



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Ι.Α. Γουδέβενος
Καθηγητής Παθολογίας - Καρδιολογίας

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
Υπεύθυνη: Π. Βεζυράκη
Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ – ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Θ. Βουγιουκλάκης
Καθηγητής Ιατροδικαστικής - Τοξικολογίας

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗ
ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΒΛΑΒΗ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΪΤΑΙ
ΜΕΤΑ ΙΣΧΑΙΜΪΑ – ΕΠΑΝΑΙΜΆΤΩΣΗ.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΉ ΜΕΛΉΤΗ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ν. ΝΙΚΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Ιωάννινα 2009

«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. Νίκα Δημητρίου: 25-5-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 360^α/6-10-1998

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σιδεράς Δημήτριος Καθηγητής Καρδιολογίας

Μέλη

Γουδέβενος Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας

Μιχάλης Λάμπρος Λέκτορας Καρδιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-10-1998

«Επίδραση αντιοξειδωτικών στη μυοκαρδιακή βλάβη που προκαλείται μετά ισχαιμία-επαναιμάτωση. Πειραματική μελέτη»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666^α/22-9-2009

1. Βουγιουκλάκης Θεόδωρος Καθηγητής Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Σιδεράς Δημήτριος Ομότιμος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Βεζυράκη Πατρόνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μηλιώνης Χαράλαμπος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Νάκα Αικατερίνη Λέκτορας Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-11-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



... στη σύζυγο μου Βανέσσα

*«Αν η γνώση μας προκαλεί προβλήματα
δεν είναι η άγνοια αυτή που θα μας τα λύσει»*

Isaac Asimov

Πρόλογος

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα και κυρίως η στεφανιαία νόσος παραμένουν η πρώτη αιτία θανάτου σε όλο το δυτικό κόσμο. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου. Αποτελεί ένα οξύ, ανέλπιστο και θορυβώδες συμβάν που τρομοκρατεί τον ασθενή και το συγγενικό περιβάλλον. Δικαίως θεωρείται, τόσο από τους ιατρούς όσο και από τους ασθενείς, ως η πιο σημαντική πάθηση γενικά στο σύνολο των καρδιαγγειακών νοσημάτων και ειδικότερα της καρδιολογίας. Μπορεί να οδηγήσει άμεσα στο θάνατο ή να δημιουργήσει υπόβαθρο αυξημένης θνητότητας και νοσηρότητας στο εγγύς και στο απώτερο μέλλον με σημαντικές συνέπειες τόσο στο άμεσο οικογενειακό περιβάλλον όσο και στο κοινωνικό σύνολο ευρύτερα.

Δεδομένων των εξαιρετικά σημαντικών επιπτώσεων της πάθησης στο ασθενή και στη κοινωνία, σύσσωμη η Ιατρική κοινότητα προσπαθεί τις τελευταίες δεκαετίες να βρει καλύτερους τρόπους πρόληψης, αντιμετώπισης και θεραπείας του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η συνεχής ενημέρωση του κοινού για τους παράγοντες κινδύνου που οδηγούν στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και η επιθετική αντιμετώπιση αυτών με τα σύγχρονα φαρμακευτικά και επεμβατικά μέσα συνέβαλλαν καθοριστικά στη συνεχή μείωση των ασθενών που εκδηλώνουν οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Επίσης, η συνεχής ανάπτυξη αλγορίθμων εκτίμησης κινδύνου των ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έτσι ώστε να υποβληθούν στην κατάλληλη παρακολούθηση και θεραπεία μαζί με τη βελτίωση των παρεχόμενων υποδομών οδήγησε στη σαφή βελτίωση της έκβασης των ασθενών τόσο στην άμεση όσο και στην απώτερη μετεμφραγματική περίοδο.

Τη σημαντικότερη συμβολή στη βελτίωση της πρόιμης και της όψιμης πρόγνωσης των ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτέλεσε η ευρεία εφαρμογή των μεθόδων έγκαιρης επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, φαρμακευτικής (θρομβόλυση) και μηχανικής

(πρωτογενής αγγειοπλαστική). Παρόλη τη βελτίωση και την ολοένα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των μεθόδων επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου ένας σημαντικός αριθμός ασθενών δεν απολαμβάνει τα ευεργετικά αποτελέσματα των μεθόδων αυτών ακόμα και αν έχουν εφαρμοστεί στον ενδεδειγμένο χρόνο. Επιπλέον, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών θα υποστεί τις επιπλοκές από την εφαρμογή της επιτυχημένης επαναιμάτωσης, οι κλινικές εκδηλώσεις της οποίας είναι γνωστές ως «παράδοξο φαινόμενο επαναιμάτωσης» ή «σύνδρομο επαναιμάτωσης». Κατά το φαινόμενο αυτό ένα σημαντικό ποσοστό μυοκαρδιακής μάζας που θα μπορούσε να είχε διασωθεί με την επαναιμάτωση, ουσιαστικά νεκρώνεται εξαιτίας των συνεπειών της ίδιας της επαναιμάτωσης. Παρόλο που το όφελος της έγκαιρης επιτυχημένης επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου σαφώς υπερτερεί από τον κίνδυνο ή τις επιπτώσεις του συνδρόμου της επαναιμάτωσης είναι γνωστό ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών θα μπορούσε πιθανώς να ωφεληθεί περισσότερο αν μπορούσε να αποφευχθεί ή να περιοριστεί το σύνδρομο της επαναιμάτωσης.

Ο τρόπος αποτελεσματικής πρόληψης του συνδρόμου επαναιμάτωσης αποτέλεσε αντικείμενο μεγάλου αριθμού πειραματικών και κλινικών μελετών. Δυστυχώς, επί δεκαετίες τα ερωτήματα της αντιμετώπισης του συνδρόμου επαναιμάτωσης παραμένουν αναπάντητα. Ποικίλα φαρμακευτικά και μηχανικά μέσα έχουν εφαρμοστεί σε διάφορα κλινικά και πειραματικά μοντέλα χωρίς σημαντικά αποτελέσματα.

Μία απάντηση σε ένα από την πληθώρα των ερωτημάτων που αφορούν την πρόληψη του συνδρόμου επαναιμάτωσης προσπαθεί να δώσει και η παρούσα διατριβή. Μέσα από τους δρόμους της επιστημονικής αναζήτησης, απορίας, αμφισβήτησης και απόδειξης η παρούσα μελέτη προσπάθησε να απαντήσει ένα σημαντικό ερώτημα στην πρόληψη του συνδρόμου επαναιμάτωσης: *αν η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες να δρουν σε διαφορετικούς μηχανισμούς της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου επαναιμάτωσης, μπορεί να μετριάσει την βλάβη από επαναιμάτωση.* Η διεξαγωγή αυτής της μελέτης δεν θα είχε κανένα νόημα αν τα αποτελέσματα δεν μπορούσαν να έχουν εφαρμογή στην κλινική πράξη. Για αυτό πρωταρχικός σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η δράση των ουσιών αυτών να ελεγχθεί σε ένα πειραματικό μοντέλο που να προσομοιάζει τις πραγματικές κλινικές συνθήκες του εμφράγματος του μυοκαρδίου έτσι ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν άμεσα να ελεγχθούν σε κλινικές μελέτες.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε με σκοπό την διερεύνηση αυτού του ερωτήματος. Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής εκφράζω πρωτίστως τις ευχαριστίες μου στον Καθ. Λάμπρο Μιχάλη ο οποίος μου έκανε την τιμή να μου αναθέσει την εκπόνηση μίας ερευνητικής μελέτης η οποία αποτελούσε το απόσταγμα μακρόχρονης προσωπικής επιστημονικής

αναζήτησης. Επίσης, εκφράζω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσε. Η εκπόνηση αυτής της διατριβής αποτέλεσε όχι μόνο ένα στάδιο ενασχόλησης μου με την έρευνα, αλλά με την επίβλεψη του Καθ. Λάμπρου Μιχάλη, ένα στίβο επιστημονικής αναζήτησης, ιατρικής γνώσης και αμφισβήτησης που με οδήγησε σε ένα διαφορετικό τρόπο επιστημονικής σκέψης, εκτίμησης και θεώρησης της ιατρικής γενικά. Η συνεχής τριβή και ο μόχθος για την αναζήτηση τόσο της βασικής όσο και της ιατρικής γνώσης υπό την άμεση καθοδήγηση του Καθ. Λάμπρου Μιχάλη αποτέλεσαν για μένα την αφετηρία για την ενασχόληση μου με την Ιατρική έρευνα έχοντας ως αρχές την λογική σκέψη, την εις βάθος αναζήτηση και την αμερόληπτη εκτίμηση και ερμηνεία της γνώσης. Τα προσόντα που απέκτησα από την εκπόνηση αυτής της διατριβής αποτελούν σήμερα κύρια χαρακτηριστικά στην άσκηση των ιατρικών μου καθηκόντων ως επιστήμων και ως λειτουργός για την βελτίωση της υγείας των ασθενών. Ελπίζω τα εφόδια που απέκτησα υπό την συμβουλή και καθοδήγηση του Καθ. Λάμπρου Μιχάλη να αποτελέσουν την βάση της διεργασίας, έρευνας και απάντησης στα προσωπικά και επιστημονικά ερωτήματα του μέλλοντος.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθ. Δημήτριο Σιδερή ο οποίος μου ενέπνευσε εξ αρχής την αρετή της αμέριστης και αμερόληπτης αναζήτησης της ιατρικής γνώσης και με την καθοδήγησή του με κατεύθυνε σωστά σε όλες τις φάσεις της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Από την παρούσα θέση θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Καθ. Ιωάννη Γουδέβενο για την επιστημονική καθοδήγηση σε όλες τις φάσεις της πειραματικής μελέτης. Η ευρεία επιστημονική του γνώση και η ερευνητική του εμπειρία αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα στην επιτυχή έκβαση της διατριβής αυτής. Η δε αγάπη και η υποστήριξη του σε κάθε ερευνητική προσπάθεια αποτέλεσαν πάντα έναυσμα προσπάθειας και κίνητρο συνέχισης της ερευνητικής μου εργασίας παραμερίζοντας τις μεγάλες και εγγενείς δυσκολίες της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί χωρίς την ισότιμη συμμετοχή του συναδέλφου και φίλου Γεωργίου Χατζηαθανασίου. Η συμπάθεια μου και οι ευχαριστίες μου προς το πρόσωπό του δεν μπορούν να εκδηλωθούν μέσα από αυτές τις γραμμές. Μπορούν να εκφραστούν μόνο μέσα από τις ατελείωτες ώρες πειραματικής και ερευνητικής εργασίας που περάσαμε μαζί. Οι χαρές, οι επιτυχίες, η κούραση και οι απογοητεύσεις που συνοδεύουν κάθε αξιόλογη επίπονη προσπάθεια είναι ταυτόσημα χαραγμένες στην μνήμη και των δύο μας και αποτελούν την απόδειξη της φιλίας και της συνεργασίας μας.

Κεφαλαιώδους σημασίας στην επιτυχή έκβαση της διατριβής αυτής ήταν και η συμβολή των δύο συναδέλφων και φίλων της κ. Άννας Κότσια και του κ. Νίκου Παπαμιχαήλ. Με προσόντα την άριστη Ιατρική κατάρτιση, την δομημένη επιστημονική γνώση, την ολοκληρωμένη προσωπικότητα και την αρετή της συνεργασίας, οι εξαιρετικοί συνάδελφοι έφεραν σε απόλυτη επιτυχία την εκτέλεση αυτού του δύσκολου και πολυσύνθετου πειράματος. Άννα και Νίκο σας ευχαριστώ.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον ερευνητή Χριστόφορο Θωμά του τμήματος Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος προθυμοποιήθηκε να επεξεργαστεί και να μετρήσει μερικές εκατοντάδες δείγματα ορών για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των TBARS. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας αποδεικνύουν το υψηλό επίπεδο της δουλειάς του και της συνεργασίας του.

Καθοριστική υπήρξε και η συμμετοχή της Λεκτ. Αικατερίνης Νάκα η οποία μαζί με τον συνάδελφο κ. Μιχάλη Παπαφακλή με κατεύθυναν στη σωστή συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων. Η άριστη και ευρεία γνώση της Ιατρικής μεθοδολογίας και στατιστικής από μέρους τους, συνέλαβε σημαντικά στη σωστή στατιστική ανάλυση των δεδομένων και την επιστημονική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η καθοδήγηση και η γνώμη τους σε καίρια σημεία μεθοδολογίας και ερμηνείας των αποτελεσμάτων ήταν άκρως απαραίτητη.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την εκπληκτική συνεργασία με το τμήμα της Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα με τον Καθ. Θεόδωρο Βουγιουκλάκη και την κ. Βασιλική Μπούμπα οι οποίοι συνέβαλαν στην άρτια εκτέλεση των πειραμάτων παρέχοντας στην πειραματική ομάδα πλήρη επιστημονική και τεχνική υποστήριξη. Και οι δύο ήταν πάντα διαθέσιμοι για την επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους κ. Νίκο Καζάκο, Επικ. Καθ. Χαράλαμπο Μηλιώνη, Επικ. Καθ. Χρήστο Κατσούρα και κ.. Κων/νο Βακάλη για την αμέριστη επιστημονική βοήθεια, συμβουλή και τον ενδελεχή έλεγχο και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
Σύνδρομο επαναϊμάτωσης - Ορισμός.....	21
Βιοχημικές και ιοντικές αλλαγές που σχετίζονται με την Ισχαιμία.....	23
Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου - Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ. Μ. Ο.).....	27
<i>Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου.....</i>	<i>29</i>
<i>Μηχανισμοί πρόκλησης βλάβης των EPO.....</i>	<i>32</i>
<i>Ενδείξεις συμμετοχής των ΔΜΠ στη βλάβη επαναϊμάτωσης.....</i>	<i>33</i>
Άμεσοι και έμμεσοι μέθοδοι προσδιορισμού των ΔΜΟ.....	37
<i>Άμεση ανίχνευση.....</i>	<i>37</i>
<i>Έμμεση ανίχνευση.....</i>	<i>39</i>
Βιοδείκτες οξειδωσης λιπιδίων.....	39
<i>Ενεργά συμπλέγματα Θειοβαρβιτουρικού Οξέος (TBARS).....</i>	<i>39</i>
<i>F2 ισοπροστάνες (F2- isoprostanes).....</i>	<i>40</i>
Βιοδείκτες οξειδωσης DNA.....	41
<i>8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-Hydroxy-2'deoxyguanosine, 8-OHdG).....</i>	<i>41</i>
<i>Αυτο-αντισώματα κατά οξειδωμένου DNA (Autoantibodies to oxidized DNA).....</i>	<i>41</i>
Βιοδείκτες οξειδωσης πρωτεϊνών.....	41
<i>Πρωτεϊνικά καρβονύλια (Protein Carbonyls).....</i>	<i>41</i>
Ενδείξεις συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναϊμάτωσης	
<i>μετά θρομβόλυση ή αγγειοπλαστική.....</i>	<i>43</i>
<i>Μελέτες φαρμακευτικής επαναϊμάτωσης.....</i>	<i>43</i>
<i>Μελέτες μηχανικής επαναϊμάτωσης (Πρωτογενής αγγειοπλαστική).....</i>	<i>44</i>
Παθολογοανατομικές και κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου επαναϊμάτωσης.....	47
<i>Κυτταρικός θάνατος και μυοκαρδιακή νέκρωση.....</i>	<i>47</i>
<i>Αρρυθμίες επαναϊμάτωσης.....</i>	<i>49</i>
<i>Απόπληκτο μυοκάρδιο – “Stunning myocardium”.....</i>	<i>54</i>
<i>Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.....</i>	<i>60</i>
<i>Δυσλειτουργία των «μικρών αγγείων» - Φαινόμενο «μη-επαναρροής»</i>	
<i>(“No-reflow phenomenon”).....</i>	<i>61</i>
2. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ.....	65
Αντιοξειδωτικές ουσίες – Εκκαθαριστές ΔΜΟ.....	65
<i>Καταλάση (CAT) και Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD).....</i>	<i>66</i>
<i>Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GP).....</i>	<i>68</i>
<i>N-2-μερκαπτο-προπιονυλ-γλυκίνη (N-2-mercaptopyrionyl-glycine - MPG).....</i>	<i>69</i>

Βιταμίνη E (Vitamin E).....	69
Αναστολείς της οξειδάσης της Ξανθίνης.....	70
Αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης.....	71
Σουλφιδριλικές Θειολικές Ενώσεις.....	72
Ανταγωνιστές διαύλων Ca^{++}	74
Ασκορβικό Οξύ (Ascorbic acid - Vitamin C).....	76
Δεσφεριοξαμίνη (Desferrioxamine - DFO).....	78
Μη-αντιοξειδωτικοί παράγοντες.....	81
Αδενοσίνη και αγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης.....	81
Αναστολείς του συμπληρώματος.....	81
Αναστολείς των διαύλων Na^+/H^+ (Na^+/H^+ Exchangers –NHE – inhibitors).....	82
Αντι-αποπτωτικοί παράγοντες.....	85
3. ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	87
Πολυπλοκότητα του συνδρόμου της επαναιμάτωσης.....	87
Χρόνος χορήγησης.....	88
Πειραματικό μοντέλο.....	89
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	93
Επιλογή κατάλληλου πειραματόζωου.....	97

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	101
Προετοιμασία – εγκλεισμός πειραματόζωων.....	102
Πρωτόκολλο αναισθησίας.....	102
Επεμβατική προετοιμασία του πειραματόζωου.....	103
Πρωτόκολλο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών	103
Καταγραφή των αρρυθμιών επαναιμάτωσης και της LVEDP – εκτίμηση της συστολικής λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας και της στεφανιαίας ροής μετά την επαναιμάτωση	108
Υπολογισμός της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο και της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου.....	109
Μέτρηση οξειδωτικού φορτίου.....	111
Στατιστική ανάλυση.....	114
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	115
Γενικά.....	115
Συνολική παρουσίαση των αποτελεσμάτων και στατιστική σύγκριση.....	167
Λόγος μυοκαρδιακής εμφραγματικής (νεκρωτικής - I) περιοχής του μυοκαρδίου σε σχέση με την περιοχή σε κίνδυνο (R) - (I/R ratio).....	167
Αρρυθμίες.....	171
Εκτίμηση της συστολικής λειτουργίας της Αριστεράς κοιλίας.....	172
Στεφανιαία ροή μετά την επαναιμάτωση.....	178

Οξειδωτικό stress.....	178
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	183
Ασκορβικό οξύ.....	184
Δεσφερριοξαμίνη.....	186
N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC).....	188
Συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών.....	189
Τρόπος και χρόνος χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών.....	191
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	195
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	197
SUMMARY.....	201
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	203

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Σύνδρομο επαναιμάτωσης – Ορισμός.

Η ισχαιμία αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές καταστάσεις που πρέπει να αντιμετωπίσει ο κλινικός Ιατρός στην καθημερινή ιατρική πράξη, όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η περιφερική αγγειακή εμβολή, οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις και η μεταμόσχευση οργάνων.

Εξελίξεις στην σύγχρονη Ιατρική επιτρέπουν την έγκαιρη αποκατάσταση της αιματικής ροής σε όλα τα παραπάνω φαινόμενα, είτε με φαρμακευτικά μέσα είτε με επεμβατικές ή χειρουργικές μεθόδους, με πρωταρχικό στόχο την πρόληψη ή τον περιορισμό της ιστικής νέκρωσης, της πάσχουσας περιοχής.

