



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΒΛΑΒΗ ΕΞ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

Γεώργιος Ν. Χατζηαθανασίου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
Β' ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΒΛΑΒΗ ΕΞ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

Γεώργιος Ν. Χατζηαθανασίου

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα»

Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2
(Νομική Κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Χατζηαθανασίου Γεωργίου: 28-9-2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 424^α/9-1-2001

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σιδεράς Δημήτριος, Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη

Γουδέβενος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Μιχάλης Λάμπρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-1-2001

«Βλάβη εξ επαναιματώσεως και προστασία με τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών. Πειραματική μελέτη»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 788^α/31-5-2016

1. Σιδεράς Δημήτριος, Ομότιμος Καθηγητής Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γουδέβενος Ιωάννης, Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Κατσούρας Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μηλιώνης Χαράλαμπος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Νάκα Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κοραντζόπουλος Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-9-2016

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΔΟΥ ΜΑΡΙΑ

***Στη συζυγό μου Στέλλα,
και στις κόρες μου Κατερίνα, Μαρία και Ειρήνη***

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η **ισχαιμία**, δηλαδή η παροχή αίματος στους ιστούς, η οποία είναι μικρότερη από τις ανάγκες τους, είναι συχνό φαινόμενο στην κλινική πράξη, ενώ οι παθολογικές καταστάσεις που οφείλονται σε ισχαιμία έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη θνητότητα και τη νοσηρότητα.

Η αποκατάσταση επαρκούς αιματικής ροής στους ισχαιμικούς ιστούς λέγεται **επαναιμάτωση** και όταν είναι έγκαιρη, μπορεί να οδηγήσει στην μερική ή πλήρη αποκατάσταση της λειτουργίας τους και στην αποφυγή ή στον περιορισμό της έκτασης και της βαρύτητας της ιστικής βλάβης. Οι κλινικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ισχαιμία και επαναιμάτωση (πχ έμφραγμα μυοκαρδίου, καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο) είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην καθημερινή ιατρική πράξη. Με την πρόοδο της ιατρικής έχει καταστεί δυνατή η επαναιμάτωση σε πολλές περιπτώσεις ισχαιμίας, χρησιμοποιώντας φαρμακευτικές ή επεμβατικές μεθόδους¹.

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, τόσο σε επίπεδο πρόληψης, όσο και σε επίπεδο θεραπείας, καθώς είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και νοσηρότητας στο δυτικό κόσμο. Μολονότι εξαιτίας κυρίως της έμφρασης που έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην πρόληψη μέσω της ενημέρωσης του κοινού για την ανάγκη αντιμετώπισης των παραγόντων κινδύνου των καρδιαγγειακών νοσημάτων έχει μειωθεί η επίπτωση των εμφραγμάτων, το πρόβλημα παραμένει συχνό. Η καρδιαγγειακή νόσος παραμένει η συχνότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, αφού ευθύνεται περίπου για το 29 % της συνολικής θνητότητας παγκοσμίως, με το οξύ έμφραγμα να είναι η αιτία για μεγάλο ποσοστό αυτών των θανάτων^{2,3}.

Επιπλέον, η βελτίωση των μεθόδων θεραπείας με τη δημιουργία των καρδιολογικών μονάδων εντατικής θεραπείας, την έγκαιρη επαναιμάτωση (η οποία σε αρκετά κέντρα γίνεται πλέον με την πρωτογενή αγγειοπλαστική), αλλά και με την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή, έχει βελτιώσει σημαντικά την έκβαση αυτών των ασθενών. Εξακολουθεί όμως να υπάρχει ακόμη αξιόλογο ποσοστό θνητότητας και επιπλοκών^{2,3}.

Πολύ σημαντικός παράγοντας για την πρόγνωση του ασθενούς που έχει υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι η **έκταση της περιοχής της μυοκαρδιακής νέκρωσης**. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η έκταση, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα θνητότητας και καρδιακής ανεπάρκειας καθώς και η συχνότητα εμφάνισης αρρυθμιών².

Η έκταση της περιοχής της μυοκαρδιακής νέκρωσης έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνεται από την έγκαιρη επαναιμάτωση, η οποία αποτελεί σήμερα την ουσιαστικότερη θεραπευτική παρέμβαση, η οποία μειώνει τη θνητότητα και βελτιώνει την λειτουργία της αριστερής κοιλίας, τόσο πρώιμα όσο και μακροπρόθεσμα.. Η ίδια η επαναιμάτωση όμως φαίνεται ότι προκαλεί σε κάποιο βαθμό βλάβη και νέκρωση μυοκαρδιακών κυττάρων και υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον προκειμένου να βρεθούν τρόποι περιορισμού της βλάβης από επαναιμάτωση².

Ειδικότερα, παρά την αναμφισβήτητη σωτήρια επίδραση της επαναιμάτωσης υπάρχουν ενδείξεις, ότι μέρος της τελικής μυοκαρδιακής βλάβης οφείλεται σε κάποια επιβλαβή φαινόμενα που συμβαίνουν στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Αυτό στηρίζεται σε πολλά πειραματικά και κλινικά δεδομένα που καταδεικνύουν ότι η επαναιμάτωση, ναι μεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωτηρία των ιστών από την καταστρεπτική επίδραση της ισχαιμίας, προκαλεί όμως παράλληλα και επιβλαβείς διεργασίες, που οφείλονται στην επιτάχυνση ορισμένων παθολογικών διεργασιών που έχουν προκληθεί από την ισχαιμία και σε άμεσες βλαπτικές επιδράσεις στα κύτταρα και τα οργανίδια τους. Αυτές οι επιβλαβείς διεργασίες είναι γνωστές με τον όρο, **«βλάβη από επαναιμάτωση»²**.

Οι βλάβες από επαναιμάτωση διακρίνονται σε αναστρέψιμες και μη αναστρέψιμες. Αναστρέψιμη μορφή βλάβης από επαναιμάτωση είναι το απόπληκτο μυοκάρδιο και οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Μη αναστρέψιμη βλάβη είναι η νέκρωση και η απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων². Αυτές οι διαταραχές μπορούν να ελαττωθούν ή να τροποποιηθούν με παρεμβάσεις κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Ασφαλώς το όφελος από την έγκαιρη επαναιμάτωση είναι πολύ μεγαλύτερο από τη λεγόμενη «βλάβη από επαναιμάτωση», αλλά ο περιορισμός της τελευταίας θα οδηγούσε σε μεγιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Η συχνότητα και η σημασία των κλινικών καταστάσεων, που χαρακτηρίζονται από ισχαιμία και επαναιμάτωση, καθιστά τη μελέτη των βιοχημικών και παθοφυσιολογικών διεργασιών, που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση, ένα επίκαιρο πεδίο έρευνας. Στόχος είναι η κατανόηση αυτών των διεργασιών στο βιοχημικό επίπεδο, προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη θεραπειάς, που θα περιορίζει την ιστική βλάβη και θα αποκαθιστά την ιστική λειτουργία κατά το μέγιστο δυνατό βαθμό.

Για την παθοφυσιολογία της βλάβης από επαναιμάτωση έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι μηχανισμοί, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η επίδραση ελευθέρων ριζών οξυγόνου, η διαταραχή της ενδοκυττάριας ομοιόστασης του ασβεστίου, η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (πρωτεϊνικών καναλιών στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων) και η ενεργοποίηση και μετανάστευση ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων στην επαναιματούμενη περιοχή^{4,5}.

Η έγκαιρη επαναιμάτωση αποτελεί αναμφισβήτητη προτεραιότητα στην αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος με ανάρπαση του τμήματος ST, προκειμένου να περιορισθεί η ισχαιμική βλάβη του μυοκαρδίου. Όμως, η έκταση, η σημασία και η αντιμετώπιση της βλάβης από επαναιμάτωση αποτελεί ακόμη πεδίο έρευνας. Η βλάβη από επαναιμάτωση έχει μελετηθεί εκτενώς, αλλά προς το παρόν δεν έχει ανακαλυφθεί κάποια πλήρως τεκμηριωμένη και κοινά αποδεκτή θεραπεία της, παρά το γεγονός ότι έχουν συντελεσθεί πρόοδοι στην κατανόηση της⁵.

Εκτός από τη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, οι **ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου**, αποτελούν ένα επιπλέον θέμα που αφορά την παρούσα μελέτη, στην οποία επιχειρήθηκε η φαρμακευτική εξουδετέρωσή τους, σε ένα πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Οι **ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου**, έχουν μελετηθεί εκτενώς και εξακολουθούν να αποτελούν πεδίο έρευνας, επειδή υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής τους σε παθογενετικούς μηχανισμούς που αφορούν, όχι μόνο στη βλάβη από επαναιμάτωση, αλλά και στη φλεγμονή και στην παθογένεση της αθηρωματικής νόσου⁶.

Σε πειραματικές μελέτες, αντιοξειδωτικές και άλλες ουσίες έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ελαττώνοντας την έκταση της βλάβης από επαναιμάτωση. Για πολλές όμως από τις δοκιμαζόμενες ουσίες υπάρχουν

αντικρουόμενα αποτελέσματα πειραματικών δοκιμών, με συνέπεια να μην υπάρχει βεβαιότητα για την αποτελεσματικότητά τους. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις τα ελπιδοφόρα στοιχεία που προκύπτουν από τις πειραματικές εργασίες δεν έχουν επιβεβαιωθεί από κλινικές μελέτες. Η δοκιμή **συνδυασμών ουσιών** με ενδεχόμενη συνεργική δράση στην προστασία του μυοκαρδίου από τη βλάβη από επαναιμάτωση, παρουσιάζει ενδιαφέρον, εφόσον είναι δυνατό ένας επιτυχής συνδυασμός να αυξήσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα^{7,8}.

Η παρούσα πειραματική μελέτη βασίσθηκε στις ενδείξεις που υπάρχουν για τη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Έτσι, ο φαρμακευτικός συνδυασμός που χρησιμοποιήθηκε, στοχεύει στην καταπολέμηση της επίδρασης των ελευθέρων ριζών κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Συγκεκριμένα, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) αποτελεί σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό παράγοντα, ενώ η δεσφεροξαμίνη μέσω της δέσμευσης του σιδήρου ελαττώνει την σιδηροκαταλυόμενη παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου, που είναι ιδιαίτερα τοξική για τους ιστούς. Η κάθε μία από αυτές τις ουσίες έχει δοκιμασθεί σε περιπτώσεις βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, αλλά ο συνδυασμός τους δεν έχει μελετηθεί επαρκώς⁹⁻¹³.

Στόχος της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι να ελεγχθεί αν η συνδυασμένη ενδοφλέβια έγχυση ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης (ως θεραπεία καταπολέμησης της επίδρασης των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου), μπορεί να επιδράσει προστατευτικά στο μυοκάρδιο που υποβάλλεται σε επαναιμάτωση μετά από περίοδο ισχαιμίας. Ως πειραματόζωο προτιμήθηκε ο χοίρος, λόγω των ανατομικών ομοιοτήτων που παρουσιάζει η καρδιά του με την ανθρώπινη, ιδιαίτερα αναφορικά με την κατανομή των στεφανιαίων αρτηριών και την έλλειψη παράπλευρης κυκλοφορίας στο στεφανιαίο δίκτυο^{14,15}.

Σε χοίρους που υποβάλλονταν σε ισχαιμία του μυοκαρδίου, με απόφραξη της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας διάρκειας 45 λεπτών, ακολουθούμενη από επαναιμάτωση διάρκειας 3,5 ωρών, έγινε ενδοφλέβια έγχυση ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης στα τελευταία 5 λεπτά της ισχαιμίας και στα πρώτα 2 λεπτά της επαναιμάτωσης. Η έναρξη της έγχυσης γινόταν 5 λεπτά πριν από την επαναιμάτωση, ώστε να υπάρχει ήδη επαρκής

συγκέντρωση των δύο φαρμάκων στο αίμα στην αρχή της επαναιμάτωσης. Στην ομάδα ελέγχου, που υποβαλλόταν, επίσης, στο ίδιο πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, γινόταν κατά το ίδιο χρονικό διάστημα χορήγηση ισόποσου διαλύματος φυσιολογικού ορού, χωρίς φαρμακευτική ουσία (placebo). Μεταξύ αυτών των δύο ομάδων πειραματοζώων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση διαφόρων παραμέτρων που εκφράζουν τη βλάβη του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση^{16,17}.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, έγινε προσπάθεια να ερμηνευθούν στα πλαίσια της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για την βλάβη του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση, τους υπεύθυνους παθογενετικούς μηχανισμούς και τις μέχρι σήμερα διαφαινόμενες προοπτικές για τη θεραπευτική της αντιμετώπιση. Έτσι, έγινε μία λεπτομερής ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας από την οποία προκύπτει η διαπίστωση, ότι αφενός έχει συντελεσθεί μεγάλη πρόοδος στη μελέτη της παθοφυσιολογίας και της βιοχημείας της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, αφετέρου το θέμα αποτελεί ένα ενεργό πεδίο έρευνας, επειδή υπάρχουν ακόμη πολλά αδιευκρίνιστα, ακόμα και αντιφατικά, σημεία.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Καρδιολογίας κ Λάμπρο Μιχάλη ο οποίος μου έκανε την τιμή να μου αναθέσει την εκπόνηση μίας μελέτης, η οποία αφορά ένα από τα πεδία της δικής του μακρόχρονης επιστημονικής έρευνας, αλλά και ένα διεθνώς εξελισσόμενο πεδίο έρευνας, αυτό της βλάβης του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά και για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση αυτής της μελέτης, για τη μετάδοση της εμπειρίας του στη διαδικασία διεξαγωγής μίας επιστημονικής μελέτης και επειδή ήταν και παραμένει πάντοτε διαθέσιμος να μου μεταδώσει τη γνώση και την εμπειρία του. Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους καθηγητές Καρδιολογίας, κκ Λάμπρο Μιχάλη και Ιωάννη Γουδέβενο και για τη γενικότερη επιστημονική βοήθεια και εκπαίδευση που μου παρείχαν, στη συνολική επιστημονική μου συγκρότηση ως καρδιολόγου. Αμφότεροι είχαν πάντοτε την καλή διάθεση να απαντούν στις απορίες και τους

προβληματισμούς μου και να μεταδίδουν τη γνώση τους. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω τη συμπαράσταση του κ Γουδέβενου, ο οποίος με υπομονή μου μετέδωσε την εμπειρία του σε πολλούς τομείς της κλινικής και της ερευνητικής καρδιολογίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ομότιμο Καθηγητή Καρδιολογίας Δημήτριο Σιδερά, ο οποίος με την ορθολογιστική του προσέγγιση και την ευρύτητα της γνώσης του με επηρέασε βαθύτατα στον τρόπο με τον οποίο προσεγγίζω την ιατρική γενικότερα και μου ενέπνευσε την αμερόληπτη αναζήτηση της ιατρικής γνώσης.

Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας κ Χρήστο Κατσούρα για την πολύτιμη συμμετοχή και τη βοήθειά του στην πειραματική εργασία, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αικατερίνη Νάκα για τη συμπαράσταση και την διαρκή ενθάρρυνση, τον Καρδιολόγο κ Νικόλαο Καζάκο (σήμερα Επιμελητή ΜΕΘ Νοσοκομείου Άρτας) ο οποίος επίσης είχε συμμετοχή στη διεξαγωγή της πειραματικής μελέτης, με την πολύτιμη συμβολή του στη μέθοδο προσδιορισμού της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής και την κα Δήμητρα Νιόκου, αναισθησιολόγο για την ακούραστη και πολύτιμη βοήθειά της.

Ενεργός ήταν και η συμπαράσταση του Καθηγητή Ιατροδικαστικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ Θεόδωρου Βουγιουκλάκη, που ήταν πάντοτε πρόθυμος να μας παράσχει κάθε βοήθεια και της ειδικής χημικού του τμήματος Ιατροδικαστικής, κας Βασιλικής Μπούμπα, η οποία βοήθησε ενεργά με την παρασκευή των χημικών διαλυμάτων TTC και Evans Blue, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και με συγκίνησε με την φιλική συνεργασία και την υποστήριξή της. Τους ευχαριστώ θερμά για την ουσιαστική και πολύτιμη βοήθειά τους.

Η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συμμετοχή του φίλου και εκλεκτού συναδέλφου κ Δημήτριου Νίκα, σήμερα Επιμελητή της Α΄ Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η βοήθεια του φίλου Δημήτρη ήταν ανεκτίμητη, συμμετείχε ενεργά σε όλες τις φάσεις της διεξαγωγής αυτής της πειραματικής μελέτης και δεν θα ξεχάσω ποτέ την έμπρακτη συμπαράστασή του. Ένα «ευχαριστώ» είναι πολύ φτωχό για να αποδώσει τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου

[7]

για το φίλο και συνάδελφο που στάθηκε δίπλα μου σε όλες τις δύσκολες στιγμές και με την πολύτιμη συνεργασία του με βοήθησε σε αυτή την πειραματική μελέτη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	ΣΕΛ.
Πρόλογος	1
Ευχαριστίες	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εισαγωγή	15
Η ισχαιμία, η επαναιμάτωση και η κλινική τους σημασία	15
Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου	17
Κύριες πρόοδοι που έχουν γίνει στη μελέτη της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης	18
Ορισμός της βλάβης από επαναιμάτωση	20
Η σταδιακή πρόοδος της έρευνας για τη βλάβη από επαναιμάτωση, από την ανακάλυψή της μέχρι σήμερα	20
Εκδηλώσεις και σημασία της βλάβης από επαναιμάτωση	27
Παθογενετικοί μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης από ισχαιμία	29
Παθογενετικοί μηχανισμοί της βλάβης από επαναιμάτωση: Γενικά	33
Οι αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου και οι ελεύθερες ρίζες	35
Πως παράγονται οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου	37
Η επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και η γενικότερη σημασία τους	44
Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στη μετάδοση βιοχημικών σημάτων	46
Η εξάρτηση της επίδρασης των ελευθέρων ριζών από τη συγκέντρωσή τους	49
Μηχανισμοί προστασίας από τις ελεύθερες ρίζες- αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί	52
Επιστημονικές ενδείξεις για το ρόλο των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση	54
Η διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης των μυοκαρδιακών κυττάρων	56

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη βλάβη από επαναιμάτωση	57
Συμμετοχή των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση	61
Η επίδραση του συστήματος του συμπληρώματος	62
Η ελαττωμένη διαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου στη μικροκυκλοφορία	63
Ο ρόλος της ενδοθηλίνης -1	64
Ο ρόλος του συστήματος της ρενίνης- αγγειοτασίνης	65
Οι επί μέρους διαταραχές που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί τους	66
Αρρυθμίες επαναιμάτωσης	67
Φαινόμενο της μη επανόδου της αιματικής ροής, ή μη επαναρροή (non reflow phenomenon)	68
Απόπληκτο μυοκάρδιο	72
Κυτταρικός θάνατος	74
Διαφορές ανάμεσα στα πειραματόζωα και τους ανθρώπους	83
Σύντομη ανασκόπηση – ο σκοπός της παρούσας μελέτης	85
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Υλικά και μέθοδοι	91
Γενική περιγραφή του πειραματικού πρωτοκόλλου και των αρχών, βάση των οποίων διαμορφώθηκε	91
Η προετοιμασία του πειραματόζωου και η πειραματική μέθοδος πρόκλησης ισχαιμίας και επαναιμάτωσης	93
Οι ομάδες των πειραματόζωων ανάλογα με τη χορηγούμενη θεραπεία	96
Η καταγραφή των κοιλιακών αρρυθμιών και των αιμοδυναμικών παραμέτρων	97
Προσδιορισμός της έκτασης της περιοχής μυοκαρδίου σε κίνδυνο και της περιοχής της μυοκαρδιακής νέκρωσης	99
Στατιστική ανάλυση	103

Αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων	103
Αποτελέσματα	123
Συζήτηση	129
Περιορισμοί	149
Συμπεράσματα	151
Περίληψη	155
Περίληψη στην Αγγλική γλώσσα	157
Βιβλιογραφία	159

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ισχαιμία, η επαναιμάτωση και η κλινική τους σημασία

Ισχαιμία, ονομάζεται η ελαττωμένη παροχή αίματος στους ιστούς, η οποία είναι μικρότερη από τις ανάγκες τους, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχής στις βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων και στη λειτουργία τους. Αν η ισχαιμία είναι σοβαρή και η διάρκειά της υπερβαίνει κάποιο χρονικό διάστημα, το οποίο εξαρτάται και από το είδος του ιστού, τότε επέρχονται και αλλοιώσεις στη μικροσκοπική και μακροσκοπική δομή των ιστών^{1,4}.

Η αποκατάσταση επαρκούς αιματικής ροής στους ιστούς μετά από μία περίοδο ισχαιμίας λέγεται **επαναιμάτωση**. Παραδείγματα καταστάσεων με αλληλουχία ισχαιμίας και επαναιμάτωσης αποτελούν: 1) το έμφραγμα του μυοκαρδίου στο οποίο εφαρμόζεται θρομβόλυση ή πρωτογενής αγγειοπλαστική, 2) οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με καρδιοπνευμονική παράκαμψη, 3) το ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, όταν πραγματοποιείται θρομβόλυση, ή συμβαίνει αυτόματη λύση του θρόμβου από το ενδογενές θρομβολυτικό σύστημα του οργανισμού και 4) η εμβολή αρτηρίας ενός άκρου, όταν αντιμετωπισθεί με χειρουργική αφαίρεση του θρόμβου^{1,4}.

Έμφαση τα τελευταία χρόνια δίνεται στις περιπτώσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, που έχουν σχέση με το μυοκάρδιο, χρησιμοποιώντας το γενικό τίτλο **καρδιοπροστασία**. Η καρδιοπροστασία περιλαμβάνει συνθήκες και θεραπευτικές παρεμβάσεις που περιορίζουν την έκταση και τη βαρύτητα της μυοκαρδιακής βλάβης και ουσιαστικά αποτελεί το ζητούμενο της έρευνας⁸.

Η θεραπευτική αξία της επαναιμάτωσης με θρομβόλυση, ή πρωτογενή αγγειοπλαστική, είναι αποδεδειγμένη σε οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάσπαση του τμήματος ST (STEMI). Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, οποιαδήποτε από αυτές τις δύο μεθόδους επαναιμάτωσης, (με προτιμότερη την πρωτογενή αγγειοπλαστική όταν υπάρχει δυνατότητα) πρέπει να εφαρμόζεται το συντομότερο δυνατόν. Η επαναιμάτωση έχει ένδειξη εντός του πρώτου δωδεκάωρου από την έναρξη των συμπτωμάτων³.

Όσο νωρίτερα εφαρμόζεται η επαναιμάτωση, τόσο μεγαλύτερο είναι το θεραπευτικό όφελος. Πραγματικά, έχει αποδειχθεί ότι η έγκαιρη αποκατάσταση της στεφανιαίας αιμάτωσης είναι η πιο αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση για το έμφραγμα με ανάρσταση του διαστήματος ST (STEMI). Αν αυτό δεν επιτευχθεί εγκαίρως, τότε προκύπτει μεγαλύτερη έκταση του εμφράκτου (δηλαδή της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής) και αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης κοιλιακών αρρυθμιών, συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και θανάτου^{2,3}.

Η μέθοδος επαναιμάτωσης με τα καλύτερα αποτελέσματα είναι η πρωτογενής αγγειοπλαστική, υπό την προϋπόθεση ότι μπορεί να εφαρμοσθεί ταχέως (εντός διαστήματος 90 λεπτών από την προσέλευση του ασθενούς στο τμήμα εκτάκτων περιστατικών), σε κέντρο με έμπειρο προσωπικό. Οι πρόοδοι που έχουν συντελεσθεί στην τεχνική της διαδερμικής στεφανιαίας επέμβασης (PCI) και στη συνοδό φαρμακευτική θεραπεία, έχουν συμβάλει στην επίτευξη φυσιολογικής (TIMI-3) στεφανιαίας ροής στην αποφραχθείσα αρτηρία σε ποσοστό που προσεγγίζει το 95% των ασθενών, που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική. Ωστόσο, παρά την έγκαιρη επαναιμάτωση της σχετιζόμενης με το έμφραγμα αρτηρίας, παραμένουν δυσχέρειες στην αποκατάσταση της καλής λειτουργίας της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας και στην επίτευξη του μέγιστου δυνατού θεραπευτικού αποτελέσματος, ως προς τη σωτηρία του μυοκαρδίου^{2,3}.

Η επαναιμάτωση έχει μεγάλη θεραπευτική αξία και σε άλλες ισχαιμικές καταστάσεις, που δεν αφορούν την καρδιά. Ένα παράδειγμα αποτελεί η επαναιμάτωση μέσω θρομβόλυσης σε οξύ ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, που συχνά είναι σωτήρια, αν γίνει το συντομότερο δυνατόν, εντός των πρώτων τριών ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων και εφόσον έχει αποκλεισθεί με αξονική τομογραφία ενδεχόμενη ύπαρξη εγκεφαλικής αιμορραγίας και δεν υπάρχουν άλλες αντενδείξεις θρομβόλυσης¹⁸.

Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Η **ισχαιμική καρδιακή νόσος**, που προκύπτει από την σοβαρή στένωση ή απόφραξη ενός, ή περισσοτέρων, από τους μεγάλους κλάδους των στεφανιαίων αρτηριών, αποτελεί σήμερα τη συχνότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στις δυτικές κοινωνίες^{19,20}. Η οξεία απόφραξη μίας στεφανιαίας αρτηρίας είναι η αιτία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Το οξύ έμφραγμα μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια της καρδιακής αντλίας (καρδιακή ανεπάρκεια), εξαιτίας νέκρωσης τμήματος του καρδιακού μυός και της συνεπακόλουθης ελάττωσης της συσταλτικότητας και αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας²¹. Το μέγεθος της νεκρωτικής περιοχής (έμφρακτο) του μυοκαρδίου έχει άμεση σχέση με την πιθανότητα εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας και τη θνητότητα. Η καρδιακή ανεπάρκεια, της οποίας συχνή αιτία είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, αποτελεί μία αιτία θνητότητας και νοσηρότητας, της οποίας η συχνότητα παρουσιάζει σήμερα μεγάλη αύξηση. Η πιθανότητα εμφάνισης μετεμφραγματικής καρδιακής ανεπάρκειας είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του εμφράκτου²².

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, μπορεί, επίσης, να προκαλέσει την εμφάνιση σοβαρών αρρυθμιών (κοιλιακή ταχυκαρδία, κοιλιακή μαρμαρυγή), οι οποίες συχνά έχουν σαν αποτέλεσμα τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο^{2,3}.

Η ενδονοσοκομειακή θνητότητα από έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει ελαττωθεί τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της ανάπτυξης των καρδιολογικών μονάδων εντατικής θεραπείας, που άρχισαν να δημιουργούνται από το 1960 και μετά, καθώς επίσης και λόγω της μεταγενέστερης εξέλιξης των θεραπευτικών παρεμβάσεων, με την εισαγωγή της θρομβόλυσης και της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής. Υπάρχει όμως το πρόβλημα, ότι έχει αυξηθεί σημαντικά η νοσηρότητα από την καρδιακή ανεπάρκεια, που είναι συχνό επακόλουθο ενός εμφράγματος^{2,3}.

Μεταξύ των παθογενετικών μηχανισμών που μειώνουν την έκταση του διασωζόμενου μυοκαρδίου με τις σύγχρονες θεραπευτικές παρεμβάσεις στο οξύ έμφραγμα είναι η **βλάβη από επαναιμάτωση**. Η **βλάβη από επαναιμάτωση** περιλαμβάνει κάποιες βλαπτικές επιδράσεις στο μυοκάρδιο και στην μικροκυκλοφορία, που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της αποκατάστασης της αιματικής ροής στον ισχαιμικό ιστό^{5,22,23}.

Μία καλύτερη και πιο πλήρης διατύπωση του ορισμού της βλάβης από επαναιμάτωση είναι η παρακάτω: Η βλάβη από επαναιμάτωση περιλαμβάνει το σύνολο των διαταραχών στις βιοχημικές κυτταρικές διεργασίες και τη λειτουργία των ιστών, που δεν οφείλονται στην επίδραση της ισχαιμίας, αλλά σε βιοχημικές διαταραχές που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση. Αυτή η βλάβη προκαλεί κυτταρική δυσλειτουργία, απόπτωση και νέκρωση μυοκαρδιακών κυττάρων και συμμετέχει στην πρόκληση του φαινομένου της μη αποκατάστασης της ροής (no reflow), των αρρυθμιών επαναιμάτωσης και της απώλειας μέρους του μυοκαρδιακού ιστού⁵.

Κύριες πρόοδοι που έχουν γίνει στη μελέτη της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης

Ο πρώτος που έδωσε τον **ορισμό της καρδιακής ισχαιμίας** ήταν ο Γερμανός παθολογοανατόμος γιατρός Rudolf Virchow το 1858. Ο Virchow διατύπωσε τον ορισμό, ότι η ισχαιμία του μυοκαρδίου είναι η κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παροχής οξυγόνου στο μυοκάρδιο και των αναγκών του μυοκαρδίου σε οξυγόνο, έτσι ώστε η παροχή οξυγόνου να είναι μικρότερη από τις ανάγκες. Ως αιτία αυτής της διαταραχής, ανέφερε τη στένωση μίας στεφανιαίας αρτηρίας²³.

Στο δεύτερο μισό του εικοστού αιώνα οι επιστήμονες θεμελίωσαν την αντίληψη ότι **το μέγεθος του εμφράκτου**, δηλαδή το μέγεθος της περιοχής του μυοκαρδίου που υπέστη μόνιμη βλάβη (νέκρωση) εξαιτίας της οξείας ισχαιμίας, έχει σαφή σχέση με την πιθανότητα εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας και με τη θνητότητα. Όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση του εμφράκτου, τόσο μεγαλύτερη είναι η θνητότητα και η πιθανότητα εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας. Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση θεραπευτικών μεθόδων για τον περιορισμό της έκτασης της νέκρωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων στο έμφραγμα του μυοκαρδίου²³.

Σημαντική ήταν η εργασία των Reimer και συνεργατών, που πρώτοι εισήγαγαν την άμεση μέτρηση του μεγέθους του μυοκαρδιακού εμφράκτου σε πειραματικό μοντέλο ανοικτού θώρακα υπό γενική αναισθησία σε σκύλους. Μελέτες αυτού του είδους, που πραγματοποίησαν οι Reimer, Jennings και συνεργάτες, έδειξαν ότι το μέγεθος του εμφράκτου καθορίζεται από τη

διάρκεια της ισχαιμίας, την έκταση της παράπλευρης κυκλοφορίας και από το μέγεθος της αρχικής μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο, δηλαδή την έκταση της περιοχής του μυοκαρδιακού ιστού που υπέστη την ισχαιμία. Επίσης απέδειξαν ότι ο θάνατος των κυττάρων του μυοκαρδίου στο έμφραγμα αρχίζει από την υπενδοκαρδιακή περιοχή. Αρχίζει, δηλαδή, από την περιοχή που βρίσκεται εσωτερικά, κοντά στο ενδοκάρδιο και επεκτείνεται προοδευτικά με κατεύθυνση προς την υποεπικαρδιακή περιοχή, δηλαδή προς τα εξωτερικά στρώματα του μυοκαρδίου, που βρίσκονται κοντά στο επικάρδιο²³.

Οι μελέτες έδειξαν επιπλέον, ότι στο οξύ έμφραγμα **η έγκαιρη επαναιμάτωση** του ισχαιμικού μυοκαρδίου, με την άρση της απόφραξης της στεφανιαίας αρτηρίας, ελαττώνει σημαντικά την έκταση του νεκρωτικού μυοκαρδιακού ιστού. Αυτές οι διαπιστώσεις οδήγησαν στην εφαρμογή της θεραπείας επαναιμάτωσης, η οποία ξεκίνησε με τη λύση των θρόμβων στις στεφανιαίες αρτηρίες (θρομβόλυση), με τη χορήγηση του πρώτου θρομβολυτικού φαρμάκου, που ήταν η στρεπτοκινάση. Ακολούθησε η εισαγωγή στη θεραπευτική του οξέος εμφράγματος και άλλων θρομβολυτικών φαρμάκων, καθώς επίσης και της διαδερμικής αγγειοπλαστικής αλλά και της εγχείρησης αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Έτσι, διαμορφώθηκε η σημερινή αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος, που βασίζεται στις παραπάνω μεθόδους επαναιμάτωσης^{8,23}. Εξαιρούμενης της θεραπείας επαναιμάτωσης, οι περισσότερες φαρμακευτικές θεραπείες που εφαρμόζονται σε οξύ έμφραγμα στη διάρκεια της ισχαιμίας, έχουν αποτύχει να δείξουν μείωση της έκτασης της νέκρωσης του μυοκαρδίου⁸.

Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι ο βαθμός δυσλειτουργίας της μικροκυκλοφορίας σχετίζεται με την έκταση της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής, σαν συνέπεια του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η δυσλειτουργία της μικροκυκλοφορίας αποδίδεται 1) στην επίδραση μικροεμβόλων που προέρχονται από θρόμβο ή από τεμάχια της αθηρωματικής πλάκας και αποφράζουν τα μικρά αρτηρίδια παρασυρόμενα από τη ροή του αίματος, και 2) στην επίδραση ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, στην τοπική ελάττωση των αγγειοδιασταλτικών και στην επικράτηση των αγγειοσυσπαστικών ουσιών και στην ενεργοποίηση μηχανισμών φλεγμονής. Ο δεύτερος μηχανισμός οφείλεται σε βλάβη από επαναιμάτωση⁵.

Ορισμός της βλάβης από επαναιμάτωση

Η βλάβη από επαναιμάτωση ορίζεται ως το σύνολο των διαταραχών στις βιοχημικές κυτταρικές διεργασίες, στη λειτουργία και στη βιωσιμότητα των ιστών, που δεν οφείλονται στην επίδραση της ισχαιμίας, αλλά σε βιοχημικές διαταραχές που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση. Αυτή η βλάβη προκαλεί κυτταρική δυσλειτουργία, απόπτωση και νέκρωση μυοκαρδιακών κυττάρων και συμμετέχει στην πρόκληση του φαινομένου της μη αποκατάστασης της ροής (no reflow), του απόπληκτου μυοκαρδίου, των αρρυθμιών επαναιμάτωσης και της απώλειας μέρους του μυοκαρδιακού ιστού. Ουσιαστικά η βλάβη από επαναιμάτωση είναι το τίμημα που πληρώνουμε για να έχουμε τα αναμφισβήτητα οφέλη της επαναιμάτωσης του ισχαιμικού μυοκαρδίου και περιλαμβάνει ορισμένες επιδράσεις της επαναιμάτωσης που είναι επιβλαβείς για το μυοκάρδιο και για τη λειτουργία της μικροκυκλοφορίας^{4,5}.

Η σταδιακή πρόοδος της έρευνας για τη βλάβη από επαναιμάτωση, από την ανακάλυψή της μέχρι σήμερα

Η κατανόηση του μηχανισμού της βλάβης από επαναιμάτωση βασίζεται κυρίως στα αποτελέσματα πειραματικών μελετών, στις οποίες θεραπευτικές παρεμβάσεις που αναστέλλουν τη δράση διάφορων ουσιών και ενδιάμεσων μοριακών διαβιβαστών, ελάττωσαν την τελική έκταση της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου (έμφρακτο). Ο περιορισμός της τελικής βλάβης μετά από αναστολή της δράσης κάποιας ουσίας ή κάποιου παθοφυσιολογικού μηχανισμού αποτελεί ισχυρή ένδειξη, ότι η συγκεκριμένη ουσία ή ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός εμπλέκεται στην πρόκληση της βλάβης^{8,23}.

Σχετικά με το **ρόλο των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου** στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση, ήδη από το 1970 περίπου είχε διαπιστωθεί η μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση των ιστών. Μία από τις πρώτες σημαντικές πειραματικές μελέτες που έστρεψαν την προσοχή των ερευνητών στη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, για την πρόκληση βλάβης κατά την επαναιμάτωση (και

ουσιαστικά κατά την «επανοξυγόνωση») των ιστών, ήταν μία μελέτη του Hearse. Με βάση αυτή τη μελέτη, διατυπώθηκε η γενικότερη ιδέα της **παραδοξότητας του ρόλου του οξυγόνου (the oxygen paradox)**. Αυτή η παραδοξότητα συνίσταται στο γεγονός ότι ενώ είναι εντελώς απαραίτητο για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων, παράλληλα μπορεί να προκαλέσει και κάποιες βλαπτικές επιδράσεις, κατά την επανοξυγόνωση ιστού που προηγουμένως ήταν ανοξικός ή ισχαιμικός. Ο Hearse και οι συνεργάτες του υπέβαλλαν καρδιές ποντικών σε μία περίοδο υποξίας, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Κατά την επανατροφοδοσία με οξυγονωμένο διάλυμα οι καρδιές αυτές παρουσίασαν μία επίμονη παθολογική σύσπαση (contracture) και ελευθέρωσαν μεγάλες ποσότητες καρδιακών ενζύμων. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε σε βλάβη του μυοκαρδίου οφειλόμενη στην επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες μελέτες²³.

Μία σημαντική παράμετρος που προέκυψε από τις πειραματικές μελέτες που έγιναν για το φαινόμενο της βλάβης από επαναιμάτωση, είναι η **παράμετρος του χρόνου**. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση των μηχανισμών που ενέχονται στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση συμβαίνει μέσα στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης. Αυτό το γεγονός καθιστά αναγκαία την εφαρμογή των θεραπευτικών παρεμβάσεων, πολύ νωρίς, στην αρχή της επαναιμάτωσης^{22,23}.

Από τις **μελέτες σε πειραματόζωα** διαπιστώθηκε ότι ένα μέρος της τελικής μυοκαρδιακής βλάβης οφείλεται σε μηχανισμούς που ενεργούν κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Ωστόσο, δεν αμφισβητείται το γεγονός ότι η σωτήρια και επωφελής δράση της επαναιμάτωσης είναι σαφώς μεγαλύτερη από τη βλαπτική της επίδραση. Οι πειραματικές μελέτες έδειξαν επίσης, ότι υπάρχει δυνατότητα περιορισμού της βλάβης από επαναιμάτωση με την εφαρμογή ποικίλων φαρμακευτικών και μη φαρμακευτικών παρεμβάσεων. Αυτό είναι εφικτό σε διάφορα είδη πειραματοζώων. Στις πειραματικές μελέτες δοκιμάστηκαν διάφορες θεραπευτικές παρεμβάσεις που επιδρούν σε διαφορετικά στάδια των μηχανισμών, που πιθανώς εμπλέκονται στην παθογένεση της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Έτσι δοκιμάστηκαν σε πειραματικά μοντέλα θεραπευτικές παρεμβάσεις που

αναστέλλουν την υπερφόρτωση των κυττάρων με ασβέστιο, την παραγωγή και τη δράση των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, τις διεργασίες της φλεγμονής, τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), καθώς επίσης και ουσίες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των μυοκαρδιακών κυττάρων. Αρκετές από αυτές τις θεραπευτικές παρεμβάσεις έδειξαν αποτελεσματικότητα στα πειραματικά μοντέλα^{2,7}.

Ωστόσο, η πλειονότητα των **κλινικών μελετών** σε ανθρώπους δεν επιβεβαίωσε την καρδιοπροστατευτική επίδραση των διαφόρων θεραπευτικών παρεμβάσεων περιορισμού της βλάβης από επαναιμάτωση, για τις οποίες υπήρχαν ενθαρρυντικές ενδείξεις από τις πειραματικές μελέτες. Αυτό οδήγησε κάποιους ερευνητές στη διατύπωση αμφιβολιών για την κλινική σημασία της βλάβης από επαναιμάτωση στους ανθρώπους.

Ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν ισχυρά επιχειρήματα για την ύπαρξη και τη σημασία της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου στους ανθρώπους. Καταρχήν θα ήταν πολύ ασύνηθες για ένα βιολογικό φαινόμενο να είναι υπαρκτό σε τόσα διαφορετικά είδη ζώων, όπως έχει αποδειχθεί από τις πειραματικές μελέτες και να μην υπάρχει στους ανθρώπους. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η βλάβη από επαναιμάτωση είναι υπαρκτό φαινόμενο στους ανθρώπους και έχει κλινική σημασία. Ενδείξεις για αυτό το γεγονός παρέχουν και κάποιες πρόσφατες κλινικές μελέτες που έδειξαν ελάττωση της βλάβης του μυοκαρδίου στους ανθρώπους, με ορισμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις που γίνονταν κατά την επαναιμάτωση. Μια τέτοια περίπτωση είναι η μετα-ισχαιμική προστασία, δηλαδή η πρόκληση επαναλαμβανόμενων μικρών περιόδων ισχαιμίας μετά από το αρχικό κύριο ισχαιμικό επεισόδιο (ischemic postconditioning-IP). Η μετα-ισχαιμική προστασία είναι σημαντικό παράδειγμα παρέμβασης η οποία εξ ορισμού επιδρά αποκλειστικά στη διάρκεια της επαναιμάτωσης και έχει δείξει ότι προσφέρει καρδιοπροστασία. Η χορήγηση αδενοσίνης και η χορήγηση αναστολέων των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pores -MPTP) είναι δύο άλλα παραδείγματα θεραπευτικών παρεμβάσεων, που έδειξαν αποτελεσματικότητα κατά την επαναιμάτωση^{2,4,8}.

Σε ότι αφορά την αδενοσίνη, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση κατά την επαναιμάτωση και μάλιστα συμμετέχει

στο βιοχημικό μηχανισμό της καρδιοπροστασίας που παρέχεται από τη μετα-ισχαιμική προστασία, αλλά και από την ισχαιμική προετοιμασία ή ισχαιμική προπόνηση. Η καρδιοπροστατευτική επίδραση της αδενοσίνης υποστηρίχθηκε και από τα ευρήματα κάποιων κλινικών μελετών στις οποίες χορηγήθηκε αδενοσίνη σε ασθενείς κατά την επαναιμάτωση^{2,4,8}.

Οι περισσότερες κλινικές μελέτες που αφορούν στο φαινόμενο της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου εστιάζουν σε ασθενείς που επαναιματώνονται με πρωτογενή αγγειοπλαστική, (primary PCI) στα πλαίσια οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου. Κάποιοι φαρμακευτικοί παράγοντες που επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι προκαλούν καρδιοπροστατευτική δράση όταν χορηγηθούν κατά την αρχή της επαναιμάτωσης περιλαμβάνουν τις στατίνες, το νατριουρητικό πεπτιδίο των κόλπων, την ερυθροποιητίνη και κάποιους παράγοντες πολλαπλασιασμού (growth factors) όπως ο IGF-1 και ο FGF-2^{2,4}.

Νέους ορίζοντες στη μελέτη της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης άνοιξε η ανακάλυψη ενός μηχανισμού προστασίας του μυοκαρδίου από θανατηφόρα βλάβη, ο οποίος επενεργεί πριν από την έναρξη ενός σχετικά παρατεταμένου επεισοδίου ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός με την ονομασία **ισχαιμική προετοιμασία, ή ισχαιμική προπόνηση (ischemic preconditioning)** και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1986. Αποτελεί ανακάλυψη μεγάλης σημασίας για δύο λόγους: α) Έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές δυνατότητες για παρεμβάσεις καρδιοπροστασίας (περιορισμού της έκτασης και της βαρύτητας της μυοκαρδιακής βλάβης) σε περιπτώσεις σοβαρής μυοκαρδιακής ισχαιμίας ή εμφράγματος και β) αποτέλεσε αφορμή για τη διεξοδική έρευνα και ανακάλυψη βιοχημικών διεργασιών που συμβάλλουν στην προστασία του μυοκαρδίου και στον περιορισμό της τελικής βλάβης.

