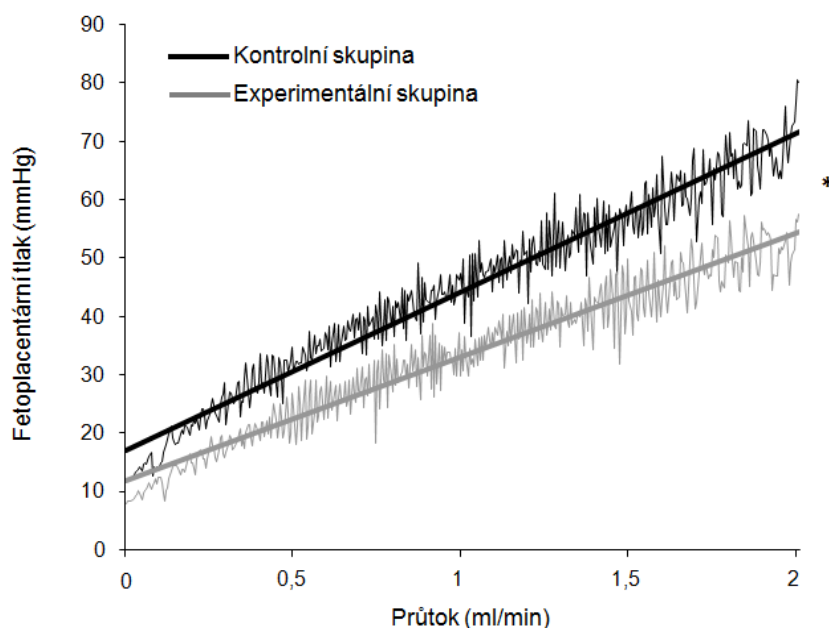
Podle předpokladu se na začátku pokusu kontrolní a experimentální skupina mezi sebou nelišila v hodnotách bazálního perfuzního fetoplacentárního tlaku (Obr. 5.1). Přidání fasudilu do perfuzního roztoku způsobilo statisticky významný pokles fetoplacentárního tlaku při normoxii (z 38 ± 3 mmHg na 31 ± 3 mmHg, p < 0,01) a kompletně zablokovalo vazokonstrikční odpověď na akutní hypoxii (perfuzní tlak 31 mmHg před hypoxií vs. 31 mmHg při hypoxii). U kontrolní skupiny naproti tomu dle očekávání velikost HFPV ovlivněna nebyla. V experimentální skupině došlo po odstranění fasudilu (po výměně infuzního roztoku) ke kompletní obnově HFPV. V kontrolní skupině nevedla výměna perfuzátu k žádné změně velikosti HFPV. Velikost fetoplacentárního tlaku před podáním fasudilu se nelišila od velikosti tlaku po výměně perfuzátu. Podání fasudilu nemělo vliv na pokles pO₂ v perfuzátu při hypoxických podnětech.



Obr. 5.1 - Fetoplacentární perfuzní tlak při bazálním průtoku. Na počátku pokusu se tlak nelišil mezi oběma skupinami ($p = 0,62$). Fasudil způsobil snížení tlaku při normoxii. Akutní hypoxie vyvolala HFPV v kontrolní skupině ($p < 0,01$), ale nikoli v experimentální skupině s fasudilem. Po výměně perfuzátu s fasudilem za čistý bez fasudilu byla přítomna HFPV podobného rozsahu v obou skupinách.

Specifikace perfuzního roztoku: KN, Krebsův roztok při normoxii (saturován směsí s 21% O_2 , 5% CO_2 a 74% N_2); FN, Krebsův roztok s fasudilem při normoxii; KH, Krebsův roztok při hypoxii (saturován směsí s 95% N_2 + 5% CO_2); FH, Krebsův roztok s fasudilem při hypoxii. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Kompletní inhibice HFPV fasudilem byla rovněž potvrzena daty z měření závislosti tlaku na průtoku (během hypoxického stimulu) (Obr. 5.2). Vztah byl u obou skupin lineární (lineární regresní koeficient $r^2 > 0,95$ u kontrol a $r^2 > 0,94$ v experimentální skupině). Na přímce závislosti P/Q můžeme hodnotit dva parametry – směrnici přímky (slope) a hodnotu průsečíku s osou perfuzního tlaku (intercept). Směrnice odpovídá odporu, který kladou fetoplacentární cévy zvyšujícímu se průtoku, hodnota průsečíku s osou perfuzního tlaku odpovídá kritickému uzavíracímu tlaku. Směrnice byla významně nižší u experimentální skupiny ve srovnání s kontrolní ($0,098 \pm 0,007$ vs. $0,125 \pm 0,009$ mmHg/ml/min, $p < 0,05$). Skupiny se mezi sebou navzájem nelišily v hodnotě interceptu s osou perfuzního tlaku.



Obr. 5.2 - Výsledky lineární regresní analýzy vztahu fetoplacentárního perfuzního tlaku a kontinuálně se zvyšujícího průtoku perfuzátu (P/Q) během akutní hypoxické challenge. Jsou znázorněna naměřená data složená z 11 placent, u každé skupiny zvířat proložena přímkou. Kolísání křivky je dáno mechanikou perfuzní pumpy. Směrnice P/Q přímkou byla významně snížena u experimentální skupiny (perfundované s fasudilem) ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,098 \pm 0,007$ vs. $0,125 \pm 0,009$ mmHg/ml/min, * $p < 0,05$). Extrapolovaný intercept s osou perfuzního tlaku se mezi oběma skupinami významně nelišil ($p = 0,13$).

5.2 Experiment 2 - Vliv chronické hypoxie na periferní cévní odpor placenty laboratorního potkana při perfuzi krví

(příloha 2)

Podle očekávání měly matky i plody, které byli vystavené 7 denní hypoxii v komoře, významně nižší tělesnou hmotnost než kontroly. Hmotnosti perfundovaných placent po dokončení pokusu se významně nelišily od neperfundovaných, nepokusných placent ($p = 0,791$ u normoxické skupiny, $p = 0,071$ u hypoxické skupiny, Tab. 5.3). Byl tak vyloučen vznik edému placent během perfuze.

Tab. 5.3 - Hmotnosti matek, placent a plodů.

skupina	Hmotnost těl matek (g)	Vlhká hmotnost perfundovaných placent (mg)	Vlhká hmotnost neperfundovaných (nepokusných) placent (mg)	Hmotnost plodů (g)
Normoxická	430 ± 17	504 ± 13	498 ± 15	3,9 ± 0,1
Hypoxická	338 ± 12	549 ± 16	506 ± 12	3,2 ± 0,1
hodnoty p (normoxická vs. hypoxická)	< 0,001	0,093	0,723	< 0,001

Při srovnání hematokritu, pH, pO₂ a pCO₂ perfuzátu (alogenní krve) u obou skupin potkanů nebyl statisticky významný rozdíl (Tab. 5.4).

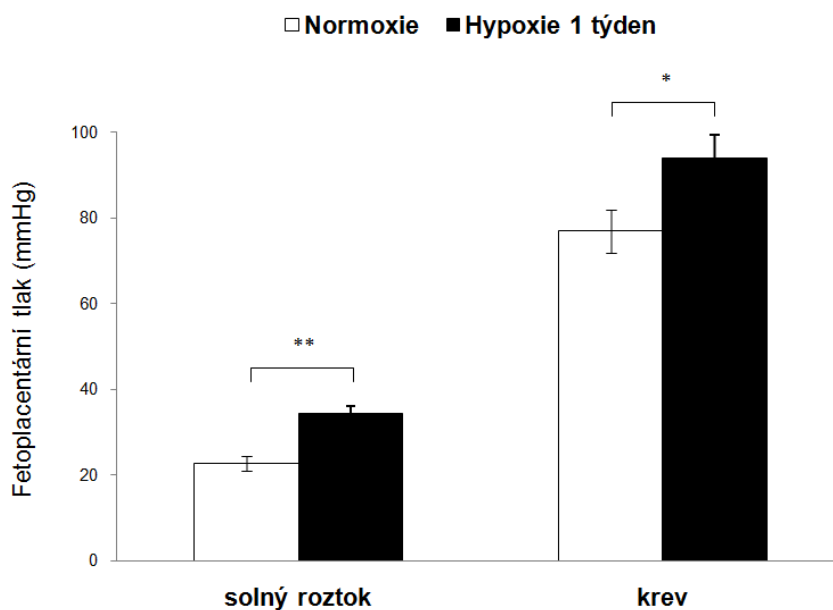
Tab. 5.4 - Hodnoty hematokritu, pH, pO₂ a pCO₂ perfuzátu.

skupina	hematokrit	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)
Normoxická	47 ± 2	7,38 ± 0,02	38 ± 3	113 ± 11
Hypoxická	45 ± 1	7,42 ± 0,04	38 ± 4	94 ± 5
hodnoty p (normoxická vs. hypoxická)	0,3372	0,3857	0,9198	0,2069

Zjistili jsme, že během počáteční perfuze Krebsovým roztokem byl bazální fetoplacentární perfuzní tlak (při průtoku 1 ml/min) významně vyšší u chronicky hypoxických potkanů (34 ± 2 mmHg) než u kontrol (23 ± 2 mmHg, p < 0,01, Obr. 5.3). Po výměně perfuzního roztoku s nízkou viskozitou za plnou krev došlo podle očekávání k výraznému zvýšení fetoplacentárního tlaku u obou skupin. Rozdíl mezi kontrolní normoxickou (77 ± 5