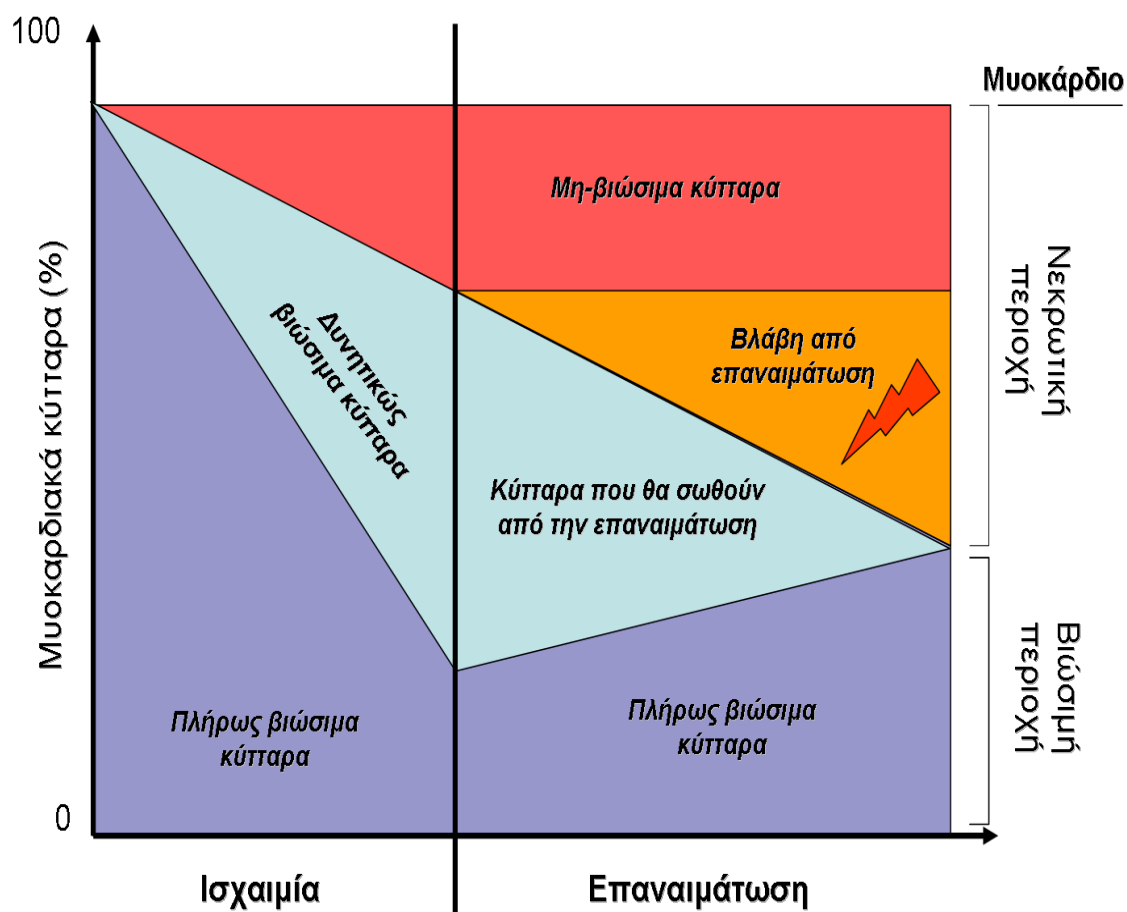
Στην Καρδιολογία, στην θεραπεία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, έχει αποδειχθεί ότι η διάνοιξη του πάσχοντος στεφανιαίου αγγείου αποτελεί τον κύριο τρόπο περιορισμού της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής, εάν αυτή επιτευχθεί νωρίς μετά την έναρξη της ισχαιμίας¹⁻⁴. Η έκταση της νέκρωσης, σε ένα οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, είναι ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης όχι μόνο της θνησιμότητας αλλά και της συνολικής λειτουργικότητας του μυοκαρδίου, καθώς και της πιθανότητας εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας⁵⁻⁷. Παρόλα αυτά, η αποκατάσταση της αιματικής ροής και η επαναχορήγηση οξυγόνου στην ισχαιμούσα περιοχή, που μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους (π.χ. θρομβόλυση, αγγειοπλαστική του πάσχοντος στεφανιαίου αγγείου, αορτοστεφανιαία παράκαμψη ή λύση σπασμού στεφανιαίου αγγείου με την χορήγηση κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής), μπορεί να προκαλέσει

η ίδια ιστική βλάβη, γνωστή ως 'Βλάβη επαναιμάτωσης' ή 'Σύνδρομο επαναιμάτωσης'^{8,9}.

Ως σύνδρομο επαναιμάτωσης ορίζεται το σύνολο των βιοχημικών, ηλεκτροφυσιολογικών και κλινικών φαινομένων που οφείλονται στην επαναιμάτωση μίας ισχαιμούσας περιοχής, οι οποίες δεν προκλήθηκαν κατά την προηγούμενη ισχαιμική περίοδο και μπορούν να μεταβληθούν-ελαττωθούν με παρεμβάσεις μόνο κατά την φάση επαναιμάτωσης¹⁰. Δηλαδή, η ίδια η επανοξυγόνωση της εμφραγματικής περιοχής μπορεί να προκαλέσει βλάβες, τέτοιες που θα μετριάσουν το αναμενόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Στην κλινική πράξη το σύνδρομο επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου απαρτίζονται :

1. Οι Αρρυθμίες επαναιμάτωσης (*reperfusion arrhythmias*)
2. Η Αγγειακή και μικροαγγειακή βλάβη (*vascular reperfusion injury*)
3. Η επιταχυνόμενη νέκρωση μυοκαρδιακών κυττάρων (*lethal reperfusion injury*),
4. Η "αποπληξία" του μυοκαρδίου ("*stunned*" *myocardium*)¹⁰⁻¹².

Κατά την περίοδο ισχαιμίας πολλά από τα κύτταρα της πάσχουσας περιοχής του μυοκαρδίου, λόγω της ανοξίας, θα υποστούν βιοχημικές και παθολογικές αλλαγές, αλλά θα παραμείνουν για κάποιο χρονικό διάστημα "δυσνητικώς βιώσιμα". Άλλα θα υποστούν μη-αναστρέψιμες βλάβες και τελικά θα νεκρωθούν. Η επαναιμάτωση αποτελεί τον μοναδικό τρόπο διάσωσης των "δυσνητικώς βιώσιμων" κυττάρων. Ο περιορισμός της μυοκαρδιακής βλάβης κατά την επαναιμάτωση δεν επιτυγχάνεται, καθώς κάποια από τα δυσνητικώς βιώσιμα κύτταρα αυτά θα καταστραφούν κατά την επανοξυγόνωση της ισχαιμούσας περιοχής. Ο περιορισμός αυτής της βλάβης επαναιμάτωσης, αποτελεί απαραίτητη παράμετρο διάσωσης όσο το δυνατόν περισσότερου μυοκαρδιακού ιστού, και προϋποθέτει την τροποποίηση των συνθηκών και διαδικασιών της φάσης επαναιμάτωσης σε επιθυμητό βαθμό ^{13,14}.



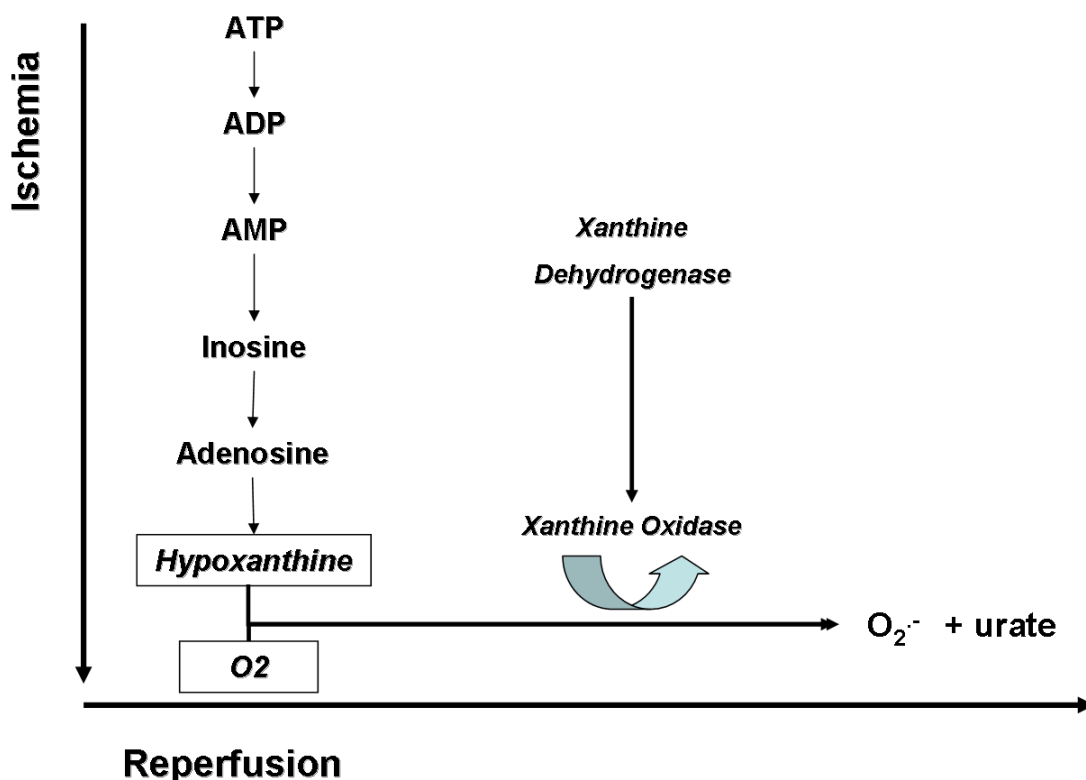
Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας νέκρωσης κυττάρων κατά την φάση της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Ένα μέρος των κυττάρων που είναι δυνητικά βιώσιμα τελικά θα νεκρωθούν εξαιτίας του φαινομένου της επαναιμάτωσης (“βλάβη από επαναιμάτωση”).

Βιοχημικές και ιοντικές αλλαγές που σχετίζονται με την ισχαιμία.

Η στεφανιαία νόσος μπορεί να οδηγήσει σε ισχαιμία, λόγω της σοβαρής και παρατεινόμενης ελάττωσης παροχής αίματος στο μυοκάρδιο. Η ελάττωση της αιμάτωσης έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττωθεί η ικανότητα του κυττάρου προς οξειδωτική φωσφορλίωση και αδυναμία επανασύνθεσης Τριφωσφορικής Αδενοσίνης (ATP) και φωσφοκρεατίνης (ενώσεις υψηλής ενέργειας που είναι απαραίτητες για της μυοκαρδιακή συστολή). Τελικά, οι πρόδρομες χημικές ενώσεις πουρινών, απαραίτητες για την σύνθεση του ATP, οξειδώνονται σε ξανθίνη και υποξανθίνη, που αποτελούν το υπόστρωμα του ένζυμου αφυδρογονάσης / οξειδάσης της ξανθίνης¹⁵. Ταυτόχρονα, κατά την ισχαιμία, η μετατροπή του ενζύμου αφυδρογονάση της ξανθίνης στην οξειδωμένη της μορφή και η διάσπαση των νουκλεοτιδίων των πουρινών δημιουργούν

ένα ιδανικό περιβάλλον για την παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.) (Σχ. 2). Στη μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης (τύπος D) σε οξειδάση της ξανθίνης (τύπος O) συμβάλει και η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα που με την συμμετοχή της καλμοδουλίνης ενεργοποιεί μια πρωτεάση, την καλπαΐνη, η οποία είναι υπεύθυνη για αυτή την μετατροπή¹³.

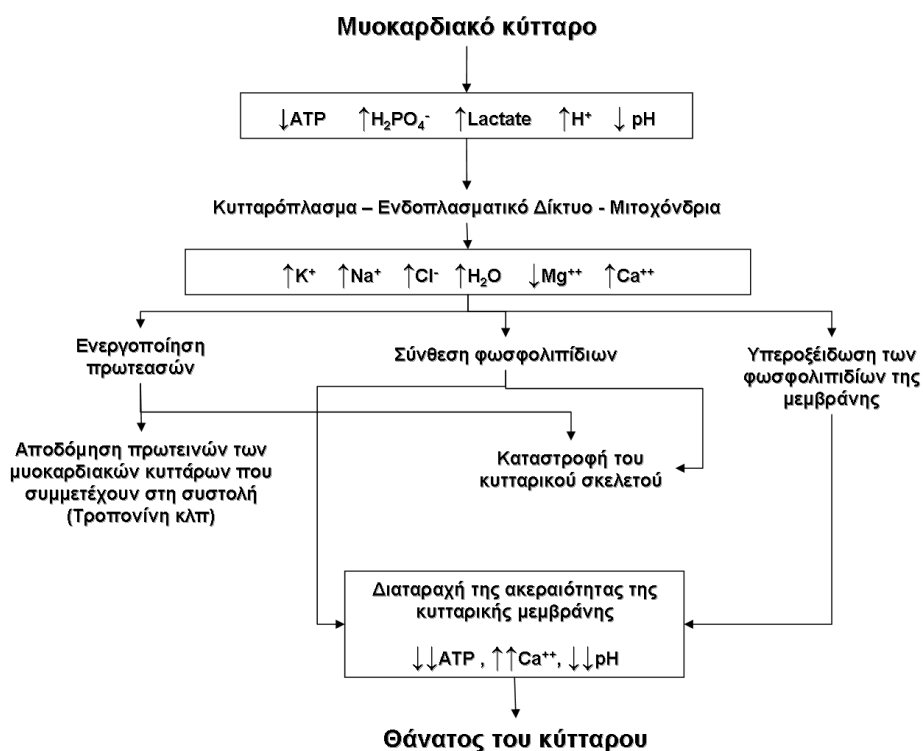
Η κυτταρική ισχαιμία οδηγεί επίσης στην ελάττωση των επιπέδων γλουταθειόνης (Glutathione - GSH) στο μυοκαρδιακό κύτταρο.¹⁶ Η GSH παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των κυτταρικών λιπιδίων και πρωτεϊνών σε λειτουργική κατάσταση, προστατεύοντας τις δομικές αυτές ενώσεις από οξείδωση σε καταστάσεις οξειδωτικού stress^{16, 17}.



Σχήμα 2. Κατά την φάση της ισχαιμίας οι πουρίνες υψηλής ενέργειας οξειδώνονται σε υποξανθίνη. Ταυτόχρονα η δεϋδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνεται σε οξειδάση της ξανθίνης. Κατά την επαναχορήγηση του O_2 η οξειδωμένη μορφή της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση παραγωγής ουρίας και υπεροξειδίου του O_2 ($O_2^{\cdot-}$), με καταστρεπτικές για τους ιστούς συνέπειες.

Όταν το οξυγόνο ελαττώνεται, προκαλείται συσσώρευση ιόντων H^+ εντός του κυττάρου (προκαλώντας πτώση του pH), που οδηγεί σε γαλακτική οξέωση. Η οξέωση αυτή, ελαττώνει την ευαισθησία των μυοκαρδιακών κυττάρων στο Ca^{++} και κατά

συνέπεια την ικανότητα συστολής τους, παρόλο που τα επίπεδα Ca^{++} στην αρχή διατηρούνται φυσιολογικά ή και αυξάνονται¹⁸⁻²¹. Προκαλεί, επίσης, αυξημένη ανταλλαγή ιόντων Na^+/H^+ που οδηγεί στην αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάρου Na^+ . Έτσι λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του Na^+ στο εσωτερικό της μεμβράνης, αυξάνεται η ανταλλαγή ιόντων $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, με συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ενδοκυττάρου Ca^{++} . Ένας άλλος μηχανισμός που συμμετέχει στην αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} κατά την φάση της ισχαιμίας, είναι η αρνητική επίδραση της προοδευτικής συγκέντρωσης των αποθεμάτων του ATP στην αντλία ιόντων Ca^{++} η οποία μεταφέρει Ca^{++} από το κυτταρόπλασμα προς τον εξωκυττάριο χώρο αλλά και από το κυτταρόπλασμα προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο²¹. Επιπλέον, τα ελαττωμένα επίπεδα ATP προκαλούν την διάνοιξη των ATP – ευαίσθητων διαύλων ιόντων K^+ στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση εξωκυττάρου K^+ . Οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των βασικών αυτών ιόντων (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) προκαλούν διαταραχές στην εκπόλωση, αγωγιμότητα, και συσταλτικότητα του μυοκαρδιακού κυττάρου που αποτελούν τα βασικά χαρακτηριστικά της ισχαιμίας²². (Πίνακας 1, Σχ. 3)



Σχήμα 3. Ιοντικές μεταβολές κατά τη φάση της μυοκαρδιακής ισχαιμίας και η επίδραση τους στις ενδοκυττάρειες μεταβολικές διεργασίες.

Πίνακας 1. Τα τρία στάδια της βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης και επακόλουθων κυτταρικών μεταβολών κατά την φάση της ισχαιμίας

1. Αλλαγές στην λειτουργία των αντλιών ανταλλαγής ιόντων

- ✓ εκροή K^+
- ✓ αύξηση των επιπέδων Mg^{++}
- ✓ αύξηση των επιπέδων Ca^{++}
- ✓ αύξηση των επιπέδων Na^+ , Cl^- και H_2O που συνοδεύεται από επιπλέον ελάττωση των επιπέδων K^+

2. Αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης

- ✓ Αυξημένη διαπερατότητα στο Ca^{++} με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια υπερφόρτωση σε Ca^{++}
- ✓ Απώλεια ενδοκυττάρων μακρο-μοριακών ενώσεων που οδηγεί σε αλλαγή της ενδοκυττάριας ωσμωτικότητας

3. Καταστροφή της δομής της μεμβράνης

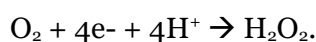
- ✓ Απώλεια της συνέχειας της μεμβράνης («τρύπες»)
 - ✓ Απώλεια μεγαλύτερων μακρο-μοριακών ενώσεων που οδηγεί σε καταστροφή των ενδοκυττάρων οργανιδίων και δομών
 - ✓ Τελικά επέρχεται εξισορρόπηση των συστατικών του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου που οδηγεί σε καταστροφή του κυττάρου.
-
-

Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου - Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ. Μ. Ο.)
Oxygen Free Radicals (O.F.R.) – Reactive Oxygen Species (R. O. S.)

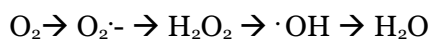
Η ισχαιμία του μυοκαρδίου προκαλεί στα κύτταρα μεταβολικές και βιοχημικές διεργασίες που κατά την επαναιμάτωση και την επαναχορήγηση οξυγόνου, αποτελούν τη βάση για την εκρηκτική παραγωγή Ελεύθερων Ριζών O_2 (E. P. O.).

Στη Χημεία ως *Ελεύθερη Ρίζα (Free Radical)* ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στοιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin), ή με πλήρη απουσία ηλεκτρονίων. Με μία τελεία επάνω αριστερά ή δεξιά συμβολίζεται το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας π.χ. ελεύθερη ρίζα της ένωσης A συμβολίζεται: $A\cdot$. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας, λόγω της τάσης του προς σύζευξη, αυξάνει κατά πολύ την χημική συγγένεια της ένωσης αυτής, κάνοντας την να “επιτίθεται” κατά οποιουδήποτε βιολογικού μορίου. Η ανεξέλεγκτη δημιουργία ελευθέρων ριζών έχει καταστρεπτικές συνέπειες για το κύτταρο, λόγω της μεγάλης δραστηριότητας των ενώσεων αυτών αλλά και λόγω της ικανότητας τους να αντιδρούν με όλα τα βασικά συστατικά του κυττάρου.

Το 97% του O_2 που φθάνει στα κύτταρα υφίσταται ελεγχόμενη τετρασθενή αναγωγή προς H_2O με την πρόσληψη τεσσάρων (4) ηλεκτρονίων που παράγονται στον κύκλο του Krebs και μεταφέρονται σε αυτό μέσω των μιτοχονδριακών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας.



