



VLIV POZDNÍCH DŮSLEDKŮ PERINATÁLNÍ HYPOXIE A PLEIOTROPNÍCH ÚČINKŮ STATINŮ NA AKUTNÍ ISCHEMICKO/REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU

Doktorská disertační práce

MUDr. Jiří Malý

Klinika kardiiovaskulární chirurgie, Institut klinické a experimentální medicíny

Praha 2009

Školitelé: Prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc.

Prof. MUDr. Bohuslav Ostadal, DrSc.

Školitel konzultant: MUDr. Ondrej Szárszoi, Ph.D.

Postgraduální doktorské studium Biomedicíny

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Tato disertační práce byla vypracována pod vedením mých školitelů Prof. MUDr. Jana Pirka, DrSc. a Prof. MUDr. Bohuslava Ošťádal, DrSc. Rád bych tedy právě jim poděkoval na prvním místě za výborné odborné vedení, podporu, rady a cenné připomínky v průběhu celého doktorského studia.

Rád bych zdůraznil velkorysý přístup Prof. Pirka, který byl jedním z hlavních iniciátorů mého doktorského studia a zároveň mi v náročných pracovních podmínkách klinického pracoviště vytvořil nezbytný časový prostor k experimentální práci. Trpělivost, vlídnost a neúnavná ochota pomoci pana Prof. Ošťádal byly dalším předpokladem k dokončení celé mé experimentální práce.

Třetím člověkem, kterému patří můj velký dík je můj školitel konzultant kolega MUDr. Ondrej Szárszoi, Ph.D., který byl mým pevným bodem ve světě experimentu. Bez jeho neustálé pomoci a dohledu by tato práce těžko vznikala.

Nemohu nezmínit velkou dávku porozumění, nezištné pomoci a trpělivosti MUDr. Zuzany Chvojkové, Ph.D., MUDr. Ivany Ošťádalové, CSc. a RNDr. Jana Neckáře, Ph.D. respektive celého týmu spolupracovníků Oddělení vývojové kardiologie Fyziologického ústavu AV ČR pod vedením Prof. RNDr. Františka Koláře, CSc.

Konečně ten nejhlubší dík patří mé manželce Petře, bez jejíž vstřícnosti a pochopení bych tuto práci jen těžko dokončil.

Závěrem v neposlední řadě děkuji rodičům a bratrovi Tomášovi za celoživotní podporu a rodinné zázemí.

SEZNAM ZKRATEK

ACC/AHA-American College of Cardiology/American Heart Association

AKS – akutní koronární syndrom

ATP – adenosintrifosfát

BW– hmotnost těla

CAD – onemocnění koronárních tepen

CF- koronární průtok

CRP – C-reaktivní protein

DP – diastolický tlak

eNOS – endotelialní NO syntáza

ET-1 – endotelin 1

HIF -1 – *hypoxia-inducible factor 1 α*

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A

HSP 70 – protein tepelného šoku 70

HW – hmotnost srdce

CH – chronická hypoxie

AR – ohrožená oblast (area at risk)

IS – infarktové ložisko (infarct size)

ICAM-1 – adhezivní molekula

IL – interleukin

IP – ischemický preconditioning

K_{ATP} – draslíkové ATP dependentní kanály

LDL – lipoproteiny o nízké hustotě

LV – levá komora

LVDP – vyvinutý tlak

MCP-1 –chemotaktický cytokin

mitoK_{ATP} – mitochondrialní K_{ATP} kanály

MPTP-mitochondrial permeability transition pore

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

NO – oxid dusnatý

NOS – NO syntáza

NSTEMI – infarkt myokardu bez elevací úseku ST

PAI-1 – Inhibitor aktivátoru plazminogenu typ 1

RIA – ramus interventricularis anterior

RV – pravá komora

SP – systolický tlak

STEMI – infarkt myokardu s elevacemi úseku ST

tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu

V-CAM-1 – adhezivní molekula

VEGF – vascular endothelial growth factor

VF – komorová fibrilace

VT – komorová tachykardie

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
<u>1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED</u>	8
1.1 Hypoxické stavy srdečního svalu	10
1.2 Klinické projevy akutní ischemie myokardu	11
1.3 Současné možnosti protekce ischemie srdečního svalu	13
1.3.1 Protektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii	16
1.3.2 Nežádoucí efekt chronické hypoxie na kardiovaskulární systém	18
1.3.3 Cyanotické vrozené srdeční vady	18
1.4 Statiny a akutní koronární syndrom	21
1.4.1 Pleiotropní účinky statinů	22
<u>2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</u>	26
<u>3. MATERIÁL A METODY</u>	28
3.1 Adaptace potkanů na perinatální hypoxii	29
3.2 Model <i>in vivo</i> – uměle ventilovaný narkotizovaný laboratorní potkan	30
3.2.1 Stanovení velikosti infarktu myokardu	31
3.3 Model <i>in vitro</i> – izolované perfundované srdce	34
3.3.1 Hodnocení reparace kontraktilní funkce	36
3.3.2 Sledování arytmií	36
3.4 Experimentální protokol	37
3.4.1 Vliv perinatální hypoxie na velikost infarktu myokardu v dospělosti	37

3.4.2 Vliv perinatální hypoxie na závažnost a počet ischemických arytmií v dospělosti	37
3.4.3 Vliv statinů na velikost infarktu myokardu	37
3.4.4 Vliv statinů na reparaci kontraktility	38
3.5 Hodnocení arytmií	38
3.6 Statistické hodnocení	39
4. VÝSLEDKY	41
4.1 Vliv perinatální intermitentní výškové hypoxie na odolnost dospělých srdcí k ischemii	42
4.1.1 Hmotnostní parametry	42
4.1.2. Ischemické arytmie	43
4.1.3. Infarkt myokardu	48
4.2 Vliv statinů na ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	50
4.2.1. Infarkt myokardu	50
4.2.2. Reparace kontraktility	54
5. DISKUZE	60
5.1. Perinatální hypoxie a její vliv na akutní ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	61
5.1.1. Vliv perinatální hypoxie na odolnost dospělých srdcí k nedostatku kyslíku	61

5.1.2. Protektivní vliv adaptace na chronickou hypoxii	62
5.1.3. Pohlavní rozdíly v odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku	63
5.2 Vliv farmakologické intervence statiny na akutní ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	66
5.2.1 Protektivní ovlivnění ischemicko/reperfuzního poškození	67
5.2.2 Užití statinů v léčbě AKS	68
<u>6. SOUHRN</u>	<u>71</u>
<u>7. LITERATURA</u>	<u>76</u>
<u>8. VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE</u>	<u>88</u>

Kapitola 1

ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

Choroby srdce a cév představují nejzávažnější onemocnění současné doby, neboť jsou příčinou více než 50% všech úmrtí. Nejčastější příčinou morbidity a mortality je přitom jedna z nich – ischemická choroba srdeční. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace bude toto onemocnění hlavní příčinou smrti nejméně do roku 2020. I když se zdravotní stav naší populace za poslední období významně zlepšil, jsme stále daleko od ideálního stavu. Vyjádřeno v absolutních číslech více než 7 miliónů lidí na celém světě je postiženo ročně akutním infarktem myokardu (White a Chew 2008). Jednou z cest, jak tuto nepříznivou situaci zlepšit, je intenzivní výzkum mechanismů, které se na vzniku ischemické choroby srdeční podílejí.

Je známo, že ischemické poškození nezávisí jen na intenzitě a trvání ischemického inzultu, ale také na stupni odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku. Je proto pochopitelné, že zájem kardiologů se v posledních padesáti letech soustředil na otázku, jak by bylo možno toleranci srdečního svalu k ischemii zvýšit. V nedávné době vystoupil čelný představitel světové experimentální kardiologie, prof. Bolli (2007) s tvrdou kritikou do vlastních řad. Uvedl, že protekce myokardu je na rozcestí: za posledních čtyřicet let byly popsány stovky experimentálních intervencí farmakologických i nefarmakologických, které dovedou ochránit ischemický myokard. S výjimkou časně reperfúze však žádná z nich nenašla uplatnění v klinické praxi, i když některé z nich se zpočátku jevily velmi slibně. Co je příčinou tohoto stavu? Překážky jsou zřejmě na straně experimentálních i klinických kardiologů. Převážná většina použitých experimentálních modelů nesimuluje adekvátně klinickou situaci, naprostá většina experimentálních prací navíc používá výlučně zdravá zvířata. Pokusné práce se soustřeďují především na molekulární a buněčné mechanismy ischemického poškození a protekce, aniž by zdůrazňovaly klinický potenciál studovaných intervencí. Vážné problémy jsou však i na straně klinického výzkumu: řada studií byla zahájena předčasně, v době, kdy

ještě nebyly známy výsledky experimentální. Situaci komplikuje množství faktorů a přídatných onemocnění, stejně jako nedostatečná přesnost měření rozsahu infarktu, chybějí vhodné biosensory atp. (Ostadal 2009).

V naší práci jsme zvolili odlišný přístup: vycházeli jsme z existujících klinických situací a pokusili jsme se zjistit, jak mohou v experimentálním modelu ovlivnit odolnost srdečního svalu k ischemii. Vybrali jsme si dvě situace, které se v posledních letech stávají velice aktuální: 1) cyanotické vrozené srdeční vady a 2) dlouhodobá léčba hypercholesterolemie.

1) Počet pacientů úspěšně operovaných pro vrozené cyanotické vady srdeční významně stoupá při současně snížené mortalitě. Tito lidé se blíží věku (nejstaršímu je nyní zhruba 40 let), kdy u nich může dojít ke vzniku klinických projevů ischemické choroby srdeční. Lze proto očekávat, že budou vyžadovat kardiologické a kardiochirurgické intervence. I když z technického hlediska budou tyto výkony stejné jako u běžné populace, mohou být ovlivněny změněnými vlastnostmi myokardu, vystaveného hypoxické zátěži v časných fázích ontogenetického vývoje. Bude u nich změněná odolnost k ischemii?

2) Významná skupina kardiologických a kardiochirurgických pacientů se v současné době rekrutuje z těch, kteří jsou dlouhodobě léčeni hypolipidemiky, především statiny. Je známo, že tato léčba má pozitivní vliv na rozvoj aterosklerotických změn cévního řečiště. Nevyřešena je však dosud otázka, zda statiny mohou ovlivnit také odolnost srdečního svalu k nedostatku kyslíku.

1.1 HYPOXICKÉ STAVY SRDEČNÍHO SVALU

Hypoxické stavy myokardu jsou výsledkem disproporce mezi množstvím kyslíku dodávaného srdeční buňce a její aktuální spotřebou. Vzhledem k vysoké arteriovenózní diferenci kyslíku v koronárním řečišti prakticky není možné zvýšit dodávku kyslíku jeho

zvýšenou extrakcí z krve. Jediným účinným mechanismem je tedy zvýšení průtoku koronárním řečištěm. Spotřeba kyslíku srdeční buňkou je dána aktuální srdeční frekvencí, kontraktilním stavem myokardu a napětím stěny komory. Teoreticky může být hypoxie srdečního svalu (výpadek oxidativní fosforylace a přechod na anaerobní glykolýzu znamená pokles z 38 mol ATP získaných při oxidativním zpracování na 3 mol ATP při využití anaerobních procesů) vyvolána následujícími mechanismy: 1) ischemickou hypoxií vznikající omezením nebo přerušením krevního průtoku k buňce způsobeném stenózou koronární artérie. 2) systémovou či hypoxickou hypoxií vyvolanou poklesem parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi při zachované perfuzi. 3) anemickou hypoxií, kde příčinou je snížená transportní kapacita krve pro kyslík a konečně za 4) histotoxickou hypoxií vznikající inhibicí terminální oxidace. V praxi se však především jedná o první dva mechanismy a to ischemickou a systémovou hypoxii. Tyto dvě často zaměňované příčiny se však zásadně odlišují. V případě ischemie se jedná o regionální pokles perfuze myokardu v povodí inkriminované koronární artérie, která je spojena nejenom s poklesem dodávky kyslíku a metabolických substrátů, ale i se signifikantním poklesem vyplavování konečných produktů (laktátu, vodíkových iontů atd.), což má za následek pokles pH. Při systémové hypoxii je vyplavování metabolitů zachováno a tím je oddálen nástup tkáňové acidózy spolu s poruchou homeostázy. Klinicky je důsledkem akutní ischemické hypoxie infarkt myokardu a důsledkem systémové hypoxie hypoxická plicní hypertenze a cor pulmonale.

1.2 KLINICKÉ PROJEVY AKUTNÍ ISCHEMIE MYOKARDU

Podle platných doporučení kardiologických společností (ACC/AHA guideline, 2002) patří do skupiny akutních koronárních syndromů několik klinických jednotek s podobným patofyziologickým základem, avšak s různým klinickým projevem: nestabilní angina pectoris (NAP), infarkt myokardu bez elevací ST- úseku (NSTEMI), infarkt myokardu s elevacemi

ST- úseku (STEMI) a minimální myokardiální léze. Všechny tyto uvedené jednotky jsou klinickými projevy akutní fáze ischemické choroby srdeční (Aschermann a spol, 2004). Základním patofyziologickým mechanismem těchto stavů je nestabilní aterosklerotický plát s možným vznikem eroze či ruptury, nasedající nástěnná nebo okludující trombóza, vazokonstrikce a v řadě případů periferní embolizace do mikrocirkulace. V klinické praxi rozdělujeme nemocné na základě rozdílné patofyziologie do dvou hlavních skupin: 1) nemocní s akutním trombotickým uzávěrem věnčité tepny (STEMI) 2) nemocní s parciálním zhoršením průtoku věnčitou tepnou na podkladě vulnerabilního aterosklerotického plátu (nonSTEMI). Patofyziologickým základem vzniku eroze či ruptury je zánětlivá reakce v oblasti plátu, infiltrovaného T- lymfocyty. K rozvoji akutního koronárního syndromu (AKS) přispívá tvorba nástěnné trombózy na podkladě aktivace krevních destiček, zvýšená fragmentace megakaryocytů a celkový prokoagulační stav krevního řečiště, tzv. vulnerabilní krev (Andreotti a Becker 2005; Davi a Patrono 2007). Tyto dvě skupiny nemocných, u kterých je manifestace AKS spojená s aterosklerotickým procesem, tvoří více než 75% celkového počtu pacientů (White a Chew 2008). Zbývající fatální příhody jsou spojeny s embolizačními příhodami, arteriálním spasmem, disekcí věnčité tepny či s některými dalšími vzácnými příčinami při absenci aterosklerotického procesu.

1.3 SOUČASNÉ MOŽNOSTI PROTEKCE ISCHEMIE SRDEČNÍHO SVALU

Stupeň ischemického poškození není závislý pouze na intenzitě a trvání ischemického stimulu, ale i na míře odolnosti tkáně ke kyslíkové deprivaci. Je proto pochopitelné, že zájem klinických a experimentálních kardiologů se v posledních desetiletích soustředil na otázku, jak odolnost srdečního svalu k nedostatku kyslíku zvýšit.

Historie výzkumu protekce srdečního svalu má počátky v padesátých letech minulého století. Epidemiologické studie u populací žijících ve vysokých nadmořských výškách (Hurtado 1960) prokázaly sníženou incidenci infarktu myokardu, jako následek dlouhodobé adaptace na chronickou hypoxii. Tato pozorování byla potvrzena v experimentálních pracích, které využívaly simulovanou hypoxii (Ostadal 2007, Ostadal 1998). V sedmdesátých letech minulého století se zájem experimentálních kardiologů soustředil především na farmakologické možnosti ovlivnění velikosti infarktového ložiska (Maroko 1971), nicméně výsledná klinická pozorování nepotvrdila povzbudivé výsledky experimentálních prací. Období skepticizmu přerušil až objev krátkodobé adaptace myokardu na akutní ischemii, ischemický preconditioning (IP) (Murry 1986). Následoval objev tzv. druhého okna protekce (Marber 1993) a tyto dva mechanismy položily základ nové éry výzkumu v této oblasti. V současnosti jsou jak dlouhodobá adaptace na chronickou hypoxii (CH) (Ostadal 2007, Ostadal 1998) tak krátkodobá adaptace, tj. IP (Yellon 2003) příklady účinných kardioprotektivních mechanismů. Oba zmenšují velikost infarktového ložiska, zlepšují postischemickou kontraktilní dysfunkci a snižují četnost arytmií. Intenzita protekce je větší u IP zatímco délka trvání tohoto protektivního fenoménu je výrazně delší při adaptaci na CH (hodiny versus týdny). Je ovšem nutné zdůraznit, že molekulární mechanismy, zodpovědné za vznik protekce u IP a CH, nejsou dosud uspokojivě objasněny.

V případě IP se jedná o signální kaskádu, reprezentovanou G-proteiny vázanými s membránovými receptory, adenosinem, tzv. druhými posly a dále mediátory (proteinkinázy, volné kyslíkové radikály, NO), které vedou k aktivaci na ATP dependentních draslíkových kanálů (K_{ATP}) v sarkolemě a v mitochondriích (Bolli a spol 2007, Hausenloy a spol 2006, Murphy a spol 2007). Sarkolemálními K_{ATP} kanály se zvýší vstup draslíku do buňky a zkrátí se trvání akčního potenciálu. V mitochondriích se vstupem draslíkových iontů přes vnitřní mitochondriální membránu ovlivňuje membránový potenciál, objem a zprostředkovaně i

energetický metabolismus a vápníková homeostáza. Zda-li tyto reakce pouze zprostředkovávají přenos signálu anebo jsou již konečným efektem je stále nejasné. Molekulární mechanismy zodpovědné za kardioprotektivní efekt u chronické hypoxie jsou ještě méně objasněné (Kolář 2004). Zdá se však, že různé protektivní fenomény (IP, CH) mají podobný molekulární základ (Neckar a spol 2002, Neckar a spol 2004).

U chronické hypoxie mimo signální cesty popsané u IP hraje podstatnou roli ovlivnění exprese proteinů, spojených s kyslíkovou homeostázou prostřednictvím transkripčních faktorů, např. HIF-1 α (Semenza a spol 2004). Je rovněž známo, že chronická hypoxie je spojena s oxidativním stresem (Herget a spol 2000, Kolář a spol 2007, Neckar a spol 2002) a zvýšenou adrenergí stimulací (Ostadal a spol 1984). Oba tyto děje byly tradičně spojeny s ischemickým poškozením; v poslední době se však ukazuje, že mohou být součástí signálních kaskád, odpovědných za odolnost k ischemii. Dalším z mechanismů, který se uplatňuje v protektivním působení CH, je zvýšená tvorba NO (Baker a spol 1999, Ostadalova a spol 2002).

