



**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce

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

**MUDr. Jiří Malý**

Praha 2009

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky

**Obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka

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

**Autor:** MUDr. Jiří Malý

**Školitelé:** Prof. MUDr. Jan Pirk, DrSc. a Prof. MUDr. Bohuslav Ošťádal, DrSc.

**Školitel konzultant:** MUDr. Ondrej Szarszoi, PhD.

**Oponenti:**

**Autoreferát byl rozeslán dne:**

**Obhajoba se koná dne: 10. 9. 2009 v      hod.**

S disertací je možno se seznámit na děkanátě I. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## OBSAH

Seznam použitých zkratk	4
Souhrn	5
Summary	6
1. Úvod	7
2. Hypotézy a cíle disertační práce	8
2.1 Hypoxické stavy srdečního svalu	8
2.2 Klinické projevy akutní ischemie myokardu	8
2.3 Cyanotické vrozené srdeční vady	9
2.4 Současné možnosti protekce ischemie srdečního svalu	10
2.5 Statiny a akutní koronární syndrom	12
2.6 Cíle disertační práce	14
3. Materiál a metody	14
3.1 Adaptace potkanů na perinatální hypoxii	15
3.2 Experimentální protokol	15
3.2.1 Vliv perinatální hypoxie na velikost infarktu myokardu v dospělosti	15
3.2.2 Vliv perinatální hypoxie na závažnost a počet ischemických arytmií v dospělosti	15
3.2.3 Vliv statinů na velikost infarktu myokardu	15
3.2.4 Vliv statinů na reparaci kontraktility	16
4. Výsledky	16
4.1 Vliv perinatální intermitentní výškové hypoxie na odolnost dospělých srdcí k ischemii	16
4.1.1 Hmotnostní parametry	16
4.1.2 Ischemické arytmie	17
4.1.3 Infarkt myokardu	18
4.2 Vliv statinů na ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	19
4.2.1 Infarkt myokardu	19
4.2.2. Reparace kontraktility	20
5. Diskuze	21
5.1 Perinatální hypoxie a její vliv na akutní ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	21
5.1.1 Vliv perinatální hypoxie na odolnost dospělých srdcí k nedostatku kyslíku	21
5.1.2 Protektivní vliv adaptace na chronickou hypoxii	22
5.1.3 Pohlavní rozdíly v odolnosti myokardu k nedostatku kyslíku	23
5.2 Vliv farmakologické intervence statiny na akutní ischemicko/reperfuzní poškození myokardu	24
5.2.1 Protektivní ovlivnění ischemicko/reperfuzního poškození	24
5.2.2 Užití statinů v léčbě AKS	25
6. Závěry	26
7. Literatura	27
8. Vlastní publikace vztahující se k tématu disertační práce	37

## 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  $\alpha$

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

mito $K_{ATP}$  – mitochondrialní  $K_{ATP}$  kanály

MPTP-mitochondrial permeability transition pore

NO – oxid dusnatý

NOS – NO syntéza

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

## SOUHRN

**Úvod:** V posledních desetiletích byly popsány stovky experimentálních intervencí, které dovedou ochránit ischemický myokard, avšak s výjimkou časné reperfuze, žádná z nich nenašla uplatnění v klinické praxi. V naší práci jsme proto zvolili jiný 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.

**Cíl:** Zjistit, zda 1. neonatální hypoxie ovlivní odolnost dospělého srdce laboratorního potkana k akutní ischemii; 2. odolnost dospělého srdce laboratorního potkana k ischemii ovlivní akutní nebo chronické podání statinů.