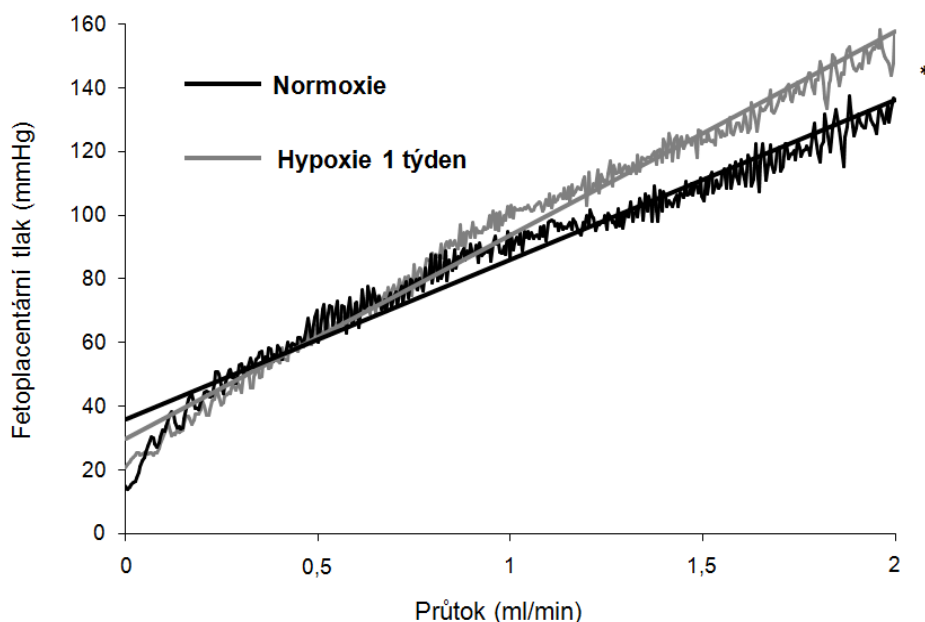
mmHg) a chronicky hypoxickou skupinou (94 ± 6 mmHg, $p < 0,05$, Obr. 5.3) byl o něco větší než v průběhu perfuze solným roztokem (11 vs. 17 mmHg).

Před měřením závislosti tlaku na průtoku došlo ke krátkému přerušení perfuze, kdy perfuzní tlak dosáhl stabilní, kladné hodnoty, která se nelišila mezi skupinami (22 ± 3 mmHg v normoxické oproti 17 ± 3 mmHg v hypoxické skupině, $p = 0,30$).



Obr. 5.3 - Fetoplacentární perfuzní tlak při chronické hypoxii v izolované placentě potkana během perfuze (při konstantní rychlosti průtoku 1 ml/min) Krebsova roztoku (vlevo) nebo plné krve (vpravo). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Perfuzní tlaky se téměř nelišily mezi oběma skupinami při nízkých hodnotách průtoku během P/Q, zhruba až do průtoku 0,8 ml/min (Obr. 5.4). Nad touto rychlostí průtoku perfuzní tlaky rostly mnohem strměji se zvyšujícím se průtokem u hypoxických potkanů než u kontrol. Data z měření závislosti tlaku na průtoku nicméně dobře zapadají u obou skupin do lineárního regresního modelu - lineární regresní koeficient byl $0,91 \pm 0,03$ u kontrolní a $0,94 \pm 0,01$ u chronicky hypoxické skupiny. Směrnice přímky byla významně vyšší u chronicky hypoxické skupiny ve srovnání s kontrolní ($0,29 \pm 0,01$ vs. $0,24 \pm 0,01$ mmHg/ml/min, $p < 0,05$, Obr. 5.4). Průsečík s osou perfuzního tlaku se mezi skupinami nelišil (normoxická sk. 36 ± 8 mmHg vs. hypoxická sk. 30 ± 5 mmHg, $p = 0,49$).



Obr. 5.4 - Vztah perfuzního tlaku a průtoku měřený na fetální straně placenty. Křivky jsou zprůměrovaná měření P/Q závislosti pro každou skupinu, zatímco přímky jsou jejich lineární regrese.
 * $p < 0,05$ pro sklony regresních přímek.

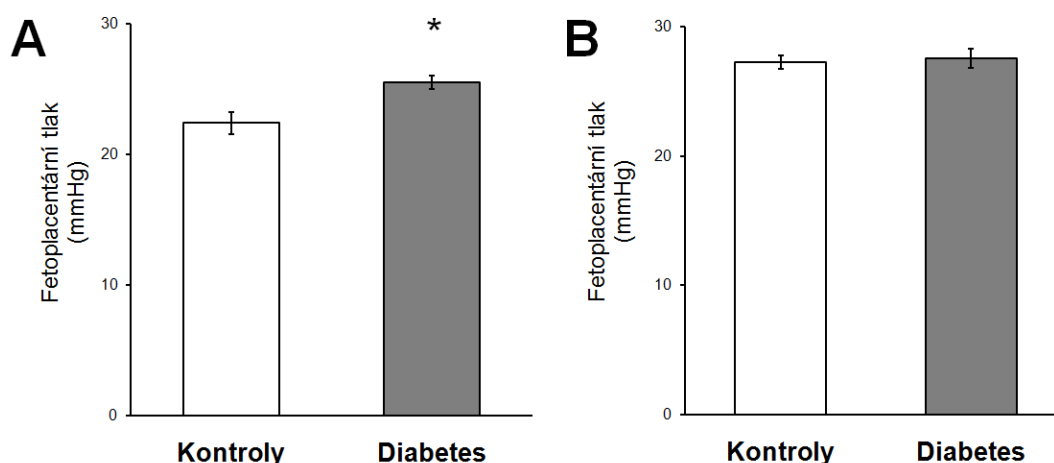
5.3 Experiment 3A – Vliv diabetu matky na fetoplacentární cévní rezistenci

Úspěšnost v navození diabetu byla 56% ze všech potkanů, kterým byl podán STZ. Diabetes matky neměl vliv na tělesnou hmotnost v den pokusu, hmotnost plodů diabetických potkanů byla významně nižší než u kontrol (Tab. 5.5). Nebyl prokázán žádný rozdíl mezi hmotnostmi placent. Podle očekávání, glykémie diabetických matek byla zvýšena ve srovnání s kontrolami. Hmotnosti pokusných placent se nelišily ve srovnání s hmotnostmi placent, které nebyly součástí tohoto experimentu ($p = 0,1805$). Nedošlo tedy k edému placent během perfuze.

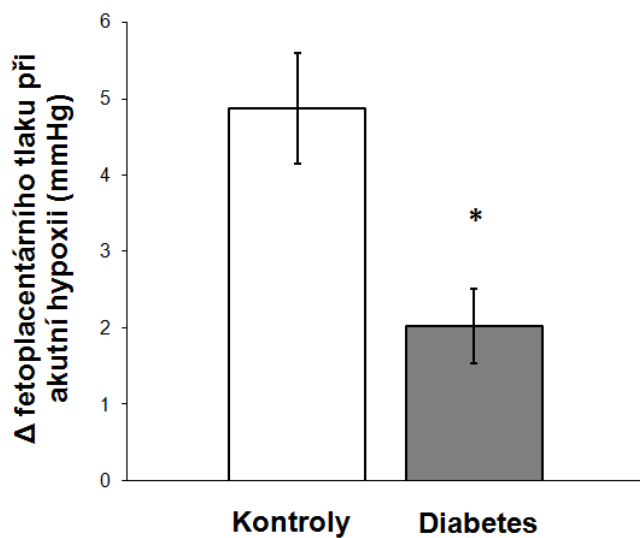
Tab. 5.5 - Hmotnosti matek, placent, plodů a glykémie matek (* p < 0,001).

skupina	Hmotnost těl matek (g)	Vlhká hmotnost perfundovaných placent (mg)	Vlhká hmotnost neperfundovaných (nepokusných) placent (mg)	Hmotnost plodů (g)	Glykémie matky (mmol/l)
Kontrolní	345 ± 18	456 ± 8	517 ± 14 (n = 21)	4,8 ± 0,1 (n = 28)	4,5 ± 0,3
Diabetická	335 ± 9	476 ± 26	477 ± 16 (n = 21)	4,1 ± 0,1* (n = 27)	20,3 ± 1,7*

Fetoplacentární tlak při bazální perfuzi 1 ml/min při normoxii byl významně vyšší u diabetické skupiny ve srovnání s kontrolní (26 oproti 22 mmHg, p < 0,01; Obr. 5.5A). Celá P/Q křivka při normoxii byla u diabetických placent posunuta k vyšším tlakům ve srovnání s kontrolami, nicméně rozdíl nepřesáhl hladinu statistické významnosti (p = 0,0951). Akutní hypoxie během bazálního průtoku vyvolala reverzibilní zvýšení fetoplacentárního tlaku v kontrolní skupině (o 22%, p < 0,001) a statisticky významně méně také v diabetické skupině (o 8%, p < 0,05; Obr. 5.5 B). Fetoplacentární tlak po 15 min trvající akutní hypoxii se nelišil mezi oběma skupinami (Obr. 5.5B). Zvýšení tlaku vyvolané hypoxií bylo signifikantně menší u diabetických (2 ± 0,5 mmHg) než u kontrolních potkanů (5 ± 0,7 mmHg, p < 0,001; Obr. 5.6). Neprokázali jsme rozdíl mezi P/Q křivkami obou skupin ani při akutní hypoxii.



Obr. 5.5 - Fetoplacentární tlak při průtoku 1ml/min u obou skupin potkanů v normoxii (A) a při akutní hypoxii (B). * signifikantně rozdílné od kontrolní skupiny, * p < 0,01.