Ειδικότερα, το 1986 οι Reimer και Jennings εκπόνησαν μία σημαντική πειραματική μελέτη σε σκύλους. Διαπίστωσαν ότι τέσσερα επεισόδια ισχαιμίας πεντάλεπτης διάρκειας προσέφεραν σημαντική προστασία του μυοκαρδίου από επακόλουθη ισχαιμική περίοδο μεγαλύτερης διάρκειας (40 λεπτών). Οι Murry και συνεργάτες διαπίστωσαν μείωση του εμφράκτου, δηλαδή της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου, μετά από 40 λεπτά ισχαιμίας (από 29% σε 7%) όταν τα πειραματόζωα υποβάλλονταν προηγουμένως σε ισχαιμική προετοιμασία (ισχαιμική προπόνηση) δηλαδή σε

περιόδους ισχαιμίας βραχείας διάρκειας. Επομένως, η ισχαιμική προετοιμασία είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός, απέναντι στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση^{24,25}.

Διαπιστώθηκε ότι η **ισχαιμική προετοιμασία (ισχαιμική προπόνηση του μυοκαρδίου) αποτελείται από δύο ξεχωριστές φάσεις**. Η πρώτη φάση εμφανίζεται πολύ νωρίς (εντός λίγων λεπτών) από την ισχαιμική προετοιμασία. Η προστατευτική επίδραση αυτής της φάσης έχει διάρκεια 1-2 ωρών. Η δεύτερη φάση της ισχαιμικής προετοιμασίας επέρχεται πιο σταδιακά, δηλαδή μετά από 12-24 ώρες, αλλά έχει πολύ μεγαλύτερη διάρκεια (3-4 ημερών). Αυτές οι δύο φάσεις έχουν διαφορετικούς υποκείμενους μηχανισμούς. Η πρώτη φάση της ισχαιμικής προετοιμασίας οφείλεται σε μεταβολές που επέρχονται σε ήδη υπάρχουσες πρωτεΐνες του κυττάρου, ενώ η δεύτερη προκαλείται από την εκ νέου σύνθεση κάποιων πρωτεϊνών με καρδιοπροστατευτική δράση^{6,24}.

Στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι εκτός από τα επεισόδια ισχαιμίας βραχείας διάρκειας, υπάρχουν και άλλες διαφορετικές συνθήκες που μπορούν να ασκήσουν καρδιοπροστατευτική επίδραση με παρόμοιο μηχανισμό. Τέτοιου είδους καρδιοπροστατευτική επίδραση έχει η κοιλιακή βηματοδότηση, η θερμική φόρτιση (θερμικό στρές), η επίδραση κυτοκινών και η σωματική άσκηση. Διαπιστώθηκε ότι αυτά τα καρδιοπροστατευτικά ερεθίσματα επιδρούν μέσω παρόμοιων μηχανισμών και παρόμοιων συστημάτων μετάδοσης βιοχημικών σημάτων, με αυτά που εμπλέκονται στην ισχαιμική προετοιμασία²⁵.

Αναφορικά με το μηχανισμό της **πρώτης φάσης της ισχαιμικής προετοιμασίας (ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου)**, οι σχετικές έρευνες έχουν δείξει τα εξής: Ένα από τα μόρια που συμμετέχουν στην αλληλουχία των βιοχημικών σημάτων είναι η αδενοσίνη, η οποία οδηγεί στη διάνοιξη μιτοχονδριακών διαύλων καλίου εξαρτώμενων από το ATP (διάυλοι mKATP: mitochondrial ATP-sensitive potassium channels). Άλλα μόρια που ελευθερώνονται, όπως η βραδυκινίνη, η ακετυλοχολίνη, η νοραδρεναλίνη και τα οπιοειδή, προκαλούν ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών, γεγονός που οδηγεί στη διάνοιξη των διαύλων mKATP των μιτοχονδρίων. Η διάνοιξη αυτών των διαύλων (καναλιών) προστατεύει τα μιτοχόνδρια από την υπερφόρτιση με ιόντα ασβεστίου. Επίσης, προκαλεί την είσοδο καλίου στα

μιτοχόνδρια, γεγονός που οδηγεί στην απελευθέρωση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια. Πρόκειται για μέτρια αύξηση της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών, που μπορεί να παίξει έναν εκλυτικό ρόλο στη μετάδοση των βιοχημικών σημάτων, που ενεργοποιούν τους προστατευτικούς μηχανισμούς της ισχαιμικής προετοιμασίας^{8,24}. **Επομένως, υπάρχουν ενδείξεις, ότι μικρή αύξηση της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών μπορεί να συμμετέχει σε προστατευτικούς μηχανισμούς. Αντίθετα μία μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, όταν συμβεί, οδηγεί σε κυτταρική βλάβη.** Αυτό θα εξηγηθεί λεπτομερέστερα σε επόμενο εδάφιο.

Σε ότι αφορά τη **δεύτερη φάση της ισχαιμικής προετοιμασίας (ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου)**, η οποία έχει μεγαλύτερη διάρκεια, οι αρχικές ουσίες που συμμετέχουν στην έκλυσή της είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO) και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Αυτές οι ουσίες κινητοποιούν μία σειρά βιοχημικών σημάτων, που οδηγεί στη σύνθεση πρωτεϊνών με καρδιοπροστατευτική επίδραση. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η συνθάση του NO, η κυκλοοξυγενάση-2 και η δισμουτάση του υπεροξειδίου^{8,24}.

Στα βιοχημικά σήματα της ισχαιμικής προετοιμασίας ή ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου περιλαμβάνεται και η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών C (PKC). **Οι πρωτεϊνικές κινάσες C** αποτελούν μία κατηγορία ενζύμων που ρυθμίζουν τη λειτουργία άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών²⁶. Αυτό το πραγματοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης υδροξυλικών ομάδων που υπάρχουν σε υπολείμματα αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης, τα οποία περιλαμβάνονται στη δομή διαφόρων πρωτεϊνών.

Επίσης στα βιοχημικά γεγονότα της ισχαιμικής προετοιμασίας περιλαμβάνεται η **ενεργοποίηση των κινασών του Ιανού 1 και 2** (JAK, Janus Activated Kinases). Οι κινάσες JAK ενεργοποιούνται μετά από επίδραση συγκεκριμένων μορίων σε κάποιους κυτταρικούς υποδοχείς. Αυτό οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση των κινασών JAK, γεγονός που τις ενεργοποιεί περαιτέρω. Στη συνέχεια οι κινάσες αυτές ενεργοποιούν με φωσφορυλίωση διάφορους παράγοντες μεταφοράς σημάτων και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STAT- Signal Transducer and Activator of Transcription). Οι ενεργοποιημένοι παράγοντες STAT εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου συνδέονται με το DNA και προάγουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση συγκεκριμένων κυτταρικών πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια²⁶.

Πιο πρόσφατα, περιγράφηκε ένα φαινόμενο καρδιοπροστασίας μετά το κύριο ισχαιμικό επεισόδιο, η **μετα-ισχαιμική προστασία (Ischemic Postconditioning-IPO)**. Διαπιστώθηκε από τους Vinten-Johansen και συνεργάτες, ότι μετά από ένα ισχαιμικό επεισόδιο ικανό να προκαλέσει νέκρωση μυοκαρδιακού ιστού, αν ακολουθήσουν επαναλαμβανόμενες περίοδοι ισχαιμίας βραχείας διάρκειας, που τις διαδέχεται επαναιμάτωση, παρατηρείται το εξής: Οι επαναλαμβανόμενες περίοδοι ισχαιμίας βραχείας διάρκειας, που συμβαίνουν μετά το κύριο ισχαιμικό επεισόδιο, έχουν καρδιοπροστατευτική επίδραση. Συγκεκριμένα, προκαλούν ελάττωση της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής μυοκαρδίου. Μελέτες έχουν δείξει, ότι ο βιοχημικός μηχανισμός που προκαλεί αυτό το προστατευτικό φαινόμενο είναι παρόμοιος με το μηχανισμό του φαινομένου της ισχαιμικής προετοιμασίας^{25,26}.

Η μελέτη των μηχανισμών της ισχαιμικής προετοιμασίας ή ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου (IPC) και της μετα-ισχαιμικής προστασίας (IPO) και κυρίως η αποσαφήνιση των μορίων που συμμετέχουν στη μεταφορά των βιοχημικών σημάτων, μέσω των οποίων ασκούνται αυτές οι προστατευτικές δράσεις, έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Είναι δυνατό να οδηγήσει στην ανακάλυψη φαρμάκων που να μιμούνται την καρδιοπροστατευτική δράση που παρατηρείται σε αυτά τα δύο φαινόμενα, ενεργοποιώντας την ίδια αλληλουχία βιοχημικών σημάτων. Έτσι, ίσως επιτευχθεί η ανάπτυξη φαρμάκων, ικανών να ελαττώνουν την έκταση και τη βαρύτητα της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Προς το παρόν, παρά το γεγονός ότι έχουν ανακαλυφθεί κάποια από τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτούς τους μηχανισμούς, πολλές παράμετροι παραμένουν άγνωστες και αποτελούν πεδίο συνεχιζόμενης έρευνας^{25,26}.

Επιπλέον, η ανακάλυψη νέων βιοχημικών καρδιοπροστατευτικών μηχανισμών, όπως οι **κινάσες προστασίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση (reperfusion injury salvage kinases -RISK)** και της επίδρασής τους στη νέκρωση και την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων, έχει συμβάλει στην ανανέωση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για το φαινόμενο της βλάβης από επαναιμάτωση. Οι κινάσες γενικά είναι μία

σημαντική κατηγορία ενζύμων, που ανήκουν στις τρανσφεράσες, δηλαδή στην ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά χημικών ομάδων από μία ουσία σε μία άλλη. Οι κινάσες είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων τους, μέσω της μεταφοράς σε αυτά μιας φωσφορικής ομάδας, συνήθως από το μονονουκλεοτίδιο τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Η μεταφορά αυτή είναι αντιστρεπτή και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση προηγουμένως ανενεργών μεταβολικά ενώσεων, ώστε να μπορούν να συμμετέχουν ή να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορες μεταβολικές και βιοχημικές διεργασίες^{2,8}.

Η βιοχημική οδός RISK είναι ένας όρος που καθιερώθηκε από τους Yellon και συνεργάτες, για την περιγραφή των κινασών που ασκούν προστατευτική επίδραση στο μυοκάρδιο κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης μετά από μία περίοδο ισχαιμίας. Η ενεργοποίηση της οδού των κινασών σωτηρίας από τη βλάβη επαναιμάτωσης (RISK) κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης προκαλεί μείωση του μεγέθους του εμφράκτου και συμμετέχει στο μηχανισμό με τον οποίο επενεργούν διάφορες καρδιοπροστατευτικές θεραπείες. Η οδός RISK συμμετέχει στην καρδιοπροστασία που προκαλείται από την ισχαιμική προετοιμασία και τη μετα-ισχαιμική προστασία. Η καρδιοπροστατευτική δράση της οδού RISK ασκείται μέσω της αναστολής της διάνοιξης των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (γεγονός που ελαττώνει τη νέκρωση και την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων) και μέσω επίδρασης στη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο^{8,26}. Η ανακάλυψη αυτών των παθοφυσιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών, ίσως οδηγήσει και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων, οι οποίες θα δρουν επηρεάζοντας αυτές τις διεργασίες.

Εκδηλώσεις και σημασία της βλάβης από επαναιμάτωση

Έχει αποδειχθεί ότι η έγκαιρη επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωτηρία του μυοκαρδίου, δηλαδή για τη διατήρηση της βιωσιμότητας και της λειτουργίας του. Όμως η επαναιμάτωση έχει επίσης συσχετισθεί με ορισμένες επιβλαβείς επιδράσεις, που είναι γνωστές με τον όρο **βλάβη από επαναιμάτωση**. Η βλάβη από

επαναιμάτωση εξ ορισμού περιλαμβάνει ορισμένες βιοχημικές, ηλεκτροφυσιολογικές και κλινικές εκδηλώσεις που οφείλονται στην επαναιμάτωση μιας ισχαιμούσας μυοκαρδιακής περιοχής και όχι στην προηγούμενη περίοδο της ισχαιμίας. Αυτές οι διαταραχές μπορούν να επηρεασθούν από παρεμβάσεις που διενεργούνται μόνο κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης (και όχι στη διάρκεια της ισχαιμίας).

Έχει διεξαχθεί συστηματική επιστημονική έρευνα προκειμένου να διευκρινισθεί αν τα κύτταρα του μυοκαρδίου παθαίνουν μη αναστρέψιμη βλάβη μόνο στη διάρκεια της ισχαιμίας, ή αν κάποιος επιπρόσθετος αριθμός κυττάρων υφίσταται μη αναστρέψιμη βλάβη κατά την επαναιμάτωση. Η διευκρίνιση αυτού του ερωτήματος έχει σημασία για την κλινική πράξη. Αν η επαναιμάτωση εκτός από τη συμβολή της στη σωτηρία σημαντικού αριθμού μυοκαρδιακών κυττάρων, προκαλεί παράλληλα και μυοκαρδιακή βλάβη, τότε υπάρχουν σημαντικά περιθώρια παρέμβασης με χορήγηση καρδιοπροστατευτικών φαρμάκων στη διάρκεια της επαναιμάτωσης²⁵.

Ισχυρή ένδειξη για την ύπαρξη της βλάβης από την επαναιμάτωση προέκυψε από πειραματικές μελέτες, στις οποίες διαπιστώθηκε ελάττωση της μυοκαρδιακής βλάβης και βελτίωση της λειτουργίας του μυοκαρδίου από τη χορήγηση διαφόρων ουσιών κατά την επαναιμάτωση. Αυτές οι ουσίες χορηγήθηκαν μετά το τέλος της περιόδου της ισχαιμίας, γεγονός που στηρίζει το επιχείρημα ότι έδρασαν επηρεάζοντας φαινόμενα που συμβαίνουν στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Οι Altavila και συνεργάτες, σε πειραματικό μοντέλο απόφραξης στεφανιαίας αρτηρίας για 45 λεπτά σε ποντικούς ακολουθούμενης από πεντάωρη επαναιμάτωση, διαπίστωσαν ότι η χορήγηση μίας αντιοξειδωτικής ουσίας ανάλογης της βιταμίνης E (IRFI 042) 5 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης ελάττωσε σημαντικά το μέγεθος του εμφράκτου. Αυτή η μελέτη παρείχε την ένδειξη ότι κατά την επαναιμάτωση συντελείται κάποιος βαθμός βλάβης, στην παθογένεια της οποίας συμμετέχει η επίδραση ελευθέρων ριζών. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η έκταση της βλάβης του μυοκαρδίου ελαττώθηκε από τη χορήγηση ουσίας με αντιοξειδωτική δράση μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Συνεπώς, το φάρμακο επηρέασε φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση και όχι κατά την ισχαιμία²⁵.

Μια άλλη ένδειξη για την ύπαρξη και τη σημασία της βλάβης από επαναιμάτωση αποτελεί το φαινόμενο της μετα-ισχαιμικής προστασίας (postconditioning), που περιγράφηκε προηγουμένως. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται στη διάρκεια της επαναιμάτωσης, μετά από το κυρίως ισχαιμικό επεισόδιο. Συνεπώς, ασκεί προστατευτική επίδραση περιορίζοντας επιβλαβείς διεργασίες που συμβαίνουν στη διάρκεια της επαναιμάτωσης και έτσι παρέχει ένα ακόμα ισχυρό επιχείρημα υπέρ της ύπαρξης βλάβης κατά την επαναιμάτωση²⁶.

Υπέρ της σημασίας της βλάβης από επαναιμάτωση, συνηγορεί και η καρδιοπροστατευτική επίδραση της ενεργοποίησης ορισμένων **κινασών**, με τη χορήγηση κατάλληλων φαρμάκων στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Αυτή η παρέμβαση κατά την επαναιμάτωση διαπιστώθηκε ότι ελαττώνει την έκταση της τελικής μυοκαρδιακής βλάβης²⁵.

Παθογενετικοί μηχανισμοί πρόκλησης της βλάβης από ισχαιμία

Για να γίνει κατανοητή η παθοφυσιολογία της βλάβης από την επαναιμάτωση πρέπει να αναλυθούν πρώτα οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την ισχαιμία. Αυτό ισχύει επειδή οι βιοχημικές διαταραχές που παρατηρούνται κατά την επαναιμάτωση διαδέχονται τις διαταραχές που συμβαίνουν κατά την ισχαιμία.

Στη διάρκεια της ισχαιμίας η σοβαρή ελάττωση, ή και η πλήρης διακοπή της αιματικής ροής στο μυοκάρδιο προκαλεί τη διακοπή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία αποτελεί βασικό μηχανισμό παραγωγής ενέργειας εντός των κυττάρων. Έτσι προκαλείται αδυναμία ανασύνθεσης των φωσφορικών ουσιών υψηλής ενέργειας, που είναι το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και η φωσφορική κρεατίνη. Αυτό σημαίνει ελάττωση των αποθεμάτων ενέργειας των μυοκαρδιακών κυττάρων, που οδηγεί στη διακοπή της ικανότητας τους να επιτελούν ενεργά την εναλλαγή της συστολής και της χάλασης. Η αδυναμία επανασύνθεσης του ATP οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των πουρινών που αποτελούν πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεσή του. Οι πουρίνες ακολουθούν τότε τη μεταβολική οδό της οξειδωσής τους σε ξανθίνη και υποξανθίνη, οι οποίες σε συνδυασμό με τη δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης δημιουργούν ευνοϊκό χημικό

περιβάλλον για τη μεταγενέστερη παραγωγή ελεύθερων ριζών του οξυγόνου²⁵.

Επίσης, το ενεργειακό έλλειμμα προκαλεί τη διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης του κυττάρου. Αυτή η διαταραχή συνίσταται στη διαφυγή ιόντων καλίου στον εξωκυττάριο χώρο και σε συσσώρευση ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Πιο αναλυτικά η ένδεια οξυγόνου προκαλεί γαλακτική οξέωση, με αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου μέσα στα κύτταρα, δηλαδή την πτώση του ενδοκυττάρου pH. Η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου ενδοκυτταρίως ευνοεί την ανταλλαγή ιόντων νατρίου με ιόντα υδρογόνου στη κυτταρική μεμβράνη. Δηλαδή, προκαλείται είσοδος στο κύτταρο ιόντων νατρίου και έξοδος ιόντων υδρογόνου. Η αύξηση του ενδοκυττάρου νατρίου, που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία, ευνοεί την ανταλλαγή νατρίου με ασβέστιο, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκτός από τα παραπάνω, η διαταραχή στην ιοντική ομοιόσταση του κυττάρου οφείλεται και στο γεγονός ότι διάφοροι μεμβρανικοί δίαυλοι ανταλλαγής ιόντων, απαιτούν ενέργεια (ATP), το οποίο δεν είναι διαθέσιμο σε συνθήκες ισχαιμίας. Αυτό επίσης οδηγεί τελικά στην αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου κατά την ισχαιμία, η οποία επιτείνεται περαιτέρω κατά την επαναιμάτωση. Επιπλέον προκαλείται και συσσώρευση ασβεστίου στα μιτοχόνδρια^{5,22,25}.

Η αύξηση του ασβεστίου συμβάλλει στην ενεργοποίηση μίας πρωτεάσης, της καλπαΐνης, η οποία συμμετέχει στη μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης. Η οξειδάση της ξανθίνης θα καταλύσει στη συνέχεια κατά την επαναιμάτωση, όταν υπάρξει προσφορά οξυγόνου στο κύτταρο, την αντίδραση της υποξανθίνης με το οξυγόνο, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερης ρίζας του οξυγόνου με ένα αρνητικό φορτίο (O_2^-) και ουρικού οξέος. Η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου συμμετέχει, όπως και οι άλλες ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την επαναιμάτωση, σε ορισμένες επιβλαβείς διεργασίες⁶ όπως θα αναπτυχθεί αναλυτικότερα παρακάτω.

Επιπλέον, η έλλειψη ATP επηρεάζει τους ευαίσθητους στο ATP δίαυλους καλίου της κυτταρικής μεμβράνης. Το αποτέλεσμα είναι ότι ενώ σε κανονικές συνθήκες λειτουργίας του κυττάρου διατηρείται υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση καλίου με είσοδο ιόντων καλίου στο κύτταρο,

αντίθετα κατά την ισχαιμία υπερισχύει η έξοδος καλίου από το κύτταρο. Έτσι ελαττώνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση καλίου, ενώ αυξάνεται η συγκέντρωσή του στο εξωκυττάριο υγρό. Η διαταραχή της ιοντικής σύστασης του κυττάρου στην ισχαιμία (ενδοκυτταρίως αύξηση του ασβεστίου και του νατρίου και ελάττωση του καλίου και του pH), προκαλεί διαταραχή στην εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, στην αγωγιμότητα (επομένως δημιουργείται αρρυθμιογόνο υπόστρωμα) και στη συστολική λειτουργία των μυοκαρδιακών κυττάρων^{1,26}.

Επίσης η διαταραχή στην ενδοκυττάρια ιοντική ομοιόσταση συμβάλλει στην ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεασών, που προκαλούν αποδόμηση πρωτεϊνών του κυττάρου, που χρειάζονται για τη συστολική λειτουργία (όπως η τροπονίνη), καθώς επίσης και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Τελικά με την πρόοδο της ισχαιμίας τα μυοκαρδιακά κύτταρα εμφανίζουν εξοίδηση, το ενδοκυττάριο pH γίνεται όξινο, και σταδιακά ακολουθεί η δομική αποδιοργάνωση των κυττάρων¹.

Έχει διαπιστωθεί, ότι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου δεν παράγονται μόνο κατά την επαναιμάτωση, αλλά και κατά την ισχαιμία, σε μικρότερο βέβαια ποσό. Παρά την ένδεια οξυγόνου που υπάρχει στην ισχαιμία, υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνει παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και σε αυτή την περίοδο. Η υποξία προκαλεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων απελευθέρωση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου οι οποίες προέρχονται από τα μιτοχόνδρια. Συνεπώς οι συνθήκες που ευνοούν την αυξημένη παρουσία και δράση των ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση, αρχίζουν ήδη να διαμορφώνονται κατά την περίοδο της ισχαιμίας που έχει προηγηθεί²⁵.

Κατά την έναρξη της ισχαιμίας υπάρχει ακόμη οξυγόνο στα κύτταρα, μέρος του οποίου στρέφεται σε χημικές οδούς παραγωγής ελευθέρων ριζών (ιδιαίτερα υπεροξειδίου). Αυτό οφείλεται σε διαταραχή της λειτουργίας των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων κατά την ισχαιμία, με αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο οξυγόνο. Η ανίχνευση της παραγωγής της ρίζας υπεροξειδίου κατά την ισχαιμία έγινε σε πειραματικές μελέτες, στις οποίες μυοκαρδιακά κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες που προσομοιάζουν με την ισχαιμία, με τη χρήση της ουσίας

διϋδροεθιδίνη (dihydroethidine, DHE)²². Η DHE αποτελεί χρήσιμο δείκτη της παρουσίας ελευθέρων ριζών, επειδή όταν εισέλθει στο κύτταρο οξειδώνεται από τη ρίζα του υπεροξειδίου και μετατρέπεται σε εθίδιο, το οποίο παρουσιάζει φθορισμό. Σε μυοκαρδιακά κύτταρα που υποβλήθηκαν σε προσομοίωση ισχαιμίας για μία ώρα παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού κατά τη χορήγηση DHE, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Επίσης η χρήση ουσιών που αναστέλλουν τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, δηλ τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, οδήγησε σε ελάττωση του παραγόμενου φθορισμού μετά την χορήγηση DHE στα μυοκαρδιακά κύτταρα που υποβάλλονταν σε συνθήκες ισχαιμίας. Αυτό αποτελεί σαφή ένδειξη ότι η θέση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών κατά την ισχαιμία βρίσκεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων. Αντίθετα αυτές οι πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η θέση παραγωγής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση είναι διαφορετική, αφού η παραγωγή τους δεν ελαττώθηκε από τους ίδιους αναστολείς που περιορίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών στην ισχαιμία²².

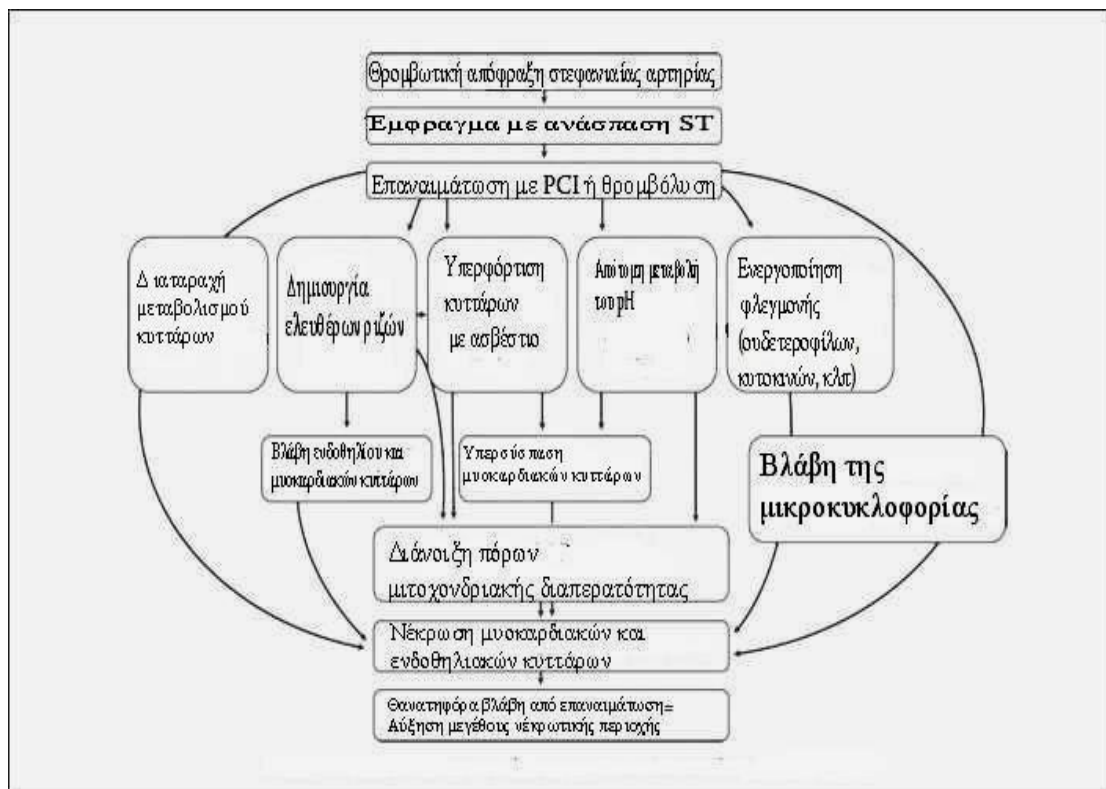
Η παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου κατά την ισχαιμία, σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα έχει δύο ειδών επιδράσεις στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Αφενός προκαλεί κάποιο βαθμό κυτταρικής βλάβης από την οξείδωση δομικών μακρομορίων των κυττάρων, αφετέρου όμως συμμετέχει και σε μετάδοση χημικών σημάτων τα οποία ενεργοποιούν προστατευτικούς μηχανισμούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου εξαρτάται και από τη συγκέντρωσή τους. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις έχουν κυρίως επιβλαβή οξειδωτική επίδραση στα κύτταρα. Αντίθετα, υπάρχουν δεδομένα που συνηγορούν, ότι όταν υπάρχουν μικρές συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών κυριαρχεί η προστατευτική επίδραση, μέσω ενεργοποίησης προστατευτικών βιοχημικών διεργασιών του κυττάρου²⁵.

Παθογενετικοί μηχανισμοί της βλάβης από επαναιμάτωση: Γενικά

Το φαινόμενο της βλάβης του μυοκαρδίου από την επαναιμάτωση έχει διερευνηθεί με πολλές πειραματικές μελέτες. Από τα ευρήματα αυτών των εργασιών έχει διαπιστωθεί ότι η παθογένεια του φαινομένου είναι περίπλοκη, αφού έχουν προκύψει ενδείξεις ότι ενέχονται πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση είναι η επίδραση μεγάλων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, η ενδοκυττάρια υπερφόρτιση με ασβέστιο, η διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και η μετανάστευση ουδετεροφίλων στην περιοχή⁸. Αναλυτικότερα, στην παθογένεση της βλάβης από επαναιμάτωση υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχουν οι παρακάτω διεργασίες^{25,27,28,29}.

- 1) Η επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση
- 2) Η διαταραχή της ενδοκυττάριας περιεκτικότητας σε ιόντα, κυρίως ασβεστίου (αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου), αλλά και νατρίου που παρατηρείται κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου
- 3) Η απότομη μεταβολή του pH προς το φυσιολογικό που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση
- 4) Η διανοίξη των πόρων διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (mitochondrial permeability transition pore -MPTP)
- 5) Η επίδραση των ουδετεροφίλων στην επαναιματούμενη περιοχή του μυοκαρδίου.
- 6) Η πιθανή επίδραση του συστήματος του συμπληρώματος, το οποίο ενεργοποιείται κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση.
- 7) Η ελαττωμένη διαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στη μικροκυκλοφορία, που έχει διαπιστωθεί κατά την επαναιμάτωση.
- 8) Η αυξημένη παραγωγή ενδοθηλίνης-1 (ισχυρό αγγειοσυσπαστικό πεπτιδίο) που παρατηρείται κατά την επαναιμάτωση.
- 9) Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης, που αποτελεί μία σειρά βιοχημικών σημάτων και διεργασιών, η οποία τελικά οδηγεί σε περαιτέρω θάνατο μυοκαρδιακών κυττάρων (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).

Οι παραπάνω παθογενετικοί μηχανισμοί δεν είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι εμφανίζουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις. Η παθοφυσιολογία της βλάβης του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως και αποτελεί ένα συνεχιζόμενο πεδίο έρευνας. Παρακάτω αναλύονται οι παθογενετικοί μηχανισμοί που αναφέρθηκαν, με βάση τα στοιχεία που έχουν προκύψει από τις έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα.



Εικόνα 1. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη βλάβη από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου.

(Από Prasad A, Stone GW et al. Reperfusion Injury, Microvascular Dysfunction, and Cardioprotection. The “Dark Side” of Reperfusion. *Circulation*. 2009;120:2105-2112.⁵)

Οι αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου και οι ελεύθερες ρίζες

Σε στεφανιαία νόσο, η αλληλουχία της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης προκαλεί την αυξημένη παραγωγή **αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου**, στους καρδιακούς ιστούς, δηλαδή ουσιών που περιέχουν οξυγόνο και έχουν την τάση να αντιδρούν ταχέως με διάφορα βιολογικά μόρια^{7,22}. Πολλές από αυτές τις αντιδραστικές ουσίες του οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) είναι ελεύθερες ρίζες, αλλά υπάρχουν και κάποιες που δεν κατατάσσονται στην κατηγορία των ελευθέρων ριζών.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που διαθέτουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, γεγονός που τις κάνει ασταθείς ουσίες, που έχουν την τάση να αντιδρούν ταχέως με άλλα μόρια. Τέτοιες ουσίες με ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα είναι η ρίζα του υπεροξειδίου, O_2^- (superoxide), η ρίζα του υδροξυλίου, OH (hydroxyl radical), το περοξυνιτρώδες, ONOO⁻. (peroxynitrite) και οι ρίζες λιπαρών οξέων ROO[·]. Όπως αναφέρθηκε, εκτός από τις ελεύθερες ρίζες, υπάρχουν και κάποιες από τις αντιδραστικές ουσίες του οξυγόνου, που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, δηλαδή δεν διαθέτουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Κύριο παράδειγμα αποτελεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου (hydrogen peroxide)⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων. Το γεγονός αυτό συνέβαλλε στη διαπίστωση ότι συμβαίνει αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, επειδή σε διάφορες μελέτες ανιχνεύθηκαν προϊόντα υπεροξειδωσης των λιπιδίων κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου σε ζώα, αλλά και σε ασθενείς με έμφραγμα που υποβλήθηκαν σε θρομβόλυση. Επίσης ανιχνεύθηκαν και σε ασθενείς κατά τα πρώτα λεπτά μετά από αγγειοπλαστική των στεφανιαίων. Η αθρόα παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης έχει διαπιστωθεί και μέσω της ανίχνευσης των ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο του παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (electron paramagnetic resonance)². Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η έκλυση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, που γενικά συμβαίνει εντός των πρώτων λεπτών της επαναιμάτωσης, είναι μεγαλύτερη (κορυφώνεται) κατά τα πρώτα 10-20 δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης. Επίσης έδειξαν ότι οι ουσίες που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες μπορούν να ασκήσουν προστατευτική

δράση μόνο όταν η χορήγησή τους αρχίσει μερικά λεπτά πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης^{6,7}.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου παράγονται από τα μυοκαρδιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα της περιοχής που υπέστη την αλληλουχία ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, αλλά και από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα που μεταναστεύουν στην περιοχή. Στην παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μυοκαρδιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμμετέχει το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, ενώ όπως αναφέρεται παρακάτω, πολύ σημαντική συμμετοχή έχει και η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, η οποία είναι μία βιοχημική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η τελευταία έχει ήδη υποστεί βλάβη κατά την ισχαιμία, με αποτέλεσμα κατά την επαναιμάτωση όταν το οξυγόνο είναι πλέον πάλι διαθέσιμο, να χρησιμοποιεί αρκετό από το οξυγόνο για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, αντί να το χρησιμοποιεί αποδοτικά για την παραγωγή ενέργειας. Γενικά τα μιτοχόνδρια αποτελούν σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών και ιδιαίτερα η εσωτερική μεμβράνη τους και τα ένζυμα δεϋδρογονάσες και μονοαμινοοξειδάση (MAO)^{6,22}.

Συνοπτικά οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου ασκούν επίδραση με τους παρακάτω τρόπους: άμεση οξειδωση μακρομορίων που αποτελούν κυτταρικά συστατικά, ενεργοποίηση τοπικά των μηχανισμών της φλεγμονής και διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου λόγω μείωσης της διαθεσιμότητας του NO. Επίσης η αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών σε συνδυασμό και με την αύξηση της ενδομιτοχονδριακής συγκέντρωσης ασβεστίου προκαλούν τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση. Η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας προκαλεί περαιτέρω διαταραχή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, γεγονός που συμβάλλει στην κυτταρική νέκρωση. Η σοβαρή διαταραχή στη μιτοχονδριακή λειτουργία και η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου είναι δύο παράγοντες που παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην πρόκληση της κυτταρικής νέκρωσης και σχετίζονται με την επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου^{5,27}.

Πως παράγονται οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στις αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας από οργανικές ενώσεις του άνθρακα. Στον αερόβιο μεταβολισμό το μοριακό οξυγόνο (O_2) υφίσταται σταδιακή αναγωγή σε νερό. Συνοπτικά, σε αυτή τη διαδικασία (αναπνευστική αλυσίδα) καταναλώνεται οξυγόνο και οργανικές ενώσεις (υποστρώματα) και παράγεται τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), ως μόριο αποθήκευσης ενέργειας, νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Η διεργασία αυτή γίνεται στα μιτοχόνδρια. Το 95% του οξυγόνου καταναλίσκεται χωρίς την παραγωγή ελευθέρων ριζών, αλλά 5 % του οξυγόνου που χρησιμοποιείται εισέρχεται σε αντιδράσεις, στις οποίες παράγονται ελεύθερες ρίζες. Η ύπαρξη ενός ή περισσοτέρων ασύζευκτων ηλεκτρονίων δίνει στις ελεύθερες ρίζες αυξημένη δυνατότητα για αντίδραση με άλλα μόρια³⁰.

Αυτή η αυξημένη αντιδραστικότητα μπορεί να χαρακτηρίζεται από ευχέρεια της ελεύθερης ρίζας να προσλάβει ηλεκτρόνια (δηλαδή να αναχθεί), ή να δώσει ηλεκτρόνια σε ένα άλλο μόριο (δηλαδή να οξειδωθεί). Έτσι μία οξειδωτική ελεύθερη ρίζα που φέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο μπορεί να αντιδράσει με ένα άλλο μόριο, από το οποίο προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο. Η απώλεια ενός ηλεκτρονίου, το οποίο χορηγείται σε άλλο μόριο λέγεται οξείδωση, ενώ η πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου λέγεται αναγωγή. Επομένως το μόριο που χορηγεί ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα οξειδώνεται ενώ η ελεύθερη ρίζα που προσλαμβάνει το ηλεκτρόνιο ανάγεται³¹.

Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες διεργασίες, όπως η μεταφορά βιοχημικών σημάτων, η φλεγμονή και οι αμυντικές διεργασίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο (οξειδωτικό στρές -oxidative stress) είναι η κατάσταση που προκύπτει από τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών ουσιών από τα κύτταρα και της επαρκούς διαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών μορίων που εξουδετερώνουν αυτές τις ουσίες. Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας έχει σαν αποτέλεσμα να είναι αυξημένη η δράση των οξειδωτικών ουσιών. Μεταξύ των οξειδωτικών ουσιών πρωτεύοντα ρόλο έχουν οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο προκαλεί βλάβες στα κύτταρα και σχετίζεται με την παθογένεση νοσημάτων,

στα οποία περιλαμβάνονται καρδιαγγειακά νοσήματα, νευρολογικά νοσήματα, ο καρκίνος, καθώς επίσης και η φυσιολογική γήρανση. Σε δείγματα αίματος από πάσχοντες από στεφανιαία νόσο έχουν διαπιστωθεί ενδείξεις αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, δηλαδή αυξημένης βιοχημικής δραστηριότητας οξειδωτικών ουσιών^{6,31}.

Μία σημαντική ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου είναι **το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-)**, που προκύπτει όταν το μόριο του οξυγόνου (O_2) προσλάβει ένα ηλεκτρόνιο. Το ανιόν του υπεροξειδίου δεν έχει τόσο μεγάλη αντιδραστικότητα, ούτε τόσο μεγάλη επιβλαβή επίδραση, όσο άλλες ελεύθερες ρίζες. Έχει χαμηλή λιποδιαλυτότητα με αποτέλεσμα να είναι περιορισμένη η επίδρασή του στις κυτταρικές μεμβράνες. Το ιόν αυτό έχει όμως σημασία, επειδή μπορεί να μετατραπεί στην πρωτονιωμένη μορφή του, τη ρίζα περυδροξυλίου (perhydroxyl radical- HO_2), που προκύπτει όταν το O_2^- προσλάβει ένα ιόν υδρογόνου, δηλαδή ένα πρωτόνιο. Αυτή η ρίζα είναι περισσότερο λιπόφιλη και πιο αντιδραστική και έτσι μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες. Συνεπώς, το ιόν του υπεροξειδίου βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη μορφή του, δηλαδή τη ρίζα HO_2 . Η πρωτονιωμένη μορφή του υπεροξειδίου σχηματίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν υπάρχει οξέωση, όπως σε συνθήκες ισχαιμίας. Επομένως η ισχαιμία ευνοεί το σχηματισμό της ρίζας HO_2 , που έχει ιδιαίτερη τοξικότητα, επειδή προκαλεί οξειδωτική βλάβη σε λιπίδια και πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά και στο DNA⁶.

Υπάρχουν επίσης και άλλες ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο, οι οποίες ενώ δεν είναι ελεύθερες ρίζες, έχουν οξειδωτική δράση και συμμετέχουν στη δημιουργία αυξημένου οξειδωτικού φορτίου. Τέτοιες ουσίες είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το οξείδιο του αζώτου (NO) και το περοξυνιτρώδες ($ONOO^-$). Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσει στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό τους, μέσω διαδοχικών αντιδράσεων^{6,30}.

Στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ελευθέρων ριζών συμβάλλει και η διαθεσιμότητα ελευθέρων ιόντων σιδήρου. Κάτω από συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, το υπεροξειδίο προκαλεί την απόσπαση ελευθέρων **ιόντων σιδήρου** από μόρια που περιέχουν σίδηρο. Τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου οδηγούν σε περαιτέρω παραγωγή ελευθέρων ριζών με τοξική δράση,

όπως η ρίζα του υδροξυλίου που παράγεται στο κυτταρόπλασμα από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μέσω της αντίδρασης Fenton⁶. Τα ιόντα σιδήρου βρίσκονται σε αφθονία στα μυοκαρδιακά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και λειτουργούν ως καταλύτης σε αυτή την αντίδραση. Η ρίζα του υδροξυλίου θεωρείται από τις περισσότερο κυτταροτοξικές, επειδή αντιδρά πολύ εύκολα και ταχέως με διάφορα βιοχημικά συστατικά του κυττάρου. Προκαλεί υπεροξειδωση των λιπιδίων με συνέπεια την πρόκληση άμεσης βλάβης των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης αντιδρά με σουλφυδριλικές ομάδες των πρωτεϊνών. Έτσι η ρίζα του υδροξυλίου, αλλά και οι άλλες ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβη σε διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου, ιδιαίτερα σε ένζυμα και αντλίες μεταφοράς ιόντων^{6,30}.

Ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου παράγονται από τη δράση διαφόρων βιοχημικών μηχανισμών και ενζυμικών συστημάτων, όπως η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, η οξειδάση του NADPH, η οξειδάση της ξανθίνης και η συνθάση του NO.

Η **αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων** αποτελεί σημαντική θέση παραγωγής ελευθέρων ριζών. Συνοπτικά, στην αναπνευστική αλυσίδα συμβαίνει μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της δεϋδρογονάσης του NADH, ή δεϋδρογονασών (αφυδρογονασών) συνδεδεμένων με φλαβοπρωτεΐνη στο οξυγόνο, με τελικό αποτέλεσμα την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, περίπου 2-5% των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων αναλώνονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Η μεγάλη πλειονότητα αυτών των ελευθέρων ριζών που παράγονται στα μιτοχόνδρια, φυσιολογικά, εφόσον τα μιτοχόνδρια δεν έχουν υποστεί βλάβη, παραμένουν εντός των μιτοχονδρίων και δεν εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Έχει βρεθεί ότι ο ρυθμός λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας και ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια επηρεάζεται από την εσωτερική και την εξωτερική συγκέντρωση ασβεστίου. Ένας προστατευτικός μηχανισμός από το οξειδωτικό φορτίο στα μιτοχόνδρια, είναι η ενδομιτοχονδριακή παρουσία του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου εξαρτώμενη από το μαγγάνιο (Mn-SOD), η οποία συμμετέχει στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών. Επομένως, φυσιολογικά υπάρχει σημαντικός βαθμός προστασίας από την επίδραση αυτών των ριζών⁶.

Κατά την ισχαιμία του μυοκαρδίου η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων υφίσταται διαταραχή της λειτουργίας της, με αποτέλεσμα όταν αποκατασταθεί η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, κατά την επαναιμάτωση, να αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια³⁰. Όπως έχει αναφερθεί αυτή η αύξηση των ελευθέρων ριζών, σε συνδυασμό και με την αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου, προκαλεί τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας, πρωτεϊνικών καναλιών της μεμβράνης των μιτοχονδρίων που παίζουν ρόλο στον πρόκληση του κυτταρικού θανάτου^{25,26}.

Υπάρχουν και άλλες πηγές αντιδραστικών ουσιών του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια όπως το ένζυμο μονοαμινοξειδάση (MAO) που βρίσκεται στην εξωτερική τους μεμβράνη και παράγει μονοξειδίο του αζώτου και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι δύο τελευταίες ουσίες έχουν επίσης οξειδωτική δράση, αν και σαφώς ασθενέστερη από αυτή των ελευθέρων ριζών. Τα μιτοχόνδρια ελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου κατά την ισχαιμία, οι οποίες συμμετέχουν σε σημαντικές διεργασίες μετάδοσης βιοχημικών σημάτων³⁰.