Účinným protektivním mechanismem, uplatňujícím se v experimentu i klinice, je časné obnovení krevního průtoku ischemickou oblastí, tj. časná reperfuze. Je to prozatím jediná prokázaná možnost jak zmenšit nekrotické ložisko v průběhu akutního infarktu myokardu. Dosavadní výsledky experimentálních prací na zvířecích modelech však poukazují na fakt, že reperfuze přispívá poměrně významně k následnému tkáňovému poškození myokardu, především tvorbou volných kyslíkových radikálů (Eefting a spol 2004). Vzhledem k tomu, že reperfuzní poškození nemůže existovat bez předchozí ischemie, je používán termín ischemicko/reperfuzní (I/R) poškození. I/R poškození je spojeno především s poruchami kontraktility, časnými postperfuzními arytmiemi, s poškozením buněčných membrán a v konečné fázi s buněčnou smrtí. Nicméně výsledky klinických studií (Widimsky a spol 2003, Widimsky a spol 2000) potvrzují nezastupitelný význam reperfuzní terapie u akutního

koronárního syndromu navzdory rizikům reperfučního poškození. Cílem reperfúze je obnovení mikrocirkulace a obnovení energetických zásob, normalizace pH a osmolality myocytu (Piper a spol 1998). Možným negativním projevem obnovení průtoku je tzv. „no-reflow“ fenomén, kdy části myokardu zůstanou bez krevního zásobení na základě zhroucení mikrocirkulace a může dojít až k buněčné smrti myocytu (Ostadal a spol 2005).

Zájem o tzv. reperfuční poškození byl v nedávné době stimulován objevením tzv. postconditioningu. Zdá se, že „postconditioning“ využívá podobných signálních kaskád jako „preconditioning“ (NOS, mK_{ATP}) (Yang a spol 2004). Na rozdíl od IP jsou krátké ischemické periody aplikovány na počátku reperfúze, protektivní efekt těchto dvou fenoménů je přitom srovnatelný. Je nepochybné, že z klinického hlediska se jedná o způsob relevantnější. První výsledky ukazují, že může najít své uplatnění. Objev postconditioningu však přispěl rovněž k tomu, že zájem experimentálních a klinických kardiologů se v souvislosti s ischemicko/reperfučním poškozením soustředil na dosud zanedbávanou organelu - mitochondrii. Bylo totiž zjištěno, že příčinou reperfučního poškození je zřejmě otevření tzv. mitochondriálního póru (MPTP) lokalizovaného na vnitřní mitochondriální membráně. Jeho blokáda totiž vede k významnému omezení ischemického poškození a to jak v experimentu tak v klinice.

Závěrem je možno říci, že z hlediska využití poznatků experimentální kardiologie v klinice se jeví jako hlavní cíle: ovlivnění velikosti reperfučního poškození cestou „postconditioningu“, další výzkum na úrovni buněčných organel (mitochondriální membrána), hlubší objasnění role apoptozy a využití farmakologické intervence k ovlivnění ischemicko/reperfučního poškození (např. využití pleiotropních účinků statinů) (Haunstetter a Izumo 2000, Hausenloy a Yellon 2004).

1.3.1 PROTEKTIVNÍ EFEKT ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII

Nejčastějšími experimentálními modely chronické hypoxie je 1) hypobarická hypoxie, a to jak přirozená (vysoká nadmořská výška), tak simulovaná v barokomoře a 2) normobarická hypoxie (normobarická komora) (Ostadal a Kolář, 2007). Chronická hypoxie je přítomna u cyanotických vrozených vad srdečních, u těžkých forem chronické obstruktivní plicní choroby a u chronické ischemické choroby srdeční. Chronická hypoxie však nemusí být vždy permanentní: může mít často intermitentní charakter, například v průběhu exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci, při infekcích v oblasti cest dýchacích nebo při syndromu spánkové apnoe. Intermitentní hypoxie je rovněž charakteristická pro NAP (Ostadal a Widimský 1985).

Adaptace na chronickou hypoxii je charakteristická řadou funkčních změn, jejichž cílem je udržení homeostázy při minimální ztrátě energie (Durand 1982). Takové přizpůsobení může ochránit myokard v situaci, která vyžaduje zvýšenou zátěž a tím samozřejmě i vyšší metabolismus. Adaptace tak zvyšuje odolnost srdečního svalu ke všem projevům akutního nedostatku kyslíku. Chronická hypoxie má i antihypertenzivní efekt, vyvolaný poklesem periferní rezistence v systémovém řečišti (Henley a spol 1992). Kromě protektivního vlivu však chronická hypoxie vede k řadě dalších adaptačních změn, jako je hypoxická plicní hypertenze a hypertrofie pravé komory srdeční, které za excesivní hypoxie mohou vést až k srdečnímu selhání. Adaptace kardiovaskulárního systému na chronickou hypoxii je tak spojena s rozvojem protektivních i negativních změn.

Při chronické hypoxii musí myokard udržovat adekvátní funkci i při sníženém parciálním tlaku kyslíku v koronárních artériích. V padesátých letech minulého století byl pozorován a později popsán snížený výskyt ischemické choroby srdeční u populací žijících trvale ve vysoké nadmořské výšce (Peru, 4000 m; Hurtado 1960). Experimentální práce tyto

epidemiologické studie potvrdily; Kopecký a Daum, (1958), Poupa a spol (1966), McGrath a spol (1968) a řada dalších. Později se ukázalo, že podobný protektivní efekt má i relativně krátká intermitentní expozice simulované vysoké nadmořské výšce (4 hod/den, 24 expozic, 7000 m, Widimský a spol 1973, McGrath a spol 1973).

Uvedené výsledky byly později potvrzeny v dalších studiích, při použití různých experimentálních modelů a adaptačních protokolů. Zjistilo se, že adaptace srdce na chronickou hypoxii snižuje všechny hlavní projevy ischemicko/reperfuzního poškození: zmenšuje velikosti infarktu myokardu (Meerson a spol 1973; Turek a spol 1980; Neckar a spol 2002), snižuje postischemickou kontraktilní dysfunkci (McGrath a spol, 1973; Tajima a spol 1994; Baker a spol 1997) a omezuje ischemické a reperfuzní arytmie (Meerson a spol 1987; Vovc a spol 1998; Asemu a spol 1999; Neckar a spol 2002a, Szarszoi a spol 2001, Zong a spol 2005). Na rozdíl od výše uvedených prací, které prokazují protektivní efekt chronické hypoxie, ukázali Joyeux-Faure a spol (2005), že při extrémní hypoxické zátěži (intermitentní hypoxie FiO₂ 5% po dobu 40 sek následovanou 20 sekundovou normoxií, 8 hodin/den, celkově 35 dní) je srdce citlivější k ischemicko/reperfuznímu poškození, pravděpodobně díky nadměrné tvorbě volných kyslíkových radikálů.

Jedním ze zásadních zjištění je fakt, že kardioprotektivní efekt adaptace na chronickou hypoxii je závislý na věku experimentálních zvířat. Vliv stárnutí sledovali La Padula a Costa (2005); vystavili potkany od 7. týdne života po celý zbytek života chronické hypoxii, odpovídající výšce 5000 m. Zjistili, že zatímco odolnost myokardu k akutní hypoxii byla u dospělých jedinců do 18 měsíce života zvýšená, u starých potkanů (25 měsíců) tento protektivní fenomén vymizel. Je zajímavé, že ztráta adaptace, zahrnující vzestup plicní hypertenze (chronická horská nemoc), je častá u starých obyvatel peruánských And. Mnohem méně je známo o možném protektivním vlivu adaptace na nezralé srdce. Ostadal a spol (1995) a Baker a spol (1995) prokázali, že adaptace na chronickou hypoxii zvyšuje u novorozených

jedinců (potkan a králík) odolnost myokardu k akutnímu ischemickému poškození. Ostadalová a spol (2002) však upozornili, že tento protektivní efekt nelze vyvolat u novorozenců: prenatální expozice výškové hypoxii (březí samice potkana) nevedla k zvýšení odolnosti myokardu k ischemii u jednodenních mláďat; tento protektivní fenomén se objevil až během prvního postnatálního týdne.

1.3.2 NEŽÁDOUCÍ EFEKT CHRONICKÉ HYPOXIE NA KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Vliv chronické hypoxie na plicní řečiště se od systémové cirkulace zásadně liší; dochází k vzestupu tlaků v plicnici a s tím spojené hypertrofii a dilataci pravé komory. Při vystavení neonatálních i dospělých laboratorních potkanů intermitentní hypobarické hypoxii (7000 m.n.m., 8/hod., 24 expozic) dochází k vyvolání plicní hypertenze a zvětšení pravé komory (Kolář a spol 1989 a Ostadala a spol 1995). K obdobným závěrům dochází i Rabinowitch a spol (1981), když srovnávali kardiopulmonální reakci u potkanů vystavených permanentní hypobarické hypoxii (5000 m.n.m.). Změny vyvolané chronickou hypoxií jsou však reverzibilní: plicní hypertenze i hypertrofie pravé komory se po dostatečné době (> 4 týdny) po návratu do normoxických podmínek normalizovaly (Ostadal a Widimský 1985, Kolář a Ostadal 1991).

1.3.3 CYANOTICKÉ VROZENÉ SRDEČNÍ VADY

Cyanoza u novorozenců vzniká při saturaci arteriální krve na méně než 90% a P_{O_2} méně než 60 mmHg. U vrozených vývojových srdečních vad existují 3 mechanismy, které vedou k desaturaci arteriální krve: 1) morfologické anomálie s redukováným plicním průtokem (Fallotova tetralogie, těžká pulmonální stenóza/atrezie a trikuspidální atrezie), 2) vady s intrakardiálním mísením desaturované krve, která je odváděna do aorty (transpozice

velkých cév, parciální anomální návrat plicních žil) a 3) patologické leze se zvýšeným plicním průtokem a plicním edémem, u nichž narušení difuzní bariery a intrapulmonální zkraty zabraňují adekvátní oxygenaci (společný arteriální trunks). Délka hypoxemie u všech zmiňovaných vad závisí na době chirurgické úpravy srdečního defektu. Správné načasování doby korektivní operace je rozhodující pro další vývoj novorozence a funkci myokardu. Většina dětí podstupuje srdeční operaci v průběhu prvního roku života; až do doby korekce cyanotické vady je srdce pefundováno hypoxickou krví.

Bazální průtok koronárním řečištěm je u cyanotických pacientů zvýšený (Dedkov a spol 2006). Tepny jsou dilatované, nicméně koronární rezerva zůstává nezměněna (Chen a spol 1994). Na histologických vzorcích, které zahrnovaly materiál pacientů s Eisenmengerovým syndromem byl prokázán klíčový vliv remodelace a denzity myokardiální mikrocirkulace na zachování koronární rezervy (Dedkov a spol 2006). Z porovnání jednotlivých skupin vzorků vyplynulo, že hlavním podnětem k remodelaci koronární mikrocirkulace nebyla prodloužená difuzní vzdálenost O_2 jak je tomu u hypertrofie myokardu, nýbrž že k ní došlo i u pacientů s Eisenmengerovým syndromem, jejichž srdeční sval hypertrofický nebyl. Za pravděpodobný mechanismus označili autoři zvýšenou aktivitu VEGF (vascular endothelial growth factor) a jeho receptorů, a to v souvislosti se vzestupem tonu extramurálních věnčitých tepen při zvýšeném bazálním průtoku. Studie Oechslina a spol (2005) ukázala na sníženou dostupnost NO a změněnou vazodilatační odpověď vázanou na endotel u jedinců s cyanotickou vrozenou srdeční vadou. Toto pozorování naznačuje sníženou angiogenezi, zprostředkovanou NO (Paniagua a spol 2001); výsledkem je snížená denzita terminálních arteriol u pacientů s Eisenmengerovým syndromem. Koronární rezerva je pravděpodobně zachována díky remodelaci preterminálních arteriol.

Fyfe a spol (2005) popsali abnormality v hodnotách cholesterolemie a výskytu aterosklerotických změn u pacientů s vrozenou cyanotickou srdeční vadou. Snížení hodnot

cholesterolemie pozoroval ve skupinách pacientů jak s korigovanou, tak s nekorigovanou cyanotickou srdeční vadou v porovnání se skupinami pacientů s necyanotickými vadami a obdobný trend byl naznačen i u hodnot LDL. Zajímavým faktem zůstává, že tento antisklerotický efekt přetrvával dlouhodobě (střední doba sledování 16,9 let) i u pacientů po korekci cyanotické srdeční vady.

Klinických diagnóz, u kterých nacházíme odlišnosti ve spektru lipidů a průběhu aterosogeneze u perinatálně hypoxických jedinců, je celá řada (Gilbert a spol 1981). Nepochybný je dále efekt NO, jehož dostupnost je u pacientů s cyanotickou vrozenou srdeční vadou zvýšena díky aktivaci jeho tvorby a zvýšení genové exprese eNOS a díky aktivaci endotelu při zvýšené viskozitě krve spojené s erytrocytozou. Dalším typickým nálezem u jedinců s cyanotickými vrozenými srdečními vadami je trombocytopenie (Horigome a spol 2002). Megakaryocyty, které procházejí přes pravo-levé zkraty, nejsou schopny cytoplazmatické fragmentace krevních destiček, ke které normálně v plicním řečišti dochází. Zásadní roli sehrává s velkou pravděpodobností genetická dispozice. Nízká hladina cholesterolu přetrvává u cyanotických jedinců i po odstranění cyanozy, hypoxemie a erytrocytozy a to bez závislosti na věku operovaných pacientů. Tato skutečnost pravděpodobně vyplývá z genetického vývojového programu, který vede ke snížení aktivity genů odpovědných za syntézu cholesterolu a neumožňuje tak úpravu lipoproteinového spektra ani v dospělosti.

Uvedená fakta potvrzují změny v lipidovém spektru, ve výskytu rizikových faktorů aterosklerózy i v samotné morfologii mikrocirkulace a ultrastrukturálních změnách u jedinců s primárním hypoxickým poškozením na podkladě cyanotické vrozené vady srdeční. U těchto jedinců je možno očekávat změněnou odpověď na případné ischemicko/reperfuzní poškození myokardu v dospělosti.

1.4 STATINY A AKUTNÍ KORONÁRNÍ SYNDROM

Inhibitory 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzym A reductázy (HMG-CoA, statiny) snižují hladinu cholesterolu v krvi snížením produkce lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a zvýšením činnosti LDL receptorů. Statiny jsou po celém světě hojně užívané u pacientů s poruchou metabolismu lipidů a onemocněním koronárních tepen (CAD). Existují přesvědčivé důkazy o jejich účinnosti v primární i v sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Tento účinek může však být vysvětlen snížením hladiny lipidů pouze částečně. Během posledního desetiletí bylo vynaloženo značné úsilí na výzkum pleiotropních účinků statinů. Bylo zjištěno, že kromě snižování hladiny lipidů v krvi mají statiny protizánětlivé, antitrombotické a antioxidační účinky. Zároveň zvyšují produkci oxidu dusnatého (NO) a zlepšují endoteliální dysfunkci.

Ateroskleróza koronárních tepen je již dlouhou dobu známa jako onemocnění, kde jedním z hlavních vyvolávajících proměnných je porucha metabolismu lipidů. Iniciální fáze je v příčinné souvislosti s klasickými historickými rizikovými faktory: hyperlipidémie, genetická zátěž, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, obezita, věk a abusus tabáku. Avšak ukázalo se, že tyto „klasické“ rizikové faktory nemohou zcela vysvětlit rozvoj koronární aterosklerózy u všech pacientů trpících CAD. Intenzivní studium patogeneze ruptury koronárního plátu

vedlo k hypotéze o možném zapojení dalších mechanismů do tohoto procesu. Zvýšená hladina některých zánětlivých parametrů, např. C-reaktivního proteinu (CRP), by mohla být jedním z vážných rizikových faktorů podílejících se na vzniku kardiovaskulárního onemocnění. Aktivace zánětlivých procesů hraje pravděpodobně klíčovou roli také v destabilizaci koronárního plátu a jeho ruptuře s následným rozvojem trombózy, který se klinicky manifestuje jako akutní koronární syndrom (AKS). Ukázalo se, že statiny regulují několik mechanismů, které se objevují v patogenezi AKS: potlačení tvorby a účinku

prozánětlivých cytokinů, adhezivních molekul, metaloproteináz, antioxidační účinek a zvýšená tvorba NO. Zvýšený zájem experimentálních i klinických kardiologů o statiny, hlavně o jejich využití v léčbě AKS, je tedy naprosto opodstatněný.

Zdá se, že statiny mohou ovlivňovat různé faktory podléjící se na tomto procesu. Pro lepší pochopení možného terapeutického účinku statinů je nutné alespoň částečně zmínit současné poznatky o patogenezi vulnerabilního plátu. Ruptura plátu funguje jako spouštěč koronární trombózy, která je příčinou většiny AKS. Nestabilní aterosklerotický plát se v některých strukturálních rysech liší: většinou je v něm ložisko nahromaděných lipidů, makrofágů a tenký fibrózní plát (Aikawa a Libby 2004, Davies 1995, Davies 1996, Ambrose a spol 1988). Faktory, které přispívají k větší vulnerabilitě plátu můžeme rozdělit na vnější a vnitřní (Pasterkamp a spol 2000, Dickson a Gotlieb 2003). Mezi vnější faktory patří hemodynamický stres, vazospasmus, únava plátu a protrombotické podmínky (Dickson a Gotlieb 2003). Mezi vnitřní faktory, zodpovědné za náchylnost k ruptuře plátu, patří velikost a složení lipidového jádra, neovaskularizace, endoteliální eroze, malá tloušťka plátu, zánět, enzymy štěpící základní látky, snížený počet buněk hladkého svalstva (BHS) a nízký obsah kolagenu, vnější remodelace a nodulární kalcifikace (Dickson a Gotlieb 2003).

1.4.1 PLEIOTROPNÍ ÚČINKY STATINŮ

Jak již bylo uvedeno výše, statiny jsou vysoce účinné při léčbě dyslipidemií. Významně snižují hladiny celkového cholesterolu, cholesterolu LDL nebo triglyceridů a zvyšují hladinu cholesterolu HDL již po několikátýdenní terapii (Jones a spol 1998). Mají však i další účinky, které se zdají být nezávislé na snižování lipidů; ty jsou označovány jako účinky „pleiotropní“. Během posledních několika let bylo opakovaně pozorováno, že mohou ovlivňovat různé mechanismy, které se účastní rozvoje nestabilního plátu.

Protizánětlivé účinky statinů

Zánět se pravděpodobně velmi výrazně podílí na patogenezi aterosklerózy a koronárního plátu. Zvýšená hladina cirkulujících zánětlivých parametrů CRP, protein teplotního šoku 65, IL-6 a cirkulující adhezivní molekuly ICAM-1, V-CAM-1 mají s největší pravděpodobností vliv na závažnost aterosklerózy a zhoršenou prognózu pacienta s ischemickou chorobou srdeční. Opakovaně se prokázalo, že hladina CRP, jednoho z nejdůležitějších rizikových faktorů kardiovaskulárních příhod, byla statiny snížena nezávisle na účinku, snížení hladiny lipidů (Albert a spol 2001, Kinlay a spol 2003, Ridker a spol 2001). Kromě toho statiny potlačily sekreci některých cytokinů, jako jsou IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α nebo MCP-1 (Romano a spol 2000, Blake a Ridker 2001, Koh a spol 2001, Rezaie-Majd a spol 2002). Zároveň bylo popsáno snížení počtu cirkulujících adhezivních molekul ICAM-1, selektinu P a selektinu E po statinové terapii (Seljeflot a spol 2002, Sardo a spol 2002, Niwa a spol 1996).

