

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

III. interní-kardiologická klinika

3. LF UK a FNKV

Zita Chitovová

**Prevence reperfúzního poškození u pacientů
s akutním infarktem myokardu s elevacemi ST,
kteří jsou léčeni perkutánní koronární intervencí
(*Prevention of reperfusion injury
after primary percutaneous coronary intervention for
ST-segment elevation myocardial infarction*)**

Diplomová práce

Praha, květen 2008

Autor práce: **Zita Chitovová**

Studijní program: **Všeobecné lékařství**

Vedoucí práce: **Mudr. Zuzana Mot'ovská, Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce: **III. interní-kardiologická
klinika 3. LF UK a FNKV**

Datum a rok obhajoby: **3.6.2008**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze 25.května 2008

Chitovová Zita
Zita Chitovová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní doktorce Zuzaně Mořovské za její odbornou pomoc, ochotu a podporu.

OBSAH

OBSAH	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
ÚVOD.....	9
METODIKA PRÁCE.....	11
1.REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU.....	12
1.1 DEFINICE REPERFÚZNÍHO POŠKOZENÍ.....	12
1.2 ČTYŘI TYPY REPERFÚZNÍHO POŠKOZENÍ.....	13
1.3 POTENCIONÁLNÍ MECHANISMY VZNIKU	14
1.3.1 Hlavní mechanismy	14
1.3.2 Další mechanismy	16
1.3.3 Mechanismy vzniku „no-reflow“ fenoménu.....	16
1.3.3.1 Ischemické poškození endotelu a mikrovaskulární obstrukce.....	17
1.3.3.2 Neutrofilý: mechanická obstrukce vs. Interakce	17
1.3.3.3 Volné kyslíkové radikály	18
1.3.3.4 Cévní funkční odchylky.....	18
1.3.3.5 Mechanická komprese	19
1.3.3.6 Koagulace, tkáňový faktor.....	19
1.3.3.7 Mikroembolizace aterosklerotických hmot a trombů.....	19
2. MOŽNOSTI PREVENCE NA ZÁKLADĚ VÝSLEDKŮ DOSAVADNÍCH KLINICKÝCH STUDIÍ	21
2.1 FARMAKOLOGICKÉ MOŽNOSTI	22
2.1.1 Scavengery kyslíkových radikálů a antioxidanty	24
2.1.2 Blokátory vápníkových kanálů.....	25
2.1.3 Inhibitory neutrofilů.....	26

2.1.4 Adenosin	28
2.1.5 Inhibitory komplementu	29
2.1.6 Oxid dusnatý (NO).....	29
2.1.7 Antagonisté endotelin-1 receptoru	30
2.1.8 Inhibitory renin- angiotensinového systému (RAS)	31
2.1.9 Inhibitory Na ⁺ /H ⁺ kanálu.....	32
2.1.10 Antiapoptotické prostředky	33
2.1.11 Statiny	33
2.1.12 Erytropoetin (EPO)	35
2.1.13 Glukagon-like peptid 1 (GLP-1).....	36
2.1.14 Atriální natriuretický peptid (ANP)	36
2.1.15 Blokátory glykoproteinového receptoru IIb/IIIa.....	37
2.1.16 Další přípravky	37
2.2 NEFARMAKOLOGICKÉ MOŽNOSTI.....	38
2.2.1 Epizody krátkodobé ischemie.....	38
2.2.2 Regionální hypotermie	39
2.2.3 Mechanické protekce před mikroembolizacemi	40
2.3 ALTERNATIVNÍ MOŽNOSTI	41
DISKUSE A ZÁVĚR.....	43
SOUHRN	45
SUMMARY	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- A I, II** - angiotensin I, II
- ACE** - angiotensin konvertující enzym
- ADO** - adenosin
- AIM** - akutní infarkt myokardu
- ANP** – atriální natriuretický peptid
- AT 1,2** - receptor 1,2 pro angiotensin II
- BK** - bradykinin
- CAM** - buněčné adhezivní molekuly
- ET-1** - endotelin – 1
- GLP-1** – glukagonu podobný peptid-1
- H₂O₂** - peroxid vodíku
- HMG-CoA** - 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
- ICAM-1**- intercelulární adhezní molekula
- ICHS** - ischemická choroba srdeční
- MPO** - myeloperoxidáza
- mPTP** - dočasně propustné mitochondriální póry
- NFκB** - prozánětlivý transkripční nukleární faktor kappa B
- NO** - oxid dusnatý
- NOS** - NO syntéza
- OFR** - volné kyslíkové radikály
- PAF** - destičkový aktivační faktor
- PCI** - perkutánní koronární intervence
- PDGF** - destičkový růstový faktor
- PECAM-1** - destičková endoteliální adhezní molekula – 1
- PI3K** – fosfatidylinositol-3 kináza
- PTP** – přechodně propustné póry
- RISK** - záchranné kinázy reperfučního poškození
- SOD** - superoxid dismutáza

TIMI - průtok věčnými tepnami u nemocných s akutním IM 0-III

VSMC - buňky hladkých svalů cév

ÚVOD

Problematiku reperfúzního poškození jsem si vybrala, protože se jedná o aktuální kardiologické téma v souvislosti se vzrůstajícím počtem primárních perkutánních koronárních intervencí jako metody volby v léčbě pacientů s akutním infarktem myokardu. Přes vysokou technickou míru úspěšnosti této metody, zbývá 4-7% pacientů (1), kteří během hospitalizace umírají. Dosavadní studie prokazují, že významnou příčinou je reperfúzní poškození (zejména jeho „no-reflow“ forma) , které vzniká po znovuobnovení průtoku krve ischemizovanou oblastí myokardu . Vhodnou prevencí reperfúzního poškození by se mohlo podařit toto procento snížit.

V české, ale i celosvětové populaci jsou nejrozšířenějším zdravotním problémem nemoci oběhového systému. Tvoří největší podíl příčin úmrtí a jsou trvale nejčastější příčinou hospitalizace. Jednu z významných podskupin nemocí oběhového systému tvoří pacienti s ischemickou chorobou srdeční.

Podle statistických údajů za rok 2006 bylo v České republice u praktických lékařů dispenzarizováno 847 635 pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS), z tohoto počtu tvoří 91 359 pacienti s akutním infarktem myokardu (AIM). (2) Tato vysoká čísla mají rok od roku vzrůstající tendenci a nelze v následujících letech očekávat změnu tohoto trendu.

Terapie AIM s ST elevacemi je založena na časně a úspěšné reperfúzi, pomocí primární perkutánní koronární intervence (primární PCI) nebo trombolýzy. Ve srovnání s trombolýzou je primární PCI úspěšnější. Reperfúze je nejefektivnější strategií v redukci velikosti infarktu myokardu a zároveň ve zlepšení jeho klinických důsledků. Přesto může obnovení průtoku krve ischemizovanou oblastí způsobit další poškození myokardu.

Tento fenomén nazývaný reperfúzní poškození myokardu může paradoxně snížit pozitivní efekt reperfúzní terapie. Uvedený fenomén můžeme rozdělit do

čtyř typů na letální reperfúzní poškození, cévní reperfúzní poškození, reperfúzí vyvolaný stunning a reperfúzní arytmie.

Cílem této práce je nejen přinést praktický souhrn informací o fenoménu reperfúzního poškození, který je v praxi zatím částečně opomíjen a poukázat na jeho podstatný vliv na konečnou prognózu pacientů s AIM léčených PCI, ale především nabídnout možnosti prevence jeho vzniku nebo minimalizace jeho rozsahu na základě výsledků dosavadních studií.

Je třeba připomenout, že reperfúzní poškození myokardu je spojeno se skupinou pacientů, u kterých je AIM prvním projevem doposud klinicky němého onemocnění koronárním tepen nebo je jedním z možných důsledků déle probíhající manifestní formy ICHS, a tudíž by nejlepší prevencí bylo předejít samotnému vzniku těchto onemocnění.

METODIKA PRÁCE

Tuto práci jsem vytvořila na základě poznatků a výsledků dosavadních studií a výzkumů zabývajících se problematikou reperfúzního poškození v časovém období od roku 1974 - 2008. Informace jsem čerpala ze studií a článků publikovaných v odborně uznávaných kardiologických a farmakologických časopisech. Některé zdroje jsem hledala s využitím databáze PubMed. Ilustrační schémata jsou převzata z článků publikovaných v časopisech Heart, Cardiovascular Research a British Journal of Pharmacology. Statistické údaje uvedené v *Úvodu* této práce jsou získány ze Zdravotnické ročenky České republiky 2006 uveřejněné internetovou databází Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. Všechny použité zdroje k této práci jsou sepsány v *Seznamu použité literatury*.

1.REPERFÚZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU

Časná reperfúze je nejefektivnějším přístupem v prevenci progresu ischemické léze vzniklé po uzávěru koronární artérie. Primární perkutánní koronární intervence (primární PCI) je ve většině vyspělých zemí metodou volby v léčbě akutního infarktu myokardu s ST-elevacemi a je efektivnější než trombolýza v obnově TIMI – 3, a tím snižuje mortalitu. Dilatací stenózy infarktové tepny (*angl. culprit lesion*) PCI významně snižuje výskyt reinfarktu.

(1) Přesto může reperfúze ischemizovaného myokardu vyvolat i jeho poškození a snížit tak prospěšný efekt obnoveného krevního průtoku. Tento jev se označuje jako reperfúzní poškození. Bylo poprvé popsáno v roce 1960 u psů *Jenningsem a kol.* (62)

1.1 Definice reperfúzního poškození

Reperfúzní poškození je proces, který je s reperfúzí kauzálně spojen a ke kterému před reperfúzí nedošlo.

Piper H. M. (3)

1.2 Čtyři typy reperfúzního poškození

Klinická manifestace a závažnost reperfúzního poškození může být rozdílná a závisí na rozsahu srdeční dysfunkce.