Το ενζυμικό σύμπλεγμα της **οξειδάσης του NADH και του NADPH** επίσης συμμετέχει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Πρόκειται για ένζυμα συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη. Με αυτά τα ένζυμα ανάγεται το μόριο του οξυγόνου προσλαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από το NADH ή το NADPH. Έτσι σχηματίζεται η ρίζα ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-). Η οξειδάση του NADH και του NADPH είναι σημαντική πηγή ενδοαγγειακών ελευθέρων ριζών, αφού αυτά τα ένζυμα αποτελούν τις κυριότερες οξειδάσες των ενδοθηλιακών και των μυοκαρδιακών κυττάρων. Η οξειδάση του NADPH είναι επίσης σημαντική πηγή δημιουργίας ελευθέρων ριζών από τα φαγοκύτταρα, τα οποία επίσης συμμετέχουν στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση, μέσω των μηχανισμών της φλεγμονής^{6,30}.

Μετά από μία περίοδο ισχαιμίας τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος (λόγω του αναερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης) διεγείρουν την αυξημένη δραστηριότητα της οξειδάσης του NADH στα κύτταρα του μυοκαρδίου. Επομένως, ένας από τους μηχανισμούς, με τους οποίους η αλληλουχία της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, είναι η ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADH⁶.

Η δραστηριότητα της οξειδάσης του NADH και του NADPH επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι συμμετέχουν και στην παθογένεση καρδιακών νοσημάτων. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι αιμοδυναμικές συνθήκες (αυξημένη τοιχωματική τάση σε ένα αγγείο), κυτοκίνες, τοπικές μεταβολές στο μεταβολισμό των κυττάρων και ορμόνες. Η θρομβίνη, η οποία είναι τοπικά αυξημένη στο πάσχον αγγείο σε ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, αυξάνει τη δράση της οξειδάσης του NADH και του NADPH. Άλλοι βιοχημικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην παθογένεια των στεφανιαίων συνδρόμων όπως ο προερχόμενος από το αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (platelet derived growth factor PDGF), και κυτοκίνες, όπως ο TNF α , επίσης προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας του ενζυμικού συστήματος της οξειδάσης του NADH και του NADPH ⁶.

Παράδειγμα ορμονικής επίδρασης στη ρύθμιση της δράσης αυτών των οξειδασών που συμμετέχουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου είναι η αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης του NADH και του NADPH στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος από την επίδραση της αγγειοτασίνης II. Η επίδραση αυτή της αγγειοτασίνης II γίνεται με τη μεσολάβηση προϊόντων του αραχιδονικού οξέως που παράγονται από τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση. Ένας άλλος χημικός μεσολαβητής που αυξάνει τη δραστηριότητα της οξειδάσης του NADH και του NADPH στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων για διάστημα μεγαλύτερο των 24 ωρών, είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF α). Ο TNF α έχει αυτή την επίδραση, επειδή προκαλεί αύξηση της σύνθεσης (μεταγραφής) μίας υπομονάδας (δηλαδή ενός τμήματος) αυτών των ενζύμων. Μέρος της επίδρασης ορισμένων φαρμάκων, όπως οι αναστολείς των υποδοχέων της αγγειοτασίνης AT-1, στο καρδιαγγειακό σύστημα αποδίδεται στο γεγονός ότι προκαλούν ελάττωση της δραστηριότητας της οξειδάσης του NADH και του NADPH ⁶.

Ένα άλλο σημαντικό ενζυμικό σύστημα που συμμετέχει στους μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η **οξειδοαναγωγή της ξανθίνης**, η οποία έχει δύο μορφές που μετατρέπονται η μία στην άλλη, την οξειδάση και την δεϋδρογονάση. Η δεϋδρογονάση ανάγει το NAD⁺, ενώ η οξειδάση αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο, οδηγώντας στην παραγωγή

ανιόντος του υπεροξειδίου (ρίζας υπεροξειδίου) και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στον καταβολισμό των πουρινών, η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης καταλύει την οξειδωτική υδροξυλίωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια τη μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, το οποίο αποτελεί ουσία με αντιοξειδωτική δράση εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών. Το γεγονός ότι η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης έχει δύο μορφές που βρίσκονται σε ισορροπία, σημαίνει ότι είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της οξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου⁶. Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης είναι μία σημαντική πηγή οξειδωτικών ουσιών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Η οξειδάση της ξανθίνης παράγει ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μέσω της οδού του μεταβολισμού των πουρινών και με τον τρόπο αυτό εμπλέκεται στην πρόκληση δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο και στην επιδείνωση της συστολικής δυσλειτουργίας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια^{6,30}.

Επίσης, η **συνθάση του οξειδίου του αζώτου (NOS)** μπορεί, κάτω από ορισμένες βιοχημικές συνθήκες, να συμμετάσχει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Η ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου (eNOS) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH σε μία χημική ομάδα αίμης. Η συνθάση του οξειδίου του αζώτου αποτελεί επίσης την κύρια πηγή μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου μπορεί να συνθέσει μονοξείδιο του αζώτου, αλλά και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ένζυμο χρειάζεται την παρουσία της τετραϋδροβιοπτερίνης, η οποία πρέπει να είναι προσδεμένη κοντά στη χημική ομάδα της αίμης, προκειμένου να μεταφέρει ηλεκτρόνια σε άτομο αζώτου της L-αργινίνης, ώστε τελικά να παραχθεί μονοξείδιο του αζώτου (NO). Όταν η συνθάση του οξειδίου του αζώτου βρίσκεται σε ασύζευκτη κατάσταση, δηλαδή όταν δεν είναι συνδεδεμένη με τετραϋδροβιοπτερίνη ή L-αργινίνη, τότε το ένζυμο συμβάλλει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και συγκεκριμένα υπεροξειδίου (O_2^-), αλλά και στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)^{6,30}.

Το **μονοξείδιο του αζώτου (NO)**, που λέγεται και αγγειοδιασταλτικός παράγοντας του ενδοθηλίου (endothelium derived relaxation factor-EDRF), είναι ένα σημαντικό μόριο μετάδοσης σημάτων, που συμμετέχει στη ρύθμιση

του αγγειακού τόνου. Συγκεκριμένα, αποτελεί τη βασική αγγειοδιασταλτική ουσία που παράγεται από το ενδοθηλίο των αγγείων και προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Επιπλέον, ελαττώνει τον παθολογικό πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Η ελευθέρωση NO διεγείρεται με ερέθισμα την αυξημένη τοιχωματική τάση στο αγγείο, ή την επίδραση κυτοκινών που ενεργοποιούν την ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ασκεί ανασταλτική επίδραση στην οξειδάση της ξανθίνης και στην οξειδάση του NADPH, ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επομένως, η συνθάση του NO συμμετέχει στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου⁶.

Η παραγωγή NO αυξάνεται σε περιοχές αθηρωματικών βλαβών των αγγείων που υφίστανται αυξημένη μηχανική καταπόνηση (διατμητική τάση-shear stress, από δυνάμεις που επενεργούν στο αγγειακό τοίχωμα) κατά τη ροή του αίματος. Βασικός παράγοντας στην πρόκληση δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου είναι η ελάττωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου, που μπορεί να συμβεί από την επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Εκτός από το σημαντικό ρόλο που παίζει το NO στην αγγειοδιαστολή (χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων), υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι ασκεί προστατευτική επίδραση έναντι της ανάπτυξης αθηροσκληρωτικών βλαβών. Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου στην ενδοθηλιακή λειτουργία επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η χορήγηση της L-αργινίνης, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου, βελτιώνει την αγγειοδιαστολή ενδοθηλιακής προέλευσης σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο. Η επίδραση του NO δεν είναι μόνο παρακρινική, δηλ στην περιοχή που παράγεται, αλλά επιδρά και σε απομακρυσμένες περιοχές από τη θέση σύνθεσής του, γεγονός που παρουσιάζει αναλογίες με την ορμονική λειτουργία. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσής του με την αιμοσφαιρίνη στους πνεύμονες και αποσύνδεσής του από αυτήν στην περιφερική κυκλοφορία σε θέσεις με χαμηλή οξυγόνωση, όπου θα προκαλέσει αγγειοδιασταλτική επίδραση, αυξάνοντας την τοπική αιματική ροή^{5,6}.

Η επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και η γενικότερη σημασία τους

Η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου μετά από μια περίοδο ισχαιμίας προκαλεί την αθρόα παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Αυτό έχει διαπιστωθεί σε πειραματικές μελέτες, αλλά και σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που υποβλήθηκαν σε θρομβόλυση ή αγγειοπλαστική.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχουν σε διεργασίες πρόκλησης κυτταρικής βλάβης, απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου. Η βλάβη προκαλείται μέσω της οξειδωσης μακρομορίων που αποτελούν συστατικά των κυττάρων. Αυτό συμβαίνει, επειδή οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς χημικές ενώσεις που αντιδρούν εύκολα με άλλες ουσίες, λόγω της παρουσίας ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου αντιδρούν ταχέως με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, με τις πρωτεΐνες του κυττάρου και το DNA, με αποτέλεσμα αυτά τα μακρομόρια να υφίστανται οξειδωτική βλάβη και να διαταράσσεται η λειτουργία τους^{22,32}.

Η αντίδραση μεταξύ ελευθέρων ριζών και πολυακόρεστων λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην οξειδωση των τελευταίων με σχηματισμό περοξυ-λιπιδίων, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν δυσμενώς τη λειτουργία πρωτεϊνών της μεμβράνης και τη διαβίβαση βιοχημικών σημάτων. Ιδιαίτερα αντιδραστική και επιβλαβής είναι η ρίζα περυδροξυλίου (perhydroxyl radical- HO₂), που προκύπτει όταν το O₂⁻ προσλάβει ένα ιόν υδρογόνου, δηλαδή ένα πρωτόνιο. Αυτή η ρίζα είναι σχετικά λιπόφιλη και μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες. Συνέπεια αυτών των αντιδράσεων είναι η πρόκληση διαταραχής στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και διαφόρων πρωτεϊνών του κυττάρου²².

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου αντιδρούν επίσης με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα συστήματα μεταφοράς ιόντων μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την διαταραχή της λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή στην ενδοκυτταροπλασματική και ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Συνεπώς και σε αυτό το σημείο διαπιστώνεται σύνδεση μεταξύ των διαφορετικών μηχανισμών που συμμετέχουν στη βλάβη από επαναιμάτωση, στην προκειμένη περίπτωση

μεταξύ της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών και της αυξημένης συγκέντρωσης ασβεστίου στα κύτταρα^{22,30}.

Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της κυτταρικής βλάβης υποστηρίχθηκε από τα ευρήματα αρκετών πειραματικών μελετών. Σε αυτές τις μελέτες η χορήγηση ουσιών που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες συνέβαλε στην ελάττωση της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου (έμφρακτο). Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα αναφέρεται μελέτη, στην οποία σε πειραματικό μοντέλο απόφραξης στεφανιαίας αρτηρίας σε σκύλους, η χορήγηση δισμουτάσης του υπεροξειδίου και καταλάσης πριν από την επαναιμάτωση, προκάλεσε ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου. Χαρακτηριστικά, η προστατευτική δράση διαπιστώθηκε μόνο όταν η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων γινόταν πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης και όχι όταν γινόταν λίγα λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι **η οξειδωτική βλάβη γίνεται πολύ νωρίς, στην αρχή της επαναιμάτωσης**, αφού οι αντιοξειδωτικές ουσίες έπρεπε να είναι ήδη παρούσες από την αρχή της επαναιμάτωσης για να έχουν αποτέλεσμα³³.

Μελέτες στο κυτταρικό επίπεδο, με χρήση μυοκαρδιακών κυττάρων και προσομοίωση των συνθηκών ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, έδωσαν επίσης ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Διαπιστώθηκε ότι οι αντιοξειδωτικές ουσίες μείωσαν το ποσοστό κυτταρικού θανάτου σε τέτοια πειραματικά μοντέλα³⁴.

Επειδή, όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν ευρήματα από μελέτες σε πειραματόζωα που συνδέουν τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου με την πρόκληση μυοκαρδιακής βλάβης, αυτό το εύρημα δημιούργησε στους ερευνητές την προσδοκία της κλινικής εφαρμογής. Δηλαδή, χρειάζεται να διευκρινισθεί αν κάποιες από τις θεραπευτικές παρεμβάσεις που μειώνουν την επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, μπορούν να οδηγήσουν σε ελάττωση της μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας στον άνθρωπο, σε συγκεκριμένες κλινικές περιστάσεις. Τέτοιες περιστάσεις είναι η θρομβόλυση του οξέος εμφράγματος, η αγγειοπλαστική στεφανιαίας αρτηρίας και η εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης⁸.

Η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στη μετάδοση βιοχημικών σημάτων.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου εκτός από την άμεση βλάβη σε μακρομόρια που προκαλούν έχουν και άλλες πιο περίπλοκες επιδράσεις. Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες μετάδοσης ενδοκυττάρων βιοχημικών σημάτων, τα οποία προκαλούν μεταβολές σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Με αυτό τον τρόπο επηρεάζουν και τη λειτουργία διαφόρων παραγόντων μεταγραφής, δηλαδή μορίων που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και τη σύνθεση πρωτεϊνών στα κύτταρα.

Έχει βρεθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου επηρεάζουν τη λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει επειδή, οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν το μηχανισμό μετάδοσης ενδοκυττάρων σημάτων στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος μέσω των ιόντων ασβεστίου. Τα ιόντα ασβεστίου ενεργοποιούν τη δραστηριότητα διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, όπως η PKC και η καλσινευρίνη⁶.

Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου επηρεάζουν τη δραστηριότητα διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, όχι μόνο μέσω του ασβεστίου, αλλά και πιο άμεσα, μέσω οξειδωτικών διεργασιών. Οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνοντας υπολείμματα κυστεΐνης προκαλούν μεταβολές στη στερεοδιάταξη ορισμένων πρωτεϊνών στο χώρο και επηρεάζουν τη λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών. Μία από τις πρωτεϊνικές κινάσες, των οποίων η δραστηριότητα επηρεάζεται από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, είναι η κινάση της τυροσίνης. Η συγκεκριμένη επίδραση έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων⁶.

Ένα παράδειγμα μεσολάβησης οξειδωτικής ουσίας στην ενεργοποίηση πρωτεϊνικής κινάσης είναι το ακόλουθο: Η διέγερση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων από τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF), αλλά και η αυξημένη παρουσία ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, προκαλούν αύξηση της παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, επηρεάζει τη λειτουργία πρωτεϊνικών κινασών, διεγείροντας τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης (διεγείρει δηλαδή την κινάση της τυροσίνης), ενώ ενεργοποιεί επίσης και την κινάση MAPK (mitogen activated protein kinase). Μία άλλη οξειδωτική ουσία που επηρεάζει τη

δραστηριότητα πρωτεϊνικών κινασών είναι η ελεύθερη ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^-), η οποία ενεργοποιεί την κινάση MAPK στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων⁶. Οι κινάσες έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε ορισμένες κυτταρικές βιοχημικές οδούς και διεργασίες. Συνεπώς η επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στη δράση πρωτεϊνικών κινασών, αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι **οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στη μετάδοση βιοχημικών σημάτων μέσα στα κύτταρα** και επηρεάζουν τις διάφορες ενδοκυττάρειες βιοχημικές οδούς^{6,30}.

Μία άλλη ρυθμιστική επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, είναι η επίδρασή τους στην έκφραση ορισμένων γονιδίων. Αυτό γίνεται μέσω της επίδρασής τους σε παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής όπως ο πυρηνικός παράγοντας κάππα Β (NfκB), η AP-1 (ενεργοποιητική πρωτεΐνη -1) και ο PPAP. Οι παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής είναι βιοχημικά μόρια, που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων και κατά συνέπεια τη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών των κυττάρων⁶.

Ο πυρηνικός παράγοντας κάππα Β (NfκB) είναι ένας τέτοιος παράγοντας μεταγραφής, ο οποίος επηρεάζεται από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Αυτός ο παράγοντας μεταγραφής συμμετέχει στη ρύθμιση των διεργασιών της φλεγμονής, της ανοσολογικής απάντησης, της σύνθεσης κυτοκινών και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η εκλεκτική αναστολή του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NfκB) στην καρδιά, σε τρωκτικά, ελαττώνει την έκταση του εμφράκτου μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Συνεπώς, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο παράγοντας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση.

Ο παράγοντας NfκB διατηρείται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα επειδή βρίσκεται σε σύνδεση με ανασταλτική πρωτεΐνη IκB. Η αποσύνδεση του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NfκB) από την παραπάνω ανασταλτική πρωτεΐνη αποτελεί το πρώτο βήμα για την ενεργοποίησή του. Όταν υπάρξουν τα κατάλληλα ερεθίσματα, η ανασταλτική πρωτεΐνη IκB υφίσταται φωσφορυλίωση από μία πρωτεϊνική κινάση, με συνέπεια την αδρανοποίησή της. Τότε ο ενεργοποιημένος πλέον NfκB μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου προκειμένου να επηρεάσει την έκφραση (μεταγραφή) συγκεκριμένων γονιδίων⁶.

Η σημασία του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NfκB) φαίνεται από το γεγονός, ότι κάποια από τα ερεθίσματα που προάγουν την αθηροσκλήρωση, υπάρχουν ενδείξεις ότι το κάνουν αυτό μέσω επίδρασής τους στη δραστηριότητα του NfκB. Τέτοια ερεθίσματα είναι η οξειδωμένη LDL (οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας), διάφορες κυτοκίνες, όπως ο TNFα και η ιντερλευκίνη -1 (IL-1), η αγγειοτασίνη 2, κάποιοι λοιμώδεις παράγοντες και η ιοντίζουσα ακτινοβολία⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου αποτελούν ενδιάμεσο διαβιβαστή σημάτων στη διαδικασία ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NfκB) από ερεθίσματα όπως ο TNFα και η ιντερλευκίνη -1 (IL-1). Αυτό ενισχύεται και από το εύρημα, ότι αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η βιταμίνη Ε, εμποδίζουν την ενεργοποίηση του NfκB. Ο παράγοντας NfκB δρα σε συνέργεια και με άλλους παράγοντες τροποποιητικούς της μεταγραφής, όπως η ενεργοποιητική πρωτεΐνη AP-1. Πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής χρειάζονται και τους δύο αυτούς παράγοντες μεταγραφής προκειμένου να εκφραστούν και να γίνει η σύνθεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Ο παράγοντας NfκB, του οποίου η δράση επηρεάζεται από οξειδωτικές ουσίες (όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κλπ), αλλά και από άλλους παράγοντες, ρυθμίζει τη μεταγραφή περίπου 200 γονιδίων που σχετίζονται με το μηχανισμό της φλεγμονής, τη σύνθεση κυτοκινών και τη σύνθεση προθρομβωτικών παραγόντων, δηλαδή ουσιών που συμμετέχουν στη διαδικασία της θρόμβωσης. Επομένως, αυτός ο παράγοντας, που επηρεάζεται και από τις συγκεντρώσεις των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, συμμετέχει σε παθοφυσιολογικές διεργασίες, που μεταξύ άλλων σχετίζονται και με την αθηροσκλήρωση και την καρδιακή νόσο⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου επηρεάζουν και άλλους παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, όπως η ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1 (AP-1). Η σύνθεση των πρωτεϊνικών υπομονάδων της AP-1 διεγείρεται από οξειδωτικές ουσίες, όπως το υπεροξειδίο. Το υπεροξειδίο, τα οξειδωμένα λιπαρά οξέα και η οξειδωμένη LDL, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της AP-1 στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Συνεπώς, συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, δηλαδή αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, ευνοούν την ενεργοποίηση της AP-1, αφού ευνοούν τη σύνθεση υπεροξειδίου του υδρογόνου και την οξείδωση της LDL και των

λιπαρών οξέων. Η ενεργοποιητική πρωτεΐνη -1 (AP-1) διεγείρει τη μεταγραφή γονιδίων που έχουν σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου επηρεάζουν επίσης τη δράση των υποδοχέων της ομάδας **PPAR**, οι οποίοι με τη σειρά τους σχετίζονται με την παθογένεση φλεγμονωδών αντιδράσεων που προάγουν την αρτηριοσκλήρωση. Η οξειδωμένη LDL ενεργοποιεί τη δράση των υποδοχέων της ομάδας PPAR στα αφρώδη κύτταρα (foam cells) της αθηρωματικής πλάκας. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, δεν παίζουν ρόλο μόνο στις βιοχημικές διεργασίες της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, αλλά έχουν έναν ευρύτερο ρόλο στην παθογένεια της αγγειακής νόσου και της φλεγμονής⁶.

Η εξάρτηση της επίδρασης των ελευθέρων ριζών από τη συγκέντρωσή τους

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και γενικότερα οι αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου (ROS) σε χαμηλές συγκεντρώσεις (δέκα φορές μικρότερες από αυτές που προκαλούν επιβλαβείς επιδράσεις) συμμετέχουν σε καρδιοπροστατευτικούς μηχανισμούς. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν κυτταρική βλάβη και εμπλέκονται στο μηχανισμό πρόκλησης της βλάβης από επαναιμάτωση^{26,30}.

Μία σημαντική δράση των παθολογικά αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, είναι η επίδρασή τους στους **πόρους μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP)**, προκαλώντας τη διάνοιξή τους. Αυτό έχει σαν συνέπεια την έξοδο ουσιών από τα μιτοχόνδρια, όπως το κυτόχρωμα c, οι οποίες προκαλούν την ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης. Επίσης η διάνοιξη αυτών των πόρων επηρεάζει δυσμενώς τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας από τα μιτοχόνδρια, ενώ συμβάλλει και στην οξειδωτική βλάβη του κυττάρου, μέσω της εξόδου οξειδωτικών ουσιών από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα³⁰.

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων (η οποία συμβάλλει και στην παθογένεια της βλάβης από επαναιμάτωση) ως εξής: Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) και ελευθέρων ριζών του οξυγόνου αποτελεί σημαντική αιτία ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Σε περιπτώσεις που υπάρχει

αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου (ROS), αυτές **αντιδρούν με το NO** και το απενεργοποιούν, με αποτέλεσμα να προκαλείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, εξαιτίας της ελάττωσης της διαθεσιμότητας του NO. Αυτή η αντίδραση των ROS με το NO έχει δύο συνέπειες: Ελαττώνεται η διαθεσιμότητα του NO, το οποίο έχει χρήσιμη αγγειοδιασταλτική δράση και παράγονται αζωτούχες ελεύθερες ρίζες με τοξική δράση. Η ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^-), για παράδειγμα, αντιδρά με το NO με αποτέλεσμα να σχηματίζεται περοξυνιτρώδες. Οι αζωτούχες ελεύθερες ρίζες που παράγονται από αυτή την αντίδραση προκαλούν νιτροσυλίωση των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών στη δομή και τη λειτουργία τους^{6,30}.

Επίσης οι ελεύθερες ρίζες εκτός από την άμεση εξουδετέρωση του NO, ελαττώνουν τη δράση του και έμμεσα αντιδρώντας με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα στον οποίο συνδέεται το NO. Έτσι αλλοιώνουν (οξειδώνουν) την περιοχή της πρωτεΐνης με την οποία συνδέεται το NO, ή διαταράσσουν τη διαμόρφωση αυτής της πρωτεΐνης στο χώρο, με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις να ελαττώνεται η δυνατότητα σύνδεσης του μονοξειδίου του αζώτου⁶.

Μία άλλη επίδραση των ελευθέρων ριζών είναι ότι **οξειδώνουν την τετραϋδροβιοπτερίνη** σε διϋδροβιοπτερίνη, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα να στρέφεται η ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου σε περαιτέρω σύνθεση ελευθέρων ριζών, αντί για τη σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου (NO). Η ελάττωση της τετραϋδροβιοπτερίνης λόγω της παραπάνω επίδρασης των ελευθέρων ριζών, συμβάλλει στη διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου, επειδή η τετραϋδροβιοπτερίνη ασκεί ευνοϊκή επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Συγκεκριμένα, η αύξηση της τετραϋδροβιοπτερίνης βελτιώνει τη λειτουργία του ενδοθηλίου μέσω αύξησης της σύνθεσης του NO, αλλά και μέσω ελάττωσης της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου. Επομένως η ελάττωση της συγκέντρωσής της τετραϋδροβιοπτερίνης λόγω της μετατροπής της σε διϋδροβιοπτερίνη, από την επίδραση των ελευθέρων ριζών, έχει τα αντίθετα αποτελέσματα⁶.

Μία ακόμα ένδειξη συμμετοχής των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, είναι το εύρημα ότι η χορήγηση του αντιοξειδωτικού ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου βελτιώνει την προκαλούμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιασταλτική λειτουργία στις

στεφανιαίες αρτηρίες^{6,30}. Η ελαττωμένη ανταπόκριση των αγγείων στην αγγειοδιασταλτική επίδραση της ακετυλοχολίνης αποτελεί ένδειξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και έχει συσχετισθεί με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στο αγγείο και ελαττωμένη δραστηριότητα του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου, που προστατεύει από την επίδραση των ελευθέρων ριζών. Η διαταραχή της αγγειοδιασταλτικής λειτουργίας του ενδοθηλίου είναι μία σημαντική διαταραχή της κυκλοφορίας, επειδή συμμετέχει στην παθογένεια της βλάβης από επαναιμάτωση, αλλά έχει και άλλες επιπτώσεις: Μπορεί να προκαλέσει ισχαιμία του μυοκαρδίου σε συνθήκες αυξημένων μεταβολικών αναγκών, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές στενώσεις στις στεφανιαίες αρτηρίες. Η ύπαρξη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας έχει διαπιστωθεί σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αλλά και σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες για στεφανιαία νόσο ή με περιφερική αρτηριοπάθεια⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μέσω της δυσμενούς επίδρασής τους στη λειτουργία του ενδοθηλίου, συμμετέχουν στην πρόκληση καρδιαγγειακής νόσου. Έτσι, εκτός από τη συμμετοχή τους στην παθογένεση της βλάβης από επαναιμάτωση, συμμετέχουν με διάφορους τρόπους και στην παθογένεση διαφόρων άλλων παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος^{6,31}. Αυτό το γεγονός ενισχύει το ενδιαφέρον για το ρόλο τους και για ενδεχόμενη ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων, μέσω φαρμάκων που επιδρούν στις ελεύθερες ρίζες (πχ τις εξουδετερώνουν, ή μειώνουν την παραγωγή τους). Έτσι, υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών και στην παθογένεση της υπέρτασης, αφού έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή τους σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση, νεφραγγειακή υπέρταση και προεκλαμψία⁶. Ορισμένα αντιυπερτασικά φάρμακα, όπως η καρβεδιλόλη, οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτασίνης υπάρχουν ενδείξεις ότι προκαλούν μέρος των καρδιαγγειακών δράσεών τους μέσω της αντιοξειδωτικής τους επίδρασης και συγκεκριμένα της ελάττωσης του ενδοαγγειακού οξειδωτικού φορτίου⁶.

Ωστόσο, παρά τα δεδομένα που έχουν προκύψει, ιδιαίτερα από πειραματικές μελέτες, για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην παθογένεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου και της καρδιαγγειακής νόσου γενικότερα, οι περισσότερες

κλινικές μελέτες έως τώρα δεν έχουν δείξει σαφές καρδιαγγειακό όφελος από τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών^{6,30}.

Μηχανισμοί προστασίας από τις ελεύθερες ρίζες-αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων οξειδωτικών ουσιών οδηγεί τα κύτταρα να αυξήσουν τη δραστηριότητα των **αμυντικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών**. Τέτοιοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι τα ένζυμα δισμουτάση του υπεροξειδίου εξαρτώμενη από το μαγγάνιο, δισμουτάση του υπεροξειδίου εξαρτώμενη από τον ψευδάργυρο και το χαλκό, η περοξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγάση της γλουταθειόνης και η καταλάση^{6,30}.

Οι δύο παραπάνω μορφές της δισμουτάσης του υπεροξειδίου μετατρέπουν τη ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο έχει πολύ μικρότερη επιβλαβή δράση, δηλαδή σαφώς μικρότερη τοξικότητα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει βλαπτική επίδραση μόνο όταν είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες κανονικά δεν παρατηρούνται στα κύτταρα. Μετατρέπεται σε νερό από την περοξειδάση της γλουταθειόνης και την καταλάση. Έτσι, η ρίζα του υπεροξειδίου που αποτελεί ένα παραπροϊόν των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας, με αυτή τη σειρά των χημικών αντιδράσεων μετατρέπεται σε νερό, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να προστατεύονται από τη βλαπτική της επίδραση²². Εκτός από τους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, στην αντιοξειδωτική άμυνα συμμετέχουν και άλλες ουσίες που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως η βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ και το β-καροτένιο^{6,22}.

Κεντρικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου παίζει η **γλουταθειόνη**. Η γλουταθειόνη αλληλεπιδρά άμεσα με διάφορες οξειδωτικές ουσίες και τις εξουδετερώνει. Κατά τη διαδικασία αυτή μετατρέπεται στην οξειδωμένη μορφή της. Η γλουταθειόνη ανανεώνεται πάλι από την οξειδωμένη μορφή της με την επίδραση του NADPH. Η γλουταθειόνη συμβάλλει επίσης στην αντιοξειδωτική άμυνα και με ένα δεύτερο μηχανισμό. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στην αναγέννηση του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) από την οξειδωμένη μορφή του (δεϋδροασκορβικό οξύ)²².

Το **ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)** είναι σημαντική υδατοδιαλυτή αντιοξειδωτική ουσία, που συμβάλλει στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών στον ενδοκυττάριο και στον εξωκυττάριο χώρο, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από την επίδρασή τους. Επίσης το ασκορβικό οξύ συμβάλλει και στην αναγέννηση της άλφα- τοκοφερόλης από την οξειδωμένη μορφή της. Η άλφα τοκοφερόλη είναι η κύρια λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική ουσία. Προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών από την οξείδωσή τους από τις ελεύθερες ρίζες. Σημειώνεται ότι η οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών από τις ελεύθερες ρίζες οδηγεί σε σημαντική βλάβη των λειτουργιών της μεμβράνης, συνεπώς η αναγέννηση της α-τοκοφερόλης από το ασκορβικό οξύ συμβάλλει στην προστασία έναντι βλάβης στην κυτταρική μεμβράνη¹.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η γλουταθειόνη, μέσω της άμεσης εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, αλλά και με τη συμμετοχή της στην αναγέννηση του ασκορβικού οξέος και της άλφα τοκοφερόλης, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αντιοξειδωτική προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, τόσο στον ενδοκυττάριο χώρο και τις κυτταρικές μεμβράνες, όσο και στον εξωκυττάριο χώρο¹.

Τονίζεται ότι η συγκέντρωση της γλουταθειόνης ελαττώνεται κατά την περίοδο της ισχαιμίας, με συνέπεια την εξασθένηση της αντιοξειδωτικής άμυνας. Επομένως, σε φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχουν αποτελεσματικοί κυτταρικοί μηχανισμοί προστασίας από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. **Όμως, αυτοί οι προστατευτικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εξασθενούν σε συνθήκες ισχαιμίας**, με αποτέλεσμα να μην παρέχουν επαρκή εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, όταν συμβαίνει η αυξημένη παραγωγή τους κατά την επαναιμάτωση, στη διάρκεια της οποίας υπάρχει και πάλι προσφορά οξυγόνου στους ιστούς. Συνεπώς, η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση, επιτείνεται από το γεγονός ότι η προηγηθείσα ισχαιμία προκαλεί εξασθένηση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών των ιστών. Έτσι, κατά την επαναιμάτωση, το μυοκάρδιο, καθώς επίσης και το ενδοθήλιο των αγγείων, είναι περισσότερο ευάλωτο στη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, γεγονός που συντελεί στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση^{1,22}.

Στους μηχανισμούς άμυνας του μυοκαρδίου απέναντι στη βλάβη από επαναιμάτωση, εκτός από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, που προστατεύουν από την επιβλαβή επίδραση των ελεύθερων ριζών, υπάγονται και άλλοι μηχανισμοί όπως η ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού των κινασών σωτηρίας από τη βλάβη επαναιμάτωσης (reperfusion injury salvage kinase -RISK) και η μετσχαιμική προστασία (ischemic post-conditioning). Συνεπώς, οι μηχανισμοί άμυνας απέναντι στη βλάβη από επαναιμάτωση είναι πολλαπλοί, περίπλοκοι και έχουν αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση μεταξύ τους²⁵.

Επιστημονικές ενδείξεις για το ρόλο των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση

Την επιστημονική θεωρία για τον παθογενετικό ρόλο των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση ενισχύουν ορισμένες πειραματικές μελέτες. Συγκεκριμένα, σε διάφορα πειραματικά μοντέλα στεφανιαίας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, η χορήγηση ουσιών που ελαττώνουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, ή τις εξουδετερώνουν, οδήγησε στην ελάττωση της βλάβης του μυοκαρδίου. Η εκτίμηση της έκτασης της μυοκαρδιακής βλάβης γινόταν με τον προσδιορισμό της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου με παθολογοανατομικές μεθόδους (χρώση με χλωριούχο τριφαινυλοτετραζόλιο-TTC) μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (συνήθως ωρών) επαναιμάτωσης.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε ωφέλεια από τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, ήταν το πείραμα που έγινε από τον Jolly και τους συνεργάτες του. Σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας για 90 λεπτά και επαναιμάτωση για 24 ώρες, διαπιστώθηκε ελάττωση του μεγέθους του μυοκαρδιακού εμφράκτου με τη χορήγηση συνδυασμού δισμουτάσης του υπεροξειδίου και καταλάσης. Το ευνοϊκό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν η χορήγηση των δύο αντιοξειδωτικών ενζύμων, που έχουν προστατευτική δράση από τις ελεύθερες ρίζες, άρχιζε 15 λεπτά πριν από την επαναιμάτωση. Αντίθετα δεν υπήρχε αποτέλεσμα όταν η χορήγηση άρχιζε 40 λεπτά μετά την επαναιμάτωση³³. Αυτή η αρχική μελέτη

παρείχε μία ένδειξη ότι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου μετέχουν στην παθογένεια της βλάβης του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Επίσης έδειξε ότι έχει μεγάλη σημασία και ο χρόνος χορήγησης των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες πρέπει να χορηγούνται έγκαιρα, από την αρχή της επαναιμάτωσης.

Αυτό διαπιστώθηκε και σε μεταγενέστερες μελέτες, που ενισχύουν την άποψη ότι η βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες συμβαίνει στην αρχή της επαναιμάτωσης και οι αντιοξειδωτικές ουσίες για να έχουν επίδραση πρέπει να επενεργήσουν στο μυοκάρδιο ήδη από την αρχή της επαναιμάτωσης. Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η βιταμίνη E (και συγγενείς ουσίες), το ασκορβικό οξύ, η N-(2-μερκαπτοπροπιονυλ-γλυκίνη κλπ, σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Σε κάποια πειραματικά πρωτόκολλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών έδειξε ευνοϊκά αποτελέσματα, αλλά σε κάποια άλλα δεν υπήρξε αξιόλογο θεραπευτικό αποτέλεσμα, με συνέπεια να υπάρχει δυσχέρεια στην ερμηνεία των ευρημάτων και στην εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για την έκταση και τη σημασία της επίδρασης των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου στην βλάβη από επαναιμάτωση^{7,22,29,30,35}.

Αυτές οι διαφορές στην αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών στις διάφορες πειραματικές μελέτες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, δείχνουν ότι η επίδραση των δοκιμαζόμενων φαρμάκων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από πολλές παραμέτρους. Τέτοιες παράμετροι είναι το είδος του πειραματοζώου, η διάρκεια της προηγηθείσας ισχαιμίας, η ύπαρξη ή όχι παράπλευρης κυκλοφορίας, η δόση, η οδός και ο χρόνος χορήγησης του δοκιμαζόμενου φαρμάκου.

Τα δεδομένα σχετικά με τη δυνατότητα μείωσης της έκτασης της βλάβης από επαναιμάτωση με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, είναι αρκετά αντιφατικά, με αποτέλεσμα αυτό το ζήτημα να αποτελεί ένα συνεχιζόμενο πεδίο έρευνας. Η σημασία των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση δεν έχει αποσαφηνισθεί, αφού, όπως αναφέρθηκε, παρά τα αρχικά ενθαρρυντικά ευρήματα, υπάρχουν και αρκετές μελέτες που δεν έδειξαν ευνοϊκό αποτέλεσμα από τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών. Ένα παράδειγμα αποτελούν πειράματα σε σκύλους

που υποβλήθηκαν σε 40 ή 90 λεπτά στεφανιαίας ισχαιμίας και τέσσερις ημέρες επαναιμάτωσης. Σε αυτή τη μελέτη δεν παρατηρήθηκε ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου με τη χορήγηση λίγο πριν την επαναιμάτωση δισμουτάσης του υπεροξειδίου, ή της αντιοξειδωτικής ουσίας N-(2-μερκαπτοπροπιονυλ)- γλυκίνης^{29,36}. Μία εξήγηση για τα αντικρουόμενα ευρήματα των πειραματικών μελετών, είναι και η περιπλοκότητα του φαινομένου της βλάβης από επαναιμάτωση, στην οποία εμπλέκονται πολλοί μηχανισμοί, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και όχι μόνο η επίδραση των αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου. Αυτό μπορεί να έχει ενδεχομένως ως αποτέλεσμα μία θεραπεία να επηρεάζει ταυτόχρονα και άλλες αιτιοπαθογενετικές παραμέτρους, με τρόπο όχι ευνοϊκό. Ενδεχομένως να απαιτείται μία θεραπεία με πολυπαραγοντική δράση, ικανή να επηρεάσει ευνοϊκά περισσότερους από έναν παθογενετικούς μηχανισμούς, προκειμένου να υπάρξει θεραπευτικό αποτέλεσμα, το οποίο να είναι μετρήσιμο και μάλιστα με επαναληψιμότητα^{27,29}.

Η διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης των μυοκαρδιακών κυττάρων

Αυτός είναι ένας ακόμη μηχανισμός, για τον οποίο υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι συμμετέχει στη βλάβη από επαναιμάτωση. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα κατά την περίοδο της ισχαιμίας, η οποία επιτείνεται κατά την επαναιμάτωση. Η διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης κατά την επαναιμάτωση οδηγεί, μεταξύ άλλων, σε «σπατάλη ενέργειας» προερχόμενης από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αντί να χρησιμοποιείται αυτή η ενέργεια για τη συστολική λειτουργία του μυοκαρδιακού κυττάρου, καταναλώνεται στην προσπάθεια του κυττάρου να διορθώσει την διαταραχή στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων. Αυτό γίνεται μέσω διαμεμβρανικής μεταφοράς ιόντων, διαδικασία που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας. Ειδικότερα, ενεργοποιούνται τα συστήματα μεταφοράς ασβεστίου στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και το σαρκοπλασματικό δίκτυο, λόγω της αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου^{1,26}.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η επίδραση των ελεύθερων ριζών και η διαταραχή στην ιοντική ομοιόσταση του κυττάρου είναι μηχανισμοί που

σχετίζονται μεταξύ τους. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλεί βλάβη στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης και του σαρκοπλασματικού δικτύου και διαταραχή στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Αυτές οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών μπορούν να συμβάλλουν στην υπερφόρτωση του κυττάρου με ασβέστιο. Επιπρόσθετα, η υπερφόρτωση με ασβέστιο μπορεί να προκαλέσει διαταραχή στην ενδομιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών¹.

Η υπερφόρτωση των μιτοχονδρίων με ασβέστιο σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ενοχοποιούνται για τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας, γεγονός που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βλάβη του κυττάρου. Η αυξημένη ενδομιτοχονδριακή και ενδοκυτταροπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία πρόκλησης του κυτταρικού θανάτου. Προστατευτικοί μηχανισμοί, όπως η ισχαιμική προετοιμασία ή ισχαιμική προπόνηση του μυοκαρδίου (ischemic preconditioning), μέσω ενεργοποίησης μίας σειράς βιοχημικών σημάτων, ελαττώνουν την υπερφόρτωση με ασβέστιο και αναστέλλουν τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας^{26, 27}.

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη βλάβη από επαναιμάτωση

Τα μιτοχόνδρια εκτός από οργανίδια παραγωγής ενέργειας (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αποτελούν επίσης σημαντικό παράγοντα που ρυθμίζει και καθορίζει τη βιωσιμότητα ή το θάνατο του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια μπορούν να κατευθύνουν το κύτταρο προς μία νεκρωτική ή αποπτωτική μορφή κυτταρικού θανάτου. Αυτή η λειτουργία επιτελείται μέσω των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας, που είναι μη εκλεκτικοί διάυλοι (κανάλια) που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η διάνοιξη αυτών των πόρων συμμετέχει στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου κατά την επαναιμάτωση^{25,26,30}.

Ο **πόρος μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore-MPT)** είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, η λειτουργία του οποίου επηρεάζεται από το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης, τη συγκέντρωση ελεύθερων ριζών του οξυγόνου και τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου. Υπό φυσιολογικές

συνθήκες οι πόροι μιτοχονδριακής διαπερατότητας είναι κλειστοί και η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων είναι σχετικά αδιαπέραστη. Αυτό επιτρέπει την απρόσκοπτη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, που εξυπηρετεί την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Οι πόροι ανοίγουν όταν εκπολώνεται η μεμβράνη και όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών- γενικότερα αντιδραστικών ουσιών του οξυγόνου (ROS)- και υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου σε φυσιολογικό pH^{26,30}.

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας οι πόροι είναι κλειστοί, επειδή η ενδοκυττάρια οξέωση και κάποιοι άλλοι παράγοντες (επίπεδα μαγνησίου, χαμηλό pH κλπ), που επικρατούν κατά την ισχαιμία, ευνοούν την παραμονή τους σε κλειστή κατάσταση.

Κατά την επαναιμάτωση υπάρχει αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και ελεύθερων ριζών του οξυγόνου και ελαττωμένη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου. Αυτές οι συνθήκες προκαλούν τη διάνοιξη των πόρων MPTP της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, καθιστώντας την περισσότερο διαπερατή. Εκτός από τα παραπάνω στη διάνοιξη των πόρων συμβάλλει και η ταχεία μεταβολή του pH προς τα φυσιολογικά επίπεδα, γεγονός που επίσης συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση^{25,26}.

Οι πόροι, όταν ανοίξουν, επιτρέπουν τη δίοδο νερού, ηλεκτρολυτών και μορίων μεγέθους μέχρι 1,5 kilodalton. Αυτό προκαλεί την είσοδο διαλυτών ουσιών στα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα την ωσμωτική εισροή ύδατος, την εξοίδηση του εσωτερικού των μιτοχονδρίων και τη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονός που διαταράσσει τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και αναστρέφει τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Τα μιτοχόνδρια μετατρέπονται από παραγωγούς σε καταναλωτές ATP. Η εξοίδηση του μιτοχονδρίου που αναφέρθηκε παραπάνω, τελικά οδηγεί σε ρήξη της εξωτερικής του μεμβράνης με έξοδο μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Μία από τις πρωτεΐνες που ελευθερώνονται είναι το κυτόχρωμα c, το οποίο συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Αυτό αποτελεί έναυσμα για τη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης^{25,26}.