Antioxidační účinky statinů

Reaktivní formy kyslíku se přímo podílejí na degradaci NO a zvyšují endoteliální dysfunkci. Bylo popsáno, že fluvastatin funguje jako scavenger superoxidu a hydroxylového radikálu a snižuje citlivost LDL k oxidaci (Suzumura a spol 1999); cerivastatin neutralizuje superoxid a zachovává aktivní formu NO (Kalinowski a spol 2002). Další člen skupiny statinů – atorvastatin snížil peroxidaci lipidů a zvýšil celkovou antioxidační kapacitu (Fuhrman a spol 2002).

Účinky statinů na oxid dusnatý

NO hraje u CAD ochrannou roli svým vazodilatačním účinkem, modifikací zánětlivé reakce a aktivací leukocytů a trombocytů (Vaughan a spol 1996, Jeremy a spol 1999). Kromě toho NO redukuje endoteliální působení adhezivních molekul, adhezi monocytů k endotelu a snižuje tvorbu IL-6 a IL-8 (De Caterina a spol 1995). Zvýšení tvorby NO, způsobené

zvýšením aktivity eNOS, bylo pozorováno po podání statinů v různých experimentálních modelech (Kalinowski a spol 2002). Možným vysvětlením tohoto účinku statinů je inhibice G-proteinů, následkem čehož je snížení degradace eNOS mRNA a tím vyšší hladina a aktivita eNOS (Laufs a spol 2002, Laufs a Liao 2000).

Statiny a endotelin-1

Endotelin 1 (ET-1) je syntetizován endoteliálními buňkami a má opačný účinek než NO – stimuluje vazokonstrikci a proliferaci vaskulárních buněk a funguje jako aktivátor krevních destiček (Tsiara a spol 2003, Jagroop a Mikhailidis 2000). V experimentálních modelech podporuje aktivace exprese ET-1 rozvoj aterosklerózy (Barton a spol 2000). Podání statinů snižuje hladinu ET-1 mRNA (Hernandez-Perera a spol 1998); není však jasné, zda se jedná o přímý účinek statinů na syntézu ET-1 nebo zda je to důsledek zvýšené tvorby NO, který má opačný účinek než ET-1 (Tsiara a spol 2003).

V klinických podmínkách byl účinek statinů na endoteliální dysfunkci hodnocen většinou pomocí dilatace zprostředkované průtokem (z angl. flow-mediated dilatation, FMD); tento parametr je u pacientů s aterosklerózou zhoršený (Dupuis a spol 1999). Podání statinů u pacientů s hypercholesterolémií a s CAD výrazně zlepšilo FMD; účinek pravděpodobně nezávisí na změně hladiny lipidů ovlivněné statiny (Dupuis a spol 1999, de Jongh a spol 2002).

Antitrombotické účinky statinů

Kultivací monocytů/makrofágů, BHS nebo endoteliálních buněk bylo opakovaně prokázáno, že statiny mohou snížit úroveň a aktivitu TF, který spouští koagulační kaskádu aktivováním faktorů IX a X (Colli a spol 1997, Ferro a spol 2000). Tento účinek statinů byl potvrzen na experimentálních modelech i v klinických studiích (Eto a spol 2002, Camera a spol 2002). Statiny snižují hladinu inhibitoru tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor TFPI), silného antikoagulačního agens (Hansen a spol 1995, Lorena a spol 1997),

avšak nemají vliv na volný TFPI (Hansen a spol 1995). Při studiích, zjišťujících účinek statinů na protrombinový fragment (F1+2), fibrinopeptid A a komplex trombin-antitrombin III se ukázalo, že statiny významně snižují tvorbu trombinu (Szczeklik a spol 1999, Musial a spol 2001). Je prokázáno, že tento účinek statinů je výsledkem nejen inhibice jeho tvorby, ale také snížení exprese TF (Ferro a spol 2000).

Názory na vliv statinů na hladinu fibrinogenu, jednoho z rizikových faktorů kardiovaskulárních příhod se různí (Meade a spol 1986), zřejmě díky použití různých metodických postupů (Krysiak a spol 2003). Také faktor VII, VIII a von Willebrandův faktor byly identifikovány jako prediktory zvýšeného rizika CAD (Warkentin 1995).

Statiny neovlivňují pouze koagulaci, ale také fibrinolytickou aktivitu. Ve studiích in vitro bylo opakovaně prokázáno, že podání statinů má za následek zvýšenou hladinu aktivátoru tkáňového plasminogen (tPA) a zároveň sníženou hladinu PAI-1 (Essig a spol 1998, Mussoni a spol 2000). Ačkoli výsledky in vitro, které se týkají stimulace fibrinolýzy statiny, se v zásadě shodují, klinické zkoušky přinesly méně přesvědčivé výsledky (Krysiak a spol 2003). Klinické studie jsou však nejednotné, pokud jde o inkluzní kritéria, typ statinu a jeho dávkování, doby trvání léčby (Krysiak a spol 2003).

Kapitola 2
CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Na základě studia dostupných literárních údajů a zvážení našich metodických možností jsme si stanovili tyto cíle disertační práce:

2.1 Testovat hypotézu, zda neonatální hypoxie ovlivní odolnost dospělého srdce laboratorního potkana k akutní ischemii.

Vliv akutní ischemie na odolnost myokardu u perinatálně hypoxických potkanů jsme v první části hodnotili pomocí velikosti infarktu myokardu, v druhé části jsme hodnotili závažnost a počet ischemických arytmií.

2.2 Testovat hypotézu, zda odolnost dospělého srdce laboratorního potkana k ischemii ovlivní akutní nebo chronické podávání statinů.

V první části jsme sledovali rozsah infarktu myokardu na modelu ventilovaného anestezovaného potkana – model *in vivo*. V druhé části jsme hodnotili vliv statinů na velikost reparace kontraktility na izolovaném perfundovaném srdci – model *in vitro*. V obou případech jsme srovnávali vliv akutního a chronického podání statinů.

Kapitola 3

MATERIÁL A METODY

3. MATERIÁL A METODY

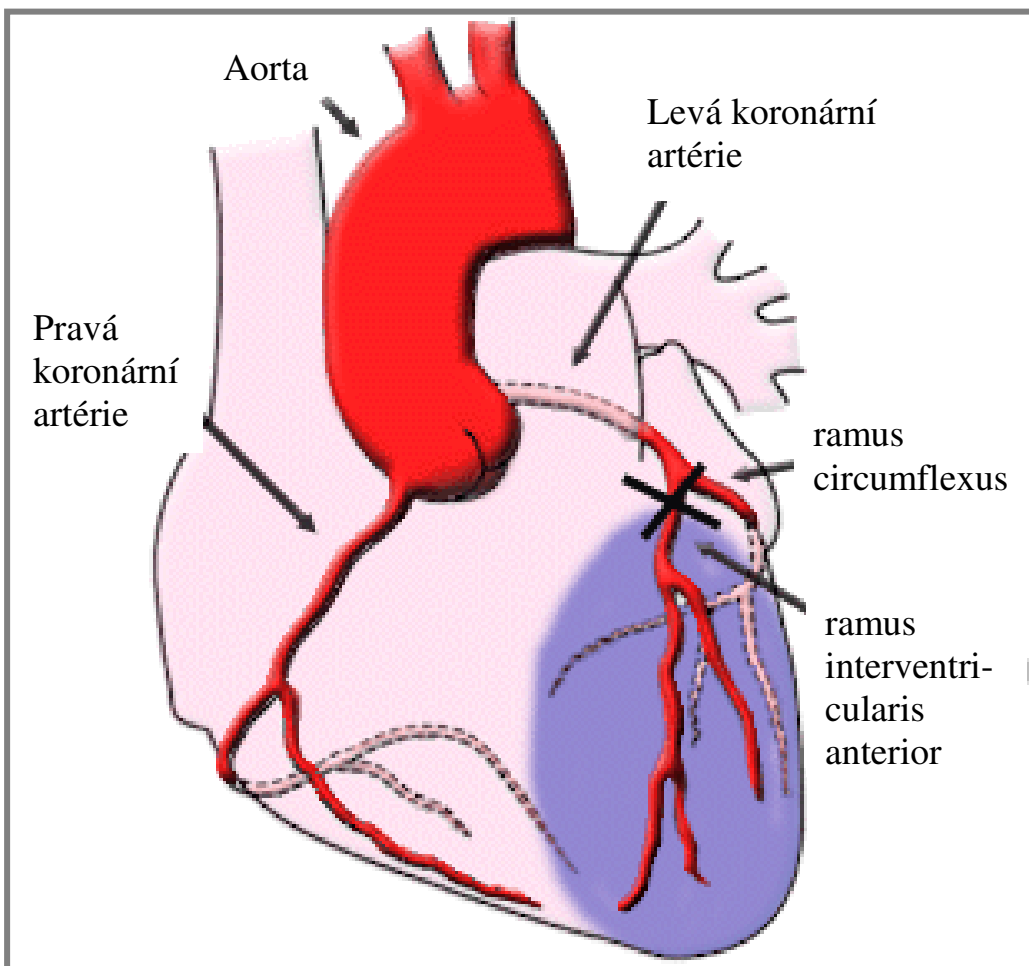
V našich pokusech jsme používali samce a samice laboratorního potkana kmene Wistar. Zvířata byla chována za standardních podmínek v plastických akváriích. V místnosti byla udržována stálá teplota 22 ± 2 °C a osvětlení s 12-h režimem střídání světla a tmy. Potkani měli volný přístup k vodě a standardní laboratorní dietě. Všechny pokusy byly prováděny po schválení etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR a v souladu s pravidly *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publikované US National Institute of Health (NIH číslo 85-23, 1996).

3.1 ADAPTACE POTKANŮ NA PERINATÁLNÍ HYPOXII

Experimentální zvířata jsme vystavili chronické hypoxii v hypoxické komoře. Březí samice potkanů kmene Wistar byly vystaveny intermitentní výškové hypoxii 5000 m ($P_B = 405$ mm Hg, 54 kPa; $P_{O_2} = 85$ mm Hg, 11.3 kPa) v hypobarické komoře 8 hod/den v posledním trimestru gravidity (7 dní před porodem). Mláďata byla porozena za normoxických podmínek mimo hypobarickou komoru a poté opět vystavena stejné výškové hypoxii po dobu 10 dní. Po skončení hypoxické periody byla zvířata chována až do dospělosti (3 měsíce) v normoxických podmínkách, odpovídajících nadmořské výšce 200 m ($P_B = 742$ mmHg, 99 kPa; $P_{O_2} = 155$ mmHg, 20,7 kPa). Kontrolní skupina zvířat se narodila a byla chována za stejných normoxických podmínek. Naše experimenty jsme prováděli na dvou modelech: 1) *in vivo* model anestetizovaného uměle ventilovaného potkana 2) *in vitro* model izolovaného perfundovaného srdce podle Langendorffa (Langendorff 1895, Dehnert 1988).

3.2 MODEL *IN VIVO* – UMĚLE VENTILOVANÝ NARKOTIZOVANÝ LABORATORNÍ POTKAN

Zvířata byla narkotizována pentobarbitalem sodným (Sanofi, Francie), v dávce 60 mg/kg intraperitoneálně a byla umístěna na vyhřívaný operační stůl. Tělesná teplota potkana během celého pokusu byla udržována v rozmezí 37 až 38°C při monitoraci rektálním teploměrem. Na začátku operace byla provedena intubace průdušnice a následně kanylace levé krkavice pro měření krevního tlaku. Tracheální kanyla byla napojena na ventilační přístroj (Ugo Basile, Itálie), nastavený na frekvenci 65 - 70 cyklů/min při dechovém objemu 1,2 ml vzduchu/100 g potkana (Li a Kloner 1995). Po stabilizaci dýchání (několik desítek vteřin) byla provedena thorakotomie v oblasti čtvrtého mezižebří. Operační pole bylo zpřístupněno pomocí retraktoru. Ramus interventricularis anterior (RIA) byl vizualizován prostřížením perikardu. Chirurgickým stehem (Ethibond 7-0, Ethicon, Velká Británie) jsme provedli opich RIA. Na oba konce stehu byla navléknuta polyethylenová kanyla o vnitřním průměru 1,85 mm. Operační rány byly zakryty vlhkou buničinou, aby nedošlo k osychání tkání. Pro měření EKG byly na povrch těla potkana umístěny dvě snímací elektrody. Poloha elektrod byla volena tak, aby výsledný signál vykazoval pravidelný záznam s minimálními projevy vnějších vlivů (nejčastější umístění elektrod: sternum - pravá přední končetina). EKG signál byl zaznamenáván přes zesilovač a zapisovač (Hellige, Švýcarsko) během ischemické části pokusu a během první minuty reperfuze.



Obr. č. 1: místo podvazu koronární arterie

3.2.1 STANOVENÍ VELIKOSTI INFARKTU MYOKARDU.

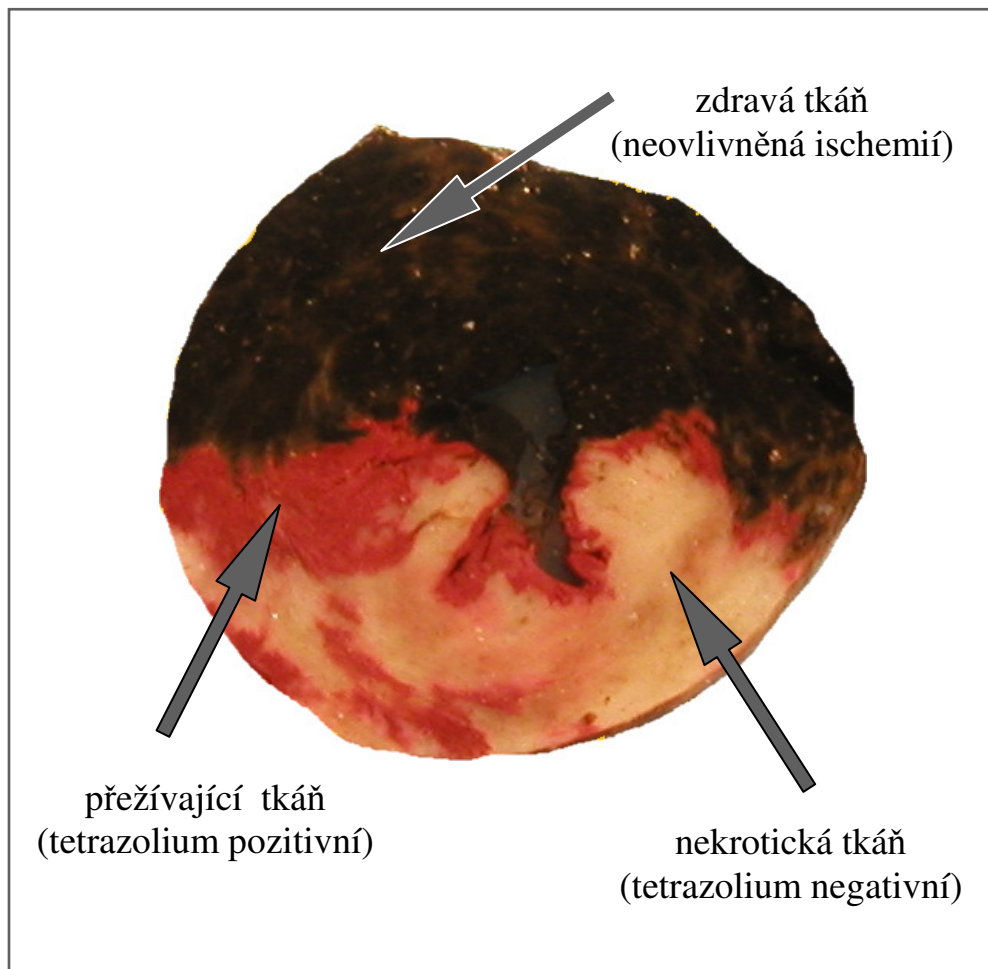
Infarkt myokardu na modelu *in vivo* byl vyvolán regionální ischemií, způsobenou okluzí sestupné větve levé koronární artérie (obr. č. 1) po dobu 20 min; následovalo období 180 minutové reperfuze. Na konci reperfuze jsme do kanyly aplikovali 0,25 mg verapamilu (Isoptin, Knoll, Německo) a tím zastavili srdce v diastole. Poté bylo srdce opatrně vystřiženo z hrudníku a vloženo do kádinky s ledovým fyziologickým roztokem. Aorta byla napojena na kanylu spojenou s injekční stříkačkou s fyziologickým roztokem, která byla předem propláchnuta heparinem (Léčiva, Česká republika). Srdce bylo intenzivně promyto, aby se zbavilo krve v koronárním řečišti a dutinách komor. Poté jsme opět provedli okluzi koronární

tepny. Následně bylo srdce perfundováno 2 ml 5 % KMnO_4 (Schering, Německo). Touto perfuzí byla odlišena oblast ischemické okluze od normálně perfundované tkáně. Silným oxidačním účinkem manganistanu se obarvila perfundovaná část myokardu do černohněda.

Po perfuzi KMnO_4 byly vyměněny injekční stříkačky na aortální kanyle a přebytečný manganistan v koronárním řečišti a v dutinách komor byl dokonale vypláchnut fyziologickým roztokem. Okluze RIA byla uvolněna až poté, co odkapávající fyziologický roztok ztratil fialový nádech. Myokard byl nakonec perfundován 10ml 1 % 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridem - TTC (Sigma, USA) ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (Baxter a spol 1994, Schultz a spol 1997, Speechly-Dick a spol 1994, Shirato a spol 1989, Li a spol 1990).

Srdce bylo ponecháno ponořené v kádince s TTC po dobu 20-ti minut (Ytrehus a spol 1994). Poté byly z myokardu odstřiženy síně a komory a vloženy do neutrálního 10 % formaldehydu na dobu alespoň 30 minut. Neutrální formaldehyd zpevnil tkáň a komory mohly být nařezány na 1 mm tenké řezy. První řez byl veden v bazální části komor kolmo na podélnou osu levé komory těsně pod atrioventrikulární chlopní. Toto úvodní oddělení báze určilo rovinu pro následující řezy. Takto bylo srdce rozděleno na 6 až 8 řezů, které byly vloženy do Petriho misky s formaldehydem.

Následující den byla odstraněna z řezů pravá komora. Sada řezů levé komory včetně septa byla vyfotografována digitálním fotoaparátem a snímky byly uloženy v počítači. Řezy byly snímány jak z apikální tak bazální strany a vyhodnoceny planimetry pomocí programu Ellipse. Dále jsme vypočítali relativní zastoupení jednotlivých oblastí a vyjádřili v procentech: IS/AR - velikost infarktu vztažená na ohroženou oblast, IS/LV - velikost infarktu vztažená na celou levou komoru, AR/LV - velikost ohrožené oblasti vztažená na levou komoru. Obr. č. 2 ukazuje příklad řezu levou komorou a septem myokardu potkana po znázornění infarktu tetrazoliovými solemi.



