

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kateřina Chmelířová**

Ischemický conditioning na dálku: principy a mechanismy

Remote ischemic conditioning: principles and mechanisms

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Tímto prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně, na základě uvedených zdrojů a literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.8.2017

Kateřina Chmelířová

**Poděkování:**

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnoval v průběhu vypracovávání bakalářské práce.

**Abstrakt:**

Ischemický conditioning na dálku, nebo také ischemický remote conditioning, je experimentální léčebná metoda sloužící k ochraně srdce (nebo jiných orgánů) proti ischemicko-reperfuznímu poškození. Na rozdíl od klasického conditioningu, kdy se proces spouští po sérii krátkých ischemií přímo na cílovém orgánu, se u conditioningu na dálku aktivuje ochranná funkce pomocí sérii krátkých ischemií a následných reperfuzí vykonaných na vzdálené tkáni, nejčastěji se jedná o zaškrvení končetiny. Přenos signálu ze vzdáleného orgánu do cílového orgánu je zprostředkován neuronální a humorální cestou. Metoda je aplikovatelná jako pre-conditioning, tedy před předpokládanou dlouhodobou ischemií, jako per-conditioning, tedy během dlouhodobé ischemie a – také jako post-conditioning po dlouhodobé ischemii. Jedná se o bezpečnou, neinvazivní, lehce proveditelnou a levnou metodu. V této bakalářské práci jsou popsány dosud poznané molekulární mechanismy, kterými se conditioning na dálku může podílet na vzniku kardioprotekce.

**Klíčová slova:**

Srdce, ischemický conditioning na dálku, ischemický conditioning, ischemicko-reperfuzní poškození, kardioprotekce, experimentální léčba.

**Abstract:**

Ischemic remote conditioning is an experimental treatment method serving for the protection of heart (or other organs) against ischemia-reperfusion injury. In comparison with the regular conditioning, where the process is initiated by sequence of short ischemias performed directly on the target organ, protective function of the remote conditioning is activated via sequence of short ischemias and following reperfusion executed on a remote tissue – usually by strangulating an upper limb. Transmission of the signal from the remote organ to the target organ is mediated via neuronal and humoral routes. Method can be applied as pre-conditioning, before the presumed long-term ischemia, and per-conditioning, during long-term ischemia, or as post-conditioning after a long-term ischemia. It is quite safe, non-invasive, inexpensive and easily feasible method. This thesis describes the so far identified molecular mechanisms involved in the development of cardioprotection mediated by remote conditioning.

**Key words:**

Heart, ischemic remote conditioning, ischemic conditioning, ischemia-reperfusion injury, cardioprotection, experimental treatment.

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Ischemická choroba srdeční.....	8
2.1	Ischemicko-reperfuzní poškození.....	8
2.1.1	Poškození způsobené ischemií.....	8
2.1.2	Poškození způsobené reperfuzí.....	9
3	Ischemický conditioning.....	11
3.1	Ischemický preconditioning.....	11
3.2	Ischemický postconditioning.....	15
4	Ischemický conditioning na dálku.....	16
4.1	Mechanismy.....	16
4.1.1	Humorální cesta.....	17
4.1.2	Neuronální cesta.....	18
4.1.3	Genová exprese.....	19
4.2	Ischemický preconditioning na dálku.....	20
4.3	Ischemický postconditioning na dálku.....	21
5	Klinické využití.....	23
6	Závěr.....	24
7	Seznam zkratk.....	26
8	Zdroje.....	28

# 1 Úvod

Tato práce si klade za cíl shrnout informace o principech, mechanismech a využití jevu, který se jmenuje „ischemický conditioning na dálku“, ale je také známý jako „ischemický remote conditioning“ (RIC). RIC je experimentální léčebná metoda, jejíž cílem je snížit závažnost ischemicko-reperfuzního poškození srdce a jiných orgánů pomocí přirozené ochrany těla před poškozením tkání. K jejímu provedení je třeba aplikovat několik krátkých sérií ischemie a následné reperfuze na vzdáleném orgánu - tkáni - nejčastěji na horní nebo dolní končetině.

V roce 1993 Przyklenková a kol. přišli s objevem ischemického remote conditioningu. Díky studiím na psech dokázali, že kardioprotektivní vliv klasického conditioningu je univerzální a může být aktivován i ze vzdáleného orgánu.

Mechanismy ischemického conditioningu na dálku jsou velmi podobné mechanismům ischemického conditioningu, které zahrnují především signální dráhy RISK a SAFE. Cesta, která vede od vzdáleného orgánu do orgánu, který má být ochráněn, však stále není úplně jasně popsána. Existuje mnoho studií, které popisují velké množství různých signálních molekul a mechanismů, které by mohly stát za kardioprotektivními účinky ischemického conditioningu. V této práci bude jako hlavní cílový orgán vystupovat srdce. Pokusím se alespoň krátce představit některé z hlavních teorií, představovat podrobněji všechny teorie není vzhledem k jejich velkému množství možné.

V současné době se setkáváme se třemi teoriemi, které navrhují, jakým způsobem dochází ke zprostředkování zvýšené protekce cílového orgánu ovlivněním jiné vzdálené části těla. Humorální teorie hovoří o tom, že krev odebraná z živočicha, který byl podroben RIC, může zmenšit závažnost ischemicko-reperfuzního poškození jiného živočicha, je-li mu transplantována. Celá humorální teorie stojí na změně koncentrace látek v séru.

Neuronální teorie říká, že aferentní nervy vyšlou po aktivaci adenosinem nebo bradykininem signál, který je do srdce dopraven sympatickými a parasympatickými vlákny. Tato teorie byla ověřována pomocí gangliových blokátorů. Je jasné, že neuronální cesta je k funkci RIC nezbytná.

Teorie genové exprese zkoumá vliv změny genové exprese na RIC. V rámci této teorie je individuálně zkoumán například NF- $\kappa$ B, Egr-1 nebo aktivace leukocytů.

## 2 Ischemická choroba srdeční

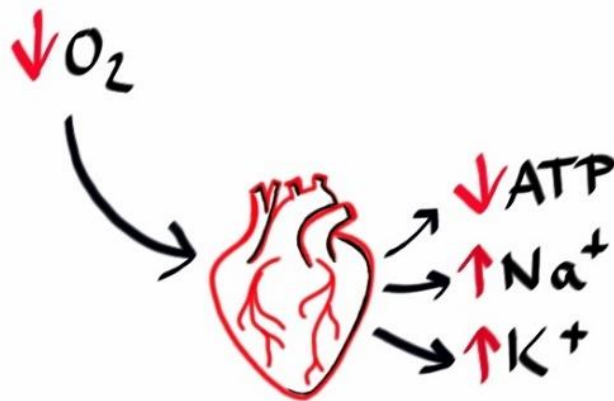
Ischemická choroba srdeční (ICHS) je onemocnění, které vzniká v důsledku akutního nebo chronického omezení průtoku krve cévami srdce. Nejčastějším omezením bývají změny na věnčitých tepnách, které zamezí přitékání krve do určité oblasti srdečního svalu. Zde pak vznikne nepoměr mezi dodávkou a spotřebou kyslíku - tedy část srdeční tkáně je hypoxická a dojde k ischemii, která může vyústit až v nekrózu (Špinar a kol. 2003).

### 2.1 Ischemicko-reperfuzní poškození

Ischemicko-reperfuzní poškození (IRP) je poškození tkáně způsobené dlouhodobou ischemií a následnou reperfuzí tkáně. IRP je významný jev, zvláště pro vysoký výskyt akutních infarktů myokardu (AIM). Stupeň poškození myokardu je závislý na délce ischemie a zasažené oblasti (Reimer et al., 1977).