Η παραγωγή **ελεύθερων ριζών οξυγόνου** συνδέεται με τη διαταραχή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Κατά την επαναιμάτωση γίνεται παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα (αλυσίδα μεταφοράς

ηλεκτρονίων της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων), αλλά και σε άλλα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η επαναιμάτωση, με την επάνοδο της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, προκαλεί την απότομη επανενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, της οποίας η λειτουργία έχει προηγουμένως διαταραχθεί από την ισχαιμία. Κατά την επανενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας στη φάση της επαναιμάτωσης, γίνεται αθρόα απελευθέρωση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Οι ελεύθερες ρίζες, που παράγονται, διεγείρουν τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPT) σε συνδυασμό και με τις άλλες βιοχημικές συνθήκες που αναφέρθηκαν. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις, ότι η διάνοιξη αυτών των πόρων συμμετέχει στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση^{1,26}.

Σημαντική ένδειξη για τη συμμετοχή της διάνοιξης των πόρων MPT στο μηχανισμό της βλάβης από επαναιμάτωση αποτελεί η επίδραση ουσιών, που αναστέλλουν τη διάνοιξη αυτών των πόρων, όπως η κυκλοσπορίνη-A και η σανγλιφερίνη-A (sanglifehrin-A). Η κυκλοσπορίνη αναστέλλει τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας εμποδίζοντας τη σύνδεση μίας μιτοχονδριακής ρυθμιστικής πρωτεΐνης, της κυκλοφιλίνης -D στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αυτές οι ουσίες, που αναστέλλουν τη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων MPT, βρέθηκε ότι ασκούν προστατευτική επίδραση από τη μυοκαρδιακή βλάβη, ακόμη και όταν χορηγηθούν μόνο κατά την επαναιμάτωση^{2,5}.

Υπάρχουν και άλλα δεδομένα που καταδεικνύουν, ότι η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPT), παίζει κομβικό ρόλο στην πρόκληση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Μία τέτοια ένδειξη είναι η εξής: Η ελάττωση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, που προσφέρει τόσο η ισχαιμική προετοιμασία, όσο και η επίδραση περιόδων ισχαιμίας μικρής διάρκειας μετά το κύριο ισχαιμικό επεισόδιο, δηλαδή η μετ ισχαιμική προστασία (ischemic postconditioning IPO), προκύπτει από την αναστολή της διάνοιξης των μιτοχονδριακών πόρων MPT. Άλλωστε, με τον ίδιο τρόπο επιδρούν και ορισμένα φάρμακα που «μιμούνται» το μηχανισμό της ισχαιμικής προετοιμασίας^{2,26}.

Η κατανόηση του προστατευτικού ρόλου της μετα-ισχαιμικής προστασίας έχει μεγάλη σημασία για την κατανόηση των μηχανισμών της

βλάβης από επαναιμάτωση και για την προσπάθεια ανεύρεσης αποτελεσματικής θεραπείας. Αυτό ισχύει επειδή η μετα-ισχαιμική προστασία είναι φαινόμενο που επιδρά μόνο στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Οι μηχανισμοί, με τους οποίους η μετα-ισχαιμική προστασία αναστέλλει τη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων MPTP, είναι η διατήρηση πιο όξινου pH κατά την επαναιμάτωση (λόγω των επαναλαμβανόμενων περιόδων ισχαιμίας μικρής διάρκειας), η ελάττωση της συσσώρευσης ασβεστίου, η μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και η ενεργοποίηση της οδού των κινασών σωτηρίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση (RISK). Συγκεκριμένα, η μετα-ισχαιμική προστασία προκαλεί αύξηση της δράσης των κινασών PI-3 και ERK 1 και 2, που συμμετέχουν στην οδό των κινασών σωτηρίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση (RISK). Έχει βρεθεί ότι στη διάρκεια της επαναιμάτωσης, η ενεργοποίηση ορισμένων κινασών είτε από την επίδραση της μετα-ισχαιμικής προστασίας, είτε από τη χορήγηση ορισμένων φαρμάκων έχει καρδιοπροστατευτική επίδραση, γεγονός που συνηγορεί για την ύπαρξη βλάβης που συντελείται στη διάρκεια της επαναιμάτωσης^{27,28}.

Οι πόροι MPT έχουν συμμετοχή όχι μόνο στο μηχανισμό της νέκρωσης του μυοκαρδιακού κυττάρου, αλλά και στο μηχανισμό της απόπτωσης. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XL, χαρακτηρίζονται ως αντιαποπτωτικές, επειδή αναστέλλουν το φαινόμενο της απόπτωσης. Αυτές οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες δρουν μέσω της αναστολής της διάνοιξης των πόρων MPT, είτε με άμεση επίδραση στους πόρους, ή με αναστολή της επίδρασης στους πόρους MPT των ουσιών Bax/Bak, που προάγουν την απόπτωση. Οι δύο τελευταίοι χημικοί μεσολαβητές προάγουν τη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων. Επίσης η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, δεν ελαττώνει μόνο τη βλάβη κατά την επαναιμάτωση, αλλά έχει επίδραση και στη βλάβη κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, αφού ελαττώνει την ισχαιμική οξέωση των κυττάρων και το ρυθμό της μείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP κατά την ισχαιμία²⁶.

Συμπερασματικά, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις, ότι ορισμένοι παράγοντες που ελαττώνουν τη βλάβη κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση (όπως η ισχαιμική προετοιμασία, η μετα-ισχαιμική προστασία και φάρμακα που αναπαράγουν το μηχανισμό της ισχαιμικής προετοιμασίας) δρουν μέσω της ενεργοποίησης των κινασών σωτηρίας (RISK) και παράλληλα μέσω της

αναστολής της διάνοιξης των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP). Επίσης ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση των κυττάρων, αναστέλλουν τη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων, ενώ εκείνες που προάγουν την απόπτωση (Bax/Bak), ευνοούν τη διάνοιξη των πόρων. Όλα αυτά τα δεδομένα δείχνουν τον κομβικό ρόλο που παίζουν οι πόροι μιτοχονδριακής διαπερατότητας στη βλάβη από επαναιμάτωση^{5,26}.

Η φαρμακευτική ενεργοποίηση των κινασών σωτηρίας (RISK) και η αναστολή της διάνοιξης των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας MPTP, κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, περιορίζει τη βλάβη του μυοκαρδίου. Επομένως, πρόκειται για βιοχημικές διεργασίες, που ασκούν καρδιοπροστατευτική δράση εφαρμοζόμενες στη διάρκεια της επαναιμάτωσης, τεκμηριώνοντας και το γεγονός ότι δε συντελείται όλη η βλάβη στη διάρκεια της ισχαιμίας, αλλά μέρος αυτής συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση. Υπάρχουν όμως αρκετές πτυχές αυτών των βιοχημικών διεργασιών, που είναι άγνωστες. Δεν είναι γνωστό, με ποιο τρόπο ορισμένες κινάσες της ομάδας RISK επιφέρουν μεταβολές στους μιτοχονδριακούς πόρους MPTP. Επίσης, δεν είναι γνωστή η ακριβής σύσταση των πόρων MPTP, δηλ το σύνολο των πρωτεϊνών που τους απαρτίζουν και η δομή τους^{8,26}.

Συμμετοχή των ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ουδετερόφιλα, που μεταναστεύουν στην επαναιματούμενη περιοχή του μυοκαρδίου, συμβάλλουν στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση. Μία βασική παρατήρηση που έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στο ρόλο των ουδετεροφίλων, είναι ότι όπου υπάρχει δημιουργία μυοκαρδιακού εμφράκτου πάντοτε παρατηρείται αυξημένη παρουσία ουδετεροφίλων στην περιοχή. Τα λευκοκύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν στο μυοκάρδιο που υπέστη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση μετά από λίγες ώρες από την επαναιμάτωση. Στις πέντε ώρες από την επαναιμάτωση βρίσκονται ήδη σε μεγάλους αριθμούς στην πάσχουσα περιοχή. Πειραματικές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου μετά από αναστολή της προσκόλλησης των

ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο κατά την επαναιμάτωση. Η αναστολή αυτή έγινε με τη χορήγηση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων^{7,23,37}.

Τα ουδετερόφιλα ελευθερώνουν ουσίες που ενεργοποιούν τη φλεγμονή, όπως οι ιντερλευκίνες. Αυτό συντελεί στην πρόκληση βλάβης στα μυοκαρδιακά κύτταρα. Επίσης, υπάρχει συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και στη βλάβη που προκαλείται από τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα, όταν διεγερθούν, αποτελούν μια σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών, μέσω του ενζύμου NADPH οξειδάση που βρίσκεται στις κυτταρικές τους μεμβράνες και παράγει τη ρίζα του υπεροξειδίου. Συνεπώς η επίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην επαναιματούμενη μυοκαρδιακή περιοχή συμβαίνει και μέσω των ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων, που παράγουν ελεύθερες ρίζες. Αυτό το γεγονός συνηγορεί στη διαπίστωση, ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών μηχανισμών πρόκλησης βλάβης από επαναιμάτωση¹.

Αυτή η δράση των ελευθέρων ριζών που ελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα, αφού όπως αναφέρθηκε είναι καθυστερημένη (μετά από ώρες), δεν μπορεί φυσικά να εξουδετερωθεί από αντιοξειδωτικά φάρμακα που χορηγούνται μόνο στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, όπως γίνεται συνήθως στα πειραματικά πρωτόκολλα.

Η επίδραση των ουδετεροφίλων στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Δεν έχει αποσαφηνισθεί σε ποιο ποσοστό η δράση τους αφορά στην απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν ήδη υποστεί νέκρωση και σε ποιο ποσοστό αφορά στην πρόκληση βλάβης βιώσιμων κυττάρων²⁵.

Η επίδραση του συστήματος του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται κατά την επαναιμάτωση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των αναφυλατοξινών C3a, C4a, και C5a, καθώς επίσης και του τελικού συμπλέγματος του συμπληρώματος, το οποίο εναποτίθεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι παράγοντες του συμπληρώματος προκαλούν βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της μεμβράνης. Επίσης οι παράγοντες του συμπληρώματος προκαλούν την απελευθέρωση

του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και ιδιαίτερα ο παράγοντας C5a διεγείρει την προσκόλληση των ουδετεροφίλων στην επαναιματούμενη μυοκαρδιακή περιοχή. Τα ουδετερόφιλα όπως αναφέρθηκε, ελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες που ασκούν βλαπτική επίδραση στα κύτταρα.

Σε ορισμένες παλαιότερες μελέτες η χορήγηση ουσιών που αναστέλλουν τη δράση των παραγόντων του συμπληρώματος, οδήγησε σε ελάττωση της έκτασης του εμφράκτου μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση²⁹.

Η ελαττωμένη διαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου στη μικροκυκλοφορία

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παράγεται από το ενδοθήλιο και έχει προστατευτική επίδραση στην κυκλοφορία. Συγκεκριμένα, έχει ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση, βελτιώνοντας έτσι την αιμάτωση των ιστών. Επίσης, το NO αναστέλλει την προσκόλληση των ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο των αγγείων. Κατά την επαναιμάτωση ισχαιμούντος μυοκαρδίου έχει διαπιστωθεί ελαττωμένη συγκέντρωση NO, με αποτέλεσμα τη λιγότερο αποτελεσματική λειτουργία της μικροκυκλοφορίας. Αυτή η ελάττωση της διαθεσιμότητας του NO οφείλεται αφενός σε ελάττωση της παραγωγής του και αφετέρου στην αδρανοποίησή του από την αντίδραση με την ελεύθερη ρίζα του υπεροξειδίου, η οποία παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κατά την επαναιμάτωση. Επισημαίνεται λοιπόν και εδώ, η συμμετοχή των παραγόμενων κατά την επαναιμάτωση ελευθέρων ριζών στη δυσλειτουργία της μικροκυκλοφορίας, μέσω της αδρανοποίησης του NO. Κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αντιδρά με τη ρίζα του υπεροξειδίου και σχηματίζεται περοξυνιτρώδες. Το περοξυνιτρώδες σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικό, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπάρχουν ενδείξεις ότι ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση^{29,30}.

Η επωφελής δράση του NO κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου έχει διαπιστωθεί από τα αποτελέσματα πειραματικών μελετών. Συγκεκριμένα, σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, η χορήγηση της L-αργινίνης, πρόδρομης ουσίας του NO, οδήγησε σε ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου και σε βελτιωμένη ανάκτηση της μυοκαρδιακής λειτουργίας. Η χορήγηση ενός αναστολέα της συνθάσης του NO, με αποτέλεσμα να

εμποδίζεται η σύνθεση του NO, ακυρώνει την καρδιοπροστατευτική δράση της L-αργινίνης. Αυτό οδηγεί στη διαπίστωση, ότι η επωφελής επίδραση της L-αργινίνης κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου οφείλεται στη χρησιμοποίησή της από τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την παραγωγή του NO²⁹.

Ο ρόλος της ενδοθηλίνης -1

Η ενδοθηλίνη- 1 (ET-1) είναι ένα πεπτίδιο με ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση. Η παραγωγή της και η αγγειοσυσταλτική της επίδραση αυξάνεται κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Από τα ευρήματα πειραματικών μελετών έχουν προκύψει ενδείξεις, ότι κάποιες από τις επιδράσεις της ενδοθηλίνης -1 συμμετέχουν στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση. Συγκεκριμένα η ενδοθηλίνη, επειδή έχει αγγειοσυσπαστική δράση, πιθανώς συμμετέχει στην πρόκληση του φαινομένου της ελαττωμένης επανόδου της αιματικής ροής (no reflow). Επίσης η ενδοθηλίνη- 1 διεγείρει τη συσσώρευση των ουδετεροφίλων στην επαναιματούμενη μυοκαρδιακή περιοχή. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα ουδετερόφιλα πιθανώς συμβάλλουν στην πρόκληση μυοκαρδιακής βλάβης. Η ενδοθηλίνη αυξάνει την παραγωγή υπεροξειδίου στο μυοκάρδιο, ενώ προκαλεί και αύξηση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου. Συνεπώς διαπιστώνεται ότι η αυξημένη ενδοθηλίνη- 1 κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου επηρεάζει και άλλους μηχανισμούς που ενέχονται στην πρόκληση βλάβης. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και η διαταραχή της ενδοκυττάριας ιοντικής ομοιόστασης. Κάποιες μελέτες έδειξαν ελάττωση της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης με την ενδοστεφανιαία ή την ενδοφλέβια χορήγηση διαφόρων αναστολέων της ενδοθηλίνης- 1 σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης^{7,29}.

Πάντως, οι μηχανισμοί που περιγράφονται παραπάνω δεν έχουν διευκρινισθεί πλήρως. Σε κάποια πειραματικά μοντέλα βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση οι αναστολείς των υποδοχέων της ενδοθηλίνης δεν έδειξαν την καρδιοπροστατευτική επίδραση που διαπιστώθηκε σε άλλες πειραματικές μελέτες. Αυτές οι διαφορές στα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών

μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στο είδος του χορηγούμενου αναστολέα των υποδοχέων της ενδοθηλίνης- 1, ή σε διαφορές στην οδό και το χρόνο χορήγησης και γενικά στο σχεδιασμό του εκάστοτε πειραματικού μοντέλου²⁹.

Ο ρόλος του συστήματος της ρενίνης- αγγειοτασίνης.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι στην παθοφυσιολογία της βλάβης του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση συμμετέχει και το σύστημα της ρενίνης- αγγειοτασίνης. Συγκεκριμένα, σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (A-MEA) προκάλεσε την ελάττωση του μεγέθους του μυοκαρδιακού εμφράκτου και των αρρυθμιών επαναιμάτωσης, ενώ συνέβαλλε και στη βελτιωμένη ανάνηψη της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου. Άλλωστε είναι γνωστή η γενικότερη καρδιοπροστατευτική δράση των A-MEA από τις μεγάλες κλινικές μελέτες, στις οποίες αποδείχθηκαν τα οφέλη από τη χορήγησή τους μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Όμως, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η παρατηρούμενη ελάττωση της έκτασης της βλάβης του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση που προκαλείται από τη χορήγηση των A- MEA δεν οφείλεται μόνο στην ελάττωση της παραγωγής της αγγειοτασίνης II που προκαλούν, αλλά και στην αύξηση της συγκέντρωσης της βραδυκινίνης. Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης δεν είναι μόνο υπεύθυνο για τη μετατροπή της αγγειοτασίνης I σε αγγειοτασίνη II, αλλά και για την αποδόμηση της βραδυκινίνης, η οποία έχει καρδιοπροστατευτική δράση.

Η αγγειοτασίνη II σε αυξημένες συγκεντρώσεις έχει δυσμενή επίδραση στην καρδιά και υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει επιβλαβή επίδραση και σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Η αγγειοτασίνη II αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα μυοκαρδιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων και έτσι προκαλεί θετική ινότροπη επίδραση, διαταραχή της διαστολικής λειτουργίας και αγγειοσυσπασση των στεφανιαίων αρτηριών. Οι δράσεις αυτές φαίνεται ότι είναι επιβλαβείς σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, αφού σε πειραματικές μελέτες η χορήγηση αναστολέων του υποδοχέα AT1 της αγγειοτασίνης II ελάττωσε την έκταση της εμφραγματικής περιοχής. Αυτή η

επίδραση παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις που το φάρμακο χορηγήθηκε ενδοφλεβίως πριν από την ισχαιμία, καθώς επίσης και όταν χορηγήθηκε τοπικά στο ισχαιμικό μυοκάρδιο αμέσως πριν από την επαναιμάτωση, ώστε να υπάρχει δυνατότητα επίδρασης του φαρμάκου από την αρχή της επαναιμάτωσης²⁹.

Οι επί μέρους διαταραχές που συμβαίνουν κατά την επαναιμάτωση και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί τους

Ειδικότερα, η βλάβη από την επαναιμάτωση περιλαμβάνει τις παρακάτω επιμέρους διαταραχές:

- 1) Την πρόκληση αρρυθμιών
- 2) Τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την πρόκληση βλάβης της μικροκυκλοφορίας. Μία συνέπεια αυτής της κατάστασης είναι το φαινόμενο της μειωμένης ή και ολοκληρωτικά καταργημένης επανόδου της αιματικής ροής (non reflow) μετά την άρση της απόφραξης της στεφανιαίας αρτηρίας.
- 3) Την εμφάνιση του απόπληκτου μυοκαρδίου (stunned myocardium), το οποίο ενώ είναι βιώσιμο, εμφανίζει παροδική και αναστρέψιμη ελάττωση της συσταλτικότητας.
- 4) Την πρόκληση νέκρωσης κάποιου αριθμού μυοκαρδιακών κυττάρων, τα οποία ήταν βιώσιμα κατά τη χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης, ή την επιτάχυνση της νέκρωσης ορισμένων κυττάρων που έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά την περίοδο της ισχαιμίας^{1,8}.

Η ανάλυση αυτών των επιμέρους διαταραχών και των μηχανισμών που τις προκαλούν είναι απαραίτητη για την κατανόηση της σημασίας του φαινομένου της βλάβης από επαναιμάτωση και για την πρόταση θεραπειών για την αντιμετώπισή της. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση είναι η επίδραση ελευθέρων ριζών και γενικότερα αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), η ενδοκυττάρια συσσώρευση ασβεστίου (υπερφόρτιση με ασβέστιο), η απότομη μεταβολή του pH, η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας και η συσσώρευση ουδετεροφίλων στην περιοχή της βλάβης^{1,8}.

Αρρυθμίες επαναιμάτωσης

Με τον όρο **αρρυθμίες επαναιμάτωσης** περιγράφεται το φαινόμενο της εμφάνισης με αυξημένη συχνότητα κοιλιακών αρρυθμιών κατά τα πρώτα δευτερόλεπτα ή λεπτά της επαναιμάτωσης. Πρόκειται κυρίως για επεισόδια επιταχυμένου ιδιοκοιλιακού ρυθμού, κοιλιακές εκτακτοσυστολές, ριπές κοιλιακής ταχυκαρδίας, ακόμη και κοιλιακής μαρμαρυγής. Σε πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί ότι η απότομη επαναιμάτωση μυοκαρδίου που έχει υποβληθεί σε ισχαιμία για 20-30 λεπτά συχνά προκαλεί την εμφάνιση αρρυθμιών (κοιλιακή ταχυκαρδία, κοιλιακή μαρμαρυγή, ή επιταχυμένος ιδιοκοιλιακός ρυθμός). Όμως, η συχνότητα αυτών των αρρυθμιών ελαττώνεται σημαντικά όταν η ισχαιμία είναι πιο παρατεταμένη χρονικά, ή όταν η επαναιμάτωση δεν είναι απότομη, αλλά σταδιακή.

Στον άνθρωπο παρατηρούνται συχνά αρρυθμίες επαναιμάτωσης στις εξής κλινικές περιπτώσεις: Σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που υποβάλλονται σε θρομβόλυση, ή πρωτογενή αγγειοπλαστική και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Επομένως, η εμφάνιση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης έχει σαφώς διαπιστωθεί και στους ασθενείς, αλλά έχουν παρατηρηθεί κάποιες διαφορές από τα πειραματόζωα, σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης των κακοθών αρρυθμιών επαναιμάτωσης (κοιλιακή ταχυκαρδία και κοιλιακή μαρμαρυγή). Οι αρρυθμίες αυτές παρατηρούνται σε μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς από ότι στα πειραματόζωα. Η διαφορά αυτή εξηγείται από το γεγονός, ότι η επαναιμάτωση σε περιπτώσεις ασθενών που υποβάλλονται σε θρομβόλυση συχνά γίνεται με μεγαλύτερη καθυστέρηση και είναι πιο σταδιακή από ότι στα πειραματικά μοντέλα. Επίσης σε αρκετούς ασθενείς υπάρχει χρονία στεφανιαία νόσος πριν από την εκδήλωση του εμφράγματος, με αποτέλεσμα σε αρκετές περιπτώσεις να υπάρχει παράπλευρη κυκλοφορία, η οποία συμβάλλει στη μείωση της βαρύτητας της ισχαιμίας. Στους ασθενείς, σε αντίθεση με τις πειραματικές μελέτες, υπάρχει αρκετά συχνά το φαινόμενο της ισχαιμικής προετοιμασίας ή ισχαιμικής προπόνησης (ischemic preconditioning), όταν έχουν προηγηθεί μικρότερης διάρκειας και βαρύτητας ισχαιμικά επεισόδια στην ίδια περιοχή του μυοκαρδίου⁴. Η ισχαιμική προετοιμασία ή προπόνηση, όπως αναφέρθηκε, είναι προσαρμοστικός μηχανισμός. Προσφέρει στο μυοκάρδιο μεγαλύτερη

αντοχή σε ένα επόμενο ισχαιμικό επεισόδιο μεγαλύτερης διάρκειας, ενώ ελαττώνει και τη συχνότητα εμφάνισης αρρυθμιών επαναιμάτωσης. Αυτές είναι οι παράμετροι που εξηγούν την εμφάνιση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης σε μικρότερη συχνότητα στους ασθενείς, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα. Πάντως, οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης είναι αρκετά συχνές και στους ασθενείς και αποτελούν μία σημαντική εκδήλωση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου.

Παθογενετικά οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης έχουν συνδεθεί κυρίως με την επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, που εκλύονται στην επαναιματούμενη περιοχή του μυοκαρδίου, με την υπερφόρτωση του κυτταροπλάσματος με ασβέστιο που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση και με τη διαταραχή στη λειτουργία των μιτοχονδρίων^{1,38,39}. Σε κάποιες πειραματικές μελέτες η χορήγηση ουσιών που ελαττώνουν την παραγωγή, ή την επίδραση των ελευθέρων ριζών, όπως η καταλάση, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ και η μεθειονίνη, προκάλεσε την ελάττωση της εμφάνισης αρρυθμιών επαναιμάτωσης^{3,38}. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί σε μελέτες ότι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου προκαλούν ηλεκτροφυσιολογικές διαταραχές στην καρδιά, μέσω της υπεροξειδωσής των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών⁴⁰. Πάντως, η παθογένεση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως.

Φαινόμενο της μη επανόδου της αιματικής ροής, ή μη επαναρροής (non reflow phenomenon)

Αυτό το φαινόμενο περιγράφηκε αρχικά από τους Kloner και συνεργάτες. Κατά την επαναιμάτωση, που ακολουθεί μετά από μία περίοδο αγγειακής απόφραξης, προκαλείται πολλές φορές βλάβη της μικροκυκλοφορίας, δηλαδή των μικρών αγγείων και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Έτσι, παρατηρείται σε αρκετές περιπτώσεις το φαινόμενο, ότι η άρση της αγγειακής απόφραξης δεν οδηγεί πάντα στην πλήρη επάνοδο της αιματικής ροής στην ισχαιμική περιοχή, με συνέπεια η ροή να είναι ελαττωμένη ή κατηργημένη⁴¹.

Ουσιαστικά πρόκειται για ελαττωμένη ροή στα μικρά αγγεία της μυοκαρδιακής περιοχής που υπέστη την επίδραση της ισχαιμίας, παρά την

άρση της απόφραξης στην υπεύθυνη επικαρδιακή στεφανιαία αρτηρία. Σε αυτή την περίπτωση, η αιματική ροή, παρά την άρση της αγγειακής απόφραξης, μπορεί να είναι ελαττωμένη, ή να καταργηθεί τελείως. Το φαινόμενο της μη επανόδου της αιματικής ροής μπορεί να οδηγήσει τελικά στη νέκρωση μυοκαρδίου, που ήταν δυνητικά βιώσιμο κατά τη χρονική στιγμή της λήξης της ισχαιμίας (δηλαδή της έναρξης της επαναιμάτωσης)⁵.

Το φαινόμενο της ελαττωμένης επανόδου της ροής (non reflow) έχει κλινική **προγνωστική σημασία**. Σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα επιπλοκών και συμβάντων κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του ασθενούς που υπέστη το έμφραγμα και με αύξηση του ποσοστού θνητότητας στο ένα έτος. Αντίθετα η αποκατάσταση φυσιολογικής ροής (βαθμού 3 κατά την κατάταξη TIMI), στην επαναιματούμενη στεφανιαία αρτηρία και τους κλάδους της, αποτελεί θετικό προγνωστικό δείκτη που σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση. Ένας δείκτης καλής αποκατάστασης της αιματικής ροής με την επαναιμάτωση είναι η πλήρης υποχώρηση των ανασπάσεων του διαστήματος ST, η οποία έχει συσχετισθεί τόσο με την αποκατάσταση της φυσιολογικής ροής, όσο και με καλή πρόγνωση².

Υπάρχουν ενδείξεις, ότι στην παθογένεια του φαινομένου της μη επανόδου της αιματικής ροής μετέχει η παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση και ιδιαίτερα της ελεύθερης ρίζας του υδροξειδίου. Σε διάφορες μελέτες έχει διαπιστωθεί κατά την επαναιμάτωση η εμφάνιση διαταραχών στη μικροκυκλοφορία, με εξοίδηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και ελαττωμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από το ενδοθήλιο. Το **μονοξείδιο του αζώτου** είναι σημαντικός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας^{4,5}.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί μετανάστευση ουδετεροφίλων στην περιοχή που υποβλήθηκε σε επαναιμάτωση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με σχηματισμό μικροθρόμβων που αποφράσσουν τα τριχοειδή. Συνεπώς το φαινόμενο της μη επανόδου ή της ελαττωμένης επανόδου της αιματικής ροής κατά την επαναιμάτωση αποδίδεται 1) στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δηλαδή την ελάττωση της ικανότητας του ενδοθηλίου να παράγει αγγειοδιασταλτικές ουσίες 2) στην επίδραση των ουδετεροφίλων που μεταναστεύουν στην περιοχή και 3) στο σχηματισμό μικροθρόμβων που

αποφράσσουν τα τριχοειδή. Για τον πρώτο μηχανισμό, δηλαδή για την πρόκληση δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι υπεύθυνες σε μεγάλο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, που παράγονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις κατά την επαναιμάτωση. Σε ότι αφορά την απόφραξη της μικροκυκλοφορίας από θρομβωτικό υλικό, αυτό αποδίδεται στην περιφερική εμβολή μικρών τεμαχίων θρόμβου και αθηρωματικής πλάκας που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία της άρσης της αγγειακής απόφραξης, πχ με αγγειοπλαστική. Αυτά τα υλικά παρασύρονται με την αιματική ροή και φθάνουν στη μικροκυκλοφορία, όπου προάγουν και την περαιτέρω ανάπτυξη θρόμβων μέσω των προθρομβωτικών ουσιών που περιέχουν. Στον περιορισμό της ανάπτυξης μικροθρόμβων αποδίδεται και το όφελος (βελτίωση της έκβασης) που παρέχεται από τη χορήγηση αναστολέων της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάρτηση του ST που υποβάλλονται σε αγγειοπλαστική^{4,5}.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση και την καρδιαγγειακή νόσο. Η ελάττωση της διαθεσιμότητας μονοξειδίου του αζώτου (NO), η οποία έχει δυσμενή επίδραση στην ενδοθηλιακή λειτουργία, προκαλείται από διάφορους μηχανισμούς, από τους οποίους ο σημαντικότερος είναι η αυξημένη αποδόμηση του NO. Άλλοι μηχανισμοί που προκαλούν ελάττωση της διαθεσιμότητας του NO είναι η ελαττωμένη έκφραση (σύνθεση) της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO, καθώς επίσης και η έλλειψη του αναγκαίου υποστρώματος ή των συμπαραγόντων για τη λειτουργία αυτού του ενζύμου, αλλά και η επίδραση διάφορων βιοχημικών σημάτων στο ένζυμο⁶.

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου προκαλούν αυξημένη αποδόμηση του NO, επειδή αντιδρούν με αυτό το μόριο, ενώ επηρεάζουν και τη λειτουργία της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO. Αυτό συμβαίνει επειδή οξειδώνουν την τεραϋδροβιοπτερίνη, που είναι απαραίτητος συμπαραγόντας (cofactor) για τη λειτουργία του ενζύμου⁶. Σε κάποιες μελέτες έχει καταδειχθεί πειραματικά ελάττωση της βαρύτητας της διαταραχής στην επάνοδο της αιματικής ροής με τη χορήγηση από την έναρξη της επαναιμάτωσης ουσιών που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως πχ η δισμουτάση του

υπεροξειδίου. Σε καπνιστές έχει διαπιστωθεί ελαττωμένη αγγειοδιασταλτική απάντηση του ενδοθηλίου, η οποία βελτιώνεται μετά από τη χορήγηση της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ). Συνεπώς, αυτό αποτελεί ένδειξη συμμετοχής των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην παθοφυσιολογία της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας⁶.

Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι η ελαττωμένη δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO προκαλεί όχι μόνο διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου σε ότι αφορά την παραγωγή αγγειοδιασταλτικών ουσιών, αλλά και αύξηση της αθηρογένεσης⁶.

Η αγγειοδιασταλτική λειτουργία του ενδοθηλίου δεν διαταράσσεται μόνο από τις ελεύθερες ρίζες αλλά και από άλλους παράγοντες, όπως τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Αυξημένα επίπεδα LDL προκαλούν ελάττωση της αγγειοδιασταλτικής δράσης του ενδοθηλίου, ενώ η HDL χοληστερόλη έχει την αντίθετη επίδραση⁶.

Αυτές οι επιδράσεις πολλών διαφορετικών παραγόντων στη λειτουργία του ενδοθηλίου καταδεικνύουν ότι η ρύθμισή της είναι περίπλοκη, εξαρτώμενη από διάφορες παραμέτρους. Το ενδοθήλιο είναι ενεργό στοιχείο του κυκλοφορικού συστήματος, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, δηλαδή των λειτουργιών της αγγειοδιαστολής και της αγγειοσύσπασης, μέσω παραγωγής αγγειοδραστικών ουσιών, όπως οι προστακυκλίνες, οι ενδοθηλίνες και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Επίσης το ενδοθήλιο επηρεάζει τις λειτουργίες των αιμοπεταλίων και τις διεργασίες της φλεγμονής και της αθηροσκλήρωσης.

Επιπρόσθετα, έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή και ανοσολογικών μηχανισμών στην πρόκληση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και της βλάβης της μικροκυκλοφορίας. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, την ελευθέρωση κυτοκινών και την επίδραση των ουδετεροφίλων. Σε πειραματικές μελέτες η αφαίρεση των ουδετεροφίλων οδήγησε σε ελάττωση της βαρύτητας του φαινομένου της διαταραχής στην επάνοδο της αιματικής ροής (non reflow) μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση¹.

Απόπληκτο μυοκάρδιο

Μία άλλη εκδήλωση βλάβης από επαναιμάτωση είναι η εμφάνιση του **απόπληκτου μυοκαρδίου** (stunned myocardium), το οποίο παρουσιάζει παροδική διαταραχή της συστολικής λειτουργίας, μετά την αποκατάσταση της αιματικής ροής. Το απόπληκτο μυοκάρδιο εκδηλώνεται κλινικά ως παροδική τμηματική διαταραχή της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου μετά από ένα οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Μία άλλη περίπτωση αποπληξίας του μυοκαρδίου που παρατηρείται στην κλινική πράξη, εμφανίζεται μετά από την καθολική ισχαιμία-επαναιμάτωση του μυοκαρδίου στα πλαίσια καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων. Τότε εκδηλώνεται ως παροδική συνολική (διάχυτη) ελάττωση της συσταλτικότητας της αριστερής κοιλίας.

Αυτό το μυοκάρδιο είναι βιώσιμο και η διαταραχή της συσταλτικότητας υποχωρεί αυτομάτως και πλήρως μετά από κάποιο χρονικό διάστημα ωρών έως μερικών ημερών μετά την επαναιμάτωση. Η διάρκεια αυτής της αναστρέψιμης συστολικής δυσλειτουργίας είναι πολύ μεγαλύτερη από τη διάρκεια της ισχαιμίας που προηγήθηκε. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί σε σκύλους, ότι μετά από 15 λεπτά στεφανιαίας ισχαιμίας, η διάρκεια αυτού του φαινομένου της παροδικής συστολικής δυσλειτουργίας είναι περίπου 24 ώρες⁴².

Συνεπώς, η συστολική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου που παρατηρείται μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση δεν οφείλεται μόνο στη νέκρωση κάποιου τμήματος του μυοκαρδίου, αλλά συμμετέχει στην πρόκλησή της και ένα τμήμα απόπληκτου μυοκαρδιακού ιστού που είναι βιώσιμο και με αναστρέψιμη δυσλειτουργία. Σε πολλές περιπτώσεις αυτό το απόπληκτο μυοκάρδιο ευθύνεται για σημαντικό ποσοστό της αρχικά παρατηρούμενης συστολικής δυσλειτουργίας. Το απόπληκτο μυοκάρδιο χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι είναι βιώσιμο και έχει παροδικά ελαττωμένη συσταλτικότητα παρά το γεγονός ότι έχει αποκατασταθεί η αιματική ροή. Αυτό επιτρέπει τη διάκρισή του από το μυοκάρδιο σε χειμερία νάρκη ή χειμάζον μυοκάρδιο (hibernating myocardium), που είναι επίσης βιώσιμο μυοκάρδιο, με ελαττωμένη συσταλτικότητα, αλλά υπό συνθήκες σημαντικά ελαττωμένης αιματικής ροής.

Το χειμάζον μυοκάρδιο εμφανίζει αποκατάσταση της λειτουργίας του όταν αποκατασταθεί η αιματική ροή⁴³.

Το φαινόμενο του απόπληκτου μυοκαρδίου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και γενικά αντιδραστικών ουσιών του οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), που δημιουργούνται κατά την επαναιμάτωση. Σε πειραματικές μελέτες διαπιστώθηκε ελάττωση της εμφάνισης του φαινομένου του απόπληκτου μυοκαρδίου (stunning), με τη χορήγηση από την αρχή της επαναιμάτωσης φαρμάκων που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Σε πειραματικές μελέτες βρέθηκε μεγάλη διαφορά στην αποτελεσματικότητα ουσιών που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, σε ότι αφορά στην επίδρασή τους στη λειτουργία του μυοκαρδίου, σε σύγκριση με την επίδρασή τους στο μέγεθος της τελικά διαμορφούμενης νεκρωτικής περιοχής (έμφρακτο). Διαπιστώθηκε ότι οι ουσίες που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες είναι αποτελεσματικές στη βελτίωση της συσταλτικότητας μετά την επαναιμάτωση, ενώ είναι σαφώς λιγότερο αποτελεσματικές (και σε πολλές περιπτώσεις αναποτελεσματικές) στη μείωση της έκτασης του εμφράκτου. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου συμμετέχουν περισσότερο στην πρόκληση του φαινομένου του απόπληκτου μυοκαρδίου, παρά για την πρόκληση νέκρωσης του μυοκαρδίου. Η παρατηρούμενη βελτίωση στη συστολική λειτουργία με τη χορήγηση από την αρχή της επαναιμάτωσης φαρμάκων που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, δεν οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ελάττωση της μυοκαρδιακής νέκρωσης, αλλά στην ελάττωση της έκτασης του απόπληκτου μυοκαρδίου⁴⁴.

Επίσης, από πειραματικές μελέτες έχουν προκύψει ενδείξεις, ότι στην παθογένεση του φαινομένου συμμετέχει και η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου, η οποία παρατηρείται στα μυοκαρδιακά κύτταρα κατά την επαναιμάτωση. Η διαταραχή στην ομοιόσταση του ασβεστίου πιθανώς σχετίζεται και με την πρόκληση βλάβης στο σαρκοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου από την επίδραση ελευθέρων ριζών⁴².

Κυτταρικός θάνατος

Η συμμετοχή της επαναιμάτωσης στην πρόκληση **κυτταρικού θανάτου** είναι ένα άλλο είδος βλάβης από επαναιμάτωση που έχει μελετηθεί, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνισθεί πλήρως η έκταση και η σημασία της. Γενικά, υπάρχει σημαντική δυσχέρεια στη διάκριση μεταξύ της βλάβης που προκλήθηκε από την ισχαιμία και της μετέπειτα βλάβης που έγινε κατά την επαναιμάτωση, μετά τη λήξη της ισχαιμικής περιόδου. Έχει αποδειχθεί, ότι η έγκαιρη επαναιμάτωση αποτελεί προϋπόθεση για τη σωτηρία του μυοκαρδίου, με τον περιορισμό της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης. Όμως, υπάρχουν ενδείξεις, ότι θανατηφόρα βλάβη μυοκαρδιακών κυττάρων συμβαίνει και κατά την επαναιμάτωση. Αυτό προκύπτει από τη διαπίστωση σε πειραματικές μελέτες, ότι η χορήγηση ορισμένων φαρμάκων κατά την επαναιμάτωση, ελάττωσε την έκταση της τελικής μυοκαρδιακής νέκρωσης. Μελέτες που κατέδειξαν ελάττωση της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου, από παρεμβάσεις που έγιναν στη διάρκεια της επαναιμάτωσης, συνέβαλαν στην εδραίωση της πεποίθησης, ότι μέρος της μυοκαρδιακής βλάβης συμβαίνει στη διάρκεια της επαναιμάτωσης^{2,8}.

Σε πειραματικές μελέτες έχει βρεθεί, ότι στο έμφραγμα η περιοχή της μυοκαρδιακής νέκρωσης περιβάλλεται από μία ισχαιμική ζώνη μυοκαρδίου που είναι δυνητικά βιώσιμη. Ένα μέρος από αυτά τα ισχαιμικά αλλά βιώσιμα κύτταρα θα σωθεί από την επαναιμάτωση, αλλά κάποιο άλλο μέρος τους μπορεί να υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, συνεπεία του φαινομένου της βλάβης από επαναιμάτωση.

Αναλυτικότερα, το ζήτημα της κυτταρικής νέκρωσης κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, τίθεται ως εξής: Κατά την περίοδο της ισχαιμίας, κάποια μυοκαρδιακά κύτταρα λόγω της ανοξίας θα υποστούν μη-αναστρέψιμες βλάβες, με αποτέλεσμα να είναι αναπόφευκτη η τελική νέκρωσή τους. Όμως ένα ποσοστό από τα κύτταρα της ισχαιμικής περιοχής του μυοκαρδίου, θα υποστούν βιοχημικές μεταβολές, αλλά θα παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα δυνητικώς βιώσιμα. Η επαναιμάτωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση διάσωσης αυτών των δυνητικώς βιώσιμων κυττάρων. Ωστόσο, κάποιο ποσοστό από αυτά τα δυνητικώς βιώσιμα κύτταρα

θα καταστραφεί κατά την επανοξυγόνωση της ισχαιμούσας περιοχής, εξαιτίας βλάβης που προκαλείται στην περίοδο της επαναιμάτωσης, ενώ τα υπόλοιπα τελικά θα επιβιώσουν. Ο περιορισμός της βλάβης επαναιμάτωσης θα μπορούσε επομένως να συμβάλλει στη διάσωση μεγαλύτερου ποσοστού των δυνητικά βιώσιμων κυττάρων και επομένως μεγαλύτερης έκτασης του μυοκαρδίου^{1,31,42}.

Εκτός από τη σωτηρία μεγάλου αριθμού βιώσιμων κυττάρων, αλλά και την πρόκληση βλάβης σε κάποιο μικρότερο αριθμό κυττάρων, υπάρχουν ενδείξεις ότι η επαναιμάτωση έχει και μια άλλη επίδραση. Συγκεκριμένα, επιταχύνει το θάνατο μυοκαρδιακών κυττάρων, που έχουν ήδη υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά την ισχαιμία. Αυτή η τελευταία επίδραση δεν μπορεί να θεωρηθεί ως συμμετοχή της επαναιμάτωσης στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για απλή επιτάχυνση της νέκρωσης κυττάρων, των οποίων η απώλεια είναι αναπόφευκτη. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η μεγαλύτερη και πιο καθοριστική κυτταρική βλάβη προκαλείται από την ισχαιμία. Ο θάνατος μυοκαρδιακών κυττάρων κατά την επαναιμάτωση, δεν περιλαμβάνει μόνο νέκρωση βιώσιμων κυττάρων σαν συνέπεια της βλάβης από επαναιμάτωση, αλλά σε σημαντικό ποσοστό οφείλεται σε επιτάχυνση της νέκρωσης κατά την επαναιμάτωση, κυττάρων, τα οποία έχουν ήδη υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά την προηγηθείσα ισχαιμία²⁹.

Εκτός από τα κύτταρα του μυοκαρδίου, και τα κύτταρα του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αρτηριών μπορούν ως συνέπεια της βλάβης από επαναιμάτωση να εμφανίσουν παροδική διαταραχή της λειτουργίας τους, ή μόνιμη βλάβη. Η θανατηφόρα βλάβη από επαναιμάτωση παρουσιάζεται σε μυοκαρδιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα^{1,42}.

Ο τρόπος απώλειας μυοκαρδιακών κυττάρων που συμβαίνει μετά από την αλληλουχία ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, περιλαμβάνει τρεις μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, την απόπτωση (apoptosis), την αυτοφαγία (autophagy) και τη νέκρωση (necrosis). Οι μηχανισμοί αυτοί θεωρήθηκαν αρχικά σχετικά ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Πρόσφατα όμως διαπιστώθηκε ότι η νέκρωση και η απόπτωση παρά το γεγονός ότι αποτελούν διαφορετικούς τρόπους κυτταρικού θανάτου, δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Βρέθηκε ότι

κάποιοι παράγοντες που αναστέλλουν το μηχανισμό της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χωρίς στοιχεία φλεγμονής), αναστέλλουν και τις διεργασίες της κυτταρικής νέκρωσης^{25,29}.