Obr. č. 2: Řez levou komorou a septem myokardu potkana po stanovení infarktu tetrazoliovými solemi.

3.3 MODEL *IN VITRO* – IZOLOVANÉ PERFUNDOVANÉ SRDCE



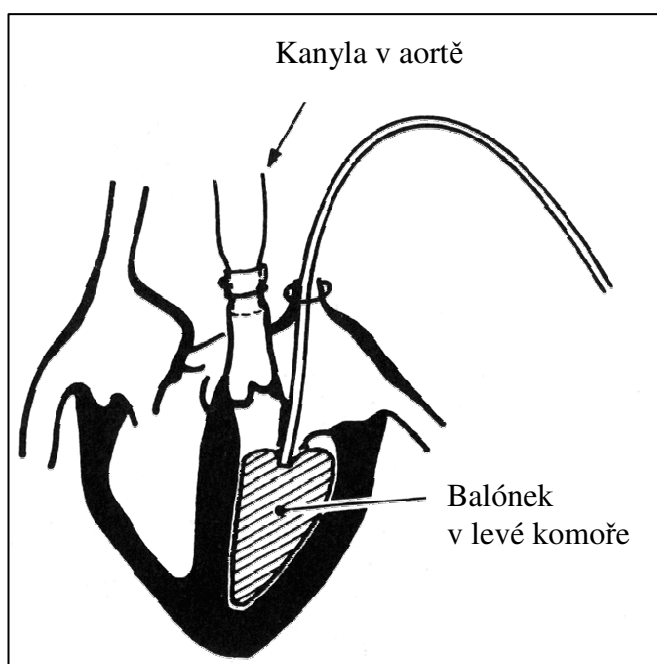
Obr. č. 3: Langendorffův přístroj použitý v experimentu

Zvířata byla uvedena do anestezie jednorázovým intraperitoneálním podáním pentobarbitalu (60 mg/kg). Po fixaci na operační podložce byla kůže na hrudníku nastřížena až k jugulu a odklopena. Poté byla krátkým stříhem otevřena břišní dutina těsně pod bránicí. Po prostřížení bránice byla žebra postupně přerušena až k prvnímu žebru a odklopena. Srdce

bylo ihned vyjmuto z hrudníku, upevněno na aortální kanylu a perfundováno v perfuzním aparátu podle Langendorffa (obr. č. 3). Perfuzní podmínky se lišily v závislosti na sledovaném parametru ischemicko/reperfuzního poškození.

Pro měření reparace kontraktility bylo srdce perfundováno za konstantního tlaku (100 cm H₂O) Krebs-Henseleitovým roztokem ve složení (mmol/l): NaCl 118,0, KCl 4,7, CaCl₂ 1,25, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, KH₂PO₄ 1,2 a glukóza 7,0. Roztok byl saturován karbogenem (95% O₂ a 5% CO₂), pH bylo upraveno na 7,4 a roztok byl udržován při konstantní teplotě (37 °C). Čerstvý perfuzní roztok byl připravován každý den před začátkem pokusu. Po upevnění v Langendorffově přístroji byly ze srdce odstraněny zbytky extrakardiální tkáně. Poté byla jehlou propíchnuta komora v oblasti apexu, aby se zabránilo hromadění perfuzátu, které do LV odvádějí *venae cordis minimae (Thebesii)*. Srdce bylo elektricky stimulováno pravoúhlými pulsy s frekvencí 300/min platinovými elektrodami, přiloženými na bazi pravé komory. Délka pulzů byla nastavena na 2 ms a napětí na hodnotu převyšující o 50 % hodnotu prahovou. Kontraktilní funkce srdce byla měřena balónkovou metodou, která spočívá v zavedení neelastického poddajného balónku do levé komory (obr. č. 4).

Obr.č. 4: měření kontraktilní funkce pomocí balónku v levé komoře



3.3.1 HODNOCENÍ REPARACE KONTRAKTILNÍ FUNKCE

Tlakové změny v balónku byly registrovány tlakovým snímačem. Balónek byl postupně plněn vodou tak, aby se diastolický tlak na konci stabilizace pohyboval mezi 7,5 - 10 mm Hg. Zesílený tlakový signál byl zaznamenáván a analyzován vlastním počítačovým softwarem. Hodnoty systolického tlaku (SP), diastolického tlaku (DP), vyvinutého tlaku (LVDP) a maximální rychlosti kontrakce $[(+dP/dt)_{max}]$ byly vyjádřeny jako průměr z deseti srdečních cyklů ve vybraných časových intervalech. Koronární průtok (CF) byl měřen ve zvolených časových intervalech jako množství perfuzátu vytékajícího ze srdce a normalizován na hmotnost srdce.

3.3.2 SLEDOVÁNÍ ARYTMÍ

Při sledování ischemických a reperfuzních arytmí byla srdce perfundována za konstantního průtoku - 10 ml/min/g. Předpokládaná hmotnost srdce potkanů byla vypočtena ze vztahu mezi hmotností těla (BW) a hmotností srdce (HW), vycházejících z předcházejících pokusů (Asemu a spol, 2000): $\log HW \text{ (mg)} = 1,042 \log BW \text{ (g)} + 0,309$ pro normoxická zvířata. Ischemie myokardu byla vyvolána podvazem RIA. Šicím vláknem (hedvábí, 6-0) jsme provedli atraumatickou jehlou opich 1 mm pod odstupem RIA z levé koronární artérie, na oba konce vlákna byla standardně navléknuta polyetylenová kanyla. Konkrétní mechanismus je tlak kanyly proti arterii v místě podvazu a následná fixace kanyly na šicím vlákně chirurgickou svorkou. Kontrolním údajem pro úspěšnou koronární okluzi bylo okamžité zvýšení perfuzního tlaku. Perfuzní roztok byl stejný jako v případě, kdy byla sledována reparace kontraktility, s výjimkou nižší koncentrace KCl (3,2 mmol/l), vyšší koncentrace CaCl₂ (2,5 mmol/l) a přidaného pyruvátu sodného (2,0 mmol/l). Epikardialní elektrogram byl zaznamenáván pomocí platinových elektrod, připevněných na bazi pravé komory a apex. Střední perfuzní tlak byl měřen v aortální kanyle a byl spolu s elektrogramem

ukládán a následně hodnocen pomocí našeho počítačového programu. Srdeční frekvence byla vypočtena z elektrogramu.

3.4 EXPERIMENTÁLNÍ PROTOKOL

3.4.1 VLIV PERINATÁLNÍ HYPOXIE NA VELIKOST INFARKTU MYOKARDU V DOSPĚLOSTI

Na modelu *in vivo* u dospělých zvířat byl infarkt myokardu po 25 min. stabilizační fázi vyvolán podvazem RIA po dobu 20 min. Po 3 hod. reperfuzi byla velikost infarktu po obarvení trifenylnitrazolem změřena planimetricky.

3.4.2 VLIV PERINATÁLNÍ HYPOXIE NA ZÁVAŽNOST A POČET ISCHEMICKÝCH ARYTMÍ V DOSPĚLOSTI

Na modelu *in vitro* byla po 25 min stabilizaci vyvolána 30 min regionální ischemie podvazem RIA. Po skončení ischemie následovala 5 min reperfuze.

3.4.3 VLIV STATINŮ NA VELIKOST INFARKTU MYOKARDU

Infarkt myokardu na modelu *in vivo* byl vyvolán 20 min regionální ischemií, která následovala po 25 min stabilizaci. Po 180 min. reperfuzi byla stanovena velikost infarktu. Statin (atorvastatin, Sigma Chemicals, Co., USA) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v dávce 1 mg/kg hmotnosti o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ a podán potkanům žaludeční sondou 30 min. před začátkem pokusu.

3.4.4 VLIV STATINŮ NA REPARACI KONTRAKTILITY

K hodnocení vlivu statinů na reparaci kontraktility jsme použili model *in vitro*. Po 25 min stabilizaci byla srdce vystavena 20 min globální ischemii a 40 min reperfuzi. Globální ischemie byla vyvolána uzavřením přítoku perfuzního roztoku do srdce. V průběhu ischemie byla srdce ponořena do Krebs-Henseleitova roztoku, temperovaného na 35°C (pH 7,4) a saturovaného 95 % N₂ a 5 % CO₂. Po obnovení průtoku byly kontraktilní parametry zaznamenávány v 5 min intervalech a vyjádřeny jako procento výchozích preischemických hodnot. Při akutním podávání byl simvastatin (Sigma Chemical Co., USA) podán do perfuzního roztoku v koncentraci 10 μmol/l jenom v reperfuzi a u chronického pokusu byl potkanům simvastatin podáván v koncentraci 5mg/kg přímo do potravy 14 dní před pokusem. Roztok simvastatinu použitý v akutním pokuse byl připraven následujícím způsobem (Zheng a Hu, 2006): prášek byl rozpuštěn v 0,5 ml 100% etanolu, poté smíchán s 0.75 ml 0,1 mol/l NaOH, zahříván na 50°C po dobu 2 hodin; poté neutralizován pomocí 0,1 mol/l HCl na pH 7,2 a nakonec deionizovanou vodou naředěn na konečnou koncentraci 10 μmol/l. Výsledný roztok jsme poté rozpustili přímo v perfuzním Krebs-Henseleitovém roztoku.

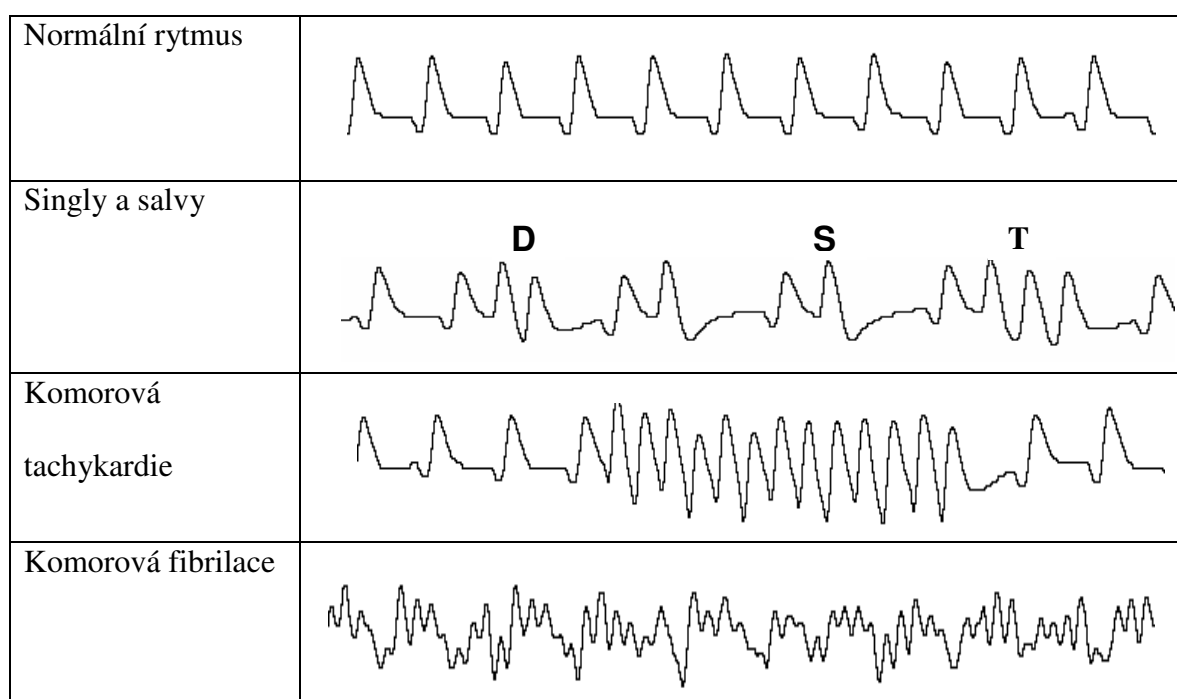
3.5 HODNOCENÍ ARYTMÍÍ

Komorové arytmie byly sledovány na modelu *in vitro* jednak během ischemie, jednak během reperfuze. Elektrogram byl zaznamenáván počítačem a po skončení pokusu analyzován pomocí vlastního počítačového programu. Arytmie byly hodnoceny podle Lambethské konvence (Walker a spol, 1988), jako:

- *jednoduché předčasné komorové stahy (singles),*
- *dvojité a trojité komorové stahy jdoucí po sobě - tzv. salvy,*
- *komorové tachykardie (VT) - čtyři a více po sobě jdoucí předčasné stahy,*

➤ *komorové fibrilace (VF).*

Příklady záznamů jednotlivých typů arytmíí ukazuje obr. č. 5. Dále jsme hodnotili výskyt a počet epizod komorových tachykardií a fibrilací. Komorové fibrilace trvající víc než 2 min jsme pokládali za trvalé. Kromě typu arytmíí jsme hodnotili ještě závažnost arytmíí pomocí skóre, kde je každému srdci přiděleno číslo od 1 do 5 podle nejzávažnějšího typu arytmie, který se u daného srdce vyskytl (singles-1, salvy-2, VT-3, VF-4, trvalé VF-5).



Obr. č. 5: Typy hodnocených komorových arytmíí. S - jednoduchý předčasný komorový stah (single), D - dvojitý a T - trojitý předčasný komorový stah.

3.6 STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Naměřené výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm střední chyby průměru (SE). Rozdíly v počtu arytmíí a ve velikosti infarktu myokardu mezi skupinami byly hodnoceny pomocí Mann-Whitneyova U testu. Při porovnávání více než dvou skupin byl

použit Kruskal-Wallisův neparametrický test. Výskyt komorových tachykardií a fibrilací byl hodnocen Fisherovým testem. ANOVA a následný Student-Newman-Keulsův test byly použity pro analýzu variance uvnitř skupin. Statistické rozdíly byly považovány za významné při $P < 0,05$. Ke statistickému a grafickému zpracování výsledků byl použit program GraphPad Prism 3.00.

Kapitola 4
VÝSLEDKY

4. VÝSLEDKY

4.1 Vliv PERINATÁLNÍ INTERMITENTNÍ VÝŠKOVÉ HYPOXIE NA ODOLNOST Dospělých SRDCÍ K ISCHEMII

V této části naší práce jsme se zaměřili na zjištění odolnosti myokardu k akutní ischemii u dospělých samců a samic, vystavených v perinatálním období chronické hypoxii. Potkany jsme adaptovali na výškovou intermitentní hypoxii 7 dní před porodem a 10 dní postnatálně (viz metodika). Pokusy byly rozděleny do dvou etap, ve kterých jsme sledovali dva různé parametry ischemicko/reperfuzního poškození na dvou různých experimentálních modelech. Během první etapy jsme jako parametr akutního ischemického poškození sledovali infarkt myokardu na modelu ventilovaného anestezovaného potkana – model *in vivo*. V druhé etapě jsme sledovali vliv perinatální hypoxie na závažnost a počet ischemických arytmií na izolovaném perfundovaném srdci – model *in vitro*.

4.1.1 HMOTNOSTNÍ PARAMETRY

Hmotnost těla, hmotnost srdce, relativní hmotnosti levé a pravé komory a poměr hmotnosti pravé a levé komory u normoxických a perinatální hypoxických samců a samic ukazuje tabulka č. 1. Hmotnost těla a srdce normoxických a perinatálně hypoxických samic byla významně nižší než u stejně starých samců. Zvířata vystavená perinatální hypoxii měla signifikantně nižší hmotnost těla a to jak samci tak samice. Perinatální hypoxie však významně ovlivnila hmotnost srdce jenom u samic: hmotnost srdce byla snížena, zatímco relativní hmotnost pravé komory (RV/HW) a pravolevý index (RV/LV) byly zvýšeny.

4.1.2 ISCHEMICKÉ ARYTMIE

Výchozí hodnoty tepové frekvence a perfuzního tlaku se mezi skupinami významně nelišily. Zatímco tepová frekvence se v průběhu celého experimentu neměnila, perfuzní tlak se po okluzi koronární artérie okamžitě zvýšil a po uvolnění okluze se vrátil na úroveň preischemických hodnot. Tyto změny byly srovnatelné ve všech skupinách a jsou shrnuty v tabulce č. 2. Všechna srdce měla v preischemické fázi pravidelný rytmus bez jakýchkoliv komorových arytmií. Podvaz koronární artérie vyvolal komorové arytmie s maximem mezi 10. a 20. min ischemie.

Zjistili jsme, že perinatální hypoxie zásadním způsobem ovlivňuje odolnost myokardu k akutní ischemii v dospělosti. U samců jsme pozorovali výrazný proarytmogenní vliv perinatální hypoxie; dochází ke zvýšení počtu všech pozorovaných typů arytmií v porovnání s kontrolní skupinou (graf č. 1). Naopak u samic, vystavených perinatální hypoxii, jsme pozorovali antiarytmický účinek, který se projevil výrazným snížením počtu ischemických arytmií (graf č. 2).

Tabulka 1: Hmotnost těla, hmotnost srdce a relativní hmotnost levé komory, pravé komory a septa u normoxických a perinatální hypoxických samců a samic.

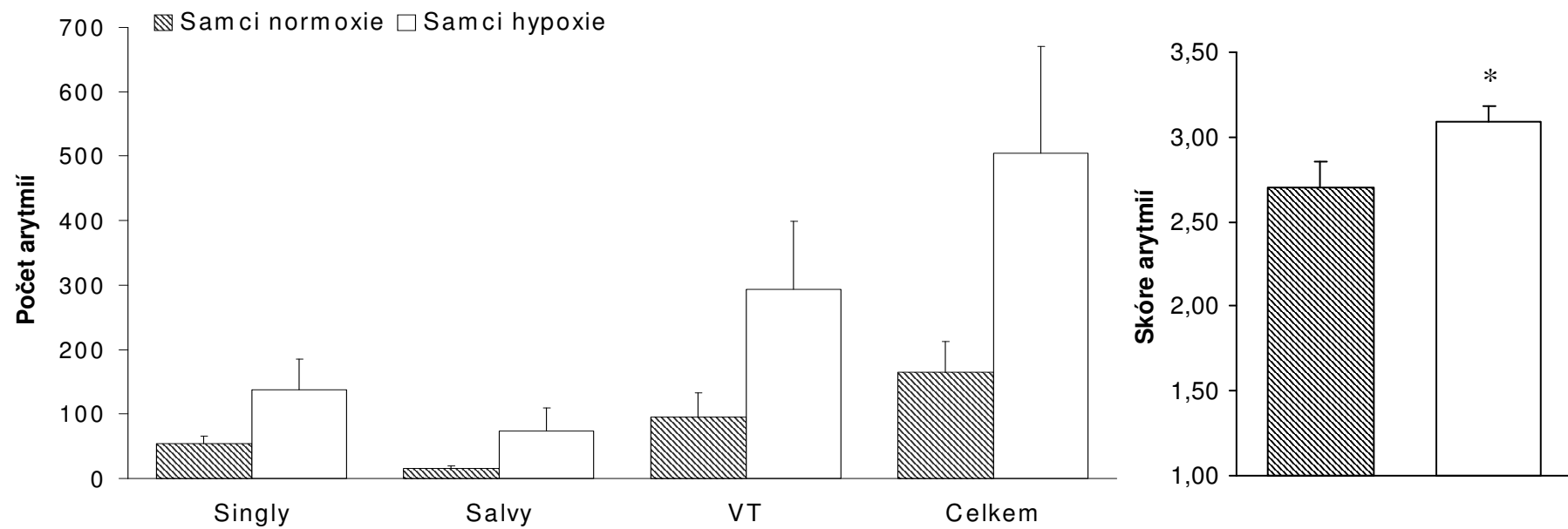
	N	BW (g)	HW (mg)	HW/BW	LV/BW	RV/BW	RV/LV
Normoxie – samci	10	343±5	769±33	2,23±0,07	1,33±0,04	0,45±0,03	0,34±0,01
Hypoxie – samci	10	317±8*	714,9±23	2,25±0,04	1,33±0,03	0,49±0,01	0,37±0,01
Normoxie – samice	10	216±6 [‡]	515,5 ±17 [‡]	2,39±0,05	1,415±0,04	0,47±0,02	0,34±0,02
Hypoxie – samice	10	190±3* [‡]	461,9±16* [‡]	2,43±0,05	1,396±0,06	0,53±0,01*	0,40±0,02*

BW, hmotnost těla; HW, hmotnost srdce; LV/BW, relativní hmotnost levé komory; RV/BW, relativní hmotnost pravé komory; RV/LV, poměr hmotnosti pravé a levé komory; n, počet zvířat. Hodnoty byly naměřeny odděleně před experimenty sledující odolnost myokardu samců a samic k akutní ischemii. * $P < 0.05$ hypoxie vs. normoxie, [‡] $P < 0.05$ samice vs. samci.