**Metodika:** 1. Laboratorní potkani byli vystaveni intermitentní hypobarické hypoxii (IHH) 7 dnů před porodem; mláďata se rodila za normoxických podmínek a následně byla opět vystavena IHH do 10 dne. Pokusy byly prováděny na dospělých jedincích. Komorové arytmie byly sledovány na modelu izolovaného perfundovaného srdce (*in vitro*) během 30 min. ischemie vyvolané okluzí RIA. Rozsah oblasti infarktového ložiska byl měřen na anestetizovaném, uměle ventilovaném potkanovi (*in vivo*) po 20 min ischemii a 180 min reperfuzi. 2. Infarkt myokardu na modelu *in vivo* byl vyvolán 20 min regionální ischemií, po které následovala 180 min reperfuze. Atorvastatin o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  byl podán potkanům žaludeční sondou 30 min před začátkem pokusu. Reparaci kontraktility jsme hodnotili na modelu *in vitro* po 20 min globální ischemii a 40 min reperfuzi. Při akutním podání byl simvastatin podán do perfuzního roztoku v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  jenom v reperfuzi a u chronického pokusu byl potkanům simvastatin podáván v koncentraci 5mg/kg přímo do potravy 14 dní před pokusem.

**Výsledky:** 1. Perinatální hypoxie významně ovlivňuje odolnost dospělého srdečního svalu k nedostatku kyslíku, a to v závislosti na pohlaví jedince. IHH 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 perinatální IHH na rozsah infarktu myokardu dospělých samců a samic jsme neprokázali. 2. Akutní podání statinu laboratorním potkanům *in vivo* významně snížilo rozsah infarktového ložiska vztaženého na velikost levé komory. Při vyjádření velikosti infarktu na ohroženou oblast byl protektivní vliv podávání statinu naznačen, ale nedosáhl statistické významnosti. Akutní podání statinu v reperfuzi *in vitro* významně zlepšilo kontraktilní dysfunkci v porovnání s kontrolní skupinou; chronické podání nemělo významný protektivní vliv.

**Závěr:** Naše 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. Naše výsledky dále 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

**Background:** In last decades there were many experimental interventions protecting myocardium against ischemia but aside from early reperfusion none of them was successfully adopted in clinical practice. In our experimental work we try to apply clinical situations into an experimental condition to find out feasible solution how to influence tolerance of myocardium to ischemia. We choose two actual clinical settings: 1. congenital cyanotic heart defects and 2. hypercholesterolemia chronically treated with statins

**Aim:** To examine: 1. the effect of of perinatal hypoxia to the tolerance of the adult myocardium to acute ischaemia/reperfusion injury with regard to sex; 2. the effect of the acute and chronic statin treatment on the tolerance of the adult rat myocardium to ischemia.

**Method:** 1. Rats were exposed to intermittent hypobaric hypoxia (IHH) 7 days before delivery; pups were born under normoxic conditions and exposed to hypoxia again for 10 postnatal days. Further, all animals were kept under normoxic conditions. All experiments were performed on 90-day-old rats. Ventricular arrhythmias were assessed on isolated perfused hearts during 30 min. occlusion of the left anterior descending coronary artery. Infarct size was measured on isolated hearts 40 min. regional ischaemia and 120 min. reperfusion. 2. Infarct size was measured on *open chest* animals (20-min regional ischemia; 3-h reperfusion). Atorvastatin in concentration 50  $\mu\text{mol/l}$  was given via the gastric probe. Contractile function was measured on isolated rat hearts under constant pressure (20 min of global ischemia, followed by 40 min of reperfusion). To investigate the acute effect, simvastatin at a concentration of 10  $\text{mmol/l}$  was added to the perfusion solution during reperfusion. In chronic experiments the rats were fed simvastatin at a concentration of 5mg/kg for two weeks before the measurement of the contractile function.

**Results:** 1. Perinatal IHH significantly influences the resistance of adult myocardium to oxygen deficiency, and this being dependant on gender. Perinatal IHH 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. 2. 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. Acute administration of statin during reperfusion significantly reduced the contractile dysfunction. However, this protective effect of statins was not present after chronic treatment.

**Conclusions:** 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. 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.

## 1. ÚVOD

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 milionů 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 reperfuze 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 přidatných 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 změnami 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.

## **2. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE**

### **2.1 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 významným 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.