Αντίθετα, το 3% του O_2 που φθάνει στα κύτταρα υφίσταται σταδιακή μονοσθενή αναγωγή με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου κάθε φορά:



Οι ενδιάμεσες ενώσεις, που παράγονται κατά την αναγωγή του O_2 όπως η ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$), το H_2O_2 και το ανιόν του σουπεροξειδίου, όταν αυξηθούν, συμμετέχουν σε τοξικές για τα κύτταρα αντιδράσεις. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται *Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.)* και σύμφωνα με τον ορισμό ορισμένες μόνο από αυτές αποτελούν Ελεύθερες Ρίζες O_2 (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Δραστικές μορφές οξυγόνου (Δ.Μ.Ο)

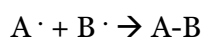
$O_2\cdot$	Ανιόν σουπεροξειδίου
$HO_2\cdot$	Ρίζα υδροξυϋπεροξειδίου
H_2O_2	Υπεροξείδιο του Υδρογόνου
$OH\cdot$	Υδροξυλική ρίζα
$RO\cdot$	Ρίζα αλκοξειδίου
$ROO\cdot$	Ρίζα υπεροξειδίου
$ROOH\cdot$	Οργανικό υπεροξείδιο
O_3	Όζον
$HOCL$	Υποχλωριώδες οξύ
NO_2	Διοξείδιο του αζώτου
$NO\cdot$	Μονοξείδιο του αζώτου

Σημειώνεται ότι λανθασμένα, αρκετές φορές ο όρος «Ελεύθερες Ρίζες O_2 » χρησιμοποιείται για να περιγράψει τέτοιους οξειδωτικούς μεταβολίτες στους οποίους όμως συμπεριλαμβάνονται και χημικές ενώσεις οι οποίες δεν αποτελούν ελεύθερες ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Για αυτό το λόγο ο όρος Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.) θεωρείται σήμερα πιο κατάλληλος για να περιγράψει τους ενεργούς μεταβολίτες του O_2 ικανούς να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη ²³.

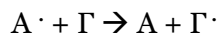
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονισθεί ότι μετά την αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα μόριο μη-ελεύθερη ρίζα, τουλάχιστον ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης θα είναι μία νέα ελεύθερη ρίζα, η οποία με τη σειρά της αντιδρά με άλλα μόρια ή ενώσεις σχηματίζοντας εκ νέου άλλες ελεύθερες ρίζες. Η σειρά των αλυσιδωτών αντιδράσεων έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη καταστροφή του βιολογικού υλικού.

Αντιδράσεις τέτοιου τύπου μπορούν να σταματήσουν με δύο τρόπους:

α) να αντιδράσουν δύο μόρια ελευθέρων ριζών μεταξύ τους συνεισφέροντας από ένα ηλεκτρόνιο σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό



β) ή να αντιδράσει η ελεύθερη ρίζα με μία άλλη ένωση (μη-ελεύθερη ρίζα) και να σχηματιστεί μία νέα ελεύθερη ρίζα, η οποία δεν είναι τόσο δραστική και έτσι διακόπτεται η αλυσίδα των καταστρεπτικών αντιδράσεων.



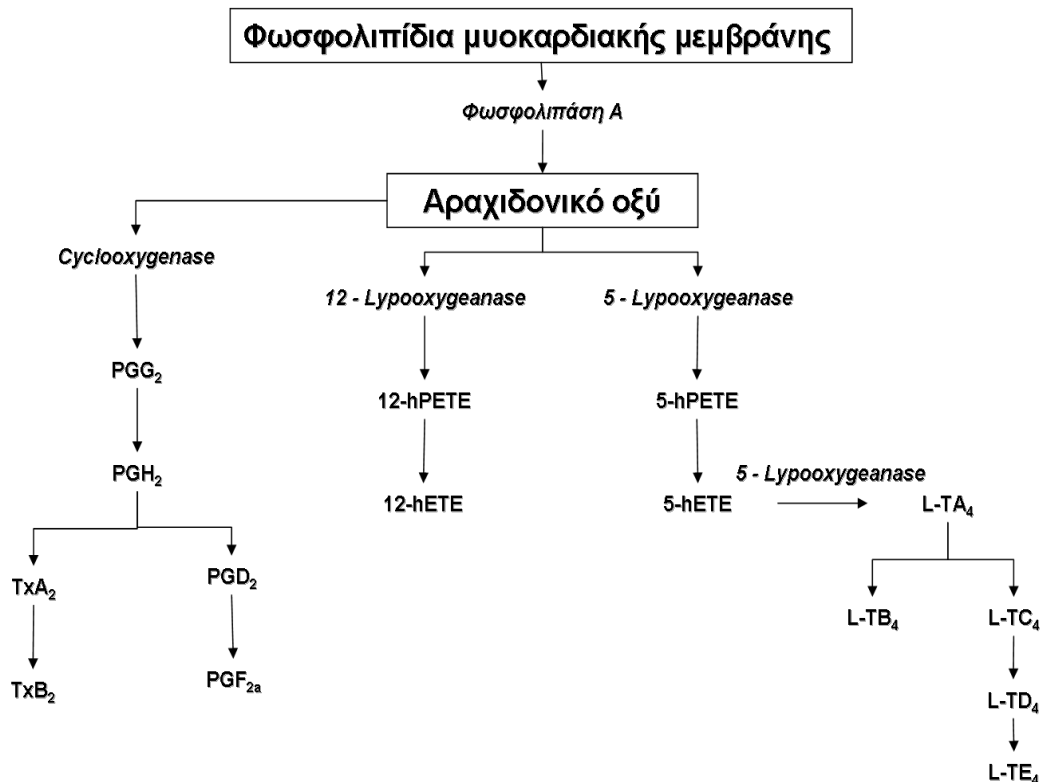
Η δεύτερη περίπτωση αποτελεί το κύριο μηχανισμό άμυνας του κυττάρου στην ενδογενή, μικρή σε ποσότητα όμως, παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2 .

Πηγές παραγωγής Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου.

Οι Ε.Ρ.Ο. μπορούν να προέρχονται από εξωγενείς ή από ενδογενείς πηγές παραγωγής. Στις εξωγενείς περιλαμβάνονται οι ιονίζουσες ακτινοβολίες, η ηλιακή φωτεινή ακτινοβολία, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι, τα αέρια καύσης οργανικής ύλης, ο καπνός του τσιγάρου, καθώς και ορισμένα φάρμακα όπως η Μπλεομυκίνη, η Στρεπτομυκίνη, η Ανδριαμυκίνη και η παρακεταμόλη.

Στις ενδογενείς πηγές, στις οποίες ο οργανισμός παράγει Δ.Μ.Ο. υπό φυσιολογικές συνθήκες, περιλαμβάνονται πληθώρα κυττάρων, οργανιδίων και ενζύμων, σημαντικότερες από τις οποίες αποτελούν: το κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπεροξυσωμάτια, ο πυρήνας, η κυτταρική μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια και τα λευκοκύτταρα. Ανάλογα με το βαθμό και τη διάρκεια της ισχαιμίας, στους μηχανισμούς παραγωγής Δ.Μ.Ο. κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου συμμετέχουν και άλλα κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικρών αγγείων, τα αιμοπετάλια και τα κύτταρα του διάμεσου ιστού²⁴.

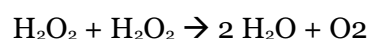
Πολλά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που είναι διαλυτά στο *κυτταρόπλασμα* μπορούν να υποστούν αυτοοξειδωση και να παράγουν Δ.Μ.Ο. όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου, όπως οι κατεχολαμίνες, το γαλακτικό οξύ, η οξυαιμοσφαιρίνη ή οι φλαβίνες. Επίσης ένζυμα όπως η δεϋδρογονάση της ξανθίνης (η οποία όπως προαναφέρθηκε κατά την ισχαιμία μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης), είναι σε θέση να παράγουν Δ.Μ.Ο. ως παραπροϊόντα της δράσης τους. Στην *κυτταροπλασματική μεμβράνη* η παραγωγή Δ.Μ.Ο. είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού του αραχιδονικού Οξέος διαμέσου της βιοσύνθεσης των εικοσανοειδών. Το αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από τα λιπίδια της μεμβράνης, κυρίως λόγω της δράσης της φωσφολιπάσης A_2 , μεταβολίζεται προς προσταγλαδίνες ή λευκοτριένια (Σχ.4).



Σχήμα 4. Μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης και του αραχιδονικού οξέος προς προσταγλαδίνες (PG) και λευκοτριένια (L-TA)

Όπως φαίνεται στο Σχ. 4, κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος μέσω του δρόμου της κυκλοοξυγενάσης (COX1/COX2) παράγεται ανιόν του σουπεροξειδίου κατά την μετατροπή της προσταγλαδίνης G₂ (PGG₂) σε προσταγλαδίνη H₂ (PGH₂). Το αραχιδονικό οξύ μέσω του δρόμου της λιποξυγενάσης καταλήγει στο σχηματισμό λευκοτριενών. Τα λευκοτριένια (LT) αποτελούν ισχυρούς χημειοτακτικούς παράγοντες για τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κύτταρα ενώ ταυτόχρονα προκαλούν την ενεργοποίηση τους προς παραγωγή Δ.Μ.Ο. και πρωτεολυτικών ενζύμων²⁵.

Στα *υπεροξεισώματα* παράγονται μεγάλες ποσότητες Δ.Μ.Ο. λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους σε ειδικές οξειδάσες. Τα υπεροξυσώματα περιέχουν και μεγάλες ποσότητες καταλάσης, ένζυμο το οποίο καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O σύμφωνα με την αντίδραση:

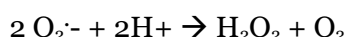


Στα *μιτοχόνδρια*, κατά την διάρκεια της ισχαιμίας παράγονται Δ.Μ.Ο., κυρίως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), που προέρχονται από την ανάγωση των

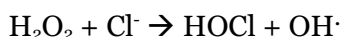
οστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας. Στα πρώτα στάδια της ισχαιμίας οι Δ.Μ.Ο. εξουδετερώνονται από την δράση της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (Superoxide Dismutase - SOD). Όσο διαρκεί η ισχαιμία τα επίπεδα της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου ελαττώνονται με αποτέλεσμα να εκπίπτει η ενδογενής άμυνα του κυττάρου και έτσι να αυξάνεται η καταστροφική δράση των Δ.Μ.Ο. στα μιτοχόνδρια.

Η πυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο, περιέχουν ενώσεις όπως το κυτόχρωμα P450 που καταλύουν την οξειδωση ενός μεγάλου αριθμού ενδογενών και εξωγενών ουσιών, παράγοντας κυρίως ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και H_2O_2 .

Τα πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα, υπό κανονικές συνθήκες βρίσκονται στον μυελό των οστών και μόνο το 5% αυτών κυκλοφορεί στο αίμα. Όταν προσελκυστούν από διάφορους χημειοτακτικούς παράγοντες στο τόπο της βλάβης (π.χ. στην εμφραγματική περιοχή του μυοκαρδίου), ενεργοποιούνται από τους μεσολαβητές της φλεγμονής (π.χ. τα Λευκοτριένια όπως προαναφέρθηκε) με αποτέλεσμα να αυξάνεται κατά πολύ η κατανάλωση O_2 . Αυτή η εκρηκτική αύξηση της αναπνευστικής λειτουργίας είναι γνωστή με τον όρο “αναπνευστική έκρηξη”^{26,27}. Κατά την διαδικασία της “αναπνευστικής έκρηξης” ενεργοποιείται το ένζυμο νικοτιναμινο-αδένινο-δινουκλεοτιδιο φωσφορικό υδρογόνο (NADPH) Οξειδάση που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του λευκοκυττάρου. Το ένζυμο αυτό είναι κυρίως υπεύθυνο για την παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που αποτελούν, όπως φαίνεται στον πίνακα 3, Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.)²⁸. Η παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 μέσω της NADPH-οξειδάσης φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 δεν αποτελούν καταστρεπτικές ρίζες. Μπορούν να μετατραπούν σε πολύ ισχυρές ρίζες με την βοήθεια του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση (MPO), το οποίο εκκρίνεται από τα κυτταροπλασματικά κυστίδια και οξειδώνει τα ιόντα Cl^- σε υποχλωριώδες οξύ κατά την αντίδραση:



Το HOCl και η OH^{\cdot} αποτελούν ισχυρές καταστρεπτικές ρίζες.

Μηχανισμοί πρόκλησης βλάβης των ΕΡΟ.

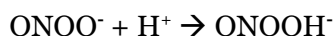
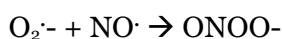
Όταν μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μία μη-ελεύθερη ρίζα, ξεκινά μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό και άλλων “δευτερογενών” ελευθέρων ριζών. Η αντίδραση δύο δευτερογενών ελευθέρων ριζών μεταξύ τους καταλήγει σε αρκετές περιπτώσεις σε σχηματισμό σταθερών μορίων. Ο τύπος αυτός των αντιδράσεων αποτελεί συνήθη τρόπο τερματισμού των αλυσιδωτών αντιδράσεων Δ.Μ.Ο.

Αντίδραση των Δ.Μ.Ο. με τις λιποπρωτεΐνες των μεμβρανών οδηγεί στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Πρόκειται για σειρά αλυσιδωτών αυτοκαταλυόμενων αντιδράσεων που οδηγούν στην διάσπαση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και δημιουργία διαφόρων προϊόντων (κυρίως αλδεϋδών) αλλά και δημιουργία νέων ελευθέρων ριζών. Εκτεταμένη λιπιδιακή υπεροξειδωση στις βιολογικές μεμβράνες, προκαλεί διαταραχές στην ρευστότητα τους, μείωση του δυναμικού τους, αύξηση της διαπερατότητας τους, και πιθανώς λύση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών. Τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπαρών οξέων είναι διάφορες κυτταροτοξικές ουσίες όπως αλδεϋδες (μαλονδιαλδεϋδη, 4-υδροξύ-2,3-trans-νονενάλη) και αέριοι υδρογονάνθρακες (αιθάνιο, πεντάνιο). Τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης επηρεάζουν σημαντικά διάφορες κυτταρικές λειτουργίες πριν από το φαινόμενο καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών, όπως αναστολή ενζύμων (κυτόχρωμα P-450, αδενυλική κυκλάση κ.λπ.), συμμετέχουν σε αντιδράσεις σουλφιδριλικών ομάδων (-SH) ενώ μεσολαβούν και σε διασυνδέσεις με πρωτεΐνες που έχουν θειολικές ομάδες²⁹.

Στην περίπτωση που Δ.Μ.Ο. σχηματισθούν κοντά στον πυρήνα του κυττάρου αυτό έχει σαν συνέπεια την οξειδωτική μετατροπή των βάσεων του DNA. Ο τόπος σχηματισμού των Ε.Ρ.Ο στο κύτταρο έχει σημασία γιατί ο χρόνος ημιζωής τους, είναι πολύ μικρός (λίγα μικροδευτερόλεπτα) με αποτέλεσμα να μην προλαβαίνουν να διαχυθούν και να φθάσουν στο DNA όταν ο τόπος παραγωγής τους είναι μακριά, φαινόμενο το οποίο συμβαίνει κυρίως στις ισχυρές Δ.Μ.Ο. όπως είναι η ρίζα OH·. Λιγότερο ισχυρές ρίζες οξυγόνου διαχέονται πιο εύκολα. Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να προκαλέσει σχάση των αλυσίδων του DNA, ανταλλαγή χρωμοσωμικού υλικού και τροποποίηση των βάσεων του DNA. Πιο ευαίσθητες στην οξειδωτική τροποποίηση είναι οι βάσεις Κυτοσίνη και Θυμίνη. Συνολικά οι βλάβες του DNA από τις Δ.Μ.Ο. έχουν σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής και του διπλασιασμού του DNA, καθώς και μεταλλάξεις που μπορούν να οδηγήσουν στον θάνατο του κυττάρου³⁰.

Οι πρωτεΐνες του κυττάρου αποτελούν επίσης, στόχο δράσης των Δ.Μ.Ο. τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια. Κύριο σημείο δράσης των Δ.Μ.Ο. αποτελούν τα αμινοξέα των πολυπεπτιδίων αλυσίδων που τροποποιούνται από την οξειδωτική δράση επηρεάζοντας την δομή και κατά συνέπεια την λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στην δράση και άλλων ενδιάμεσων παραπροϊόντων της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Τα αποτελέσματα αυτών των επιδράσεων μπορεί να είναι, είτε συσσωμάτωση των πρωτεϊνών λόγω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ τους, είτε διάσπαση και κατακερματισμός των πρωτεϊνών, καταστάσεις που εξαρτώνται από την δομή της κάθε πρωτεΐνης αλλά και από την φύση και δράση της ελεύθερης ρίζας οξυγόνου.

Σε άλλη περίπτωση μία ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με μία άλλη ελεύθερη ρίζα, συνεισφέροντας τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τους για να σχηματίσουν έναν ομοιοπολικό δεσμό. Παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης αποτελεί η αντίδραση του $O_2\cdot^-$ με το $NO\cdot$ προς υπεροξυνιτρικό ($ONOOH^-$), σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Σε φυσιολογικό pH το $ONOOH^-$ προκαλεί άμεση βλάβη στις πρωτεΐνες ενώ ταυτόχρονα αποτελεί προϊόν παραγωγής ισχυρών Δ.Μ.Ο., όπως η $OH\cdot$, χωρίς να απαιτείται η ταυτόχρονη παρουσία ιόντων μετάλλου ³¹.

Ενδείξεις συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στη βλάβη επαναιμάτωσης

Ήδη από το 1975, σε πειράματα που έγιναν σε απομονωμένες καρδίες ποντικών από τους Humphey S και Hearse D.J. , είχε παρατηρηθεί το φαινόμενο του “παράδοξου του οξυγόνου” υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή των Δ.Μ.Ο.³². Η χημική δομή των Δ.Μ.Ο. όμως, κάνει τις ενώσεις αυτές πολύ δραστικές και εξαιρετικά βραχείες σε χρόνο ημιζωής, κάνοντας έτσι την ανίχνευσή τους πολύ δύσκολη. Η απόδειξη της συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στη παθοφυσιολογία του φαινομένου της επαναιμάτωσης αποτέλεσε επί μακρόν αντικείμενο πληθώρας πειραματικών *in vivo* και *ex vivo* μελετών.

Τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή νέων μεθόδων μελέτης της βλάβης επαναιμάτωσης στον μυοκαρδιακό ιστό, όπως ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (Electron Paramagnetic Resonance – E.P.R.) και την χρήση ενώσεων –

παγιδευτών ηλεκτρονίων (όπως της N-τετρα-βουτυλ-αλφα-φενυλνιτρόνη, PBN), έγινε εφικτή η άμεση εντόπιση παράγωγής Δ.Μ.Ο. στο μυοκάρδιο και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

Πιο συγκεκριμένα οι Bolli και συν. και οι Garlick & συν. απέδειξαν άμεσα τον σχηματισμό Δ.Μ.Ο. κατά την επαναιμάτωση, τόσο σε πειράματα σε σκύλους ή σε κουνέλια όσο και σε απομονωμένες καρδιές ποντικών, αντίστοιχα. Και οι δύο ερευνητές έδειξαν ότι κατά την επαναιμάτωση ισχαιμούντος μυοκαρδιακού ιστού παρατηρείται “έκρηξη” παραγωγής Δ.Μ.Ο., η μέγιστη απελευθέρωση των οποίων γίνεται στα 4 min της επαναιμάτωσης, περίπου^{33,34}. Χαρακτηριστικό είναι ότι κατά την επαναιμάτωση απομονωμένων καρδιών με ανοξικό διάλυμα, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη αύξηση στην παραγωγή Δ.Μ.Ο.³⁵. Η παραγωγή των Δ.Μ.Ο. συνεχίζεται και μετά την επαναιμάτωση και παραμένει αυξημένη για τουλάχιστον 3 ώρες και σταδιακά εμφανίζει προοδευτική ελάττωση³⁵. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και άλλοι ερευνητές χρησιμοποιώντας άλλους παγιδευτές ηλεκτρονίων όπως την 5', 5- διμέθυλο-πυρολίν- N- οξειδίο (DMPO)^{36,37}.