Kloner (3) rozdělil reperfúzní poškození na čtyři typy, jak je pozoroval v experimentech na zvířatech:

a) Reperfúzí vyvolaný stunning (omráčený myokard) - tj. kontraktilní dysfunkce, která po reperfúzi přetrvává i přesto, že nedošlo k ireverzibilnímu poškození a že byl obnoven normální průtok koronárními tepnami. Jedná se o nejmírnější formu srdeční dysfunkce, která se spontánně upravuje po několika dnech (někdy až po několika týdnech) .

b) Reperfúzní arytmie, které vznikem komorové tachykardie nebo fibrilace komor během prvních sekund po reperfúzi, vedou k ohrožení funkce myokardu. Reagují dobře na léčbu antiarytmikem nebo defibrilací elektickým výbojem.

c) Cévní reperfúzní poškození – progresivní poškození mikrocirkulace s rozšířením oblasti s „ no-reflow“ fenoménem a ztráta koronární vazodilatační rezervy. U „no-reflow“ fenoménu se jedná o nezvratný výpadek perfúze, stav, ve kterém nedojde k obnovení průtoku krve v ischemické oblasti ani po provedeném akutním ošetření.

d) Letální reperfúzní poškození – tj. reperfúzí navozená smrt buněk, které byly ještě viabilní v době před obnovením průtoku krve. Jedná se o nejtěžší formu srdeční dysfunkce. Může se podílet až na 50% konečné velikosti infarktu myokardu. Mezi možné mediátory letálního reperfúzního poškození patří volné kyslíkové radikály, intracelulární přetížení Ca^{2+} , rychlé obnovení fyziologického pH a zánět. (3,4)

1.3 Potencionální mechanismy vzniku

Při volbě účinné prevence vzniku a minimalizace rozsahu reperfúzního poškození je třeba znát základní mechanismy, které se podílejí na vzniku tohoto patologického jevu. Pro významnost „no-reflow“ fenoménu při léčbě pacientů s AIM s ST- elevacemi pomocí primární PCI a jeho určitou specifičnost, budou mechanismy tohoto fenoménu popsány v samostatné kapitole.

1.3.1 Hlavní mechanismy

Hlavními mediátory reperfúzního poškození myokardu jsou **volné kyslíkové radikály a neutrofilý**, které se při obnově krevního toku reperfúzí dostávají do předtím ischemizované tkáně.

Volné kyslíkové radikály jsou vysoce reaktivní molekuly, které jsou v malém množství tvořeny i v průběhu normálního metabolismu buněk a jsou odstraňovány endogenními systémy „odklízečů“ – tzv. „scavengery“. Scavengery můžeme rozdělit do dvou skupin: první obranná linie (buněčné enzymy – superoxididismutasa, katalasa) a druhá obranná linie (neenzymatické scavengery – alpha-tokoferol, kys. askorbová). (5) Reperfúze post-ischemické tkáně je spojena s nadměrnou tvorbou volných kyslíkových radikálů, vytvořených různými mechanismy (mitochondriální dýchání, aktivované neutrofilý, xanthin-oxidázová aktivita), které zahltní buněčné obranné systémy a způsobí tkáňové poškození.(6)Je nutné zdůraznit, že buňky poškozené předchozí ischemií jsou k působení volných kyslíkových radikálů zvýšeně citlivé. (3) Dochází k peroxidaci lipidů, která ve

svém důsledku může znamenat porušení integrity buněčné membrány, jež se stává zvýšeně propustnou pro sodík a vápník.(3) Oxidovány jsou i sufhydrylové skupiny strukturálních proteinů a enzymů, a je inhibována oxidativní fosforylace v mitochondriích. Kromě přímého oxidativního účinku ovlivňují kyslíkové radikály různé buněčné funkce, které hrají důležitou roli ve sledu dějů, jež vedou až k tkáňovému poškození během reperfúze.(6) Jedná se o volnými radikály:

1. inaktivovaný NO ,
2. indukovanou adhezi neutrofilů v intaktních cévách ,
3. stimulovanou produkci PAF – jako aktivátoru neutrofilů - endotelovými buňkami a snížení jeho odbourávání,
4. navozenou tvorbu neutrofilních chemotaktických substancí z plazmy
5. stimulovanou syntézu tkáňového faktoru s jeho expresí na endotelových buňkách – podporující vznik intravaskulární trombózy.

Neutrofil podstatně přispívají k reperfúznímu poškození. Průnik neutrofilů do post-ischemického myokardu je spojen s jejich aktivací, adhezí na endoteliální povrch a následnou migrací do poškozené tkáně. Aktivované neutrofilie uvolňují různé mediátory jako jsou kyslíkové radikály nebo proteolytické enzymy, které mohou přímo způsobit poškození tkáně. Mezi uvolňované látky patří také prozánětlivě působící mediátory (PAF, tromboxany, leukotrieny), které potencují **lokální zánětlivou reakci** a atrahují leukocyty a destičky do post-ischemické tkáně. Neutrofilie také mohou obstruovat kapiláry a tím mechanicky bránit krevnímu toku. (6)

1.3.2 Další mechanismy

Přetížení kalcium přispívá ke vzniku reperfúzního poškození několika způsoby. Jedním z nich je hyperkontrakce srdečních myofibril vznikající v momentu reoxygenace. Dalším je nárůst intracelulární koncentrace kalcia, který zapříčiní vzestup hladiny vápníku v mitochondriích. To vede ke snížení schopnosti mitochondrií vytvářet APT a tím omezuje regeneraci myocytů. Posledním dosud známým způsobem je aktivace proteáz, které mohou zničit intracelulární struktury jako například buněčný cytoskelet. Stále nejsou zcela objasněny cesty vstupu kalcia do buněk, ale s největší pravděpodobností jimi jsou $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanály a napětově řízené kalciové kanály.

Deplece cytosolického kalcia chrání myocyty před reperfúzním poškozením po předchozí ischemii.(5,7)

Rychlá normalizace kyselého pH tkáně myokardu v důsledku vymytí kyseliny mléčné při reperfúzi vyvolá aktivaci výměny Na-H a Na-HCO_3 a může vést až k letální komplikaci reperfúze vzniklým pH paradoxem.(4)

1.3.3 Mechanismy vzniku „no-reflow“ fenoménu

Přítomnost „no-reflow“ fenoménu má závažné klinické důsledky. Je spojen s horším zotavením globální i regionální kontraktility myokardu, vyšším výskytem arytmií, častějším výskytem srdečního selhání a zhoršením celkové prognózy pacientů s akutním infarktem myokardu.(3)

Ačkoli existuje více vysvětlení vzniku „no-reflow“ fenoménu, význam jednotlivých mechanismů ještě není zcela objasněn. Ale jejich významnost je zřejmě rozdílná bezprostředně po uvolnění koronární okluze a později, v průběhu reperfúze, jak bylo pozorováno na různých experimentálních modelech.(8)

1.3.3.1 Ischemické poškození endotelu a mikrovaskulární obstrukce

Nejčastějším nálezem jsou oblasti s edémem a „puchýřky“ (*angl. blebs*) endotelových buněk , které se podílejí na uzávěru kapilárního lumen a přímo se tím účastní na vzniku regionálních poruch perfúze ihned po znovuotevření koronární artérie.(8)

1.3.3.2 Neutrofilý: mechanická obstrukce vs. Interakce

V experimentech *Ambrosia et al.* (9) bylo během reperfúze pozorováno rozšíření anatomického „no-reflow“ spojené s nálezem nápadných shluků neutrofilů v těchto „no-reflow“ oblastech. Shluky neutrofilů způsobují obstrukci kapilárního lumen tvorbou „zátek“. Neutrofilý tak mohou přispět k vývoji „no-reflow“, ale nezdají se být podmínkou jeho vzniku.

Přestože je shlukování neutrofilů v oblastech „no-reflow“ významné, není jejich působení omezeno jen na mechanickou obstrukci, ale zahrnuje interakce s endotelem, destičkami a zřejmě i myocyty. Polymorfonukleáry jsou schopny uvolňovat volné kyslíkové radikály, proteolytické enzymy a leukotrieny, které ovlivňují destičky a endoteliální funkce. Endotelové buňky mohou modulovat funkce neutrofilů expresí adhezních molekul např. ICAM-1, P-selectin a uvolňováním rozpustnými půdovky jako jsou NO, prostacyklin, endothelin a PAF.

Destičky ovlivňují aktivaci polymorfonukleárů uvolňováním tromboxanu A₂, PDGF, serotoninu, proteáz a adenosinu.(8)

1.3.3.3 Volné kyslíkové radikály

Produkce volných kyslíkových radikálů vrcholí v prvních 2-10 minutách reperfúze po uzávěru koronární artérie. Mezi zdroje kyslíkových radikálů patří mitochondrie, xantin-oxidázová aktivita a neutrofilů. Superoxiddismutáza zodpovědná za odstraňování superoxidu může být poškozena proběhlou ischemií. V experimentech na zvířatech bylo zjištěno, že aplikace superoxiddismutázy v kombinaci s katalázou značně redukuje rozsah „no-reflow“ a ultrastrukturální známky endoteliálního poškození.(10)

1.3.3.4 Cévní funkční odchylky

Cévní dysfunkce, která vzniká po ischemii a následné reperfúzi, je charakterizovaná sníženou schopností vazodilatace v odpovědi na acetylcholin nebo destičkami indukovaný podnět. Může přetrvávat i několik týdnů. Klinické pozorování potvrdilo snížení koronární rezervy jako následek ischemie a reperfúze. Bylo ale zjištěno, že pokud není porušená cévní odpověď na fyziologický stimul primární příčinou „no-reflow“, může především dlouhotrvající alterace cévní funkce přispět k adaptaci krevního průtoku na vzniklou situaci zvýšenou extrakcí kyslíku nebo potřebného substrátu.(8)

1.3.3.5 Mechanická komprese

Rychle vzniklé zduření myokardiálních buněk s intracelulárním i intersticiálním edémem je jednou z velmi časných morfologických známek reperfúzního poškození. Mechanická komprese mikrovaskulárního systému může přispívat ke vzniku „no-reflow“, ale není primárním mechanismem jeho vzniku.(8)

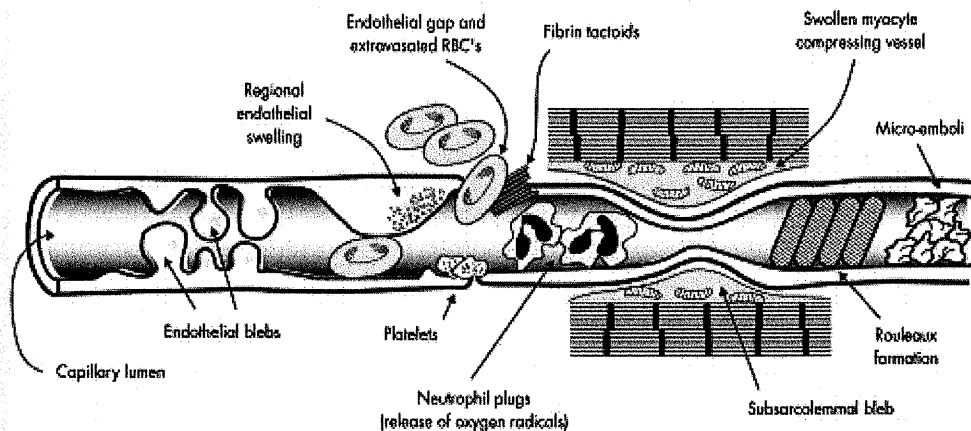
1.3.3.6 Koagulace, tkáňový faktor

Při utrastrukturálním zkoumání oblastí „no-reflow“ nebyl nalezen přímý důkaz, že by intravaskulární trombus byl jeho příčinou. Některé studie prokázaly pomocí elektronového mikroskopu nečetné mikrotromby,(11) jiné nenašli žádný důkaz aktivace koagulační kaskády. Poznatky nedávných studií nasvědčují tomu, že tkáňový faktor, který aktivuje zevní koagulační cestu, může ovlivňovat stupeň „no-reflow“.(8)