#### 2.1.1 Poškození způsobené ischemií

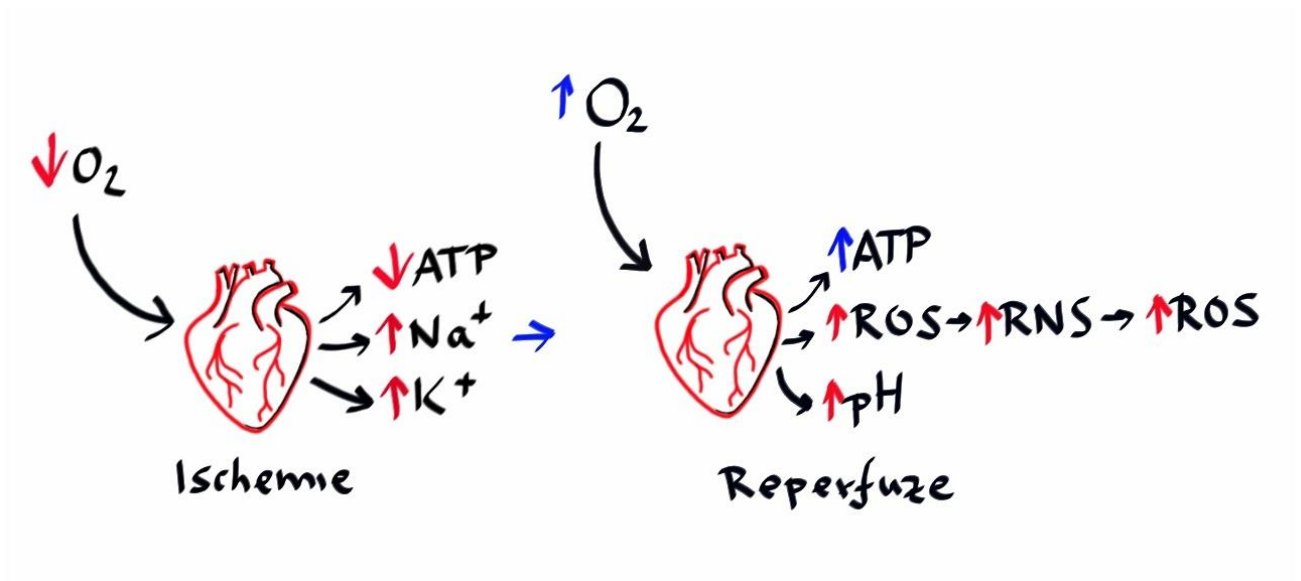
Pokud se myokardu nedostává dostatečné množství kyslíku, začne se snižovat hladina metabolických substrátů a sníží se produkce adenosintrifosfátu (ATP), který v myokardu běžně vzniká během oxidativní fosforylace. Pokud ATP není v dostatečném množství, aktivuje se anaerobní metabolismus, přestává fungovat  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza a naruší se příjem iontů sarkoplazmatickým retikulem (SR). Díky nefunkčnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy dojde ke zvýšení koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů v buňce, k poškození sarkoplazmatického retikula a k nekróze buňky (obr. 1) (Ferdinandy a kol., 2007).



**Obrázek 1:** Změna koncentrací látek v myokardu během poškození způsobeného ischemií.

### 2.1.2 Poškození způsobené reperfuzí

Reperfuze znamená obnovení přívodu krve do ischemické části myokardu. Pro přežití ischemií postižených buněk je reperfuze nezbytná, ale může působit i škodlivě (Ferdinandy a kol., 2007). Při reperfuzi dojde k návratu fyziologického zásobení tkáně  $O_2$ , obnově aktivity mitochondrií, membránového potenciálu a produkce ATP. Dojde k náhlé reoxygenaci a reaktivaci elektrontransportního řetězce, produkujícího reaktivní formu kyslíku (ROS), který stimuluje tvorbu reaktivních forem dusíku (RNS), a následně dochází k dalšímu uvolňování ROS (DeWall et al., 1971). Vznik a uvolňování reaktivních forem kyslíku a dusíku může mít za následek poškození SR a vstup  $Na^+$  iontů do mitochondrií. Vlivem odplavování protonů v buňce vzrůstá pH (obr. 2). Všechny tyto změny mohou vést k otevření mitochondriálního póru přechodné permeability (mPTP), který hraje klíčovou roli v aktivaci nekrózy (Ferdinandy a kol., 2007).



**Obrázek 2:** Změna koncentrací látek v myokardu během poškození způsobeného reperfuzí.

### 3 Ischemický conditioning

Dříve než přistoupím k popisu samotného conditioningu na dálku – remote conditioningu, je potřeba alespoň obecně popsat mechanismy klasického conditioningu.

Ischemický conditioning je obecně jev, při němž díky krátkým sériím ischemie dojde k protekci tkání proti ischemicko-reperfučnímu poškození. Ischemický conditioning se dále dělí podle místa působení a načasování. U všech typů ischemického conditioningu se stále pohybujeme ve fázi výzkumu, přesto je v poslední době velká snaha o uvedení získaných poznatků do klinické praxe.

#### 3.1 Ischemický preconditioning

Ischemický preconditioning (IPC) byl objeven v roce 1968 (Murry a kol., 1968), kdy byli experimentu podrobena psi. Jednalo se o experiment, při němž byli psi vystaveni čtyřem cyklům pětiminutové ischemie a pětiminutové reperfuze bezprostředně před tím, než prodělali řízenou 40-ti minutovou ischemickou příhodu. Po reperfuzi bylo poškození o 75 % nižší oproti kontrolní skupině (Heusch G., 2015). Stejný jev byl postupně pozorován u mnoha druhů včetně člověka (Yellon a kol., 1993). IPC můžeme rozdělit do dvou fází - akutní a pozdní fáze.

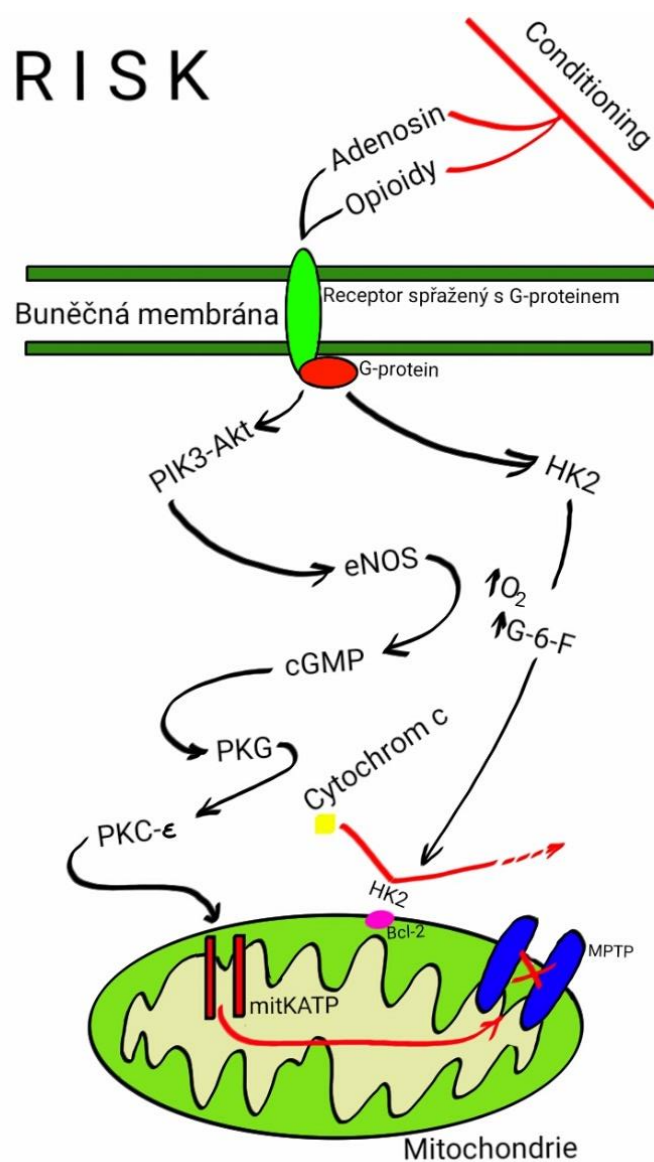
Akutní fáze (first window) nebo také klasický IPC začíná okamžitě po stimulech vyvolávajících preconditioning, trvá 2–4 hodiny. V akutní fázi pozorujeme vyšší protektivní účinek vůči nekróze buněk (Marber a kol. 1993). Kardiomyocyty během akutní fáze uvolňují molekuly adenosinu, bradykininu a endorfinů a ty aktivací příslušných receptorů a G proteinů spouští signální cesty, které nepomáhají kardioprotekci (Heusch, 2015).