Obr. 5.6 - Velikost HFPV. *signifikantně rozdílné od kontrolní skupiny (* $p < 0,001$).

5.4 Experiment 3B - Vliv diabetu matky a chronické hypoxie na fetoplacentární cévní rezistenci (neonatální model diabetu)

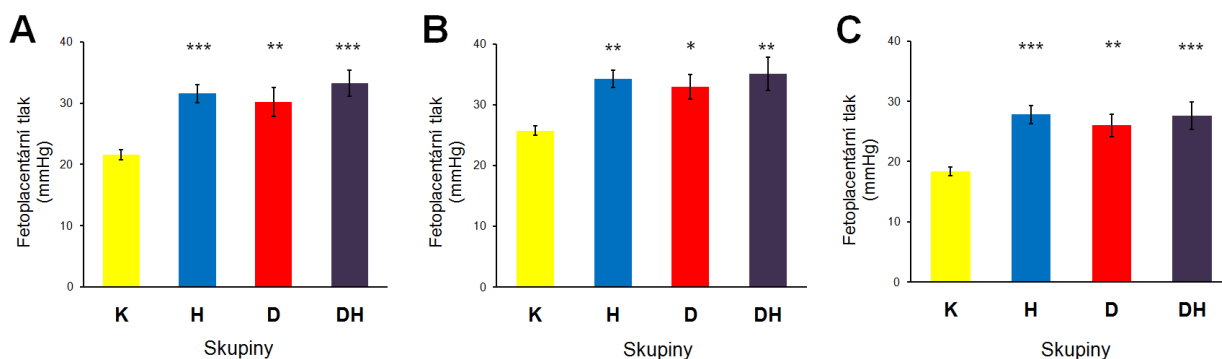
Matky vystavené chronické hypoxii (H a DH skupina) měly nižší tělesnou hmotnost než kontrolní skupina, ale experimentální diabetes hmotnost matky významně neovlivnil (Tab. 5.6). Tělesná hmotnost plodů nebyla ovlivněna samotnou hypoxií ani diabetem, ale kombinace diabetu plus hypoxie měla za následek významně menší plody. Hmotnosti placent se mezi skupinami nelišily, placento-fetální poměr byl vyšší u DH skupiny než u třech zbývajících skupin. U všech skupin se hmotnosti perfundovaných a neperfundovaných placent mezi sebou nelišily. Podle očekávání byl hematokrit matek podobně zvýšen v obou hypoxických skupinách, ale nebyl ovlivněn diabetem. Glykémie potkanů obou diabetických skupin (D a DH) měřená před zabřeznutím byla v rozmezí 8,3 - 25,1 mmol/l, což bylo významně více než v nediabetických skupinách. Před začátkem každého měření byla glykémie matek stále vyšší u diabetických potkanů D ve srovnání s oběma nediabetickými skupinami (které se mezi sebou navzájem nelišily), ale glykémie nebyla vyšší u DH potkanů.

Tab.5.6 - Charakteristika skupin.

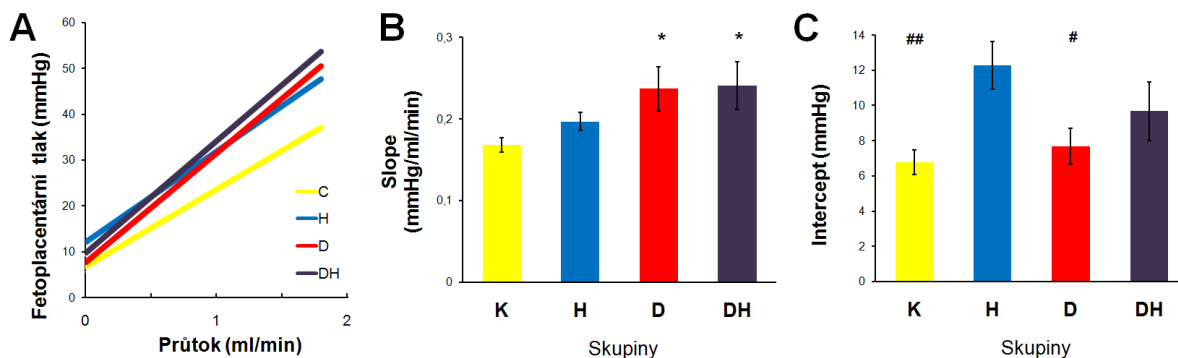
		skupina			
		K	H	D	DH
Hmotnost těl matek (g)		348 ± 10	311 ± 7 ^{**++}	346 ± 10	310 ± 7 ^{**++}
Vlhká hmotnost perfundovaných placent (mg)		521 ± 35	518 ± 38	574 ± 30	543 ± 20
Vlhká hmotnost neperfundovaných (nepokusných) placent (mg)		533 ± 12	565 ± 19	537 ± 22	525 ± 16
Hmotnost plodů (g)		4,6 ± 0,3 [†]	4,3 ± 0,3	4,5 ± 0,3 [†]	3,6 ± 0,3
Placento - fetální poměr		0,12 ± 0,006 [†]	0,137 ± 0,005	0,124 ± 0,01 [†]	0,150 ± 0,011
Počet mlád'at (medián hodnot)		14	13	12	11
Hematokrit		42,1 ± 1,2	48,8 ± 1,5 ^{**+}	44,0 ± 1,0	49,9 ± 1,7 ^{***++}
Glykémie (mmol/l)	6 - 10 týden věku	6,5 ± 0,4	6,2 ± 0,3	13,6 ± 2,3 ^{*#}	12,1 ± 1,8 ^{**##}
	16 - 20 týden věku (tj. den experimentu)	5,2 ± 0,2 ⁺⁺	4,8 ± 0,2 ⁺⁺	12,0 ± 3,0	6,4 ± 1,1 ⁺

* signifikantně rozdílné od K skupiny (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001), # od H skupiny (# p < 0,05, ## p < 0,01), + od D skupiny (+ p < 0,05, ++ p < 0,01), † od DH skupiny († p < 0,05).

Fetoplacentární perfuzní tlak při konstantním bazálním průtoku 1 ml/min (přímo odrážející cévní rezistenci) při normoxických podmínkách se nelišil mezi skupinami H, D a DH a ve všech třech skupinách byl významně vyšší než v kontrolní (K) skupině (Obr. 5.7A). Podrobnější analýza odporových vlastností fetoplacentární cirkulace měřením P/Q potvrdila vyšší odpor u skupin H, D a DH než u kontrol (Obr. 5.8A). Vztah mezi perfuzním tlakem a průtokem krve byl lineární (lineární regresní koeficient > 0,985), pro každou skupinu byla konstruována regresní přímka. Tyto přímky byly hodnoceny pomocí dvou parametrů: směrnice (sklonu, slope) a průsečíku s osou tlaku (intercept). Chronická hypoxie bez diabetu (H) způsobila paralelní posun P/Q přímky směrem k vyšším tlakům (vyšší hodnota průsečíku s tlakovou osou ve skupině H než u kontrolní skupiny, beze změny směrnice), experimentální diabetes bez hypoxie (D) zvýšil strmost P/Q přímky (vyšší směrnice ve skupině D než u kontrolní skupiny, beze změny hodnoty interceptu). Když byla hypoxie v kombinaci s diabetem (skupina DH), směrnice byla podobně zvýšená jako ve skupině D, zatímco intercept nebyl významně odlišný od skupiny H (Obr. 5.8B, C).

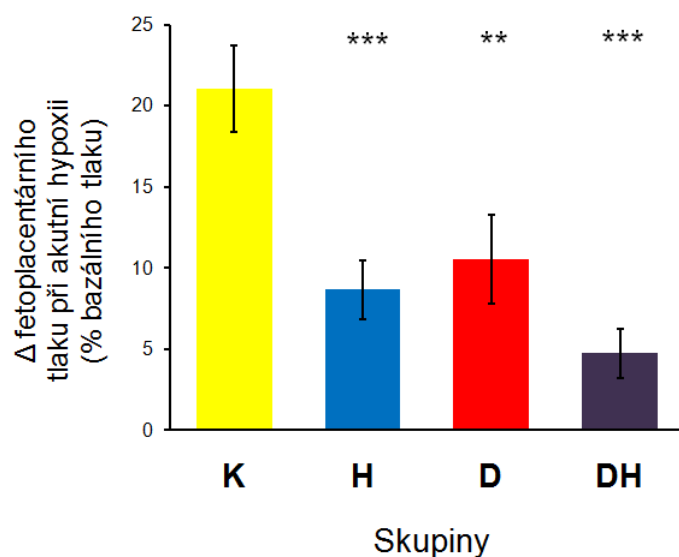


Obr. 5.7 – Fetoplacentární perfuzní tlak během konstantního průtoku při normoxii (A), akutní hypoxii (B) a akutní hypoxii po podání fasudilu (C). *signifikantně rozdílné od kontrolní (K) skupiny (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Obr. 5.8 – Závislost tlaku na průtoku (P/Q) všech skupin při normoxii. Zvýšení perfúzního tlaku bylo vyvoláno kontinuálním zvyšování průtoku (během 120 sekund). Přímkové jsou lineární regrese pro každou skupinu (A). Směrnice (B) a hodnoty průsečíku P/Q přímků s osou perfuzního tlaku (C). *signifikantně rozdílné od kontrolní (K) skupiny (* $p < 0,05$), #signifikantně rozdílné od hypoxické (H) skupiny (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$).