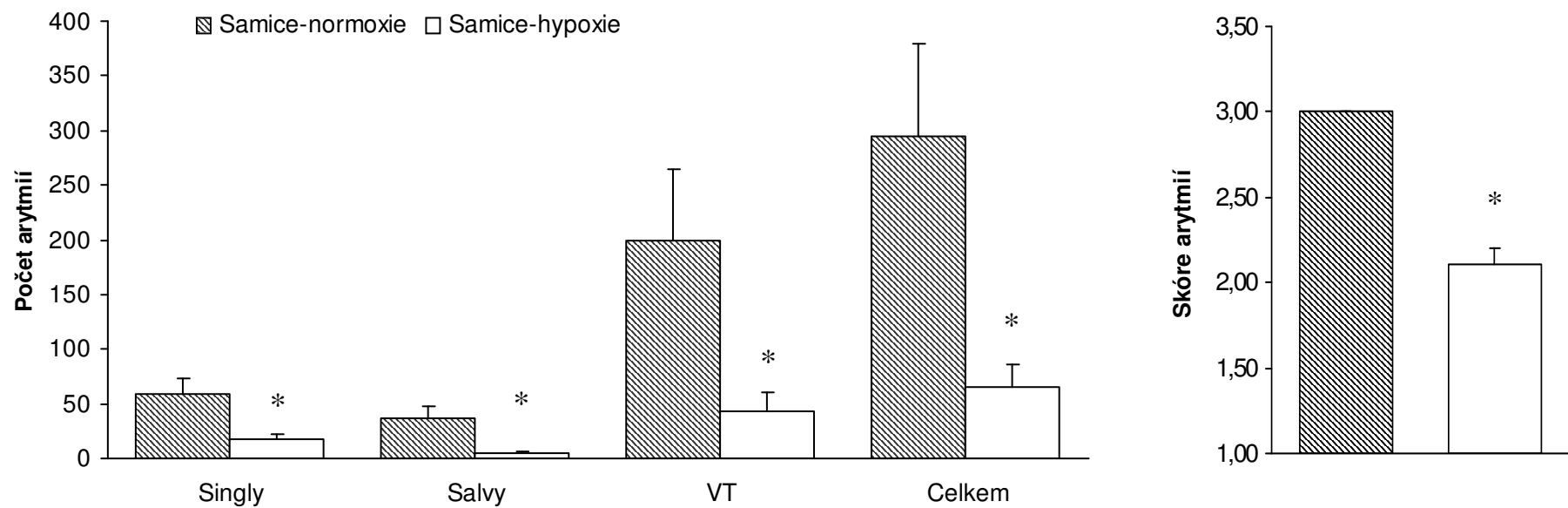
Tabulka 2: Koronární průtok, perfuzní tlak a tepová frekvence u normoxických a perinatálně hypoxických samců a samic před ischemií, v průběhu ischemie a v reperfuzi.

	n	Koronární průtok	Perfuzní tlak (mmHg)				Tepová frekvence (min ⁻¹)	
			stabilizace	Ischémie	Reperfuze	stabilizace	ischemie	reperfuze
				1 min	1 min		1 min	1 min
Samci – normoxie	10	11,9±0,5	47,8±1,9	67,6±3,0*	53,0±2,8	211±12	222±12	217±19
Samci – hypoxie	11	11,6±0,3	46,5±2,0	68,4±3,2*	54,0±3,4	203±13	218±12	239±13
Samice – normoxie	9	11,6±0,5	39,4±2,1 [‡]	58,0±3,7*	43,4±2,1 [‡]	193±17	192±11	223±21
Samice – hypoxie	9	10,9±0,2	37,3±2,1 [‡]	57,2±3,8* [‡]	42,5±2,6 [‡]	202±13	197±14	224±14

n, počet zvířat. * P<0.05 vs. hodnoty před ischemií, [‡] P<0.05 samice vs. samci.



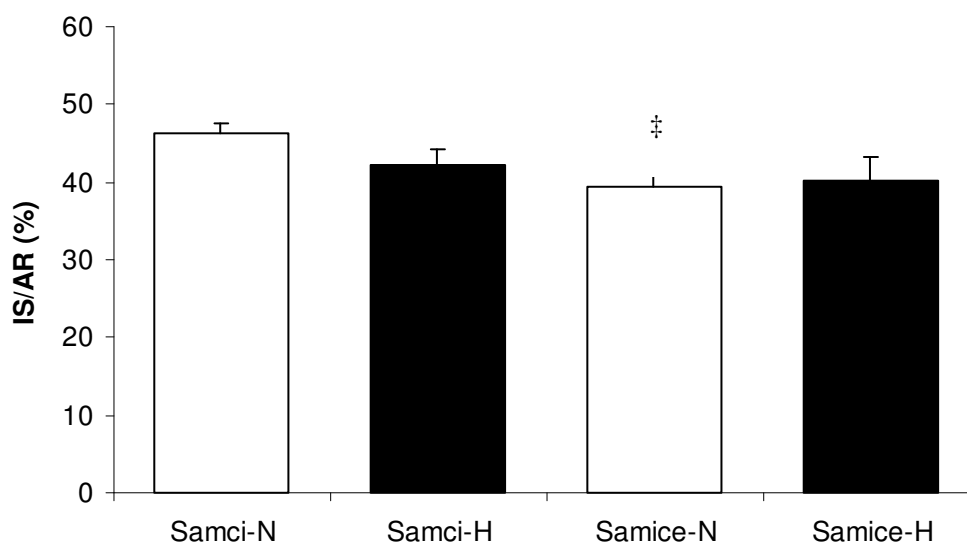
Graf č. 1 : Počet jednotlivých typů ischemických komorových arytmií a arytmiické skóre v průběhu 30-min ischemie u srdcí kontrolních a perinatálně hypoxických samců. * $P < 0,05$ vs. kontroly.



Graf č. 2 : Počet jednotlivých typů ischemických komorových arytmií a arytmiické skóre v průběhu 30-min ischemie u srdcí kontrolních a perinatálně hypoxických samic. * P<0,05 vs. kontroly.

4.1.3 INFARKT MYOKARDU

V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence u normoxických a perinatálně hypoxických samců a samic před ischemií, v průběhu ischemie a v reperfuzi. Zjistili jsme, že na modelu *in vivo* velikost infarktového ložiska dosahovala 46 % u kontrolních normoxických samců a jeho velikost nebyla ovlivněna perinatální hypoxií. Ve skupině normoxických samic byla velikost infarktu myokardu významně snížena v porovnání s normoxickými samci (o 15 %), ale podobně jako u samců jsme nepozorovali vliv perinatální hypoxie na velikost infarktového ložiska (graf č. 1).



Graf č. 3: Velikost infarktu myokardu (IS) vztažená na ohroženou oblast (AR - area at risk) ve skupině normoxických (N) a perinatálně hypoxických (H) samců a samic; model *in vivo*.

Tabulka 3: Krevní tlak a tepová frekvence u normoxických a perinatálně hypoxických samců a samic před ischemií, v průběhu ischemie a v reperfuzi na modelu *in vivo*.

	Stabilizace	Ischemie 20 min	Reperfuze 3 h
Tepová frekvence (min ⁻¹)			
Samci – normoxie	451±12	431±18	424±23
Samci – hypoxie	398±10*	444±13 [‡]	406±19
Samice – normoxie	448±16	452±42	454±33
Samice – hypoxie	432±18	439±10	410±23
Krevní tlak (mmHg)			
Samci – normoxie	87±1	98±4	98±5
Samci – hypoxie	106±9	108±17	104±9
Samice – normoxie	87±3	83±2	90±4
Samice – hypoxie	103±9	96±12	95±13

Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ze 6 srdcí v každé skupině v stabilizaci, na konci 20-min ischemie a na konci reperfuze. * $P < 0.05$ hypoxie vs. normoxie, [‡] $P < 0.05$ vs. stabilizace.

4.2 Vliv statinů na ischemicko/reperfuzní poškození myokardu

V druhé části naší práce jsme se zaměřili na zjištění vlivu statinů na odolnost myokardu k akutnímu ischemicko/reperfuznímu poškození u dospělých samců potkana. Tato část práce byla rozdělena do dvou etap, ve kterých jsme sledovali dva různé parametry ischemicko/reperfuzního poškození na dvou různých experimentálních modelech. Během první etapy jsme jako parametr akutního ischemického poškození sledovali velikost infarktu myokardu na modelu *in vivo*. V druhé etapě jsme hodnotili vliv statinů na velikost reparace kontraktility na izolovaném perfundovaném srdci. V této části experimentu jsme dále hodnotili způsob podávání statinů; použili jsme protokol s akutním i chronickým podáváním.

4.2.1 INFARKT MYOKARDU

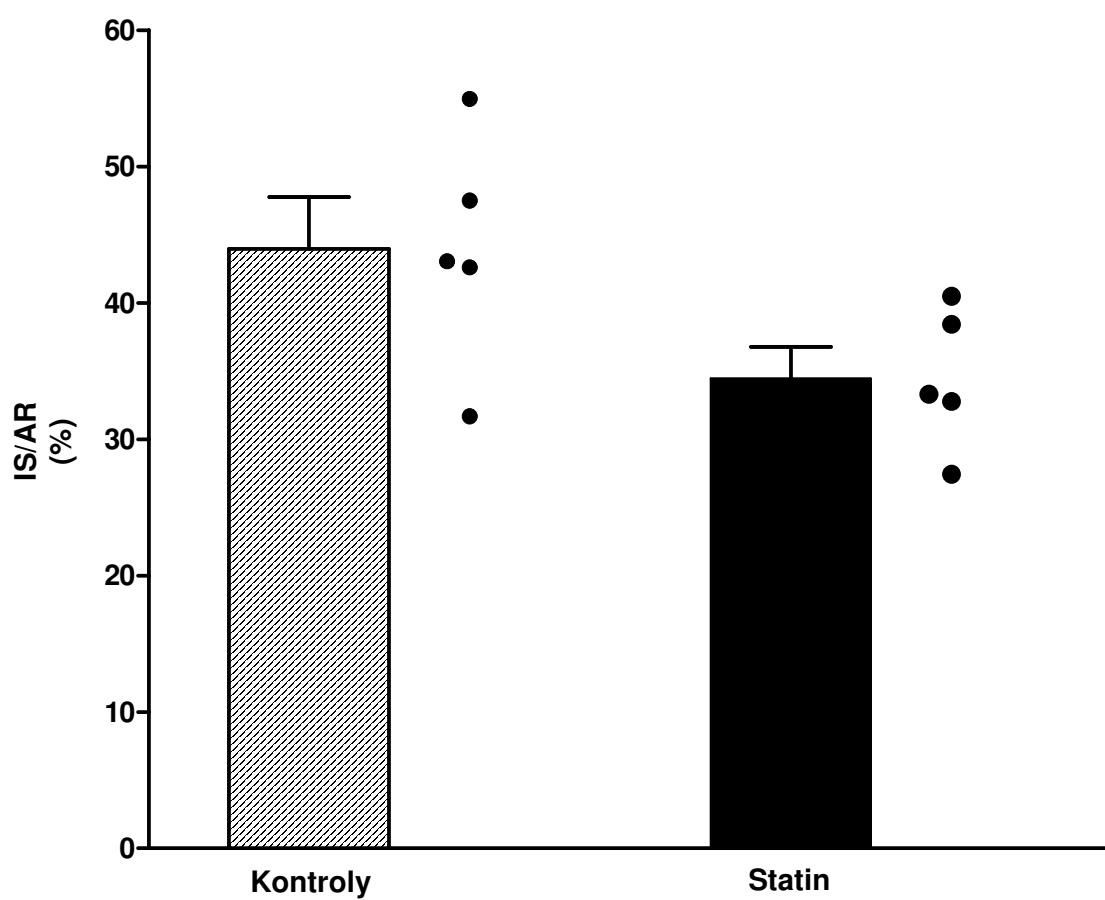
V tabulce č. 4 jsou uvedeny hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence u kontrolních potkanů a u potkanů po aplikaci statinu v období stabilizace, v průběhu ischemie a v reperfuzi. Žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami jsme nezjistili, podobně jako u hmotnostních parametrů. Velikost infarktového ložiska vztažená na velikost levé komory byla u potkanů léčených statinem významně nižší (graf č. 5) než u kontrol. Při hodnocení velikosti infarktu myokardu vztaženou na ohroženou oblast (area at risk) byl protektivní vliv podávání statinu naznačen, ale nedosáhl statistické významnosti (graf č. 4).

Tabulka 4: Krevní tlak a tepová frekvence u kontrolních potkanů a potkanů léčených simvastatinem před ischemií, v průběhu ischemie a v reperfuzi na modelu *in vivo*.

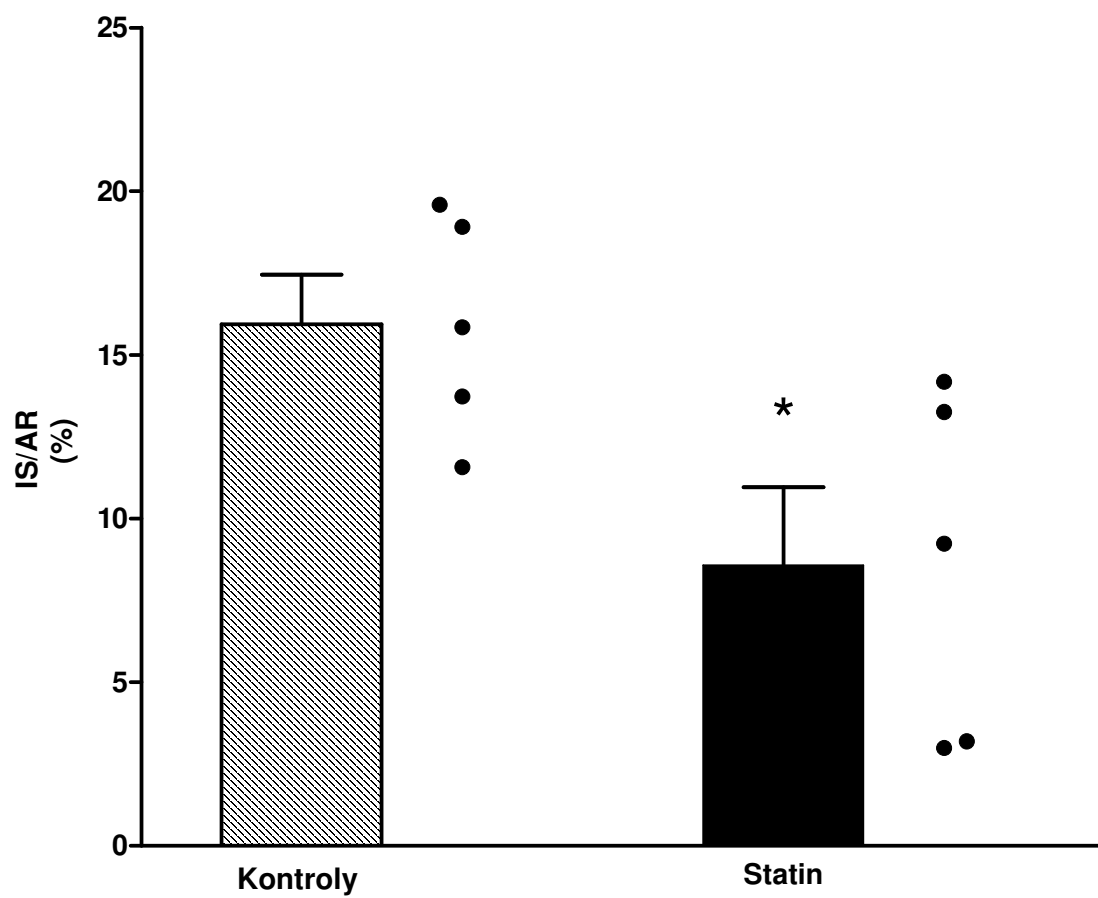
	Stabilizace	Ischemie 20 min	Reperfuze 3 h
Tepová frekvence (min⁻¹)			
Kontrola	436±20	415±21	422±15
Statin	427±11	431±13	405±25
Krevní tlak (mmHg)			
Kontrola	88±2	93±5	98±7
Statin	91±2	90±6	96±5

Hodnoty jsou prezentovány jako průměr z 5 srdcí v každé skupině v stabilizaci, na konci 20-min ischemie a na konci reperfuze.

Graf č. 4: Velikost infarktu myokardu (IS) vztažená na ohroženou oblast (AR) u potkanů po aplikaci statinů a u kontrol měřena na modelu *in vivo*.



Graf č. 5: Velikost infarktu myokardu (IS) vztažená na velikost levé komory (LV) u potkanů po aplikaci statinů a u kontrol; model *in vivo*. *P<0.05 vs. kontroly



4.2.2 REPARACE KONTRAKTILITY

Tabulka č. 5 ukazuje hmotnost těla a srdce a relativní hmotnost celého srdce, levé komory a pravé komory u potkanů léčených chronickým nebo akutním podáváním statinů ve srovnání se zvířaty kontrolními. Hmotnost těla i srdce u potkanů léčených akutně podávaným statinem byla signifikantně vyšší, ale relativní hmotnosti srdce a levé komory se mezi skupinami nelišily; relativní hmotnost pravé komory byla nižší u kontrolní skupiny.