1.3.3.7 Mikroembolizace aterosklerotických hmot a trombů

Přeměna stabilního aterosklerotického plátu v nestabilní může být způsobena zánětlivou stimulací nebo iatrogenní manipulací. Dochází k porušení fibrózní čepičky, obnažení subendoteliální matrix a uvolnění lipidových hmot, které stejně jako matrix, endoteliální buňky a destičkové tromby, embolizují do distálních částí cévního řečiště.(12) Mikroembolizace významně přispívá ke vzniku „no-reflow“ fenoménu a potenciálně vede ke vzniku mikro- a makroinfarktů.(8)

Obr.1 Schéma shrnující odlišné mechanismy podléjící se na vzniku „no-reflow“, který je spojen s ultrastrukturálními mikrovaskulárními změnami (podle Klonera a Reffelmanna) (8)



(*capillary lumen* – kapilární lumen, *endothelial blebs* – „puchýřky“ endotelových buněk, *regional endothelial swelling* – místní zduření endotelu, *endothelial gap and extravasated RBC's* – endotelové spoje a extravazace erytrocytů, *platelets* – destičky, *neutrophil plugs [release of oxygen radicals]* – shluky neutrofilů, které uvolňují volné kyslíkové radikály, *fibrin tactoids*- fibrinové taktoidy, *subsarcolemmal bleb*- subsarkolemální puchýř, *swollen myocyte compressing vessel* – zduřelý myocyt komprimující cévu, *micro-emboli* – mikroembolizace, *rouleaux formation* – shluky válců)

2. MOŽNOSTI PREVENCE NA ZÁKLADĚ VÝSLEDKŮ DOSAVADNÍCH KLINICKÝCH STUDIÍ

„ Time is muscle, and muscle is life. “

Eugene Braunwald, 1971

V experimentech vede reperfuční trauma až k 50 % výsledné velikosti infarktového ložiska, ke smrti téměř v 10 % ošetřených akutních infarktů myokardu a k srdečnímu selhání asi ve 25 %. (4)

Znalost mechanismů podílejících se na vzniku reperfučního poškození umožňuje použít prostředky, které do těchto mechanismů zasahují a pozitivně ovlivňují výsledný rozsah postižení. Pro různorodost těchto mechanismů mnohé studie prokazují zvýšení efektu účinku při použití několika prostředků najednou.

Efektivita většiny kardioprotektivně působících látek byla zatím prokázána jen na zvířecích modelech, ale mnohé názory se shodují, že jejich účinnost bude stejná i v klinických zkouškách.

Možnosti, jak minimalizovat reperfuční poškození, lze rozdělit na dva základní přístupy podle načasování léčebné intervence na ischemický „**preconditioning**“ (před vznikem ischémie) a ischemický „**postconditioning**“ (na začátku reperfuze). Zatímco v 90. letech byl zájem soustředěn na preconditioning, dnes je směřován spíše na intervence v rámci postconditioningu.(13) V několika malých studiích byl ischemický postconditioning spojen s 36% redukcí velikosti infarktového ložiska a se zlepšením reperfuze myokardu.(4)

Také byly nalezeny nové kardioprotektivní mechanismy, které lze farmakologicky ovlivnit. Jsou jimi aktivace **RISK** (reperfusion injury salvage kinase) a inhibice otevření mitochondriálních **PTP** (permeability transition pore

). RISK je skupina antiapoptotických kináz. Patří mezi ně fosfatidyl-inositol-3 kináza / Akt (PI-3 kináza/ Akt), p42/p44 MAP kináza (*Hausenloy et al. (14)*) a cyklická GMP- dependentní protein kináza (*Piper et al.(15)* ; *Burely et al.(16)*). Aktivace RISK může zredukovat rozsah infarktu až o 50%.(4) RISK doprovází několik mechanismů, které se také podílejí na ochraně buněk (aktivace NOS, inhibice mPTP, upregulace antiapoptotických působků, inhibice proapoptotických působků Bcl2 proteinové rodiny, regulace uptake Ca^{2+} sarkoplazmatickým retikulem, inhibice glykogen syntáz kinázy-3beta). Styčným bodem těchto mechanismů, včetně RISK, je inhibice otevření mPTP. K otevření mPTP dochází v prvotní fázi reperfúze po dostatečně dlouhé ischemii a je konečným spouštěčem buněčné smrti.

Je třeba mít na paměti, že reperfúzní poškození přímo souvisí s ICHS, která je způsobena nebo spojena s rizikovými faktory jako hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, insulínová rezistence, ateroskleróza a srdeční selhání; svůj význam má i věk. Všechny tyto faktory mohou přispívat ke vzniku reperfúzního poškození a ovlivňují odpověď na kardiprotektivní intervence, tudíž mohou mít vliv na úspěšnost preconditioningu a postconditioningu.

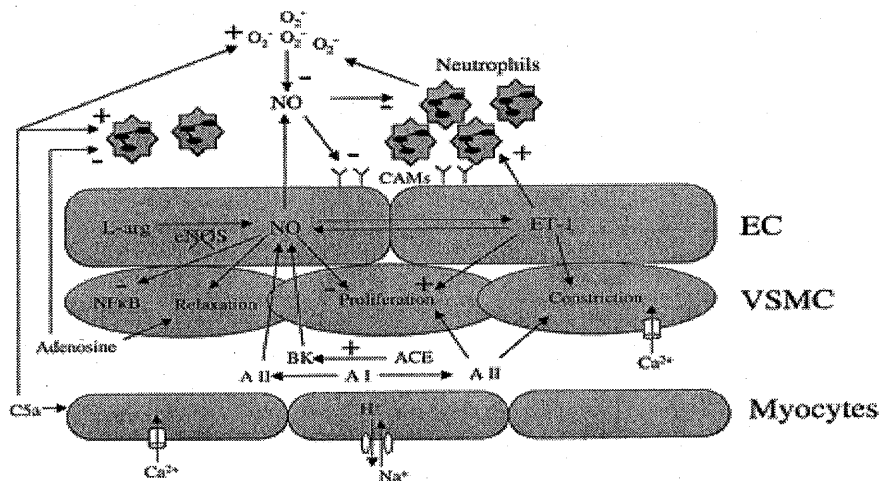
2.1 Farmakologické možnosti

Bylo zkoušeno mnoho farmakologických přípravků, především scavengery volných kyslíkových radikálů, blokátory vápníkových kanálů, inhibitory neutrofilů, NO, adenosinu příbuzné látky, inhibitory renin-angiotenzinového systému, antagonisté endotelinového receptoru, inhibitory Na^+/H^+ kanálu a antiapoptotické působky (obr. 2) . Většina z nich má přesvědčivě pozitivní efekt. Příčinou některých rozporupných výsledků mohou být různorodé faktory: odlišnosti živočišných druhů, množství kolaterál, trvání ischemie, načasování

aplikace léků, metody aplikace léků a rozdílné důsledky kardioprotekce (velikost infarktu, funkce myokardu, endoteliální funkce nebo arytmie).

Také je podstatné, aby se terapeutické množství účinné látky, dostalo se začátkem reperfúze do cílové ischemické oblasti. Zde vyvstává problém při intravenózní aplikaci, kdy se potřebné množství podané látky nemusí dostat do ischemické oblasti, pokud nejsou vytvořeny kolaterály. I v případě, že jsou vytvořeny, je zapotřebí vysoké dávky léku, aby jeho koncentrace v ischemické oblasti byla dostatečná. To je spojeno s rizikem výskytu vedlejších účinků léků. Naproti tomu lokální aplikace (anterográdní intrakoronární aplikace, retrográdní venózní koronární aplikace) zaručí vpravení účinné látky selektivně do cílové oblasti bez ovlivnění nepostíženého myokardu. Pro klinické použití se zdá být vhodnější anterográdní intrakoronární aplikace před otevřením uzavřené artérie.

Obr.2 Schéma působení některých mediátorů ischemie/reperfúze, které je možné farmakologicky ovlivnit. (podle Wanga et al.) (7)



Po reperfúzi klesá hladina NO na podkladě snížené aktivity enzymu eNOS a narůstá hladina superoxidu, který je produkován neutrofilů a dalšími zdroji. To vede ke zvýšení cévní tonu v důsledku snížení NO indukované relaxace a zvýšené produkce vasokonstriktorů endotelinu-1 (ET-1) a angiotensinu II (A II). Aktivací NFκB se zvyšuje exprese prozánětlivých cytokinů a CAM následně stimuluje adhezi neutrofilů. Součástí komplementu jako C5a přispívají k destrukci membrány, stimulaci neutrofilů a produkci superoxidu. Reperfúzní poškození může být zmírněno zvýšením hladiny NO, blokádou ET-1 receptorů, blokádou produkce (ACE- inhibitory) nebo receptorů (AT 1) angiotensinu II, stimulací receptorů adenosinu, blokádou komplementu, blokádou vápníkových kanálů, blokádou Na⁺/H⁺ kanálů nebo inhibicí neutrofilní adheze přes CAM. Zdá se, že existuje mnoho důležitých interakcí mezi jednotlivými mediátory, například kardioprotektivní efekt dosažený blokádou ACE, A II receptorů nebo ET-1 receptorů zahrnuje aktivaci BK a/nebo NO.

2.1.1 Scavengery kyslíkových radikálů a antioxidanty

Mezi nejvýznamnější scavengery kyslíkových radikálů a antioxidanty patří **superoxid dismutáza** (SOD), **kataláza** rozkládající H_2O_2 , inhibitor xantinoxidázy **allopurinol**, chelátor železa **deferoxamin**, **vitamín E** a **vitamín C**.

Jako první pozoroval příznivý účinek *Jolly a kol.*(1984) (17) na psím modelu, když při 90minut trvající simulované okluzi a.circumflexa následované 24 hodinovou reperfúzí, podal do levé síně před začátkem ischemie nebo 15 minut před reperfúzí **SOD a katalázu**. Podařilo se tak zredukovat velikost infarktu. Pokud ale byla účinná látka podána 40 minut po začátku reperfúze, nebyl efekt prokázán. Zdá se, že poškození volnými kyslíkovými radikály vzniká v časně fázi. Potvrdila se tedy i významnost načasování aplikace léku.