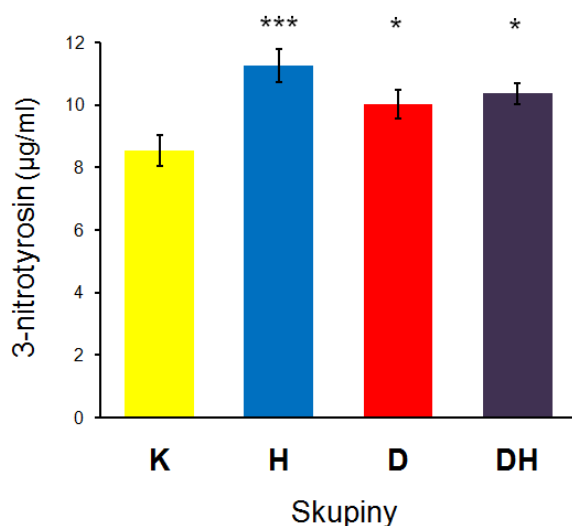
Ve všech skupinách vyvolala akutní hypoxická výzva (při konstantní rychlosti průtoku) statisticky významný nárůst perfuzního tlaku (Obr. 5.7B). Relativní velikost této akutní hypoxické fetoplacentární vazokonstrikce (HFPV), vyjádřená jako % bazálního perfuzního tlaku v normoxii, byla snížena podobně chronickou hypoxií, experimentálním diabetem i jejich kombinací (Obr. 5.9).



Obr. 5.9 - Velikost HFPV, *signifikantně rozdílné od kontrolní (K) skupiny (**p < 0,01, ***p < 0,001).

HFPV byla zcela zrušena podáním inhibitoru Rho kinázy fasudilu, a to ve všech skupinách. Ve skutečnosti perfuzní tlak poklesl dokonce pod normoxickou hodnotu (asi o 13% ve všech skupinách) (Obr. 5.7C). I po podání fasudilu přetrvaly rozdíly v perfuzním tlaku mezi skupinami stejně tak, jak byly naměřeny během normoxie (Obr. 5.7A).

Fetální plazmatické koncentrace 3-nitrotyrosinu byly významně zvýšeny ve všech experimentálních skupinách (H, D, DH) ve srovnání s kontrolami (Obr. 5.10).



Obr. 5.10 - Měření koncentrace 3-nitrotyrosinu ve fetální krvi. *signifikantně rozdílné od kontrolní (K) skupiny (*p < 0,05, ***p < 0,001).

6. DISKUZE

6.1 Experimentální model

Placenta potkana je vzhledem k četným podobnostem (konverze spirálních arterií, hloubka invaze endovaskulárního trofoblastu) velice vhodným pokusným modelem pro studium normálního i patologického těhotenství u člověka (Caluwaerts et al., 2005).

6.2 Experiment 1 - Inhibice Rho kinázy fasudilem oslabuje akutní hypoxickou fetoplacentární vazokonstrikci u potkana

Tato studie prokázala podstatnou roli Rho kinázové signální dráhy v mechanismu HFPV. V předchozích experimentech na lidské placentě dokonce i velmi nízká dávka nifedipinu (1nM) - selektivního blokátoru L-typu napěťově řízených vápníkových kanálů buněčné membrány - zcela zablokovala HFPV (Jakoubek et al., 2006). To dokázalo zásadní roli těchto kanálů v mechanismu HFPV. Zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů při HFPV v konečném důsledku aktivuje kinázu lehkého řetězce myosinu (MLCK), která fosforylací lehkého řetězce myosinu (MLC) umožňuje kontrakci hladké svalové buňky v cévní stěně a tím vazokonstrikci. Z plicních cév je ale známo (Leach et al., 1994), že udržení vazokonstrikce (iniciované nejprve vtokem vápenatých iontů) je možné i jiným mechanismem. Hlavním známým mechanismem trvalé fosforylace MLC je inhibice enzymu fosfatázy lehkého řetězce myosinu (MLCP), který MLC defosforyluje, prostřednictvím systému Rho kinázy - jde o Ca^{2+} senzitivizaci (Somlyo a Somlyo, 1994; Sylvester et al., 2012). Také naše studie potvrzuje, že aktivita Rho kinázy je předpokladem pro HFPV. S největší pravděpodobností je pro HFPV nezbytný jak Ca^{2+} influx přes L-typy kanálů (Jakoubek et al., 2006), tak Rho kinázou zprostředkovaná Ca^{2+} senzitivizace (tato studie). Tento závěr jsme ale postavili na výsledcích dvou experimentů, které byly provedeny na odlišných druzích (Jakoubek provedl pokus na preparátu lidské placenty, naše studie byla provedena na placentě potkana). Ačkoli nelze vyloučit možnost, že L-kanály jsou důležitější v lidské placentě (Jakoubek et al., 2006), zatímco Ca^{2+} senzitivizace převládá v mechanismu HFPV u placenty potkana (naše studie), nepovažujeme tento mezidruhový rozdíl za pravděpodobný.

Pro podrobnější zhodnocení podání fasudilu během doby hypoxické expozice na fetoplacentární hemodynamické parametry jsme zvolili hodnocení vztahu P/Q na preparátu izolované, dvojitě perfundované placenty. Zatím v literatuře zcela chybí fyziologická

interpretace závislosti tlaku na průtoku (P/Q) v placentě. Vycházíme z podobnosti fetoplacentárních cév s plicními. Jednalo se o lineární závislost, v plicních cévách ji charakterizují dva parametry - směrnice neboli sklon přímky (slope) a hodnota průsečíku s osou perfuzního tlaku, který vznikne extrapolací přímky k nulovému průtoku (Obr. 4.2). Podle Starlingova modelu rezistoru (Herget a Hampl, 1995) můžeme zjednodušeně říci, že hodnota slope odpovídá přírůstkovému odporu, čili odporu, který klade plicní cévní řečiště zvyšujícímu se průtoku. Vyšší hodnota slope může být způsobena sníženou poddajností cév nebo zmenšením celkové plochy jejich průřezu. Hodnota interceptu je interpretována jako kritický uzavírací tlak, tj. nejnižší tlak, při kterém ustane perfuze do cévy a který je určen silami působícími proti kolapsu středního kolapsibilního segmentu (intravaskulární tlak) a silami uzavírající tento segment (perivaskulární tlak, intraalveolární tlak a aktivní tonus stěn cév). Koreluje s bazálním tonem plicních cév. Měření závislosti tlaku na průtoku podpořilo závěr naší práce, tedy že HFPV lze zabránit bloádou signální dráhy Rho kinázy. Mechanické vlastnosti placentárních cév byly podáním fasudilu změněny. V pokusu vyšlo, že během celé doby trvání akutní hypoxické challenge byly u skupiny s fasudilem hodnoty fetoplacentárního tlaku vždy nižší pro danou velikost průtoku než tomu bylo u kontrol. Navíc vyšlo, že rozdíl mezi skupinami nebyl kvůli velikosti interceptu, v něm mezi skupinami nebyl významný rozdíl. Naproti tomu skupina s fasudilem měla významně menší směrnici závislosti P/Q ve srovnání s kontrolní skupinou. V plicních cévách tento parametr odpovídá odporovým vlastnostem cév, které se nachází před kolapsibilním segmentem (Mitzner a Huang, 1987). Analogicky se tedy domníváme, že místo HFPV citlivé k inhibici Rho kinázy tak leží vzhůru od nejperifernějších kolapsibilních cév. Pro přesnou lokalizaci působení HFPV bude ale zapotřebí dalších studií.

Fetoplacentární oběh je zcela odlišný od jiných cévních řečišť tím, že za normálních okolností má minimální klidový cévní tonus. Podobá se tím dospělému plicnímu cévnímu řečišti. Hampl (Hampl et al., 2002) v pokusu na izolovaném perfundovaném kotyledonu lidské placenty přidal do perfuzátu silnou vazodilatační látku nitroprusid sodný ve vysoké dávce a jejím prostřednictvím chtěl zjistit stupeň aktivního napětí cévní stěny za klidových podmínek. Neprokázal žádnou změnu, nitroprusid již nebyl schopen redukovat cévní tonus ve fetoplacentárních cévách toho druhu. Je zajímavé, že v naší práci po podání fasudilu došlo k významnému snížení klidového cévního odporu, o cca 18%. Podobně působil v plicích inhibitor Rho kinázy Y-27632, který také snížil bazální perfuzní tlak (Nagaoka et al., 2004). Fasudil se tedy zdá být mnohem silnějším vazodilatátorem než nitroprusid. V našem experimentu 3B byl fasudil přidán do perfuzátu na izolované potkanní placentě při akutní

hypoxické challenge. Došlo nejen ke kompletní reverzi HFPV, ale perfuzní tlak se snížil o takřka 15% pod úroveň bazálního tlaku u kontrolní skupiny při normoxii.

Na konci pokusu byl perfuzát s fasudilem vyměněn za čerstvý, bez fasudilu, při akutní hypoxii pak došlo k plnému obnovení HFPV. Tím byla vyloučena možnost, že by inhibici HFPV fasudilem způsobil edém nebo jiný artefakt způsobený prolongovanou perfuzí preparátu.

Tato studie ukázala, že Rho kinázou zprostředkovaná Ca^{2+} senzitivace přispívá k udržení klidového fetoplacentárního cévního odporu a hraje klíčovou roli v mechanismu HFPV. Inhibitory Rho kinázy by tak mohly potenciálně být užitečné v terapii onemocnění jako je intrauterinní růstová restrikce, kde je HFPV považována za klíčový patofyziologický faktor.