Druhá fáze (second window), nebo také pozdní fáze, začíná až po 12–24 hodinách a trvá 2–3 dny. Druhá fáze má méně protektivní účinek na nekrózu myokardu, ale více chrání proti omráčení myokardu (Yellon a kol., 2003) (myocardial stunning = omráčení myokardu; jde o lokální dysfunkci myokardu, která může nastat po odeznění ischemie a obnovení perfuze). Na rozdíl od akutní fáze nevyužívá tato fáze okamžitě dostupné látky, ale efektivně využívá zvýšení exprese cytokinů a růstových faktorů prostřednictvím jejich de novo syntézy (Heusch, 2015).

Signální dráhy aktivované během IPC se označují zkratkami RISK (Reperfusion-Induced Salvage Kinase pathway) a SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement pathway).

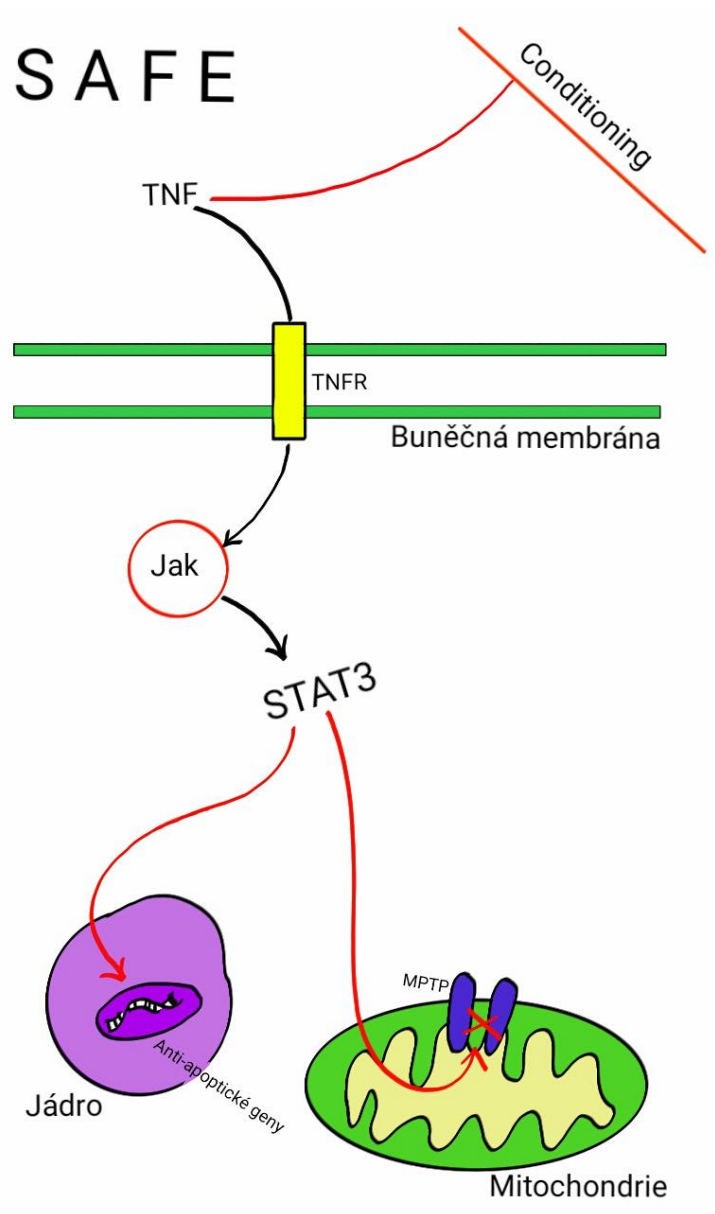
Signální dráha RISK může být aktivována ve chvíli, kdy se adenosin, bradykin nebo opioidy navážou na příslušné receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) na membráně buňky (obr. 3). Po jejich aktivaci vstupují do hry hlavní kinázy ERK1/2 (extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2) a PI3K-Akt (fosfatidyl-inositol 3-kináza). Zejména posledně jmenovaná je důležitou anti-apoptotickou kinázou, která mimo jiné aktivuje eNOS (endotelová syntáza) a HK2 (hexokináza 2). eNOS pomocí syntézy NO aktivuje cGMP (cyklický guanosinmonofosfát), který je ve zvýšené koncentraci aktivačním prvkem pro PKG (proteinkináza G). PKG potom zajistí aktivaci PKC- $\epsilon$ , ale jak k tomu dochází, zatím není úplně jasné. Jisté je, že PKC- $\epsilon$  má kardioprotektivní účinek, což dokázal, více než před 10 lety, Ytrehus a kol. Při výzkumu na myších modelech tehdy inhibovali funkci PKC a kardioprotektivní účinky se v tomto případě neprojeví.  $K_{ATP}$  kanály jsou neaktivní při normálních hladinách buněčného ATP ale vzhledem k tomu, že ATP je během hypoxie vyčerpán, zvyšuje aktivitu těchto kanálů k výstupu  $K^+$  a hyperpolarizaci. Což je zřejmě ve snaze chránit buňky a minimalizovat poškození způsobené hypoxií. Tak dojde k aktivaci  $mitK_{ATP}$  (mitochondriální ATP sensitivní  $K^+$  kanál), který je při dostatku ATP neaktivní, ovšem při nedostatku se zvyšuje jeho aktivita a tím dojde k vylití  $K^+$  a hyperpolarizaci.  $MitK_{ATP}$  může být také velmi dobře aktivován uměle pomocí diazoxidu (Santos a kol., 2002). Víme, že otevření  $mitK_{ATP}$  kanálů v cílovém orgánu před nebo bezprostředně po nástupu dlouhodobé ischemie snižuje rychlost hydrolýzy ATP nebo rychlost ATPázové aktivity v mitochondriích, což má kardioprotektivní účinek. Díky tomu se snižuje rychlost spotřeby ATP během reperfúze (Santos a kol., 2002). Dalším kardioprotektivním účinkem otevření  $mitK_{ATP}$  je redukce apoptózy. K redukci dojde díky snížení exprese proapoptického faktoru Bax a zvýšení exprese Bcl-2 (Dong a kol., 2003). O funkci PKC- $\epsilon$  a inhibici MPTP se toho bohužel zatím moc neví a mechanismy těchto jevů jsou teprve zkoumány (Costa a kol., 2006).