Χρησιμοποιώντας σαν πειραματικό μοντέλο μεμονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα οι Quaipe R. & συν. έδειξαν ότι μετά την επανοξυγόνωση παρατηρείται σημαντική αύξηση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη μυοκαρδιακής βλάβης³⁸. Επίσης, κατά την επαναιμάτωση ισχαιμικών μυοκαρδιακών κυττάρων τα οποία εκτέθηκαν στην δράση καταλάσης και δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD) - δύο σημαντικών αντιοξειδωτικών παραγόντων - κατά την διάρκεια της ισχαιμίας, παρατηρήθηκε ελάττωση της απελευθέρωσης της LDH, συμπεραίνοντας ότι η γένεση Δ.Μ.Ο. συμβάλλει στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου επαναιμάτωσης.

Άλλοι ερευνητές απέδειξαν την συμμετοχή των Δ.Μ.Ο. μελετώντας την βλάβη που αυτές προκαλούν κατά την χορήγησή τους σε απομονωμένες καρδιές ποντικών³⁹. Στις βασικές δομικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα μυοκαρδιακά κύτταρα περιλαμβάνονται: διάσπαση των μυϊκών ινιδίων, οίδημα της περιοχής στην οποία χορηγήθηκαν Δ.Μ.Ο., δημιουργία ενδοκυττάριου οιδήματος, ενώ υπάρχουν ενδείξεις και ενδοθηλιακού οιδήματος. Κατά την χορήγηση δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (Superoxide Dismutase – SOD) και καταλάσης μαζί με τις Δ.Μ.Ο. παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των παραπάνω δομικών μεταβολών ισχυροποιώντας την υπόθεση συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης.

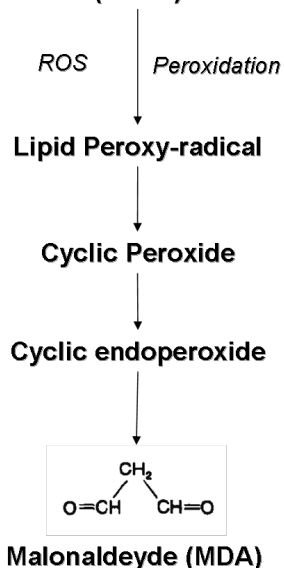
Σε άλλες περιπτώσεις, ως δείκτης συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης αποτέλεσε η παρουσία προϊόντων που παράγονται από την δράση των Δ.Μ.Ο. σε κυτταρικά συστατικά. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά προϊόντα αντίδρασης

των Δ.Μ.Ο. με κυτταρικές δομές είναι η μαλονδουαλδεΐδη (MDA) η οποία αποτελεί προϊόν υπεροξειδωσής των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης μετά την έκθεση τους στις Δ.Μ.Ο..⁴⁰ (Σχ. 5)

Τέλος, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα συμφωνά με τα οποία, η χορήγηση ουσιών που δρουν σαν εκκαθαριστές Δ.Μ.Ο. πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης περιορίζουν σε άλλοτε άλλο βαθμό την εκρηκτική παραγωγή των Δ.Μ.Ο. και τις κυτταρικές βλάβες που αυτές προκαλούν. Ταυτόχρονα περιορίζεται η συχνότητα και η βαρύτητα των καρδιακών αρρυθμιών καθώς και των άλλων κλινικών εκδηλώσεων του συνδρόμου επαναιμάτωσης («αποπληξία», νέκρωση και αγγειακή βλάβη του μυοκαρδίου).

Όπως προκύπτει από το σύνολο των πειραματικών δεδομένων, οι Δ.Μ.Ο. αποτελούν πολύ σημαντικούς μεσολαβητές στην μυοκαρδιακή βλάβη κατά το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Η αποκάλυψη και η διερεύνηση των μηχανισμών παραγωγής και της τοξικής δράσης των Δ.Μ.Ο. στην επανοξυγόνωση του μυοκαρδίου, ανοίγει σημαντικές προοπτικές κατανόησης των παθοφυσιολογικών και κλινικών μεταβολών του μυοκαρδιακού κυττάρου κατά την ισχαιμία / επαναιμάτωση καθώς και εφαρμογή νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων στα ισχαιμικά σύνδρομα.

Membrane Poly-Unsaturated Fatty Acids (PUFA)



Σχήμα 5. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής MDA. Τα πολύακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταρικής μεμβράνης (polyunsaturated fatty acids - PUFA) μετατρέπονται σε MDA και άλλα προϊόντα με την επίδραση Δ.Μ.Ο. (ROS)

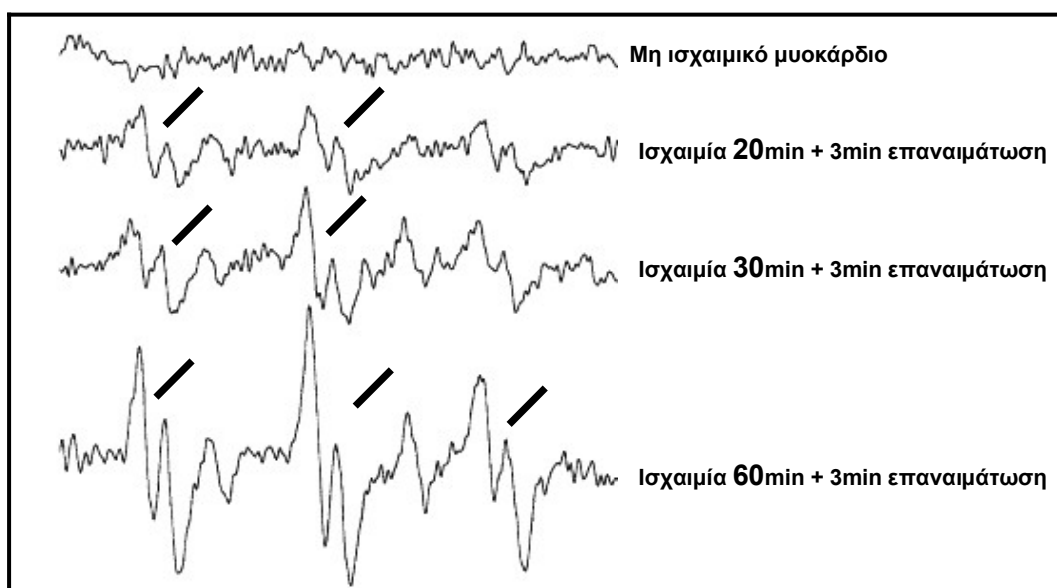
Άμεσες και έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού των Δ.Μ.Ο

Ο ακριβής προσδιορισμός των Δ.Μ.Ο. σε βιολογικά υλικά (αίμα ή μυοκαρδιακός ιστός) μετά από την επαναιμάτωση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αιτιολογική συσχέτιση του συνδρόμου επαναιμάτωσης με το οξειδωτικό stress. Η μέτρηση των Δ.Μ.Ο. μπορεί να γίνει με μεθόδους άμεσης αλλά και έμμεσης ανίχνευσης τους στα υπό εξέταση υλικά.

Άμεση ανίχνευση

Ο πιο αξιόπιστος τρόπος είναι η **άμεση** ανίχνευση των Δ.Μ.Ο. με την χρήση της μεθόδου της Φασματοσκοπίας Συντονισμού Στροφορμής Ηλεκτρονίου [Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy]. Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας ESR βασίζεται στην ικανότητα των ασύζευκτων ηλεκτρονίων να απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν βρίσκονται εντός καθορισμένου μαγνητικού πεδίου. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, εξαιτίας της ικανότητας τους να περιστρέφονται με μία συγκεκριμένη ταχύτητα ιδιοπεριστροφής (spin), είναι μαγνητισμένα. Κατά την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος υπό καθορισμένο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, προκαλείται η διέγερση των ηλεκτρονίων τα οποία μεταβαίνουν από χαμηλότερη σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση λόγω της αλληλοεπίδρασης μεταξύ του μαγνητικού στοιχείου της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και του μαγνητικού στοιχείου του ίδιου του ηλεκτρονίου. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται μαγνητικός συντονισμός (Magnetic Resonance). Κατά την φάση του μαγνητικού συντονισμού, ένα ποσό ενέργειας από την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εφαρμόζεται απορροφάται προκειμένου να επιτευχθεί η μετάβαση των ηλεκτρονίων σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Η ESR φασματομετρία γίνεται με την εφαρμογή σταθερής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο υπό εξέταση δείγμα (π.χ. αίμα) και ταυτόχρονη μεταβολή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου έτσι ώστε να επιτευχθεί μαγνητικός συντονισμός. Το ποσό της απορροφούμενης ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας κατά την φάση του μαγνητικού συντονισμού που μετριέται με την ESR φασματομετρία αντιστοιχεί στην ποσότητα των μορίων με ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα. Καθώς οι Δ.Μ.Ο. είναι μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα, η μέθοδος της ESR φασματομετρίας είναι ικανή, να ανιχνεύσει άμεσα το πόσο των Δ.Μ.Ο. σε ένα ιστικό δείγμα^{41,42}. Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η αδυναμία ανίχνευσης των Δ.Μ.Ο. όταν η συγκέντρωσή τους είναι πολύ μικρή – ιδιαίτερα όταν ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι πολύ μικρός – και η αδυναμία ανίχνευσής τους στο σώμα ζώντων οργανισμών (in vivo).

Το πρώτο μειονέκτημα υπερκεράστηκε σημαντικά με την χρήση των «παγίδων ιδιοπεριστροφής» (spin traps). Τα spin traps αποτελούν ουσίες οι οποίες αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και σχηματίζουν σταθερά συμπλέγματα (spin adducts) με σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής ώστε να μπορούν να ανιχνευτούν με την ESR φασματομετρία. Ανάλογα με την υπό εξέταση ελεύθερη ρίζα οξυγόνου, χρησιμοποιούνται διαφορετικά spin traps. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες spin trap ουσίες είναι το N-tert-butyl-alpha-phenyl Nitron (PBN) και το 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)⁴³. Όλες οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως spin traps, έχουν την ικανότητα να αντιδρούν εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και να δημιουργούν σταθερά συμπλέγματα αναστέλλοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των Δ.Μ.Ο. και διευκολύνοντας την ανίχνευσή τους σε βιολογικά υλικά. Πρόσφατα, η ιδιότητα αυτή των spin traps, οδήγησε τους ερευνητές να δοκιμάσουν τα spin traps όχι μόνο ως βοηθητικά μέσα διάγνωσης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου αλλά και ως πιθανά προστατευτικά μέσα σε καταστάσεις οξειδωτικού stress με ικανοποιητικά έως τώρα αποτελέσματα κυρίως σε πειραματικά μοντέλα⁴⁴⁻⁴⁷ (Σχ. 6)



Σχήμα 6. ESR φασματογραφία για την ανίχνευση Δ.Μ.Ο. και την χρήση spin-traps (PBN). Τα βέλη υποδεικνύουν την απόκλιση του σήματος στη φασματογραφία που αντιστοιχεί στην παρουσία Δ.Μ.Ο.. Η ένταση και ο τύπος του λαμβανόμενου σήματος αντιστοιχεί στην συγκέντρωση και τον τύπο των Δ.Μ.Ο. που ανιχνεύθηκαν. Παρατηρείστε ότι όσο μεγαλύτερη η διάρκεια της ισχαιμίας τόσο πιο έντονο το λαμβανόμενο σήμα που αντιστοιχεί σε παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης Δ.Μ.Ο.

Η αδυναμία της ανίχνευσης των Δ.Μ.Ο. στο σώμα ζωντανών οργανισμών αποτελεί το δεύτερο σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη του νερού που υπάρχει στους ιστούς των ζωντανών οργανισμών το οποίο προκαλεί σημαντική διηλεκτρική απώλεια ενέργειας στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που χρησιμοποιείται στην ESR φασματοσκοπία με αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνική υποδομή των συσκευών που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση ESR φασματοσκοπίας επιτρέπουν σήμερα την εφαρμογή της και σε ζωντανούς οργανισμούς (in vivo)^{48, 49}. Η εφαρμογή της in vivo ESR φασματοσκοπίας είναι όμως εξαιρετικά περιορισμένη και εκτελείται σε 10 περίπου εργαστήρια παγκοσμίως⁴⁹.

Έμμεση ανίχνευση

Παρόλο που η χρήση της ESR φασματοσκοπίας θεωρείται η πιο ακριβής και πιο αξιόπιστη για την ανίχνευση των Δ.Μ.Ο η χρήση της περιορίζεται σημαντικά λόγω της πολυπλοκότητας της μεθόδου και του τεχνικού εξοπλισμού που απαιτείται. Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική έρευνα οδήγησε στην ανακάλυψη ειδικών μορίων ή χημικών ενώσεων που αντιδρούν εύκολα είτε με τις Δ.Μ.Ο. είτε με παραπροϊόντα δράσης αυτών, σχηματίζοντας συμπλέγματα – βιοδείκτες εύκολα ανιχνεύσιμα με συνήθεις χημικές μεθόδους⁵⁰. Η ύπαρξη τέτοιων βιοδεικτών αποτελεί **έμμεση** απόδειξη της παρουσίας Δ.Μ.Ο στο υπό εξέταση βιολογικό δείγμα.

Πολλοί τέτοιοι βιοδείκτες έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα και περιλαμβάνουν συμπλέγματα προϊόντων οξειδωσης κυρίως λιπιδίων, DNA και πρωτεϊνών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τέτοιοι βιοδείκτες είναι οι ενεργές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS) και οι F2-ισοπροστάνες.

Βιοδείκτες οξειδωσης λιπιδίων

Ενεργά συμπλέγματα Θειοβαρβιτουρικού Οξέος - Thiobarbituric Acid Reactive Substances - TBARS).

Αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες για την ανίχνευση Δ.Μ.Ο⁵⁰. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλεί την παραγωγή μαλονδυαλδεΐδης (MDA) η οποία αντιδρά με το Θειοβαρβιτουρικό Οξύ (Thiobarbituric Acid - TBA) σχηματίζοντας σταθερά συμπλέγματα (TBARS)^{51, 52}. Η ποσοτική ανίχνευση των TBARS γίνεται με την χρήση φασματομετρικής μεθόδου η οποία εύκολη και διαδεδομένη

μέθοδος⁵³. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χαμηλή ειδικότητα της. Επιπλέον άλλες, πλην της MDA, αλδεϋδες μπορούν να αντιδράσουν με το TBA αυξάνοντας την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων της μεθόδου^{54,55}. Προκειμένου να υπερκεραστεί το συγκεκριμένο μειονέκτημα χρησιμοποιείται σήμερα η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) με την οποία επιτυγχάνεται η διαχωρισμός των συμπλέγματος TBA – MDA από τα υπόλοιπα TBA συμπλέγματα που πιθανώς υπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα βελτιώνοντας σημαντικά την ειδικότητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η ποσοτική ανίχνευση των TBARS μπορεί να γίνει τόσο σε δείγματα βιολογικού ιστού όσο και σε πλάσμα αίματος⁵⁶⁻⁵⁸.

F2 ισοπροστάνες (F2- isoprostanes).

Οι F2-ισοπροστάνες παράγονται κατά την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος από τις Δ.Μ.Ο. ⁵⁹. Οι ουσίες αυτές παράγονται στην αρχή σαν φωσφολιπίδια και μετά απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και αποβάλλονται με τα ούρα σαν ελεύθερες ισοπροστάνες (free - isoprostanes)⁶⁰. Από τις ισοπραστάνες, ο πιο αξιόπιστος και πιο διαδεδομένος δείκτης οξειδωτικού stress είναι η 8-isoprostagladin – F_{2a} (*8-epi-PGF_{2a}*)⁶¹⁻⁶³. Η μέτρηση των ισοπροστανών μπορεί να γίνει σε δείγματα ορού αίματος και ούρων με μεθόδους χρωματογραφίας αερίου/φασματομετρία μάζας με εξαιρετική ειδικότητα και ευαισθησία⁶⁴⁻⁶⁶. Σήμερα, εφαρμόζονται και ανοσολογικές μέθοδοι ποιοτικής και ποσοτικής ανίχνευσης των ισοπροστανών, κατά τις οποίες ειδικά αντισώματα σχηματίζουν ανιχνεύσιμα ανοσοσυμπλέγματα με τις ισοπροστάνες και ειδικότερα με την 8-isoprostagladin – F_{2a}. Θεωρούνται όμως χαμηλότερης ειδικότητας λόγω πιθανής διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλα προοστανοειδή^{62,67}.

Οι ανωτέρω μέθοδοι αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ακριβή ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό των E.P.O σε καταστάσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Σήμερα, εφαρμόζονται και άλλες μέθοδοι που επίσης βασίζονται στην ανίχνευση προϊόντων της υπεροξειδωσης των λιπαρών οξέων και επιτρέπουν την μέτρηση της συνολικής ικανότητας του αίματος να «εκκαθαρίζει» ή να «συλλαμβάνει» Δ.Μ.Ο. (*Oxygen Radical Absorbance Capacity- ORAC και Total peroxy Radical – trapping Antioxidant Potential - TRAP*)^{68, 69}. Οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν στους ερευνητές να αξιολογήσουν το συνολικό οξειδωτικό φορτίο του αίματος πειραματόζων ή και ανθρώπων σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, αλλά η πολυπλοκότητα τους περιορίζει σημαντικά την ευρύτερη χρήση τους.

Βιοδείκτες οξειδωσης DNA

8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG).

Η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη αποτελεί τον πιο διαδεδομένο δείκτη οξειδωτικής βλάβης του DNA⁷⁰⁻⁷². Η οξείδωση του DNA μπορεί να προκαλέσει πολλά οξειδωτικά προϊόντα, εκ των οποίων η οξείδωση της C-8 γουανοσίνης είναι το πιο συχνό. Η 8-OHdG προσδιορίζεται σε δείγματα DNA (DNA λεμφοκυττάρων ή μυοκαρδιακών κυττάρων) με την χρήση χρωματογραφίας αερίου / μάζας, HPLC χρωματογραφία με ηλεκτροχημικό εντοπισμό (*electrochemical detection - ECD*) και ανοσοενζυμικές μεθόδους απορρόφησης (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*)^{73, 74}.

Αυτο-αντισώματα κατά οξειδωμένου DNA (Autoantibodies to oxidized DNA).

Ένας άλλος πιθανός βιοδείκτης ανίχνευσης E.P.O. είναι η μέτρηση στον όρο του αίματος αυτοαντισωμάτων κατά της 5-υδροξυμεθυλ-2'-δεοξυουριδίνη (*5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, HMdU*), που αποτελεί προϊόν της οξείδωσης της θυμίνης. Οι Frenkel και συν. ανακάλυψαν ότι στον άνθρωπο τέτοια αυτοαντισώματα παράγονται και στον άνθρωπο και η μέτρησή τους μπορεί να γίνει σχετικά εύκολα με την χρήση μεθόδου ELISA⁷⁵.

Βιοδείκτες οξειδωσης πρωτεϊνών

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (Protein Carbonyls).

Ο βιοδείκτης που συνήθως χρησιμοποιείται για την εκτιμηθεί η οξείδωση των πρωτεϊνών είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Η συνήθης μέθοδος εκτίμησης είναι η χρωματογραφία δινιτρο-φαινυλ-υδραλαζίνης αλλά σήμερα χρησιμοποιείται η πιο εύκολη ELISA μέθοδος με αξιοπιστία και ευαισθησία παραπλήσια αυτής της χρωματογραφίας⁷⁶.