6.3 Experiment 2 - Chronická hypoxie zvyšuje periferní cévní odpor placenty potkana při perfuzi krví

Tato studie prokázala, že hypoxie během poslední třetiny délky březosti potkana vede ke zvýšení cévního odporu na fetální straně placenty perfundované krví. Tento výsledek je v souladu s předchozím pokusem z naší laboratoře, kde byl ale preparát perfundovaný Krebsovým roztokem (Jakoubek et al., 2008). Rozdíl v perfuzním tlaku mezi skupinami v absolutních hodnotách (mmHg) byl sice zvýšen náhradou málo viskózního Krebsova roztoku krví o mnohem vyšší viskozitě, ale relativní zvýšení (vyjádřené % tlaku kontrolní skupiny) bylo ve skutečnosti nižší. Je však zřejmé, že perfuze krví odráží klinicky relevantní situaci lépe než perfuze Krebsovým roztokem. Nicméně naše výsledky ukázaly, že pro studium účinků hypoxie na fetoplacentární cévní rezistenci není nutné používat technicky poněkud složitější (a náročnější pro použití pokusných zvířat) model krví perfundované placenty; dostatečný byl model placenty perfundované Krebsovým roztokem.

Byla použita krev z dospělých dárců namísto fetální krve, která je ve fetoplacentárních cévách in vivo. Tímto by však nemělo dojít ke zkreslení výsledků, neboť obě krve mají podobnou viskozitu. Fetální krev má poněkud vyšší hematokrit, ale zase nižší viskozitu plazmy (Linderkamp et al., 1992; Reinhart et al., 1985).

Mechanismy působení chronické hypoxie na fetoplacentární cévy byly dosud minimálně prozkoumány. Jednou z možností je zvýšené napětí cévního hladkého svalu. Avšak ani vysoká dávka účinné vazodilatační látky (nitroprusid sodný) nesnížila vysoký

fetoplacentární cévní odpor u chronicky hypoxických matek (Jakoubek et al., 2008). V experimentu 3B jsme prokázali, že jiná silná vazodilatační látka fasudil (inhibitor Rho kinázy) snížila pouze částečně cévní odpor. U chronicky hypoxické skupiny zůstal významně zvýšený ve srovnání s kontrolní normoxickou skupinou. Je však možné, že vazomotorická složka zvýšeného odporu může být vyšší v podmínkách in vivo, protože naše měření byla provedena za normoxických podmínek (např. pO_2 byl vyšší než v děloze). Vzhledem k tomu, že akutní hypoxie způsobuje fetoplacentární vazokonstrikci (Hampl et al., 2002, Jakoubek et al., 2006), je možné, že za hypoxických podmínek v děloze může být vazokonstrikční složka ještě vyšší.

Není tedy pravděpodobné, že by prostá vazokonstrikce byla hlavní příčinou pozorovaného zvýšeného cévního odporu. Jako jiné možné vysvětlení zůstává morfologická přestavba fetoplacentárních cév při chronické hypoxii podobná té, která se při hypoxii odehrává v plicním řečišti. Popsána byla v úvodu práce. Nedávná práce Hvizdošové-Klešcové popsala morfologické změny, které mohou mít za následek zvýšený cévní odpor (Hvizdošová-Klešcová et al., 2013).

Zvýšení fetoplacentárního cévního odporu při chronické hypoxii bylo spíše v důsledku zvýšení směrnice (sklonu) P/Q přímek než jejich paralelního posunu (tj. zvýšené hodnoty průsečíku s osou perfuzního tlaku). Tento náš výsledek je ve shodě s prací Jakoubka (Jakoubek et al., 2008), ve které se však závislost tlaku na průtoku měří jinak: nikoli kontinuálním zvyšováním průtoku až na dvojnásobek, ale postupným zvyšováním průtoku stupňovitě po 0,2 ml/min až na 1,8 ml/min, kdy každý krok trval cca 2 min. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny užitím analýzy rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření, proto směrnice a hodnota průsečíku s osou perfuzního tlaku nebyly určeny. Tvar a vzájemná poloha P/Q křivek normoxické a chronicky hypoxické skupiny jsou podobné jako v naší studii s tím rozdílem, že ale samozřejmě každá hodnota průtoku odpovídala nižšímu tlaku v placentě perfundované Krebsem (Jakoubek et al. 2008) než krví (naše studie).

Jak již bylo zmíněno, při fyziologické interpretaci směrnice a hodnoty průsečíku s osou perfuzního tlaku P/Q přímek vycházíme z analogie plicních cév (Herget a Hampl, 1995). Zvýšený sklon P/Q přímky může odpovídat snížené poddajnosti fetoplacentárních cév nebo úbytku celkové plochy jejich průřezu.

Metodologickým omezením této práce bylo, že jsme nedosáhli podobné velikosti pO_2 jako u plodu v děloze (Rodesch et al., 1992). To by však mělo spíše snížit než zvýšit rozdíly v cévním odporu mezi chronicky hypoxickou a normoxickou skupinou. V podmínkách in vivo (tedy za signifikantně nižšího pO_2) by se dalo očekávat, že rozdíl mezi skupinami

bude ještě větší kvůli přítomnosti hypoxické vazokonstrikce u chronicky hypoxické skupiny. Je známo, že hypoxická fetoplacentární vazokonstrikce je potencována chronickou hypoxií (Jakoubek et al., 2008). Chronická hypoxie v děloze také vyvolává polycytémii u fětů (Postigo et al., 2009; Soothill et al., 1987), která rovněž zvýší rozdíl mezi hypoxickými a kontrolními potkany ve srovnání s naším pokusem, kde jsme perfundovali normocytémickou krví dospělých dárců.

V tomto experimentu byli potkani vystaveni vlivu chronické hypoxie během posledního týdne s celkových 3 týdnů trvání březosti. Je to srovnatelné s poslední třetinou těhotenství u člověka. K hypoxii tak došlo v době, kdy již byla dokončena embryogeneze, a proto jde jen o vliv chronické hypoxie na již plně vyvinutý fetoplacentární cévní systém.

Chronická hypoxie během poslední třetiny březosti vedla k signifikantnímu zvýšení fetoplacentárního cévního odporu v izolované, krví perfundované placentě. Potvrdili jsme tím naši hypotézu, neboť rozdíl v perfuzním tlaku mezi kontrolní a chronicky hypoxickou skupinou byl vyšší při perfuzi krví než při perfuzi méně viskóznějším Krebsovým roztokem. Vyjádříme-li ale tento rozdíl jako procenta tlaku kontrolní skupiny, je ve skutečnosti menší v krví perfundovaných preparátech než v preparátech perfundovaných Krebsovým roztokem. Závěrem lze tedy říci, že použití laboratorně a metodologicky složitější perfuze krví nepřináší žádné jasné výhody pro studium účinků hypoxie na fetoplacentární cévy ve srovnání s jednodušší perfuzí Krebsovým roztokem. Zvýšení fetoplacentární cévní rezistence o 22% v našem pokusu způsobené chronickou hypoxií matky patrně sníží perfuzi placenty, to bude mít za následek podvýživu plodu a pravděpodobnou růstovou restrikcí se všemi známými neonatálními i dlouhodobými škodlivými následky.

6.4 Experiment 3A + 3B - Diabetes matky a chronická hypoxie zvyšují fetoplacentární cévní rezistenci u potkanů

Chronická hypoxie vyvolala zvýšení fetoplacentární cévní rezistence, tento výsledek je v souladu s pokusem Jakoubka (Jakoubek et al., 2008) i s našimi daty (Experiment 2). Významně vyšší fetoplacentární tlak při konstantním bazálním průtoku byl naměřen u plodů diabetických matek jak na modelu neonatálního diabetu (Experiment 3B), tak tehdy, pokud byl streptozotocin aplikován již březím samicím (Experiment 3A). Neprokázalo se, že by se účinek chronické hypoxie a diabetu sčítal. Možným vysvětlením je, že na zvýšení fetoplacentárního odporu u hypoxie i diabetu se podílí podobné mechanismy. Další pravděpodobné vysvětlení vychází z analogie s plicním cévním řečištěm. Je známo, že

chronická hypoxie způsobuje plicní arteriální hypertenzi (Reeves a Herget, 1984). U diabetu bylo prokázáno zvýšení venózního vazomotorického tonu (Russ a Tobin, 1996). Jestliže tedy dojde v důsledku chronické hypoxie při zvyšování průtoku k otevření menšího počtu arteriol ve srovnání s normoxickou placentou, potom zúžení navazujících vén v části distálně od tohoto úseku již nijak neovlivní celkový placentární odpor. Předpokládáme, že v důsledku diabetu dojde k zúžení ve venózní části u všech cév (zvýšení perfuzního tlaku u diabetické skupiny D), avšak na navýšení celkového odporu u skupiny s diabetem + hypoxií (DH) se podílí pouze ty vény, které navazují na otevřené arterioly. Zvýšení celkového odporu DH placenty v důsledku diabetu je tedy relativně malé. S tím přesně korespondují naše výsledky, kdy u skupiny s kombinovaným poškozením (DH) došlo k mírnému, avšak nesignifikantnímu nárůstu perfuzního tlaku oproti skupinám D a H.

K popisu vlastností cévního řečiště byla použita závislost tlaku na kontinuálně se zvyšujícím průtoku. Chronická hypoxie způsobila paralelní posun P/Q přímky a významně zvýšila hodnotu interceptu s osou perfuzního tlaku, která odpovídá kritickému uzavíracímu tlaku. Diabetes v našem neonatálním modelu (Experiment 3B) naproti tomu zvýšil směrnici přímky P/Q, aniž by významně posunul hodnotu interceptu (kritický uzavírací tlak).