HK2 se běžně váže na mitochondriální membránu v závislosti na koncentraci glukóza-6-fosfátu v cytoplasmě. Čím méně je glukóza-6-fosfátu v cytoplasmě, tím vyšší je afinita HK2 k mitochondriální membráně. V průběhu reperfúze dojde ke zvýšení koncentrace glukóza-6-fosfátu a HK2 poté interaguje s proteiny ze skupiny Bcl-2, čímž zamezuje vstupu cytochromu c do cytoplasmy a snižuje produkci ROS v průběhu IR. Dále se pak HK2 podílí na stabilizaci kontaktních míst vnitřní a vnější mitochondriální membrány, čímž zabraňuje dalšímu vylití cytochromu c do cytoplasmy (Hernández-reséndiz a kol., 2014).



**Obrázek 3:** Zjednodušené schéma fungování dráhy RISK.

Signální dráha SAFE je nezávislá na RISK dráze a je aktivována TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), který se naváže na TNFR a společně aktivují JaK (Janusovu kinázu). Jak poté fosforylací aktivuje STAT proteiny (signální přenašeče a aktivátory transkripce) v cytoplasmě (obr. 4). Aktivovaný STAT3 protein se dostává do jádra a tam spustí transkripci anti-apoptických genů (Lecour, James, 2011, Hattori a kol., 2001). Aktivovaný STAT3 snižuje pravděpodobnost otevření MPTP, čímž podporuje dráhu RISK. Mechanismus, kterým STAT3 zamezuje otevření MPTP, doposud není přesně známý (Dawn a kol., 2004).



**Obrázek 4:** Zjednodušené schéma fungování dráhy SAFE.

Dráhy RISK a SAFE podle některých výzkumů nemohou fungovat samostatně, protože inhibice jedné z nich by mohla způsobit nefunkčnost i té druhé. Preconditioning by pak neměl kardioprotektivní účinky (Lecour a kol., 2005, Suleman a kol., 2008).

## 3.2 Ischemický postconditioning

POC stejně jako IPC spočívá v provedení několika krátkých period ischemie a reperfuze. Na rozdíl od IPC je ale aplikován po nástupu dlouhodobé ischemie, avšak dříve než dojde k reperfuzi (Kaur a kol., 2009). IPC má jeden zásadní nedostatek, a tím je nepředvídatelnost ischemie. Tento nedostatek byl důvodem k hledání jiných možností a ke vzniku metody ischemického postconditioningu (POC).

POC byl objeven roku 2003 na psím modelu. Bezprostředně po vzniku koronární okluze byla provedena série tří devadesátivteřinových cyklů ischemie a následné reperfuze. Oproti kontrolní skupině byly následky reperfuze o 50 % příznivější (Xi a kol., 2008). O dva roky později objevil výzkumný tým Franze Kerendiho možnost využití POC i při jeho aplikaci ze vzdálených orgánů, a tak byl vyvinut ischemický remote postconditioning.

POC má obecně podobné mechanismy jako IPC, taktéž aktivuje dráhy RISK a SAFE (viz kapitola Ischemický preconditioning).

## 4 Ischemický conditioning na dálku

Ischemický conditioning na dálku, nebo-li také ischemický remote conditioning (RIC), je jev, kdy díky krátkým řízeným sériím ischemie v jednom cévním řečišti, orgánu nebo tkáni dojde ke vzniku látek, které mají protektivní účinek na jiné vzdálené tkáně a orgány. Cílem RIC je tedy snížit ischemicko-reperfuční poškození srdce nebo jiného orgánu, dojde-li k infarktu. Může být také použit preventivně během operací, u nichž hrozí riziko dočasné ischemie (Heusch a kol., 2016). Mechanismus RIC vychází z mechanismu IPC, je však značně komplikovaný a také méně prozkoumaný. Je zde třeba odpovědět na otázku, jakým způsobem se dostává signál zprostředkovávající kardioprotekci ze vzdáleného do cílového orgánu. Nejpravděpodobnější se jeví teorie přenosu prostřednictvím humorálních a neuronálních drah (Heusch a kol., 2016).

Ischemický conditioning na dálku můžeme stejně jako běžný conditioning rozdělit na preconditioning na dálku a postconditioning na dálku. Je to neinvazivní, cenově dostupný a efektivní způsob ochrany tkání před ischemicko-reperfučním poškozením. Funkčnost této metody byla ověřena v několika studiích (Hausenloy a kol., 2012).

### 4.1 Mechanismy

Přesný molekulární mechanismus ischemického conditioningu na dálku není doposud známý. Jisté je pouze to, že během conditioningu na dálku dochází ke změně genové exprese, aktivaci leukocytů a v neposlední řadě k adaptacím mitochondrií na stres vyvolaný nedostatkem kyslíku. Na základě dosud získaných informací, publikovaných v řadě předchozích studií, by mechanismus RIC mohl zahrnovat tři možnosti – humorální cestu, neuronální cestu a změnu genové exprese. Pro účinný conditioning na dálku je zřejmě třeba aktivovat několik různých signálních drah, které fungují v závislosti na sobě. Vztahy mezi jednotlivými drahami dosud nebyly jasně definovány.

### 4.1.1 Humorální cesta

Studie humorální teorie conditioningu na dálku byly zahájeny na prasečím modelu. Tehdy se transplantovalo srdce z prasete, které conditioningem neprošlo, do prasete, které conditioningem prošlo. Následná uměle vyvolaná ischemická příhoda měla prokazatelně nižší následky než u kontrolní skupiny (Konstantinov a kol., 2005).

Další studie již neprobíhala na prasatech, ale na králících. Výzkumný tým Erika W. Dicksona jedné skupině králíků aplikoval RIPC a poté jim odebral krevní plasmu. Transfuzí této krve poté dostala druhá skupina králíků, u nichž byla následně vytvořena dlouhodobá ischemie myokardu. Následky reperfuze byly příznivější u králíků s transplantovanou krví než u kontrolní skupiny. Analýza látek cirkulujících v krvi po provedeném RIPC prokázala přítomnost látek, které se sice přirozeně v krvi vyskytují, ale tyto látky zde byly v jiných koncentracích než u organismů, na které RIC aplikován nebyl. (Dickson a kol., 1999).

Některé studie na myších modelech se také zaměřovaly na zkoumání potenciálních změn látek v séru. U myši byly po provedeném RIPC naměřeny snížené koncentrace IL-6 a IL-1. Klesla také koncentrace prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  (která v pozdějších studiích u lidí naopak stoupala). V pozdní fázi RIPC bylo prokázáno zvýšení obsahu protizánětlivého interleukinu IL-10 v séru, který dokáže snížit produkci protizánětlivých cytokinů a tím inhibuje zánětlivou odpověď (Zhang a kol., 2013). Při výzkumu na myším modelu se ukázalo, že dojde-li k zablokování receptoru pro IL-10, nebo je knockoutovaný gen pro jeho expresi, nemá RIPC žádný efekt. U myši s knockoutovým genem pro IL-10 bylo později testováno dodání tohoto cytokinu exogenně, což plně nahradilo kardioprotektivní účinek RIPC (Cai a kol., 2012).

Při výzkumu na lidech - na pacientech, kteří se měli podrobit zákroku, jehož součástí bylo převedení na mimotělní oběh, se po rozboru séra zjistilo, že pacienti, kteří před tímto zákrokem prošli RIPC, měli po operaci značně nižší koncentrace troponinu T. Dále byly u těchto pacientů měřeny koncentrace cytokinů v séru hned po aplikaci RIPC a byla naměřena značně vyšší koncentrace IL- $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  a HIF-1 $\alpha$ . Tato měření poukazují na kardioprotektivní účinky cytokinů uvolněných při RIPC (Albrecht a kol., 2013).