Οι ανωτέρω βιοδείκτες, εκτός από τα TBARS και τις F2-ισοπροστάνες, δεν έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί και η εμπειρία σχετικά με την χρήση τους σε οξέα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας και επαναιμάτωσης θεωρείται περιορισμένη. Αντίθετα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η παραγωγή ανιχνεύσιμων προϊόντων αυτής, όπως τα TBARS και οι F2-ισοπροστάνες, έχει αποδειχθεί σε πλήθος πειραματικών και κλινικών

μελετών. Για αυτό το λόγο θεωρούνται οι πιο κατάλληλοι βιοδείκτες για την έμμεση εκτίμηση του οξειδωτικού stress σε πειράματα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.

Ενδείξεις συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης μετά θρομβόλυση ή αγγειοπλαστική.

Η συμμετοχή των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης τους δεν αποτελεί ένα φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί μόνο σε πειραματικές μελέτες αλλά έχει αποδειχθεί με πλήθος κλινικών μελετών. Στις μελέτες που θα αναφερθούν, η παρουσία των Δ.Μ.Ο. μετά από επαναιμάτωση και η συσχέτισή τους με τα κλινικά φαινόμενα που απαρτίζουν το σύνδρομο επαναιμάτωσης έχει αποδειχθεί τόσο μετά από φαρμακευτική (θρομβόλυση) όσο και μετά από μηχανική (αγγειοπλαστική) επαναιμάτωση.

Μελέτες φαρμακευτικής επαναιμάτωσης

Η συμμετοχή Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης στον άνθρωπο θεωρήθηκε πιθανή για πρώτη φορά, στη μελέτη των Kodama et al στην οποία προσδιορίστηκε η ενεργότητα της SOD στο πλάσμα 25 ασθενών που έλαβαν θρομβόλυση μετά από οξύ πρόσθιο-διαφραγματικό έμφραγμα του μυοκαρδίου⁷⁷. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση των επίπεδων της SOD με το κλάσμα εξώθησης των ασθενών στους οποίους είχε επιτευχθεί επιτυχής επαναιμάτωση ($r = -0.58$, $p < 0.05$). Αντίθετα, τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στους ασθενείς που δεν είχαν επιτυχή επαναιμάτωση. Καθώς η SOD αποτελεί ισχυρό ενδογενές αντιοξειδωτικό παράγοντα θεωρήθηκε ότι η παρουσία της διαφυλάσσει την μυοκαρδιακή λειτουργία και το κλάσμα εξώθησης μετά από επιτυχή επαναιμάτωση προστατεύοντας το μυοκάρδιο από την δράση των Δ.Μ.Ο. εμπλέκοντας τις τελευταίες έμμεσα ως μεσολαβητές στο σύνδρομο επαναιμάτωσης. Αργότερα, οι Davies SW et al απόδειξαν την παρουσία Δ.Μ.Ο σε κλινική μελέτη επαναιμάτωσης με τον προσδιορισμό TBARS σε ορό περιφερικού φλεβικού αίματος, σε 50 ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που έλαβαν θρομβόλυση⁷⁸. Η επιτυχία της θρομβόλυσης επιβεβαιώθηκε με αγγειογραφική εξέταση των στεφανιαίων αγγείων σε όλους τους ασθενείς. Οι ασθενείς στους οποίους η ένοχη για το έμφραγμα στεφανιαία αρτηρία ήταν ανοιχτή – επιτυχής θρομβόλυση – είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές TBARS σε σχέση με αυτούς στους οποίους η ένοχη αρτηρία ήταν αποφραγμένη – μη επιτυχής επαναιμάτωση. Η παραγωγή Δ.Μ.Ο μετά από επαναιμάτωση επιβεβαιώθηκε και με άλλες κλινικές μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση των Δ.Μ.Ο. μόνο στους ασθενείς στους οποίους είχε αποδεδειγμένα επιτευχθεί επιτυχής επαναιμάτωση⁷⁹⁻⁸⁷. Στις μελέτες αυτές η μέτρηση των Δ.Μ.Ο έγινε έμμεσα, κυρίως με τον προσδιορισμό TBARS στο περιφερικό αίμα των ασθενών ή ισοπροστανών στα ούρα⁶¹. Η παραγωγή Δ.Μ.Ο. παρατηρήθηκε να αυξάνει από τα 90 min μετά την επαναιμάτωση⁸² και να διατηρείται μέχρι και 7 ημέρες μετά⁸¹.

Η χρονική διαφορά στην μέγιστη συγκέντρωση των Δ.Μ.Ο. μεταξύ των κλινικών μελετών φαρμακευτικής επαναιμάτωσης (περίπου τα 90 min) και των πειραματικών μελετών που αναφέρθηκαν προηγουμένως (περίπου τα 4 min) αποδίδεται στην καθυστερημένη διάνοιξη του αγγείου με τη χρήση της θρομβόλυσης. Στην πρώτη περίπτωση με τη χρήση θρομβόλυσης, ο ακριβής χρόνος διάνοιξης του αγγείου – όταν αυτός επιτευχθεί - δεν είναι γνωστός και κυμαίνεται μεταξύ 30 – 90 min μετά τη χορήγηση θρομβόλυσης. Ο χρόνος έκλυσης των Δ.Μ.Ο. που παράγονται κατά την επαναιμάτωση κυμαίνεται αναλόγως. Στη δεύτερη περίπτωση, στις πειραματικές μελέτες όπου χρησιμοποιούνται μοντέλα μηχανικής ισχαιμίας / επαναιμάτωσης (απόφραξη του στεφανιαίου αγγείου με μπαλόνι ή απολίνωση του με ράμμα), η άρση της ισχαιμίας είναι άμεση (ξεφούσκωμα του μπαλονιού ή λύση της απολίνωσης) και ως εκ τούτου ο ακριβής χρόνος επαναιμάτωσης είναι γνωστός. Η μέγιστη παραγωγή Δ.Μ.Ο. γίνεται ταχύτατα αμέσως μετά την άρση της ισχαιμίας.

Μελέτες μηχανικής επαναιμάτωσης (Πρωτογενής αγγειοπλαστική)

Με την εφαρμογή της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής (*Primary PCI*) ως μέθοδος επαναιμάτωσης σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αμέσως υπήρξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη και ανίχνευση Δ.Μ.Ο. μετά από επιτυχή επαναιμάτωση. Η πρωτογενής αγγειοπλαστική προσφέρει άμεση, ταχεία και αποδεδειγμένη επαναιμάτωση από την θρομβόλυση και για αυτό το λόγο αποτέλεσε ελκυστικό μοντέλο για την μελέτη και την συμμετοχή των Δ.Μ.Ο. στο σύνδρομο επαναιμάτωσης. Επιπρόσθετα, πολλές από τις επιπλοκές που εμφανίζονται μετά από πρωτογενή αγγειοπλαστική, όπως το μυοκαρδιακό stunning ή το φαινόμενο «αργής ροής» (no-reflow phenomenon) θα μπορούσαν να αποτελούν αποτέλεσμα του συνδρόμου επαναιμάτωσης.

Πρώτοι οι Grech ED et al προσδιόρισαν άμεσα, με την μέθοδο ESR, την παρουσία Δ.Μ.Ο. σε ασθενή που υποβλήθηκε σε πρωτογενή αγγειοπλαστική μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου⁸⁸. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, μετά την πρώτη διάνοιξη του αγγείου παρατηρήθηκε αύξηση των κυκλοφορούντων Δ.Μ.Ο. η οποία όμως ελαττώθηκε μετά την εκ νέου απόφραξη του αγγείου εξαιτίας οξείας θρόμβωσης. Μετά την επαναδιάνοιξη του αγγείου παρατηρήθηκε εκ νέου αύξηση των κυκλοφορούντων Δ.Μ.Ο. Η περίπτωση αυτή αποτελεί την πρώτη απόδειξη παραγωγής Δ.Μ.Ο. μετά επιτυχή επαναιμάτωση με αγγειοπλαστική στον άνθρωπο. Η οξειδωτική έκρηξη που παρατηρήθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση επιβεβαιώθηκε αργότερα, από τους ίδιους συγγραφείς, και στις περιπτώσεις άλλων 9 ασθενών⁸⁹. Σε όλους τους ασθενείς η ενεργότητα των οξειδωτικών ριζών προσδιορίστηκε πριν και μετά την επιτυχή διάνοιξη

του αγγείου, σε δείγματα φλεβικού αίματος προερχόμενα από το στεφανιαίο κόλλο των ασθενών. Στη μελέτη αυτή, η παρουσία των οξειδωτικών ριζών αποδείχθηκε έμμεσα μετρώντας προϊόντα υπεροξειδωσίας των λιπιδίων όπως το 9,11-λινολεϊκό οξύ και η συγκέντρωση μαλονδυαλδεΐδης στο φλεβικό αίμα.

Στις μελέτες που αναφέρθηκαν οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν έμμεσους τρόπους για την απόδειξη της αύξησης των Δ.Μ.Ο. μετά από πρωτογενή αγγειοπλαστική. Άμεση επιβεβαίωση και μέτρηση των οξειδωτικών ριζών μετά από πρωτογενή αγγειοπλαστική σε ασθενείς μετά από επιτυχή επαναιμάτωση έγινε από τους ίδιους συγγραφείς με την μέθοδο ESR φασματομετρίας και ταυτόχρονη χρήση του PBN ως spin trap. Οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα από τον στεφανιαίο κόλλο σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική και συγκρίθηκαν με ταυτόσημα δείγματα αίματος που λήφθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε απλό διαγνωστικό καθετηριασμό εξαιτίας βαλβιδικής νόσου. Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε απότομη αύξηση των Δ.Μ.Ο. 15 min μετά την διάνοιξη της αποφραγμένης αρτηρίας. Μέγιστες τιμές οξειδωτικών ριζών παρατηρήθηκαν στη 1 1/2 και 3 1/2 ώρες μετά την επαναιμάτωση οι οποίες σταδιακά ελαττώθηκαν μέχρι να εξαφανιστούν 5 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκ νέου αύξηση των τιμών Δ.Μ.Ο. που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, 18 έως 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση χωρίς ωστόσο να υπάρξει αγγειογραφική ένδειξη επαναπόφραξης και επαναδιάνοιξης της ένοχης για το έμφραγμα αρτηρίας. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε καθετηριασμό ρουτίνας.

Η μεταβολή των οξειδωτικών ριζών στο χρόνο, επιβεβαιώθηκε και από τους Guan W et al μετά από τακτικές μετρήσεις (ανά 30 min) της ισοπροστάνης 8-epi-PGF2a στα ούρα 21 ασθενών που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική⁹⁰. Μέγιστες τιμές 8-epi-PGF2a παρατηρήθηκαν στη 1 και 1 1/2 ώρα μετά την διάνοιξη του αγγείου. Σε αντίθεση με την μελέτη των Grech ED et al όπου αυξημένες τιμές οξειδωτικών ριζών παρατηρήθηκαν μέχρι και 5 ώρες μετά την διάνοιξη του αγγείου, εδώ η συγκέντρωση της 8-epi-PGF2a επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα μόλις 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Παρομοίως, οι Berg K et al απέδειξαν την απότομη αύξηση της 8-epi-PGF2a αμέσως μετά επιτυχή επαναιμάτωση στο περιφερικό αίμα ασθενών που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου⁹¹. Οι τιμές επανήλθαν στα προ της επέμβασης επίπεδα μετά 3 ώρες.

Γενικά, παρόλο που πρόσφατα οι Olsson και & συν. αμφισβήτησαν την παραγωγή οξειδωτικών ριζών μετά από πρωτογενή αγγειοπλαστική⁹², η παρουσία Δ.Μ.Ο. μετά πρωτογενή αγγειοπλαστική και η συμμετοχή τους στη παθοφυσιολογία

του συνδρόμου επαναιμάτωσης θεωρείται αποδεδειγμένη. Σημαντικός αριθμός κλινικών μελετών όχι μόνο απέδειξαν (άμεσα ή έμμεσα) την παρουσία οξειδωτικών ριζών μετά την επαναιμάτωση αλλά ταυτόχρονα μελέτησαν και την πιθανή αναστολή τους (επιτυχώς ή ανεπιτυχώς) με τη χρήση γνωστών αντιοξειδωτικών ουσιών^{90, 93-98}.

Παθολογοανατομικές και κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου επαναιμάτωσης

Το 1977 οι Bulkley BH και Hutchins GM παρατήρησαν μυοκαρδιακή νέκρωση μετά από επιτυχή χειρουργική επαναιμάτωση ισχαιμούσας μυοκαρδιακής περιοχής παρουσία πλήρως βατών μοσχευμάτων⁹⁹. Στη μελέτη αυτή, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά νέκρωση τμημάτων του μυοκαρδίου που επαναιματώθηκε επιτυχώς παρόλο που η αιματική παροχή μέσω των μοσχευμάτων ήταν φυσιολογική. Η δημοσίευση του παράδοξου αυτού φαινομένου αποτελεί την πρώτη αναφορά σε μία από τις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις του φαινομένου της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

Στην κλινική πράξη, η μυοκαρδιακή βλάβη που προκαλείται μετά την επιτυχή επαναιμάτωση μετά τη διάνοιξη μιας αποφραγμένης στεφανιαίας αρτηρίας εκδηλώνεται με μυοκαρδιακή νέκρωση, αρρυθμίες επαναιμάτωσης, «αποπληξία του μυοκαρδίου», δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και δυσλειτουργία των «μικρών αγγείων» (κυρίως των αρτηριολίων) συμπεριλαμβανομένου και του φαινομένου «αργής ροής» μετά επαναιμάτωση.

Κυτταρικός θάνατος και μυοκαρδιακή νέκρωση

Αποτελεί την πιο σημαντική εκδήλωση του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Ο θάνατος του μυοκαρδιακού κυττάρου ξεκινά από την πολύ πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης και επέρχεται μέσω δύο μηχανισμών: την κυτταρική «όγκωση» (oncosis) ή την κυτταρική «απόπτωση» (apoptosis). Εν συντομία, η «όγκωση» χαρακτηρίζεται είτε από κατάτμηση του κυτταροπλάσματος και των κυτταρικών οργανιδίων είτε από κυτταρικό οίδημα συνεπεία σημαντικής φλεγμονώδους αντίδρασης. Η «απόπτωση» χαρακτηρίζεται από κυτταρική συρρίκνωση, εξίδρωση και συμπύκνωση της χρωματίνης και κατάτμηση του DNA εντός του κυτταρικού πυρήνα απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης. Γενικότερα, η «όγκωση» αποτελεί μία ταχεία και αιφνίδια μορφή κυτταρικού θανάτου, σε αντίθεση με την «απόπτωση» η οποία αποτελεί μια βραδεία, προοδευτική και γενετικώς καθοριζόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου^{100, 101}. Η απόπτωση αποτελεί την επικρατούσα μορφή κυτταρικού θανάτου κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης (πρώτα λεπτά έως και 4 ώρες μετά την επαναιμάτωση) ενώ ο θάνατος μέσω του μηχανισμού της όγκωσης συναντάται κυρίως μετά τις πρώτες 4 ώρες έως και 2 μέρες μετά την επαναιμάτωση¹⁰²⁻¹⁰⁴. Και οι δύο μηχανισμοί οδηγούν τελικά το μυοκαρδιακό κύτταρο στο θάνατο μέσα σε λίγες ώρες ή μέρες^{105, 106}.

Ο θάνατος μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης μετά ισχαιμία-επαναιμάτωση έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. Σημαντικός αριθμός πειραματικών δεδομένων τόσο *ex vivo* όσο και *in vivo* έχουν αποδείξει την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων σε ισχαιμικό μυοκαρδιακό ιστό που υπέστη επιτυχή επαναιμάτωση¹⁰⁷⁻¹¹¹.

Αντίθετα με την πειραματική επιβεβαίωση του μηχανισμού της απόπτωσης ως αίτιο κυτταρικού θανάτου μετά την επαναιμάτωση, οι αποδείξεις για την συμβολή της απόπτωσης στο σύνδρομο επαναιμάτωσης στην κλινική πράξη είναι λίγες. Οι Saraste A et al, μελέτησαν δείγματα ιστών από νεκροτομικά παρασκευάσματα 14 ασθενών οι οποίοι έπασχαν από Ο.Ε.Μ. και υποβλήθηκαν σε επιτυχή επαναιμάτωση με θρομβόλυση¹¹². Τόσο το έμφραγμα όσο και η επιτυχία της επαναιμάτωσης επιβεβαιώθηκαν κλινικά (ύφεση του θωρακικού άλγους, πτώση >50% των ανασπάσεων του ST τμήματος στο ΗΚΓ μετά θρομβόλυση, σημαντική διαφυγή μυοκαρδιακών ενζύμων νέκρωσης μετά θρομβόλυση) αλλά και παθολογοανατομικά. Δείγματα ελήφθησαν από την εμφραγματική περιοχή, την μη-εμφραγματική περιοχή αλλά και την περιοχή ορίου μεταξύ εμφραγματικής και μη-εμφραγματικής περιοχής. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία νεκρωμένων και αποπτωτικών μυοκαρδιακών κυττάρων και συγκρίθηκαν με παρόμοια δείγματα προερχόμενα από 6 ασθενείς που πέθαναν από μη-καρδιακά αίτια. Στη μελέτη αυτή, εντοπίστηκε ένας σημαντικός αριθμός αποπτωτικών μυοκαρδιακών κυττάρων κυρίως στα όρια μεταξύ της εμφραγματικής και μη-εμφραγματικής περιοχής. Αποπτωτικά κύτταρα εντοπίστηκαν τόσο στη πρόωμη όσο και στη όψιμη φάση μετά επαναιμάτωση.

Οι Hofstra L et al μελέτησαν την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων σε ασθενείς με Ο.Ε.Μ. με μη επεμβατικές μεθόδους¹¹³. Οι ίδιοι συγγραφείς, αλλά και άλλοι, έχουν αποδείξει ότι είναι δυνατός ο εντοπισμός αποπτωτικών κυττάρων στην εμφραγματική περιοχή μετά από επαναιμάτωση με τη χρήση ραδιο-σησημασμένης (με ⁹⁹Tc) ανθρώπινης ανασυνδυασμένης annexin - V^{114, 115}. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι η ουσία annexin - V έχει ισχυρή χημική συγγένεια με την phosphatidylserine, μία ενδοκυττάρια ουσία η οποία εξωκυτταρώνεται όταν ένα κύτταρο εισέλθει στην διαδικασία προγραμματισμένου θανάτου (απόπτωση)¹¹⁶. Ο προσδιορισμός του συμπλέγματος annexin- V και phosphatidylserine γίνεται με την χρήση συσκευής SPECT (Single Photon Emission Computer Tomography)¹¹⁷. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για να προσδιορίσουν την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων σε 7 ασθενείς με Ο.Ε.Μ. που υποβλήθηκαν σε επιτυχή επαναιμάτωση μετά από αγγειοπλαστική του αποφραγμένου αγγείου ακολουθούμενου από φυσιολογική στεφανιαία ροή [στεφανιαία ροή βαθμού 3 κατά Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI 3) κατηγοριοποίηση]. Τα

αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα ευρήματα ενός ασθενή χωρίς Ο.Ε.Μ. . Στη μελέτη αυτή, σε 6 από τους 7 ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσληψη ραδιο-σεσημασμένης με ^{99}Tc annexin – V στην περιοχή που μόλις είχε επαναιματωθεί υποδηλώνοντας την παρουσία αποπτωτικών κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε πρόσληψη ραδιο-σεσημασμένης με ^{99}Tc annexin – V στον υγιή ασθενή που χρησιμοποιήθηκε προς σύγκριση. Σε ένα ασθενή δεν ήταν δυνατή η εντόπιση ραδιο-σεσημασμένης με ^{99}Tc annexin – V. Στον ασθενή αυτό χρειάστηκε να γίνει εξωτερική ηλεκτρική απινίδωση λόγω εκδήλωσης κοιλιακής μαρμαρυγής κατά την φάση της επαναιμάτωσης. Η τοπική βλάβη που προκλήθηκε στα κύτταρα του δέρματος και των μυών της προκάρδιας χώρας, θεωρήθηκε από τους συγγραφείς ως ο λόγος για τον οποίο δεν ήταν δυνατή η λήψη ραδιενεργού σήματος από την περιοχή της καρδιάς.