Η **νέκρωση** των κυττάρων συνήθως συμβαίνει στην κεντρική ζώνη της μυοκαρδιακής περιοχής που υπέστη ισχαιμία και επαναιμάτωση. Αποτελεί διαδικασία που δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας και χαρακτηρίζεται από εξοίδηση των κυττάρων με τελική ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον η κυτταρική νέκρωση διεγείρει μία φλεγμονώδη αντίδραση με διήθηση της περιοχής από μακροφάγα και διέγερση της δραστηριότητας των ινοβλαστών^{25,26}.

Η **απόπτωση** αποτελεί μία διαφορετική διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Χαρακτηρίζεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1972 από τους Wyllie και συνεργάτες. Η απόπτωση οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο μέσω μίας σειράς προγραμματισμένων βιοχημικών διεργασιών, που απαιτούν κατανάλωση ενέργειας και τελικά επιφέρουν τη συρρίκνωση του κυττάρου και την κατάτμηση του γενετικού του υλικού (DNA) και άλλων κυτταρικών συστατικών. Το κύτταρο συρρικνώνεται και τελικά η μεμβράνη του εμφανίζει προσεκβολές που ελευθερώνουν αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies), που περιέχουν κυτταρικά συστατικά. Τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρώνονται από άλλα κύτταρα. Σε αντίθεση με όσα συμβαίνουν στην κυτταρική νέκρωση, κατά την απόπτωση δεν διεγείρεται ο μηχανισμός της φλεγμονής, επειδή δεν ελευθερώνονται ενδοκυττάρια συστατικά, ούτε διεγείρεται η δημιουργία ινώδους ιστού^{25,26}.

Στο μηχανισμό της απόπτωσης κεντρικό ρόλο παίζει η ενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων, με δράση πρωτεάσης κυστεΐνης, που λέγονται κασπάσες. Αυτά τα ένζυμα διενεργούν την κατάτμηση του DNA και άλλων κυτταρικών συστατικών, όπως κάποιες πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων και του κυτταροσκελετού. Οι κασπάσες ενεργοποιούνται κατά την επαναιμάτωση και κατά την ισχαιμία. Η κασπάση-9 ενεργοποιείται κατά την ισχαιμία, αλλά και κατά την επαναιμάτωση, ενώ η κασπάση 8 κατά την επαναιμάτωση²⁶.

Σοβαρή ένδειξη της συμμετοχής της απόπτωσης στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση αποτελεί το γεγονός, ότι η έλλειψη ή αναστολή των προαποπτωτικών πρωτεϊνών (δηλαδή των πρωτεϊνών που συμμετέχουν

στο μηχανισμό της απόπτωσης), ή η αυξημένη σύνθεση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (που αναστέλλουν την απόπτωση) περιορίζει τον κυτταρικό θάνατο από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Σε ότι αφορά τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bcl-2, υπάρχουν σημαντικές πειραματικές ενδείξεις ότι η ενεργοποίησή τους, ή η αυξημένη έκφρασή τους, δεν αναστέλλει μόνο την απόπτωση, αλλά και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως η νέκρωση. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση ουσιών που αναστέλλουν τις κασπάσες μειώνουν την έκταση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, αλλά η αύξηση της έκφρασης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών επιτυγχάνει μεγαλύτερο αποτέλεσμα. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες προστατεύουν και από άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου²⁵. Υπάρχουν δύο οδοί απόπτωσης η εξωγενής και η ενδογενής. Αυτές οι δύο οδοί έχουν αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Η εξωγενής οδός της απόπτωσης, αρχίζει με την ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, που λέγονται υποδοχείς κυτταρικού θανάτου (death receptors). Η διέγερση αυτών των υποδοχέων από ορισμένα ερεθίσματα προκαλεί την ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 και της προκασπάσης-3, με συνέπεια τη μετατροπή τους σε δραστικές κασπάσες. Αυτές προκαλούν τη λύση διαφόρων κυτταρικών συστατικών και τελικά το θάνατο του κυττάρου⁸.

Επίσης υπάρχει και η ενδογενής οδός της απόπτωσης, στην οποία μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια βιοχημικά σήματα που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Αυτά τα σήματα μεταφέρονται μέσω προαποπτωτικών πρωτεϊνών, δηλαδή πρωτεϊνών που ενεργοποιούν το μηχανισμό της απόπτωσης (Bax, Bak, Bid και Bad) Παράλληλα, όμως, υπάρχει και η επίδραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών που τείνουν να αναστείλουν τη διαδικασία της απόπτωσης (Bcl-2 και Bcl-XL). Διάφορα ενδοκυττάρια ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης και της επίδρασης οξειδωτικών ουσιών (ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου), προκαλούν την ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak και την επίδρασή τους στα μιτοχόνδρια. Αυτό οδηγεί σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, που απελευθερώνουν πρωτεΐνες που ευνοούν την απόπτωση (κυτόχρωμα c και Smac), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Μία άλλη σημαντική οδός, που οδηγεί στην απόπτωση, περιλαμβάνει την επίδραση επιβλαβών ερεθισμάτων στο

ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε αυτή την περίπτωση απελευθερώνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο κασπάση-12, γεγονός που προκαλεί την ενεργοποίηση των κασπασών 3, 7, και 9^{8,26}.

Η διαδικασία της απόπτωσης αρχίζει σύντομα μετά την έναρξη της ισχαιμίας και ενισχύεται κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Η υπόθεση ότι η βλάβη από την επαναιμάτωση συμμετέχει στην πρόκληση απόπτωσης, ενισχύεται από τα ευρήματα ορισμένων πειραματικών μελετών. Στις μελέτες αυτές, με τη χορήγηση από την αρχή της επαναιμάτωσης ουσιών που αναστέλλουν την απόπτωση, παρατηρήθηκε περιορισμός της απόπτωσης και της έκτασης της μυοκαρδιακής περιοχής που τελικά υφίσταται βλάβη^{5,6}.

Παράδειγμα αποτελεί μία μελέτη σε απομονωμένες καρδιές ποντικών, που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση. Σε αυτή τη μελέτη, η αναστολή στην αρχή της επαναιμάτωσης της δράσης της κασπάσης, πρωτεάσης που συμμετέχει στην αποπτωτική διαδικασία, οδήγησε σε περιορισμό του μεγέθους του τελικού εμφράκτου⁴⁵. Υπάρχουν ενδείξεις ότι στην πρόκληση της απόπτωσης συμβάλλουν η ενδοκυττάρια υπερφόρτωση με ασβέστιο και η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, που παρατηρούνται κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Μία ένδειξη για τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών στην παθογένεση της απόπτωσης αποτελούν τα ευρήματα ορισμένων πειραματικών μελετών. Σε αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε ελάττωση της απόπτωσης μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία και επαναιμάτωση, με τη χορήγηση δισμουτάσης του υπεροξειδίου και καταλάσης, ενζύμων που συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών²⁹.

Η **αυτοφαγία** (autophagy) είναι ένας άλλος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου, ο οποίος υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει σε κάποιο βαθμό στην πρόκληση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Η αυτοφαγία αποτελεί έναν μηχανισμό που χρησιμεύει στη διάλυση και απομάκρυνση κυτταρικών συστατικών που έχουν υποστεί βλάβη, όπως τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά και ένα μηχανισμό που ενεργοποιείται σε περιπτώσεις στέρσης θρεπτικών συστατικών. Η εκτεταμένη αυτοφαγία μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο. Σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης παρατηρείται αυξημένη αυτοφαγία. Μία ένδειξη συμμετοχής της αυτοφαγίας στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση είναι η παρακάτω:

Σε μία πειραματική μελέτη διαπιστώθηκε ότι η ελάττωση της μπεκλίνης-1 (beclin1), μίας πρωτεΐνης που διεγείρει την αυτοφαγία, μειώνει τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης (8)

Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου, όπως συμβαίνει σε συνθήκες ισχαιμίας, προκαλεί αύξηση της αυτοφαγίας. Υπάρχει σύνδεση μεταξύ της αυτοφαγίας και άλλων μορφών κυτταρικού θανάτου, μέσω της αλληλεπίδρασης διαφόρων μορίων που μεταφέρουν τα βιοχημικά σήματα σε αυτές τις διεργασίες. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, που συμβαίνει μέσω της αύξησης του ασβεστίου, συμβάλλει και στη διέγερση της απόπτωσης. Η αύξηση του ασβεστίου προκαλεί ενεργοποίηση της καλπαΐνης, μίας πρωτεάσης (δηλαδή ενός ενζύμου που διασπά άλλες πρωτεΐνες αποκόπτοντας συγκεκριμένους πεπτιδικούς δεσμούς). Αυτή η συγκεκριμένη πρωτεάση συμμετέχει στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας, αλλά και του μηχανισμού της απόπτωσης²⁵.

Μέρος του κυτταρικού θανάτου προκαλείται κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, όπως δείχνουν ορισμένες πειραματικές μελέτες, στις οποίες ελαττώθηκε η έκταση του εμφράκτου από θεραπευτικές παρεμβάσεις που έγιναν στην αρχή της επαναιμάτωσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μελετών, είναι τα εξής: Σε αναισθητοποιημένους σκύλους που υποβλήθηκαν σε πλήρη απόφραξη μίας στεφανιαίας αρτηρίας για 90 λεπτά, η έγχυση αδενοσίνης μέσα στην στεφανιαία αρτηρία κατά την επαναιμάτωση ελάττωσε το μέγεθος του εμφράκτου και βελτίωσε τη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Οι Gross και συνεργάτες έδειξαν σε πειραματική εργασία, ότι η χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων των οπιοειδών κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης μπορεί να περιορίσει το μέγεθος του εμφράκτου,. Επίσης, η χορήγηση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης σε κάποιες πειραματικές μελέτες προκάλεσε μείωση του μεγέθους του εμφράκτου και βελτίωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας⁴².

Άλλα παραδείγματα θεραπευτικών παρεμβάσεων στην αρχή της επαναιμάτωσης, που έδειξαν περιορισμό της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης σε πειραματικό επίπεδο είναι τα παρακάτω: η μετα-ισχαιμική προστασία (postconditioning), η χορήγηση αναστολέων της ανταλλαγής ιόντων Na-H, η χορήγηση αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης C δέλτα

(PKCδ), η χορήγηση αναστολέων των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPT) και η αναστολή της GSK-3β (κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου - 3β), κλπ.²⁵.

Τέτοιες πειραματικές παρεμβάσεις έδειξαν μείωση της μυοκαρδιακής βλάβης από επαναιμάτωση, όταν εφαρμόζονταν στην αρχή (στα πρώτα δευτερόλεπτα) της επαναιμάτωσης. Συνεπώς αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι στην αρχή της επαναιμάτωσης συμβαίνουν σημαντικά γεγονότα, τα οποία αν επηρεαστούν από θεραπευτικές ενέργειες, μπορεί να υπάρξει ελάττωση της έκτασης του εμφράκτου. Μία τέτοια προοπτική έχει μεγάλη κλινική σημασία. Όμως, από τις μελέτες διαπιστώθηκε ότι κατά κανόνα βασική προϋπόθεση για να υπάρχει θεραπευτικό αποτέλεσμα, είναι η έναρξη της καρδιοπροστατευτικής θεραπείας στα πρώτα δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης. Αυτό κλινικά είναι εφικτό μόνο σε περιπτώσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, ή αγγειοπλαστικής των στεφανιαίων αρτηριών²⁵.

Αντίθετα, θεραπευτικές παρεμβάσεις που εφαρμόζονται μετά τα 5-10 πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης δεν προσφέρουν αξιόλογη προστατευτική δράση. Επίσης σημειώνεται ότι οι μελέτες που έδειξαν αποτελεσματικότητα διαφόρων θεραπειών στην αρχή της επαναιμάτωσης χρησιμοποιούσαν διάρκεια ισχαιμίας που δεν ήταν πολύ παρατεταμένη. Σε αρκετές περιπτώσεις στην κλινική πράξη, η διάρκεια της ισχαιμίας είναι μεγαλύτερη από ότι στις πειραματικές μελέτες²⁵.

Ισχυρό στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της πρόκλησης θανατηφόρου βλάβης αριθμού μυοκαρδιακών κυττάρων στη διάρκεια της επαναιμάτωσης είναι το φαινόμενο της μετα-ισχαιμικής προστασίας (IPO) που έχει αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο. Σε αυτό το φαινόμενο, τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια ισχαιμίας βραχείας διάρκειας, που διακόπτουν την επαναιμάτωση μετά το κύριο ισχαιμικό επεισόδιο, έχει δειχθεί ότι επιφέρουν σημαντική ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου. Επομένως, πρόκειται για ένα είδος καρδιοπροστασίας που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση, μετά το κύριο ισχαιμικό επεισόδιο^{2,5,26}.

Η καρδιοπροστατευτική επίδραση, τόσο στην περίπτωση της μετα-ισχαιμικής προστασίας (IPO), όσο και στην ισχαιμική προετοιμασία (ισχαιμική προπόνηση) γίνεται μέσω της ενεργοποίησης μιας ομάδας ενζύμων, όπως

είναι ορισμένες **κινάσες**. Γενικότερα, οι κινάσες καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων από μόρια υψηλής ενέργειας που περιέχουν τέτοιες ομάδες (όπως το ATP) σε συγκεκριμένα μόρια, τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα αυτών των ενζύμων. Ως γνωστόν, αυτή η χημική αντίδραση λέγεται φωσφορυλίωση. Η μεγάλη σημασία αυτών των ενζύμων, οφείλεται στο γεγονός ότι η φωσφορυλίωση ενός μορίου (πχ πρωτεΐνης, λιπιδίου, υδατάνθρακα) μεταβάλλει τη βιοχημική του δράση και τη δυνατότητά του να συνδέεται ή να αντιδρά με άλλα μόρια. Με αυτό τον τρόπο οι κινάσες επηρεάζουν το μεταβολισμό, τη λειτουργία διαφόρων κυτταρικών πρωτεϊνών και τη μετάδοση ενδοκυττάρων βιοχημικών σημάτων⁴⁶.

Ειδικότερα, οι συγκεκριμένες κινάσες που συμμετέχουν στους καρδιοπροστατευτικούς μηχανισμούς της ισχαιμικής προετοιμασίας και της μετα-ισχαιμικής προστασίας, αποκαλούνται **«κινάσες σωτηρίας για τη βλάβη επαναιμάτωσης» (reperfusion injury salvage kinases-RISK)**. Οι κινάσες σωτηρίας (RISK) είναι μία ομάδα πρωτεϊνικών κινασών, που ενεργοποιούνται κατά την επαναιμάτωση και συμβάλλουν στην ελάττωση του τελικού μεγέθους του εμφράκτου. Σε αυτές τις κινάσες σωτηρίας περιλαμβάνονται η κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3 (PI3-K), η πρωτεϊνική κινάση B (Akt) και οι κινάσες ERK1/2 (κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα)²⁵. Υπάρχουν διαδοχικά βήματα στην ενεργοποίηση αυτών των κινασών. Οι κινάσες ERK 1 και 2 και η Akt φωσφορυλιώνονται από την κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-3 (PI-3) και αποτελούν μεσολαβητές στους μηχανισμούς προστασίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση. Οι κινάσες MAPK, ERK-1, ERK-2 ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση και έχουν αντιαποπτωτική δράση, δηλαδή περιορίζουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τόσο η ισχαιμική προετοιμασία (ισχαιμική προπόνηση του μυοκαρδίου) όσο και η μετα-ισχαιμική προστασία, έχει βρεθεί ότι αυξάνουν τη φωσφορυλίωση (και με αυτό τον τρόπο την ενεργοποίηση) των κινασών ERK-1 και ERK-2, οι οποίες λέγονται κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα²⁵. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ισχαιμική προετοιμασία (ισχαιμική προπόνηση) και η μετα-ισχαιμική προστασία παρουσιάζουν ομοιότητες στο μηχανισμό της καρδιοπροστατευτικής επίδρασής τους^{5,26}.

Ο ρόλος των κινασών σωτηρίας (RISK) στην καρδιοπροστασία κατά τη φάση της επαναιμάτωσης επιβεβαιώνεται από το γεγονός, ότι η αναστολή

τους από κάποιες φαρμακευτικές ουσίες ακυρώνει την προστατευτική επίδραση τόσο της ισχαιμικής προετοιμασίας, όσο και της μετα-ισχαιμικής προστασίας. Επιπλέον, πειραματικές μελέτες, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση αυτών των κινασών από κάποιες φαρμακευτικές ουσίες κατά την επαναιμάτωση, ελαττώνει την τελική βλάβη από επαναιμάτωση⁵.

Οι κινάσες σωτηρίας για τη βλάβη επαναιμάτωσης (RISK) παρέχουν προστατευτική δράση μέσω μιας σειράς από επιδράσεις, όπως η ελάττωση της υπερφόρτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων με ασβέστιο, η αναστολή της διάνοιξης των πόρων MPTP των μιτοχονδρίων (πόροι μιτοχονδριακής διαπερατότητας) και η διέγερση μηχανισμών περιορισμού της απόπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η φαρμακευτική ενεργοποίηση της οδού των κινασών RISK ερευνάται σαν μία ενδεχόμενη θεραπευτική λύση για τον περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση. Φάρμακα που ενεργοποιούν αυτή την οδό, όπως η ατορβαστατίνη, το νατριουρητικό πεπτιδίο των κόλπων (ANP) και η ερυθροποιητίνη σε πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στον περιορισμό της έκτασης του εμφράκτου⁵.

Υπάρχουν και άλλα ένζυμα που έχουν προστατευτικό ρόλο από τη βλάβη επαναιμάτωσης. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η **ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου**. Αυτή η συνθάση παράγει μονοξείδιο του αζώτου στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, ουσία που αναστέλλει τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων του αγγειακού τοιχώματος. Επίσης, έχει ανασταλτική επίδραση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Με αυτό τον τρόπο ασκεί αγγειοδιασταλτική και αντιθρομβωτική δράση³⁰.

Επίσης, προστατευτικό ρόλο διαδραματίζει και η **ομάδα των πρωτεϊνικών κινασών C (PKC)**. Αυτές οι κινάσες ενεργοποιούνται από την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου και της διακυλογλυκερόλης και συμμετέχουν σε οδούς μετάδοσης ενδοκυττάρων μηνυμάτων, επηρεάζοντας τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών²⁵.

Όπως αναφέρθηκε, το όφελος από την επαναιμάτωση είναι σαφώς μεγαλύτερο από τη βλάβη που προκαλεί. Η βλάβη από την επαναιμάτωση μπορεί να γίνει κατανοητή σαν το κόστος που πληρώνουμε για τα οφέλη της επαναιμάτωσης του ισχαιμικού ιστού. Η κατανόηση του μηχανισμού της

βλάβης από επαναιμάτωση και η ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων για τον περιορισμό αυτής της βλάβης μπορεί να συμβάλλει στη μεγιστοποίηση της ωφέλειας από την επαναιμάτωση.

Διαφορές ανάμεσα στα πειραματόζωα και τους ανθρώπους

Η απουσία ευνοϊκών αποτελεσμάτων σε πολλές μελέτες περιορισμού της έκτασης της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση σε ανθρώπους, συχνά σε αντίθεση με τα ευρήματα αντίστοιχων μελετών σε πειραματόζωα, έχει αποδοθεί σε διάφορες πιθανές αιτίες. Υπάρχουν ορισμένες διαφορές στις συνθήκες της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης που ισχύουν στα πειραματόζωα σε σχέση με τις συνθήκες που υπάρχουν στην κλινική πράξη. Στις μελέτες χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα, ενώ οι ασθενείς με έμφραγμα με ανάσπαση ST (STEMI) είναι ηλικιωμένοι με αθηρωματικά αγγεία. Επιπλέον σε αρκετούς ασθενείς που εμφανίζουν έμφραγμα στα πλαίσια χρόνιας αθηρωματικής νόσου των στεφανιαίων αρτηριών, μπορεί να υπάρχει παράπλευρη κυκλοφορία, ποικίλης έκτασης. Οι ασθενείς σε αντίθεση με τα πειραματόζωα λαμβάνουν παράλληλα θεραπευτική αγωγή με διάφορα φάρμακα, τα οποία είναι ενδεχόμενο να επηρεάζουν τις περίπλοκες βιοχημικές διεργασίες της καρδιοπροστασίας με διάφορους τρόπους.

Επίσης στους ασθενείς **η διάρκεια της ισχαιμίας** ποικίλλει, ενώ τα πειραματόζωα υποβάλλονται σε ισχαιμία σχετικά μικρής διάρκειας 30-90 λεπτών. Στις περισσότερες μελέτες δεν υπήρχε αυστηρό κριτήριο εισαγωγής των ασθενών σχετικά με τη διάρκεια της ισχαιμίας. Είναι πιθανό ότι **η διάρκεια της ισχαιμικής περιόδου**, πρέπει να βρίσκεται εντός ορισμένων ορίων για να παρατηρηθεί ελάττωση στη βλάβη από επαναιμάτωση, με την επίδραση θεραπευτικών παρεμβάσεων. Έτσι, σε ασθενείς που προσέρχονται για θεραπεία πολύ νωρίς και τυγχάνουν πολύ έγκαιρης επαναιμάτωσης, το τελικό έμφρακτο είναι μικρό με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν περιθώρια να φανεί μετρήσιμο όφελος από κάποια επιπρόσθετη θεραπεία. Σε ότι αφορά τους ασθενείς που προσέρχονται στο νοσοκομείο με αρκετά μεγάλη καθυστέρηση από την έναρξη των συμπτωμάτων της ισχαιμίας, φαίνεται να ισχύει το εξής:

Σε αυτούς τους ασθενείς, η δυνατότητα σωτηρίας μυοκαρδίου από θεραπευτικές παρεμβάσεις που γίνονται κατά την επαναιμάτωση είναι μικρή, αφού η παρατεταμένη ισχαιμία έχει ήδη προκαλέσει μη αναστρέψιμη βλάβη σε μεγάλη έκταση του μυοκαρδίου^{8,23}.

Επομένως, για να υπάρχει αξιόλογο θεραπευτικό όφελος από την εφαρμογή θεραπειών περιορισμού της βλάβης από επαναιμάτωση πρέπει η διάρκεια της προηγηθείσας ισχαιμίας να βρίσκεται εντός κάποιων χρονικών ορίων (ούτε πολύ βραχεία, ούτε πολύ παρατεταμένη). Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις ο ακριβής χρόνος έναρξης του κυρίου επεισοδίου ισχαιμίας είναι δύσκολο να προσδιορισθεί στους ασθενείς, οι οποίοι μπορεί να έχουν παρουσιάσει κάποιο στηθαγχικό επεισόδιο πριν από το κυρίως στεφανιαίο επεισόδιο, ή μπορεί να υπάρχει διαλείπουσα αυτόματη επαναιμάτωση πριν από την κύρια περίοδο της ισχαιμίας.

Ένας άλλος παράγοντας που ενδεχομένως ενέχεται στις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των πειραματικών και των κλινικών μελετών είναι το γεγονός ότι η σχετικά ακριβής εκτίμηση του μεγέθους του εμφράκτου είναι πιο δυσχερής στους ανθρώπους, από ότι στα πειραματόζωα, παρά την πρόοδο στις απεικονιστικές εξετάσεις.

Μία επιπλέον σημαντική παράμετρος που διαφοροποιεί τις πειραματικές από τις κλινικές μελέτες είναι και **ο χρόνος έναρξης της δοκιμαζόμενης καρδιοπροστατευτικής παρέμβασης**. Στις περισσότερες κλινικές μελέτες η έναρξη της δοκιμαζόμενης παρέμβασης γίνεται μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Αντίθετα στις περισσότερες μελέτες σε πειραματόζωα η δοκιμαζόμενη παρέμβαση γίνεται πιο νωρίς, είτε πριν από την έναρξη της ισχαιμίας, είτε πριν από την επαναιμάτωση. Αυτό έχει σημασία για τα αποτελέσματα μιας θεραπείας, επειδή υπάρχουν ενδείξεις ότι η βλάβη από επαναιμάτωση αρχίζει πολύ νωρίς, σχεδόν αμέσως με την αποκατάσταση της στεφανιαίας ροής⁸.

Σύντομη ανασκόπηση – ο σκοπός της παρούσας μελέτης

Όπως αναφέρθηκε, η βλάβη από επαναιμάτωση δεν ακυρώνει το όφελος από την επαναιμάτωση, το οποίο σαφώς υπερισχύει, αλλά συντελεί στην ελάττωση του οφέλους αυτού. Αυτό συμβαίνει επειδή η επαναιμάτωση, εκτός από τη σωτήρια επίδρασή της, προκαλεί και ορισμένες διαταραχές, όπως οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης, διαταραχές στη λειτουργία της μικροκυκλοφορίας, το απόπληκτο μυοκάρδιο και η συμμετοχή στην πρόκληση θανάτου (νέκρωσης και απόπτωσης) μυοκαρδιακών κυττάρων. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου γίνεται αθρόα παραγωγή ελευθέρων ριζών και γενικότερα αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (reactive oxygen species- ROS), και ότι οι αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της βλάβης από επαναιμάτωση. Έχει διαπιστωθεί ερευνητικά η τοξική επίδραση των αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στις κυτταρικές μεμβράνες, όπου αντιδρούν με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, προκαλώντας την υπεροξειδωσή τους, αλλά και τη δημιουργία τοξικών ριζών λιπαρών οξέων. Αυτό διαταράσσει τη διαμόρφωση και τη λειτουργία πρωτεϊνών της μεμβράνης, ενώ έχει και δυσμενείς επιπτώσεις στην ακεραιότητα της μεμβράνης. Η αυξημένη συκέντρωση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου συμβάλλει στην πρόκληση της διάνοιξης των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), που είναι πρωτεϊνικά κανάλια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, τα οποία όταν ανοίξουν επιτρέπουν την έξοδο κυττοχρώματος c και άλλων ενδομιτοχονδριακών ουσιών, γεγονός που προκαλεί την έναρξη διεργασιών που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών του οξυγόνου έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση διαταραχών στη λειτουργία κυττάρων (όπως είναι τα μυοκαρδιακά κύτταρα) αλλά και για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Αυτό συμβαίνει μέσω της άμεσης χημικής τους επίδρασης σε δομικά μακρομόρια των κυττάρων, όσο και μέσω της συμμετοχής τους στην ενεργοποίηση άλλων μηχανισμών που οδηγούν σε κυτταρική βλάβη, όπως η διάνοιξη των πόρων MPTP των μιτοχονδρίων^{6,12}.

Ο σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση της συνδυασμένης ενδοφλέβιας χορήγησης ενός συνδυασμού

ουσιών (της βιταμίνης C και της δεσφεροξαμίνης) στη βλάβη του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση. Οι δύο παραπάνω ουσίες έχουν δράση που περιορίζει την επίδραση των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, με διαφορετικούς και πιθανά συνεργικούς μηχανισμούς. Η επίδραση αυτού του φαρμακευτικού συνδυασμού σε ένα πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου έως τώρα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στη βιβλιογραφία, στην οποία υπάρχουν κυρίως μελέτες για την επίδραση των επιμέρους συστατικών του, ή των συνδυασμών τους με άλλες ουσίες^{8-13,47-49}. Η αναζήτηση ενός αποτελεσματικού συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών, αποτελεί μία λογική συνέχεια της εκτεταμένης έρευνας που έχει γίνει για την αθρόα παραγωγή ελεύθερων ριζών του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου και για τη συμμετοχή τους στους παθογενετικούς μηχανισμούς πρόκλησης βλάβης.

Συνεπώς με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα για την τοξική δράση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, οι οποίες παράγονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις κατά την επαναιμάτωση, επιχειρήσαμε να δοκιμάσουμε κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, ένα συνδυασμό φαρμάκων που να ελαττώνουν την παραγωγή και τη δράση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, δρώντας σε διαφορετικά στάδια αυτών των βιοχημικών διεργασιών.

Παρά το γεγονός ότι το ασκορβικό οξύ και η δεσφεροξαμίνη, σε μεμονωμένη χορήγηση έχουν μελετηθεί αρκετά ως προς την επίδρασή τους στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα συμπεράσματα, με αποτέλεσμα να είναι δυσχερής η εξαγωγή ενός τελικού πορίσματος^{8-13,47-49}. Επιπλέον, οι δύο αυτές ουσίες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς σε συνδυασμένη χορήγηση, ως προς την επίδρασή τους στη βλάβη από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, ιδιαίτερα με έμφαση στον ενδεχόμενο περιορισμό της μυοκαρδιακής νέκρωσης, στα πλαίσια ενός πειραματικού πρωτοκόλλου που να παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το κλινικό σενάριο του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επιπλέον, όπως εξηγείται παρακάτω, ο συνδυασμός τους παρουσιάζει ενδιαφέρον από πλευράς βιοχημικής δράσης.

Η δράση αυτών των δύο ουσιών κατά της παραγωγής και της επίδρασης των ελεύθερων ριζών, καθώς αφορά διαφορετικές βιοχημικές αντιδράσεις, είναι μη αλληλοεπικαλυπτόμενη και επομένως ο συνδυασμός

τους θα μπορούσε να ενισχύσει το τελικό αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα το ασκορβικό οξύ είναι σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό μόριο, το οποίο αντιδρά με οξειδωτικές αντιδραστικές ενώσεις του οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species), όπως οι ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου, και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, που είναι τοξικές για τα κύτταρα. Το ασκορβικό αδρανοποιεί αυτές τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύοντας τα κύτταρα και κατά τη διαδικασία αυτή οξειδώνεται σε μονοδεϋδροασκορβικό οξύ και σε δεϋδροασκορβικό οξύ. Οι δύο τελευταίες (οξειδωμένες) μορφές του ασκορβικού οξέος είναι πολύ σταθερότερες ουσίες από τις ελεύθερες ρίζες και έτσι έχουν πολύ μικρότερη τοξική επίδραση από αυτή των ελευθέρων ριζών⁵⁰. Οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος μετατρέπονται πάλι στην αντιοξειδωτική τους μορφή με την επίδραση της γλουταθειόνης. Έχει βρεθεί ότι οι υδατοδιαλυτές αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη αποτελούν την πρώτη γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας των ιστών, αφού είναι οι πρώτες που ελαττώνονται σε καταστάσεις αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και άλλων οξειδωτικών ουσιών. Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ συμβάλλει στην προστασία από την επίδραση οξειδωτικών ουσιών, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, μετατρέποντας την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης στην αντιοξειδωτική της μορφή, η οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Συνεπώς το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και η γλουταθειόνη αποτελούν δύο βιοχημικά αντιοξειδωτικά συστήματα που δρουν σε συνέργεια^{10,50, 51}.

Σε ότι αφορά τη χρήση της δεσφεροξαμίνης στο δοκιμαζόμενο θεραπευτικό συνδυασμό, η επιλογή της έγινε επειδή δεσμεύει αποτελεσματικά τα ιόντα σιδήρου. Η αυξημένη παρουσία αντιδραστικών ουσιών του οξυγόνου προκαλεί απελευθέρωση ιόντων σιδήρου από μόρια που περιέχουν σίδηρο. Τα ιόντα σιδήρου συμμετέχουν ως καταλύτης στις αντιδράσεις Fenton και Haber- Weiss, που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με τοξική δράση. Συγκεκριμένα στην αντίδραση Fenton τα ιόντα σιδήρου καταλύουν το σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτές οι αντιδράσεις απαιτούν την παρουσία ελευθέρων ιόντων σιδήρου και έτσι αναστέλλονται από τη δεσφεροξαμίνη, η οποία έχει γνωστή ισχυρή σιδηροδεσμευτική δράση. Συνεπώς, η κυριότερη αντιοξειδωτική δράση

της δεσφεροξαμίνης είναι ότι ελαττώνει τη σιδηροκαταλυόμενη παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου, η οποία είναι ιδιαίτερα τοξική για τους ιστούς^{11,32,52,53}.

Συμπερασματικά, με βάση τη φαρμακευτική της δράση, η δεσφεροξαμίνη σε αυτό το θεραπευτικό συνδυασμό αποσκοπεί κυρίως να ελαττώσει την παραγωγή ορισμένων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, ενώ το ασκορβικό οξύ να εξουδετερώσει μέρος των ελευθέρων ριζών, μετά την δημιουργία τους και έτσι η δράση τους θα μπορούσε θεωρητικά να χαρακτηριστεί ως συμπληρωματική και ενισχυτική. Οι πολλές πειραματικές ενδείξεις, που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση, συντελούν στη θεωρητικά αναμενόμενη ευνοϊκή επίδραση ενός τέτοιου συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών, η οποία ωστόσο δεν έχει ισχύ χωρίς την πειραματική επιβεβαίωση. Η έως τώρα έρευνα με χρήση συνδυασμών αντιοξειδωτικών ουσιών στη βλάβη από επαναιμάτωση, έδειξε ότι ο κάθε συνδυασμός έχει διαφορετική επίδραση και συνεπώς τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει με τη χρήση των μεμονωμένων συστατικών ενός συνδυασμού φαρμάκων, ή και με τη χρήση παρόμοιων συνδυασμών με περισσότερα συστατικά, δεν μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια το θεραπευτικό αποτέλεσμα ενός συγκεκριμένου φαρμακευτικού συνδυασμού^{23,30}.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενική περιγραφή του πειραματικού πρωτοκόλλου και των αρχών, βάση των οποίων διαμορφώθηκε.

Ως πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης χρησιμοποιήθηκε ο χοίρος, λόγω των ομοιοτήτων που υπάρχουν μεταξύ της καρδιάς του χοίρου και της ανθρώπινης. Οι ομοιότητες αυτές αφορούν στην ανατομική κατανομή των στεφανιαίων αρτηριών και στην έλλειψη παράπλευρης κυκλοφορίας^{14,15}.

Σε μια προσπάθεια καλύτερης προσομοίωσης των κλινικών συνθηκών της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης μίας στεφανιαίας αρτηρίας, χρησιμοποιήθηκε πειραματικό μοντέλο κλειστού θώρακα, κατά το οποίο η ισχαιμία και η επαναιμάτωση της στεφανιαίας αρτηρίας επιτυγχάνεται με την εισαγωγή καθετήρα-μπαλονιού εντός του αυλού της στεφανιαίας αρτηρίας. Έτσι αποφεύγεται η έκθεση του πειραματοζώου σε μείζονες επεμβάσεις θωρακοτομής. Η πρόκληση της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης έγινε στην περιοχή της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας (LCX).

Η βασική αρχή της παρούσας πειραματικής μελέτης συνίσταται στην πρόκληση παρατεταμένης στεφανιαίας ισχαιμίας με τη διαστολή ενδοαυλικού καθετήρα-μπαλονιού, με συνέπεια τον αποκλεισμό της αιματικής ροής εντός της στεφανιαίας αρτηρίας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (45 λεπτά) και την πρόκληση εμφράγματος. Στο τέλος του προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος της ισχαιμίας γινόταν άρση της απόφραξης της στεφανιαίας αρτηρίας με την αποέκπτυξη («ξεφούσκωμα») του ενδοαυλικού καθετήρα-μπαλονιού, με αποτέλεσμα την έναρξη της επαναιμάτωσης. Η χορήγηση των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών ουσιών στη μία ομάδα πειραματοζώων, ή μόνο φυσιολογικού ορού στην δεύτερη ομάδα πειραματοζώων (ομάδα ελέγχου), γινόταν με ενδοφλέβια έγχυση λίγα λεπτά πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης και στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του χορηγούμενου θεραπευτικού συνδυασμού έγινε καταγραφή παραμέτρων που σχετίζονται με τη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση, όπως η συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας, η βαθμολόγηση της αιματικής επαναρροής στην στεφανιαία αρτηρία που

υποβλήθηκε σε επαναιμάτωση (ταξινόμηση της ροής στην επαναιματούμενη αρτηρία με την κατάταξη κατά TIMI), οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης και η έκταση της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου. Η έκταση της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου, η οποία αποτελεί και το σημαντικότερο δείκτη μυοκαρδιακής βλάβης, μετρήθηκε με τη χρήση ειδικής ιστοχημικής χρώσης.

Σε ότι αφορά τα κριτήρια επιλογής των συγκεκριμένων παραμέτρων, προκειμένου να εκτιμηθεί η έκταση της βλάβης από επαναιμάτωση, ελήφθησαν υπόψιν τα εξής δεδομένα:

Οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης αποτελούν μία από τις γνωστές εκδηλώσεις της βλάβης από επαναιμάτωση,^{1,39} όπως αναφέρθηκε ήδη στο γενικό μέρος.

Η συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας είναι άλλη μία παράμετρος που επηρεάζεται από τη βλάβη από επαναιμάτωση¹, ενώ το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας αποτελεί μία αναγνωρισμένη παράμετρο που εκφράζει τη συνολική συστολική απόδοση της κοιλίας⁵⁴ και έχει τεκμηριωμένη προγνωστική αξία μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς οι ελαττωμένες τιμές του σχετίζονται με μικρότερα ποσοστά επιβίωσης⁵⁵.

Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας χρησιμοποιήθηκε ως αιμοδυναμικός δείκτης για τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, με βάση το γεγονός ότι η αύξηση της είναι ένας από τους διεθνώς αποδεκτούς δείκτες που έχουν συνδεθεί με τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Για την επιλογή αυτού του αιμοδυναμικού δείκτη λάβαμε υπόψη μας ότι η ελάττωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας προκαλεί αύξηση της τελοδιαστολικής της πίεσης⁵⁶. Επίσης η αύξηση της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστερής κοιλίας αποτελεί έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα που σχετίζεται με δυσμενή έκβαση σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα ακόμα και μετά από ταξινόμησή τους ως προς το κλάσμα εξώθησης⁵⁶.

Βαθμολογήσαμε τη ροή στην επαναιματούμενη περισπωμένη αρτηρία με βάση το σύστημα ταξινόμησης κατά TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction–TIMI classification)⁵⁷. Η βαθμολόγηση της ροής στην επαναιματούμενη στεφανιαία αρτηρία, γινόταν επειδή η διαταραχή της ροής μετά την άρση της απόφραξης, αποτελεί δείκτη για την αξιολόγηση της λειτουργίας του ενδοθηλίου και της μικροκυκλοφορίας. Η διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου και της μικροκυκλοφορίας αποτελεί μία από τις

εκδηλώσεις της βλάβης μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση, όπως εμφανίζεται με τη μορφή του φαινομένου ελαττωμένης επανόδου της αιματικής ροής^{5,6}. Η βαθμολόγηση κατά TIMI της ροής της στεφανιαίας αρτηρίας περιφερικά από το σημείο της προηγούμενης απόφραξης, επιλέχθηκε ως ένα διεθνώς αναγνωρισμένο σύστημα βαθμολόγησης της αιματικής ροής^{58,59}, το οποίο έχει και τεκμηριωμένη προγνωστική σημασία, εφόσον η μη αποκατάσταση φυσιολογικής ροής στην επαναιματωθείσα στεφανιαία αρτηρία συσχετίστηκε με ελαττωμένη επιβίωση⁵⁷.

Η βλάβη από επαναιμάτωση, με βάση προηγούμενα πειραματικά δεδομένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι επηρεάζει και την τελική έκταση της εμφραγματικής περιοχής^{1,8}. Η έκταση της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για ασθενείς, που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου, με την επιβίωση να ελαττώνεται όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση του εμφράκτου. Συνεπώς, ο περιορισμός της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης (έμφρακτο) είναι ένας από τους πρωτεύοντες στόχους κάθε θεραπευτικής παρέμβασης⁶⁰.

Ο υπολογισμός της έκτασης της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου, ως ποσοστό της έκτασης της συνολικής μυοκαρδιακής περιοχής που υποβλήθηκε σε ισχαιμία και επαναιμάτωση (περιοχή σε κίνδυνο) είναι σύνηθες καταληκτικό σημείο αξιολόγησης δοκιμαζόμενων θεραπειών σε πειραματικά πρωτόκολλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η βιβλιογραφικά τεκμηριωμένη ιστοχημική χρώση με χλωριούχο τριφαινυλοτετραζόλιο (TTC)^{61,62}.

Η προετοιμασία του πειραματοζώου και η πειραματική μέθοδος πρόκλησης ισχαιμίας και επαναιμάτωσης

Για το πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν εικοσιπέντε αρσενικοί χοίροι ηλικίας 3-5 μηνών και βάρους 30-35 κιλών. Πριν από κάθε πείραμα, κάθε πειραματόζωο φυλασσόταν σε ξεχωριστό κλουβί στο τμήμα φύλαξης πειραματόζωων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για ένα εικοσιτετράωρο. Τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε στέρηση ξηράς

τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες, ώστε να μπορούν να υποβληθούν σε διασωλήνωση και γενική αναισθησία κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Γινόταν ζύγιση και καταγραφή του βάρους του κάθε πειραματοζώου και στη συνέχεια εφαρμογή του παρακάτω πρωτοκόλλου γενικής αναισθησίας: Η προαναισθητική αγωγή περιλάμβανε 4 mg/kg αζαπερόνης (Azaperone) ενδομυϊκώς και μετά 15 λεπτά 5 mg/kg κεταμίνης (Ketamine) ενδομυϊκώς. Γινόταν τοποθέτηση δύο φλεβοκαθετήρων (διαμέτρου 18-20 G) σε φλέβες του πτερυγίου του ωτός, για τη χορήγηση υγρών και φαρμάκων. Η εισαγωγή στην αναισθησία γινόταν με ενδοφλέβια πεντοθάλη (Pentothal) 7 mg/kg. Στη συνέχεια γινόταν η ενδοτραχειακή διασωλήνωση και η εφαρμογή μηχανικού αερισμού, με αναπνευστήρα πίεσης-όγκου (Engstrom model 200, Engstrom, Sweden) με μείγμα οξυγόνου και αέρα (1:2), συχνότητα αναπνοών 14 -16 /λεπτό και αναλογία εισπνοής/εκπνοής 1:2. Ο όγκος αερισμού είχε καθοριστεί στα 200-300ml/Kg/min και εφαρμοζόταν θετική τελοεκπνευστική πίεση στα 3-4 cm H₂O. Η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με συνεχή χορήγηση πτητικού αναισθητικού: σεβοφλουράνιο (sevoflurane 1%) και περιοδική ενδοφλέβια χορήγηση φαιντανύλης (Fentanyl citrate 20μg/Kg) και Norcuron (Vecuronium Bromide 0.1mg/Kg). Κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν παρακολούθηση σε οθόνη (monitor) του επιφανειακού ηλεκτροκαρδιογραφήματος μέσω αυτοκόλλητων ηλεκτροδίων μίας χρήσης.

Μετά την πλήρη εισαγωγή του πειραματοζώου σε γενική αναισθησία, γινόταν χειρουργική αποκάλυψη της δεξιάς και της αριστερής κοινής μηριαίας αρτηρίας και τοποθέτηση θηκαριού διαμετρήματος 6 F στη δεξιά και στην αριστερή μηριαία αρτηρία με χρήση ατραυματικής βελόνας παρακέντησης και οδηγού σύρματος διαμέτρου 0,035". Η εισαγωγή του θηκαριού γινόταν με την τεχνική Seldinger, που περιλαμβάνει την εισαγωγή της βελόνας στον αυλό της αρτηρίας έτσι ώστε να υπάρχει ελεύθερη σφυγμική ροή αίματος στο άκρο της, την προώθηση του οδηγού σύρματος με το κυρτό εύκαμπτο άκρο του μέσα από τη βελόνα εντός του αρτηριακού αυλού, την αφαίρεση της βελόνας, την εισαγωγή του ελεύθερου άκρου του οδηγού σύρματος στο στόμιο του διαστολέα του θηκαριού και προώθηση του διαστολέα εντός της αρτηρίας με ολίσθησή του επί του οδηγού σύρματος. Στη συνέχεια γίνεται η απόσυρση του διαστολέα από το αγγείο και εισαγωγή του στον αυλό του θηκαριού,

ακολουθούσε η εισαγωγή του ελεύθερου άκρου του οδηγού σύρματος στο πρόσθιο στόμιο του θηκαριού που περιείχε το διαστολέα και η ολίσθηση του θηκαριού (μαζί με το διαστολέα) επί του οδηγού σύρματος εντός της αρτηρίας. Τελικά αφαιρούσαμε το διαστολέα και το οδηγό σύρμα, με παραμονή του θηκαριού εντός του αρτηριακού αυλού, πραγματοποιούσαμε αναρρόφηση αίματος από τον πλευρικό σωλήνα του θηκαριού και τέλος την εισαγωγή εντός του θηκαριού ηπαρινισμένου διαλύματος φυσιολογικού ορού από τον πλευρικό του σωλήνα, ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη θρόμβωσή του. Στη συνέχεια γινόταν ενδοφλέβια χορήγηση ηπαρίνης 80 U/kg.