Jak u lidí, tak u myši byla míra poškození myokardu nižší u skupiny, u které byl proveden RIPC. U myšího modelu se dále porovnávaly výsledky skupin, na kterých byl aplikován RIPC a skupin, na kterých byl aplikován IPC. Hladina výše zmíněných cytokinů

a následky reperfučního poškození byly jasně nižší u skupiny s IPC, než u skupiny s RIPC. Na základě tohoto výzkumu můžeme tvrdit, že kardioprotekce pomocí IPC je účinnější než kardioprotekce pomocí RIPC (Zhang a kol., 2013).

Do humorální teorie nesmíme zapomenout zařadit endogenní chemické stimuly, mezi které se řadí malé molekuly, jako třeba ionty vápníku, které mohou působit pomocí aktivace adenosinu a PKC, ale jejich kardioprotektivní účinek je spíše minoritní (Wallbridge a kol., 1996). Dále pak reaktivní formy kyslíku (ROS), které mají v conditioningu částečně protichůdnou úlohu. Přílišné množství ROS způsobí nezvratné poškození myokardu, kdežto v malém množství (např. jako odpověď na mitochondriální aktivaci  $K_{ATP}$ ) působí ROS kardioprotektivně (Tullio a kol., 2007). I velikost ischemie ovlivňuje kardioprotektivitu ROS. U malých ischemií působí ROS kardioprotektivně, kdežto u hlubokých a rozsáhlých ischemií jsou ROS na škodu (Heusch a kol., 2015). Mezi endogenní chemické stimuly můžeme zařadit i reaktivní formy dusíku (RNS). Ty, stejně jako ROS, v malém množství působí kardioprotektivně, zatímco ve velkém množství opačně. Nepřítomnost specifické NO syntázy díky které se v organismu tvoří RNS, zcela nevylučuje kardioprotektivní účinek RNS (Rassaf a kol., 2014). RNS nejsou tvořeny pouze exogenně, ale jsou také syntetizovány během ischemie (Martin a kol., 2006).

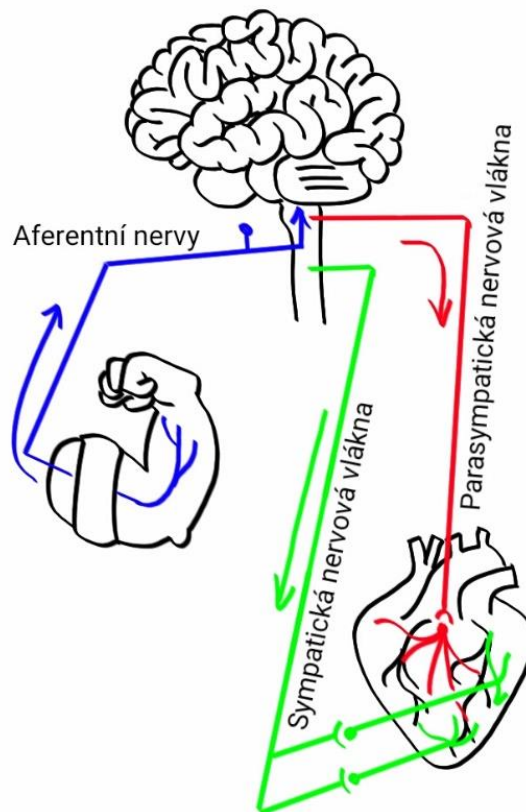
#### **4.1.2 Neuronální cesta**

Efektem působení neuronálních drah v průběhu RIC se zabývá několik experimentálních studií (Hausenloy a Yellon, 2008). Důkazy o tom, že autonomní nervový systém hraje v RIC svoji roli, přišly po pokusech s gangliovými blokátory – hexamethoniem, který byl použit mj. výzkumným týmem prof. Wolfruma (Wolfrum a kol., 2002), a trimetaphanem (Loukogeorgakis a kol., 2005). Po použití těchto gangliových blokátorů byla inhibována ochranná funkce RIC.

Další studie zkoumaly vliv resekce některých nervů na funkci RIC (Lim a kol., 2010). Výzkumný tým Lim a kol. zkoumal tuto teorii na myším modelu, kdy byl na uspané myši oddělen femorální nerv od femorální žíly a tepny, zároveň byla provedena resekce femorálního a ischiatického nervu. To vše bylo provedeno před aplikací RIC. RIC na tomto myším modelu měl naprosto nulový ochranný efekt. Na dalších myších modelech byla provedena resekce vždy jen jednoho nervu - buď ischiatického nebo femorálního. V těchto případech došlo pouze

k lehkému omezení ochranné funkce RIC. Jedním ze závěrů této studie bylo, že RIC zprostředkovává ochranu myokardu mimo jiné právě pomocí neuronální cesty (Lim a kol., 2010).

V současné době si vysvětlujeme funkci neuronálního mechanismu tak, že dojde k uvolnění neuropeptidů, například adenosinu, bradykininu (Ding a kol., 2001) nebo CGRP (Xiao a kol., 2001) ze vzdáleného orgánu, a tyto transmittery aktivují místní aferentní nervy. Ty pak stimulují nervy sympatiku a parasympatiku vedoucí do cílového orgánu (obr. 5) (Tang a kol., 1999).



**Obrázek 5:** Současná neuronální hypotéza.

### 4.1.3 Genová exprese

Teorie genové exprese může být též známá jako teorie systémové odpovědi. Změna genové exprese během RIC byla pozorována na myších srdcích (Podgoreanu a kol., 2005) a poté i u lidských pacientů podstupujících kardiochirurgický zákrok (Arab a kol., 2007).

Zaškrcení končetiny způsobilo změnu genové exprese a změny ve vzdálených orgánech. Konkrétně došlo ke změně genů zajišťujících odpovědi na zánětlivé procesy a stres vyvolaný nedostatkem kyslíku (Konstantinov a kol., 2005). Změna genové exprese se týká velké spousty genů a mnoho z nich je individuálně studováno.

Prvním příkladem ovlivnění genové exprese by mohl být nukleární faktor kappa-B (NF- $\kappa$ B), který může být do RIC zapojen hned několika cestami, například prostřednictvím drah přirozené imunity nebo dráhou PI3K (Fosfatidylinositol 3 kináza) (Hausenloy a kol., 2005). Li a kol. dokázali na myším modelu, že během RIC je nezbytný transkripční faktor NF- $\kappa$ B a iNOS (inducibilní syntáza oxidu dusnatého). Pokud byl u myši cíleně zablokován faktor p105 u podjednotky NF- $\kappa$ B nebo iNOS, nebyl RIC účinný (Li a kol., 2004).

Genová exprese ovlivňuje také aktivaci leukocytů (Konstantinov a kol., 2004). Změna této konkrétní genové exprese je patrná zejména mezi ranou a pozdní fází (first a second window). RIC zde potlačuje aktivaci leukocytů – tím pádem i expresi genů důležitých pro syntézu proteinů zapojených do chemotaxe, adheze a migrace leukocytů, stejně tak jako potlačuje syntézu cytokinů potřebných k signalizaci v rámci nespecifické imunity (Harkin a kol., 2002). Imunitní reakce v leukocytech jsou ovšem nespecifické a mohou být aktivovány např. bakteriálními LPS, HSP nebo také hypoxií, TNF- $\alpha$  (zde narážíme na podobnost s IPC a drahami RISK a SAFE - viz kapitola Ischemický preconditioning) a dalšími stimuly, z nichž mnoho může způsobovat také kardioprotekci při RIC (Tahepold a kol., 2001).