### **2.2 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, kde nalézáme infiltraci 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 (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.

### 2.3 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 difúzní bariéry 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 perfundováno 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 difúzní 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 aterosklerózy 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/reperfuční poškození myokardu v dospělosti.

## **2.4 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 skepticismu 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 kontraktální dysfunkci a snižují četnost arytmí. 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. Zdáli 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 $\alpha$  (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 adrenergní 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 reperfuze poškození nemůže existovat bez předchozí ischemie, je používán termín ischemicko/reperfuze (I/R) poškození. I/R poškození je spojeno především s poruchami kontraktility, časnými postperfuze arytmii, 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 reperfuze terapie u akutního koronárního syndromu navzdory rizikům reperfuze poškození. Cílem reperfuze 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).

## 2.5 STATINY A AKUTNÍ KORONÁRNÍ SYNDROM

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 skepticismu 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 arytmí. 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. Zdáli 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 $\alpha$  (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 časná 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 reperfuze poškození nemůže existovat bez předchozí ischemie, je používán termín ischemicko/reperfuze (I/R) poškození. I/R poškození je spojeno především s poruchami kontraktility, časnými postperfuze 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 reperfuze terapie u akutního koronárního syndromu navzdory rizikům reperfuze poškození. Cílem reperfuze 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. reperfuze 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 reperfuze, 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/reperfuzním poškozením soustředil na dosud zanedbávanou organelu - mitochondrii. Bylo totiž zjištěno, že příčinou reperfuzního 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 reperfuzního poškození cestou „postconditioningu“, další výzkum na úrovni buněčných organel (mitochondriální membrána), hlubší objasnění role apoptozy a využití farmakologické intervence k ovlivnění ischemicko/reperfuzního poškození (např. využití pleiotropních účinků statinů) (Haunstetter a Izumo 2000, Hausenloy a Yellon 2004).

## 2.6 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

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

**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.

**Testovat hypotézu, zda odolnost dospělého srdce laboratorního potkana k ischemii ovlivní akutní nebo chronické podání 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.

## 3. MATERIÁL A METODY

V našich pokusech jsme používali samce a samice laboratorního potkana kmene Wistar. Zvířata byla chována za standardních podmínek v plastikových akváriích. V místnosti byla udržována stálá teplota  $22 \pm 2$  °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. Břeží 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 pokusných zvířat se narodila a byla chována za stejných normoxických podmínek.

Naše experimenty jsme prováděli na dvou modelech: 1) *in vivo* model anestezovaného uměle ventilovaného potkana 2) *in vitro* model izolovaného perfundovaného srdce podle Langendorffa (Langendorff 1895, Dehnert 1988).

### **3.2 EXPERIMENTÁLNÍ PROTOKOL**

#### **3.2.1 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 trifenyltetrazoliem změřena planimetricky.

#### **3.2.2 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 skočení ischemie následovala 5 min reperfuze. Závažnost a počet ischemických arytmí jsme hodnotili podle Lambethské konvence (Walker a spol).

#### **3.2.3 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  $\mu$ mol/l a podán potkanům žaludeční sondou 30 min. před začátkem pokusu.

### 3.2.4 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 % N<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>. Po obnovení průtoku byly kontraktilní parametry [LVDP a (dp/dt)<sub>max</sub>] zaznamenávány v 5 min intervalech a vyjádřeny jako procento výchozích preischemických hodnot. Při akutním podání 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.

## 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. 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 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.