Tabulka č. 5: Hmotnost těla, srdce a relativní hmotnost srdce, levé komory a pravé komory zvířat kontrolních, a u potkanů léčených chronicky nebo akutním podáváním statinů.

	n	BW (g)	HW (mg)	HW/BW	LV/BW	RV/BW
Kontroly	7	289 ± 7	843 ± 52	2,93 ± 0,19	2,41 ± 0,17	0,52 ± 0,03
Akutní statin	7	337 ± 9*	1007 ± 34*	3,05 ± 0,6	2,43 ± 0,06	0,62 ± 0,02*
Chronický statin	6	287 ± 4	918 ± 90	3,20 ± 0,6	2,57 ± 0,29	0,63 ± 0,04*

BW, hmotnost těla; LV/BW, relativní hmotnost levé komory; RV/BW, relativní hmotnost pravé komory; S/BW, relativní hmotnost septa; n, počet zvířat. *P<0.05 vs. kontroly.

Akutní ani chronické podávání simvastatinu nemělo vliv na základní parametry kontraktility [vyvinutý tlak, diastolický tlak, $(+dP/dt)_{\max}$] ani koronární průtok (tabulka č. 6). Sledovaný projev ischemicko/reperfuzního poškození - kontraktilní dysfunkci - jsme hodnotili jako průběh a velikost obnovy $(+dP/dt)_{\max}$ a vyvinutého tlaku (LVDP) v reperfuzi a

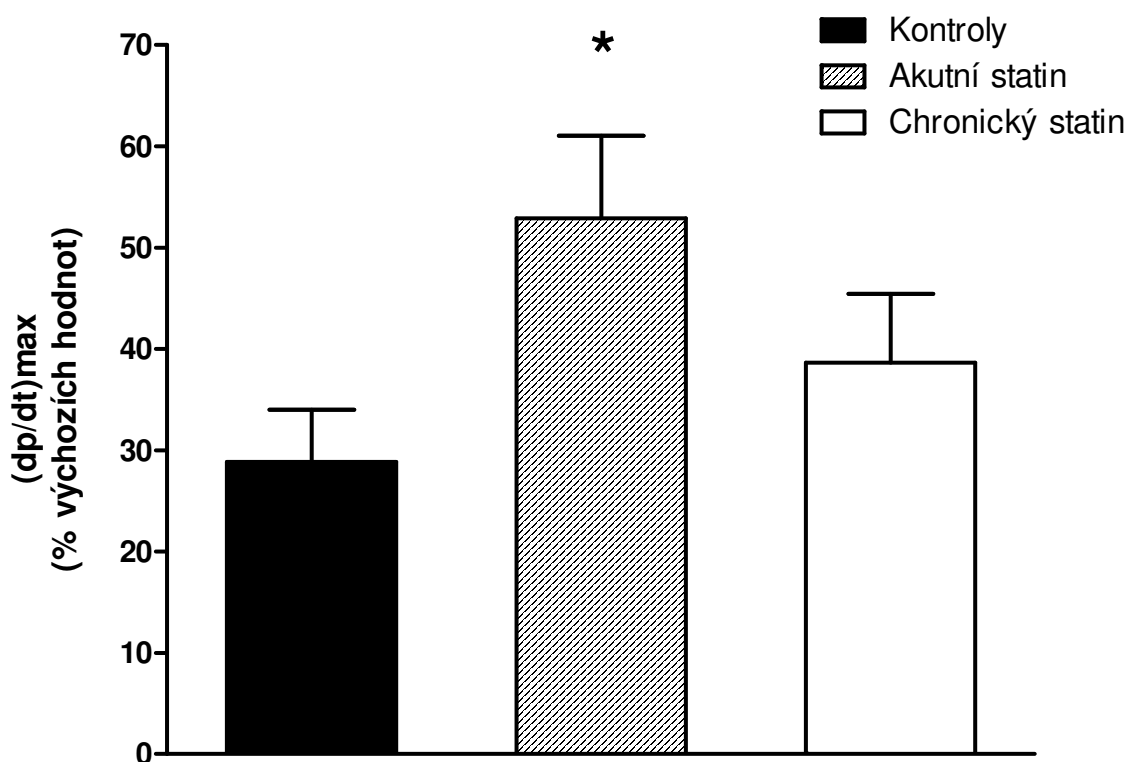
vyjadřovali jako % výchozích preischemických hodnot (grafy č. 6, č. 7). Akutní podání simvastatinu významně zlepšilo maximální hodnoty reparační kontraktilních parametrů - $(+dP/dt)_{\max}$ a vyvinutého tlaku ($52,9 \pm 8,2$; $56,9 \pm 8,6$) v porovnání s kontrolní skupinou ($28,8 \pm 5,2$; $29,5 \pm 6,5$), zatímco chronické podávání nemělo žádný statisticky významný protektivní vliv. Akutní i chronické podávání simvastatinu neovlivnilo časový průběh obnovy $(+dP/dt)_{\max}$ a LVDP; ty postupně narůstaly od prvních minut reperfúze a od 25. min až do konce pokusu (40. min) se už výrazně nezvyšovaly (grafy č. 8, č. 9).

Tabulka č. 6: Účinek akutního a chronického podávání statinů na základní kontraktilní parametry a koronární průtok u experimentálních zvířat.

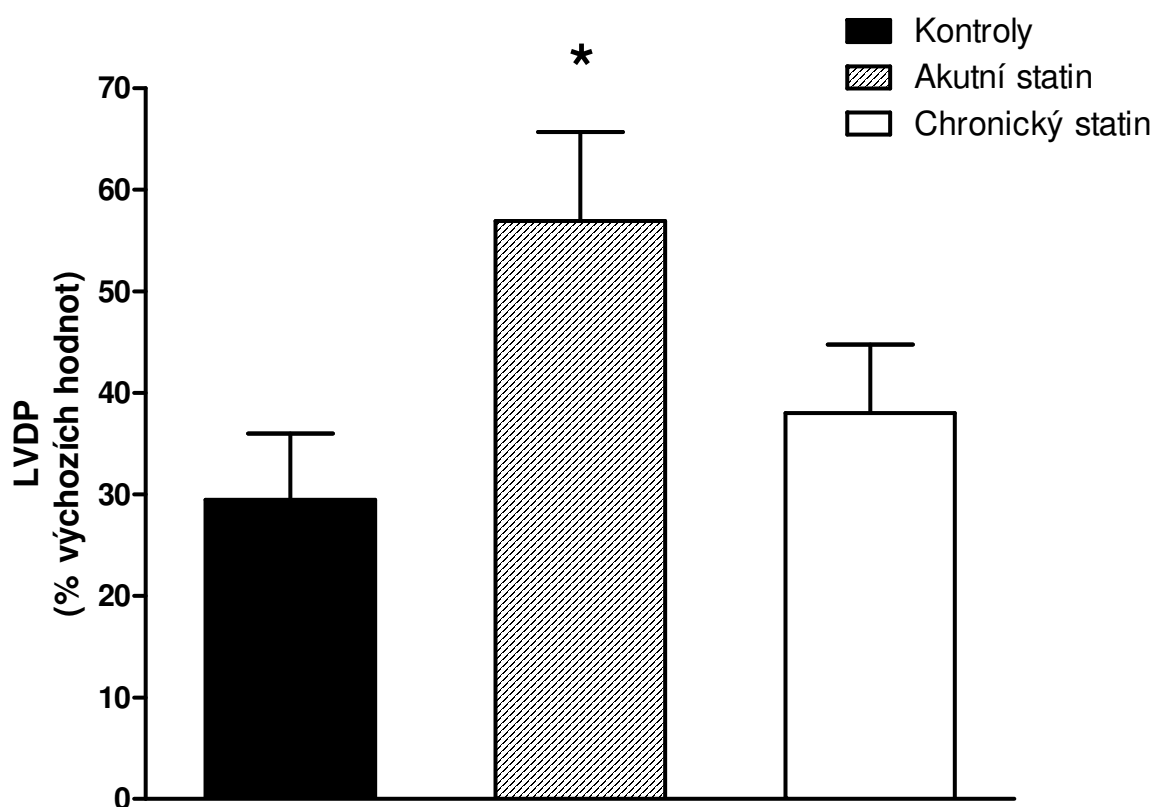
	n	$(+dP/dt)_{\max}$ (mm Hg/s)	LVDP (mm Hg)	DP (mm Hg)	CF (ml/min/g)
Kontroly	7	3973 ± 124	121 ± 2	$7,4 \pm 0,3$	$16,9 \pm 0,5$
Akutní statin	7	3505 ± 196	119 ± 3	$7,1 \pm 0,5$	$18,0 \pm 0,6$
Chronický statin	6	4016 ± 215	113 ± 4	$6,2 \pm 0,9$	$17,5 \pm 0,7$

LVDP, vyvinutý tlak; DP, diastolický tlak; CF, koronární průtok; n, počet zvířat.

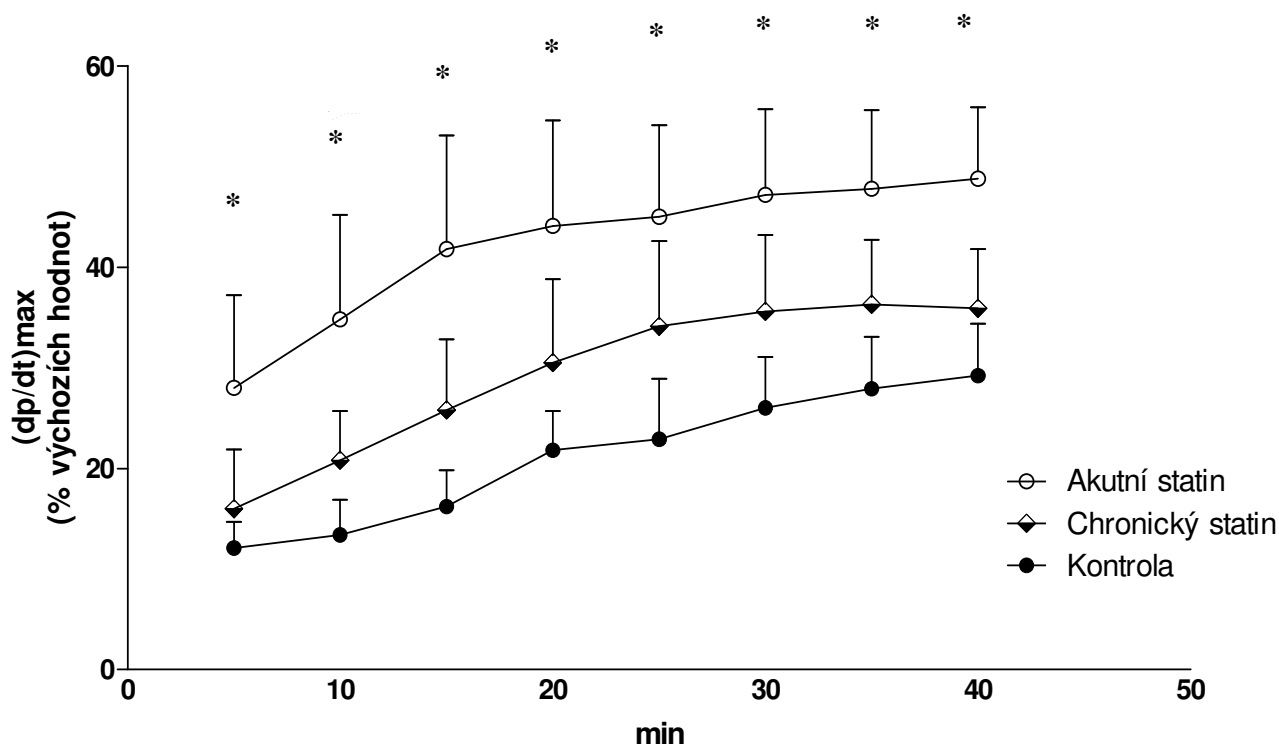
Graf č. 6: Vliv akutního a chronického podávání statinů na nejvyšší dosažené hodnoty reparační (+dP/dt)_{max} v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot. *P<0.05 vs. kontroly



Graf č. 7: Vliv akutního a chronického podávání statinů na nejvyšší dosažené hodnoty reparace LVDP v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot. *P<0.05 vs. kontroly

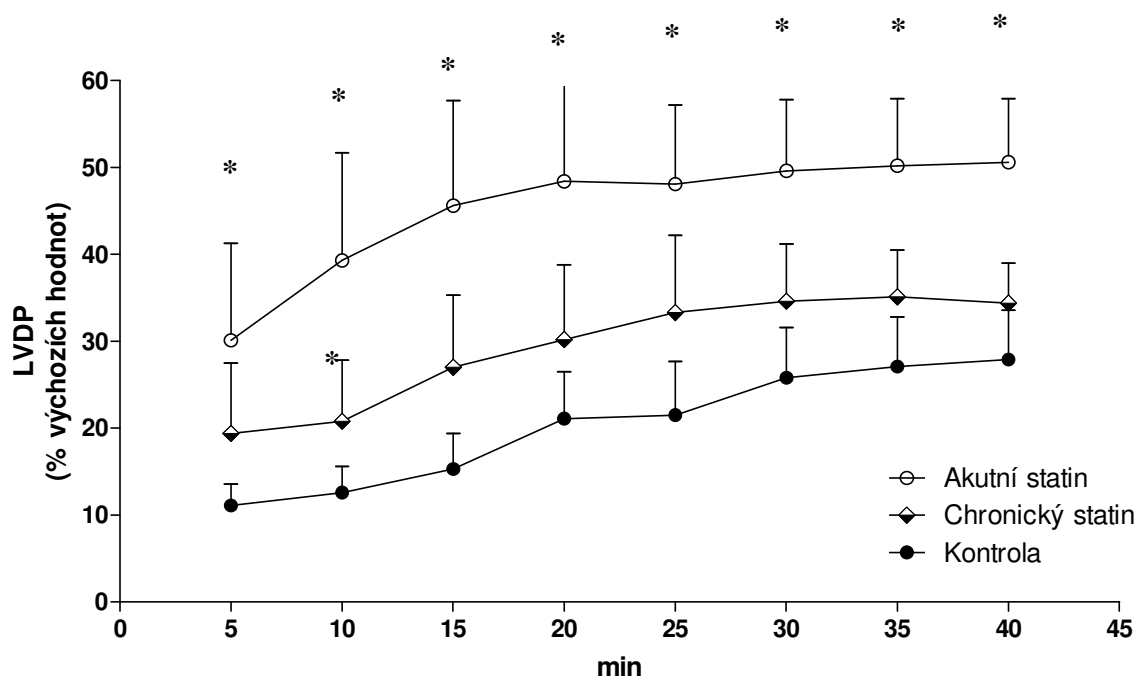


Graf č. 8: Vliv akutního a chronického podávání simvastatinu na průběh reparaace $(+dP/dt)_{max}$ v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot. * $P < 0.05$ vs. kontroly.



Graf č. 9: Vliv akutního a chronického podávání simvastatinu na průběh reparace LVDP v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot.

*P<0.05 vs. kontroly.



Kapitola 5

DISKUZE

5. DISKUZE

5.1 PERINATÁLNÍ HYPOXIE A JEJÍ VLIV NA AKUTNÍ ISCHEMICKO/REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU

5.1.1 VLIV PERINATÁLNÍ HYPOXIE NA ODOLNOST DOSPĚLÝCH SRDCÍ K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Naše pokusy ukázaly, že pozdní kardiální důsledky časné hypoxie jsou u laboratorních potkanů závislé na pohlaví. Zatímco perinatální expozice intermitentní výškové hypoxii významně zvýšila odolnost dospělých samic k akutnímu ischemickému poškození (vyjádřenou nižší incidencí ischemických arytmií), pak odpověď dospělých samců byla přesně opačná. Tyto výsledky podporují hypotézu, vyslovenou v úvodu této práce, že chronická hypoxie v časném období ontogenetického vývoje může významně ovlivnit odpověď dospělého kardiovaskulárního systému na akutní patogenní podněty, jako je nedostatečné zásobení kyslíkem.

Údaje o pozdních důsledcích chronické hypoxie na odolnost srdečního svalu k akutní hypoxii či ischemii jsou zatím nedostatečné; případné pohlavní rozdíly pak nebyly dosud vůbec studovány. Rohlicek a spol (2002, 2005) pozorovali, že dospělí potkani, kteří byli v neonatálním období hypoxemičtí, mají ve srovnání s kontrolními zvířaty významně vyšší minutový objem srdeční; tepová frekvence byla přitom zvýšená a krevní tlak klesal podobně jako u normoxických kontrol. Li a spol (2003) zjistili, že prenatální chronická hypoxie významně zvyšuje citlivost dospělých srdcí (stáří 6 měsíců) k ischemicko/reperfuznímu poškození: velikost infarktu byla zvýšená a obnovení kontraktilních funkcí zhoršeno. Ve

své další studii s 2 měsíčními potkany (Li a spol 2004) však ukázali, že prenatální hypoxie velikost srdečního infarktu neovlivnila. To je v souladu s našimi pokusy, ve kterých jsme rovněž použili zvířata mladší věkové skupiny. Nicméně na námi sledovaném parametru ischemicko/reperfuzního poškození – ischemických arytmiích jsme prokázaly rozdíly i u takto starých zvířat. Podobné ontogenetické údaje nejsou dosud k dispozici, zdá se však, že vliv pozdních důsledků časné hypoxie na odolnost dospělých zvířat k akutní ischemii může záviset na věku experimentálních zvířat.

5.1.2 PROTEKTIVNÍ VLIV ADAPTACE NA CHRONICKOU HYPOXII

Perinatální hypoxie zvýšila v našich experimentech odolnost srdcí dospělých samic k akutní ischemii. Je známo, že adaptace na chronickou hypoxii představuje efektivní kardioprotektivní fenomén (Ostadal a Kolář 1999, 2007, Ostadal a spol 1999) jehož vliv může přetrvávat poměrně dlouho po vyjmutí zvířat z hypoxického prostředí (Faltová a spol 1987, Neckar a spol 2004, Fitzpatrick a spol 2005). Neckar a spol (2004) prokázali, že ještě 35 dní po skončení hypoxické expozice je rozsah infarktového ložiska u pokusných zvířat menší než u zvířat kontrolních. Přetrvávání protektivního vlivu však záviselo na studovaném parametru; antiarytmický efekt adaptace měl podstatně kratší trvání (jeden týden). Vzhledem k tomu, že všechny uvedené výsledky byly získány pouze u samců, nelze vyloučit, že přetrvávání protektivního vlivu může být u samic delší.