Jiná studie prokázala významnost přítomnosti kolaterál, když po vpravení SOD do levé síně nedošlo k redukci velikosti infarktu, ale po retrográdním vpravení SOD se velikost infarktového ložiska zmenšila. Pokud tedy kolaterály nejsou vytvořeny, je anterográdní aplikace neefektivní.(18)

V některých studiích se efekt SOD, N-(2-merkaptopropionyl) – glycinu nebo kombinace SOD a katalázy neprokázal. Možným vysvětlením těchto rozporuplných výsledků je interindividuální variabilita a rozdílná technika měření velikosti infarktového ložiska. (7)

Další studie zjistily příznivý vliv na vznik reperfúzních arytmií a omráčeného myokardu.(7)

Allopurinol je inhibitor xantin-oxidázy a je běžně užíván při léčbě dny. Ale také byl prokázán jeho účinek v redukci reperfúzního poškození supresí oxidativního stresu například ve studiích *Stewart JR. et al.* (19) nebo *Yoshiharu K.* (20)

Deferoxamin se podílí na ochraně myokardu redukcí železem katalyzované tvorby hydroxylových radikálů. Vysoké dávky (vyšší než 0,76 mmol/l) mohou být toxické.(21)

Vitamín E je vysoce lipofilní a má pomalý průnik do tkání, což omezuje jeho využití v akutních případech. Naproti tomu u **analogů vitamínu E**, které jsou více hydrofilní, byl zjištěn efekt prokazující zmenšení reperfúzního poškození. Účinnost jednoho z nových analog, IRFI 042, prokázala studie *Altavilla et al.* na krysích modelech, kdy došlo k signifikantnímu zmenšení velikosti ischemického ložiska při podání 5 minut po začátku reperfúze. (22)

Peroxidace lipidů je jedním ze hlavních mechanismů poškození způsobeného volnými kyslíkovými radikály. Vysoce účinný neenzymatický syntetický inhibitor peroxidace lipidů o velmi nízké molekulové hmotnosti **indenoindol H290/51** (7), spíše velmi efektivně zabraňuje šíření radikálů než jejich samotné tvorbě. Efekt byl zjištěn na prasečích modelech při podání krátce před reperfúzí.

2.1.2 Blokátory vápníkových kanálů

Mezi blokátory s prokázaným účinkem patří hlavně **diltiazem, felodipin, nifedipin, verapamil a clevedipin**.

Blokátory vápníkových kanálů mají kardioprotektivní účinek, pokud jsou aplikovány jak před začátkem ischemie, tak se začátkem reperfúze. V případě použití blokátorů Ca^{2+} s dlouhodobým účinkem nelze přesně odlišit protektivní účinek před poškozením samotnou ischemií nebo před poškozením až následnou reperfúzí.(5) Také nelze vyloučit, že prospěšný vliv souvisí s úsporou energie, ke které dochází díky jejich negativnímu chronotropnímu a ionotropnímu efektu. Některé z blokátorů mají navíc antioxidační účinek nebo regulují NOS.

Diltiazem, jak prokázaly studie *Herzoga et al.* na prasečích srdcích, podaný v nízkých dávkách během prvních minut reperfúze zmenšil velikost infarktu. Jako rozhodující se jeví aplikace v prvních 12 minutách.(23)

Vazoselektivní blokátor **felodipin**, jehož terapeutická dávka nemá kardiodepresivní účinek, zlepšuje obnovení funkcí a zmenšuje rozsah infarktu. V experimentech s felodipinem stále není možné během reperfúze vyloučit možnost „wash-out“ mechanismu, kdy se blokátor může dostat do systémové cirkulace a ovlivnit tak systémovou cévní rezistenci nebo ischemií nezasazený myokard.(5)

Nifedipin, podle studií provedených na psech, zlepšuje postischemickou kontraktální funkci a minimalizuje ventrikulární fibrilace v průběhu reperfúze.(7)

Verapamil snižuje vznik reperfúzních arytmií, jak bylo prokázáno na krysích i prasečích srdcích.(7)

Clevedipin je nový blokátor s ultrakrátkým účinkem a krátkým poločasem v krvi, což zajišťuje jeho zanedbatelnou hladinu v systémovém oběhu. Významně zmenšuje velikost infarktu.(5) Efekt je prokazatelný při podání krátce po vzniku ischemie nebo těsně před reperfúzí, na rozdíl od podání v průběhu ischemie. Z toho vyplývá, že influx kalcia má rozdílnou patofyziologickou důležitost během různých fází ischemie a reperfúze. Ačkoli se spekuluje o mnohých mechanismech tohoto jevu, jeho přesná podstata není zcela známa.

Téměř výhradní místní účinek clevedipinu potvrdil, že funkce blokátorů kalciových kanálů je založena na lokálním působení v postižené oblasti více než na periferních mechanismech.(5) Proto je vhodné aplikovat blokátory cestou katétru zavedeného do uzavřené artérie při PCI.

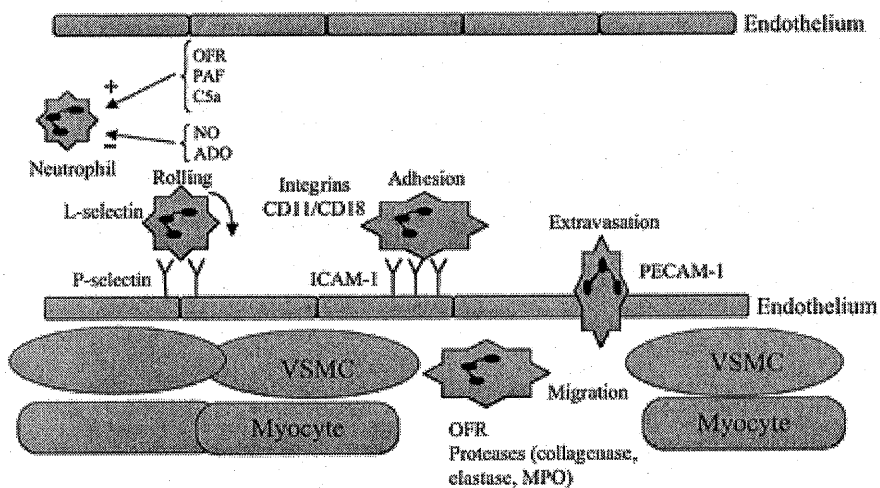
2.1.3 Inhibitory neutrofilů

Způsoby jak minimalizovat neutrofilu indukované poškození jsou: **deplece neutrofilů, přímá inhibice neutrofilů, inhibice adhezních molekul neutrofilů a endoteliálních buněk.**

Deplece dosažená podáním protilátek proti neutrofilům nebo pomocí filtrů zachycujících neutrofilů zmírňuje „no-reflow“ a redukuje velikost infarktu. Naopak přidání koncentráту neutrofilů na začátku reperfúze zhorší dysfunkci myokardu.(7)

Mnohé studie hodnotily efekt **blokády adhezních molekul** jako možnost inhibice neutrofilů indukovaného poškození, tedy zmenšení reperfúzního poškození. Podstatou je interakce (zahrnující „rolling“, adhezi a transmigraci) mezi adhezními molekulami na neutrofilech a endotelových buňkách. Adhezní molekuly jsou rozděleny do tří skupin: selektiny, β 2-integriny a imunoglobulinová super-rodina. (obr. 3)

Obr.3 Interakce mezi neutrofilů a adhezními molekulami. (podle Wanga et al.) (7)



Cirkulující neutrofilů jsou inhibovány NO a adenosinem (ADO). Aktivovány volnými kyslíkovými radikály (OFR), PAF a komponentami komplementu jako C5a. Neutrofilů jsou aktivovány v časné fázi reperfúze a dochází k jejich rolování, adhezi a transmigraci. Rolling je zajištěn P-selektinem na endotelovém povrchu. Ligandem pro P-selectin může být L-seletin na neutrofilech. Pevná adheze je zprostředkována P-selektinem na povrchu endotelových buněk a integrinovým komplexem CD11/CD18 na neutrofilech. Extravazace a migrace je zprostředkována PCAM-1 lokalizovanou na endoteliálních buněčných spojích. Následně dochází k transmigraci neutrofilů a uvolňování OFR a proteáz, které přispívají k tkáňovému poškození a atrahují další neutrofilů do místa poškození.

Podání **monoklonální protilátky** proti CD11b/CD18 psům zredukovalo rozsah infarktu. Došlo ke snížení akumulace neutrofilů v ohroženém myokardu. Při podání protilátek proti ICAM-1, P-selektinu, L-selektinu a PECAM-1 kočkám, 10 minut před reperfúzí, se snížila adheze nebo transmigrace neutrofilů a zmenšil se rozsah velikosti infarktového ložiska až o 50%. Tyto studie potvrzují názor, že infiltrace neutrofilů patří mezi klíčové události podílející se na vzniku reperfúzního poškození. (7)

Přes výsledky těchto studií je potřeba zdůraznit, že reperfúzní poškození nevzniká jen na podkladě škodlivého působení neutrofilů. Jsou studie, ve kterých redukce akumulace neutrofilů není spojena s redukcí ložiska infarktu nebo se zlepšením funkcí myokardu. (7)

2.1.4 Adenosin

Adenosin je v nízké koncentraci přítomen v normálním myokardu, ale jeho množství vzrůstá během ischemie a reperfúze. Je to způsobeno hydrolýzou vysokoenergetických fosfátů jako ATP, ADP a AMP. Zprostředkovává signální odpovědi cestou specifických receptorů na myocytech, VSMC, buňkách endotelu a neutrofilech. Zapojený v ischemickém preconditioningu zprostředkovává adenosin protekci proti reperfúznímu poškození. Intrakoronární aplikace adenosinu psům na začátku reperfúze chrání endoteliální struktury, zmenšuje akumulaci neutrofilů, zlepšuje regionální funkci komor a redukuje velikost infarktu. (7)

Specifičtí agonisté adenosinových receptorů A1, A2 a A3 redukují velikost ložiska, pokud jsou podány před reperfúzí nebo v návaznosti na ni. Adenosin inhibuje adhezi neutrofilů na endotel, inhibuje degranulaci neutrofilů a snižuje tvorbu superoxidu, tedy faktory, které mohou přispívat k ochraně myokardu.

Některé studie protektivní vliv adenosinu neprokázaly. Například *Homeister et al.* (24) neprokázaly účinnost adenosinu, ale při podání spolu s **lidocainem** byl rozsah infarktu redukován. Také účinný agonista adenosinových

receptorů A1 a A2 **AMP 579** signifikantně zmenšuje infarktové ložisko, což by mohlo značit, že dávka adenosinu v této studii byla nedostatečná.

Jiné dvě studie neprokazují efekt ani u adenosinu ani u A1 agonisty. (7) Agonisté byly podány před začátkem reperfúze králíkům, u kterých nebyly vytvořeny kolaterály. Lze se tedy domnívat, že se do postiženého myokardu nedostalo dostatečně vysoké množství účinné látky. Ochranný účinek agonistů A1 receptorů zřejmě spočívá v interferenci s neutrofily, ke kterému dochází během pozdní fáze reperfúze.