Jedním z příkladů může být také potlačení exprese genu Egr-1, který aktivuje transkripci genů zapojených do procesu ischemicko-reperfuzního poškození tkáně (Yan a kol., 2000).

Můžeme říci, že změna genové exprese a genová transkripce je pro RIC klíčová, avšak nepodařilo se mi najít jasně popsanou a jednoznačnou cestu vedoucí od vzdáleného orgánu přímo k ochraně cílového orgánu způsobenou pouze změnou genové exprese, do které by už nevstupovaly jiné mechanismy.

## **4.2 Ischemický preconditioning na dálku**

Ischemický preconditioning na dálku (RIPC) byl objeven v roce 1993 výzkumným týmem Kariny Przyklenkové jako nová forma IPC. Výzkum probíhal na psím modelu, kdy tým provedl sérii čtyř pětiminutových cyklů ischemie a reperfuze na oběžné koronární tepně, a poté

byla navozena ischemie v oblasti levé přední koronární tepny. Oproti kontrolní skupině byla velikost reperfučního poškození značně nižší (Przyklenk a kol., 1993). Tímto objevem prokázali, že metoda IPC má kardioprotektivní účinky i při aplikaci v orgánech či tkáních vzdálených srdci. Na lidech se RIPC začal aplikovat až po zjištění, že jej lze provádět neinvazivně, např. nafouknutím manžety okolo nadloktí (Kharbanda a kol., 2002).

Yellon a kolektiv byli první, kteří použili IPC na lidech. Na náhodně vybrané skupině demonstrovali, že třiminutové zastavení průtoku krve aortou a její následné dvouminutové uvolnění zvýší produkci ATP v myokardu. Tato i mnoho dalších studií byly prováděny u pacientů s koronárním bypassesem nebo u pacientů při srdeční operaci (Yellon a kol., 1993).

### **4.3 Ischemický postconditioning na dálku**

Varianta postconditioningu na dálku (RPOC) je vhodnou metodou k protekci proti reperfuzi po dlouhodobé ischemii, a to právě díky efektivitě, cenové nenáročnosti a možnosti aplikace bez invazivních vstupů (Gill a kol., 2015). Mimo využití před kardiologickými operacemi a po dlouhodobé ischemii je možné tuto metodu využívat při transportu pacientů s akutním infarktem myokardu přímo v sanitě po cestě do nemocnice. Stejně jako u ostatních forem RIC spočívá princip ve střídavých sériích krátké ischemie a reperfuze vzdáleného orgánu (končetiny) (obr. 6). Od RIPC se RPOC liší pouze načasováním. RPOC je možné provést po fázi ischemie cílového orgánu, avšak metodu je třeba aplikovat před reperfuzí cílového orgánu (Heusch a kol., 2012).

RPOC byl testován na myších, kdy jim byla po okluzi koronárních tepen periodicky zaškrcována končetina. Touto metodou byla snížena míra poškození myokardu téměř o 50 % (Kerendi a kol., 2005). Později byl vzdálený POC aplikován i na dalších pokusných modelech, včetně člověka. Na všech testovaných skupinách měl POC kardioprotektivní účinky. Stejně jako u IPC jsou po působení POC aktivovány dráhy RISK a SAFE (Lacerda a kol., 2009). Oproti kontrolní skupině bylo pozorováno snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF  $\alpha$  a IL-6 (Wang a kol., 2014).



**Obrázek 6:** Remote ischemic post conditioning aplikovaný pomocí škrtidla na tříse pravé spodní kočety. A – končetina před přiložením škrtidla, B – odkrvená končetina s přiloženým škrtidlem, C – znovu prokrvená končetina – po reperfuzi, bez škrtidla.

Převzato z: Zhang a kol., 2016

## 5 Klinické využití

Ischemický conditioning na dálku začal být pro lékaře zajímavý právě ve chvíli, kdy se zjistilo, že je možné ho aplikovat neinvazivně na vzdáleném orgánu, pouze nafouknutím manžety která zaškrtní končetinu (Kharbanda a kol., 2002). První studie prováděná na lidských pacientech se konala v roce 2000. Bylo shromážděno 8 pacientů čekajících na koronární bypass, kteří byli rozděleni na dvě skupiny, přičemž na první skupině byl aplikován RIC (2 série ischemie-reperfuze na nadloktí). Výsledky studie byly negativní a neukázaly se žádné rozdíly mezi skupinou s RIC a kontrolní skupinou. Problémem této studie byl pravděpodobně malý počet sérií ischemie-reperfuze a malá velikost testovaných skupin (Günaydin a kol., 2000).

Od debaklu v roce 2000 trvalo dlouhou dobu, než se někdo pokusil studii zopakovat. Až v roce 2006 se objevila další studie, kdy bylo náhodně vybráno 37 dětí, které měly vrozenou srdeční vadu a v blízké době měly podstoupit chirurgickou operaci. 17 dětí bylo náhodně vybráno do skupiny s RIC a kontrolní skupinu tvořilo zbylých 20 dětí. Děti ze skupiny s RIC prošly sérií čtyř pětiminutových cyklů ischemie-reperfuze, kdy jim byla nafukovací manžetou zaškrtnuta dolní končetina. Poté se všechny děti podrobily plánovanému chirurgickému zákroku. Po odebrání vzorků krve se zjistilo, že v kontrolní skupině byla významně vyšší hladina troponinu I. Tato studie byla první, která potvrdila kardioprotektivní účinek RIPC u lidí (Chemug a kol., 2006).

Po studii z roku 2006 se RIC stal předmětem několika dalších výzkumů. V roce 2011 se konala velká studie zahrnující přes 480 pacientů, jejímž závěrem bylo, že RIC má vliv na snížení pooperačního poškození myokardu, avšak neovlivňuje pooperační úmrtnost (Takagia a Umemoto, 2011).

## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout informace o principech, mechanismech a využití ischemického conditioningu na dálku. Conditioning na dálku, jak již bylo řečeno, je experimentální léčebná metoda založená na aplikaci několika sériích krátkodobé ischemie a následné reperfuze, prováděné na vzdáleném orgánu, nejčastěji na končetině, což má kardioprotektivní účinky. Stejně jako klasický conditioning můžeme remote conditioning dále dělit na preconditioning, perconditioning a postconditioning a to podle toho, zda byl aplikován před, během anebo po dlouhodobé ischemii.

Při srovnání remote conditioningu s klasickým conditioningem můžeme říci, že mechanismus obou typů těchto intervencí stojí na stejném základu, tedy na signálních drahách RISK a SAFE. Dráha RISK je aktivována navázáním adenosinu, opioidu, či bradykininu na příslušný GPCR. Po aktivaci je spuštěna signální kaskáda, na jejímž konci najdeme inhibované mPTP, otevřené  $\text{mitK}_{\text{ATP}}$  kanály a sníženou produkci ROS. Dráha SAFE je aktivována navázáním  $\text{TNF-}\alpha$  na TNFR, načež se přes JaK a STAT proteiny dostaneme až k anti-apoptickým genům a inhibici mPTP.