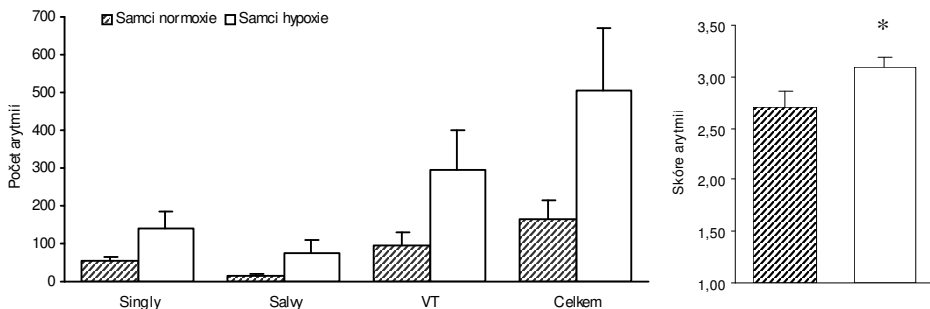


#### 4.1.2 ISCHEMICKÉ ARYTMIE

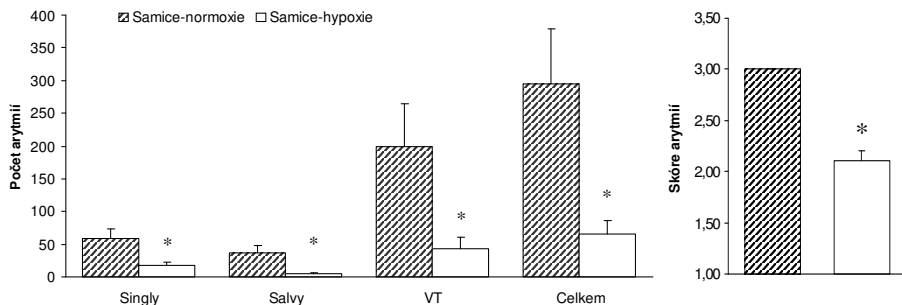
Výchozí hodnoty tepové frekvence a perfuzního tlaku se mezi skupinami významně nelišily. Všechna srdce měla v preischemické fázi pravidelný rytmus bez jakýchkoliv komorových arytmií. Podvaz koronární artérie vyvolal komorové arytmie s maximem mezi 10. a 20. min ischemie.

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).

**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.



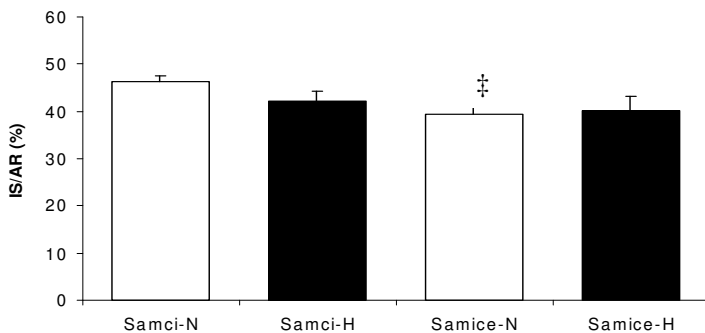
**Graf č. 2 :** Počet jednotlivých typů ischemických komorových arytmií a arytmiické skóre v průběhu 30-min ischemie u srdcí kontrolních a perinatálně hypoxických samic. \* P<0,05 vs. kontroly.



#### 4.1.3 INFARKT MYOKARDU

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*.



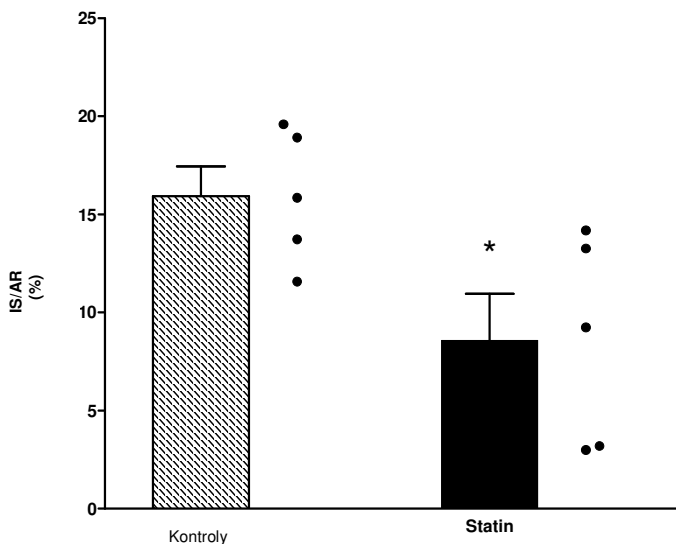
## 4.2 VLIV STATINŮ NA ISCHEMICKO/REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU

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 podání statinů; použili jsme protokol s akutním i chronickým podáním.