V obou experimentech (3A + 3B) akutní hypoxická challenge vyvolala vazokonstrikci, která byla ale u všech experimentálních skupin významně menší než u kontrol. Je známo, že u pokusu s izolovanými plícemi bylo přidání glukózy do perfuzátu spojeno se sníženou tlakovou odpovědí na hypoxii (HPV) (Rounds et al., 1981). Naopak perfuze bez glukózy potencovala hypoxickou vazokonstrikci (Stanbrook a McMurtry, 1983). V citovaných pokusech se ale jednalo o vliv akutní glykémie na HPV, nikoli o následek diabetu. Účinek diabetu na vazomotorickou odpověď plicních cév okrajově zmiňují Russ a Tobin (1996), když u diabetických potkanů uvádějí významně sníženou presorickou odpověď na vazokonstrikční stimulus vyvolaný analogem tromboxanu U-46619. Nižší reaktivitu na vazokonstrikční podněty u lidského fetoplacentárního cévního řečiště při diabetu prokázali i Kossenjans et al. (2000). Naše zjištění zcela odpovídají literárním údajům. Kossenjans et al., (2000), ale i další autoři (Lyall et al., 1998; Myatt a Cui, 2004) dávají změnu vaskulární reaktivity při diabetu do souvislosti se zvýšenou produkcí peroxynitritu a následným oxidačním poškozením cévní stěny. Pokud se týká poškození placentární cirkulace chronickou hypoxií, nálezy se rozcházejí. Větší odpověď fetoplacentárních cév na akutní hypoxickou challenge v Jakoubkově studii (Jakoubek et al., 2008) by mohla být ovlivněna rozdílným experimentálním protokolem, kde akutní hypoxii předcházela opakovaná aplikace

angiotensinu II, který nebyl podáván v naší studii. Nicméně vliv chronické hypoxie na akutní hypoxickou challenge ještě musí být osvětlen. Při společném vlivu diabetu a hypoxie se HFPV ještě snížila, ale rozdíl oproti HFPV u potkanů s diabetem nebo u potkanů vystavených pouze chronické hypoxii nebyl signifikantní.

Přidání silného vazodilatátoru fasudilu do perfuzátu způsobilo snížení fetoplacentárního tlaku pod bazální úroveň. To je v souladu s výsledkem experimentu 1, kde fasudil navíc kompletně zabránil HFPV. Fasudil jsme použili k průkazu toho, jaký je podíl vazokonstrikce na zvýšení fetoplacentárního cévního odporu. Po podání fasudilu došlo u všech experimentálních skupin ke snížení tlaku jen poměrně, nikoliv na úroveň tlaku u kontrolní skupiny. Z toho vyvozujeme, že zvýšení bazálního tlaku u všech experimentálních skupin není způsobeno jenom vazokonstrikcí, ale i jinými mechanismy, které bohužel nejsou známy. Mohlo by jít o morfologickou přestavbu cévního řečiště. Již byly popsány morfologické změny u chronicky hypoxických placent (Hvizdošová-Kleščová et al., 2013), které by mohly způsobovat zvýšený fetoplacentární odpor. Jsou popsány i morfologické změny ve fetální části diabetických placent - ztlustění bazální membrány, syncytiotrofoblast s fibrinovými depozity, hyperplazie cytotrofoblastu (al-Okail a al-Attas, 1994), fibrinoidní nekrózy a cévní léze (Daskalakis et al., 2008). Závažné degenerativní cystické léze v spongiózní vrstvě placenty byly také popsány v placentě potkana s diabetem (Prager et al., 1974). I tyto morfologické změny by mohly být příčinou zvýšeného fetoplacentárního odporu.

Přítomnost oxidačního stresu u fétů všech experimentálních skupin v pokusu 3B jsme prokázali významně zvýšenou hladinou nitrotyrosinu v jejich plazmě. To je v souladu s literárními údaji, které prokázaly zvýšený nitrotyrosin v endotelu i ve stromatu diabetických placent (Lyll et al., 1998) a v plazmě laboratorních potkanů při chronické hypoxii (Hodyc et al., 2012).

Neonatální model diabetu u potkana byl popsán jako vhodný experimentální model diabetu 2. typu (King, 2012), velmi podobný reálnému diabetu u těhotných (Sinzato et al., 2012). Zvířata s diabetem a současně vystavená hypoxii měla nižší tělesnou hmotnost a nižší glykémii v den pokusu kvůli sníženému příjmu potravy během prvních dnů chronické hypoxické expozice.

7. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá mechanismy, které ovlivňují reaktivitu fetoplacentárních cév na hypoxii. Výsledky této dizertační práce přinesly následující nové poznatky:

Prokázali jsme hypotézu, že Rho kinázová signální dráha se podílí na změně periferního odporu při HFPV. Inhibice Rho kináz fasudilem způsobila signifikantní pokles bazálního tonu fetoplacentárních cév. Fasudil inhiboval akutní hypoxickou fetoplacentární vazokonstrikci u laboratorního potkana. Látky typu inhibitoru Rho kinázy by tedy mohly být užitečným nástrojem v terapii poruch spojených s hypoxií placenty.

Naše výsledky rovněž podporují hypotézu, že chronická hypoxie zvyšuje cévní odpor na fetální straně placenty při perfuzi krví u laboratorního potkana. Toto zvýšení je alespoň zčásti rezistentní vůči akutní reoxygenaci (při normoxických podmínkách perfuze). Nepodílí se na něm zvýšený cévní tonus. Použití složitější perfuze krví nepřineslo žádné jasné výhody pro studium účinků hypoxie na fetoplacentární cévy ve srovnání s laboratorně a metodologicky jednodušší perfuzí Krebsovým roztokem.

Výsledky dále potvrzují hypotézu, že diabetes matky zvyšuje fetoplacentární cévní odpor. Na tomto zvýšení se nepodílí jen prostá vazokonstrikce. Velikost akutní hypoxické fetoplacentární vazokonstrikce je signifikantně menší u diabetických potkanů než u kontrolních potkanů. Společné působení diabetu a chronické hypoxie nemá aditivní účinek na odpor fetoplacentárních cév. Za nejpravděpodobnější vysvětlení považujeme to, že v důsledku diabetu dojde k zúžení ve venózní části cévního řečiště, zatímco v důsledku chronické hypoxie dojde ke konstrikci rezistentních arteriol. Zúžení ve venózní části cév již dále nesníží průtok, který byl omezen konstrikcí v arteriální části cév chronickou hypoxií.

Problematika vlivu hypoxie na fetoplacentární cévní systém a její farmakologické ovlivnění nebyly podle literárních údajů dosud dostatečně studovány a získané výsledky by mohly doplnit představy o vzniku intrauterinní růstové retardace (IUGR) a preeklampsie.

8. ABSTRAKT

Placenta a plíce jsou jediné orgány, které plní funkci okysličování krve a mají společnou vlastnost - vazokonstrikci jako akutní reakci na hypoxii. Reagují tedy opačně než systémové cévy. V prezentované práci jsme se zaměřili na mechanismy regulace fetoplacentárních cév při stavech spojených s hypoxií. Byl použit experimentální model izolované, dvojité perfundované placenty potkana.

Naše výsledky prokazují významnou roli signální dráhy Rho kinázy v mechanismu této hypoxické fetoplacentární vazokonstrikce (HFPV).

Chronické působení hypoxie na fetoplacentární cévy vede k trvalému zvýšení odporu cévního řečiště. Toto bylo prokázáno v experimentu s perfuzí fetoplacentárních cév málo viskózním solným roztokem. Naše výsledky ukazují významné zvýšení fetoplacentárního odporu cév při perfuzi krví, tedy za podmínek, které se blíží situaci in vivo. Zvýšení odporu může vést k placentární hypoperfuzi a následně k podvýživě plodu, což je považováno za jednu z klíčových příčin vážných fetálních a novorozeneckých morbidit, zejména intrauterinní růstové retardace.

Diabetes mellitus je známých faktorem ovlivňujícím růst plodu. Stejně jako při chronické hypoxii, tak i při diabetu působí na stěny cév radikálový stres. Plody diabetických matek mají řadu znaků svědčících pro hypoxii. Působení diabetu na fetoplacentární hemodynamiku však dosud není známo. Naše výsledky prokazují významné zvýšení fetoplacentárního odporu cév při diabetu matky. Není způsobené jen vazokonstrikcí. Společné působení diabetu a chronické hypoxie nemělo aditivní účinek, což by mohlo svědčit o účasti podobných mechanismů na zvýšení fetoplacentárního odporu a/nebo o poškození různých oddílů (arteriální nebo venózní) fetoplacentárního cévního řečiště při chronické hypoxii a při diabetu.

Poznání mechanismů účinků hypoxie na fetoplacentární cévy může pomoci v terapii stavů, na jejichž vzniku se podílí chronická intrauterinní hypoxie.

Klíčová slova: placenta, hypoxická fetoplacentární vazokonstrikce, Rho kináza, hypoxie, intrauterinní růstová retardace, diabetes, radikálový stres

ABSTRACT

The placenta and the lungs are the only organs that perform a function of blood oxygenation and have a common characteristic - vasoconstriction in response to acute hypoxia. Thus the reaction is in an opposite manner than smooth muscle of systemic arteries does. In this study we focused on the mechanisms that regulate fetoplacental blood vessels in conditions associated with hypoxia. An experimental model of isolated dually perfused rat placenta was used.