Přesné molekulární mechanismy protektivního působení adaptace na chronickou hypoxii nejsou dosud objasněny (Kolář a Ostadal 2004). Z mnoha potenciálních faktorů byly dosud experimentálně studovány jen některé. Je dobře známo, že expozice chronické hypoxii je zpočátku spojena s oxidačním stresem (Herget a spol 2000, Kolář a spol 2007) a zvýšenou adrenergní stimulací (Ostadal a spol 1984). Oba vlivy byly dlouho považovány za

jednoznačně škodlivé; v současné době se však ukazuje, že se mohou dosud neznámým mechanismem podílet na rozvoji protektivního působení. Dalším studovaným faktorem je oxid dusnatý (NO). Bylo totiž prokázáno, že hraje pozitivní úlohu v protektivním mechanismu chronické hypoxie u neonatálních potkanů (Ostadalová a spol, 2002) a králíků (Baker a spol 1999a). Jak adrenergní stimulace tak zvýšená produkce kyslíkových radikálů a NO mohou měnit expresi řady signálních molekul. V této souvislosti je třeba jmenovat proteinkinázy (Ding a spol 2004, Neckar a spol 2005), sarkolemální a mitochondriální K_{ATP} kanály (Asemu a spol 1999, Ostadalová a spol 2002, Kolář a spol 2005), ryanodinové receptory (Chen a spol 2006) a fosfolamban (Xie a spol 2005).

Jak však vysvětlit, že vliv perinatální hypoxie na odolnost myokardu se projeví v dospělosti? Li a spol (2003) se domnívají, že perinatální hypoxie může vést ke změně programu některých genů *in utero*, jako na př. HSP70, eNOS, β -adrenergních receptorů a G proteinů, což může mít dlouhodobý vliv na srdeční funkci a odolnost dospělého srdce k nedostatku kyslíku. Tuto hypotézu podporují i další výsledky uvedeného týmu (Li a spol 2004), které ukázaly, že prenatální hypoxie vede v srdci k inhibici syntézy proteinů tepelného šoku (HSP70) a ruší tak kardioprotektivní působení těchto proteinů. Avšak dosud neexistují důkazy o možných pohlavních rozdílech v molekulárních mechanismech odpovědných za protektivní působení chronické hypoxie.

5.1.3 POHLAVNÍ ROZDÍLY V ODOLNOSTI MYOKARDU K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Průkaz pohlavních rozdílů v odolnosti dospělého srdečního svalu k nedostatku kyslíku není překvapivý. Ostadal a spol (1984) zjistili již před více jak dvaceti lety, že izolovaná pravá srdeční komora samic laboratorních potkanů je významně odolnější k akutnímu

nedostatku kyslíku než pravá komora samčí. Poledne (1986) ukázal, že stimulovaná cholesterolemie je u samic Pražského hereditárního hypercholesterolemického potkana signifikantně vyšší než u samců stejného kmene. Intenzivní výzkum této otázky však začal teprve v posledních několika letech (Ostadal a spol 2009). Vyšší odolnost samičího srdečního svalu k ischemicko/reperfuznímu (I/R) poškození byla prokázána u psů, potkanů a myší (Johnson a spol 2006). Nedostatek estrogenů zvyšuje u potkanů citlivost k I/R poškození, zvýšená hladina ji naopak snižuje. Naše výsledky ukázaly, že pohlavní rozdíly v odolnosti dospělého srdečního svalu k ischemii mohou výrazně ovlivnit zásahy v časných fázích ontogenetického vývoje. Nevyřešena je otázka, co je příčinou těchto rozdílů? Zde je možné uvést další výsledky naší pracovní skupiny, kdy byla provedena gonadektomie u perinatálně hypoxických samců a samic ihned po narození. Bylo zjištěno, že neonatální kastrace neovlivnila arytmogenezi u normoxických ani hypoxických dospělých samic, naproti tomu u dospělých normoxických samců významně snížila počet ischemických arytmií. U hypoxických kastrovaných samců se počet arytmií dále snížil, ale pokles již nebyl statisticky významný (Netuka a spol, zatím nepublikováno).

Zatím jediné experimentální studie, které se zabývají pohlavními rozdíly v pozdních důsledcích perinatální hypoxie na kardiopulmonální systém jsou práce Hampla a Hergeta (1990) a Hampla a spol (2003). Tito autoři zjistili, že perinatální hypoxie vede u samic laboratorního potkana k permanentnímu zvýšení pravo-levého srdečního indexu; to odpovídá i perzistující pravostranné hypertrofii u dospělých samic, vystavených perinatální hypoxii v našem experimentálním uspořádání. Hampl a spol (2003) dále ukázali, že ovariektomie, provedená u samic v časném postnatálním období, zvyšuje negativní vliv perinatální hypoxie v dospělosti: tlak v plicním řečišti byl u samic významně zvýšen. Autoři proto uzavírají, že přítomnost ovárií chrání před negativním působením perinatální hypoxie v dospělosti.

I když úloha pohlavních hormonů v kardioprotekci není zdaleka tak jednoznačná, jak se předpokládalo, nelze říci, že by neměly na kardiovaskulární systém žádný vliv. Vždyť funkční estrogenové receptory (α a β) byly prokázány v samčích i samičích srdečních buňkách; jejich afinita k vazbě na 17β -estradiol je přitom u obou pohlaví stejná. Vazba estrogenů na receptory vede k ovlivnění genové exprese řady funkčních a strukturálních bílkovin (tzv. „genomic effect“, např. pohlavní rozdíly v expresi kontraktálních a kolagenních bílkovin). Kromě toho mají však estrogény i přímý vliv na aktivitu signálních kaskád, který se objevuje rychle a nezávisle na syntéze proteinů („non-genomic effect“). Jedním z možných mechanismů, které by se mohly ve zvýšené odolnosti samičího srdce uplatnit, je molekula oxidu dusnatého (Di Lisa, 2006 a, 2006 b). Bylo totiž prokázáno, že v samičím myokardu je výrazně vyšší exprese endoteliální NO syntázy (eNOS); blokátor tohoto enzymu (L-NAME) pohlavní rozdíly poškození zrušil. Sun a spol (2006) navíc prokázali, že vyšší hladina eNOS v samičím srdci snižuje aktivitu vápníkových kanálů typu L a tak zabraňuje přetížení buňky vápníkem, jedné z hlavních příčin I/R poškození. Tento mechanismus však zřejmě nebude jedinou cestou, která se v protekci samičího myokardu uplatňuje. Svou roli zde, zdá se, hrají např. sarkolemální (Johnson a spol 2006) a mitochondriální (Lee a spol 2000) K_{ATP} kanály; jejich blokáda totiž zvětšila rozsah poškození v samičím srdci. Bae a Zhang 2005) se domnívají, že za zvýšenou odolnost samičího srdce je odpovědná vyšší aktivita serin/threonin protein kinázy (Akt) a protein kinázy C. Ta má na jedné straně za následek redukci tvorby kyslíkových radikálů a proapoptotické isoformy p38 MAPK kinázy, na druhé straně stimulaci antiapoptotické isoformy p38. Pro možnou protektivní úlohu Akt svědčí i pozorování Camper-Kirby a spol (2001), že v jádrech myocytů pre-menopausálních žen se nachází větší množství Akt. Xu a spol (2006) se zase domnívají, že kardioprotektivní efekt estrogenů je vyvolán inhibicí prozánětlivého tumor necrosis factor α (TNF α) v ischemickém myokardu; dochází ke zlepšení reparace kontraktální funkce a k redukci apoptozy a nekrozy.

Převážná většina experimentálních prací si však z pohlavních hormonů vybrala pouze jeden – estrogen. Je přitom jasné, že kardiovaskulární systém ovlivňuje nejen celá řada estrogenních hormonů, či hormonů s estrogenními účinky, ale také nejméně jeden další silný hráč, androgenní hormony. Jak estrogenní tak androgenní hormony jsou přítomny u obou pohlaví, i když v různých koncentracích a poměrech. Endogenní androgeny (dehydroepiandrosteron, androstendion a dehydroepiandrosteron) jsou pomocí enzymů 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy a aromatázy přeměňovány na estradiol. To znamená, že některé pozitivní efekty testosteronu, které pozorujeme u samců, mohou být způsobeny jeho konversí na estradiol a jeho metabolity. Testosteron aktivuje androgenové receptory, které jsou exprimovány v myocytech; zvyšuje hladinu homocysteinu a ET-1 a stimulací tyroxin hydroxylázy zvyšuje syntézu katecholaminů. Testosteron tedy zásadním způsobem ovlivňuje kardiovaskulární systém; jeho nižší hladina má kardioprotektivní efekt (Dubey a spol 2002).

Jak je vidět, množství různých hypotéz, pokoušejících se vysvětlit příčiny pohlavních rozdílů v odolnosti srdečního svalu k nedostatku kyslíku, přibývá. Na definitivní, důkladně ověřené vysvětlení molekulární podstaty tohoto, z klinického hlediska závažného biologického fenoménu, si však musíme ještě počkat.

5.2 Vliv farmakologické intervence statiny na akutní ischemicko/reperfuzní poškození myokardu

Důkazy o účinnosti statinů v terapii ICHS vycházejí z rozsáhlých prospektivních klinických studií jako jsou 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) (48), CARE (Cholesterol and Recurrent Events) (Sacks 1996,49) nebo LIPID (Long-Term InteRvention with Pravastatin in Ischaemic Disease) (50). Objevení pleiotropních účinků statinů v posledních letech se

odrazilo ve snaze využívat statiny i u akutních forem ICHS. Byly publikovány experimentální a klinické studie prokazující příznivý účinek statinové terapie zahájené v průběhu AKS.

5.2.1 PROTEKTIVNÍ OVLIVNĚNÍ ISCHEMICKO/REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ

Bylo opakovaně prokázáno, že léčba zvířat statiny před začátkem ischemie významně snižuje ischemicko/reperfuzní poškození myokardu. Lefer a spol (1999) prokázali na modelu izolovaného perfundovaného srdce potkana protektivní účinek simvastatinu, pokud byl podáván před ischemií. Simvastatin inhiboval interakce mezi leukocyty a endotelem a zlepšil parametry kontraktility. Ueda a spol (1999) popsali, že léčba pravastatinem snižuje velikost infarktu myokardu u hypercholesterolemických králíků. V jiné studii Lefer a spol (2001) prokázali zmenšení velikosti infarktu po léčbě simvastatinem u diabetické myši. Bylo také zjištěno, že tento protektivní účinek může být částečně způsoben stimulací eNOS a zvýšenou produkcí NO (Leffer a spol 2001, Di Napoli a spol 2001).

Uvedené studie naznačují, že by pacienti s akutním infarktem myokardu mohli ze včasného zahájení statinové terapie v průběhu ischemie nebo před začátkem reperfuze profitovat. Bauersachsovi a spol (2001) se nepodařilo prokázat zmenšení velikosti infarktu, byl-li statin podáván 24 hodin po nástupu ischemie myokardu. První studie, která prokázala významný prospěch statinové terapie započaté hned po nástupu ischemie byla práce Hayashidaniho a spol (2002): popsali nižší mortalitu u myší, kterým byl proveden podvaz koronární artérie a terapie fluvastatinem byla zahájenou hned po tomto zákroku. Kromě toho fluvastatin zmírnil remodelaci levé srdeční komory, snížil incidenci selhání srdce. Bell a Yellon (2003) na modelu izolovaného perfundovaného srdce myši prokázali příznivý účinek atorvastatinu podaného v reperfuzi na snížení velikosti infarktu myokardu. Výsledky této studie *in vitro* byly nedávno potvrzeny Wolfrumem a spol (2004) v *in vivo* studii u potkanů.

5.2.2 UŽITÍ STATINŮ V LÉČBĚ AKS

Prospektivní klinické studie prokázaly bezpečnost a při časném zahájení statinové terapie po AKS také účinnost této terapie (Tab. 7). Nicméně je třeba zdůraznit, že tyto studie byly navrženy pro časnou (případně velmi časnou) sekundární prevenci, ne pro skutečnou léčbu AKS. Ve všech výše uvedených studiích byli pacienti randomizováni během několika hodin až dní po přijetí k hospitalizaci. Během této doby je většina pacientů již klinicky stabilizována.

Tabulka 7. Významné klinické studie

Studie	Počet pacientů	Zkoušený lék	Základní parametr	Výsledky
MIRACL	3086	Atorvastatin / placebo	MACE	RR 0,84; p=0,048
FLORIDA	540	Fluvastatin / placebo	Ischemie	n.s.
PROVE-IT	4162	Atorvastatin / pravastatin	MACE	RR 0,84; p=0,005
PACT	3408	Pravastatin / placebo	MACE	n.s.
A to Z	4497	Simvastatin / placebo	MACE	n.s.
PRINCESS	3600	Cerivastatin / placebo	MACE	n.s.

MACE, major adverse cardiac events (závažné nežádoucí kardiální příhody)

Objev pleiotropních účinků statinů otevřel nové pole pro indikaci statinové léčby. Rozšíření znalostí o pleiotropních účincích statinů spolu s rostoucím poznáním patogeneze AKS posouvá zahájení statinové terapie blíže k nástupu jeho symptomů. Nedávné experimentální studie, podobně jako první klinické studie, přinesly slibné výsledky podporující myšlenku protektivního podání statinů při AKS. K výslednému potvrzení tohoto terapeutického postupu bude nezbytné provedení dalších experimentálních a klinických prací. Výsledky naší experimentální práce zaměřené na možnost farmakologického ovlivnění kontraktilní dysfunkce navozené epizodou globální ischemie jsou v plně v souladu s předchozím konstatováním. Naše výsledky jasně ukázaly, že podání simvastatinu v průběhu akutní fáze signifikantně snižuje kontraktilní dysfunkci. Již dříve publikované experimentální práce na zvířecích modelech prokázaly, že akutní podání statinů před začátkem ischemie myokardu významně snižuje velikost infarktového ložiska nejenom u myši (Lefer a spol 2001, Jones a spol 2002, Yamakuchi a spol. 2005), u potkanů (Di Napoli a spol 2001, Wayman a spol 2003, Tiefenbacher a spol 2003), ale i u psů (Sanada a spol 2004) a u prasat (Lazar a spol 2003). Všechny tyto experimentální studie jasně demonstrují protektivní efekt podávání statinů profylakticky. Nicméně nedávají odpověď na námi vyslovenou hypotézu, zda-li jde ovlivnit rozsah ischemického poškození farmakologicky pomocí statinové terapie během reperfuze. Zheng a Hu (2006) prokázali na izolovaném modelu potkaního srdce pozitivní efekt na reparaci kontraktility přidáním simvastatinu do perfuzního roztoku v průběhu reperfuze po 15 min ischemii. Bell a Yellon (2003) prokázali pozitivní efekt podání atorvastatinu během reperfuze na velikost (zmenšení) infarktového ložiska na modelu izolovaného perfundovaného myšího srdce. Konečně Wolfram a spol (2004) ve své experimentální studii *in vivo* zjistili, že intravenózní podání simvastatinu 3 min. před ukončením ischemie taktéž signifikantně zmenší infarktové ložisko. Jak je patrné z uvedených prací, akutní podání statinů v experimentu má statisticky významný pozitivní efekt ať již na

reparaci kontraktility po globální ischemii myokardu anebo na zmenšení infarktového ložiska po epizodě regionální ischemie.

Naproti tomu chronické podávání statinů dva týdny před ischemií v našem experimentu neprokázalo pozitivní efekt na závažnost kontraktilní dysfunkce u modelu izolovaného srdce laboratorního potkana. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky publikovanými Mensahem a spol (2005), který prokázali, že pozitivní vliv na velikost infarktového ložiska při akutním podání atorvastatinu mizí, pokud je tato účinná látka podávána chronicky po dobu dvou týdnů před ischemicko/reperfuzním poškozením. Je třeba zmínit i fakt, že Chen a spol dokumentovali kladný vliv chronického podávání pravastatinu po dobu 22 dnů před ischemicko/reperfuzním poškozením na četnost výskytu komorových tachyarytmií u potkanů v pokusu *in vivo*. Lze tedy uzavřít, že protektivní efekt akutního podání statinů v průběhu ischemicko/reperfuzního poškození myokardu je zřejmý, avšak molekulární mechanismus tohoto účinku zůstává prozatím ne zcela objasněn. Různé účinné molekuly hrají důležitou roli v této kaskádové reakci. Phosphatidylinositol-3-kinasa (Bell a Yellon 2003, Wolfrum a spol 2004), NO-synthasa (Jones a spol 2002, Tiefenbacher a spol 2003, Wolfrum a spol 2004), K_{ATP} (Tavackoli a spol 2004) nebo PTEN, proteinová fosfatáza inhibující činnost fosfatidylinositol-3-kinasy (Mensah a spol 2005). Všechny tyto molekuly jsou označovány jako důležité při různých pleiotropních na cholesterolu nezávislých účincích statinů.

Kapitola 6

SOUHRN

6. SOUHRN

1. Perinatální hypoxie významně ovlivňuje odolnost dospělého srdečního svalu k nedostatku kyslíku, a to v závislosti na pohlaví jedince. Intermittentní výšková perinatální hypoxie má u samců výrazný proarytmogenní efekt; v porovnání s kontrolní skupinou dochází ke zvýšení počtu všech sledovaných typů arytmií. Naopak u samic jsme pozorovali protektivní antiarytmický účinek, který se projevil prokazatelným snížením počtu ischemických arytmií. Vliv intermittentní výškové perinatální hypoxie na rozsah infarktu myokardu dospělých samců a samic jsme neprokázali.

Výsledky ukazují na možné pozdní důsledky hypoxických stavů srdečního svalu v časných fázích ontogenetického vývoje. Tato skutečnost by měla být zohledněna při dlouhodobém sledování pacientů s cyanotickými vrozenými vadami.

2a. Akutní podání statinu laboratorním potkanům *in vivo* významně snížilo rozsah infarktového ložiska vztaženého na velikost levé komory. Při vyjádření velikosti infarktu na ohroženou oblast (area at risk) byl protektivní vliv podávání statinu naznačen, ale nedosáhl statistické významnosti.

2b. Akutní podání statinu v reperfuzi *in vitro* významně zlepšilo maximální hodnoty reparace kontraktilních parametrů v porovnání s kontrolní skupinou; chronické podání nemělo významný protektivní vliv.

Výsledky ukazují, že akutní podání statinů má na cholesterolu nezávislý kardioprotektivní efekt. Tyto výsledky podporují myšlenku možného podání statinů jako léků první volby při léčbě akutního koronárního syndromu.

SUMMARY:

1. Perinatal hypoxia significantly influences the resistance of adult myocardium to oxygen deficiency, and this being dependant on gender, type and duration of perinatal hypoxia. Intermittent high altitude perinatal hypoxia in males has a significant proarrhythmogenic effect; in comparison to the control group there is an increased number of all observed types of arrhythmias. In contrast, in females we observed an antiarrhythmic effect which resulted in decreased number of documented ischemic arrhythmias. The effect of perinatal hypoxia on myocardial infarct size in adult males and females was not demonstrated.

The results support the hypothesis that perinatal hypoxia is a primary programming stimulus in the heart, leading to gender-dependent changes in cardiac tolerance to acute oxygen deprivation in later adult life. This fact would have important implications for patients who have experienced prolonged hypoxemia in early life.

2a. Acute administration of statin to rats *in vivo* significantly decreased infarct size expressed as IS/LV, in comparison to infarct size expressed as IS/AR the protective effect of statin administration was suggested, but did not reach statistical significance.

b) Acute administration of statin during reperfusion significantly reduced the contractile dysfunction. However, this protective effect of statins was not present after chronic treatment.