### 4.2.1 INFARKT MYOKARDU

Velikost infarktového ložiska vztážená na velikost levé komory byla u potkanů léčených statinem významně nižší (graf č. 4) než u kontrol. Při hodnocení velikosti infarktu myokardu vztáženou na ohroženou oblast (area at risk) byl protektivní vliv podání statinu naznačen, ale nedosáhl statistické významnosti.

**Graf č. 4:** Velikost infarktu myokardu (IS) vztážená na velikost levé komory (LV) u potkanů po aplikaci statinů a u kontrol; model *in vivo*. \* $P < 0.05$  vs. kontroly

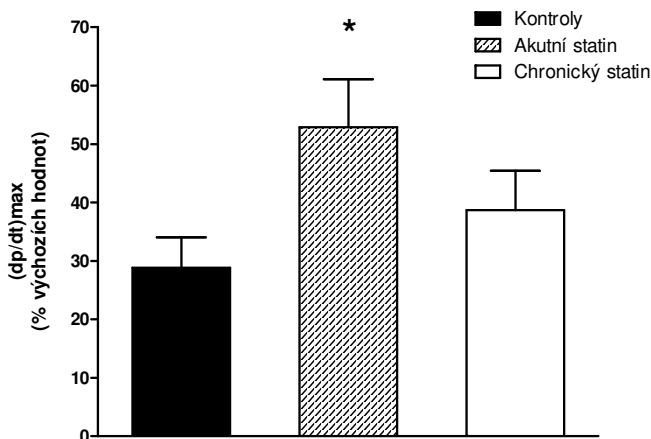


4.2.2

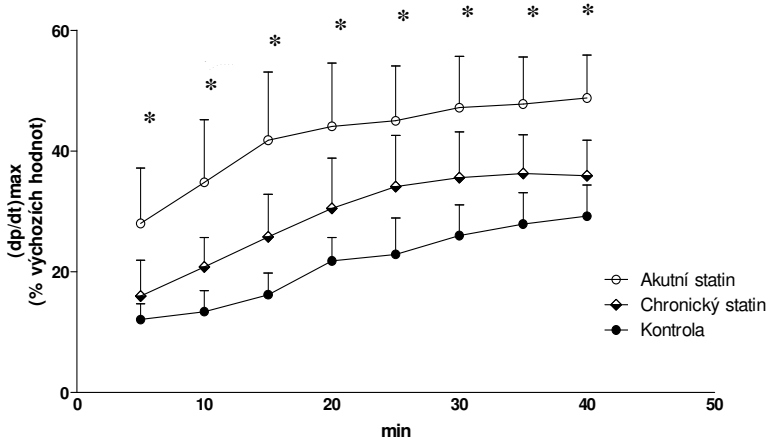
## REPARACE KONTRAKTILITY

Akutní ani chronické podání simvastatinu nemělo vliv na základní parametry kontraktility [vyvinutý tlak, diastolický tlak,  $(+dP/dt)_{\max}$ ] ani koronární průtok. Sledovaný projev ischemicko/reperfuzního poškození - kontraktální dysfunkci - jsme hodnotili jako průběh a velikost obnovy  $(+dP/dt)_{\max}$  a vyvinutého tlaku (LVDP) v reperfuzi a vyjadřovali jako % výchozích preischemických hodnot. Akutní podání simvastatinu významně zlepšilo maximální hodnoty reparace kontraktálních 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 podání nemělo žádný statisticky významný protektivní vliv. Akutní i chronické podání simvastatinu neovlivnilo časový průběh obnovy  $(+dP/dt)_{\max}$  a LVDP; ty postupně narůstaly od prvních minut reperfuze a od 25. min až do konce pokusu (40. min) se už výrazně nezvyšovaly (grafy č. 5, č. 6)