2.1.5 Inhibitory komplementu

Komplement je aktivován během ischemie a reperfúze. Důsledkem je tvorba anafylatoxinů C3a, C4a, C5a a „membrane attack“ komplexu. Komplement poškozují buňku přímo, a to zvýšením permeability, uvolněním histaminu a PAF. Navíc jsou složky komplementu, zejména C5a významnými stimulatory adheze neutrofilů a produkce superoxidu. Inhibice komplementové kaskády pomocí **inhibitorů C1 esterázy, monoklonálních protilátek proti C5a a antagonisty C5a receptoru** redukuje velikost infarktu myokardu. (7)

2.1.6 Oxid dusnatý (NO)

Endotelem tvořený NO ovlivňuje řadu biologických pochodů, které vykazují protektivní účinky během ischemie a následné reperfúze. NO je velmi účinný vazodilatátor a podílí se zlepšení krevního průtoku během reperfúze. NO také inhibuje adhezi neutrofilů na endotel a podílí se na vychytávání superoxidu.

Reperfúze je spojena se sníženou dostupností NO, zřejmě v důsledku zvýšené inaktivace superoxidem a snížené produkce NO. Obnova tvorby NO a nebo podání exogenního NO je spojeno s ochranou před reperfúzním poškozením. Rozvoj endoteliální dysfunkce vzniká v průběhu prvních minut po reperfúzi. (25)

Kardioprotektivního efektu, vyjádřeného redukcí velikosti infarktu in vivo a obnovou funkce myokardu in vitro, bylo dosaženo i prekurzorem NO **L-argininem**. (26, 7) Pro docílení účinnosti je třeba aplikovat NO donory a L-arginin před začátkem nebo se začátkem reperfúze. Stejného efektu nelze dosáhnout D-argininem a také je protektivní účinek blokován inhibitory NOS. (7)

Některé studie prokazují i antiarytmogenní účinek NO v průběhu reperfúze. Po podání donorů NO byl tento účinek prokázán u prasat (27), a naopak inhibice NOS zvyšuje výskyt reperfúzí indukovaných arytmií. (28)

Existují studie, které prokazují zcela opačné účinky NO. Je to zřejmě způsobeno nespecifickými účinky blokátorů syntézy NO, odlišným množstvím tvořeného NO a typem NOS (endoteliální, indukibilní). (7)

2.1.7 Antagonisté endotelin-1 receptoru

ET-1 je silný peptidový vazokonstriktor. Běžně se tvoří v buňkách endotelu, ale jeho tvorba byla prokázána i v VSMC a myocytech. Tvorba ET-1 a jeho vazokonstrikční efekt se zvyšuje v průběhu ischemie myokardu a reperfúze. (7)

Studie na krysách ukázala, že použití monoklonálních protilátek proti ET-1 zmenšuje velikost infarktu. (29) Následný vývoj selektivních antagonistů ET receptorů umožnil další výzkum v této oblasti. V experimentech na psech byl zjištěn účinek antagonisty ET_A **BQ123** v redukcí velikosti infarktu až o 40%. (30) Podobný účinek mají i nízkomolekulární selektivní ET_A a ET_A/ET_B receptorový antagonisté **LU135252** a **bosentan**. (31, 7) Stupeň kardioprotekce je stejný u obou preparátů jak při lokální, tak při systémové aplikaci.

Podstata mechanismu působení antagonistů ET receptoru není zcela jasná. Jedním z mechanismů bude vazodilatační působení, které zmírňuje rozsah „no-reflow“, dalším je inhibice neutrofilů a navíc LU135252 významně zlepšuje post-ischemickou funkci komor, pokud jsou při reperfúzi promývány neutrofilly. Antagonisté také inhibují produkci superoxidu indukovanou ET-1 a vzestup intracelulárního vápníku pomocí stimulace fosfolipázové aktivity.

Je zajímavé, že blokáda ET receptorů je pravděpodobně spřažena s produkcí NO. Tato domněnka byla potvrzena u prasat, kdy byla redukce velikosti infarktu pomocí LU 135252 byla zablokována inhibitory NOS.(7)

Některé studie ukazují, že v průběhu ischemie a reperfúze má ET-1 proarytmogenní účinek . LU 135252 snižuje výskyt komorových fibrilací během ischemie u prasat a TAK 044 snižuje výskyt reperfúzních arytmií u krys.(7)

I mezi studiemi ET-1 se vyskytují kontroverzní výsledky, například že ET-1 má pozitivní efekt, na zmenšení rozsahu infarktového ložiska, pokud je aplikován před vznikem ischemie. Tento preconditioning efekt je zprostředkován protein kinázou C.(7) Další studie neprokázala žádný efekt ET antagonistů.

2.1.8 Inhibitory renin- angiotensinového systému (RAS)

Klíčovým produktem RAS je angiotensin II. A II zvyšuje v myocytech a hladkých svalových buňkách hladinu intracelulární vápníku, což vede k pozitivnímu ionotropismu, ovlivnění diastolické funkce a koronární vazokonstrikci. Angiotenzin II je důležitým regulátorem uvolňování noradrenalinu ze sympatických nervových zakončení a řídí srdeční a cévní sympatickou aktivitu. Patofyziologické hladiny angiotenzinu II jsou kardiotoxické a způsobují nekrózu myocytů.

ACE inhibitory snižují výskyt reperfúzní arytmie, redukuje velikost infarktu a zlepšují obnovu funkce myokardu. **Captopril** se zřejmě podílí na ochraně myokardu vychytáváním kyslíkových radikálů, ale i dalšími mechanismy. ACE je také zodpovědné za degradaci bradykininu, který se ukazuje jako kardioprotektivní. (7)

Jsou známy dva typy angiotensin II receptorů, AT₁ a AT₂ . K ovlivnění kardiovaskulárního systému A II využívá hlavně AT₁ receptor. Při pokusech na prasatech působí aplikovaný AT₁ blokátor **candesartan**(32,7) a **EXP3174** (33) značnou redukcí velikosti infarktu. Tento efekt vzniká, pokud je blokátor podán těsně před ischemií nebo pokud je podán lokálně do oblasti ischemie těsně před reperfúzí. A je pravděpodobně založen lokální inhibicí srdečního A II.

Studie *Preckela a kol.* (34) na psech nezjistila účinnost AT₁ blokátoru **irbesartanu** na velikost infarktu, přestože jeho podání před ischemií zvýšilo průtok krve kolaterálami do postižené oblasti. Příčinou těchto rozporupných výsledků v této může být aplikace dvou bonusů A II před okluzí artérie. Krátké expozice A II před ischemií fungují jako preconditioning a zajišťuje odolnost myokardu vůči poškození(35) a aplikace AT₁ blokátoru již dále nezvýší ochranný účinek. AT₁ blokátor také redukuje vznik reperfúzních arytmií.

Blokáda AT₁ receptoru způsobuje vzrůst hladiny A II potlačením negativního feedbacku.. Angiotensin II následně aktivuje AT₂ receptor v endoteliálních buňkách a výsledkem je zvýšená produkce bradykininu, která přispívá k ochraně myokardu.(36) Aktivace bradykininových receptorů B₂ vede ke stimulaci cyklooxygenázy a NOS s následným zvýšením tvorby a uvolňování prostacyklinu a NO, jež jsou zodpovědné za účinek dosažený AT₁ blokátory.

2.1.9 Inhibitory Na⁺/H⁺ kanálu

Inhibice Na⁺/H⁺ kanálu v myocytech hraje významnou roli v regulaci intracelulárního pH a také sodíkové a vápníkové iontové homeostázy. Inhibice tohoto kanálu je prospěšná ze dvou důvodů. Prvním je inhibicí Na⁺/H⁺ kanálu redukováný eflux vodíku z buněk, který se podílí na udržení nízkého intracelulárního pH v průběhu časné fáze reperfúze. Přetrvávající intracelulární acidóza během reperfúze zřejmě chrání před reperfúzním poškozením. Druhým je inhibicí kanálu zmenšený influx sodíku a následně vápníku, a tím se zmenšuje přetížení vápníkem.

Předléčení a podání inhibitoru Na⁺/H⁺ kanálu **HOE- 694** prasatům krátce před reperfúzí zmenšuje rozsah ložiska. Tento poznatek podpořily i studie *Linze et al.* (37) a *Gumina et al.* (38), při aplikaci inhibitoru kanálu **cariporidu** nebo **EMD-85131** psům a králíkům krátce před začátkem reperfúze . Tři jiné studie nepotvrdily redukcii velikosti infarktu při použití cariporidu podaného těsně před reperfúzí.(7)

Několik studií prokazuje příznivý vliv inhibitorů Na^+/H^+ kanálu na reperfúzi indukovanou arytmií. HOE-694 a cariporid významně snižuje incidenci reperfúzi indukované komorové fibrilace v závislosti na dávce, bez ohledu zda-li je lék podán během ischémie i reperfúze nebo jen v průběhu reperfúze.(7)

2.1.10 Antiapoptotické prostředky

Roste počet důkazů potvrzujících, že lze při reperfúzní poškození pozorovat dvě formy buněčné smrti: nekrózu a apoptózu. Proces vedoucí k apoptóze začíná krátce po nástupu ischémie a výrazně se rozvíjí během reperfúze. Je způsoben doplněním vysokoenergetických fosfátů, vápníkovým přetížením a produkcí kyslíkových radikálů. Inhibice těchto procesů zmenšuje ireverzibilní poškození vzniklé v souvislosti s reperfúzí. Potvrzuje to i studie *Mocana et al.* (39) na izolovaných krysích srdcích. Inhibicí **kaspázy**, hlavní proteázy ovlivňující apoptotický proces, se významně zmenšuje velikost infarktu. Apoptóza je omezena i aplikací **SOD** a **katalázy**, což naznačuje, že apoptóza je závislá na oxidativním stresu. Lze ji také inhibovat monoklonálními protilátkami proti C5 složce komplementu.