Υπό ακτινοσκοπική παρακολούθηση, γινόταν προώθηση μέσω του θηκαριού της αριστερής μηριαίας αρτηρίας αγγειογραφικού καθετήρα τύπου pig tail διαμετρήματος 6 F (PigTail 6Fr, SuperTorque, Cordis Co, Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE), με τη βοήθεια οδηγού σύρματος (0,035" Starter, Cordis Co, Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE), εντός της αριστερής κοιλίας. Αυτός ο καθετήρας παρέμενε εντός της αριστερής κοιλίας, ενώ ακολουθούσε η αφαίρεση του οδηγού σύρματος και η σύνδεση του καθετήρα pig-tail με το σύστημα καταγραφής πιέσεων, προκειμένου να παρακολουθείται η συστολική και η διαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας. Επίσης η παραμονή του καθετήρα pig-tail εξυπηρετούσε και για τη μετέπειτα διενέργεια αριστερής κοιλιογραφίας, με σκοπό την εκτίμηση της συνολικής και περιοχικής συσπαστικότητας της αριστερής κοιλίας.

Μετά, μέσω του θηκαριού της δεξιάς μηριαίας αρτηρίας γινόταν προώθηση ενός οδηγού καθετήρα αγγειοπλαστικής Hockey-Stick διαμετρήματος 6 F (VistaBrite Tip, Cordis Co, Johnson & Johnson Med. Co, Waterloo, BE). υπό ακτινοσκοπικό έλεγχο και καθετηριαζόταν το στόμιο του στελέχους της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Μέσω του οδηγού καθετήρα γινόταν εισαγωγή ενός σύρματος αγγειοπλαστικής 0,014". στην περισπωμένη στεφανιαία αρτηρία. Στη συνέχεια πάνω από το σύρμα γινόταν εισαγωγή ενός μπαλονιού αγγειοπλαστικής 2,5 x 20 mm στην αρτηρία.

Πρωθούσαμε το μπαλόνι στη θέση αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχειλίου κλάδου της περισπωμένης αρτηρίας. Πριν από την έναρξη της ισχαιμίας πραγματοποιούσαμε μία καταγραφή της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστερής κοιλίας μέσω του καθετήρα Pigtail. Στη

συνέχεια πραγματοποιούσαμε διαστολή του μπαλονιού αγγειοπλαστικής προκειμένου να επιτευχθεί απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας, αμέσως περιφερικά του πρώτου αμβλέος επιχειλίου κλάδου. Αυτό είχε σαν συνέπεια την πρόκληση καθολικής ισχαιμίας στην περιοχή του μυοκαρδίου που αιματώνεται από το αποφραχθέν τμήμα της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας. Η απόφραξη του αγγείου επιβεβαιωνόταν από εκλεκτική στεφανιογραφία με έγχυση σκιαγραφικού μέσω του οδηγού καθετήρα εντός της αρτηρίας, η οποία καταδείκνυε την μη δίοδο του σκιαγραφικού περιφερικότερα από το σημείο τοποθέτησης του μπαλονιού. Η πλήρης απουσία σκιαγράφησης του αγγείου περιφερικά από τη θέση του διεσταλμένου μπαλονιού αποτελούσε απαραίτητη προϋπόθεση για τη συνέχιση του πειράματος. Επίσης παρατηρούσαμε την ανύψωση του τμήματος ST στο καταγραφόμενο ΗΚΓ, ως αποτέλεσμα της προκαλούμενης διατοιχωματικής ισχαιμίας στο μη αρδευόμενο μυοκαρδιακό τοίχωμα. Η διάρκεια της ισχαιμίας ήταν 45 λεπτά.

Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος γινόταν συστολή του μπαλονιού (αφαίρεση του υγρού από το μπαλόνι) με τη χρήση αρνητικής πίεσης και το μπαλόνι παρέμενε στη θέση του εντός της αρτηρίας. Η συστολή του μπαλονιού αποτελούσε την έναρξη της περιόδου επαναιμάτωσης, διάρκειας 3,5 ωρών.

Οι ομάδες των πειραματοζώων ανάλογα με τη χορηγούμενη θεραπεία

Χρησιμοποιήθηκαν 25 πειραματόζωα, τα οποία πριν από την έναρξη του πειράματος κατατάσσονταν τυχαία σε δύο ομάδες. Σημειώθηκαν τρεις θάνατοι πειραματοζώων πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης (2 είχαν τυχαίοποιηθεί στην ομάδα ελέγχου και 1 στην ομάδα θεραπείας). Αυτά τα τρία πειραματόζωα εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Στα πειραματόζωα της ομάδας θεραπείας (n=11) χορηγούσαμε ενδοφλέβια έγχυση 100mg/kg βιταμίνης C και 60 mg/kg δεσφεριοξαμίνης. Κάθε μία από αυτές τις δύο ουσίες ήταν διαλυμένη σε 100 ml φυσιολογικού ορού (Normal Saline 0,9 %). Η έγχυση των δύο φαρμάκων άρχιζε 5 λεπτά πριν την επαναιμάτωση (δηλαδή 5 λεπτά πριν από τη συστολή του μπαλονιού) και διαρκούσε μέχρι και τα πρώτα 2 λεπτά της επαναιμάτωσης.

Τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου (n=11) ελάμβαναν για το ίδιο χρονικό διάστημα ενδοφλέβια έγχυση ίδιας ποσότητας (200ml) φυσιολογικού ορού χωρίς φαρμακευτική ουσία.

Η καταγραφή των κοιλιακών αρρυθμιών και των αιμοδυναμικών παραμέτρων

Κατά το χρονικό διάστημα των πρώτων 60 λεπτών της επαναιμάτωσης γινόταν συνεχής εκτύπωση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος και καταγραφή των κοιλιακών αρρυθμιών (κοιλιακή μαρμαρυγή, εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία, μη εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία, ιδιοκοιλιακός ρυθμός). Σημειώναμε για το κάθε πειραματόζωο το συνολικό αριθμό των επεισοδίων μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού που καταγράφηκαν στα πρώτα 60 λεπτά της επαναιμάτωσης της αρτηρίας. Όταν συνέβαινε κακοήθης κοιλιακή αρρυθμία (εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία ή κοιλιακή μαρμαρυγή) στην παρούσα πειραματική μελέτη θεωρούσαμε αυτό το συμβάν ως καταληκτικό σημείο. Δεν πραγματοποιούσαμε ηλεκτρική ανάταξη (απινίδωση) της αρρυθμίας, αλλά προβαίναμε σε καταγραφή του συμβάντος ως εμφάνιση κακοήθους κοιλιακής αρρυθμίας.

Εξήντα λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης γινόταν μία μέτρηση της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστερής κοιλίας (LVEDP) μέσω του καθετήρα pigtail.

Αμέσως μετά την καταγραφή της LVEDP, πραγματοποιούσαμε εκλεκτική αγγειογραφία της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, με έγχυση σκιαγραφικού μέσω του οδηγού καθετήρα αγγειοπλαστικής, και βαθμολογούσαμε τη ροή στην επαναιματούμενη περισπωμένη αρτηρία με βάση το σύστημα ταξινόμησης κατά TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction–TIMI classification). Η βαθμολόγηση της ροής κατά TIMI γινόταν από την καταγραφή video της αγγειογραφίας, από παρατηρητή, που δεν γνώριζε αν το πειραματόζωο ανήκε στην ομάδα θεραπείας ή στην ομάδα ελέγχου. Το σύστημα ταξινόμησης κατά TIMI βαθμολογεί την επάρκεια της αποκατάστασης της επικαρδιακής αιματικής ροής, μετά από επαναιμάτωση της στεφανιαίας αρτηρίας που είναι υπεύθυνη για το έμφραγμα, στα πλαίσια της αντιμετώπισης ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η κατάταξη της

αιματικής ροής κατά TIMI αφορά στη ροή της στεφανιαίας αρτηρίας περιφερικά από το σημείο της προηγούμενης απόφραξης. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή:

Ο βαθμός TIMI 0 αντιστοιχεί σε ανύπαρκτη ροή περιφερικά του σημείου της προηγούμενης απόφραξης.

Ο βαθμός TIMI 1 αντιστοιχεί στην ύπαρξη διόδου του σκιαγραφικού και επομένως ροής πέρα από το σημείο της προηγούμενης απόφραξης, αλλά χωρίς να φθάνει η ροή μέχρι τα περιφερικότερα τμήματα της αρτηρίας. Δηλαδή δεν υπάρχει πλήρης σκιαγράφιση της αρτηρίας μετά την επαναιμάτωση.

Ο βαθμός TIMI 2 υποδηλώνει την ύπαρξη ροής σε όλο το αγγείο, μέχρι και τα τελικά τμήματά του, αλλά η ροή αυτή είναι βραδύτερη της φυσιολογικής. Η ταχύτητα εισόδου του σκιαγραφικού στο τμήμα του αγγείου περιφερικά της προηγούμενης απόφραξης ή η ταχύτητα απομάκρυνσής του από το περιφερικό στεφανιαίο δίκτυο είναι εμφανώς μικρότερη από την αντίστοιχη ταχύτητα που παρατηρείται σε άλλες περιοχές που αιματώνονται από διαφορετικούς στεφανιαίους κλάδους που δεν είχαν υποστεί απόφραξη.

Ο βαθμός TIMI 3 σημαίνει τη φυσιολογική ροή στην επαναιματωθείσα αρτηρία με φυσιολογική ταχύτητα εισόδου, αλλά και απομάκρυνσης του σκιαγραφικού στα περιφερικά τμήματα της αρτηρίας. Η ταχύτητα αυτή είναι όμοια με την ταχύτητα που παρατηρείται σε έναν μη πάσχοντα στεφανιαίο αρτηριακό κλάδο^{58,59}.

Αμέσως μετά την εκτίμηση της ροής στο αγγείο κατά TIMI, γινόταν αριστερή κοιλιογραφία με έγχυση σκιαγραφικού μέσω του καθετήρα Pigtail, ο οποίος είχε παραμείνει εντός της αριστερής κοιλίας. Η αριστερή κοιλιογραφία γινόταν σε Δεξιά Πρόσθια Λοξή Προβολή 30° (Right Anterior Oblique -RAO) και καταγραφόταν σε ψηφιακό αρχείο. Η κοιλιογραφία γινόταν με σκοπό τον υπολογισμό του κλάσματος εξώθησης, το οποίο αποτελεί αναγνωρισμένο δείκτη της συνολικής συστολικής απόδοσης της αριστερής κοιλίας. Ο υπολογισμός του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας (Left Ventricular Ejection Fraction - LVEF), γινόταν από παρατηρητή ο οποίος δεν ήταν ενήμερος αν το πειραματόζωο ανήκε στην ομάδα χορήγησης ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης, ή στην ομάδα ελέγχου.

Η μέτρηση του τελοσυστολικού και του τελοδιαστολικού όγκου της αριστερής κοιλίας για τον υπολογισμό του κλάσματος εξώθησης (ΚΕ- LVEF) έγινε με τη χρήση ειδικού προγράμματος εκτίμησης των αγγειογραφικών εικόνων (CAAS, Pie Medical, Maastrich, The Netherlands) και υπολογίσθηκε το κλάσμα εξώθησης από τη γνωστή εξίσωση:

$ΚΕ = (\text{τελοδιαστολικός όγκος} - \text{τελοσυστολικός όγκος}) / \text{τελοδιαστολικός όγκος}$.

Για την επιλογή αυτής της μεθόδου μέτρησης του όγκου της αριστερής κοιλίας ελήφθη υπόψιν, ότι η μέτρηση του όγκου της αριστερής κοιλίας μέσω της αριστερής κοιλιογραφίας, έστω και με την μικρή υπερεκτίμηση του όγκου που την χαρακτηρίζει, γενικά θεωρείται μέθοδος με επαρκή ακρίβεια, τεκμηριωμένη από διάφορες μελέτες. Επίσης, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η εκτίμηση από ένα αγγειογραφικό επίπεδο είναι αποδεκτή, αφού δεν εμφανίζει μεγάλο σφάλμα σε σχέση με την εκτίμηση από δύο αγγειογραφικά επίπεδα^{63,64}.

Προσδιορισμός της έκτασης της περιοχής μυοκαρδίου σε κίνδυνο και της περιοχής της μυοκαρδιακής νέκρωσης

Στην παρούσα μελέτη υπολογίσαμε για κάθε πειραματόζωο την έκταση της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου, ως ποσοστό της έκτασης της μυοκαρδιακής περιοχής που υποβλήθηκε σε ισχαιμία και επαναιμάτωση (περιοχή σε κίνδυνο, δηλαδή η συνολική περιοχή που διέτρεξε κίνδυνο ενδεχόμενης εμφραγματικής νέκρωσης).

Για την εκτίμηση της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής χρησιμοποιήθηκε η καθιερωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία ιστοχημική μέθοδος της χρώσης του μυοκαρδίου με 2, 3, 5- triphenyl tetrazolium chloride (TTC).

.Αυτή η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του TTC να αντιδρά με δεϋδρογονάσες των ιστών σχηματίζοντας την ερυθρή χρωστική φορμαζάνη που προσδίδει στον ιστό το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα «του κεραμιδιού» (κεραμέρυθρη χροιά). Οι δεϋδρογονάσες είναι ένζυμα που χαρακτηρίζουν το βιώσιμο (ζωντανό) μυοκάρδιο. Επομένως η σύνδεσή τους με το TTC συμβαίνει στο βιώσιμο μυοκάρδιο, το οποίο λαμβάνει κατά τη χρώση αυτή χαρακτηριστική κεραμέρυθρη χροιά.

Αντίθετα, η βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης στερεί το νεκρωτικό μυοκάρδιο από τις δεϋδρογονάσες. Έτσι στο νεκρωτικό μυοκάρδιο δεν λαμβάνει χώρα η παραπάνω αντίδραση με το TTC, με αποτέλεσμα να μη συμβαίνει η χρωματική μεταβολή. Έτσι η περιοχή του μυοκαρδίου που δεν λαμβάνει το χαρακτηριστικό κεραμέρυθρο χρώμα, κατά τη χρώση με το τριφαινυλοτετραζόλιο, αντιστοιχεί στην περιοχή της μυοκαρδιακής νέκρωσης (έμφρακτο)^{61,62}.

Σε πειράματα που έγιναν σε κουνέλια και ποντίκια διαπιστώθηκε ότι η μέτρηση του μεγέθους του εμφράγματος με το TTC μετά από τρεις ώρες επαναιμάτωσης ήταν αξιόπιστη και δεν διέφερε σημαντικά από τη μέτρηση μετά από λίγες ημέρες με την ίδια μέθοδο⁶².

Για τη σύγκριση της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής μεταξύ ομάδων πειραματοζώων, προκειμένου να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα μιας θεραπευτικής παρέμβασης, έχει καθιερωθεί στη βιβλιογραφία η μέτρηση της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής ως ποσοστού ή αναλογίας σε σχέση με την περιοχή που βρέθηκε σε κίνδυνο να νεκρωθεί (περιοχή σε κίνδυνο). Υπολογίζεται δηλαδή ο λόγος I/R, όπου με I (infarct) συμβολίζεται η νεκρωτική περιοχή (έμφρακτο) και με το R (risk zone) η περιοχή του μυοκαρδίου σε κίνδυνο.

Παρακάτω περιγράφεται η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό του λόγου I/R στην παρούσα πειραματική μελέτη. Μετά από τη συμπλήρωση 3,5 ωρών (210 λεπτών) επαναιμάτωσης, το μπαλόني αγγειοπλαστικής, το οποίο παρέμεινε στην αρχική του θέση, διατάθηκε πάλι, έτσι ώστε να αποφραχθεί η περισπωμένη αρτηρία ακριβώς στην ίδια θέση που είχε αποφραχθεί για την πρόκληση της ισχαιμίας. Η επίτευξη της πλήρους απόφραξης της αρτηρίας ελεγχόταν αγγειογραφικά, με μία έγχυση σκιαγραφικού. Αμέσως μετά γινόταν έγχυση διαλύματος Evans Blue 2% σε δόση 2 ml/Kg μέσω του καθετήρα rigtail μέσα στην αριστερή κοιλία. Η ενέργεια αυτή αποσκοπούσε στην ανάδειξη της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο, εφόσον η πάλλουσα αριστερή κοιλία διοχέτευε τη χρωστική ουσία σε όλες τις αρτηρίες του σώματος και μέρος της χρωστικής όπως είναι φυσικό διοχετευόταν στις στεφανιαίες αρτηρίες. Έτσι η χρωστική χρωμάτιζε όλο το μυοκάρδιο εκτός από το μυοκάρδιο της περιοχής που αρδευόταν από το αποφραγμένο τμήμα της περισπωμένης αρτηρίας. Το φουσκωμένο μπαλόني

εμπόδιζε τη δίοδο της χρωστικής σε αυτή ακριβώς την περιοχή. Επομένως, η περιοχή του μυοκαρδίου σε κίνδυνο (περιοχή που υποβλήθηκε σε ισχαιμία) διακρινόταν ως η περιοχή που δεν χρωματίστηκε από το Evans Blue.

Τρία λεπτά μετά τη χορήγηση του διαλύματος Evans Blue γινόταν πρόκληση καρδιακής ανακοπής στο πειραματόζωο με ταχεία έγχυση διαλύματος χλωριούχου καλίου (KCl) μέσα την αριστερή κοιλία διαμέσου του καθετήρα Pigtail.

Στη συνέχεια προχωρούσαμε στην αφαίρεση της καρδιάς του πειραματοζώου και στην απόρριψη των κόλπων και της δεξιάς κοιλίας. Η αριστερή κοιλία κοβόταν σε παράλληλες εγκάρσιες τομές πάχους 0,5 εκατοστών με κατεύθυνση από τη βάση προς την κορυφή. Σε κάθε τομή αναγνωρίζονταν τα όρια της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο (δηλαδή της περιοχής του μυοκαρδίου που υποβλήθηκε σε ισχαιμία και επαναιμάτωση). Η περιοχή αυτή όπως αναφέρθηκε διακρινόταν ευχερώς επειδή δε χρωματίστηκε από το Evans Blue και διατηρούσε το κανονικό της χρώμα σε αντίθεση με το υπόλοιπο μυοκάρδιο που είχε κυανή απόχρωση. Προκειμένου να διακρίνονται καλύτερα τα όρια της περιοχής σε κίνδυνο στο τέλος του πειράματος, γινόταν επισήμανση των ορίων αυτών με τη σκιαγράφησή τους πάνω στην κάθε τομή μυοκαρδίου χρησιμοποιώντας λεπτό πινέλο και σινική μελάνη. Οι τομές του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα 1% TTC μέσα σε κλειστό δοχείο που τοποθετούσαμε σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37 βαθμών Κελσίου, για χρονικό διάστημα 30 λεπτών σε σκοτεινό δωμάτιο.

Οι δακτυλιοειδείς τομές του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας μετά την αφαίρεσή τους από το δοχείο με το διάλυμα TTC, φωτογραφίζονταν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Σε κάθε τομή του μυοκαρδίου διακρίνονταν ορισμένες περιοχές με βάση την απόχρωση του μυοκαρδίου: Μία περιοχή με κυανή απόχρωση που αντιπροσώπευε την έκταση του μυοκαρδίου που δεν υποβλήθηκε σε ισχαιμία, δηλ τη μυοκαρδιακή περιοχή που δεν αιματωνόταν από τον αγγειακό κλάδο που αποφράχθηκε στο πείραμα. Όπως αναφέρθηκε αυτή η περιοχή χρωματίστηκε από το Evans blue. Το υπόλοιπο μυοκάρδιο που δεν χρωματίστηκε από το Evans blue ανήκε στην περιοχή αιμάτωσης του αποφραγμένου αρτηριακού κλάδου, ανήκε δηλαδή στην περιοχή που υποβλήθηκε σε ισχαιμία και επαναιμάτωση (περιοχή σε κίνδυνο). Στην

επιφάνεια της περιοχής σε κίνδυνο (R) αναγνωρίστηκαν δύο επιμέρους περιοχές: μία περιοχή με ερυθρό χρώμα (απόχρωση προς το κεραμιδί) που χρωματίστηκε από το TTC και αντιπροσώπευε το βιώσιμο μυοκάρδιο και το υπόλοιπο μυοκάρδιο που δεν χρωματίστηκε από το TTC και επομένως παρουσιαζόταν σαν μία περιοχή με πιο ωχρή απόχρωση. Αυτή η τελευταία περιοχή αντιπροσώπευε το νεκρό μυοκάρδιο, δηλαδή το έμφρακτο (I).



Εικόνα 2

A. Η χαρακτηριστική εμφάνιση της καρδιάς του πειραματοζώου μετά την έγχυση διαλύματος κυανού του Evans 2%, πριν από την αφαίρεση της καρδιάς. Η περιοχή που δεν χρωματίστηκε από το διάλυμα κυανού του Evans αντιπροσωπεύει την περιοχή σε κίνδυνο

(R). **B.** Τομή της αριστερής κοιλίας (πάχους 0,5 cm). Το μυοκάρδιο απεικονίζεται κυανό, εκτός από την περιοχή σε κίνδυνο (R), η οποία δεν έχει χρωματισθεί από το κυανό διάλυμα. **Γ.** Η ίδια τομή της φωτογραφίας (B) μετά την εμβάπτισή της στο διάλυμα TTC. Η περιοχή που το περιγράμματά της έχει τονισθεί με ινδική μελάνη αντιπροσωπεύει την περιοχή σε κίνδυνο (R). Εντός αυτής της περιοχής (R), διακρίνονται δύο επιμέρους περιοχές. Μία περιοχή με πιο ωχρό χρώμα που αντιπροσωπεύει το νεκρωτικό μυοκάρδιο (N) και μία περιοχή με ζωηρό κεραμέρυθρο χρώμα που αντιπροσωπεύει το βιώσιμο μυοκάρδιο (V).

Σε κάθε ψηφιακή φωτογραφία μυοκαρδιακής τομής, με τη βοήθεια προγράμματος ηλεκτρονικού υπολογιστή (UTSHCA – Image Tool) μετρήθηκε η επιφάνεια της περιοχής του νεκρωτικού μυοκαρδίου (I), της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο (R) και η συνολική επιφάνεια της κάθε τομής μυοκαρδίου. Πολλαπλασιάζοντας αυτές τις επιφάνειες με το πάχος της κάθε τομής του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (0,5 cm), προέκυψαν οι αντίστοιχοι όγκοι, της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου, της περιοχής του μυοκαρδίου σε κίνδυνο, και ο συνολικός όγκος της κάθε μυοκαρδιακής τομής. Αθροίζοντας

αυτούς τους επιμέρους όγκους που αντιστοιχούσαν σε κάθε μία από τις ληφθείσες τομές του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας προέκυπταν αντιστοίχως για ολόκληρη την αριστερή κοιλία ο όγκος της περιοχής σε κίνδυνο (R), της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής (έμφρακτο-I) και ο συνολικός όγκος του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (LV). Στη συνέχεια υπολογιζόταν για ολόκληρη την αριστερή κοιλία η αναλογία της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής προς την περιοχή σε κίνδυνο (I/R) και η αναλογία της περιοχής σε κίνδυνο προς το συνολικό όγκο του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (R/LV).

Στατιστική ανάλυση

Οι διάφορες τιμές των υπό εξέταση παραμέτρων παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm πιθανό σφάλμα. Η στατιστική σύγκριση των παραμέτρων I/R, R/LV, EF και LVEDP μεταξύ των δύο ομάδων έγινε με τη δοκιμασία Student (t-test). Ο αριθμός των επεισοδίων μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού εξετάσθηκε με τη στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney. Ο αριθμός των πειραματοζώων που εμφάνισαν εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία ή κοιλιακή μαρμαρυγή στην πρώτη ώρα της επαναιμάτωσης και ο αριθμός των πειραματοζώων που είχαν ροή TIMI III την πρώτη ώρα μετά την επαναιμάτωση της στεφανιαίας αρτηρίας έγινε αντικείμενο στατιστικής σύγκρισης με τη δοκιμασία Χ τετράγωνο (Chi Square).

Αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων

Σημείωση: Ο συγκεντρωτικός πίνακας των μετρήσεων για όλα τα πειραματοζώα επισυνάπτεται στο τέλος του κεφαλαίου «Αποτελέσματα».

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΟΜΑΔΑΣ ΕΛΕΓΧΟΥ (control group)

Πείραμα 1ο:

Χοίρος, βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματοζώου με αρτηριακή πίεση 105/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 90 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική

πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 65 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 12 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 38 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 31,2 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 22,4 %.

Πείραμα 2ο:

Χοίρος, βάρους 31Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/55 mmHg και καρδιακή συχνότητα 84 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 5 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης

αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 37 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 8 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 55 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 34,3 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 15,6 %.

Πείραμα 3ο:

Χοίρος, βάρους 34,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 90/55 mmHg και καρδιακή συχνότητα 100 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για

την έναρξη της επαναιμάτωσης. Στο 12^ο λεπτό μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης το πειραματόζωο εμφάνισε συχνές κοιλιακές εκτακτοσυστολές και ακολούθως στο 14^ο λεπτό κοιλιακή μαρμαρυγή, από την οποία και κατέληξε.

Πείραμα 4ο:

Χοίρος, βάρους 30,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 86 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 19 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 14 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 39 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 40,5 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 19,7 %.

Πείραμα 5ο:

Χοίρος, βάρους 30,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 107/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 98 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 0 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 15 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 40 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 0

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 36,2 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 20,4 %.

Πείραμα 6ο:

Χοίρος, βάρους 31 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/55 mmHg και καρδιακή συχνότητα 103 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Στο 2^ο λεπτό μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης το πειραματόζωο εμφάνισε κοιλιακή ταχυκαρδία, η οποία συνοδευόταν από υπόταση (συστολική αρτηριακή πίεση 70 mmHg) και η οποία μετά από 1,5 λεπτό εξελίχθηκε σε κοιλιακή μαρμαρυγή, από την οποία και κατέληξε.

Πείραμα 7ο:

Χοίρος, βάρους 34 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 90/50mmHg και καρδιακή συχνότητα 105 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού

διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 13 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 10 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 46 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 19,4 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 21,2 %.

Πείραμα 8ο:

Χοίρος, βάρους 34 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/50mmHg και καρδιακή συχνότητα 97 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 32 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 8 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 53 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 41,4 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 17,7 %.

Πείραμα 9ο:

Χοίρος, βάρους 34 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 90 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 5 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 5 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 11 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 53 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 38 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV) ήταν 17,5 %.

Πείραμα 10ο:

Χοίρος, βάρους 32,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές.

Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 85 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 5 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 7 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 52 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της

εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 26,9 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 19,5 %.

Πείραμα 11ο:

Χοίρος, βάρους 31 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 102/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 95 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 13 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 14 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 45 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2. Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου in vitro έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 28 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 21 %.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΟΜΑΔΑΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ (treatment group)

Πείραμα 12ο:

Χοίρος, βάρους 33 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 85 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 4 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 32 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 7 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 52 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 26,9 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 19,5 %.

Πείραμα 13ο:

Χοίρος, βάρους 32,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 90 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 8 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 5 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 12 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 46 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου in vitro έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 27,9 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 18,9 %.

Πείραμα 14ο:

Χοίρος, βάρους 34 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 113/64 mmHg και καρδιακή συχνότητα 85 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 8 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 15 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 17 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 52 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 1.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου in vitro έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 25,1 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV) ήταν 20,3 %.

Πείραμα 15ο:

Χοίρος, βάρους 33 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα.

Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές.

Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 92 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 13 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 9 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 48 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 23,4 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 22,0 %.

Πείραμα 16ο:

Χοίρος, βάρους 30,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/55 mmHg και καρδιακή συχνότητα 103 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με

καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 3 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 6 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 47 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 18,3 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 19,4 %.

Πείραμα 17ο:

Χοίρος, βάρους 32,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα.

Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές.

Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 114/64 mmHg και καρδιακή συχνότητα 83 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 5 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για

την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 11 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 7 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 50 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 22,8 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 19,1 %.

Πείραμα 18ο:

Χοίρος, βάρους 35 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 115/66 mmHg και καρδιακή συχνότητα 82 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 7 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 0 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 7 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 56 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 19,8 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (R/LV). ήταν 15,8 %.

Πείραμα 19ο:

Χοίρος, βάρους 32,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 95 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 5 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 0 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 8 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 52 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 34,0 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 20,1 %.

Πείραμα 20ο:

Χοίρος, βάρους 31 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές.

Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 96 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 23 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 7 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 41 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 3.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου *in vitro* έγινε η εκτίμηση του λόγου της

εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 36,1 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 17,6 %.

Πείραμα 21ο:

Χοίρος, βάρους 30,5 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 103/62 mmHg και καρδιακή συχνότητα 98 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 6 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Κατά τη συνεχή καταγραφή του ΗΚΓ επί 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν 12 ριπές μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού.

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) ήταν 12 mmHg, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (ejection fraction – EF) ήταν 43 % και η ροή κατά TIMI στο επαναιματωθέν αγγείο ήταν 2.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική και ιστοχημική εξέταση (με τη μέθοδο χρώσης που αναφέρθηκε παραπάνω) της καρδιάς του πειραματόζωου in vitro έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 34,7 %. Ο όγκος του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο (R) ως ποσοστό του συνολικού όγκου της αριστερής κοιλίας(R/LV). ήταν 19,6 %.

Πείραμα 22ο:

Χοίρος, βάρους 33 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή με στέρηση ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες.

Προνάρκωση, διασωλήνωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής χειρουργική αποκάλυψη των κοινών μηριαίων αρτηριών και τοποθέτηση θηκαριού 6 F άμφω χωρίς επιπλοκές.

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 114/65 mmHg και καρδιακή συχνότητα 88 παλμούς/min. Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας (baseline LVEDP) ήταν 5 mmHg.

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και πλήρης απόφραξη της περισπωμένης αρτηρίας αμέσως μετά την έκφυση του πρώτου αμβλέος επιχείλιου κλάδου με καθετήρα μπαλόني αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Με τη συμπλήρωση αυτού του χρονικού διαστήματος έγινε συστολή του μπαλονιού με τη χρήση αρνητικής πίεσης για την έναρξη της επαναιμάτωσης. Στο 4^ο λεπτό μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης το πειραματόζωο εμφάνισε συχνές κοιλιακές εκτακτοσυστολές και ακολούθως στο 8^ο λεπτό κοιλιακή μαρμαρυγή, από την οποία και κατέληξε.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κοιλιακές αρρυθμίες κατά την επαναιμάτωση

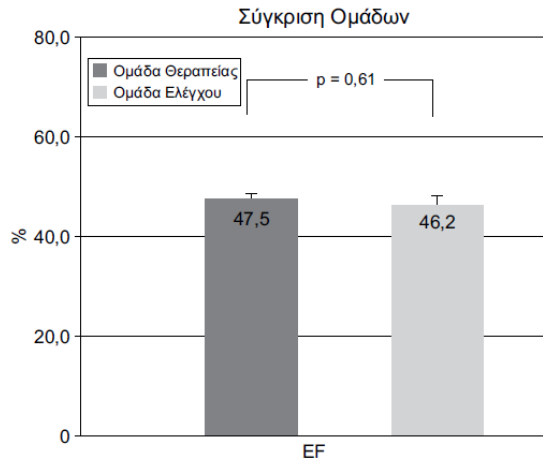
Από τα 11 πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου, 2 παρουσίασαν κοιλιακή μαρμαρυγή εντός της πρώτης ώρας της επαναιμάτωσης. Στην ομάδα θεραπείας (n=11), 1 πειραματόζωο εμφάνισε κοιλιακή μαρμαρυγή. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς μη σημαντική (p=0,53).

Οι υπόλοιπες μεταβλητές εξετάσθηκαν μόνο για τα ζώα που δεν εμφάνισαν κοιλιακή μαρμαρυγή (9 ζώα της ομάδας ελέγχου και 10 της ομάδας θεραπείας), αφού όπως αναφέρθηκε με βάση το πρωτόκολλο του πειράματος η μέτρηση των μεταβλητών αυτών γινόταν με τη συμπλήρωση χρόνου 60 λεπτών επαναιμάτωσης, εκτός από τη μέτρηση της έκτασης της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου (έμφρακτο) που γινόταν αργότερα (με τη συμπλήρωση 3,5 ωρών επαναιμάτωσης).

Ο αριθμός των επεισοδίων μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού στη διάρκεια της πρώτης ώρας της επαναιμάτωσης ήταν $24,22 \pm 7,08$ στην ομάδα ελέγχου (n=9) και $11,40 \pm 3,24$ στην ομάδα θεραπείας (n=10) και διαπιστώθηκε μία τάση για λιγότερες αρρυθμίες στην ομάδα θεραπείας, αλλά η διαφορά ήταν στατιστικώς μη σημαντική (p=0,13)

Κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) μία ώρα μετά την επαναιμάτωση

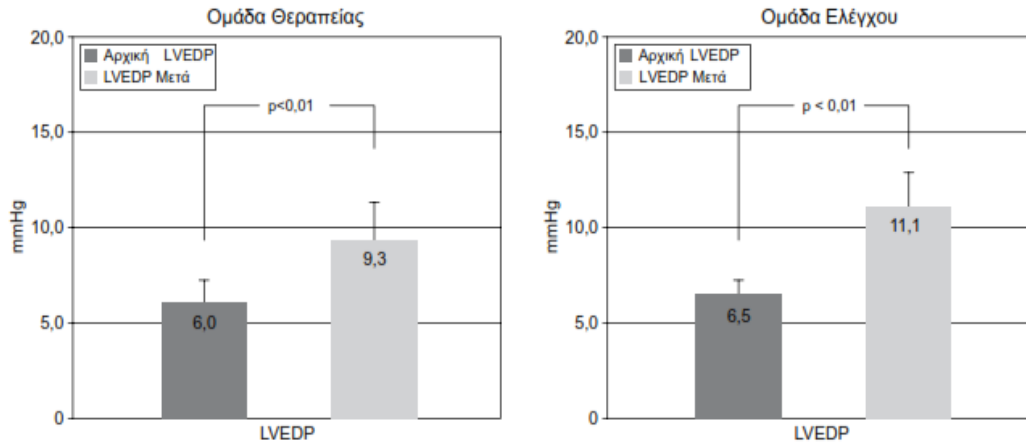
Μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης το LVEF ήταν $46,2 \pm 2,1$ %, στην ομάδα ελέγχου και $47,5 \pm 1,4$ % στην ομάδα θεραπείας. (Εικόνα 2). Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν σημαντική στην τιμή του LVEF μία ώρα μετά την επαναιμάτωση, (p= 0,61) (Εικόνα 3).



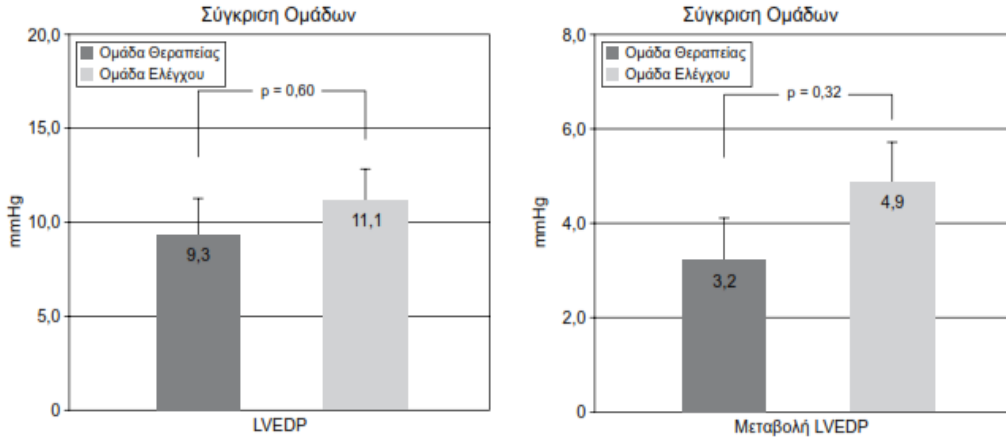
Εικόνα 3. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην τιμή του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας μία ώρα μετά από την έναρξη της επαναιμάτωσης, μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,61$). EF: κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας.

Τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP)

Παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες στατιστικά σημαντική αύξηση στην LVEDP μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης σε σύγκριση με την αρχική τιμή (πριν από την ισχαιμία). ($p<0,01$). Δεν διαπιστώθηκε όμως σημαντική διαφορά στη μεταβολή της LVEDP μεταξύ των δύο ομάδων [$+4,6 \pm 0,9$ mmHg στην ομάδα ελέγχου ($n=9$) και $+3,2 \pm 0,9$ mmHg στην ομάδα θεραπείας ($n=10$)] ($p=0,30$). Η ποσοστιαία μεταβολή της LVEDP ήταν $+71,3 \pm 13,6\%$ στην ομάδα ελέγχου και $+52,9 \pm 13,0\%$ στην ομάδα θεραπείας, με διαφορά επίσης στατιστικά μη σημαντική ($p=0,34$). (Εικόνες 4 και 5).



Εικόνα 4. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP) και στις δύο ομάδες, μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, σε σχέση με την αρχική της τιμή, πριν από την ισχαιμία.



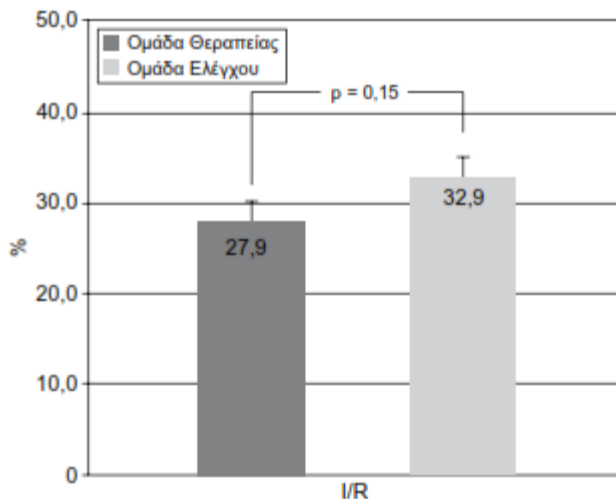
Εικόνα 5. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, τόσο ως προς την τιμή της LVEDP που μετρήθηκε μία ώρα μετά την επαναιμάτωση (αριστερά), όσο και ως προς τη μεταβολή της από την αρχική τιμή (δεξιά). LVEDP: τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας.

Βαθμολόγηση της ροής κατά TIMI στην επαναιματοθείσα στεφανιαία αρτηρία

Από τα 9 ζώα της ομάδας ελέγχου που επιβίωσαν μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, τα 4 (44,4%) είχαν ροή TIMI 3. Στην ομάδα θεραπείας (n=10), 6 ζώα (60%) είχαν ροή TIMI 3 μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p=0,50).

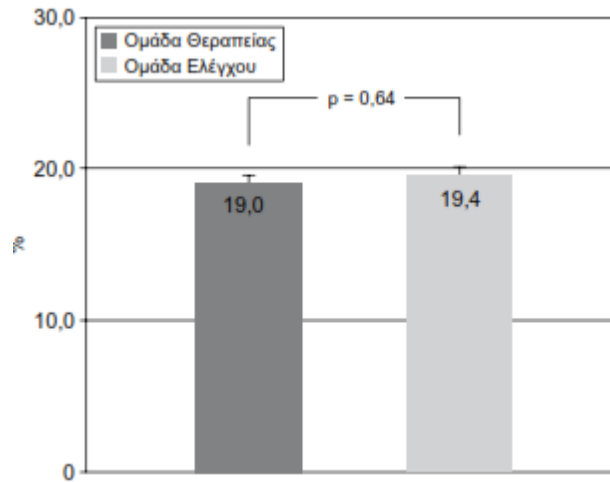
Η έκταση της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής (I/R)

Η έκταση της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής (έμφρακτο), ως ποσοστό της περιοχής σε κίνδυνο (I/R) 3½ ώρες μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, ήταν στην ομάδα ελέγχου $32,9 \pm 2,4$ % (n=9) και στην ομάδα θεραπείας $27,9 \pm 2,2$ % (n=10) (Εικόνα 6). Υπήρξε μία τάση για μικρότερο έμφρακτο στην ομάδα θεραπείας, αλλά με διαφορά στατιστικώς μη σημαντική (p=0,15) (Εικόνα 5). Η περιοχή μυοκαρδίου σε κίνδυνο, ως ποσοστό του συνολικού όγκου του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας(R/LV) ήταν στην ομάδα ελέγχου $19,4 \pm 0,7$ % και στην ομάδα θεραπείας $19,0 \pm 0,6$ %, με διαφορά μη σημαντική (p= 0,64) (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά ως προς την έκταση της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου, που εκφράσθηκε ως ποσοστό της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο, μεταξύ των δύο ομάδων (p =0,15).

I/R= νεκρωτική περιοχή / περιοχή σε κίνδυνο.



Εικόνα 7. Η αναλογία της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο (R) στο συνολικό όγκο του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (LV) δεν εμφάνισε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,64$).

Πίνακας αποτελεσμάτων πειράματος

Αρ.	Ομάδα	VF	I/R %	Ριπές NSVT και IVR	EF %	Baseline LVEDP mmHg	LVEDP 60 λεπτά μετά επαναιμάτωση	LVEDP μεταβολή	LVEDP μεταβολή %	Ροή TIMI 60λεπτά μετά επαναιμάτωση	R/LV %
1	C	Όχι	31.2	65	38	7	12	5	71.4	3	22.4
2	C	Όχι	34.3	37	55	5	8	3	60.0	3	15.6
3	C	Ναί				7					
4	C	Όχι	40.5	19	39	7	14	7	100.0	3	19.7
5	C	Όχι	36.2	0	40	7	15	8	114.3	0	20.4
6	C	Ναί				6					
7	C	Όχι	19.4	13	46	7	10	3	42.9	2	21.2
8	C	Όχι	41.4	32	53	6	8	2	33.3	2	17.7
9	C	Όχι	38.0	5	48	5	11	6	120.0	2	17.5
10	C	Όχι	26.9	15	52	7	7	0	0	3	19.5
11	C	Όχι	28.0	13	45	7	14	7	100.0	2	21.0
12	T	Όχι	37.2	32	44	4	8	4	100.0	3	17.4
13	T	Όχι	27.9	5	46	8	12	4	50.0	2	18.9
14	T	Όχι	25.1	15	52	8	17	9	112.5	1	20.3
15	T	Όχι	23.4	13	48	6	9	3	50.0	3	22.0
16	T	Όχι	18.3	3	47	6	6	0	0	2	19.4
17	T	Όχι	22.8	11	50	5	7	2	40.0	3	19.1
18	T	Όχι	19.8	0	56	7	7	0	0	3	15.8
19	T	Όχι	34.0	0	48	5	8	3	60.0	3	20.1
20	T	Όχι	36.1	23	41	6	7	1	16.6	3	17.6
21	T	Όχι	34.7	12	43	6	12	6	100.0	2	19.6
22	T	Ναί				5					

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Αρ. αριθμός πειράματος

C: ομάδα ελέγχου (Control group), T: ομάδα θεραπείας (Treatment group)

VF: κοιλιακή μαρμαρυγή, NSVT: μη εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία, IVR: ιδιοκοιλιακός ρυθμός,

EF: κλάσμα εξώθησης, μία ώρα μετά την επαναιμάτωση

R/LV: ποσοστό % του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας που αποτελεί η περιοχή σε κίνδυνο,

I/R: ποσοστό % του μυοκαρδίου της περιοχής σε κίνδυνο που καταλαμβάνει η νεκρωτική περιοχή.