Συμπερασματικά, ο κυτταρικός θάνατος είτε μέσω της «όγκωσης» είτε μέσω της «απόπτωσης» συμβάλλει τελικά στην απώλεια μυοκαρδιακού ιστού και στην αύξηση του μεγέθους του εμφράγματος. Η έκταση του εμφράγματος αποτελεί καλά αποδεδειγμένο παράγοντα σχετιζόμενο με την αύξηση της πιθανότητας εκδήλωσης καρδιακής ανεπάρκειας και θανάτου στην πρώιμη αλλά και όψιμη μετεμφραγματική περίοδο ¹¹⁸⁻¹²².

Αρρυθμίες επαναιμάτωσης

Η επαναιμάτωση του μυοκαρδίου μετά από περίοδο ισχαιμίας μπορεί να οδηγήσει σε δυνητικώς επικίνδυνες για τη ζωή αρρυθμίες (κοιλιακή μαρμαρυγή, κοιλιακή ταχυκαρδία)^{123,124}. Στον άνθρωπο η πιο συχνή αρρυθμία επαναιμάτωσης είναι ο επιταχυνόμενος ιδιοκοιλιακός ρυθμός η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις είναι καλοήθης^{124,125}. Όμως, η κοιλιακή ταχυκαρδία και η κοιλιακή μαρμαρυγή αποτελούν το πιο σημαντικό αίτιο αφνίδιου θανάτου και πρώιμης μετεμφραγματικής θνητότητας και νοσηρότητας σε ασθενείς με Ο.Ε.Μ. στους οποίους επιτυγχάνεται επιτυχής επαναιμάτωση^{126,127}.

Η πρώτη πειραματική παρατήρηση του φαινομένου έγινε από τους Cohnheim και Von Schulthess – Rechberg τον 19^ο αιώνα. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι μπορούσε να προκληθεί κοιλιακή μαρμαρυγή μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από τη αποκατάσταση αιματικής ροής σε προηγουμένως αποφραγμένο στεφανιαίο αγγείο. Το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε αργότερα στα μέσα του 20^{ου} αιώνα από τους Tennant R και Wiggers CJ ενώ δύο δεκαετίες μετά οι Stephenson SE Jr et al παρατήρησαν ότι αρρυθμίες επαναιμάτωσης συμβαίνουν πιο συχνά μετά από επαναιμάτωση παρά μετά από παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας¹²⁸.

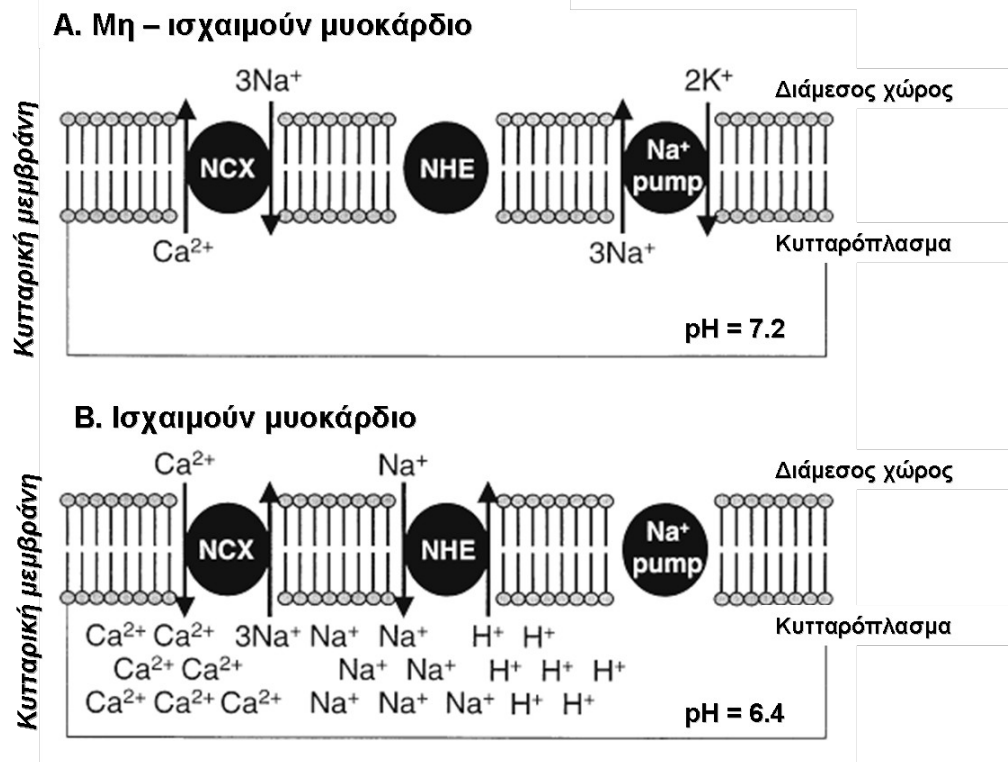
Σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης έχει αποδειχθεί ότι η επαναιμάτωση ισχαιμούντος μυοκαρδίου προκαλεί την γένεση κοιλιακής μαρμαρυγής, κοιλιακής ταχυκαρδίας και επιταχυνόμενου ιδιοκοιλιακού ρυθμού^{129, 130}. Η πιθανότητα εμφάνισης αρρυθμιών επαναιμάτωσης ελαττώνεται όσο αυξάνεται η διάρκεια της ισχαιμίας ή όταν η ισχαιμία γίνεται σταδιακά^{131, 132}. Η συχνότητα εκδήλωσης αρρυθμιών είναι υψηλή πρωτίστως στην πρώιμη φάση μετά την επαναιμάτωση και ελαττώνεται σημαντικά με την πάροδο της ώρας μετά την επαναιμάτωση^{133, 134}. Οι Balke et al απέδειξαν πως όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της ισχαιμίας τόσο μεγαλύτερες και οι βλάβες που προκαλούνται στην κυτταρική μεμβράνη μετά τη επαναιμάτωση, αυξάνοντας την συχνότητα της εμφάνισης αρρυθμιών επαναιμάτωσης¹³². Σε πειραματικές μελέτες in vitro έχει αποδειχθεί ότι μετά την επαναιμάτωση επιτυγχάνεται γρήγορη αποκατάσταση των δυναμικών ενέργειας στη κυτταρική μεμβράνη του μυοκαρδιακού κυττάρου, αλλά αυτή δεν είναι ομοιογενής για όλα τα κύτταρα της περιοχής που επαναιματώθηκε¹³⁵⁻¹³⁷. Συγκεκριμένα, από τα πρώτα 30 sec της επαναιμάτωσης έχει παρατηρηθεί σημαντική ηλεκτρική ανομοιογένεια στη μεμβράνη μυοκαρδιακών κυττάρων στα όρια μεταξύ της ισχαιμικής και της επαναιματωθείσας περιοχής του μυοκαρδίου¹³⁸⁻¹⁴⁰. Αυτή η μέγιστη ηλεκτρική ανομοιογένεια που παρατηρείται στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης δημιουργεί πολλαπλά ενδομυοκαρδιακά κυκλώματα επανεισόδου στη περιοχή επαναιμάτωσης με συνέπεια την γένεση κακοήθων αρρυθμιών επαναιμάτωσης όπως η κοιλιακή ταχυκαρδία και μαρμαρυγή^{141, 142}.

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της αρρυθμογενούς δράσης των Δ.Μ.Ο κατά την φάση της επαναιμάτωσης δεν είναι πλήρως γνωστός. Υπάρχουν ενδείξεις πως η καταστρεπτική δράση των Δ.Μ.Ο. στην κυτταρική μεμβράνη, τόσο μέσω της οξειδωσης των λιποπρωτεΐνων^{143, 144} όσο και μέσω της άμεσης τοξικής δράσης στα διαύλους ηλεκτρολυτών, προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες της τελευταίας¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Ειδικότερα, η τοξική βλάβη που προκαλείται στους ενεργούς διαύλους που ελέγχουν την ομοιόσταση του ενδοκυττάρου Ca^{++} αποτελούν ένα από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς πρόκλησης αρρυθμιών. Το φαινόμενο παρατηρείται κατά την πρώιμη κυρίως φάση της επαναιμάτωσης, ονομάζεται «σύνδρομο υπερφόρτωσης Ca^{++} - *calcium overload syndrome*» και ενοχοποιείται για την τόσο για την πρόκληση αρρυθμιών επαναιμάτωσης όσο και για το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου»^{149, 150}.

Ο κύριος μηχανισμός πρόκλησης του συνδρόμου βασίζεται σε διαταραχή της αλληλένδετης συνεργασίας μεταξύ τριών διαφορετικών ενεργών αντλιών ιόντων Na^+ , Ca^{++} και πρωτονίων (H^+). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Grinwald et al και

αργότερα η συμμετοχή του στο σύνδρομο επαναιμάτωσης επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ (Σχ. 7). Περιληπτικά, τόσο η ισχαιμία (ελάττωση παρεχομένης στην αντλία ενέργειας με την μορφή ADP) όσο και η επαναιμάτωση (τοξική δράση Δ.Μ.Ο. στην δομή της αντλίας) προκαλεί αναστολή στη δράση της αντλίας Na^+/K^+ και συσσώρευση Na^+ στον ενδοκυττάριο χώρο. Ταυτόχρονα, η ενδοκυττάρια οξειδωση (αποτέλεσμα ισχαιμίας) ενεργοποιεί την αντλία Na^+/H^+ η οποία ανταλλάσσει ενδοκυττάριο H^+ με την εισροή εξωκυττάρια Na^+ αυξάνοντας ακόμα περισσότερο την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Na^+ . Τα υψηλά επίπεδα Na^+ στον ενδοκυττάριο χώρο ενεργοποιούν την αντλία $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$ η οποία με την κατανάλωση ενέργειας αποβάλλει Na^+ σε ανταλλαγή με Ca^{++} το οποίο εισέρχεται ενεργά από τον εξωκυττάριο προς τον ενδοκυττάριο χώρο. Η αλληλουχία αυτή προκαλεί τελικά την υπερφόρτωση του κυττάρου σε Ca^{++} και διαταραχή της ιοντικής ισορροπίας της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την γένεση αρρυθμιών^{155, 156}. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι, η βεραπαμίλη δεν αναστέλλει την αύξηση του ενδοκυττάρια Ca^{++} που προκαλείται από τις Δ.Μ.Ο.¹⁵⁷. Αποδεικνύεται λοιπόν, ότι η υπερφόρτωση Ca^{++} δεν γίνεται μέσω μεταφοράς ιόντων Ca^{++} δια των L-διαύλων Ca^{++} αλλά κυρίως μέσω της διαταραχής της αντλίας Na^+/H^+ όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Άλλοι λιγότερο γνωστοί μηχανισμοί πιθανόν να συμμετέχουν στη πρόκληση αρρυθμιών επαναιμάτωσης¹⁵⁸. Η διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων από τα αυξημένα επίπεδα cAMP, η μεταβολή του εσωτερικού δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων καθώς και η μεταβολή της ομοιόστασης του K^+ αποτελούν μερικούς από αυτούς^{13,159,160}. Ειδικότερα, στην ισχαιμική περιοχή παρατηρείται υψηλή, τοπική συγκέντρωση εξωκυττάρια K^+ . Κατά την επαναιμάτωση, μεγάλες ποσότητες K^+ επανακυκλοφορούν στο αίμα (*“local washout”*) προκαλώντας υπερκαλιαιμία και δυνητικώς αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης αρρυθμιών¹⁶¹.



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας των αντλιών ανταλλαγής ιόντων σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες ισχαιμίας. **(Α)** Η αντλία ανταλλαγής ιόντων Na⁺/K⁺ (Na⁺/K⁺ ATPase - Na⁺ Pump) χρησιμοποιεί ATP προκειμένου να ανταλλάσσει 3 ιόντα Na⁺ με 2 ιόντα K⁺. Η αντλία ανταλλαγής ιόντων Ca²⁺ (Na⁺/Ca²⁺ exchanger - NCX) μεταφέρει ενδοκυττάριο Ca²⁺ προς τον εξωκυττάριο χώρο με αντάλλαγμα εξωκυττάριο Na⁺ που εισέρχεται εντός του κυττάρου. Η αντλία ανταλλαγής ιόντων Na⁺/H⁺ (Na⁺/H⁺ exchanger - NHE) παραμένει αδρανής σε φυσιολογικές συνθήκες. **(Β)** Σε συνθήκες ισχαιμίας η ενδοκυττάρια οξείδωση (pH = 6.4) ενεργοποιεί την αντλία NHE η οποία ανταλλάσσει H⁺ προς τον εξωκυττάριο χώρο με Na⁺ προς τον ενδοκυττάριο χώρο. Προκαλείται υπερφόρτωση Na⁺ στον ενδοκυττάριο χώρο η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση της αντλίας NCX η οποία μεταφέρει Na⁺ προς τον εξωκυττάριο χώρο και Ca²⁺ τον ενδοκυττάριο με αποτέλεσμα να προκαλείται ενδοκυττάρια υπερφόρτωση Ca²⁺.

Στον άνθρωπο οι απειλητικές για τη ζωή αρρυθμίες (επίμονη κοιλιακή ταχυκαρδία και κοιλιακή μαρμαρυγή) μετά επιτυχή επαναιμάτωση είναι συχνό φαινόμενο και απαντάται σε ποσοστό έως και 10% των ασθενών που είχαν επιτυχή επαναιμάτωση μετά θρομβόλυση^{162,163}. Η συχνότητα εμφάνισης αρρυθμιών επαναιμάτωσης είναι μικρότερη σε ασθενείς με Ο.Ε.Μ. που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική^{164,165}. Η εμφάνιση τέτοιων αρρυθμιών κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης παρόλο που έχει γενικά εκτιμάται ως δείκτης επιτυχούς ιστικής επαναιμάτωσης^{166,167}, σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση λόγω διάτασης της αριστεράς κοιλίας πιθανώς λόγω μυοκαρδιακής βλάβης σε κυτταρικό επίπεδο που προκαλείται από το σύνδρομο επαναιμάτωσης^{127,162,168-170}. Το ίδιο δεν φαίνεται να ισχύει για τους ασθενείς που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική καθώς η εμφάνιση

αρρυθμιών μετά τη διάνοιξη του αγγείου δεν έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ασφαλή δείκτη επιτυχούς επαναιμάτωσης ενώ η πρόγνωση των ασθενών που εκδηλώνουν τέτοιες αρρυθμίες επαναιμάτωσης δεν επηρεάζεται από την εμφάνιση τους¹⁶⁴.

Εφόσον η δυσλειτουργία της αντλίας Na^+/H^+ αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς πρόκλησης αρρυθμιών επαναιμάτωσης, η πλήρης αναστολή της λειτουργίας της θα μπορούσε να σταματήσει τον φαύλο κύκλο υπερφόρτωσης Ca^{++} , όπως αυτός περιγράφηκε προηγουμένως, και να περιορίσει την γένεση αρρυθμιών. Πλήθος πειραματικών μελετών, έχουν αποδείξει την ευνοϊκή επίδραση της χορήγησης διαφόρων αναστολέων της αντλίας Na^+/H^+ στην ελάττωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης¹⁷¹⁻¹⁷⁷. Παραδόξως, η αντιαρρυθμική δράση των αναστολέων της αντλίας Na^+/H^+ δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί σε κλινικές μελέτες, όταν αυτή χορηγήθηκε πριν την επαναιμάτωση σε ασθενείς με Ο.Ε.Μ.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

Η συσχέτιση των Δ.Μ.Ο. στην γένεση αρρυθμιών επαναιμάτωσης αποδεικνύεται έμμεσα και από το γεγονός ότι σε σημαντικό αριθμό πειραματικών μελετών, η χορήγηση ουσιών που αναστέλλουν την παραγωγή Δ.Μ.Ο. κατά την επαναιμάτωση ελαττώνουν και την εκδήλωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης¹⁸¹⁻¹⁸⁶. Η επίδραση των αντιοξειδωτικών στη καταστολή των αρρυθμιών επαναιμάτωσης δεν έχει αποδειχθεί πλήρως σε κλινικές μελέτες. Οι Laskowski et al. παρατήρησαν σημαντική ελάττωση στην συχνότητα εμφάνισης των έκτακτων κοιλιακών συστολών μόνο μετά 24 ώρες από την επαναιμάτωση σε ασθενείς που έλαβαν i.v. συνδυασμό αντιοξειδωτικών. Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην εμφάνιση αρρυθμιών κατά το πρώτο 24ώρο μετά επαναιμάτωση μεταξύ των δύο ομάδων¹⁸⁷. Η χορήγηση Trimetazidine σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επαναιμάτωση με θρομβόλυση ελάττωσε τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης σε δυο μελέτες με μικρό αριθμό ασθενών^{188,189}. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν από τη πολυκεντρική, διπλή-τυφλή, τυχαιοποιημένη και ελεγχόμενη με placebo μελέτη European Myocardial Infarction Project-Free Radicals - EMIP-FR¹⁹⁰. Στην μελέτη αυτή, χορηγήθηκε i.v. Trimetazidine σε 19725 ασθενείς πριν τη θρομβόλυση. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη εμφάνιση αρρυθμιών επαναιμάτωσης μεταξύ των δύο ομάδων. Η χορήγηση Trimetazidine δεν πρόσφερε κανένα όφελος στους ασθενείς που είχαν επιτυχή επαναιμάτωση. Μικρό όφελος παρατηρήθηκε στους ασθενείς που έλαβαν Trimetazidine και είχαν ανεπιτυχή επαναιμάτωση. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Tsujita K et al., απέδειξαν την αντιαρρυθμική δράση της αντιοξειδωτικής ουσίας Edaravone, όταν αυτή χορηγήθηκε i.v. σε ασθενείς με ΟΕΜ λίγο πριν υποβληθούν σε προσπάθεια επαναιμάτωσης με πρωτογενή αγγειοπλαστική¹⁹¹.

Συμπερασματικά, οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης είναι ένα συχνό φαινόμενο που συναντάται τόσο στις πειραματικές όσο και στις κλινικές μελέτες επαναιμάτωσης μετά

από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η εμφάνισή τους στην πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης θεωρείται σημείο επιτυχούς ιστικής επαναιμάτωσης αλλά και δείκτης χειρότερης πρόγνωσης των ασθενών αυτών. Η καταστολή τους με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, παρόλο που έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα, δεν έχει αποδειχθεί επαρκώς σε κλινικές μελέτες.