2.1.11 Statiny

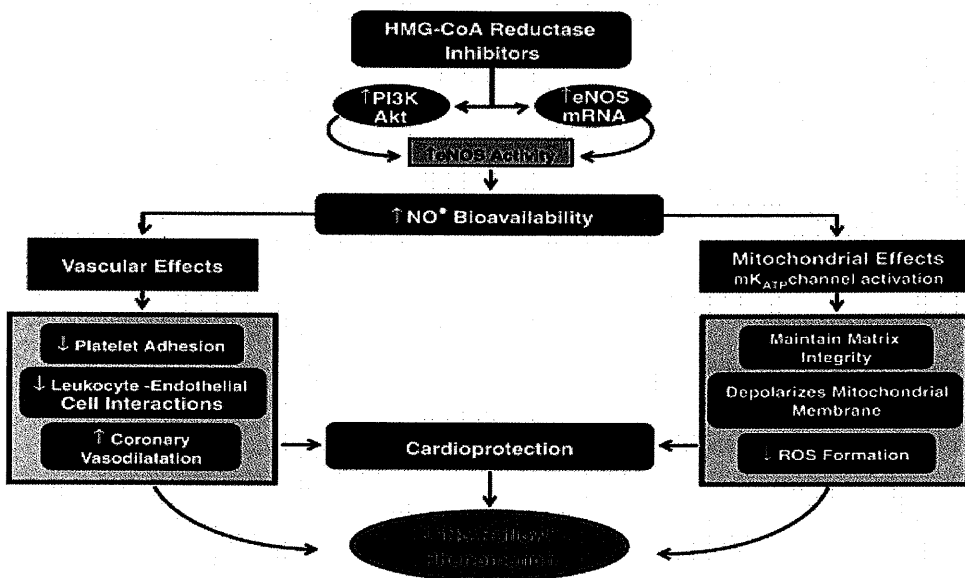
Statiny, inhibitory HMG-CoA reductasy, jsou velmi úspěšně užívány v terapii kardiovaskulárních onemocnění. Dříve se předpokládalo, že hlavním mechanismem účinku statinů je snížení cytoplazmatické hladiny cholesterolu a změna v regulaci metabolismu lipoproteinů. Dnes se ukazuje, že statiny mají pleotropní efekt. Zájem je směřován zejména na jejich schopnost zvýšit biologickou dostupnost NO, který zprostředkovává kardioprotektivní působení inhibicí vaskulárního zánětu a smrti myokardiálních buněk při různých kardiovaskulárních chorobách. Kardioprotektivní účinek statinů na vznik

kardiovaskulárních chorob podle *Petera et al.*(40) není omezen jen na jejich dlouhodobé preventivní působení, ale mají i „akutní“ ochranný efekt, který je způsoben mechanismy nezávislými na snížené hladině cholesterolu.

Statiny aktivují PI3K/Akt záchranou cestu, která pokud je aktivovaná před nebo po ischemii, má ochranný účinek před reperfúzním poškozením. Podle studií na zvířecích modelech prokazatelně zmenšují rozsah infarktu. Přesto některé studie při chronickém užívání statinů prokazují jejich škodlivý efekt s poklesem ATP a kreatinfosfátu v myokardu psů. Dlouhodobá aktivace PI3K/Akt záchrané cesty s antiapoptotickým efektem může způsobit kardiomegalii a vést k zhoubnému bujení. Intracelulární inhibitor PI3K/Akt záchrané cesty, fosfatáza PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), tento efekt omezuje. (41)

Obr.3 Kardioprotektivní mechanismy statinů. (podle Calverta a Lefera)

(42)



Statiny zvyšují biologickou dostupnost NO cestou PI3K/Akt a eNOS. NO poté zajišťuje buněčnou ochranu v období ischemie a reperfúze působením na dvě složky: cévní a mitochondriální. Působením na cévní složku dochází ke snížení adheze a tvorby shluků destiček a leukocytů v mikrocirkulaci a vazodilataci koronárních cév. Statiny zprostředkovaná tvorba NO se také podílí na ochraně mitochondrií, aktivací jejich K_{ATP} kanálů. Otevření těchto kanálů zajišťuje depolarizaci mitochondriální membrány, udržování integrity mitochondriální matrix a snižuje produkci ROS mitochondriemi, ke které dochází po proběhlé ischemii a následné reperfúzi.

Nejslibnější výsledky jsou prokazovány ve studiích se **simvastatinem** a **atorvastatinem**.

Zhao et al.(43) ve studii prokázali, že **simvastatin** redukuje „no-reflow“, vznikající po ischemii a následné reperfúzi, aktivací mitochondriálních K_{ATP} kanálů v myokardu. Simvastatin má i preconditioning efekt, při němž využívá právě tyto kanály.

Terapie simvastatinem zlepšuje koronární krevní průtok po reperfúzi, zmenšuje oblast „no-reflow“ až o 57%, zachovávají endoteliální spoje a redukují rozsah nekrózy myokardu. Na zvířecích modelech vedlo podávání simvastatinu k zachování postischemické funkce levé komory.

Atorvastatin při akutním podání chrání myokard před reperfúzním poškozením. Avšak při chronické nebo dlouhodobé terapii tento účinek ztrácí. Byla prokázána souvislost s rostoucí hladinou PTEN, která je regulátorem aktivity PI3K. Protektivního účinku atorvastatinu lze znovu dosáhnout akutním podáním vysoké dávky bezprostředně před ischemií s následnou reperfúzí.(41)

2.1.12 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin je člen velké a rozmanité cytokinové super-rodiny. Nedávno bylo zjištěno, že koordinuje lokální odpověď na poškození zachováním vaskulární autoregulace a oslabením apoptotických a zánětlivých příčin buněčné smrti.

Mudalagiri et al.(44) prokázaly protektivní efekt exogenního erythropoetinu při simulovaném reperfúzním poškození. Tento efekt je závislý na aktivaci PI3K a ERK1/2, což potvrzuje, že RISK jsou klíčovým záchranným mechanismem v myokardu. Pospěšnost erythropoetinu byla pozorována při aplikaci výslovně během re-oxygenace, což by napodobovalo klinické podmínky, kdy by se kardioprotektivní přípravek aplikoval na začátku reperfúze.(13)

Erythropoetin, ovlivňuje mnoho signálních cest a přidružených kináz, nejen RISK, a z toho vyplývá možnost vzniku nežádoucích efektů. Proto se nezdá být ideální pro klinické využití.

2.1.13 Glukagon-like peptid 1 (GLP-1)

Glukagon-like peptide 1, je inkretinový hormon produkovaný endokrinními buňkami ve střevě, který stimuluje sekreci inzulínu. Také aktivuje antiapoptotické signální dráhy, jako například PI3K, v pankreatu a v insulinomech. Jsou to stejné dráhy, které mají protektivní účinek v myokardu. Ve studii *Bose et al.* (45) autoři předpokládali, že GLP-1 by mohl přímo chránit srdce před reperfučním poškozením právě působením přes tyto signální dráhy. Tento předpoklad se potvrdil při pokusech na krysích srdcích a nabídl možnost nového využití tohoto léku zejména u pacientů s diabetem 2. typu.

Nikolaidis et al. (46) prokázali, že ke standardní terapii přidaná infúze GLP-1 zlepšuje regionální a globální funkci levé komory u pacientů s AMI a těžkou systolickou dysfunkcí po úspěšné PCI.

2.1.14 Atriální natriuretický peptid (ANP)

ANP stimuluje guanylyl-cyklázu, která vytváří cGMP . Ten aktivuje specifické kinázy, a ty nakonec vedou např. k relaxaci hladkého svalstva cév. *Sangawa et al.* (47) na izolovaných krysích srdcích zjistil, že ANP chrání zvýšenou syntézou cGMP kardiomyocyty před reperfúzí indukovanou hyperkontrakcí. Podání ANP v době reperfúze chrání myokard před reperfučním poškozením.

2.1.15 Blokátory glykoproteinového receptoru IIb/IIIa

Abciximab inhibuje agregaci trombocytů, ale adheze trombocytů na subendoteliální struktury není zcela zablokována, což snižuje riziko krvácení.

Malioli et al. (48) zjistil u pacientů s AMI po PCI, kterým byl v časně fázi podán abciximab zlepšení angiografického nálezu před PCI, tkáňové perfúze po PCI a obnovy funkce levé komory během 1 měsíce, zřejmě díky časnému začátku rekanalizace infarktové tepny.

Capmbell et al. (49) se ve své studii zaměřili na schopnost abciximabu oslabit interakce trombocytů a leukocytů s endoteliálními buňkami a ochránit kontraktilní funkci a koronární perfúzi po proběhlé ischemii/reperfúzi.

2.1.16 Další přípravky

Nicorandil je nitrovazodilatátor. Jeho aplikace ve spojení s PCI redukuje reperfúzní poškození a zlepšuje funkci myokardu u pacientů a AMI (*Ota et al.*) (50)

Ishii et al. (51) zjišťovali účinnost nicorandilu u pacientů se stresovou hyperglykemií při AMI, kterým byl nicorandil podán před reperfúzí. U těchto pacientů došlo k signifikantnímu zlepšení epikardiálního krevního průtoku a prevenci výskytu závažného mikrovaskulárního reperfúzního poškození. Celkově se zlepšila prognóza těchto pacientů.

Dále se zkoumá vliv **cyclosporinu**, který při intravenózním bonusu těsně před PCI inhibuje otevření mitochondriálních PTP. (4)

Stejný účinek se zkoumá u **sanglifehrinu A**, který na zvířecích modelech redukuje velikost infarktu až o 50%.(4)

Zjišťuje se možnost využití **papaverinu**, hlavně v redukci „no-reflow“.

Značný počet studií se věnoval přínosu i.v. podávaných **infuzních roztoků glukózy s inzulinem a s kaliem** při reperfuzi. Myokard v průběhu ischemie pravděpodobně využívá více glukózu než neesterifikované mastné kyseliny jako metabolický zdroj energie. Ale nejnovější EBM studie neprokázaly kardioprotektivní efekt a to ani v případech, kdy byly infuze zahájeny ještě před PCI, dokonce již v průběhu přednemocniční neodkladné péče (studie IMMEDIATE).

Proč podání **magnézia** i.v. v průběhu reperfúze vede ke zmenšení ložiska infarktu myokardu, není patofyziologicky vysvětleno.

Mnoho studií prokazuje zvýšení účinku v prevenci reperfúzního poškození při terapii kombinací různých z výše uvedených prostředků.

2.2 Nefarmakologické možnosti

2.2.1 Epizody krátkodobé ischemie

Ischemický preconditioning (Pre-con) je adaptivní odpověď na krátkodobě působící opakovanou ischemii působící před vznikem dlouhotrvající koronární okluze.

Ischemický postconditioning (Post-con) naproti tomu využívá opakovaných krátkodobých epizod ischemie v průběhu časné reperfúze.

Bylo zjištěno, že efektivnost obou přístupů je srovnatelná. Pro klinickou praxi má větší význam ischemický postconditioning.

Hlavními mechanismy, na kterých je založena účinnost obu metod je aktivace RISK a naopak se inhibice otevření kanálů PTP.

V roce 1986, *Murry et al.* (52) poprvé přišly s konceptem **ischemického preconditioningu**, kdy opakované krátké epizody ischemie ochrání myokard před důsledky následného dostatečně dlouhého ischemického infarktu. Bylo zjištěno, že díky Pre-con lze zmenšit velikost infarktu, ochránit vaskulární endoteliální funkce, snížit akumulaci neutrofilů a redukovat apoptózu. Prokázala se i možnost tímto postupem omezit výskyt patofyziologických důsledků (např. arytmie, infarkt) ischemicko-reperfúzního poškození, avšak klinické využití této kardioprotektivní metody je limitováno nemožností předpovědět vznik ischemie.