Η στήλη NSVT / IVR αναφέρεται στον αριθμό των ριπών μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ιδιοκοιλιακού ρυθμού που καταγράφηκαν εντός της πρώτης ώρας της επαναιμάτωσης.

TIMI Flow: βαθμολόγηση ροής στη στεφανιαία αρτηρία μία ώρα μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, με την ταξινόμηση κατά TIMI.

LVEDP τελοδιαστολική πίεση αριστερής κοιλίας, Baseline LVEDP: η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας πριν από την έναρξη της ισχαιμίας. (σε mmHg).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ερευνηθεί η επίδραση συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου με ένα πειραματικό μοντέλο που προσομοιάζει κατά το δυνατόν με τις συνθήκες που υπάρχουν στην κλινική πράξη. Επιλέχθηκε ο συνδυασμός του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και της δεσφεροξαμίνης, επειδή τα επιμέρους συστατικά του ελαττώνουν τη συγκέντρωση και τη δράση των ελευθέρων ριζών με διαφορετικούς και θεωρητικά συμπληρωματικούς μηχανισμούς, ενώ ο συγκεκριμένος συνδυασμός δεν έχει μελετηθεί επαρκώς τη βιβλιογραφία, παρά τις μελέτες που έχουν γίνει για τη δράση των επιμέρους συστατικών του, ή του συνδυασμού τους με άλλες ουσίες, στη βλάβη του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση^{8-13,47-49}. Επιπλέον, ο συνδυασμός της δεσφεροξαμίνης με το ασκορβικό οξύ έχει ένα πρόσθετο πλεονέκτημα, που είναι ο περιορισμός της επιβλαβούς σιδηροκαταλυόμενης αυτό-οξειδωσης του ασκορβικού οξέος, όπως αναλύεται παρακάτω.

Η διερεύνηση της επίδρασης αντιοξειδωτικών ουσιών κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου αποτελεί ένα πεδίο συνεχιζόμενης έρευνας, που στηρίζεται σε ευρήματα προηγούμενων μελετών που έδειξαν αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην επαναιμάτωση^{65,66} και ενδείξεις συμμετοχής των ελευθέρων ριζών στο φαινόμενο της βλάβης από επαναιμάτωση^{5,6,10,22,31,67,68,69,70}.

Το ασκορβικό οξύ και η δεσφεροξαμίνη επελέγησαν για να χρησιμοποιηθούν στην παρούσα πειραματική μελέτη, επειδή είναι ουσίες με γνωστή επίδραση στη βιοχημική δραστηριότητα των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, που δρουν με διαφορετικό τρόπο. Οι ουσίες αυτές παρεμβαίνουν σε διαφορετικά στάδια των χημικών αντιδράσεων, που αφορούν στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την επαναιμάτωση. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι είναι ενδεχόμενο ο συνδυασμός τους να αυξήσει το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της κάθε ουσίας ξεχωριστά.

Καταβλήθηκε προσπάθεια, το πειραματικό μοντέλο να εμφανίζει ομοιότητες με την κλινική πράξη, δηλαδή με την κλινική περίπτωση του οξέος

εμφράγματος του μυοκαρδίου που υποβάλλεται σε θεραπεία επαναιμάτωσης, πχ με πρωτογενή αγγειοπλαστική. Σε αυτή την επιλογή διαμόρφωσης του πειραματικού πρωτοκόλλου μας οδήγησε και η διαπίστωση, από τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που χρησιμοποιούσαν πειραματικά μοντέλα που διέφεραν σημαντικά από την κλινική πράξη, ότι τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δεν μπορούσαν να επιβεβαιωθούν σε αντίστοιχες κλινικές μελέτες και διέφεραν από τα αποτελέσματα αντίστοιχων κλινικών δοκιμών^{7,30}.

Μία πιθανή εξήγηση για τη διαφορά των ευρημάτων πολλών πειραματικών μελετών που έδειξαν όφελος από τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, με τα αποτελέσματα κάποιων κλινικών μελετών που δεν έδειξαν αντίστοιχα οφέλη, είναι ότι πολλά πειραματικά πρωτόκολλα δεν προσομοιάζουν επαρκώς με τις συνθήκες που επικρατούν στην κλινική πράξη. Για αυτό το λόγο, προκειμένου να προσεγγίσουμε καλύτερα το κλινικό σενάριο του οξέος εμφράγματος, στο συγκεκριμένο πείραμα δεν ακολουθήσαμε πρωτόκολλο ανοικτού θώρακα, και η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών έγινε ενδοφλεβίως, δηλ με τρόπο που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη. Επίσης, η επιλογή του χρονικού διαστήματος χορήγησης των φαρμάκων (στα τελευταία 5 λεπτά πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης μέχρι και τα 2 πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης) ήταν τέτοια, ώστε να είναι συμβατή με τα συμβαίνοντα στην κλινική πράξη. Ενδεχόμενη χορήγηση των φαρμάκων για αρκετό χρονικό διάστημα πριν από την επαναιμάτωση, όπως έγινε σε άλλα πειραματικά πρωτόκολλα, δεν συμβαδίζει πολύ ικανοποιητικά με τη συνήθη κλινική πρακτική, στην οποία δίνεται έμφαση κυρίως στην ταχύτερη δυνατή επαναιμάτωση.

Με βάση τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης, που παραθέσαμε παραπάνω, δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας θεραπείας και της ομάδας ελέγχου, σε ότι αφορά το μέγεθος της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής (ως ποσοστό της περιοχής σε κίνδυνο). Επομένως, η συνδυασμένη ενδοφλέβια έγχυση δεσφεριοξαμίνης και ασκορβικού οξέος, πριν από την έναρξη και στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, δεν ελάττωσε σημαντικά το μέγεθος της νεκρωτικής περιοχής, παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μία τάση για μικρότερη έκταση του εμφράκτου στην ομάδα θεραπείας ($p=0,15$). Σημειώνεται ότι το μέγεθος του εμφράκτου είναι ισχυρός

προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, αφού σχετίζεται με τη θνητότητα, με την πιθανότητα εμφάνισης μετεμφραγματικής καρδιακής ανεπάρκειας, και με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων του ασθενούς, όπως εκφράζονται από την λειτουργική κατάταξη κατά NYHA. Σε ασθενείς λειτουργικής κατηγορίας NYHA III-IV διαπιστώθηκαν σημαντικά μεγαλύτερης έκτασης εμφράγματα, σε σύγκριση με τους ασθενείς κατηγορίας I-II^{71,72}. Για αυτούς τους λόγους δώσαμε ιδιαίτερη σημασία στη διερεύνηση αν η δοκιμαζόμενη θεραπευτική παρέμβαση ελαττώνει το μέγεθος του εμφράκτου και θεωρήσαμε το μέγεθος του εμφράκτου (ως ποσοστό της περιοχής σε κίνδυνο), ως το κύριο καταληκτικό σημείο αυτής της πειραματικής μελέτης.

Η παράμετρος της βαθμολόγησης της αιματικής ροής κατά TIMI εξετάσθηκε επειδή έχει μεγάλη προγνωστική σημασία, σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που υποβάλλονται σε θεραπεία επαναιμάτωσης. Η εφαρμοζόμενη κλίμακα βαθμολόγησης της στεφανιαίας ροής, χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην πρώτη φάση της μελέτης TIMI, στην οποία κατά τη σύγκριση μεταξύ δύο θρομβολυτικών φαρμάκων, του ανασυνδυσμένου ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (rt-PA) και της στρεπτοκινάσης, αποδείχθηκε η υπεροχή του πρώτου έναντι της δεύτερης. Μέτρο της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας ήταν η επάρκεια της αποκατάστασης της ροής στην αποφραγμένη αρτηρία, σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα STEMI και για αυτό το λόγο χρειάσθηκε να διαμορφωθεί και στη συνέχεια να καθιερωθεί ένα απλό και αξιόπιστο σύστημα βαθμολόγησης της επάρκειας της στεφανιαίας ροής^{58,59}. Σε αυτή την πειραματική μελέτη χρησιμοποιήσαμε αυτό ακριβώς το σύστημα βαθμολόγησης της αιματικής ροής, το οποίο θεωρείται καθιερωμένο διεθνώς.

Στην παρούσα μελέτη, η επιλογή της ροής κατά TIMI ως μία από της υπό εξέταση παραμέτρους για την αξιολόγηση της δοκιμαζόμενης θεραπείας, έγινε και λόγω της προγνωστικής αξίας που έχει αυτή η ταξινόμηση. Στόχος μας ήταν να ελεγχθεί αν η συνδυσασμένη αντιοξειδωτική θεραπεία θα μπορούσε δυνητικά να επηρεάσει την πρόγνωση σε περιστάσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, όπως το οξύ έμφραγμα.

Ο βαθμός της αποκατάστασης της αιματικής ροής στην εμφραγματική αρτηρία κατά TIMI (TIMI flow grade) έχει σαφή προγνωστική αξία, αφού

εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με τα ποσοστά θνητότητας στις 30 ημέρες και στο 1 έτος σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική. Η συσχέτιση αυτή είναι ανεξάρτητη από άλλους παράγοντες κινδύνου. Με τη μεγαλύτερη θνητότητα συσχετίζεται η ροή TIMI βαθμού 0 έως 1. Η ροή βαθμού TIMI 2 δεν αποτελεί πλήρη και επιτυχή αποκατάσταση της ροής, αφού αντιστοιχεί σε θνητότητα μεγαλύτερη από αυτή που εμφανίζουν οι ασθενείς με αποκατάσταση της φυσιολογικής επικαρδιακής ροής (TIMI 3). Η ροή TIMI 2 αντιστοιχεί σε θνητότητα ενδιάμεση μεταξύ αυτής που παρατηρείται στους ασθενείς με ροή TIMI 0-1 και εκείνους με ροή TIMI 3 στην επαναιματούμενη στεφανιαία αρτηρία⁷⁴. Άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η επαρκής αποκατάσταση της ροής στη σχετιζόμενη με το έμφραγμα αρτηρία σχετίζεται με μικρότερη έκταση εμφράκτου (νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου) και καλύτερη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας⁷⁵.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στον αριθμό των πειραματοζώων με ροή TIMI 3 στο επαναιματοθέν αγγείο. ($p=0,50$). Συνεπώς, η συνδυασμένη θεραπεία κατά της επίδρασης των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου δεν συνέβαλε σημαντικά στη βελτίωση της αιματικής ροής στην επαναιματοθείσα στεφανιαία αρτηρία.

Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη ροή TIMI είναι ένα εύρημα που συνηγορεί ότι η συγκεκριμένη αντιοξειδωτική θεραπεία (συνδυασμός ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης), με το συγκεκριμένο τρόπο χορήγησης, δεν είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της διαταραχής στη λειτουργία του ενδοθηλίου και της μικροκυκλοφορίας, μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Αυτό το εύρημα φαίνεται καταρχήν ως μη αναμενόμενο, με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα στη βιβλιογραφία, τα οποία ενοχοποιούν την αυξημένη παρουσία ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση, για την παρατηρούμενη διαταραχή στη λειτουργία του ενδοθηλίου και της μικροκυκλοφορίας, που αποτελεί μία από τις εκδηλώσεις της βλάβης από επαναιμάτωση²².

Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου είναι γνωστό ότι προκαλούν ελάττωση της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO), οξειδώνοντας την τετραϋδροβιοπτερίνη, η οποία είναι απαραίτητος συμπαράγοντας του ενζύμου που το συνθέτει, δηλ της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO (eNOS). Επίσης οι

ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με το NO και το μετατρέπουν στην τοξική ρίζα περοξυνιτρώδες, ενώ προκαλούν και διαταραχή στον πρωτεϊνικό υποδοχέα μέσω του οποίου το μονοξειδίο του αζώτου ασκεί τη δράση του. Το NO είναι βασικός παράγοντας που προστατεύει τη λειτουργία της μικροκυκλοφορίας με την αγγειοδιασταλτική και αντιθρομβωτική του επίδραση^{5,6}. Συνεπώς, κατά κανόνα μία θεραπεία που εξουδετερώνει έγκαιρα τις ελεύθερες ρίζες ή περιορίζει την παραγωγή τους, αναμένεται να επιφέρει βελτίωση στην ενδοθηλιακή λειτουργία και τη μικροκυκλοφορία και να περιορίσει το φαινόμενο της ελαττωμένης ή καταργημένης επανόδου της αιματικής ροής (non-reflow).

Στην προκειμένη περίπτωση, μία πιθανή εξήγηση της έλλειψης αποτελεσματικότητας της αντιοξειδωτικής θεραπείας στη βελτίωση της στεφανιαίας ροής, είναι ότι ενδεχομένως ο τρόπος χορήγησης (ενδοφλεβίως) των αντιοξειδωτικών φαρμάκων μπορεί να μην κατέστη δυνατό να επιτύχει μεγάλες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών φαρμάκων στα πρώτα δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης, χρονικό διάστημα που θεωρείται κρίσιμο επειδή προηγούμενες μελέτες συνηγορούν, ότι σε αυτό το χρονικό διάστημα συντελείται η μεγαλύτερη και απότομη παραγωγή ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, ενώ επιπλέον αυτό το χρονικό διάστημα είναι ιδιαίτερα καθοριστικό για τις διεργασίες της βλάβης από επαναιμάτωση⁸. Επιπροσθέτως, το ασκορβικό οξύ ασκεί μεγάλο μέρος της αντιοξειδωτικής δράσης του σε συνέργεια με τη γλουταθειόνη. Αυτές οι δύο υδατοδιαλυτές αντιοξειδωτικές ουσίες συνεργούν, αποκαθιστώντας η μία τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής μορφής της άλλης. Τα αποθέματα της αντιοξειδωτικής μορφής της γλουταθειόνης ενδεχομένως είχαν υποστεί σημαντική ελάττωση από την προηγηθείσα αρκετά μεγάλη περίοδο ισχαιμίας (διάρκειας 45 λεπτών), που εφαρμόσθηκε στην παρούσα μελέτη, αφού έχει διαπιστωθεί σε παλαιότερες μελέτες ότι κατά την περίοδο της ισχαιμίας ελαττώνονται τα επίπεδα αυτής της ουσίας⁷⁵. Αυτό πιθανώς αποδυνάμωσε τη δράση του χορηγούμενου ασκορβικού οξέος, λόγω της αλληλεξάρτησης της δράσης αυτών των δύο ουσιών, που αναφέρθηκε παραπάνω.

Μία άλλη παράμετρος που συγκρίναμε μεταξύ των δύο ομάδων πειραματοζώνων (ομάδα θεραπείας και ομάδα ελέγχου) ήταν το κλάσμα εξώθησης (EF), με σκοπό να ελεγχθεί αν υπάρχει επίδραση της

δοκιμαζόμενης θεραπείας στη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Ο έλεγχος του κλάσματος εξώθησης υπαγορεύθηκε από το γεγονός ότι αποτελεί ισχυρό προγνωστικό δείκτη μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτό επιβεβαιώθηκε και σε μελέτη ασθενών με οξύ έμφραγμα που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική, στους οποίους διαπιστώθηκε ότι το ελαττωμένο κλάσμα εξώθησης (<40 % σε υπολογισμό με αριστερή κοιλιογραφία) αποτελούσε ισχυρό δείκτη πρώιμης θνητότητας (σε διάστημα 30 ημερών), αλλά και όψιμης θνητότητας (στην τριετία). Σε αυτή τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι το χαμηλό κλάσμα εξώθησης σχετίζεται με αύξηση της θνητότητας και μάλιστα ανεξάρτητα από την έκταση της στεφανιαίας νόσου (μονοαγγειακής ή πολυαγγειακής)⁷⁶.

Με βάση όσα είναι γνωστά για την παθοφυσιολογία της βλάβης από επαναιμάτωση, η ευνοϊκή επίδραση ενός συνδυασμού αντιοξειδωτικών φαρμάκων στη συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση, είναι μία λογική υπόθεση. Αυτό βασίζεται στο γεγονός, ότι η δράση των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση του φαινομένου του απόπληκτου μυοκαρδίου (stunned myocardium), μέσω της βλάβης που προκαλούν στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, η οποία συμβάλλει στη διαταραχή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου⁴². Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες έχουν ενοχοποιηθεί και για πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης μυοκαρδιακών κυττάρων, αφού οι αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών είναι ένας από τους παράγοντες που ευνοούν τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP) κατά την επαναιμάτωση, γεγονός που έχει επιβλαβείς επιδράσεις στα μυοκαρδιακά κύτταρα⁶. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών μπορούν επιπλέον να προκαλέσουν βιοχημικές αλλοιώσεις στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και σε πολλές πρωτεΐνες των κυττάρων²².

Στη δική μας μελέτη δεν παρατηρήθηκε σημαντικό όφελος από τον ενδοφλέβιο συνδυασμό ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης ως προς την παράμετρο του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας ($p= 0,61$). Μία πιθανή εξήγηση είναι αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω, δηλαδή η ενδεχόμενη αδυναμία έγκαιρης επίτευξης επαρκούς συγκέντρωσης φαρμάκων στην πάσχουσα περιοχή με την ενδοφλέβια χορήγηση, σε συνδυασμό και με

την ένδεια της αντιοξειδωτικής μορφής της γλουταθειόνης εξαιτίας της προηγηθείσας ισχαιμικής περιόδου. Η ένδεια γλουταθειόνης ελαττώνει την αποτελεσματικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης του ασκορβικού οξέος⁷⁵.

Σε ότι αφορά την τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελεί μία σημαντική αιμοδυναμική παράμετρο, που μπορεί να αυξηθεί τόσο σε συστολική όσο και σε διαστολική δυσλειτουργία της κοιλίας και επιπλέον έχει αποδεδειγμένη προγνωστική σημασία⁵⁶. Η σύγκριση των δύο ομάδων πειραματοζών (ομάδα που έλαβε τα αντιοξειδωτικά φάρμακα και ομάδα ελέγχου στην οποία δε χορηγήθηκαν τα φάρμακα) δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές ως προς το ποσό της αύξησης της τελοδιαστολικής πίεσης, μετά την αλληλουχία της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης ($p=0,30$). Το εύρημα αυτό φαίνεται να συμβαδίζει με την μη ανεύρεση σημαντικής διαφοράς ως προς τη συνολική συστατικότητα της αριστερής κοιλίας και ως προς το μέγεθος του εμφράκτου, βρίσκεται δηλαδή στα ίδια πλαίσια με τα λοιπά ευρήματα της μελέτης.

Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε σημαντικό όφελος σε ότι αφορά τον αριθμό των επεισοδίων κοιλιακών αρρυθμιών, και ειδικότερα στις εμμένουσες κοιλιακές αρρυθμίες δεν αναδείχθηκε διαφορά ($p=0,53$), ενώ στις μη εμμένουσες κοιλιακές αρρυθμίες διαπιστώθηκε μία τάση για λιγότερες αρρυθμίες στην ομάδα θεραπείας, η οποία όμως ήταν στατιστικά μη σημαντική ($p=0,13$). Αυτή η τάση για λιγότερες αρρυθμίες είναι συμβατή με ευρήματα και άλλων μελετών χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών σε πειραματικά πρωτόκολλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, οι οποίες συσχετίζουν τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης με την επίδραση ελεύθερων ριζών^{1,30}. Ωστόσο το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης, ως στατιστικά μη σημαντικό, δεν επιτρέπει να επιχειρηματολογήσει κανείς υπέρ σημαντικής θεραπευτικής επίδρασης του συγκεκριμένου ενδοφλέβιου συνδυασμού αντιοξειδωτικών φαρμάκων.

Η επιστημονική αντίληψη για την αιτιοπαθογενετική συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση, κατά την προσφορά οξυγόνου στον ισχαιμικό ιστό, στηρίζεται σε μεγάλο όγκο πειραματικών δεδομένων^{29,33,37}. Επιπλέον η ισχαιμία προκαλεί βλάβη στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας των ιστών, με αποτέλεσμα να

ελαττώνεται η ικανότητα των ιστών να αντιμετωπίσουν την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση²².

Είναι γεγονός, ότι η εκ νέου παροχή οξυγόνου στους ιστούς, που συμβαίνει κατά την επαναιμάτωση, προκαλεί την αθρόα παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αυτό προέκυψε τόσο από πειραματικές μελέτες σε ζώα, όσο και από μελέτες σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, που υποβλήθηκαν σε θρομβόλυση ή διαδερμική αγγειοπλαστική^{29,65}. Σε πειραματικές μελέτες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης έχει γίνει άμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών με την τεχνική της ESR φασματοσκοπίας (Electron Spin Resonance Spectroscopy)^{1,66}.

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα για επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στον καρδιακό ιστό είναι πολλά και προέρχονται από διάφορες πειραματικές μελέτες, με διαφορετική ερευνητική μεθοδολογία. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει, ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα κύτταρα του μυοκαρδίου^{1,77}. Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών, προκαλώντας υπεροξειδωση των λιπιδίων και οξειδωση των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη βλάβη στη δομή και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης²⁹.

Ένας άλλος μηχανισμός πρόκλησης βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες είναι ο εξής: Οι ελεύθερες ρίζες διεγείρουν την απελευθέρωση από το ενδοθήλιο του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, που προκαλεί προσέλκυση ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων στην περιοχή της επαναιμάτωσης. Τα ουδετερόφιλα συμμετέχουν στην πρόκληση της ιστικής βλάβης, αλλά και στην περαιτέρω παραγωγή οξειδωτικών ελευθέρων ριζών⁴. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, σε συνδυασμό με την αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου είναι δύο παράγοντες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της διαδικασίας της απόπτωσης. Αυτό γίνεται μέσω της ενεργοποίησης των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak, που επιδρούν στα μιτοχόνδρια, τα οποία ελευθερώνουν άλλες ουσίες, που καταλήγουν στην ενεργοποίηση των κασπασών, δηλαδή των ενζύμων που προκαλούν την απόπτωση⁷⁸.

Ένας άλλος μηχανισμός βλαπτικής επίδρασης των ελεύθερων ριζών είναι ότι αποτελούν ένα από τα ερεθίσματα που οδηγούν στη διάνοιξη των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (MPTP), γεγονός το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στην πρόκληση της βλάβης του κυττάρου από ισχαιμία και επαναιμάτωση³⁰.

Συνεπώς η προσπάθεια αποτελεσματικής εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών κατά την επαναιμάτωση, κάτι το οποίο επιχειρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, έχει λογική και επιστημονική βάση, αφού, όπως αναφέρθηκε, συμμετέχουν στην πρόκληση βλάβης των μυοκαρδιακών κυττάρων με πολλαπλούς μηχανισμούς. Για αυτό το λόγο, ο δοκιμαζόμενος συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών (ασκορβικό οξύ και δεσφεροξαμίνη), μέσω της δράσης του εναντίων των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, αναμενόταν θεωρητικά να είναι αποτελεσματικός στον περιορισμό της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η βουκιλαμίνη, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη, η αλλοπουρινόλη, η βιταμίνη Ε και ο συνδυασμός ασκορβικού οξέος με γλουταθειόνη έχουν επιτύχει περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση σε πειραματικές μελέτες^{4,7}. Επιπλέον, η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων δισμουτάση του υπεροξειδίου και καταλάση οδήγησε σε ελάττωση της απόπτωσης μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία και επαναιμάτωση⁷⁸.

Ο συνδυασμός του ασκορβικού οξέος με τη γλουταθειόνη θεωρείται τυπικό παράδειγμα συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών, όπου η μία ουσία ενισχύει τη δράση της άλλης¹⁰. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται δοκιμές πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών για τον περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, κάποιες από τις οποίες έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα^{7,9-12,33}, ενώ κάποιες άλλες δεν ανέδειξαν οφέλη από τη χρήση αυτών των φαρμάκων. Το γεγονός ότι κάποιες μελέτες, πειραματικές και κλινικές, έδειξαν αποτυχία των αντιοξειδωτικών ουσιών στην προστασία από τη βλάβη από επαναιμάτωση^{47,48,69,79}, οδήγησε σε αντιφατικά και συγκεχυμένα συμπεράσματα. Έτσι, αρκετοί ερευνητές διατύπωσαν την υπόθεση, ότι σε πολλές περιπτώσεις ένα μεμονωμένο αντιοξειδωτικό φάρμακο μπορεί να μην αρκεί για την επίτευξη ισχυρής θεραπευτικής επίδρασης και ότι μπορεί να προκύψει καλύτερο αποτέλεσμα από τη συνέργεια δύο ή περισσότερων τέτοιων ουσιών^{7,29}.

Η δοκιμή **συνδυασμών ουσιών** με ενδεχόμενη συνεργική δράση στην προστασία του μυοκαρδίου από τη βλάβη από επαναιμάτωση, παρουσιάζει ενδιαφέρον, εφόσον είναι δυνατό ένας επιτυχής συνδυασμός να αυξήσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Έτσι, κάποιοι ερευνητές χρησιμοποίησαν **συνδυασμούς φαρμάκων**, στην προσπάθεια να αναστείλουν ταυτόχρονα διαφορετικά στάδια της παθογενετικής διεργασίας^{10,23,,29,37,68}. Οι συνδυασμοί αντιοξειδωτικών φαρμάκων μπορούν να δράσουν συνεργικά με δύο τρόπους: 1) Αποκατάσταση και διατήρηση επαρκούς συγκέντρωσης της δραστηρικής αντιοξειδωτικής μορφής μίας αντιοξειδωτικής ουσίας από την επίδραση μίας άλλης. Πχ, αυτό συμβαίνει κατά τη χορήγηση ασκορβικού οξέος σε συνδυασμό με γλουταθειόνη. 2) Η επίδραση διαφορετικών αντιοξειδωτικών ουσιών σε διαφορετικά στάδια της οξειδωτικής παθοφυσιολογικής διεργασίας, αδρανοποιώντας διαφορετικές ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, ή αναστέλλοντας διαφορετικά στάδια της παραγωγής τους. Αυτό ισχύει στην περίπτωση του συνδυασμού ασκορβικού οξέος (βιταμίνης C) με δεσφεροξαμίνη, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική μελέτη.

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) αποτελεί ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό παράγοντα, επειδή εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, ενώ βρίσκεται σε ικανή ποσότητα εντός των κυττάρων πολλών διαφορετικών ιστών^{9,50}. Το ασκορβικό οξύ εμφανίζει την αντιοξειδωτική του δράση με δύο τρόπους. Άμεσα, εξουδετερώνοντας τις υδατοδιαλυτές υπεροξαιλικές ρίζες και έμμεσα συμβάλλοντας στην επαναφορά της γλουταθειόνης στην αντιοξειδωτική της μορφή (GSH), ώστε να μπορεί η τελευταία να απενεργοποιεί οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες. Το ασκορβικό οξύ κατά την αντίδρασή του με οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες, όπως οι τοξικές για τα κύτταρα ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου τις οποίες και αδρανοποιεί, οξειδώνεται σε μονοδεϋδροασκορβικό οξύ και στη συνέχεια σε δεϋδροασκορβικό οξύ. Οι δύο τελευταίες οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος είναι πολύ σταθερότερες ουσίες από τις ελεύθερες ρίζες και έτσι έχουν σαφώς μικρότερη τοξική επίδραση από αυτή των ελευθέρων ριζών. Οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος μετατρέπονται πάλι στην αντιοξειδωτική τους μορφή με την επίδραση της γλουταθειόνης^{10,50}.

Κάποιες προηγούμενες πειραματικές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση του ασκορβικού οξέος στη βλάβη από επαναιμάτωση, είτε σε

απομονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα⁷⁷, είτε σε ζωντανούς οργανισμούς (in vivo)⁸⁰. Τα αποτελέσματα ήταν σε πολλές περιπτώσεις αντιφατικά, δηλαδή κάποιες μελέτες έδειξαν ελάττωση της βλάβης από επαναιμάτωση με την επίδραση του ασκορβικού οξέος, ενώ κάποιες άλλες δεν επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα⁴⁸.

Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ σε υψηλές δόσεις έχει δείξει προστασία από τη βλάβη από επαναιμάτωση σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με εξωσωματική κυκλοφορία⁹. Αυτό αποτέλεσε μία ενδιαφέρουσα ένδειξη για το ρόλο των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου στη βλάβη από επαναιμάτωση, αλλά και για την αποτελεσματικότητα του ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικού φαρμάκου. Ωστόσο, ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών βιταμινών ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης δεν έδειξε όφελος, ως προς την ελάττωση της βλάβης από επαναιμάτωση, κατά την προεγχειρητική χορήγησή τους πριν από καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις⁶⁹. Το παράδειγμα αυτό το αναφέρουμε, όχι ως ένα παράδειγμα αντικρουόμενων μελετών, αλλά ως ένα παράδειγμα το οποίο δείχνει, ότι το αποτέλεσμα των αντιοξειδωτικών ουσιών επηρεάζεται πολύ από τον **τρόπο και το χρόνο χορήγησης, ο οποίος ήταν διαφορετικός** σε αυτές τις δύο μελέτες, ενώ υπήρχε διαφορά και ως προς το συνδυασμό του ασκορβικού οξέος με άλλη ουσία.

Αυτή η μεγάλη εξάρτηση των αποτελεσμάτων των αντιοξειδωτικών φαρμάκων σε συνθήκες ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, από τον τρόπο και το χρόνο χορήγησης, έχει διαπιστωθεί κατά τη σύγκριση πολλών μελετών^{1,4}. Έχει εξηγηθεί ως σχετιζόμενη με την δυνατότητα επίτευξης αποτελεσματικών ιστικών συγκεντρώσεων του αντιοξειδωτικού φαρμάκου στο κρίσιμο αρχικό διάστημα της επαναιμάτωσης^{7,29}.

Η αντιοξειδωτική δράση της **δεσφεροξαμίνης** βασίζεται στο γεγονός ότι δεσμεύει τα ιόντα σιδήρου που συμμετέχουν ως καταλύτης στις αντιδράσεις Fenton και Haber- Weiss. Αυτές οι αντιδράσεις συμμετέχουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με τοξική δράση^{11,52,53}. Αρκετές πειραματικές μελέτες κατέδειξαν επωφελή δράση της δεσφεροξαμίνης στο σύνδρομο επαναιμάτωσης¹², ενώ κάποιες άλλες δεν έδειξαν ευνοϊκά αποτελέσματα^{47,79}. Η προστατευτική επίδραση της δεσφεροξαμίνης στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση σε πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκε

όταν η χορήγηση του φαρμάκου γινόταν πριν από την έναρξη της ισχαιμίας, όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα παρακάτω^{22,32,67,81}.

Επίσης, η επίδραση της δεσφεροξαμίνης στη βλάβη από επαναιμάτωση εξετάσθηκε και σε κλινικές μελέτες, που έγιναν σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε εγχείρηση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (CABG). Σε αυτές τις επεμβάσεις συμβαίνει η καθολική επαναιμάτωση του μυοκαρδίου μετά την καρδιοπληγία. Και αυτή η περίπτωση είναι ένα είδος βλάβης από επαναιμάτωση, στην οποία υπάρχουν επίσης σοβαρές ενδείξεις ότι υπάρχει επιβλαβής επίδραση ελευθέρων ριζών του οξυγόνου^{82,83}. Σε αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση δεσφεροξαμίνης προκάλεσε βελτίωση του κλάσματος εξώθησης μετά την εγχείρηση, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι η δεσφεροξαμίνη ελάττωσε τη βλάβη από επαναιμάτωση. Σημειώνεται ότι στις συγκεκριμένες κλινικές μελέτες η χορήγηση της δεσφεροξαμίνης έγινε πολύ νωρίς, πριν από την επαναιμάτωση⁸². Η επωφελής δράση της δεσφεροξαμίνης αποδόθηκε στην ελάττωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, όπως διαπιστώθηκε από τη σύγκριση των TBARS μεταξύ της ομάδας της δεσφεροξαμίνης και της ομάδας ελέγχου. Σημειώνεται ότι τα TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) είναι χημικές ενώσεις που προκύπτουν από την οξείδωση των λιπιδίων, από τη δράση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και συνεπώς η ανίχνευσή τους αποτελεί ένδειξη για την αυξημένη χημική δραστηριότητα ελευθέρων ριζών και επομένως για την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών του οξυγόνου⁸⁴.

Επιπλέον, ο συνδυασμός της δεσφεροξαμίνης με το ασκορβικό οξύ εμφανίζει ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα, που είναι ο περιορισμός της αυτο-οξείδωσης του ασκορβικού οξέος. Η αυτο-οξείδωση του ασκορβικού οξέος είναι μια διεργασία που μπορεί να μειώσει την αντιοξειδωτική προστατευτική του δράση. Πρόκειται για οξείδωση του ασκορβικού οξέος που γίνεται μέσω μεταλλοκαταλυόμενων αντιδράσεων που απαιτούν την παρουσία ιόντων σιδήρου, ή χαλκού. Αυτά τα ιόντα υπάρχουν σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στο μυοκαρδιακό ιστό κατά την επαναιμάτωση⁸⁵. Η δεσφεροξαμίνη ελαττώνει τη διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου, που απαιτούνται για αυτή την αντίδραση.

Διάφοροι συνδυασμοί αντιοξειδωτικών ουσιών έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε πειραματικές μελέτες μυοκαρδιακής βλάβης από

επαναιμάτωση^{1,68,80,86}. Ωστόσο, αυτό που τελικά προέκυψε από τις πειραματικές μελέτες είναι, ότι από τους διάφορους δυνατούς συνδυασμούς αντιοξειδωτικών φαρμάκων, μόνο λίγοι είναι αυτοί που παρέχουν ενδείξεις μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας σε σύγκριση με τα μεμονωμένα φάρμακα. Σε πειράματα σε απομονωμένες καρδιές ποντικών, που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση δοκιμάστηκαν διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες τόσο με μεμονωμένη χορήγηση του κάθε φαρμάκου ξεχωριστά, όσο και σε συνδυασμό. Διαπιστώθηκε ότι μόνο λίγοι από τους δοκιμαζόμενους συνδυασμούς υπερερούσαν σε αντιοξειδωτική δράση, συγκρινόμενοι με τη χορήγηση των μεμονωμένων συστατικών τους^{7,8,29}. Τέτοιοι ήταν ο συνδυασμός της αμιλορίδης με την διμεθυλουρία και της αμιλορίδης με τη δεσφεροξαμίνη⁵².

Ωστόσο, στη δική μας πειραματική μελέτη, ο συνδυασμός ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης δεν έδειξε σημαντική επίδραση στο μέγεθος του εμφράκτου, στην αρρυθμιογένεση, στη λειτουργία της αριστερής κοιλίας και στην αιματική ροή στην επαναιματωθείσα στεφανιαία αρτηρία. Υπήρξε μόνο μία τάση για μικρότερο μέγεθος εμφράκτου και μία τάση για λιγότερες αρρυθμίες στην ομάδα της αντιοξειδωτικής θεραπείας, η οποία ίσως παρέχει μία ένδειξη μικρής θεραπευτικής επίδρασης του δοκιμαζόμενου συνδυασμού, αλλά όντας μη στατιστικά σημαντική, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη σαφούς θεραπευτικού αποτελέσματος.

Μία πιθανή εξήγηση αυτού του αρνητικού αποτελέσματος σχετίζεται με την οδό και το χρόνο χορήγησης. Η ενδοφλέβια οδός χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, επειδή είναι μία ευχερής οδός χορήγησης φαρμάκων, που εφαρμόζεται και στην καθημερινή κλινική πράξη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για να επιτευχθεί μία σημαντική θεραπευτική επίδραση στη βλάβη από επαναιμάτωση, απαιτείται η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ενός κατάλληλου φαρμάκου (ή συνδυασμού φαρμάκων) στην περιοχή του επαναιματούμενου ιστού πολύ νωρίς, από την αρχή της επαναιμάτωσης^{29,37}. Πραγματικά, στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε δόση των δύο φαρμάκων που υπερέβαινε τη συνήθη θεραπευτική τους δόση και η έγχυσή τους άρχισε πριν από την επαναιμάτωση, με αποτέλεσμα τα δύο φάρμακα να είναι παρόντα στην κυκλοφορία, ώστε να εισχωρήσουν στο μυοκάρδιο άμεσα κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Είναι όμως πιθανό, ότι απαιτούνται τοπικά στην

περιοχή επαναιμάτωσης ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις και μάλιστα από τα πρώτα δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης, προκειμένου να υπάρχει μετρήσιμη θεραπευτική επίδραση^{29,30}. Αυτές οι απαιτούμενες υψηλές ιστικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών φαρμάκων στο μυοκάρδιο κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης, πιθανώς να μην επιτυγχάνονται με την ενδοφλέβια χορήγηση. Χαρακτηριστική για αυτό το θέμα ήταν η πειραματική μελέτη των Kobayashi και συνεργατών σε χοίρους, στην οποία για να επιτευχθεί όφελος στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου χρειάστηκε να γίνει παλίνδρομη τοπική έγχυση της δεσφεροξαμίνης στο μυοκάρδιο μέσω του στεφανιαίου φλεβικού δικτύου. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αυτή την οδό χορήγησης, προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική τοπική συγκέντρωση του φαρμάκου στην περιοχή ενδιαφέροντος⁸⁷.

Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που μπορεί να ερμηνεύσει την αποτυχία της αντιοξειδωτικής θεραπείας σε αυτή τη μελέτη, σχετίζεται με την ίδια τη **δράση των φαρμάκων**. Τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για την επίδραση του ασκορβικού οξέος στη βλάβη από επαναιμάτωση είναι αντιφατικά. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι περιορίζει τη βλάβη, ενώ σε άλλες δεν διαπιστώθηκε όφελος^{49,68,69,70,88}. Επίσης, αντιφατικά αποτελέσματα έχουν προκύψει και από τη μελέτη της επίδρασης της δεσφεροξαμίνης στη βλάβη από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου^{47,79}. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν μία διαπίστωση που αναφέρθηκε ήδη, ότι η επίδραση των αντιοξειδωτικών φαρμάκων στη βλάβη από επαναιμάτωση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος (δόση, οδός, χρόνος χορήγησης, διάρκεια της ισχαιμίας, είδος πειραματοζώου)^{29,37} και από το συγκεκριμένο συνδυασμό φαρμάκων που χρησιμοποιείται⁴⁹.

Ειδικότερα, σε ότι αφορά τη διάρκεια της ισχαιμίας, αυτή επηρεάζει σημαντικά την αναλογία της τελικής μυοκαρδιακής βλάβης που οφείλεται στην επίδραση της ισχαιμίας, σε σύγκριση με αυτή που οφείλεται σε βλάβη που προκαλείται στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Επιπλέον είναι δυσχερής η επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού των αντιοξειδωτικών ουσιών, ώστε να έχουν μεταξύ τους συνεργική δράση και όχι κάποια ενδεχόμενη αρνητική αλληλεπίδραση.

Η δράση ενός συνδυασμού αντιοξειδωτικών φαρμάκων δεν είναι πάντα αθροιστική, ούτε προβλέψιμη με βάση τη δράση των επιμέρους συστατικών. Σε προηγούμενη πειραματική μελέτη σε χοίρους είχε επιλεγεί τριπλός συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών, ασκορβικό οξύ, N-ακετυλοκυστεΐνη και δεσφεροξαμίνη. Ο συγκεκριμένος τριπλός συνδυασμός δεν προσέφερε σημαντική προστασία από τη βλάβη από επαναιμάτωση¹³, παρά το γεγονός ότι προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τα επιμέρους συστατικά.

Σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητα του ασκορβικού οξέος (βιταμίνης C), υπάρχει και μία επιπλέον αιτία προβληματισμού: Η κύρια μορφή διακίνησης του ασκορβικού οξέος μεταξύ εξωκυττάριου και ενδοκυττάριου χώρου είναι η οξειδωμένη μορφή του, δηλαδή το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA)⁸⁹. Όπως αναφέρθηκε, η παραπάνω χημική ουσία ενδοκυτταρίως ανάγεται στην μορφή που έχει αντιοξειδωτική δράση με την επίδραση της γλουταθειόνης. Κατά την περίοδο της ισχαιμίας υφίστανται βλάβη οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης και της γλουταθειόνης⁷⁵. Επομένως, στην αρχή της επαναιμάτωσης είναι ελαττωμένη η προστατευτική (αντιοξειδωτική) μορφή της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα το ασκορβικό να παραμένει σε μεγάλο ποσοστό στην οξειδωμένη μορφή του²². Αυτό ενδέχεται εκτός από την ελάττωση της προστατευτικής αντιοξειδωτικής δράσης του ασκορβικού οξέος να επιφέρει και επιπρόσθετη ήπια οξειδωτική βλάβη, οφειλόμενη στην ήπια οξειδωτική δράση του δεϋδροασκορβικού οξέος. Το τελευταίο, με μια πολύπλοκη σειρά αντιδράσεων διασπάται τελικά σε οξαλικό και θρεονικό οξύ⁷⁵.

Για την ελάττωση της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας του ασκορβικού οξέος στην επαναιμάτωση, υπάρχουν ενδείξεις ότι ευθύνεται και το φαινόμενο της αυτο-οξείδωσης του ασκορβικού οξέος, που αναφέρθηκε παραπάνω⁸⁵. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο πείραμα η αυτο-οξείδωση του ασκορβικού οξέος, πιθανότατα δεν έπαιξε ιδιαίτερο ρόλο, αφού η παρουσία της δεσφεροξαμίνης ελαττώνει τη διαθεσιμότητα των ιόντων σιδήρου, που απαιτούνται για την αυτο-οξείδωση.

Σε ότι αφορά τη δεσφεροξαμίνη, που περιορίζει τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων ιόντων σιδήρου, που απαιτείται για κάποιες αντιδράσεις σχηματισμού ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, έχει ενδιαφέρον να τονισθεί το

εξής: Η προστατευτική επίδραση της δεσφεροξαμίνης στη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση, σε πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκε όταν η χορήγηση του φαρμάκου γινόταν πριν από την έναρξη της ισχαιμίας. Ειδικότερα, αυτό παρατηρήθηκε στη μελέτη των Reddy και συνεργατών, όπου σε πειραματικό μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε σκύλους, διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση δεσφεροξαμίνης προκαλούσε ελάττωση του μεγέθους του εμφράκτου, μόνο στην ομάδα των πειραματοζώων στην οποία η χορήγησή της έγινε πριν από την έναρξη της ισχαιμίας⁹⁰. Αντίθετα στα πειραματόζωα στα οποία η δεσφεροξαμίνη χορηγήθηκε στα τελευταία λεπτά της ισχαιμίας δεν παρατηρήθηκε αυτή η επωφελής επίδραση της⁷⁹.

Ωστόσο, η χορήγηση του φαρμάκου πριν από την έναρξη της ισχαιμίας αποτρέπει την προέκταση των συμπερασμάτων αυτών των μελετών στην κλινική πράξη, αφού στην περίπτωση πχ του εμφράγματος, δεν είναι προβλέψιμη η χρονική στιγμή της έναρξης της ισχαιμίας. Για αυτό το λόγο στην παρούσα πειραματική μελέτη η έναρξη χορήγησης των φαρμάκων γινόταν στα τελευταία λεπτά της ισχαιμίας και στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, ώστε τα όποια συμπεράσματα να μπορούν να αξιοποιηθούν για ενδεχόμενο σχεδιασμό κλινικής μελέτης. Καταλήγουμε επομένως στο συμπέρασμα ότι το χρονικό διάστημα χορήγησης του φαρμάκου ενδεχομένως να έπαιξε καθοριστικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα της πειραματικής μελέτης, με συνέπεια να μην επιτευχθεί επαρκής προστατευτική δράση έναντι της βλάβης από επαναιμάτωση.