Απόπληκτο μυοκάρδιο – “Stunning myocardium”

Πρόκειται για την πιο καλά αποδεδειγμένη κλινική εκδήλωση του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Heyndrickx et al. το 1975 όταν σε πειράματα σε σκύλους αποδείχθηκε ότι μετά την άρση προσωρινής ισχαιμίας, η φυσιολογική συσταλτικότητα της σχετιζόμενης με την ισχαιμία περιοχής του μυοκαρδίου καθυστερούσε για περισσότερο από 3 ώρες όταν η διάρκεια της ισχαιμίας ήταν 5 min και περισσότερο από 6 ώρες όταν η ισχαιμία ήταν 15 min¹⁹². Αργότερα το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε και από άλλες πειραματικές και κλινικές μελέτες (φαρμακευτικής και μηχανικής επαναιμάτωσης) τόσο μετά από μικρής (≤ 20 min) όσο και μετά από μεγαλύτερης διάρκειας ισχαιμία (1 – 2 ώρες)¹⁹³⁻¹⁹⁷. Το 1982 οι Branwald E και Kloner R όρισαν το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» ως τη «παρατεταμένη μετά επιτυχή επαναιμάτωση μηχανική δυσλειτουργία προηγούμενως ισχαιμούντος μυοκαρδιακού ιστού, χωρίς να υφίσταται σημαντική μυοκαρδιακή βλάβη ή νέκρωση»¹⁹⁸. Η μηχανική δυσλειτουργία είναι αναστρέψιμη και για την διάγνωση του φαινομένου απαιτείται η επιβεβαίωση της πλήρους αποκατάστασης φυσιολογικής αιματικής ροής στο υπεύθυνο για την ισχαιμία στεφανιαίο αγγείο¹⁹⁹. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η διάρκεια του φαινομένου είναι συνήθως μεγαλύτερη από αυτή της προηγηθείσας ισχαιμίας και ότι η διάρκεια του εξαρτάται ανάλογα από την ελάττωση της αιματικής ροής στο υπεύθυνο για την ισχαιμία στεφανιαίο αγγείο^{33,192,194,200,201}. Το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» παρατηρείται σε καταστάσεις μηχανικής και φαρμακευτικής επαναιμάτωσης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, μετά από αποκατάσταση αιματικής κυκλοφορίας έπειτα από γενικευμένη καρδιακή ισχαιμία, όπως μετά από καρδιακή παύση κατά τη διάρκεια επέμβασης αορτο-στεφανιαίας παράκαμψης (γνωστό και ως σημείο “πέτρινης καρδιάς – stone heart”), αλλά και μετά από προσωρινή ισχαιμία κατά τη διάρκεια σωματικής κόπωσης²⁰²⁻²⁰⁶.

Παρόλο που μέχρι τώρα έχουν προταθεί πληθώρα μηχανισμών που εμπλέκονται στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου», οι επικρατέστεροι μηχανισμοί είναι δύο: ο μηχανισμός της «οξειδωτικής βλάβης» και η «θεωρία του Ca⁺⁺». Οι δύο μηχανισμοί δεν είναι ανεξάρτητοι. Υπάρχουν ενδείξεις αλληλοεπίδρασης μεταξύ τους, καθώς έχει αποδειχθεί η καταστροφική βλάβη των οξειδωτικών ριζών στις αντλίες Ca⁺⁺ της

μυοκαρδιακής μεμβράνης και η εν συνέχεια αποδιοργάνωση της ομοιόστασης του Ca^{++} ^{18, 207-209}.

Θεωρία της οξειδωτικής βλάβης: Τις πρώτες έμμεσες ενδείξεις συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» αποτέλεσαν μελέτες στις οποίες η χορήγηση γνωστών αντιοξειδωτικών ουσιών βελτίωσε τη μυοκαρδιακή συσταλτική ικανότητα μετά από επαναιμάτωση. Η χορήγηση δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase –SOD) και καταλάσης (Catalase - CAT) σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία για 15 min με αποκλεισμό του προσθίου κατιόντα και επαναιμάτωση 30 min, βελτίωσε την ανάκτηση της συστολικής λειτουργίας της προηγηθείσας ισχαιμούσας περιοχής²¹⁰. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και από άλλους ερευνητές αποδεικνύοντας έμμεσα ότι η αναστολή των Δ.Μ.Ο. με τους οξειδωτικούς παράγοντες SOD και CAT προστατεύει από το μυοκαρδιακό stunning^{211,212}. Η χορήγηση δυμεθυλο-θειο-ουρίας (dymethylthiourea - DMTU) και μερκαπτο-προπιονυλ-γλυκίνης (mercapto-propionyl-glycine - MPG), που αποτελούν ειδικούς εκκαθαριστές του $\cdot OH$, επίσης βελτίωσε την συστολική λειτουργία του επαναιματωθέντος μυοκαρδίου, αποδεικνύοντας έμμεσα την συμμετοχή των $\cdot OH$ στο stunning του μυοκαρδίου²¹³⁻²¹⁵. Παρομοίως, η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης (desferrioxamine - DES) ελαττώνει το μυοκαρδιακό stunning μέσω της αναστολής των αντιδράσεων Haber - Weiss και Fenton, αποδεικνύοντας την συμμετοχή των Δ.Μ.Ο. (κυρίως $\cdot OH$) που παράγονται έμμεσα μέσω των σίδηρο-καταλυόμενων αντιδράσεων Haber - Weiss και Fenton^{216, 217}.

Πέραν των έμμεσων, υπάρχουν και άμεσες αποδείξεις συμμετοχής των Δ.Μ.Ο. στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου». Οι Bolli R et al. χρησιμοποίησαν την ESR φασματογραφία με την ταυτόχρονη χρήση spin traps (PBN) προκειμένου να ανιχνεύσουν Δ.Μ.Ο. μετά από την επαναιμάτωση σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε 15 min ισχαιμίας. Παρατηρήθηκε «έκρηξη» παραγωγής Δ.Μ.Ο. στα πρώτα 5 min της επαναιμάτωσης, η ποσότητα των οποίων είχε γραμμική συσχέτιση με το βαθμό ισχαιμίας που προκλήθηκε³³. Η συσχέτιση Δ.Μ.Ο. και του φαινομένου του «απόπληκτου μυοκαρδίου» επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τους ίδιους ερευνητές σε πειραματικές μελέτες που ακολούθησαν όπου χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης Δ.Μ.Ο. μετά από χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων²¹⁸⁻²²⁰. Συγκεκριμένα, η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης μείωσε το μυοκαρδιακό stunning σε σκύλους προκαλώντας ταυτόχρονα σημαντική ελάττωση στη συγκέντρωση των Δ.Μ.Ο. που μετρήθηκαν στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου μετά την επαναιμάτωση σε σχέση με τα πειραματόζωα που έλαβαν placebo²²⁰. Οι Sun S et al. παρουσίασαν επίσης παρόμοια αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας μία διαφορετική μέθοδο ανίχνευσης της οξειδωτικής

ρίζας ($\cdot\text{OH}$)²²¹. Εκτός από τις καταστάσεις περιοχικής ισχαιμίας (έμφραγμα του μυοκαρδίου), η αιτιολογική σχέση των Δ.Μ.Ο. με το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» αποδείχθηκε και σε καταστάσεις ολικής ισχαιμίας σε απομονωμένες καρδιές ποντικών. Στη μελέτη αυτή η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως SOD και CAT, ελάττωσε την βαρύτητα μηχανικής δυσλειτουργίας μετά επαναιμάτωση. Στις καρδιές που παρατηρήθηκε ελάττωση της βαρύτητας του μυοκαρδιακού stunning, παρατηρήθηκε και ελάττωση της παραγωγής Δ.Μ.Ο. ²²².

Όλες οι προηγούμενες μελέτες, έγιναν σε πειραματικά μοντέλα «ανοιχτού-θώρακα», όπου η παραγωγή των Δ.Μ.Ο. που μετρήθηκαν θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα των διαδικασιών αναισθησίας ή χειρουργικών πράξεων και όχι της διαδικασίας επαναιμάτωσης. Η ενδογενής αυτή αδυναμία των μοντέλων «ανοιχτού - θώρακα» αποδείχθηκε από τους Triana J et al και τους Li X et al οι οποίοι συνέκριναν τα μοντέλα αυτά με αντίστοιχα «κλειστού - θώρακα» (στα όποια τα πειραματόζωα δεν υποβάλλονται σε βαριές χειρουργικές επεμβάσεις) και ανακάλυψαν ότι Δ.Μ.Ο. παράγονται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες στα μοντέλα «ανοιχτού-θώρακα» σε σχέση με τα μοντέλα «κλειστού - θώρακα»^{223, 224}. Οι ίδιοι, αλλά και άλλοι ερευνητές, απέδειξαν την συσχέτιση μεταξύ Δ.Μ.Ο. και μυοκαρδιακού stunning και στα πειραματικά μοντέλα «κλειστού - θώρακα» επιβεβαιώνοντας πλήρως την αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των Δ.Μ.Ο. που παράγονται μετά την επαναιμάτωση με το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου»²²³⁻²²⁵.

Ο ακριβής μηχανισμός, μέσω του οποίου οι Δ.Μ.Ο. προκαλούν μυοκαρδιακή συστολική δυσλειτουργία δεν είναι πλήρως γνωστός. Η απ' ευθείας τοξική βλάβη των Δ.Μ.Ο. στις δομικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και των μιτοχονδρίων του μυοκαρδιακού κυττάρου, με αποτέλεσμα την διαταραχή στη διαπερατότητα τους, έχει αποδειχθεί σε διάφορες πειραματικές μελέτες και έχει προταθεί σαν ένας σημαντικός μηχανισμός πρόκλησης του φαινομένου του «απόπληκτου μυοκαρδίου»²²⁶. Οι Δ.Μ.Ο. έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την διάνοξη ειδικών «πόρων διαβατότητας σε ζώνες μετάπτωσης της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων» (Mitochondrial Permeability Transition Pores - MPTP). Η διάνοξη των πόρων MPTP, αναστρέφει στην βασική λειτουργία των μιτοχονδρίων, μετατρέποντας τα από μονάδες παραγωγής ενέργειας (ATP) σε μονάδες κατανάλωσης ενέργειας (υδρόλυση του ATP). Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο στερείται σημαντικής ποσότητας ενέργειας που εκδηλώνεται με την απουσία συσταλτικής ικανότητας^{226, 227}. Τέλος, η τοξική βλάβη (πρωτεόλυση) της Τροπονίνης Τ από την δράση των Δ.Μ.Ο. προκαλεί διάσπαση της αλληλουχίας του συσταλτικού μηχανισμού του μυοκαρδιακού κυττάρου και έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός του φαινομένου του «απόπληκτου μυοκαρδίου»^{228, 229}.

Όλες αυτές οι πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν, έμμεσα ή άμεσα, ότι οι Δ.Μ.Ο. που παράγονται μετά την επαναιμάτωση παίζουν σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο του «απόπληκτου» μυοκαρδίου τόσο σε καταστάσεις περιοχικής (έμφραγμα του μυοκαρδίου) όσο και ολικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας (επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης).

Θεωρία του Ca^{++} : Το Ca^{++} αποτελεί απαραίτητο ιόν στη διαδικασία συστολής και διαστολής του μυοκαρδιακού κυττάρου καθώς αποτελεί το βασικό ιόν στη διαδικασία σύζευξης εκπόλωσης – συστολής (myocardial excitation – contraction coupling). Με την κυτταρική εκπόλωση οι αντλίες μεταφοράς Ca^{++} στο σαρκείλημα ανοίγουν μεταφέροντας μεγάλες ποσότητες Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{++} οδηγεί σε σύνδεση ιόντων Ca^{++} με το σύμπλεγμα ρυθμιστικών πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Τροπονίνη C, I και T. Μέσω της σύνδεσης αυτής, το Ca^{++} ουσιαστικά σταματά την ανασταλτική δράση του συμπλέγματος τροπονινών στη σύνδεση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, πυροδοτώντας τη έναρξη της μυοκαρδιακής συστολής^{230, 231}.

Η «θεωρία του Ca^{++} » εμπεριέχει 2 διαφορετικούς μηχανισμούς συμμετοχής του Ca^{++} στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου»: 1) τη δυσλειτουργία του μηχανισμού σύζευξης εκπόλωσης – συστολής στο ενδοκυττάριο Ca^{++} και 2) υπερφόρτωση ενδοκυττάρου Ca^{++} .

Υποθετικά, η δυσλειτουργία του μηχανισμού σύζευξης εκπόλωσης – συστολής μπορεί να οφείλεται είτε σε ανεπάρκεια ελεύθερου ενδοκυττάρου Ca^{++} μετά την επαναιμάτωση είτε σε ελαττωμένη ευαισθησία του μηχανισμού στο υπάρχον ενδοκυττάριο Ca^{++} (ελαττωμένη συσταλτική ικανότητα για δεδομένη συγκέντρωση Ca^{++}). Πρώτοι οι Kusuoka H et al. παρατήρησαν τη συμμετοχή της διαταραχής της ομοιόστασης του Ca^{++} στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» μετά επαναιμάτωση. Στη μελέτη τους σε απομονωμένες καρδιές νυφίτσας παρατήρησαν ότι η από το Ca^{++} προκαλούμενη μέγιστη ένταση συστολής (Maximum Ca^{++} Activated Pressure - MCAP) ήταν σημαντικά μικρότερη στις καρδιές που είχαν υποστεί ισχαιμία (15 min), επαναιμάτωση και stunning, σε σύγκριση με τις καρδιές που δεν είχαν υποστεί ισχαιμία ή stunning²³². Αργότερα, αποδείχθηκε ότι η δυσλειτουργία του σύζευξης εκπόλωσης – συστολής οφείλεται κυρίως σε ελάττωση της ευαισθησίας του τελευταίου στη δεδομένη συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} ^{19, 233-235}. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η μελέτη των Miller W et al. οι οποίοι παρατήρησαν ότι η ισομετρική τάση, (η οποία είναι συνάρτηση της ευαισθησίας του μυοκαρδιακού κυττάρου στο Ca^{++}) απομονωμένων μυοκαρδιακών κυττάρων παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια ισχαιμίας ενώ ελαττώνεται σημαντικά μετά την επαναιμάτωση²³⁶. Αποδείχθηκε με αυτό τον τρόπο ότι η διαταραχή ευαισθησίας

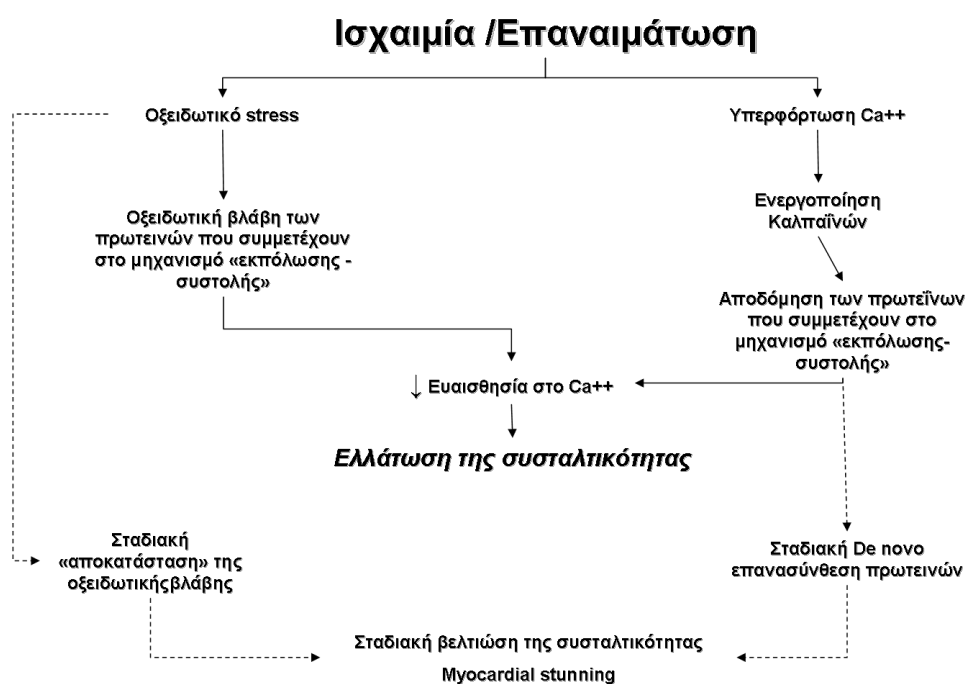
του μηχανισμού σύζευξης εκπόλωσης – συστολής συμβαίνει μόνο κατά την φάση της επαναιμάτωσης, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή της διαταραχής της ομοιόστασης του Ca^{++} στο σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Σημαντικός αριθμός πειραματικών δεδομένων αποδεικνύει ότι η υπερφόρτωση του Ca^{++} κατά τη φάση της επαναιμάτωσης με το μηχανισμό που περιγράφηκε ανωτέρω (βλέπε σελ. 30) συμμετέχει στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου». Οι θεωρίες που έχουν προταθεί είναι δύο: α) άσκοπη κατανάλωση ενέργειας με τη μορφή του ATP στις αντλίες μεταφοράς ιόντων Ca^{++} προκειμένου να αποκατασταθεί η φυσιολογική συγκέντρωση Ca^{++} στο ενδοκυττάριο χώρο και β) η άμεση τοξική βλάβη των ιόντων Ca^{++} στα συστατικά του κύτταρου μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεασών καλπαΐνες (calpains).

Οι Kusuoaka et al. απέδειξαν ότι η αιμάτωση απομονωμένων καρδίων με διαλύματα χαμηλής περιεκτικότητας σε Ca^{++} εξασθενεί το φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου» κατά τη φάση της επαναιμάτωσης²³². Αργότερα οι ίδιοι ερευνητές, με τη χορήγηση διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης Na^+ , απέδειξαν ότι ο βασικός μηχανισμός της υπερφόρτωσης Ca^{++} είναι η διαταραχή στη ισορροπημένη λειτουργία των αντλιών Ca^{++}/Na^+ και Na^+/H^+ ²³⁷. Η χορήγηση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης Na^+ κατά την φάση της επαναιμάτωσης ελάττωσε σημαντικά την «αποπληξία» του μυοκαρδίου. Το υψηλής συγκέντρωσης διάλυμα Na^+ , αυξάνει παροδικά (κατά την επαναιμάτωση) την εξωκυττάρια συγκέντρωση Na^+ με αποτέλεσμα να μετριάζεται η ανταλλαγή ιόντων Na^+ με ιόντα Ca^{++} από τον εξωκυττάριο προς τον ενδοκυττάριο χώρο περιορίζοντας σημαντικά την άσκοπη κατανάλωση ενέργειας²³⁷. Τέλος, επιβεβαίωση των ανωτέρω πειραματικών μελετών αποτελεί η παρατήρηση ότι η προσωρινή τεχνητή υπερφόρτωση του κυττάρου με Ca^{++} προκαλεί συστολική δυσλειτουργία, παρόμοια με αυτή του «απόπληκτου» μυοκαρδίου ακόμα και σε καταστάσεις μη ισχαιμίας²³⁸.

Η καταστροφική δράση των ιόντων Ca^{++} φαίνεται ότι οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, και στη ενεργοποίηση ειδικών πρωτεασών, των καλπαϊνών (calpains). Πρόκειται για ειδικές πρωτεάσες, η ενεργοποίηση των οποίων είναι Ca^{++} - εξαρτώμενη: παρουσία αυξημένων επίπεδων ενδοκυττάριας Ca^{++} , οι καλπαΐνες ενεργοποιούνται και προκαλούν τη διάσπαση και καταβολισμό δομικών πρωτεϊνών του μυοκυττάρου²³⁹⁻²⁴¹. Οι Gao W et al. παρατήρησαν ότι σε απομονωμένα κύτταρα «απόπληκτου» μυοκαρδίου μετά επαναιμάτωση, χρειάστηκε να δοθεί μεγαλύτερη ποσότητα ιόντων Ca^{++} προκειμένου να επιτευχθεί η ίδια συσταλτική δύναμη σε σχέση με κύτταρα φυσιολογικού μυοκαρδίου, υποδεικνύοντας την ελαττωμένη ευαισθησία του «απόπληκτου» μυοκαρδίου σε δεδομένη συγκέντρωση Ca^{++} ²⁰. Στην ίδια όμως μελέτη, οι ερευνητές εξέτασαν την υπόθεση ότι η παρουσία πρωτεασών (καλπαϊνών) είναι η υπεύθυνη για την ελάττωση

την ανταπόκριση του μηχανισμού σύζευξης εκπόλωσης – συστολής. Ανακάλυψαν ότι η άμεση έκθεση του μυοκαρδιακού κυττάρου στην καλπαΐνη I είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση της συσταλτικής δύναμης του κυττάρου. Αντίθετα, το φαινόμενο μπορούσε να προληφθεί πλήρως με τη χορήγηση καπλαστατίνης (Calpastatin) που αποτελεί το ισχυρό αναστολέα της Καλπαΐνης I. Τα ίδια αποτελέσματα έδειξαν οι πειραματικές μελέτες και άλλων ερευνητών στις όποιες η χορήγηση διαφόρων αναστολέων των καλπαϊνών μετρίασε σημαντικά την «αποπληξία» του μυοκαρδιακού κυττάρου μετά επαναιμάτωση^{242,243}. Η θεωρία των καλπαϊνών, πιθανώς να εξηγεί και τα αποτελέσματα των McDonough J et al., οι οποίοι παρατήρησαν σημαντική αποδόμηση της τροπονίνης I, σε απομονωμένα κύτταρα «απόπληκτου» μυοκαρδίου²²⁸. Η μελέτη αυτή σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις των Yoshida K et al επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή των Ca^{++} - εξαρτώμενων πρωτεασών (καλπαΐνες) στο φαινόμενο του «απόπληκτου μυοκαρδίου»²⁴⁴.