Zhao et al. (53) v roce 2003 zjistili, že postupná obnova koronárního průtoku v prvních 30 minutách reperfúze po předchozí okluzi redukuje velikost infarktu i defekty v perfúzi myokardu. Ve své studii použili psích modelů a vyzkoušeli výhodný postup přerušované mírné reperfúze s třemi cykly po 30 sekundách ve střídání s opakovanou ischemií – **ischemický postconditioning**, aby ověřili účinnost na redukcii reperfúzního poškození. Prokázali zmenšení rozsahu infarktu, tkáňového edému a postischemické endoteliální dysfunkce v ohrožené oblasti srovnatelné s efektem Pre-con. Pro klinické využití je tato metoda vhodnější, protože začátek perfúze je předpověditelný a je pod kontrolou lékaře.

2.2.2 Regionální hypotermie

Mnoho studií se věnuje vlivu hypotermie na rozsah infarktu a „no-reflow“. Léčebný účinek celotělové hypotermie s teplotou 33 – 35 °C je známý

v užití po neodkladné resuscitaci při náhlé srdeční zástavě. Příznivě tak je ovlivněn zejména návrat neuropsychických funkcí. Pro praktické využití v prevenci reperfúzního poškození se hledají možnosti, jak dosáhnout výhodnější regionální hypotermie.

Götberg et al. (54) na prasečích modelech dosáhli rychlé hypotermie kombinací aplikace chladného fyziologického roztoku a endovaskulárním chlazením. Hypotermie indukovaná před reperfúzí zredukovala velikost infarktu i tvorbu mikrovaskulárních obstrukcí. Pokud byla hypotermie indukována až se začátkem reperfúze, došlo také k redukci mikrovaskulárních obstrukcí, ale bez vlivu na velikost infarktu. Tyto efekty způsobené hypotermií významně zlepšují prognózu po prodělaném infarktu myokardu. Výhodou tohoto postupu je i fakt, že tím není pozdrženo užití PCI. Nevýhodou je naopak možnost vzniku levostranného srdečního selhání z přetížení aplikovanými infúzemi a vznik plicního edému.

Také *Hale et al.* (55) se v několika studiích věnovali této problematice. V jedné studii se věnovali vlivu regionální hypotermie, působící od pozdní fáze ischémie a trvající ještě dvě hodiny následné reperfúze, na „no-reflow“ fenomén. Podařilo se prokázat významnou redukci makroskopické oblasti „no-reflow“.

2.2.3 Mechanické protekce před mikroembolizacemi

Limbruno et al. (56) ve své studii testovali bezpečnost, realizovatelnost a efektivnost protektivní pomůcky **FilterWire-Ex (FW)**, která zabraňuje distální embolizaci a její využití jako součásti PCI. Tato pomůcka by pomohla zlepšit úspěšnost myokardiální reperfúze po PCI, která je limitována právě distální embolizací. Studie předpoklady potvrdila.

Carlino et al. (57) se zaměřili na zmenšení rizika embolizace v průběhu PCI na degenerovaném štěpu v. saphena za použití **PercuSurge GuardWire**. Výsledky této skupiny ukazují prospěšnost této pomůcky.

2.3 Alternativní možnosti

Spíše jen pro zajímavost, lze uvést některé alternativní možnosti jak zmenšit rozsah reperfúzního poškození.

Narang et al. (58) prokázali, že užívání **palmového oleje**, bohatého na mononenasyčené mastné kyseliny a antioxidanty, chrání srdce před oxidativním stresem spojeným s reperfúzním poškozením.

Banerjee et al. (59) zjistili, že chronické podávání **česneku** chrání před oxidativním stresem a s ním spojenými ultrastrukturálními změnami, které vznikají v souvislosti s reperfúzním poškozením.

Emblica officinalis je nízký strom. Její plody obsahují vitamín C a aminokyseliny (zejména kyselinu glutamovou, asparagovou, alanin a prolin) ve velkém množství. Dále obsahuje třísloviny (emblicaniny A a B, puniglukonin, pedunculagin), cukry a minerály (chrom, zinek, měď). *Rajak et al.* (60) ve studii zjistili, že chronické podávání chrání srdce před oxidativním stresem během ischémie/reperfúze.

Podobné účinky byly zjištěny také např. u **Hibiscus rosa sinensis** (Chinese rose) a kůry z **Terminalia arjuna**.

Akupunktura je další alternativní možností. *Gao et al.* (61) prokázali, že pomocí elektro-akupunktury, bilaterálně v Neiguan akubodech (PC6), lze docílit kardioprotektivního efektu, který chrání myokard před reperfúzním poškozením.

DISKUSE A ZÁVĚR

Reperfúzní poškození je fenomén, ke kterému dochází po znovuoobnovení krevního průtoku okludovanou koronární cévou a značně se podílí na výsledném rozsahu poškození myokardu, jež je způsobeno předešlou ischemií. Tento fenomén snižuje profit u pacientů s akutním infarktem myokardu s ST-elevacemi z mechanické reperfúzní léčby. Je snahou současné medicíny najít způsob, jak tomuto jevu zabránit a ještě vylepšit výsledky již tak úspěšné primární PCI.

Přestože jsou mechanismy vzniku reperfúzního poškození již dlouhou řadu let předmětem zkoumání, nelze zcela přesvědčivě říci, že jsou všechny rozpoznány. Je ale zřejmé, že se tyto mechanismy navzájem ovlivňují. Za hlavní dva mediátory se celkem jednotně považuje působení volných kyslíkových radikálů a neutrofilů. I zde lze nalézt propojení, protože neutrofilů mimo jiné uvolňují volné kyslíkové radikály a naopak kyslíkové radikály (jež vznikají více způsoby) ovlivňují funkce neutrofilů.

Znalost mechanismů podílejících se na vzniku reperfúzního poškození je důležitá, neboť jejich ovlivněním zabráníme vzniku reperfúzního poškození nebo ho alespoň minimalizujeme. Protože jsou tyto mechanismy různorodé, bylo v mnohých studiích prokázáno, že působením na několik z nich současně, můžeme dosáhnout většího terapeutického efektu.

Většina studií, které zjišťovaly efektivnost jednotlivých způsobů prevence reperfúzního poškození, byla provedena na zvířatech. Přesto lze předpokládat, že podobného kardioprotektivního účinku zkoušených léků bude dosaženo i u lidí, což již některé klinické studie potvrdily.

U některých léčebných postupů přinesly výsledky provedených studií zcela rozporuplné závěry. Příkladem mohou být studie zjišťující efekt SOD nebo adenosinu. Příčinou těchto výsledků mohou být různorodé faktory: odlišnosti živočišných druhů, množství kolaterál, trvání ischemie, načasování aplikace léků, dostatečná dávka léku, metody aplikace léků a rozdílné důsledky kardioprotekce (velikost infarktu, funkce myokardu, endoteliální funkce nebo arytmie). Také

nelze opomenout interindividuální variabilitu a rozdílnou techniku měření velikosti infarktového ložiska.

Dalším podstatným momentem, který může zapříčinit rozporupnost výsledků, jsou přidružené rizikové faktory ICHS. U zvířecích modelů nejsou většinou přítomny a vytváří se tak rozdílné podmínky pro působení zkoušených přípravků. Patří sem hypertenze, hyperlipidémie, diabetes, insulínová rezistence, ateroskleróza a obezita, ale také věk. Všechny tyto faktory mohou přispívat ke vzniku reperfúzního poškození a ovlivňují odpověď na kardioprotektivní intervence. Je potřeba brát v úvahu i případné lékové interakce.

Podstatné je při volbě účinné prevence myslet i na možnost její klinické realizace. Příkladem lze uvést omezené využití preconditioningu, protože nástup ischemie lze predikovat jen velmi těžko, narozdíl od začátku reperfúze, která probíhá pod kontrolou lékaře v případě postconditioningu.

Závěrem je třeba připomenout, že reperfúzní poškození vzniká v souvislosti s terapií AIM, a proto nejlepší prevencí je prevence vzniku samotného infarktu myokardu. Reperfúzní poškození vzniká na podkladě působení více mechanismů. Mnoho studií se zabývá prokazováním kardioprotektivního účinku některých léků. Účinnost lze zvýšit kombinací několika preparátů. Přesto nelze v současné době říci, kterým prostředkům dát přednost. Některé jsou velmi slibné jako např. scavengery kyslíkových radikálů statiny, inhibitory neutrofilů, ACEI a ischemický postconditioning. Bude potřeba dalších studií a výzkumů, aby se našly nejučinnější kombinace léků a postupů a bylo možno stanovit doporučený postup v prevenci reperfúzního poškození.

SOUHRN

Koronární choroba srdeční je vedoucí příčinou všech úmrtí v České republice i na světě. V České republice je okolo 91 359 pacientů v péči praktického lékaře pro akutní infarkt myokardu. Metodou první volby v léčbě akutního infarktu myokardu s ST-elevacemi je primární perkutánní koronární intervence, která zajistí časnou a úspěšnou reperfúzi. Je nejefektivnější metodou v redukci velikosti infarktu myokardu a podílí se na zlepšení klinických výsledků. Přesto proces obnovy krevního průtoku v oblasti ischemického myokardu může způsobit poškození. Tento fenomén, označovaný jako reperfúzní poškození, tak paradoxně může snížit prospěšný efekt myokardiální reperfúze. Poškození vzniklé reperfúzí můžeme rozdělit na 4 typy: omráčený myokard, reperfúzní arytmie, no-reflow fenomén a letální reperfúzní poškození. Mnoho faktorů se podílí na vzniku reperfúzního poškození. Mezi hlavní mechanismy jeho vzniku patří působení volných kyslíkových radikálů a neutrofilů. Poznání různorodých mechanismů, které přispívají k rozvoji reperfúzního poškození umožňuje zkoumat kardioprotektivní účinek u mnoha farmakologických přípravků. Patří sem vychytávače volných kyslíkových radikálů, inhibitory neutrofilů, statiny, ACEI a další. Dalšími možnostmi, jimiž lze dosáhnout redukce poškození způsobeného reperfúzí, jsou nefarmakologické metody (např. ischemický pre- a postconditioning, hypotermie, mechanické protekce před mikroembolizacemi) a alternativní metody (palmový olej, akupunktura).