In conclusion, statins have an [unambiguous](#) cholesterol-independent cardioprotective effect that can be lost after chronic treatment. These results support the idea of possible cardioprotective effect of statin administration in the first-line therapy of acute coronary syndrome.

Kapitola 7

LITERATURA

7. LITERATURA:

Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:125-38.

Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *Jama* 2001;286:64-70.

Ambrose JA, Hjemdahl-Monsen CE, Borricco S, Gorlin R, Fuster V. Angiographic demonstration of a common link between unstable angina pectoris and non-Q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1988;61:244-7.

Andreotti F and Becker RC. Atherothrombotic disorders: new insights from hematology. *Circulation* 2005;111:1855–1863.

Asemu G, Papousek F, Ostadal B, Kolar F. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1821-1831.

Aschermann a spol, Kardiologie, Galén, Praha, 2004.

Bae S, Zhang L. Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315:1125-35.

Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN, Baker JE. Tolerance of the developing heart to ischemia: impact of hypoxemia from birth. *Am J Physiol.* 1995;268:H1165-73.

Baker JE, Curry BD, Olinger GN, Gross GJ. Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the K(ATP) channel. *Circulation* 1997;95:1278-1285.

Baker JE, Holman P, Gross GJ. Preconditioning in immature rabbit hearts: role of K(ATP) channels. *Circulation* 1999;99:1249-1254.

Baker JE, Holman P, Kalyanaraman B, Griffith OW, Pritchard KA. Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Ann NY Acad Sci* 1999; 874:236–253.

Barton M, Lattmann T, d'Uscio LV, Luscher TF, Shaw S. Inverse regulation of endothelin-1 and nitric oxide metabolites in tissue with aging: implications for the age-dependent increase of cardiorenal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(5 Suppl 1):S153-6.

Barton M, Lattmann T, d'Uscio LV, Luscher TF, Shaw S. Inverse regulation of endothelin-1 and nitric oxide metabolites in tissue with aging: implications for the age-dependent increase of cardiorenal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(5 Suppl 1):S153-6.

Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation.* 1994;90:2993-3000.

Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:508-15.

Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001;89:763-71.

- Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:H19–H27.
- Camera M, Toschi V, Comparato C, Baetta R, Rossi F, Fuortes M, et al. Cholesterol-induced thrombogenicity of the vessel wall: inhibitory effect of fluvastatin. *Thromb Haemost* 2002;87:748-55.
- Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res*. 2001;88:1020-7.
- Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H62-8.
- Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
- Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
- Davi G and Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357:2482–2494.
- Davies MJ. Acute coronary thrombosis--the role of plaque disruption and its initiation and prevention. *Eur Heart J* 1995;16 Suppl L:3-7.
- Davies MJ. Detecting vulnerable coronary plaques. *Lancet* 1996;347:1422-3.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.
- de Jongh S, Lilien MR, op't Roodt J, Stroes ES, Bakker HD, Kastelein JJ. Early statin therapy restores endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:2117-21.
- De Jongh S, Lilien MR, op't Roodt J, Stroes ES, Bakker HD, Kastelein JJ. Early statin therapy restores endothelial function in children with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:2117-21.
- Dedkov EI, Perloff JK, Tomanek RJ, Fishbein MC, Gutterman DD. The coronary microcirculation in cyanotic congenital heart disease. *Circulation*. 2006;114:196-200.
- Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res*. 2006a;70:191-9.
- Di Lisa F. A female way to protect the heart: say NO to calcium. *Circ Res*. 2006b;98:298-300.
- Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, Spina R, Felaco M, Barsotti A, et al. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 2001;51(2):283-93.
- Dickson BC, Gotlieb AI. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:237-48.

- Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Zhou ZN. Intermittent hypoxia protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by activating protein kinase C. *Life Sci.* 2004;75:2587-603.
- Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res.* 2002;53:688-708.
- Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation* 1999;99:3227-33.
- Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation* 1999;99:3227-33.
- Durand J. Physiologic adaptation to altitude and hyperexis. High altitutde *Physiology and Medicine*. Edited by W. Brendel and R.A.Zink, New York: Springer-Verlag, 1982, 209-11.
- Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevedans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61:414-426.
- Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998;83:683-90.
- Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756-9.
- Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756-9.
- Faltová E, Mráz M, Pelouch V, Procházka J, Ostádal B. Increase and regression of the protective effect of high altitude acclimatization on the isoprenaline-induced necrotic lesions in the rat myocardium. *Physiol Bohemoslov.* 1987;36:43-52.
- Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000;149:111-6.
- Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000;149:111-6.
- Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, Tweddell JS, Baker JE.
- Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis* 2002;164:179-85.
- Fyfe A, Perloff JK, Niwa K, Child JS, Miner PD. Cyanotic congenital heart disease and coronary artery atherogenesis. *Am J Cardiol.* 2005;96:283-90.
- Gilbert HS, Ginsberg H, Fagerstrom R, Brown WV. Characterization of hypocholesterolemia in myeloproliferative disease. Relation to disease manifestations and activity. *Am J Med.* 1981;71:595-602.
- Hampl V, Bibova J, Ostadalova I, Povysilova V, Herget J. Gender differences in the long-term effects of perinatal hypoxia on pulmonary circulation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L386-92.

- Hampl V, Herget J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:619-24.
- Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Sandset PM, Hanssen TA, Nordoy A. Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:879-85.
- Haunstetter A, Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:795–801.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: Targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448–460.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and post-conditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 240–253.
- Henley WN, Bellush LL, Notestine MA. Reemergence of spontaneous hypertension in hypoxia-protected rats returned to normoxia as adults. *Brain Res*. 1992;579:211-8.
- Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L, Ostadal M. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 2000;49:493-501.
- Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L, Ostadal M. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 2000;49:493–501.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
- Horigome H, Hiramatsu Y, Shigeta O, Nagasawa T, Matsui A. Overproduction of platelet microparticles in cyanotic congenital heart disease with polycythemia. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1072-7.
- Hurtado A. Some clinical aspect of life at high altitude. *Ann Intern Med* 1960;53:247-258.
- Chen J, Shen H, Nagasawa Y, Mitsui K, Tsurugi K, Hashimoto K. Pravastatin inhibits arrhythmias induced by coronary artery ischemia in anesthetized rats. *J Pharmacol Sci* 2007;103:317-22.
- Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:915-20.
- Chen Y, Torry RJ, Baumbach GL, Tomanek RJ. Proportional arteriolar growth accompanies cardiac hypertrophy induced by volume overload. *Am J Physiol*. 1994;267:H2132-7.
- Jagroop IA, Mikhailidis DP. Effect of endothelin-1 on human platelet shape change: reversal of activation by naftidrofuryl. *Platelets* 2000;11:272-7.

- Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1999;43:580-94.
- Johnson MS, Moore RL, Brown DA. Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H2644-47.
- Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;81:582-7.
- Jones Sp, Gibson Mf, Rimmer Dm 3rd, Gibson Tm, Sharp Br, Lefer Dj. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardio* 2002;40:1172-8.
- Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Béguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Launois SH, Bessard G, Lévy P. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol*. 2005;98:1691-6.
- Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T. Cerivastatin potentiates nitric oxide release and enos expression through inhibition of isoprenoids synthesis. *J Physiol Pharmacol* 2002;53(4 Pt 1):585-95.
- Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, Malinski T. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. *Circulation* 2002;105:933-8.
- Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, et al. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation* 2003;108:1560-6.
- Koh KK, Son JW, Ahn JY, Choi YM, Jin DK, Park GS, et al. Non-lipid effects of statin on hypercholesterolemic patients established to have coronary artery disease who remained hypercholesterolemic while eating a step-II diet. *Coron Artery Dis* 2001;12:305-11.
- Kolár F, Jezková J, Balková P, Breh J, Neckár J, Novák F, Nováková O, Tomášová H, Srbová M, Ostádal B, Wilhelm J, Herget J. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H224-30.
- Kolár F, Neckár J, Ostádal B. MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2005;54:467-71.
- Kolár F, Ostádal B, Procházka J, Pelouch V, Widimský J. Comparison of cardiopulmonary response to intermittent high-altitude hypoxia in young and adult rats. *Respiration*. 1989;56:57-62.
- Kolár F, Ostádal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2004;53 Suppl 1:S3-13.
- Kolár F, Ostádal B. Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Pflugers Arch*. 1991;419:121-6.
- Kopecky M, Daum S. Adaptation of the myocardium to altitude anoxia. *Cesk Fysiol*. 1958;7:218-9.
- Krysiak R, Okopien B, Herman Z. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. *Drugs* 2003;63:1821-54.

- La Padula P, Costa LE. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. I. Mechanical activity. *J Appl Physiol*. 2005;98:2363-9.
- Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK, et al. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation* 2000;102:3104-10.
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 2002;942:23-30.
- Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000;87:526-8.
- Lazar HI, Bao Y, Zhang Y, Bernard Sa. Pretreatment with statins enhances myocardial protection during coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1037-42.
- Lee TM, Su SF, Tsai CC, Lee YT, and Tsai CH. Cardioprotective effects of 17 beta-estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in canine hearts. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1147–1158, 2000.
- Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000;109:315-323.
- Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ. Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 1999;100(2):178-84.
- Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Faseb J* 2001;15:1454-6.
- Li G, Bae S, Zhang L. Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1712-9.
- Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10:265-74.
- Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*. 1990;82:609-19.
- Lorena M, Perolini S, Casazza F, Milani M, Cimminiello C. Fluvastatin and tissue factor pathway inhibitor in type IIA and IIB hyperlipidemia and in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1997;87:397-403.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88:1264–1272.
- Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Schillaci G, Vaudo G, Roscini AR, et al. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36:617-21.
- Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Corell JW, Ross J, Jr., Braunwald E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusion. *Circulation* 1971; 43:67–82.
- McGrath JJ, Bullard RW. Altered myocardial performance in response to anoxia after high-altitude exposure. *Appl Physiol* 1968;25:761-764.

- McGrath JJ, Prochazka J, Pelouch V, Ostadal B. Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *J Appl Physiol* 1973;34:289-293
- Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-7.
- Meerson FZ, Gomzakov OA, Shimkovich MV. Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* 1973;31:30-34.
- Meerson FZ, Ustinova EE, Orlova EH. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Clin Cardiol* 1987;10:783-789.
- Mensah K, Mocanu Mm, Yellon Dm. Failure to protect the myocardium against ischemia/reperfusion injury after chronic atorvastatin treatment is recaptured by acute atorvastatin treatment: a potential role for phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten? *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1287-91.
- Murphy E, Steenbergen Ch. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2007; 88:581–609.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia. A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–1136.
- Musial J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost* 2001;85:221-5.
- Mussoni L, Banfi C, Sironi L, Arpaia M, Tremoli E. Fluvastatin inhibits basal and stimulated plasminogen activator inhibitor 1, but induces tissue type plasminogen activator in cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 2000;84:59-64.
- Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, Ohkawara H, Shindo J, Yokoyama K, et al. Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis* 2002;163:39-47.
- Neckar J, Marková I, Novák F, Nováková O, Szárszoi O, Ost'adal B, Kolár F. Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-delta in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1566-72.
- Neckar J, Ostádal B, Kolár F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol Res*. 2004;53:621-8.
- Neckar J, Papousek F, Novakova O, Ostadal B, Kolar F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* 2002;97:161-167.
- Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 1996;18:669-75.
- Oechslin E, Kiowski W, Schindler R, Bernheim A, Julius B, Brunner-La Rocca HP. Systemic endothelial dysfunction in adults with cyanotic congenital heart disease. *Circulation*. 2005;112:1106-12.
- Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, et al. Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolaemic subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:395-9.

- Ostadal B. The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection. *Pharmacol Rep* 2009;61:3-12.
- Ostadal B, Kolar F, Pelouch V, Widimský J. Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 1995;44:45-51.
- Ostadal B, Kolar F. Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;158:224-36.
- Ostadal B, Kolar F. *Cardiac Ischemia: From Injury to Protection*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 1999, 173 pp.
- Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev*. 1999;79:635-59.
- Ostadal B, Procházka J, Pelouch V, Urbanová D, Widimský J. Comparison of cardiopulmonary responses of male and female rats to intermittent high altitude hypoxia. *Physiol Bohemoslov*. 1984;33:129-38.
- Ostadal B, Widimsky J. *Intermittent Hypoxia and Cardiopulmonary System*. Academia, Prague, 1985.
- Ostadal P. What is “reperfusion injury”? *Eur Heart J* 2005;26:99.
- Ostadalova I, Ostadal B, Jarkovska D, Kolar F. Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart. *Pediatr Res* 2002;52:561-567.
- Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001;103:1752-8.
- Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 2000;150:245-53.
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291–300.
- Poledne R, Reinis Z, Lojda Z, Hanus K, Cíhová Z. The inflow rate of low density lipoprotein cholesterol to the arterial wall in experimental atherosclerosis. *Physiol Bohemoslov*. 1986;35:313-8.
- Poupa O, Krofta K, Prochazka J, Turek Z. Acclimation to simulated high altitude and acute cardiac necrosis. *Fed Proc* 1966;25:1243-1246.
- Rabinovitch M, Gamble WJ, Miettinen OS and Reid L. Age and sex influence of chronic hypoxia on pulmonary hypertension and on recovery, *Am. J. Physiol*. 1981;240:H62–H72.
- Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husslein P, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1194-9.
- Ridker PM, Rifai N, Lowenthal SP. Rapid reduction in C-reactive protein with cerivastatin among 785 patients with primary hypercholesterolemia. *Circulation* 2001;103:1191-3.
- Rohlicek CV, Matsuoka T, Saiki C. Cardiovascular response to acute hypoxemia in adult rats hypoxemic neonatally. *Cardiovasc Res*. 2002;53:263-70.

- Rohlicek CV, Viau S, Trieu P, Hébert TE. Effects of neonatal hypoxia in the rat on inotropic stimulation of the adult heart. *Cardiovasc Res.* 2005;65:861-8.
- Romano M, Diomede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, et al. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095-100.
- Sanada S, Asanuma H, Minamino T, Node K, Takashima S, Okuda H, Shinozaki Y, Ogai A, Fujita M, Hirata A, Kim J, Asano Y, Mori H, Tomoike H, Kitamura S, Hori M, Kitakaze M. Optimal windows of statin use for immediate infarct limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation* 2004;110:2143-9.
- Sardo MA, Castaldo M, Cinquegrani M, Bonaiuto M, Maesano A, Versace A, et al. Effects of atorvastatin treatment on sICAM-1 and plasma nitric oxide levels in hypercholesterolemic subjects. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002;8:257-63.
- Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002;162:179-85.
- Shirato C, Miura T, Ooiwa H, Toyofuku T, Wilborn WH, Downey JM. Tetrazolium artifactually indicates superoxide dismutase-induced salvage in reperfused rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:1187-93.
- Schultz JE, Qian YZ, Gross GJ, Kukreja RC. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:1055-60.
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 2001;81:1461-97.
- Somerville J. Management of adults with congenital heart disease: an increasing problem. *Annu Rev Med.* 1997;48:283-93.
- Speechly-Dick ME, Mocanu M, and Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 75: 586–590, 1994.
- Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2006;98:403-11.
- Suzumura K, Yasuhara M, Narita H. Superoxide anion scavenging properties of fluvastatin and its metabolites. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1999;47:1477-80.
- Suzumura K, Yasuhara M, Tanaka K, Odawara A, Narita H, Suzuki T. An in vitro study of the hydroxyl radical scavenging property of fluvastatin, and HMG-CoA reductase inhibitor. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1999;47:1010-2.
- Szárszoi O, Asemu G, Ostadal B, Kolář F. Role of nitric oxide in cardioprotection by chronic hypoxia. *Physiol Res* 2001;50:P27.
- Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Gora P, Swadzba J, et al. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1286-93.
- Tajima M, Katayose D, Bessho M, Isoyama S. Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994;28:312-319.

- Tavackoli S, Ashitkov T, Hu Zy, Motamedi M, Uretsky Bf, Birnbaum Y. Simvastatin-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury is mediated by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Coron Artery Dis* 2004;15:53-8.
- Tiefenbacher Cp, Kapitza J, Dietz V, Lee Ch, Niroomand F. Reduction of myocardial infarct size by fluvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H59-64.
- Tsiara S, Elisaf M, Mikhailidis DP. Early vascular benefits of statin therapy. *Curr Med Res Opin* 2003;19:540-56.
- Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, et al. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation* 2001;104:376-9.
- Turek Z, Kubat K, Ringnalda BE, Kreuzer F. Experimental myocardial infarction in rats acclimated to simulated high altitude. *Basic Res Cardiol* 1980;75:544-554.
- Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, et al. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(7):2120-5.
- Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996;348:1079-82.
- Vovc E. The antiarrhythmic effect of adaptation to intermittent hypoxia. *Folia Med (Plovdiv)* 1998;40:51-54.
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988;22:447-455
- Warkentin TE. Hemostasis and atherosclerosis. *Can J Cardiol* 1995;11 Suppl C:29C-34C.
- White HD, Chew DP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2008;372:570-84.
- Widimsky J, Urbanova D, Ressler J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res* 1973;7:798-808
- Widimsky P, Budesinsky T, Vorac D, Groch L, Zelizko M, Aschermann M, Branny M et al.. Long distance transport for primary angioplasty versus immediate thrombolysis in acute myocardial infarction: Final results of the randomized national multicenter trial – Prague-2. *Eur Heart J* 2003;24:94–104.
- Widimsky P, Groch L, Zelizko A, Aschermann M, Bednar F, Suryapranata H. Multicenter randomized trial comparing transport to primary angioplasty versus immediate thrombolysis versus combined strategy for patients with acute myocardial infarction presenting to a community hospital without a catheterization laboratory. The “Prague” Study. *Eur Heart J* 2000;21:823–831.
- Wolfrum S, Dendorfer A, Schutt M, Weidtmann B, Heep A, Tempel K, et al. Simvastatin acutely reduces myocardial reperfusion injury in vivo by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:348-55.
- Xie Y, Zhu Y, Zhu WZ, Chen L, Zhou ZN, Yuan WJ, Yang HT. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H2594-602.

- Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J.* 2006;20:1251-3.
- Yamakuchi M, Greer Jj, Cameron Sj, Matsushita K, Morrell Cn, Talbot-Fox K, Baldwin Wm 3rd, Lefer Dj, Lowenstein Cj. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit endothelial exocytosis and decrease myocardial infarct size. *Circ Res* 2005;9:1185-92.
- Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Cell Cardiol* 2004;44:1103–1110.
- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113–1151.
- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol.* 1994;266:H1145-52.
- Zheng X, Hu Sj. Effects of simvastatin on cardiohemodynamic responses to ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Heart Vessels* 2006;21:116-23.
- Zong P, Ryou MG, Sun W, Sharma AB, Sun J, Downey HF, Mallet RT, 2005. Intermittent hypoxic conditioning suppresses nitric oxide synthase activity in canine myocardium. *FASEB J.* 19, A709.

Kapitola 8

VLASTNÍ PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU

DIZERTAČNÍ PRÁCE