**Graf č. 5:** Vliv akutního a chronického podání statinů na nejvyšší dosažené hodnoty reparace  $(+dP/dt)_{\max}$  v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot. \* $P < 0,05$  vs. kontroly



**Graf č. 6:** Vliv akutního a chronického podání simvastatinu na průběh reparační (+dP/dt)<sub>max</sub> v reperfuzi po 20-min globální ischemii, vyjádřený jako % výchozích preischemických hodnot. \*P<0.05 vs. kontroly.



## 5. DISKUZE

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

#### 5.1.1 VLIV PERINATÁLNÍ HYPOXIE NA ODOLNOST DOSPĚLÝCH SRDČÍ K NEDOSTATKU KYSLÍKU

Experimentální zvířata jsme vystavili chronické hypoxii v hypoxické komoře. Březí samice potkanů kmene Wistar byly vystaveny intermitentní výškové hypoxii 5000 m (PB = 405 mm Hg, 54 kPa; PO<sub>2</sub> = 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 (PB = 742 mmHg, 99 kPa; PO<sub>2</sub> = 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).

### 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 samic, 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 hypoxia 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 projevívá 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,  $\beta$ -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 samců. 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/reperfučnímu (I/R) poškození byla prokázána u psů, potkanů a myši (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 arytmiogenezi 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 ( $\alpha$  a  $\beta$ ) byly prokázány v samčích i samičích srdečních buňkách; jejich afinita k vazbě na  $17\beta$ -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 kontraktilních a kolagenních bílkovin). Kromě toho mají však estrogeny 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 významně vyšší exprese endoteliální NO syntázy (eNOS); blokátor tohoto enzymu (L-NAME) pohlavní rozdíl 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, hraje 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 redukcí 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  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) v ischemickém myokardu; dochází ke zlepšení reparace kontraktální funkce a k redukcí 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 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy a aromatázy přeměňovány na estradiol. To znamená, že některé pozitivní efekty testosteronu, které pozorujeme u samců, mohou být způsobeny jeho konverzí na estradiol a jeho metabolity. Testosteron aktivuje androgenové receptory, které jsou exprimovány v myocytech; zvyšuje hladinu homocysteinu a ET-1 a stimuluje 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 VLV FARMAKOLOGICKÉ INTERVENCE STATINY NA AKUTNÍ ISCHEMICKO/REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU**

### **5.2.1 PROTEKTIVNÍ OVLIVNĚNÍ ISCHEMICKO/REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ**



Bylo opakovaně prokázáno, že léčba zvířat statiny před začátkem ischemie významně snižuje ischemicko/reperfuční 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 myši, kterým byl proveden podvaz koronární arterie a terapie fluvastatinem byla zahájena 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

Objev pleiotropních účinků statinů otevřel nové pole pro indikaci statinové léčby. Rozšíření znalostí o pleiotropních účincích statinů spolu s rostoucím poznáním patogenese 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 podání 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* publikovali poznatek, 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 podání 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 podání 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, Wolfram a spol 2004), NO-synthasa (Jones a spol 2002, Tiefenbacher a spol 2003, Wolfram 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.

## 6. ZÁVĚRY

**1.** Perinatální hypoxie významně ovlivňuje odolnost dospělého srdečního svalu k nedostatku kyslíku, a to v závislosti na pohlaví jedince. Intermitentní 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 intermitentní 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 kontraktálních 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.

## 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.

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, 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;4:508-15.

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, Guterman 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.
- Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevdans 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.
- HampI 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.
- HampI 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.
- 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.

- 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.
- 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, Ost'ádal 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<sup>+</sup> channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2005;54:467-71.
- Kolár F, Ostádal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2004;53 Suppl 1:S3-13.

Krysiak R, Okopien B, Herman Z. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. *Drugs* 2003;63:1821-54.