SUMMARY

Coronary heart disease is the leading cause of death both in the Czech Republic and worldwide. About 91 359 patients are in charge of practitioner due to acute myocardial infarction in the Czech Republic. After an acute myocardial infarction with ST elevation, early and successful myocardial reperfusion with the use of primary percutaneous coronary intervention (PCI), as first choice, is the most effective strategy for reducing the size of a myocardial infarct and improving the clinical outcome. The process of restoring blood flow to the ischemic myocardium, however, can induce injury. This phenomenon, termed myocardial reperfusion injury, can paradoxically reduce the beneficial effects of myocardial reperfusion. Myocardial reperfusion leads to 4 types of cardiac dysfunction: myocardial stunning, reperfusion arrhythmias, no-reflow phenomenon and lethal reperfusion injury. Many factors may contribute to the reperfusion injury. The principal mechanisms of myocardial reperfusion injury are oxygen free radicals and neutrophils. On the basis of the multiplicity of mechanisms that seem to be involved in the creation of reperfusion injury, a number of pharmacological agents have been investigated for their cardioprotective effect. These include oxygen free radicals scavengers, inhibitors of neutrophils, statins, ACEI and others. Another injury-limiting interventions are nonpharmacological (i.e. ischemic pre- and postconditioning, hypothermia, mechanical device for prevention of microembolisation) and alternative (i.e. palm oil, acupuncture).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Widimsky, P. Reperfusion damage or no-reflow damage in primary coronary interventions in acute myocardial infarction? *Eur Heart J*, 2002; vol.23, no. 14, p.1076-1078.
2. ÚZIS: Zdravotnická ročenka ČR 2006 [on-line], ÚZIS Praha 2007, [2008-05-20] Dostupné z: www.uzis.cz/download_file.php?file=3210
3. Aschermann et al. Reperfuční poškození. In *Kardiologie*. Praha: Galén, 2004. p. 604-605. ISBN 86-7262-296-0
4. Yellon, DM., Hausenloy, DJ. , Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.*, 2007, vol. 357, no. 11, p. 1121-1135.
5. Rydén, L., Sjöquist, PO., Wang QD. Pharmacological tools for the limitation of myocardial reperfusion injury. *Eur Heart J Supplements*, 2001, vol. 3 (Suppl C), p. C28-C35.
6. Ambrosio, G., Tritto I. Myocardial reperfusion injury. *Eur Heart J Supplements*, 2002, vol.4 (Suppl B), p. B 28-B 30.
7. Wang, QD. Pharmacological possibilities or protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 2002, vol. 55, p. 25-37.
8. Reffelmann T., Kloner RA. The „no-reflow“ phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart*, 2002, vol. 87, p. 162-168.
9. Ambrosio, G. et al. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*, 1989, vol. 80, p. 1846-1861.
10. Przyklenk, K., Kloner, RA. “Reperfusion injury“ by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxid dismutase plus katalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. *Circ Res*, 1989, vol. 64, p. 86-96.
11. Kloner, RA., Ganote CE., Jennings, RB. The „no-reflow“ phenomenon after temporary coronary occlusion in dogs. *J Clin Invest*, 1974, vol. 54, p. 1496- 1508.
12. Topol EJ., Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation*, 2000, vol. 101, p. 570-580.
13. Barter, GF., Burely DS. Reperfusion and calculated RISKS: pharmacological postconditioning of human myocardium. *British Journal of Pharmacology*, 2008, vol. 153, p. 1-3.
14. Hausenloy, DJ., Yellon, DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Failure Rev*, 2007, vol. 12, p. 217- 234.
15. Piper, HM., Abdallah Y., Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 2004, vol. 61, p. 365-371.
16. Burely, DS., Ferdinandy P., Barter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signalling. *Br J Pharmacol*, 2007, vol. 152, p. 855-869.

17. Jolly, SR. et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and katalase. *Circ Res*, 1984, vol. 54, p. 277- 285.
18. Hatori N. et al. Beneficial effects of coronary venous retroinfusion but not left atrial administration of superoxid dismutase on myocardial necrosis in pigs. *Eur Heart J*, 1991, vol. 12, p. 442-450.
19. Stewart, JR. et al. Prevention of free radical-induced myocardial reperfusion injury with allopurinol. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1985, vol. 90, p. 68-72.
20. Yoshiaru, K. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemia-reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts. *Circ J*, 2003, vol. 67, no. 9, p. 781-787.
21. DeBoer, DA., Clark, RE. Iron chelation in myocardial preservation after ischemia-reperfusion injury: the importance of pretreatment and toxicity. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1992, vol. 53, p. 412-418.
22. Altavilla, D. et al. IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxydant, inhibits activation of nuclear factor-kB and reduces the inflammatory response in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2000, vol. 47, p. 515-528.
23. Herzog, WR. et al. Short-term low dose intracoronary diltiazem administered at the onset of reperfusion reduces myocardial infarkt size. *Int J Cardiol*, 1997, vol. 59, p. 21-27.
24. Homeister, JW. et al. Combined adenosine and lidocaine administration limits myocardial reperfusion injury. *Circulation*, 1990, vol. 82, p. 595-608.
25. Tsao, PS. et al. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*, 1990, vol. 82, p. 1402-1412.
26. Werich, AS., Ma, XL., Lefer, AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*, 1992, vol.86, p. 279-288.
27. Wainwright, CL., Martorana, PA. Pirsidomine, a novel nitric oxide donor, suppresses ischemic arrhythmias in anesthetized pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, vol. 22, p. S44-S50.
28. Pabla, R. et al. Intracoronary nitric oxid improves postischemic coronary blod flow and myocardial contractile function. *Am J Physiol*, 1995, vol. 269, p. H1113-1121.
29. Wanatabe, T. et al. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarkt size in rats. *Circ Res*, 1991, vol. 69, p. 370-377.
30. Grover, GJ., Dzwonczyk, S., Parham, CS. The endothelin-1 receptor antagonist BQ- 123 reduces infarkt size in canine model of soronary occlusion and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1993, vol. 27, p. 1613-1618.
31. Wang, QD et al. Protective effects of non-peptid receptor antagonist bosentan on myocardial ischemic and reperfusion injury in the pig. *Cardiovasc Res*, 1995, vol. 29, p. 805-812.
32. Shimizu, M. et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade with candesartan protects the porcine myocardium from reperfusion-induced injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, vol. 32, p. 231-238.

33. Schwarz, ER. et al. Angiotensin II receptor antagonist EXP 3174 reduces infarct size comparable with enalaprilat and augments preconditioning in the pig heart. *Cardiovasc Druha Ther*, 1997, vol. 11, p. 687-695.
34. Preckel, B. et al. Influence of the angiotensin II AT receptor antagonist ibesartan on ischemia/reperfusion injury in the dog heart. *Basic Res Cardiol*, 2000, vol. 95, p. 404-412.
35. Liu, Y. et al. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, vol. 27, p. 883-892.
36. Liu, YH. et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest*, 1997, vol. 99, p. 1926-1935.
37. Linz, W. et al. Dose-dependent reduction on myocardial infarct mass in rabbits by the NHE-1 inhibitor cariporide (HOE 642). *Clin Exp Hypertens*, 1998, vol. 20, p. 733-749.
38. Gumina, RJ. Et al. A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion. *J pharmacol Exp Ther*, 1998, vol. 286, p. 175-183.
39. Mocanu, MM., Barter, GF., Yellon, DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, 2000, vol. 130, p. 197-200.
40. Lefer, DJ. Statins as potent antiinflammatory drugs. *Circulation*, 2002, vol. 106, p. 2041-2042.
41. Mensah, K. et al. 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? *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, vol. 45, no. 8, p.1287-1291.
42. Calvert, JW., Lefer, DJ. Statin therapy and myocardial no-reflow. *British Journal of Pharmacology*, 2006, vol. 149, p. 229-231
43. Zhao J-L., et al. Pretreatment with simvastatin reduced myocardial no-reflow by opening mitochondrial K_{ATP} channel. *Br J Pharmacol*, 2006, vol.149, p. 243-249.
44. Mudalagiri, NR. et al. Erythropoietin protects the human myocardium against hypoxia-reoxygenation injury via PI3-kinase and ERK1/2 activation. *Br J Pharmacol*, vol. 153, p. 50-56
45. Bose, AK. et al. Glucagon-like Peptide 1 Can Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Diabetes*, 2005, vol. 54, p. 146-151.
46. Nikolaidis, LA. et al. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction After Successful Reperfusion. *Circulation*, 2004, vol.109, p. 962-965.
47. Sangawa, K. et al. Atrial natriuretic peptide protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Ann Thorac Surg*, 2004, vol. 77, p. 233-237.

48. Maioli, M. et al. Randomized Early Versus Late Abciximab in Acute Myocardial Infarction Treated With Primary Coronary Intervention (RELAX-AMI Trial). *J Am Coll Cardiol*, 2007, vol. 49, p. 1517-1524.
49. Capmbell, B. Cardioprotective effects of abciximab (ReoPro(R)) in an isolated perfused rat heart model of ischemia and reperfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1999, vol.21, no. 8, p. 529.
50. Ota, S. et al. Impact of nicorandil to prevent reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction: Sigmart Multicenter Angioplasty Revascularization Trial (SMART). *Circ J*, 2006, vol. 70, no. 9, p. 1099-1104.
51. Ishii, H. et al. Effects of Intravenous Nicorandil Before Reperfusion for Acute Myocardial Infarction in Patients With Stress Hyperglycemia, *Diabetes Care*, 2006, vol. 29, p. 202-206.
52. Murry, CE. et al. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, vol.74, no. 5, p. 1124-36.
53. Zhao, ZQ. Et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, vol. 28, p. H579-H588.
54. Götberg, M. et al. Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2008, vol. 8: 7
55. Hale, SL. et al. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2003, vol.59, no. 3, p. 715-722.
56. Limbruno, U. et kol. Mechanical Prevention of Distal Embolization During Primary Angioplasty. Safety, Feasibility, and Impact on Myocardial Reperfusion. *Circulation*, 2003, vol. 108:171
57. Carlino, M. et al. Prevention of Distal Embolization During Saphenous Vein Graft Lesion Angioplasty . Experience With a New Temporary Occlusion and Aspiration System . *Circulation*, 1999, vol. 99, p. 3221-3223.
58. Narang, D. et al. Effect of dietary palm olein oil on oxidative stress associated with ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. *BMC Pharmacol*, 2004, vol. 4, no. 1, p. 29.
59. Banerjee, SK. et al. Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC Pharmacol*, 2002, vol. 2:16.
60. Rajak, S. et al. Emblica officinalis causes myocardial adaptation and protects against oxidative stress in ischemic-reperfusion injury in rats. *Phytother Res*, 2004, vol. 18, no.1, p. 54-60.
61. Gao, J. et al. Acupuncture pretreatment protects heart from injury in rats with myocardial ischemia and reperfusion via inhibition of the β_1 -adrenoceptor signaling pathway. *Life Science*, 2007, vol. 80, no. 16, p. 1484-1489
62. Jennings, RB. et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Patology*, 1960, vol. 70, p. 68-78.