Our findings demonstrate an essential role of Rho kinase signaling pathway in the mechanism of this hypoxic fetoplacental vasoconstriction (HFPV).

Chronic exposure to hypoxia causes a sustain elevation of vascular resistance on fetoplacental blood vessels. It was demonstrated in experiment with low-viscosity salt solution perfusion. Our current results show a significant increase of the fetoplacental vascular resistance with blood perfusion which better reflects in vivo conditions. An increase in fetoplacental vascular resistance may lead to placental hypoperfusion and consequent fetal undernutrition, which is considered one of the key causes of serious fetal and neonatal problems, especially intrauterine growth restriction.

Diabetes mellitus is a well-known factor affecting fetal growth. Both chronic hypoxia and diabetes act on vessels partly through redox alterations. The fetuses of diabetic mothers have a number of characteristics indicative of fetal hypoxia. However the effects of diabetes on the fetoplacental hemodynamics are not yet known. Our results show a significant increase of fetoplacental vascular resistance in diabetic mothers, not only due to vasoconstriction. Diabetes and chronic hypoxia together do not have an additive effect on fetoplacental vessel resistance which could indicate the involvement of similar mechanisms of the elevation of fetoplacental resistance and/or impairment of different sections (arterial or venous) of fetoplacental vascular bed in chronic hypoxia and diabetes.

Understanding the mechanisms of the effects of hypoxia on fetoplacental vessels thus might ultimately facilitate new treatments of impairments where chronic intrauterine hypoxia is involved.

Key words: placenta, hypoxic fetoplacental vasoconstriction, Rho kinase, hypoxia, intrauterine growth restriction, diabetes, oxidative stress

9. LITERATURA

- al-Okail MS a al-Attas OS: Histological changes in placental syncytiotrophoblasts of poorly controlled gestational diabetic patients. *Endocr J.* 1994, **41**(4), 355-360.
- American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2004, **27** Suppl 1, S88-90.
- Arbeille P. Fetal arterial Doppler-IUGR and hypoxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997, **75**(1), 51-53.
- Ark M, Yilmaz N, Yazici G, Kubat H a Aktaş S. Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta.* 2005, **26**(1), 81-84.
- Aucott SW, Donohue PK a Northington FJ. Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction. *J Perinatol.* 2004, **24**(7), 435-40.
- Barer GR. Active control of the pulmonary circulation. In *Pulmonary Circulation in Health and Disease*. Ed. Cumming G. & Bonsignore G. Plenum Press, 1979, pp. 81-99.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T a Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002, **31**(6), 1235-1239.
- Bíbová J, Chalupský K, Hojná S a Hampl V. Hypoxia reduces eNOS expression in hypoxic rat placentas. *Physiol Res.* 2005, **54**, 16P.
- Bishop JE, Guerreiro D a Laurent GJ. Changes in the composition and metabolism of arterial collagens during the development of pulmonary hypertension in rabbits. *Am Rev Respir Dis.* 1990, **141**(2), 450-455.
- Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN a Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes.* 1981, **30**(1), 64-69.
- Bracero L, Schulman H, Fleischer A, Farmakides G a Rochelson B. Umbilical artery velocimetry in diabetes and pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1986, **68**(5), 654-658.
- Braslasu ED, Bradalan C, Cornila M, Savulescu I, Cojmaleala R a Braslasu MC: Normal blood glucose in white wistar rat and its changes following anesthesia. *Lucrari stiintifice medicina veterinara.* 2007, vol. **XL**, 120-123.
- Brodsky D a Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med.* 2004, **19**, 307-319.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E a Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta.* 2009, **30**(6), 473-482.

- Byrne BM, Howard RB, Morrow RJ, Whiteley KJ a Adamson SL. Role of the L-arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction. *Placenta*. 1997, **18**(8), 627-634.
- Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C a Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta*. 2005, **26**(7), 574-584.
- Ceriello A, dello Russo P, Amstad P a Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*. 1996, **45**(4), 471-477.
- Crandell SS, Fisher DJ a Morriss FH Jr. Effects of ovine maternal hyperglycemia on fetal regional blood flows and metabolism. *Am J Physiol*. 1985, **249**(5 Pt 1), E454-460.
- Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, Iessi IL, Corvino SB, Serrano RG, Marini G, Piculo F, Calderon IM a Rudge MV. Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res*. 2013; 2013: **473575**.
- DeSisto CL, Kim SY, Sharma AJ. Prevalence estimates of gestational diabetes mellitus in the United States, Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS), 2007-2010. *Prev Chronic Dis*. 2014, **11**, E104.
- Daskalakis G, Marinopoulos S, Krielesi V, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S a Antsaklis A.: Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008, **87**(4), 403-407.
- Emery CJ, Bee D a Barer GR. Mechanical properties and reactivity of vessels in isolated perfused lungs of chronically hypoxic rats. *Clin Sci*. 1981, **61**, 569-580.
- Eriksson UJ a Jansson L. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. *Pediatr Res*. 1984, **18**(8), 735-738.
- Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG a McMurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004, **287**(4), L656-664.
- Farber HW a Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004, **351**(16), 1655-1665.
- Figuroa R, Omar HA, Tejani N a Wolin MS: Gestational diabetes alters human placental vascular responses to changes in oxygen tension. *Am J Obstet Gynecol*. 1993, **168**, 1616-1622.
- Fisárková B, Vytásek R, Miková D a Vízek M. Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of rats with experimental pneumonia. *Physiol Res*. 2004, **53**(5), 487-492.

- Friel AM, Hynes PG, Sexton DJ, Smith TJ a Morrison JJ. Expression levels of mRNA for Rho A/Rho kinase and its role in isoprostane-induced vasoconstriction of human placental and maternal vessels. *Reprod Sci.* 2008, **15**(2), 179-188.
- Fukata Y, Amano M a Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001, **22**, 32-39.
- Giacco F a Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010, **107**(9), 1058-1070.
- Hampl V, Bíbová J, Banasová A, Uhlík J, Míková D, Hnilicková O, Lachmanová V a Herget J. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, **290**(1), L11-20.
- Hampl V, Bíbová J a Herget J. Perinatal history of hypoxia leads to lower vascular pressures and hyporeactivity to angiotensin II in isolated lungs of adult rats. *Physiol Res.* 2000, **49**(5), 567-575.
- Hampl V, Bíbová J, Straňák Z, Wu X, Michelakis ED, Hashimoto K a Archer SL. Hypoxic fetoplacental vasoconstriction in humans is mediated by potassium channel inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, **283**(6), H2440-2449.
- Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ a Archer SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J.* 1995, **8**(4), 515-522.
- Hampl V a Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis.* 1990, **142**, 619-624.
- Harris P a Heath D. *The Human Pulmonary Circulation* (Second edition). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1977.
- Hebert SC, Desir G, Giebisch G a Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.* 2005, **85**(1), 319-371.
- Hellerström C, Swenne I a Eriksson UJ. Is there an animal model for gestational diabetes? *Diabetes.* 1985, **34** (Suppl 2), 28-31.
- Herget J a Hampl V. Pulmonary circulation. In *Biomechanics in Cardiovascular System*. Ed. Sramek BB, Valenta J, Klimes F. Czech Technical University Press, 1995, Praha, pp. 327-336.
- Hislop A a Reid L. Normal structure and dimensions of the pulmonary arteries in the rat. *J Anat.* 1978, **125**, 71-83.
- Hodyc D, Johnson E, Skoumalová A, Tkaczyk J, Maxová H, Vízek M a Herget J. Reactive oxygen species production in the early and later stage of chronic ventilatory hypoxia. *Physiol Res.* 2012, **61**(2), 145-151.

- Howard RB. Control of human placental blood flow. *Med Hypotheses*. 1987, **23**, 51-58.
- Howard RB, Hosokawa T a Maguire MH. Hypoxia-induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol*. 1987, **157**, 1261-1266.
- Hvizdošová-Kleščová A, Uhlík J, Malina M, Vulterinová H, Novotný T a Vajner L. Remodeling of fetoplacental arteries in rats due to chronic hypoxia. *Exp Toxicol Pathol*. 2013, **65**(1-2), 97-103.
- Isaacson TC, Hampl V, Weir EK, Nelson DP a Archer SL. Increased endothelium-derived NO in hypertensive pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *J Appl Physiol (1985)*. 1994, **76**(2), 933-940.
- Jakoubek V, Bíbová J a Hampl V. Voltage-gated calcium channels mediate hypoxic vasoconstriction in the human placenta. *Placenta*. 2006, **27**, 1030-1033.
- Jakoubek V, Bíbová J, Herget J a Hampl V. Chronic hypoxia increases fetoplacental vascular resistance and vasoconstrictor reactivity in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, **294**(4), H1638-1644.
- King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012, **166**, 877-894.
- King RG, Gude NM, Di Iulio JL a Brennecke SP. Regulation of human placental fetal vessel tone: role of nitric oxide. *Reprod Fertil Dev*. 1995, **7**(6), 1407-1411.
- Kingdom JC a Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*. 1997, **18**, 613-621; discussion 623-6.
- Kleiner-Assaf A, Jaffa AJ a Elad D. Hemodynamic model for analysis of Doppler ultrasound indexes of umbilical blood flow. *Am J Physiol*. 1999, **276**, H2204-2214.
- Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D a Myatt L. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000, **278**(4), H1311-1319.
- Leach RM, Robertson TP, Twort CH a Ward JP: Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol*. 1994, **266**, L223-L231.
- Linderkamp O, Stadler AA a Zilow EP. Blood viscosity and optimal hematocrit in preterm and full-term neonates in 50- to 500-micrometer tubes. *Pediatr Res*. 1992, **32**, 97-102.
- Lyall F, Gibson JL, Greer IA, Brockman DE, Eis AL a Myatt L. Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress. *Diabetes Care*. 1998, **21**(10), 1753-1758.
- Maritim AC, Sanders RA a Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003, **17**(1), 24-38.