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<sup>+</sup> 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, Duclay 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.



- 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.
- 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, Ostádal 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.
- 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.
- Oechslein 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. 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 P. What is "reperfusion injury"? *Eur Heart J* 2005;26:99.

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.

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, Diomedea 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 Ca<sup>2+</sup> 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.

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.

Tavakoli 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<sup>+</sup> 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.

- 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.
- 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 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 phosphatidylinositide 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.

## **7. PUBLIKACE DOKTORANDA**

### **1. publikace vztahující se k tématu disertační práce**

Szárszoi O, Malý J, Ostádal P, Netuka I, Besík J, Kolár F, Ostádal B. Effect of acute and chronic simvastatin treatment on post-ischemic contractile dysfunction in isolated rat heart. *Physiol Res.* 2008;57(5):793-6. **IF 1,505**

Netuka I, Szarszoi O, Maly J, Besik J, Neckar J, Kolar F, Ostadalova I, Pirk J, Ostadal B. Effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to acute ischaemia in adult male and female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 ;33(8):714-719. **IF 2.038**

Besik J, Szarszoi O, Kunes J, Netuka I, Maly J, Kolar F, Pirk J, Ostadal B. Tolerance to acute ischemia in adult male and female spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res.* 2006;56(3):267-74.. **IF 1,505**

Ostadal B, Netuka I. Besik J, Maly J, Ostadalova I. Gender and the cardiovascular system – experimental aspects. *Exp Biol Med.* 2009 (v tisku) **IF 1.979**

### **2. publikace bez vztahu k tématu disertační práce**

#### **a) s IF**

Maly J, Kautzner J, Krausova R, Rokosny S, Netuka I, Szarszoi O, Skalsky I, Pirk J. Long-Term Outcome Of Surgical Radiofrequency Ablation For Atrial Fibrillation In Three Different Groups Of Patiens. *Heart Surg Forum.* 2008;11(2):E110-116. **IF 0.5**

Netuka I, Maly J, Szarszoi O, Skalsky I., Riha J., Kotulak T., Novotny J. and Pirk J. Single stage extensit chronic Type A dissection repair and continous flow ventricular assist device. *J Heart Lung Transplant* 2009. **IF 3,088**

Netuka I, Maly J, Szarszoi O, Novotny J. Systemic right ventricle supported by implantable axial-flow assist device. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009 Jun 5. **IF 2,011**

#### **b) bez IF**

Zelizko M, Janek B, Netuka I, Malý J, Kotulák T, Marek T, Kautznerová D. Perkutánní implantace aortální chlopně u nemocné s těsnou aortální stenózou. *Interv Akut Kardiol* 2009

Netuka I, Szarszoi O, Maly. Mechanické srdeční podpory v terapii terminálního srdečního selhání. *Cor Vasa* 2008;50(5):207–214.

Viklicky O, Netuka I, Urbanova M., Adamec M., Maly J., Voska L., Pokorna E. Kidney transplantation from a brain-dead heart transplant candidate treated with biventricular assist device: 12-month follow-up. *NDT Plus*, 2008; 1: 34 – 35.

Neužil, P., Černý, Š., Pirk, J., Malý, J., Šetina, M., Branny, P., Brát, R., Burkert, J., Hájek, T., Harrer, J., Horváth, V., Němec, P., Straka, Z., Tošovský, J. Operace MAZE: jaká je realita chirurgické léčby fibrilace síní v České republice? *Cor et Vasa*, 2007, roč. 49, č. 2, s. 67-70. ISSN 0010-8650. (Původní sdělení).

Kettner J, Pirk J, Netuka I, Brezina A, Riha H, Maly J, Masin J. Mechanical cardiac support-the first use in Czech Republic. *Cas Lek Cesk.* 2005;144(1):38-42.

Kettner J, Pirk J, Netuka I, Malý J, Březina A, Mašín J. První použití mechanické srdeční podpory v České republice. *Interv akut kardiol.* 2004; 2:4-6