Hlavním rozdílem mezi klasickým conditioningem a conditioningem na dálku, je možnost neinvazivního provedení (série několika zaškrcení končetiny manžetou a následné povolání) a s tím spojená nižší finanční náročnost. Možnost neinvazivního provedení ovšem znamená nutnost dopravení signálu ze vzdáleného orgánu do orgánu cílového. Aktuálně se můžeme bavit o třech teoriích přenosu signálu ze vzdáleného orgánu do cílového – humorální a neuronální cesta a genová exprese, z nichž každá je prověřována množstvím studií, ale u žádné z nich nemáme doposud úplné a kompletní informace. V rámci humorální teorie bylo zjištěno, že na myším modelu funguje kardioprotektivně IL-10 a koncentrace cytokinu  $\text{TNF-}\alpha$  klesá, zatímco u lidí koncentrace  $\text{TNF-}\alpha$  stoupá, stejně tak jako koncentrace IL- $\beta$ , IL-8 a HIF-1 $\alpha$ . Dále se humorální teorie zabývá endogenními chemickými stimuly (konkrétně ROS), které, jak se zjistilo, mají kardioprotektivní účinek pouze v malém množství a u ischemií malého rozsahu. Neuronální teorie se zabývá vlivem neuronálních drah na kardioprotekci, což bylo z počátku ověřováno pomocí gangliových blokátorů a resekcí nervů. V současné době víme, že dojde k uvolnění neuropeptidu a aktivaci sympatických a parasympatických vláken, která předají signál vedoucí ke kardioprotekci do cílového orgánu. Teorie genové exprese pracuje s expresí pro NF- $\kappa$ B a iNOS, bez nichž je RIC neúspěšný. Dále se k teorii genové exprese váže aktivace leukocytů, kdy RIC potlačí v leukocytech exprese genů pro některé

cytokiny, které jsou v rámci nespecifické imunity nahrazeny jinými kardioprotektivními látkami, například bakteriálními LPS, HSP, nebo také TNF- $\alpha$ .

Současné využití v klinické praxi má stále statut experimentální medicíny, ačkoliv se jedná o neinvazivní a levnou metodu. Mechanismus RIC je sice doposud popsán jen na relativně základní úrovni, ale mnoho studií vykazuje výsledky potvrzující navození zvýšené odolnosti myokardu proti IRP. Je-li RIC neúspěšný, není pravděpodobně škodlivý, ale má pouze nulový efekt, čímž pacienta na životě neohrozí. Pokud je aplikace RIC úspěšná, může snížit následky ischemicko-reperfučního poškození. O kolik procent RIC následky sníží, to se zatím nedá jednoznačně říci, protože studie jsou prováděny na různých živočišných modelech a i u stejných modelů bývají výsledky různé.

## 7 Seznam zkratek

Akt	proteinkináza B
ATP	adenosintrifosfát
Bax	protein z rodiny Bcl-2 účastnící se apoptózy
Bcl-2	genová rodina bcl genů
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CGRP	peptid příbuzný peptidu s kalcitoninem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Egr-1	early growth response factor 1
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ERK1/2	extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2
GPCR	receptory spřažené s G-proteiny
HIF-1 $\alpha$	hypoxií indukovaný faktor 1-alfa
HK2	hexokináza 2
HSP	heat shock protein
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL- $\beta$	interleukin beta
iNOS	makrofágová neboli indukibilní NO-syntáza
IPC	ischemický preconditioning
IR	ischemicko-reperfuzní
IRP	ischemicko-reperfuzní poškození
JaK	Janusova kináza
K <sub>ATP</sub>	ATP sensitivní K <sup>+</sup> kanál
LPS	lipopolysacharid
mitK <sub>ATP</sub>	mitochondriální ATP sensitivní K <sup>+</sup> kanál
mPTP	pór přechodné permeability

NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKC	proteinkináza C
PKC- $\epsilon$	proteinkináza C epsilon
PKG	proteinkináza G
POC	ischemický postconditioning
RIC	ischemický conditioning na dálku
RIPC	ischemický preconditioning na dálku
RISK	reperfusion injury salvage kinase pathway
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPOC	ischemický postconditioning
SAFE	survivor activating factor enhancement pathway
SR	sarkoplazmatické retikulum
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce
TNF	tumor nekrotizující faktor
TNFR	receptor tumor nekrotizujícího faktoru
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$

## 8 Zdroje

Albrecht M., Zitta K., Bein B., Wennemuth G., Broch O., Renner J., Schuett T., Laufer F., Maahs D., Hummitzsch L., Cremer J., Zacharowski K., Meybohm P. (2013): Remote ischemic preconditioning regulates HIF-1 $\alpha$  levels, apoptosis and inflammation in heart tissue of cardiosurgical patients: a pilot experimental study. Basic Research in Cardiology 108: 314.

Arab S, Konstantinov IE, Boscarino C, et al. (2007): Early gene expression profiles during intraoperative myocardial ischemia-reperfusion in cardiac surgery. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 134: 74–81.

Cai Z.P., Parajuli N., Zhenq X., Becker L. (2012): Remote ischemic preconditioning confers late protection against myocardial ischemia–reperfusion injury in mice by up regulating interleukin–10. Basic Research in Cardiology 107: 277.

Costa, A. D. T., Jakob, R., Costa, C. L., Andrukhiv, K., West, I. C., Garlid, K. D. (2006): The mechanism by which the mitochondrial ATP–sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. The Journal of Biological Chemistry, 281: 30.

Dawn B., Xuan Y.T., Guo Y., Rezazadeh A., Stein A.B., Hunt G., Wu W.J., Tan W., Bolli R. (2004): IL–6 plays an obligatory role in late preconditioning via JaK–STAT signaling and up regulation of iNOS and COX–2. Cardiovascular Research 64: 61–71.

DeWall R. A., Vasko K. A., Stanley E. L., Kezdi P. (1971): Responses of the ischemic myocardium to allopurinol. American Heart Journal 82 (3): 362–370.

Dickson E.W., Reinhardt C.P., Renzi F.P., Becker R.C., Porcaro W.A., Heard S.O. (1999): Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 8 (2): 123–129.

Ding Y. F., Zhang M. M., He R. R. (2001): Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. Sheng Li Xue Bao 53: 7–12.

Dong J. W., Zhu H. F., Zhu W. Z., Ding H. L., Ma T. M., Zhou Z. N. (2003): Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. Cell Research 13 (5): 385–391.

Ferdinandy P., Schulz R., Baxter G.F. (2007): Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia / reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. Pharmacological reviews 59: 418–458.

Gho B.C., Schoemaker R.G., Van den Doel M.A., Duncker D.J., Verdouw P.D. (1996): Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. Circulation 94 (9): 2193–2200.

Gill R., Kuriakose R., Gertz Z.M., Salloum F.N., Xi L., Kukreja R.C. (2015): Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance. Molecular & Cellular Biomechanics 402: 41–49.

Günaydin B., Cakici I., Soncul H., Kalaycioglu S., Cevik C., Sancak B. et al. (2000): Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? Pharmacol Reserch Journal 41: 493–496.

Hattori R., Maulik N., Otani H., Zhu L., Cordis G., Engelman R.M., Siddigui M.A., Das D.K. (2001): Role of STAT3 in ischemic preconditioning. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 33: 1929-1936.

Hausenloy D.J., Boston-Griffiths E., Yellon D.M. (2012): Cardioprotection during cardiac surgery. Cardiovascular Research 94: 253–265.

Hausenloy D.J., Tsang A., Mocanu M.M., et al. (2005): Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology 288: H971–H976.

Hausenloy D.J., Yellon D.M. (2004): New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. Cardiovascular research 61: 448–460.

Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007): Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. Pharmacology & Therapeutics – Journal 116 (2): 173–191.

Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2008): Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. Cardiovascular research 79: 377–386.

Harkin D.W., Barros D'Sa A.A., McCallion K., et al. (2002): Ischemic preconditioning before lower limb ischemia reperfusion protects against acute lung injury. Journal of Vascular Surgery 35: 1264–1273.

Headrick J.P., Ashton K.J., Rose'meyer R.B., Peart J.N. (2013): Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. Pharmacology & Therapeutics 140: 92–111.