- Mimouni F, Miodovnik M, Siddiqi TA, Butler JB, Holroyde J a Tsang RC: Neonatal polycythemia in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Obstet Gynecol.* 1986, **68**(3), 370-372.
- Mitzner W a Huang I. Interpretation of pressure-flow curves in the pulmonary vascular bed. In *The Pulmonary Circulation in Health and Disease*. Ed. Will JA, Dawson CA, Weir EK, Buckner CK. Academic Press, 1987, Orlando, pp. 215-230.
- Mulvany MJ a Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990, **70**(4), 921-961.
- Myatt L, Brockman DE, Eis AL a Pollock JS. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta.* 1993, **14**(5), 487-495.
- Myatt L a Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004, **122**(4), 369-382.
- Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I a Oka M: Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004, **287**, L665-L672.
- Novotná J a Herget J. Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res.* 2002, **51**, 323 - 334.
- Paradis A a Zhang L. Role of Endothelin in Uteroplacental Circulation and Fetal Vascular Function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013, **11**(5), 594-605.
- Parisi VM a Walsh SW. Fetal vascular responses to prostacyclin. *Am J Obstet Gynecol.* 1989, **160**(4), 871-876; discussion 876-878.
- Peacock AJ, Naeije R a Rubin LJ. *Pulmonary Circulation: Diseases and Their Treatment (Third Edition)*. CRC Press, 2011.
- Peleg D, Kennedy CM a Hunter SK. Intrauterine Growth Restriction: Identification and Management. *Am Fam Physician.* 1998, **58**, 453-460.
- Pietryga M, Brazert J, Wender-Ozegowska E a Dubiel M, Gudmundsson S. Placental Doppler velocimetry in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med.* 2006, **34**(2), 108-110.
- Postigo L, Heredia G, Iilsley NP, Torricos T, Dolan C, Echalar L, Tellez W, Maldonado I, Brimacombe M, Balanza E, Vargas E a Zamudio S. Where the O₂ goes to: preservation of human fetal oxygen delivery and consumption at high altitude. *J Physiol.* 2009, **587**(3), 693-708.
- Poston L, McCarthy AL a Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and fetoplacental arterial beds. *Pharmacol Ther.* 1995, **65**, 215-391.

- Power GG, Longo LD, Wagner HN, Kuhl DE a Forster RE. Uneven Distribution of Maternal and Fetal Placental Blood Flow, as Demonstrated Using Macroaggregates, and Its Response to Hypoxia. *J Clin Invest.* 1967, **46**(12), 2053-2063.
- Prager R, Abramovici A, Liban E a Laron Z. Histopathological changes in the placenta of streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetologia.* 1974, **10**(1), 89-91.
- Ramasubramanian R, Johnson RF, Downing JW, Minzter BH a Paschall RL. Hypoxemic fetoplacental vasoconstriction: a graduated response to reduced oxygen conditions in the human placenta. *Anesth Analg.* 2006, **103**(2), 439-442.
- Rankin JG. A role for prostaglandins in the regulation of the placental blood flows. *Prostaglandins.* 1976, **11**(2), 343-353.
- Rankin JH a McLaughlin MK. The regulation of the placental blood flows. *J Dev Physiol.* 1979, **1**, 3-30.
- Reeves JT a Herget J. Experimental models of pulmonary hypertension. In *Pulmonary Hypertension.* Ed. Weir EK & Reeves JT. Futura, 1984, New York, pp. 361-391.
- Reid LM. Structure and function in pulmonary hypertension. New perceptions. *Chest.* 1986, **89**(2), 279-288.
- Reinhart WH, Danoff SJ, King RG a Chien S. Rheology of fetal and maternal blood. *Pediatr Res.* 1985, **19**, 147-153.
- Robertson TP, Aaronson PI a Ward JP. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization. *Am J Physiol.* 1995, **268**(1 Pt 2), H301-307
- Rodesch F, Simon P, Donner C a Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1992, **80**, 283-285.
- Rolo AP a Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006, **212**(2), 167-178.
- Rounds SS, McMurtry IF a Reeves JT. Glucose metabolism accelerates the decline of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *Respir Physiol.* 1981, **44**(2), 239-249.
- Russ RD a Tobin BW: Alteration of segmental vascular resistance in the pulmonary circulation of diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996, **74**(9), 1010-1015.
- Salvesen DR, Brudenell JM, Snijders RJ, Ireland RM a Nicolaidis KH. Fetal plasma erythropoietin in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 1993, **168**(1 Pt 1), 88-94. a
- Salvesen DR, Higuera MT, Mansur CA, Freeman J, Brudenell JM a Nicolaidis KH. Placental and fetal Doppler velocimetry in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 1993, **168**(2), 645-652. b

- Schroeder RE, Doria-Medina CL, Das UG, Sivitz WI a Devaskar SU. Effect of maternal diabetes upon fetal rat myocardial and skeletal muscle glucose transporters. *Pediatr Res*. 1997, **41**(1), 11-9.
- Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon Ide M, Rudge MV a Damasceno DC. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res*. 2012, 2012: **108163**.
- Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Jetta F, Zhang X, Zamudio S, Post M a Caniggia I. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005. **90**(7), 4299-4308.
- Somlyo AP a Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994, **372**(6503), 231-236.
- Soothill PW, Nicolaidis KH a Campbell S. Prenatal asphyxia, hyperlacticaemia, hypoglycaemia, and erythroblastosis in growth retarded fetuses. *Br Med J (ClinRes Ed)*. 1987, **294**(6579), 1051-1053.
- Stanbrook HS a McMurtry IF. Inhibition of glycolysis potentiates hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983, **55**(5), 1467-1473.
- Stanley JL, Cheung CC, Rueda-Clausen CF, Sankaralingam S, Baker PN a Davidge ST. Effect of gestational diabetes on maternal artery function. *Reprod Sci*. 2011, **18**(4), 342-352.
- Stock MK, Anderson DF, Phernetton TM, McLaughlin MK a Rankin JH. Vascular response of the fetal placenta to local occlusion of the maternal placental vasculature. *J Dev Physiol*. 1980, **2**(5), 339-346.
- Sweeney M, Jones CJ, Greenwood SL, Baker PN a Taggart MJ. Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta*. 2006, **27**(6-7), 635-647.
- Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI a Ward JPT: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*. 2012, **92**(1), 367-520.
- Štulc J a Štulcová B: Transport of calcium by the placenta of the rat. *J Physiol*. 1986, **371**, 1-16.
- Taricco E, Radaelli T, Rossi G, Nobile de Santis MS, Bulfamante GP, Avagliano L a Cetin I. Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. *BJOG*. 2009, **116**(13), 1729-1735.
- Thamotharan M, McKnight RA, Thamotharan S, Kao DJ a Devaskar SU. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003, **284**(5), E901-914.

- Tissot van Patot M, Grilli A, Chapman P, Broad E, Tyson W, Heller DS, Zwerdinger L a Zamudio S. Remodelling of uteroplacental arteries is decreased in high altitude placentae. *Placenta*. 2003, **24**(4), 326-335.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M a Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997, **389**(6654), 990-994.
- Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM a Perkins AV: Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 2005, **26**, 53–58.
- Von Euler US a Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*. 1946, **12**, 301-320.
- Weigand L, Foxson J, Wang J, Shimoda LA a Sylvester JT. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca²⁺ and nonselective cation channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005, **289**(1), L5-L13.
- Wang Z, Jin N, Ganguli S, Swartz DR, Li L a Rhoades RA. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, **25**(5), 628-635.
- Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J a He M. [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010, **39**(2), 133-137, 142.
- Wareing M, Bai X, Seghier F, Turner CM, Greenwood SL, Baker PN, Taggart MJ a Fyfe GK. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006, **291**(2), R437-446.
- Weir EK a Olschewski A. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovasc Res*. 2006, **71**(4), 630-641.
- West JB, Colice GL, Lee YJ, Namba Y, Kurdak SS, Fu Z, Ou LC a Mathieu-Costello O. Pathogenesis of high-altitude pulmonary oedema: direct evidence of stress failure of pulmonary capillaries. *Eur Respir J*. 1995, **8**(4), 523-529.
- Zamudio S, Kovalenko O, Vanderlelie J, Illsley NP, Heller D, Belliappa S, a Perkins AV. Chronic hypoxia in vivo reduces placental oxidative stress. *Placenta*. 2007, **28**, 846-853.a
- Zamudio S, Wu Y, Ietta F, Rolfo A, Cross A, Wheeler T, Post M, Illsley NP a Caniggia I. Human placental hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with clinical outcomes in chronic hypoxia in vivo. *Am J Pathol*. 2007, **170**(6), 2171-2179.b
- Zhang EG, Burton GJ, Smith SK a Charnock-Jones DS. Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta*. 2002, **23**, 751–762.

10. PŘÍLOHY

Publikace *in extenso*:

1. Kafka P, Vajnerová O, Herget J a Hampl V. **Rho-kinase inhibition attenuates acute hypoxic fetoplacental vasoconstriction in the rat.** *Physiol Res.* 2012, **61** Suppl 2, S43-48.
2. Kafka P, Vajnerová O a Hampl V. **Chronic hypoxia increases fetoplacental vascular resistance in rat placenta perfused with blood.** *Bratisl Med J.* 2016, in press.