Επιπλέον, σε ότι αφορά τη δράση της δεσφεροξαμίνης, από προηγούμενες μελέτες (Borg et al) έχει διαπιστωθεί ένα παράδοξο φαινόμενο: Σε μικρές δόσεις η δεσφεροξαμίνη εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση λόγω της σιδηροδεσμευτικής της ικανότητας που αναφέρθηκε παραπάνω, ενώ σε μεγάλες δόσεις μπορεί παραδόξως να εμφανίσει προοξειδωτική δράση, δηλαδή να επιδεινώσει το υφιστάμενο οξειδωτικό φορτίο⁹¹. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει δυσχέρεια στην επίτευξη εκείνων των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στους ιστούς κατά την επαναιμάτωση, που επιτυγχάνουν το μέγιστο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα, χωρίς παράλληλη επιβλαβή επίδραση, που περιορίζει το τελικό όφελος.

Μία άλλη εξήγηση για την αδυναμία της δεσφεροξαμίνης να επιτύχει περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης από επαναιμάτωση, παρά τη

διαπιστωμένη μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, που επιτυγχάνει μέσω της αναστολής των σιδηροκαταλυόμενων αντιδράσεων, είναι η εξής: Η δεσφεροξαμίνη δεν είναι αρκετά λιπόφιλο μόριο με αποτέλεσμα να μη διαπερνά επαρκώς τις κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό σημαίνει ότι η ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική της δράση είναι σαφώς μικρότερη από την εξωκυττάρια. Τα παραπάνω συνηγορούν για μικρότερη προστασία των ενδοκυττάρων δομών από την επιβλαβή επίδραση των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου που εκλύονται κατά την επαναιμάτωση⁴⁷.

Το γεγονός της αποτυχίας ορισμένων πειραμάτων χορήγησης θεραπευτικών ουσιών κατά την επαναιμάτωση για τη μείωση της έκτασης της μυοκαρδιακής βλάβης οδήγησε κάποιους μελετητές να αμφισβητήσουν ακόμα και την ίδια την ύπαρξη της βλάβης από επαναιμάτωση, θεωρώντας ότι η τελική βλάβη που διαπιστώνεται έχει συμβεί μόνο από την προηγούμενη επιβλαβή επίδραση της ισχαιμίας και καθίσταται απλά εμφανής κατά την επαναιμάτωση. Ωστόσο αυτή η θεωρία δεν επικρατεί σήμερα μεταξύ των επιστημόνων. Σημαντική ένδειξη ότι υπάρχει ένα μέρος της βλάβης (και μάλιστα σημαντικό) που προκαλείται κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης είναι το φαινόμενο της μετα-ισχαιμικής προστασίας (postconditioning). Το φαινόμενο αυτό επιδρά μόνο στην διάρκεια της επαναιμάτωσης και επιφέρει ελάττωση της έκτασης του εμφράκτου (δηλαδή της μυοκαρδιακής νεκρωτικής περιοχής, όπως διαπιστώθηκε σε πειραματικές μελέτες αλλά και σε μελέτη σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική^{26,92}. Η μετα-ισχαιμική προστασία εφαρμόζεται με μία σειρά βραχέων περιόδων ισχαιμίας και επαναιμάτωσης αμέσως μετά από ένα παρατεταμένο επεισόδιο ισχαιμίας, δηλαδή αμέσως μετά το κυρίως ισχαιμικό επεισόδιο. Η μελέτη της έχει μεγάλη σημασία τόσο από πλευράς βιοχημικού μηχανισμού, όσο και από πλευράς αποτελεσματικότητας, επειδή σε αντίθεση με την ισχαιμική προετοιμασία ή ισχαιμική προπόνηση (ischemic preconditioning), η μετα-ισχαιμική προστασία είναι ένας θεραπευτικός χειρισμός που μπορεί να εφαρμοσθεί σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα, αμέσως μετά τη διάνοιξη της αποφραγμένης αρτηρίας. Αυτό μπορεί να γίνει με εφαρμογή μικρών διαδοχικών περιόδων φουσκώματος και ξεφουσκώματος του μπαλονιού της αγγειοπλαστικής. Οι Patrick Staat και συνεργάτες διενήργησαν μία τυχαιοποιημένη μελέτη που περιέλαβε 30 ασθενείς, που

υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική με άμεση τοποθέτηση stent στην οξεία φάση εμφράγματος του μυοκαρδίου. Έδειξαν ότι η εφαρμογή μετα-ισχαιμικής προστασίας με έναρξη εντός του πρώτου λεπτού από την τοποθέτηση του stent, 4 διαδοχικών φάσεων φουσκώματος και ξεφουσκώματος του μπαλονιού διάρκειας ενός λεπτού, προκάλεσε ελάττωση κατά 36 % του εκτιμώμενου μεγέθους του εμφράκτου στην ομάδα ασθενών που υποβλήθηκε σε μετα-ισχαιμική προστασία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η οποία δεν υποβλήθηκε σε αυτή την παρέμβαση⁹².

Πειραματικές μελέτες έδειξαν τη συμμετοχή διαφόρων μηχανισμών στην καρδιοπροστατευτική δράση της μετα-ισχαιμικής προστασίας, όπως η ενεργοποίηση της κινάσης PI3, της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και της πρωτεϊνικής κινάσης B (γνωστής και ως Akt), η αναστολή της διάνοιξης των πόρων MPTP των μιτοχονδρίων, η ελάττωση της συσσώρευσης ουδετεροφίλων λευκοκυττάρων στην περιοχή του επαναιματούμενου μυοκαρδίου, η ελάττωση της ενδοκυττάριας και ενδομιτοχονδριακής υπερφόρτωσης με ασβέστιο και η ελάττωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών του οξυγόνου και γενικότερα αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου, με συνέπεια τον περιορισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης⁹²⁻⁹⁴. Το τελευταίο εύρημα αποτελεί ένδειξη ότι ο μηχανισμός της μετα-ισχαιμικής προστασίας εμφανίζει συσχέτιση και με τις διεργασίες αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, γεγονός που αποτελεί μία περαιτέρω ένδειξη για την συμμετοχή των τελευταίων στο φαινόμενο της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου.

Συνεπώς κατά την επαναιμάτωση βρίσκονται σε εξέλιξη κάποιες βιοχημικές διεργασίες πρόκλησης βλάβης, οι οποίες μπορούν να επηρεασθούν με θεραπευτικές παρεμβάσεις που γίνονται μόνο στη διάρκεια της επαναιμάτωσης. Αυτό έχει επίσης αποδειχθεί και από πειραματικές μελέτες στις οποίες επιτεύχθηκε η ελάττωση της μυοκαρδιακής βλάβης μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση από τη χορήγηση διαφόρων ουσιών πολύ νωρίς κατά την αρχή της επαναιμάτωσης. Τέτοιες ουσίες ήταν αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C τύπου δέλτα (PKC-δ), αναστολείς της διάνοιξης των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), αντιοξειδωτικές ουσίες, αναστολείς της ανταλλαγής νατρίου-πρωτονίων, η ερυθροποιητίνη (που δρα

μέσω ενεργοποίησης των κινασών σωτηρίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση –RISK οι οποίες περιορίζουν την απόπτωση και τη νέκρωση) και άλλες²⁵. Σημειώνεται ότι οι διάφορες κινάσες που αναφέρονται παραπάνω, αποτελούν ένζυμα, που μέσω της φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, εξυπηρετούν τη μετάδοση βιοχημικών σημάτων, πολλά από τα οποία συνδέονται με το θάνατο ή την επιβίωση του κυττάρου. Ωστόσο, το θεραπευτικό παράθυρο για να επηρεασθεί η επαναιμάτωση είναι πολύ στενό και η όποια θεραπευτική παρέμβαση πρέπει να συμβεί στα πρώτα δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης. Αυτό είναι εφικτό μόνο κατά τη διάρκεια αγγειοπλαστικής ή καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων²⁵.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούν βλάβη, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι σε μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να ενεργοποιούν και κάποιες προστατευτικές κυτταρικές λειτουργίες. Ένα παράδειγμα προστατευτικής λειτουργίας αποτελεί η ισχαιμική προετοιμασία ή ισχαιμική προπόνηση του μυοκαρδίου (preconditioning)⁹⁵. Η ισχαιμική προετοιμασία, η οποία ενεργοποιείται από επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών, ασκεί προστατευτική δράση, ενεργοποιώντας βιοχημικές οδούς που περιορίζουν την υπερφόρτιση των μυοκαρδιακών κυττάρων με ασβέστιο και αναστέλλουν τη διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP)²⁶.

Η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας παίζει σημαντικό ρόλο στη βλάβη από επαναιμάτωση, όπως φαίνεται από πειραματικές μελέτες στις οποίες ελαττώθηκε η μυοκαρδιακή βλάβη μετά από χορήγηση αναστολέων αυτών των πόρων κατά την αρχή της επαναιμάτωσης. Οι δύο παραπάνω διεργασίες (υπερφόρτιση με ασβέστιο και διάνοιξη των MPTP) αποτελούν κεντρικές διεργασίες στην πρόκληση του κυτταρικού θανάτου και, όπως αναφέρθηκε, αναστέλλονται από την ισχαιμική προετοιμασία, η οποία ενεργοποιείται από τη μικρή άνοδο των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου^{26,30}.

Συνεπώς, υπάρχει το ενδεχόμενο, εκτός από τη μεγάλη αύξηση των ελευθέρων ριζών που έχει τις επιβλαβείς συνέπειες που αναφέρθηκαν αναλυτικά παραπάνω και η μεγάλη ελάττωσή τους κάτω από κάποιο όριο να έχει επιβλαβείς συνέπειες. Αυτή η θεωρία εξηγείται ως εξής: Η μεγάλη ελάττωση των ελευθέρων ριζών μπορεί να ακυρώνει κάποια βιοχημικά

σήματα που ενεργοποιούν προστατευτικούς μηχανισμούς, τα οποία κινητοποιούνται από την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών του οξυγόνου^{22,96}.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της παραγωγής του παράγοντα TNFα σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσφέρει καρδιοπροστασία και ότι οι ελεύθερες ρίζες επάγουν την καρδιοπροστασία μέσω του TNFα⁹⁷. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ιστούς αποτελεί σήμα για διάφορες μεταβολικές οδούς^{96,97}. Τα κύτταρα διατηρούν μία λεπτή ισορροπία μεταξύ αυτών των προστατευτικών οξειδωτικών σημάτων και των βλαπτικών επιδράσεων της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών²². Είναι πιθανό ότι κάποιοι συνδυασμοί αντιοξειδωτικών φαρμάκων διαταράσσουν αυτή την ισορροπία και ελαττώνουν παράλληλα όχι μόνο τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, αλλά και κάποιες προστατευτικές δράσεις τους.

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στο μηχανισμό της βλάβης από επαναιμάτωση, αλλά αυτό συμβαίνει μέσα στα πλαίσια αλληλεπίδρασης και με άλλους μηχανισμούς, με αποτέλεσμα η όλη διαδικασία να είναι περίπλοκη. Επειδή η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών (όπως το ασκορβικό οξύ, η δεσφεροξαμίνη και πολλές άλλες ουσίες) για τον περιορισμό της βλάβης του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση απαιτεί την έγκαιρη παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών φαρμάκων στον απειλούμενο ιστό, θα ήταν χρήσιμη η μελλοντική μελέτη της ενδοστεφανιαίας χορήγησης τους, αρχικά σε πειραματικό επίπεδο.

Επιπλέον, ίσως άλλοι μηχανισμοί να αποτελούν πιο πρόσφορους στόχους από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, για συνεχιζόμενη έρευνα με σκοπό την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ένα δίκτυο πρωτεϊνικών κινασών που ασκούν προστατευτική δράση απέναντι στην κυτταρική βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Αυτές οι κινάσες αποτελούν σήμερα αντικείμενο έρευνας, επειδή ελαττώνουν το μέγεθος της μυοκαρδιακής βλάβης και γενικότερα την έκταση της καρδιακής δυσλειτουργίας, όταν ενεργοποιηθούν είτε μέσω της μετα-ισχαιμικής προστασίας (postconditioning), είτε μέσω της ισχαιμικής προετοιμασίας - ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου (preconditioning), είτε άμεσα με χορήγηση αγωνιστών, δηλαδή φαρμάκων που τις ενεργοποιούν^{25,27}.

Συνεπώς, η έρευνα για φάρμακα που ενεργοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες προστασίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση, καθώς επίσης και η συστηματική μελέτη του φαινομένου της μετα-ισχαιμικής προστασίας και η αναζήτηση φαρμάκων που ενεργοποιούν τις βιοχημικές οδούς που συμμετέχουν στις διεργασίες της μετα-ισχαιμικής προστασίας και της ισχαιμικής προετοιμασίας, ίσως να είναι η μελλοντική κατεύθυνση στην αναζήτηση θεραπείας για τη μυοκαρδιακή βλάβη από επαναιμάτωση.

Περιορισμοί

Ένας περιορισμός αυτής της μελέτης είναι, ότι η χορήγηση του δοκιμαζόμενου συνδυασμού φαρμάκων έγινε μόνο ενδοφλεβίως και δεν δοκιμάσθηκε κάποια άλλη οδός χορήγησης (πχ ενδοστεφανιαία χορήγηση, ή παλίνδρομη χορήγηση μέσω μίας καρδιακής φλέβας). Σε κάποιες μελέτες διαπιστώθηκε ότι μια τέτοια πιο εστιασμένη και τοπική οδός χορήγησης οδηγεί σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της θεραπείας κατά της βλάβης από επαναιμάτωση, με δεδομένο ότι απαιτείται μεγάλη τοπική συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ουσίας στο μυοκαρδιακό ιστό ήδη από τα πρώτα δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης. Βέβαια, μια τέτοια οδός χορήγησης χρησιμοποιείται σπανίως στην πράξη και πιθανώς θα καθιστούσε δυσχερέστερη τη θεωρητική προέκταση των συμπερασμάτων της μελέτης στο σύνηθες κλινικό σενάριο του οξέος εμφράγματος.

Ένας δεύτερος περιορισμός της μελέτης είναι ότι δεν υπήρξε εκτίμηση της απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου χωρίς φλεγμονή) των μυοκαρδιακών κυττάρων. Είναι ενδεχόμενο, κάποιος αριθμός μυοκαρδιακών κυττάρων που δεν είχαν υποστεί ακόμη νέκρωση κατά τη χρονική στιγμή της εκτίμησης της έκτασης της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής, να είχαν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη με αποτέλεσμα την προγραμματισμένο θάνατό τους (απόπτωση) στο εγγύς μέλλον. Σύμφωνα με κάποιες πειραματικές μελέτες, η βλάβη από επαναιμάτωση μπορεί να προκαλέσει κυτταρική απόπτωση, πιθανά σαν συνέπεια οξειδωτικών διεργασιών^{78,98,99}. Συνεπώς η μέτρηση της απόπτωσης θα μπορούσε να προσφέρει πρόσθετα στοιχεία για την επίδραση διαφόρων φαρμάκων στη βλάβη από επαναιμάτωση.

Επιπλέον πρόσφατα βρέθηκε ότι ο βιοχημικός μηχανισμός της απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου χωρίς φλεγμονώδεις διεργασίες) εμφανίζει αλληλεπίδραση με το μηχανισμό της νέκρωσης (κυτταρικός θάνατος με λύση της κυτταρικής μεμβράνης που ενεργοποιεί φλεγμονώδεις διεργασίες). Αυτό διαπιστώθηκε από το γεγονός ότι κάποιοι παράγοντες που αναστέλλουν την απόπτωση (αντιαποπτωτικοί παράγοντες) ελαττώνουν και το μηχανισμό της κυτταρικής νέκρωσης. Αυτά τα δεδομένα προσδίδουν στο μηχανισμό της απόπτωσης ακόμα μεγαλύτερη σημασία στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου, αφού φάρμακα που αναστέλλουν την απόπτωση, τα οποία αποτελούν ένα πεδίο έρευνας, μπορεί παράλληλα να περιορίζουν και τον άλλο μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου, αυτόν της νέκρωσης. Αυτό συνάγεται από την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών των δύο μηχανισμών κυτταρικού θανάτου^{100,101}. Συνεπώς είναι σκόπιμο να εξετάζεται η επίδραση των διαφόρων δοκιμαζόμενων θεραπειών στη διεργασία της απόπτωσης, πράγμα που δεν έγινε στην παρούσα μελέτη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση της συνδυασμένης ενδοφλέβιας χορήγησης ενός συνδυασμού ουσιών (της βιταμίνης C και της δεσφεροξαμίνης) στη βλάβη του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση. Οι δύο παραπάνω ουσίες έχουν δράση που περιορίζει την επίδραση των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου, με διαφορετικούς και πιθανά συνεργικούς μηχανισμούς. Η επίδραση αυτού του φαρμακευτικού συνδυασμού σε ένα πειραματικό πρωτόκολλο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου δεν έχει έως τώρα μελετηθεί επαρκώς στη βιβλιογραφία, στην οποία υπάρχουν κυρίως μελέτες για την επίδραση των επιμέρους συστατικών του, ή των συνδυασμών τους με άλλες ουσίες^{8-13,47-49}. Η αναζήτηση ενός αποτελεσματικού συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών, αποτελεί μία λογική συνέχεια της εκτεταμένης έρευνας που έχει γίνει για την αθρόα παραγωγή ελεύθερων ριζών του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου και για τη συμμετοχή τους στους παθογενετικούς μηχανισμούς πρόκλησης βλάβης.

Διαπιστώσαμε ότι η συνδυασμένη ενδοφλέβια έγχυση ασκορβικού οξέος και δεσφεροξαμίνης κατά το χρονικό διάστημα λίγων λεπτών περί την έναρξη της επαναιμάτωσης (λίγα λεπτά πριν και λίγα λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης), δεν προσφέρει σημαντική και αποτελεσματική προστασία από τη βλάβη από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, διατηρώντας μόνο την επιφύλαξη ότι παρατηρήθηκε μία τάση για βελτίωση κάποιων παραμέτρων της βλάβης, όπως η έκταση της νεκρωτικής μυοκαρδιακής περιοχής και ο αριθμός των μη εμμενουσών κοιλιακών αρρυθμιών, η οποία ωστόσο δεν πληρούσε τα κριτήρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Η αποτυχία του συγκεκριμένου θεραπευτικού συνδυασμού φαρμάκων, ανασταλτικών της επίδρασης των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, να αποδώσει σημαντικά οφέλη στη βλάβη του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση, δεν μπορεί να οδηγήσει στην απόρριψη της επιστημονικής υπόθεσης για το ρόλο που διαδραματίζουν οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και γενικότερα οι αντιδραστικές μορφές του οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μία

τάση για όφελος σε κάποιες επιμέρους παραμέτρους, έστω μη σημαντική, σε συνδυασμό με τις αναφορές στη βιβλιογραφία για τη σημασία της κατάλληλης οδού χορήγησης και της έγκαιρης παρουσίας από την αρχή της επαναιμάτωσης επαρκών συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών ουσιών, οδηγεί στο εξής συμπέρασμα: Το μη σημαντικό όφελος που έδειξε ο συγκεκριμένος φαρμακευτικός συνδυασμός, μπορεί να αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό σε τέτοιες αιτίες, που σχετίζονται με τη φαρμακοκινητική, δηλαδή με το χρόνο επίτευξης αποτελεσματικών συγκεντρώσεων φαρμάκου σε συγκεκριμένους ιστούς. Αυτό θα καθιστούσε σκόπιμη τη δοκιμή κάποιας πιο αποτελεσματικής οδού χορήγησης των φαρμάκων, όπως είναι, ενδεχομένως, η ενδοστεφανιαία οδός.

Ωστόσο, η δυσχέρεια επίτευξης σταθερών και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων με τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών στην αντιμετώπιση της βλάβης του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση, αποτελεί ένα γενικότερο εύρημα που διαπιστώνεται από τη μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Αυτό το εύρημα αποδίδεται εν μέρει στη δυσχέρεια επίτευξης των αναγκαίων συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών φαρμάκων ήδη από την αρχή της επαναιμάτωσης, αλλά και στον περίπλοκο τρόπο δράσης των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου, οι οποίες ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχουν κυρίως επιβλαβείς επιδράσεις, σε μικρότερες συγκεντρώσεις συμμετέχουν στη μετάδοση βιοχημικών σημάτων που ενεργοποιούν προστατευτικούς μηχανισμούς. Συνεπώς, η φαρμακευτική εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου έχει το πλεονέκτημα της αναστολής των επιβλαβών τους επιδράσεων, αλλά πιθανώς η πολύ μεγάλη εξουδετέρωσή τους, να έχει και το μειονέκτημα της παράλληλης απώλειας προστατευτικών βιοχημικών μηχανισμών. Για αυτό το λόγο, το ερευνητικό ενδιαφέρον πρέπει να στραφεί και προς πιο εκλεκτικές θεραπευτικές παρεμβάσεις, που επηρεάζουν άλλα μεταγενέστερα στάδια των βιοχημικών διεργασιών, που προκαλούν τη βλάβη από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Αυτό, όπως αναφέρεται παρακάτω, μπορεί να γίνει με θεραπείες που στοχεύουν σε κάποιους παθογενετικούς μηχανισμούς που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα.

Η παρούσα πειραματική μελέτη ενισχύει την μέχρι σήμερα παρατηρούμενη αντίφαση μεταξύ των πολλών ενδείξεων, που προέρχονται

από τη βασική έρευνα, για τη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου στην πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση και της αδυναμίας ανεύρεσης μίας αντιοξειδωτικής θεραπείας που να επιφέρει σαφή οφέλη στον περιορισμό αυτής της βλάβης. Κομβική σημασία έχει η έλλειψη επαρκούς επαναληψιμότητας του θεραπευτικού αποτελέσματος των αντιοξειδωτικών φαρμάκων υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, καθώς επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη διάρκεια της ισχαιμίας, και το χρόνο και την οδό χορήγησης των φαρμάκων.

Επιπλέον, η βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση είναι φαινόμενο πολυπαραγοντικό, με συμμετοχή πολλαπλών βιοχημικών μηχανισμών και διαφορετικών οδών μετάδοσης βιοχημικών σημάτων, που παρουσιάζουν μεταξύ τους περίπλοκες αλληλεπιδράσεις. Νεότερες ανακαλύψεις έχουν δώσει νέα ώθηση στην έρευνα του φαινομένου της βλάβης από επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, ή της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, όπως είναι σωστότερο να λέγεται, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές. Τέτοιες νεότερες ανακαλύψεις είναι ο ρόλος της μετα-ισχαιμικής προστασίας (ischemic postconditioning), ο ρόλος των κινασών προστασίας από τη βλάβη από επαναιμάτωση (κινάσες RISK), η λειτουργία των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), ο ρόλος διαβιβαστών βιοχημικών σημάτων όπως είναι η αδενosίνη και τα οπιοειδή και η συμμετοχή των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου σε επιβλαβείς μηχανισμούς, όπως η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας, αλλά και σε προστατευτικούς μηχανισμούς, όπως είναι η ενεργοποίηση της ισχαιμικής προετοιμασίας ή ισχαιμικής προπόνησης του μυοκαρδίου (ischemic preconditioning)^{5,100}.

Το ζήτημα της βλάβης του μυοκαρδίου από ισχαιμία και επαναιμάτωση και ο επιμέρους ρόλος των αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου, εξακολουθεί να είναι επίκαιρο ερευνητικό πεδίο, επειδή υπάρχουν ακόμα σημαντικά κενά στην κατανόηση του παθογενετικού τους ρόλου. Ωστόσο, μεγάλο μέρος της έρευνας στρέφεται πλέον και προς την προσπάθεια κατανόησης και θεραπευτικής αξιοποίησης των άλλων παθογενετικών μηχανισμών, που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, οι οποίοι ανακαλύφθηκαν πιο πρόσφατα και φαίνεται να ανοίγουν το δρόμο για πιο εκλεκτικές θεραπευτικές παρεμβάσεις. Οι νεότερες ανακαλύψεις έχουν

δημιουργήσει ανανεωμένο ενδιαφέρον και έχουν «γεννήσει» νέα ερωτήματα. Φυσικά, ο στόχος της συνεχιζόμενης έρευνας παραμένει η εφαρμογή των νέων γνώσεων στην κλινική πράξη, για την επίτευξη της καρδιοπροστασίας, δηλαδή του περιορισμού της βλάβης και της δυσλειτουργίας του μυοκαρδίου και της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας κατά την αλληλουχία της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΒΛΑΒΗ ΕΞ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.

Εισαγωγή: Κατά την επαναιμάτωση ισχαιμούντος μυοκαρδίου, παράγονται ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, που σε αλληλεπίδραση με άλλους μηχανισμούς, όπως η υπερφόρτωση των κυττάρων με ασβέστιο και η διάνοιξη των πόρων μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), προκαλούν επιβλαβείς επιδράσεις στα κύτταρα του μυοκαρδίου, γνωστές ως, βλάβη από επαναιμάτωση. Η βλάβη από επαναιμάτωση δεν ακυρώνει το όφελος από την έγκαιρη επαναιμάτωση, που είναι μεγάλο, αλλά το ελαττώνει σε κάποιο βαθμό.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διευκρινίσουμε αν η συνδυασμένη θεραπεία με την αντιοξειδωτική ουσία, ασκορβικό οξύ και το σιδηροδεσμευτικό φάρμακο δεσφεριοξαμίνη, (που ελαττώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω σιδηροκαταλυόμενων αντιδράσεων), έχει προστατευτική δράση έναντι της βλάβης από επαναιμάτωση.

Μέθοδος: Είκοσι-δύο χοιρίδια υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία και σε ισχαιμία 45 λεπτών και επαναιμάτωση 3½ ωρών στην περιοχή της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας, με χρήση μπαλονιού αγγειοπλαστικής.

Τα ζώα κατανεμήθηκαν τυχαιοποιημένα στην ομάδα θεραπείας (ΟΘ) στην οποία χορηγήθηκε ενδοφλέβια έγχυση 100 mg/kg ασκορβικού οξέος και 60 mg/kg δεσφεριοξαμίνης και στην ομάδα ελέγχου (ΟΕ), στην οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο.

Η αναλογία (I/R) της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου (I) σε σχέση με τη συνολική περιοχή σε κίνδυνο (R), μετά από 3½ ώρες επαναιμάτωσης υπολογίσθηκε με τη μέθοδο της χρώσης τετραζολίου (TTC). Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP), ο αριθμός των επεισοδίων κοιλιακών αρρυθμιών, η ροή στο αγγείο κατά TIMI και το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) εξετάσθηκαν την πρώτη ώρα από την έναρξη της επαναιμάτωσης, ως περαιτέρω δείκτες της βαρύτητας της βλάβης.

Αποτελέσματα: Το I/R στην ΟΘ (n=10) ήταν $27,9\pm 2,2\%$ και στην ΟΕ (n=9) ήταν $32,9\pm 2,4\%$ ($p=0,15$). Συνεπώς, παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μία τάση για μικρότερο έμφρακτο (I) στην ΟΘ, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αναφορικά με τις άλλες παραμέτρους που εξετάστηκαν, επίσης η διαφορά δεν ήταν σημαντική, παρά την τάση για μικρότερο αριθμό κοιλιακών αρρυθμιών στην ΟΘ.

Συμπέρασμα: Η συνδυασμένη ενδοφλέβια χορήγηση των αντιοξειδωτικών ασκορβικό οξύ και δεσφεριοξαμίνη, παρά την ύπαρξη μίας τάσης για μικρότερο έμφρακτο και λιγότερες αρρυθμίες, δεν προσφέρει μείζονα οφέλη στη μείωση της βλάβης του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση. Η ενδοφλέβια χορήγηση ενδεχομένως δεν επιτυγχάνει τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών στους ιστούς, προκειμένου να ασκήσουν προστατευτική δράση.

SUMMARY

REPERFUSION INJURY AND PROTECTION WITH THE ADMINISTRATION OF ANTIOXIDANTS. EXPERIMENTAL STUDY.

Georgios N Chatziathanasiou

Introduction: During reperfusion of ischemic myocardium, oxygen free radicals are generated, which interact with other mechanisms, such as cellular calcium overload and the opening of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) and cause detrimental effects on myocardial cells, known as reperfusion injury. Reperfusion injury does not cancel the great beneficial effect of early reperfusion, but it reduces it to some extent.

The aim of this study was to assess whether the combined treatment with the antioxidant ascorbic acid and the ferrum binding drug desferroxamine (which binds ferrum and reduces the production of free radicals through ferrum-catalyzed reactions), has a protective effect against reperfusion injury.

Method: Twenty-two pigs were subjected to general anesthesia and to ischemia for 45 minutes and reperfusion for 3½ hours in the territory of the circumflex coronary artery, using an angioplasty balloon.

Animals were randomly assigned into the treatment group (TG) which received an intravenous infusion of 100 mg / kg of ascorbic acid and 60 mg / kg desferroxamine and the control group (CG), which did not receive the above treatment.

The ratio (I / R) of the infarct (necrotic) region (I) relative to the total area at risk (R), after 3½ hours of reperfusion was measured by means of the tetrazolium chloride staining method (TTC). The end-diastolic pressure of the left ventricle (LVEDP), the number of episodes of ventricular arrhythmias, TIMI flow grade in the reperfused artery and left ventricular ejection fraction (LVEF) were assessed during the first hour from the onset of reperfusion, as further indicators of the severity of myocardial injury.

Results: I / R in the TG (n = 10) was $27,9 \pm 2,2\%$ and in the CG (n = 9) was $32,9 \pm 2,4\%$ (p = 0,15). Thus, despite the fact that a tendency for a smaller infarct (I) was observed in the TG, the difference was not statistically

significant. Regarding the other parameters examined, also there was no significant difference, despite a tendency for a smaller number of ventricular arrhythmias in the TG.

Conclusion: Combined intravenous administration of the antioxidants ascorbic acid and desferroxamine, despite a tendency towards smaller infarction and fewer arrhythmias, did not produce a significant reduction in myocardial reperfusion injury. Intravenous administration probably does not achieve the tissue concentrations of antioxidants required to exert a protective effect.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *International Journal of Cardiology* 1997; 58:95-117
2. Baine KR, Armstrong PW. Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2014;167:637- 645
3. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2012;33: 2569- 2619
4. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, et al. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 2005;100:179-190
5. Prasad A, Stone GW, Holmes DR, et al. Reperfusion Injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: The "dark side" of reperfusion. *Circulation*. 2009;120:2105- 2112
6. Elahi MM, Xiang Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2: 259-269.
7. Moukarbel GV, Ayoub CM, Abchee AB. Pharmacological therapy for myocardial reperfusion injury. *Current Opinion in Pharmacology* 2004;4:147-153
8. Liem DA, Honda HM, Zhang J, et al, Past and present course of cardioprotection against ischemia- reperfusion injury. *J Appl Physiol* 2007;103:2129- 2136
9. Dingchao H, Zhiduan Q, Liye H, et al. The protective effects of high- dose ascorbic acid on myocardium against reperfusion injury during and after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994;42:276- 278
10. Gao F, Yao CL, Gao E, et al. Enhancement of glutathione cardioprotection by ascorbic acid in myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:543- 550
11. Chopra K, Singh M, Kaul N, et al. Decrease of myocardial infarct size with desferrioxamine: possible role of oxygen free radicals ameliorative effect. *Mol Cell Biochem* 1992;113:71-76
12. Williams RE, Zweier JL, Flaherty JT. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. *Circulation* 1991; 83: 1006-1014
13. Nikas DN, Chatziathanasiou G, Kotsia A, et al. Effect of intravenous administration of antioxidants alone and in combination on myocardial reperfusion injury in an experimental pig model. *Cur Ther Res* 2008;69:423- 439
14. Verdouw PD, Van den Doel MA, de Zeeuw S, et al. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39:121-135
15. Naslund U, Haggmark S, Johansson G, et al. A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Heart J* 1992;13:1282-1289
16. Chatziathanasiou GN, Nikas DN, Katsouras CS, et al. Combined Intravenous Treatment with Ascorbic Acid and Desferrioxamine to Reduce Myocardial

- Reperfusion Injury in an Experimental Model Resembling the Clinical Setting of Primary PCI. *Hellenic J Cardiol* 2012;53: 195- 204
17. Χατζηαθανασίου Γ, Νίκας Δ, Κατσούρας Χ, et al. Δοκιμή Συνδυασμού Ενδοφλέβιας Θεραπείας με Ασκορβικό Οξύ και Δεσφεριοξαμίνη για την Ελάττωση της Μυοκαρδιακής Βλάβης από Επαναιμάτωση, σε Ένα Πειραματικό Μοντέλο που Προσομοιάζει την Πρωτογενή Αγγειοπλαστική σε Οξύ Έμφραγμα. *Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση* 2012;53: 135-145
 18. Jauch EC, Saver JL, Adams HP Jr, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44:870- 947
 19. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28- e292
 20. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med* 2013;369: 448- 457
 21. Crea F, Liuzzo G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1-11
 22. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004;61:461- 470
 23. Hearse DJ. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: successes and failures in the journey from molecule to man. *Eur Heart J Supplements* 2001;3: C11- C21
 24. Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;40:517- 547
 25. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms Underlying Acute Protection from Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiol Rev* 2008;88: 581- 609
 26. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.2011;301: H1723- H1741
 27. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121- 1135
 28. Reichek N, Parcham-Azad K. Reperfusion Injury Putting the Genie Back in the Bottle? *JACC* 2010;55:1206-1208
 29. Wang QD, Pernow J, Sjöquist PO, et al. Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2002;55: 25- 37
 30. Braunersreuther V, Jaquet V. Reactive Oxygen Species in Myocardial Reperfusion Injury: From Physiopathology to Therapeutic Approaches. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012;13: 97-114
 31. Burrell CJ, Blake DR. Reactive oxygen metabolites and the human myocardium. *Heart J* 1989;61: 4-8
 32. Hiraishi H, Terano A, Razandi M, et al. Reactive oxygen metabolite- induced toxicity to cultured bovine endothelial cells: status of cellular iron in mediating injury. *J Cell Physiol* 1994;160:132-134
 33. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;54: 277- 285

34. Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:1359-1374
35. Salvemini D, Cuzzocrea S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3: 886- 895
36. Venturini CM, Flickinger AG, Womack CR, et al. The Antioxidant, N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG), Does Not Reduce Myocardial Infarct Size in an Acute Canine Model of Myocardial Ischemia and Reperfusion. *J Thromb Thrombolysis* 1998;5:135-141
37. Ryden L, Sjöquist PQ, Wang QD. Pharmacological tools for the limitation of myocardial reperfusion injury. *Eur Heart J Supplements* 2001;3: C28- C35
38. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, et al. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest* 2005;115: 3527- 3535
39. Karahaliou A, Katsouras C, Koulouras V, et al. Ventricular arrhythmias and antioxidative medication: Experimental study. *Hellenic J Cardiol* 2008;49: 320-322
40. Nakaya H, Tohse N, Kanno M. Electrophysiological derangements induced by lipid peroxidation in cardiac tissue. *Am J Physiol* 1987;253: H1089–1097
41. Kloner RA, Alker KJ. The effect of streptokinase on intramyocardial hemorrhage, infarct size and the no-reflow phenomenon during coronary reperfusion. *Circulation* 1984;70: 513–521
42. Ferrari R. Pathophysiological vs biochemical ischaemia: a key to transition from reversible to irreversible damage. *Eur Heart J Supplements* 2001;3: C2- C10
43. Πεντούκας Η Ι, Λάζαρος Γ Α. Το μυοκάρδιο σε χειμερία νάρκη. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2001;18: 35- 38
44. Kals J, Starkopf J, Zilmer M, et al. Antioxidant UPF1 attenuates myocardial stunning in isolated rat hearts. *International Journal of Cardiology* 2008;125: 133-135
45. Kovacs P, Bak I, Szendrei L, et al. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001;364: 501-507
46. Stout TJ, Foster PG, Matthews DJ. High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases. *Curr. Pharm. Des* 2004;10:1069- 1082
47. Watanabe BI, Limm W, Suehiro A, et al. Failure of deferoxamine to reduce myocardial infarct size in a primate model of ischemia- reperfusion injury. *J Surg Res* 1993;55: 537-542
48. Bellows SD, Hale SL, Simkhovitz BZ, et al. Do antioxidant vitamins reduce infarct size following acute myocardial ischemia/reperfusion? *Cardiovasc Drugs Ther* 1995;9:117-123
49. Doppelfeld IS, Parnham MJ. Experimental conditions determine effects of ascorbic acid on reperfusion injury: comparison of tissue damage with hemodynamic parameters in rat isolated hearts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1992;14: 419- 430
50. Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *Faseb J* 1993;7:1135-1142
51. Martensson J, Meister A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 4656- 4660

52. Karwatowska-Prokopczuk E, Czarnowska E, Beresewicz A. Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 1992;26: 58- 66
53. Paraskevaidis IA, Iliodromitis EK, Vlahakos D, et al. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *Eur Heart J* 2005;26: 263- 270
54. Johnson FL. Pathophysiology and Etiology of Heart Failure. *Cardiol Clin* 2014;32: 9-19
55. Rouleau JL, Talajic M, Sussex B, et al. Myocardial infarction patients in the 1990s-their risk factors, stratification and survival in Canada: the Canadian Assessment of Myocardial Infarction (CAMI) Study. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1119-1127
56. Planer D, Mehran R. Prognostic utility of left ventricular end-diastolic pressure in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2011;108: 1068-1074
57. Cura FA, L'Allier PL, Kapadia SR, et al. Predictors and prognosis of suboptimal coronary blood flow after primary coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2001;88:124-128
58. TIMI Study Group. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial: Phase I findings. *N Engl J Med* 1985; 312: 932- 936
59. Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R, et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, phase 1: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. *Circulation* 1987;76: 142-154.
60. Miller TD, Christian TF, Hopfenspirger MR, et al. Infarct size after acute myocardial infarction measured by quantitative tomographic ^{99m}Tc sestamibi imaging predicts subsequent mortality. *Circulation* 1995;92: 334- 341
61. Kloner RA, Darsee JR, DeBoer LW. Early pathologic detection of acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med* 1981;105: 403- 406
62. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101: 593- 600
63. Sandler H, Dodge HT. The use of single plane angiocardiograms for the calculation of left ventricular volume in man. *Am Heart J* 1968;75: 325- 334
64. Wynne J, Green LH, Mann T, et al. Estimation of left ventricular volumes in man from biplane cineangiograms filmed in oblique projections. *Am J Cardiol* 1978;41: 726- 732
65. Roberts MJ, Young IS, Trouton TG, et al. Transit release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet* 1990;336:143-145
66. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, et al. Direct detection of free radicals in reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 1987;61:757- 760
67. Lesnsefsky EJ, Repine JE, Horwitz LD. Deferoxamine pretreatment reduces canine infarct size and oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:1103-1109
68. Mickle DA, Li RK, Weisel RD, et al. Myocardial salvage with trolox and ascorbic acid for an acute evolving infarction. *Ann Thorac Surg* 1989;47: 553- 557
69. Westhuyzen J, Cochrane AD, Tesar PJ, et al. Effect of preoperative supplementation with alpha- tocopherol and ascorbic acid on myocardial injury

- in patients undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113: 942- 948
70. Molyneux CA, Glyn MC, Ward BJ. Oxidative stress and cardiac microvascular structure in ischemia and reperfusion: the protective effect of antioxidant vitamins. *Microvasc Res* 2002;64: 265- 277
 71. Sobel BE, Bresnahan GF, Shell WE, et al. Estimation of infarct size in man and its relation to prognosis. *Circulation*, 1972;46: 640- 648
 72. Kelle S, Roes S, Klein C, et al. Prognostic value of myocardial infarct size and contractile reserve using magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1770-1777
 73. Ndrepepa G, Mehilli J, Schulz SJ. Prognostic significance of epicardial blood flow before and after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2008;52: 512- 517
 74. Ndrepepa G, Kastrati A, Schwaiger M, et al. Relationship between residual blood flow in the infarct-related artery and scintigraphic infarct size, myocardial salvage, and functional recovery in patients with acute myocardial infarction. *J Nucl Med* 2005;46: 1782-1788
 75. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47: 446- 456
 76. Daneault B, Généreux P, Kirtane AJ, et al. Comparison of three-year outcomes after primary percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fraction <40% versus \geq 40% (from the HORIZONS-AMI trial). *Am J Cardiol* 2013;111:12- 20
 77. Rinne T, Mutschler E, Wimmer-Greinecker G, et al. Vitamins C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage. *Int J Cardiol* 2000;75: 275- 281
 78. Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz* 2002;27: 662- 668
 79. Reddy BR, Wynne J, Kloner RA, et al. Pretreatment with the iron chelator desferrioxamine fails to provide sustained protection against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1991;25: 711- 718
 80. Klein HH, Pich S, Lindert S, et al. Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. *Am Heart J* 1989;118: 667- 673
 81. Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, et al. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *J Biol Chem* 1993;268: 416- 420
 82. Ferreira R, Burgos M, Miley J, et al. Effect of supplementing cardioplegic solution with deferoxamine on reperfused human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100: 708- 714.
 83. De Hert S, Moerman A. Myocardial injury and protection related to cardiopulmonary bypass. *Clinical Anaesthesiology* 2015;29: 137- 149
 84. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9: 515- 540
 85. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95-108
 86. Paquin J, Aouffen M, De Grandpre E, et al. Neuroprotective and cardioprotective actions of an association of pyruvate, vitamin E and fatty acids. *Arzneimittelforschung* 2005;55: 359- 369

87. Kobayashi S, Tadokoro H, Wakida Y, et al. Coronary venous retroinfusion of deferoxamine reduces infarct size in pigs. *J Am Coll Cardiol* 1991;18: 621- 627
88. Chambers DJ, Astras G, Takahashi A, et al. Free radicals and cardioplegia: organic anti-oxidants as additives to the St Thomas' Hospital cardioplegic solution. *Cardiovasc Res* 1989;23: 351- 358
89. Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J, et al. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 1993;364:79- 82
90. Reddy BR, Kloner RA, Przyklenk K. Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1989;7: 45- 52
91. Borg DC, Schaich KM. Prooxidant action of desferrioxamine: Fenton-like production of hydroxyl radicals by reduced ferrioxamine. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2: 237- 243
92. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the Human Heart. *Circulation*. 2005;112: 2143- 2148
93. Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004;44: 1103- 1110
94. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288: 1900 -1908
95. Cokkinos DV, Pantos C. Myocardial Protection: a new holy grail of contemporary cardiology. *Hell J Cardiol* 2005;46: 249- 257
96. Sipral S. Cardiac signaling and the "Convergent hypothesis": Probing the structural-functional nexus of the heart. *Hellenic J Cardiol* 2010;51: 428- 436
97. Lecour S, Rochette L, Opie L. Free radicals trigger TNF α -induced cardioprotection. *Cardiov Res* 2005;65: 239- 243
98. Vanden Hoek T, Qin Y, Wojcik K, et al. Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:141-150
99. Maulik N, Yoshida T. Oxidative stress developed during open heart surgery induces apoptosis: reduction of apoptotic cell death by ebselen, a glutathione peroxidase mimic. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36: 601- 608
100. Buja M. The Pathobiology of Acute Coronary Syndromes. Clinical Implications and Central Role of the Mitochondria. *Tex Heart Inst J* 2013;40: 221- 228
101. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16:233-238