Hernández-reséndiz S., Zazueta C. (2014): PHO-ERK1/2 interaction with mitochondria regulates the permeability transition pore in cardioprotective signaling. Life Sciences 108 (1): 13–21.

Heusch G. (2015): Molecular basis of cardioprotection: signaltransduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. Circulation Research 116: 674–699.

Heusch G., Musiolik J., Kottenberg E., Peters J., Jakob H., Thielmann M. (2012): STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication. Circulation Research 110: 111–115.

Hu K., Nattel S. (1995): Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. Involvement of alpha 1B-adrenoreceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C. Circulation 92: 2259–2265.

Cheung M.M., Kharbanda R.K., Konstantinov I.E., Shimizu M., Frndova H., Li J., et al. (2006): Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. Journal of the American College of Cardiology 47: 2277–2282.

Kaur S., Jaggi A.S., Singh N. (2009): Molecular aspects of ischaemic postconditioning. Fundamental & Clinical Pharmacology 23: 521–536.

Kerendi F., Kin H., Halkos M.E., Jiang R., Zatta A.J., Zhao Z.Q., et al. (2005): Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. Basic Research in Cardiology 100 (5): 404–412.

Kharbanda R.K., Mortensen U.M., White P.A., Kristiansen S.B., Schmidt M.R., Hoschtitzky J.A., et al. (2002): Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. Circulation 106 (23): 2881–2883.

Konstantinov I.E., Arab S., Kharbanda R., et al. (2004): The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. Physiological Genomics 19: 143–150.

Konstantinov I.E., Arab S., Kharbanda R.K., Li J., Cheung M.M., Cherepanov V., et al. (2004): The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. Physiological Genomics 19 (1): 143–150.

Konstantinov I.E., Arab S., Li J., et al. (2005): The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 130: 1326–1332.

Konstantinov I.E., Li J., Cheung M.M., Shimizu M., Stokoe J., Kharbanda R.K., et al. (2005): Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia–reperfusion injury of the denervated donor heart via a  $K_{atp}$  channel–dependent mechanism. Transplantation 79 (12): 1691–1695.

Lacerda L., Somers S., Opie L.H., Lecour S. (2009): Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. Cardiovascular Research 84: 201–208.

Lecour S., James R.W. (2011): When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? European Heart Journal 32: 680–685.

Lecour S., Suleman N., Deuchar G.A., Somers S., Lacerda L., Huisamen B., Opie L.H. (2005): Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- $\alpha$  activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase). Circulation 112: 3911-3918

Liem D. A., Verdouw P. D., Ploeg H., Kazim S., and Duncker D. J. (2002): Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. Heart and Circulatory Physiology 283: H29–H37.

Li G., Labruto F., Sirsjo A., et al. (2004): Myocardial protection by remote preconditioning: The role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 26: 968–973.

Lim S. Y., Yellon D. M., Hausenloy D. J. (2010): The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. Basic Research in Cardiology. 105: 651–655.

Loukogeorgakis S. P., Panagiotidou A. T., Broadhead M. W., Donald A., Deanfield J. E., and MacAllister R. J. (2005): Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. Journal of the American College of Cardiology 46: 450–456.

Luan H.F., Zhao Z.B., Zhao Q.H., Zhu P., Xiu M.Y., Ji Y. (2012): Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JaK2/STAT3 survival pathway. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 45: 898–905.

Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M. (1993): Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation 88 (3): 1264–1272.

Martin C., Schulz R., Post H., Boengler K., Kelm M., Kleinbongard P., Gres P., Skyschally A., Konietzka I., Heusch G. (2006): Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ: NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia. Cardiovascular Research 74: 46–55.

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

O'Rourke B. (2004): Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. Circulation Research 94: 420–432.

Podgoreanu M.V., Michelotti G.A., Sato Y., et al. (2005): Differential cardiac gene expression during cardiopulmonary bypass: Ischemia-independent upregulation of proinflammatory genes. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 130: 330–339.

Przyklenk K., Bauer B., Ovize M., Kloner R.A., Whittaker P. (1993): Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. Circulation 87 (3): 893–899.

Rassaf T., Totzeck M., Hendgen-Cotta U.B., Shiva S., Heusch G., Kelm M. (2014): Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. Circulation Research 114: 1601–1610.

Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., Jennings, R. B. (1977): The wave front phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. Circulation 56 (5): 786–94.

Santos P.D., Knowltonski A.J., Laclau M.N., et al. (2002): Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP sensitive K channel protects the ischemic heart. Heart and Circulatory Physiology 283: H284–H295.

Suleman N., Somers S., Smith R., Opie L.H., Lecour S.C. (2008): Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. Cardiovascular Research 79: 127–133.

Špínar J., Vítovec J. a kol. (2003): Ischemická choroba srdeční. GRADA Publishing

Tahepold P., Valen G., Starkopf J., et al (2001): Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia–reperfusion injury of the heart. Life Sciences 68: 1629–1640.

Takagi H., Umemoto T. (2011): Remote ischemic preconditioning for cardiovascular surgery: an updated meta–analysis of randomized trials. Vascular and Endovascular Surgery 45: 511–513.

Tang Z. L., Dai W., Li Y. J., Deng H. W. (1999): Involvement of capsaicin–sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. Naunyn–Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 359: 243–247.

Tullio F., Angotti C., Perrelli M.G., Penna C., Pagliaro P. (2013): Redox balance and cardioprotection. Basic Research in Cardiology 108: 392.

Vanagt W.Y., Cornelussen R.N., Poulina Q.P., Blaauw E., Vernooij K., Cleutjens J.P., van Bilsen M., Delhaas T., Prinzen F.W. (2006): Pacing–induced dys–synchrony preconditions rabbit myocardium against ischemia/reperfusion injury. Circulation 114: I264–I269.

Wallbridge D.R., Schulz R., Braun C., Post H., Heusch G. (1996): No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28: 1801–1810.

Wang N., Pang X., Zhang L., Tootle S., Harmouche S., Zhao Z. (2014): Attenuation of inflammatory response and reduction in infarct size by postconditioning are associated with down regulation of early growth response 1 during reperfusion in rat heart. Shock 41: 346–354.

Wolfrum S., Schneider K., Heidbreder M., Nienstedt J., Dominiak P., Dendorfer A. (2002): Remote preconditioning protects heart by activating myocardial PKC epsilon-isoform. Cardiovascular Research 55: 583–589.

Xi L., Das A., Zhao Z.Q., Merino V.F., Bader M., Kukreja R.C. (2008): Loss of myocardial ischemic postconditioning in review article 98 bousselmi et al myocardial ischemic conditioning in cardiac surgery. Journal of the Saudi Heart Association 26: 93–100.

Yan S.F., Fujita T., Lu J., et al. (2000): Egr-1, a master switch coordinating up regulation of divergent gene families underlying ischemic stress. Nature Medicine 6: 1355–1361.

Yellon D.M., Downey J.M.. (2003): Preconditioning the myocardium from cellular physiology to clinical cardiology. Physiological Reviews 83 (4): 1113–1151.

Ytrehus K., Liu Y., Downey J.M. (1994): Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. American Journal of Physiology 266: H1145–H1152.

Zhang J.Q., Wang Q., Xue F.S., Li R.P., Cheng Y., Cui X.L., Liao X., Meng F.M. (2013): Ischemic preconditioning produces more powerful anti-inflammatory and cardioprotective effects than limb remote ischemic postconditioning in rats with myocardial ischemia–reperfusion injury: abstract. Chinese Medical Journal 126: 3949–3955.

Zhang Y., Xu H., Wang T., He J., Wei J. Wang T., Dong J. (2016): Remote limb ischemic post-conditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rat skin flap by limiting oxidative stress. Acta Cirúrgica Brasileira 31 (1): 15–21.