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση της πρόκλησης του μυοκαρδιακού *stunning* μετά την επαναιμάτωση μέσω της άμεσης οξειδωτικής βλάβης και της δυσλειτουργίας του μηχανισμού σύζευξης/εκπόλωσης ή της «υπερφόρτωσης σε Ca^{++} ». Με διεκεκομμένα βέλη απεικονίζονται πιθανοί μηχανισμοί αποκατάστασης της μυοκαρδιακής συσταλτικότητας.

Οι δύο θεωρίες, της «οξειδωτικής βλάβης» και του « Ca^{++} », δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της δράσης των Δ.Μ.Ο.

μετά επαναιμάτωση και τη υπερφόρτωση του Ca^{++} . Παρόλο που ο πλήρης μηχανισμός αλληλεπίδρασης των δύο αυτών θεωριών δεν είναι πλήρως γνωστός υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι οι Δ.Μ.Ο. προκαλούν σημαντική βλάβη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, απελευθερώνοντας μεγάλες ποσότητες Ca^{++} και διαταράσσοντας τη ιοντική ομοιόσταση του μυοκαρδιακού κυττάρου^{21,245}. (Σχ. 8)

Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

Οι επιπτώσεις του συνδρόμου επαναιμάτωσης δεν περιορίζονται μόνο στο μυοκάρδιο αλλά αφορούν και τα στεφανιαία αγγεία. Μία από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις του συνδρόμου αποτελεί η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου του στεφανιαίου αγγείου που επαναιματώθηκε. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου ορίζεται ως, η επηρεασμένη ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή που παρατηρείται σε προηγουμένως κλειστό στεφανιαίο αγγείου μετά επαναιμάτωση και συνοδεύεται από υπερβολική ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοσύσπαση. Είναι γνωστό ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου επέρχεται πολύ πρώιμα μετά την επαναιμάτωση και διαρκεί για αρκετή ώρα μετά. Οι Tsao P et al. απέδειξαν πως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εμφανίζεται από τα πρώτα 2.5 min της επαναιμάτωσης και επιδεινώνεται σταθερά μέχρι και τα πρώτα 20 min. Παραμένει όμως, χωρίς βελτίωση μέχρι και 270 min μετά επαναιμάτωση²⁴⁶. Οι ίδιοι ερευνητές εξέτασαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα κύτταρα του προσβεβλημένου από την επαναιμάτωση ενδοθηλίου και διαπίστωσαν ότι το ενδοθήλιο παρέμεινε άθικτο υποδεικνύοντας ότι το φαινόμενο οφείλεται, όχι σε δομική βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά σε λειτουργική αδυναμία παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) από το ενδοθήλιο. Οι Pearson P et al. απέδειξαν ότι η διαταραχή του ενδοθηλίου διαρκεί ως και 12 εβδομάδες και ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μετά 12 εβδομάδες (πρόκληση σπασμού στεφανιαίων αγγείων) φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από τα αιμοπετάλια και τις ουσίες που παράγονται από αυτά (σεροτονίνη, θρομβίνη) παρά από την παραγωγή NO²⁴⁷. Η παρατήρηση αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς στην κλινική πράξη το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να αποτελεί αίτιο σπασμού των στεφανιαίων αγγείων ή θρόμβωσης σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μετά επιτυχή επαναιμάτωση.

Η παρατεταμένη αγγειοσύσπαση, που είναι αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας, του ενδοθηλίου μετά επαναιμάτωση, αυξάνει την παραγωγή μορίων συγκόλλησης (cell adhesion molecules - CAMs), όπως σελεκτίνες (P-selectine, L-selectine), β2-ιντεγκρίνες (β2-integrins, CD11, CD18) και προσκολλητικά μόρια (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1). Η έκλυση των μορίων αυτών από το ενδοθήλιο, οδηγεί σε προσκόλληση μεγάλου αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και ειδικότερα πολυμορφοπύρηνων, στην περιοχή του δυσλειτουργούντος ενδοθηλίου προκαλώντας απόφραξη της

μικροκυκλοφορίας αλλά και έκλυση φλεγμονωδών ουσιών που καταστρέφουν τελικά την δομή του ενδοθηλιακών κυττάρων²⁴⁸⁻²⁵⁰.

Πρέπει να τονιστεί, ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο επαναιμάτωσης καθώς η ισχαιμία χωρίς επαναιμάτωση, σχετίζεται με μικρή ή καθόλου δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, όπως αυτή εκτιμήθηκε με την ανταπόκριση τμημάτων/δακτυλίων στεφανιαίων αγγείων στη χορήγηση ενδοθηλιακό-εξαρτώμενων αγγειοδιασταλτικών ουσιών *in vitro* (endothelium dependent vasodilators)^{246,251}. Τέλος, το φαινόμενο, έχει αποδειχθεί σε πλήθος κλινικών μελετών και έχει ιδιαίτερη σημασία κυρίως σε ασθενείς που υποβάλλονται σε επείγουσα αγγειοπλαστική επαναιμάτωσης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου²⁵²⁻²⁵⁵.

Δυσλειτουργία των «μικρών αγγείων» – Φαινόμενο «μη-επαναρροής» («No-reflow phenomenon»)

Ο συνδυασμός της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και ουδετερόφιλων, η *de novo* θρόμβωση αλλά και ο εμβολισμός θρομβωτικού υλικού μετά την επαναιμάτωση προκαλούν λειτουργική και μηχανική απόφραξη της μικροκυκλοφορίας στην υπό επαναιμάτωση περιοχή του μυοκαρδίου. Το φαινόμενο είναι γνωστό σαν «φαινόμενο μη-επαναρροής» και χαρακτηρίζεται από σημαντική καθυστέρηση ή διακοπή της αιματικής ροής στο επαναιματούμενο στεφανιαίο αγγείο. Το φαινόμενο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1967 σε πειραματικά μοντέλα εγκεφαλικής ισχαιμίας σε κουνέλια, στα οποία μετά από παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας και πλήρη άρση της απόφραξης του αγγείου παρατηρούνταν σημαντική καθυστέρηση στην αποκατάσταση της αιματικής ροής προς το εγκέφαλο²⁵⁶. Περαιτέρω πειραματικές μελέτες σε διάφορα πειραματόζωα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του φαινομένου τόσο για τον εγκέφαλο αλλά και για άλλα όργανα²⁵⁷⁻²⁵⁹. Στα στεφανιαία αγγεία, το φαινόμενο της «μη-επαναρροής» περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Kloner R et al. το 1974 οι οποίοι παρατήρησαν μερική και όχι πλήρη αποκατάσταση της αιματικής ροής, μετά την αιφνίδια επαναιμάτωση στεφανιαίου αγγείου σκύλου που ήταν πλήρως αποφραγμένο επί 90 min²⁶⁰. Οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντική βλάβη στη δομή των μικροαγγείων και στην αρχιτεκτονική της ενδοθηλιακής στοιβάδας καθώς και σημαντικό κυτταρικό και μεσοκυττάριο οίδημα στην επαναιματούμενη περιοχή του μυοκαρδίου¹⁰². Το οίδημα των μυοκαρδιακών κυττάρων στη επαναιματούμενη περιοχή συμπιέζει εξωτερικά τα τριχοειδή και εμποδίζει τη φυσιολογική ροή του αίματος^{261,262}. Το οίδημα των ενδοθηλιακών κυττάρων μαζί με την απώλεια συνοχής της ενδοθηλιακής στοιβάδας

έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόπτωση οιδηματωδών ενδοθηλιακών κυττάρων εντός του αυλού των τριχοειδών προκαλώντας ουσιαστικά την απόφραξη τους²⁶⁰. Τα θετικά αποτελέσματα από πειραματικές μελέτες οι οποίες στόχευσαν στη αναστολή ή ελάττωση του οιδήματος των μυοκαρδιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων με τη χορήγηση αποιδηματικής αγωγής (μαννιτόλη ή δεξαμεθαζόνης) επιβεβαιώνουν τη σημασία τη συμμετοχή του μηχανισμού αυτού στο φαινόμενο της «μη-επαναρροής»²⁶³⁻

²⁶⁶.

Η μηχανική απόφραξη των τριχοειδικών αγγείων από αιμοπετάλια έχει επίσης προταθεί σαν πιθανός μηχανισμός γένεσης του φαινομένου της «μη-επαναρροής». Οι Golino P et al. διερεύνησαν τη συμμετοχή των αιμοπεταλίων στο φαινόμενο και παρατήρησαν ότι η μετά επαναιμάτωση ροή παρουσίασε βελτίωση στα πειραματόζωα που είχαν υποβληθεί σε αφαίρεση σημαντικού αριθμού των αιμοπεταλίων τους²⁶⁷. Τα αιμοπετάλια παράγουν ισχυρές αγγειοδραστικές ουσίες (σεροτονίνη και θρομβοξάνη A₂) που προάγουν τον αγγειόσπασμο στην μικροκυκλοφορία προκαλώντας ακόμα περισσότερη αιματική συμφόρηση, τοπική θρόμβωση και επιβράδυνση της ροής. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η χορήγηση αναστολέων της θρομβοξάνης - A₂ μετριάξει τις επιπτώσεις του συνδρόμου επαναιμάτωσης αποδεικνύοντας έτσι την συμμετοχή των αιμοπεταλίων στο φαινόμενο^{268,269}. Πέραν από το τοπικό αγγειόσπασμο, η πραγματική συμμετοχή της θρομβοξάνης - A₂ στη παθοφυσιολογία του συνδρόμου της επαναιμάτωσης είναι μικρή^{270,271}.

Η συσσώρευση λευκοκυττάρων στα τριχοειδή του μυοκαρδίου μετά την επαναιμάτωση φαίνεται να συμμετέχει στο φαινόμενο της «μη-επαναρροής». Οι Engler R et al. εξέτασαν παθολογοανατομικά μυοκαρδιακό ιστό προερχόμενο από μη-ισχαιμικές περιοχές καρδιάς σκύλου και τον συνέκριναν με αντίστοιχα δείγματα από επαναιματούμενες περιοχές. Παρατήρησαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό εγκλωβισμένων λευκοκυττάρων στα τριχοειδή των ιστικών δειγμάτων που προέρχονται από τις επαναιματούμενες περιοχές σε σχέση με αυτά που προέρχονται από τις μη-ισχαιμικές περιοχές²⁷². Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η επαναιμάτωση οδηγεί σε αιφνίδια και προσέλευση λευκοκύτταρων στα τριχοειδή των επαναιματούμενων περιοχών^{273,274}. Ειδικότερα, οι Sheridan F et al., χρησιμοποιώντας την τεχνική των Ashikawa K et al. για την άμεση επισκόπηση των επικαρδιακών αγγείων²⁷⁵, έδειξαν ότι το σήμα των σεσημασμένων λευκοκυττάρων στα επικαρδιακά μικρο-αγγεία ήταν πολύ μεγαλύτερο σε πάλλουσες καρδιών σκύλων που είχαν υποστεί επαναιμάτωση μετά 2 ώρες ισχαιμία πάρα σε πάλλουσες καρδιές σκύλων που παρέμειναν ισχαιμικές. Ο ρυθμός συσσώρευσης των λευκοκυττάρων ήταν ταχύς και αιφνίδιος στις επαναιματούμενες καρδιές ενώ βραδύτερος και πιο σταθερός στις καρδιές που παρέμειναν ισχαιμικές²⁷⁶.

Οι Byrne et al. επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή των λευκών αιμοσφαιρίων στο σύνδρομο επαναιμάτωσης όταν σε πειράματα σε πρόβατα παρατήρησαν ότι επαναιμάτωση με αίμα χαμηλής συγκέντρωσης σε λευκοκύτταρα - “*leukocyte-depleted blood*” – ελαττώνει το φαινόμενο της «μη-επαναρροής»²⁷⁷.

Τα λευκοκύτταρα συμμετέχουν στο φαινόμενο της «μη-επαναρροής» με δύο πιθανούς μηχανισμούς: μηχανική απόφραξη των μικρο-αγγείων λόγω ενδοαυλικού εγκλωβισμού τους και απελευθέρωση Δ.Μ.Ο. στα πλαίσια του συνδρόμου επαναιμάτωσης που περαιτέρω αυξάνει την ενδοθηλιακή βλάβη προάγοντας αγγειοσπασμό και διαταραχή της αιματικής ροής²⁷⁸. Η αιφνίδια συσσώρευση λευκοκυττάρων στα μικρο-αγγεία της επαναιματούμενης περιοχής οφείλεται στην έκλυση και παρουσία χημειοτακτικών παραγόντων και προσκολλητικών μορίων. Τρεις σημαντικές ομάδες ουσιών είναι υπεύθυνες για την συγκέντρωση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των μικρο-αγγείων: α) οι σελεκτίνες (P-selectin, L-selectin, E-selectin), β) οι β2-ιντεγκρίνες (CD-11, CD-18) και γ) οι ομάδα των ενδοκυττάρων προσκολλητικών μορίων (*IntraCellular Adhesion Molecule 1 – ICAM 1, VCAM-1, PECAM-1*)^{250, 278}. Η συμμετοχή των παραγόντων αυτών αποδείχθηκε περαιτέρω από πειραματικές μελέτες στις οποίες η αναστολή των σελεκτινών, ICAM-1, CD-18 ή συνδυασμό αυτών, με τη χορήγηση εκλεκτικών αντισωμάτων (αντι-σελεκτινών ή αντί – ICAM-1, αντι-CD-18), είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της εμφραγματικής περιοχής καθώς και το περιορισμό της συγκέντρωσης λευκοκυττάρων στην επαναιματούμενη περιοχή²⁷⁹⁻²⁸⁵.

2. ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης θα μπορούσε να επιτευχθεί με δύο βασικούς τρόπους:

A. με την χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων με δράση προστατευτική στο επαναιματωθέν μυοκάρδιο μέσω του *περιορισμού παραγωγής Δ.Μ.Ο.* και

B. με τη χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων τέτοιων που επιτρέπουν την αναδόμηση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού μηχανισμού του μυοκαρδιακού κυττάρου και την προστασία από τις παραγόμενες Δ.Μ.Ο.

Η χορήγηση ουσιών που θα μπορούσαν να προστατέψουν το μυοκάρδιο κατά την φάση της επαναιμάτωσης αποτέλεσε πρωταρχικό στόχο της πειραματικής και κλινικής έρευνας γύρω από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Καθώς ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης είναι η δράση των Δ.Μ.Ο., εκτεταμένη έρευνα έγινε στη χορήγηση **αντιοξειδωτικών ουσιών** για τη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης, οι οποίες αποτελούν την πλειοψηφία των «εκκαθαριστών» Δ.Μ.Ο..

Πέραν αυτών, μεγάλος αριθμός διαφόρων ουσιών, που επιδρούν προστατευτικά σε διάφορα επίπεδα του παθοφυσιολογικού «καταρράκτη» του συνδρόμου επαναιμάτωσης έχουν επίσης δοκιμαστεί. Η προστατευτική δράση μπορεί να παρέχεται από ουσίες **μη-αντιοξειδωτικές**. Σκοπός των τελευταίων είναι να παρέμβουν και να αναστείλουν ή να τερματίσουν διαδικασίες κυτταρικής καταστροφής όταν αυτές ενεργοποιηθούν κατά την φάση επαναιμάτωσης.

Παρακάτω θα αναφερθούν οι οι μηχανισμοί δράσης και η κλινική σημασία των σημαντικότερων αντιοξειδωτικών και μη-αντιοξειδωτικών ουσιών, που έχουν μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία στην προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Αντιοξειδωτικές ουσίες – Εκκαθαριστές Δ.Μ.Ο.

Στην ομάδα των αντιοξειδωτικών ουσιών περιλαμβάνονται όλες οι φαρμακευτικές και μη ουσίες που αναστέλλουν την παραγωγή Δ.Μ.Ο., αδρανοποιούν τις υπάρχουσες Δ.Μ.Ο. (*Εκκαθαριστές Δ.Μ.Ο – Reactive Oxygen Species Scavengers*) ή τέλος μετριάζουν τη δράση τους στο μυοκαρδιακό κύτταρο. Πλήθος αντιοξειδωτικών παραγόντων έχουν δοκιμασθεί τόσο σε πειραματικές όσο και σε κλινικές. Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν τα αποτελέσματα των πιο σημαντικών από αυτές τις μελέτες

με ιδιαίτερη έμφαση στη παρουσίαση των αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιήθηκαν στη εκπόνηση της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Καταλάση (CAT) και Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Super Oxide Dismutase - SOD) είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα με κύριο σκοπό να προφυλάσσει τα αερόβια κύτταρα από το οξειδωτικό stress με την αδρανοποίηση ριζών υπεροξειδίου και την μετατροπή τους σε H_2O_2 με την αντίδραση δισμουτάσης. Η καταλάση (CAT) αποτελεί ισχυρή ενδογενή αντιοξειδωτική ουσία που καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 .

Η πρώτη πειραματική μελέτη στην οποία διερευνήθηκε η δράση της χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών δημοσιεύθηκε από τους Jolly S et al. το 1984. Σε πειραματικό μοντέλο 90 min ισχαιμίας στη κατανομή της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας σε σκύλους, οι Jolly S et al. απόδειξαν ότι η συνδυασμένη χορήγηση CAT και SOD μείωσε την εμφραγματική περιοχή 24 h μετά την επαναιμάτωση. Η ευεργετική αυτή δράση παρατηρήθηκε μόνο στα πειραματόζωα τα όποια ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών ουσιών χορηγήθηκε πριν την έναρξη της ισχαιμίας ή 15 min πριν την επαναιμάτωση. Μείωση της τελικής εμφραγματικής περιοχής δεν παρατηρήθηκε όταν τα αντιοξειδωτικά χορηγήθηκαν 40 min μετά επαναιμάτωση²⁸⁶. Αποδεικνύεται ότι η βλάβη επαναιμάτωσης από τις Δ.Μ.Ο. συμβαίνει στα πρώτα λεπτά μετά επαναιμάτωση και ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών φαρμάκων θα πρέπει να γίνεται προληπτικά τουλάχιστον λίγα λεπτά πριν την άρση της ισχαιμίας. Στην παρούσα μελέτη ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών χορηγήθηκε ορθόδρομα μετά από έγχυση στο αριστερό κόλπο. Οι Hatori N et al. παρατήρησαν ότι η χορήγηση SOD με τον ίδιο τρόπο δεν πέτυχε ελάττωση της εμφραγματικής περιοχής σε πειραματικό μοντέλο γουρουνιών²⁸⁷. Αντίθετα, έδειξαν ότι η χορήγηση της ίδιας ποσότητας SOD ανάδρομα από τον στεφανιαίο κόλπο και τις καρδιακές φλέβες προς την επαναιματούμενη περιοχή, μείωσε σημαντικά την εμφραγματική περιοχή. Η παντελής έλλειψη παράπλευρων στεφανιαίων αγγείων στο γουρούνι σε αντίθεση με το σκύλο ο οποίος διαθέτει ευρύ δίκτυο παράπλευρων, πιθανώς να αποτελεί το αίτιο για την αντιφατικότητα των αποτελεσμάτων.

Μετά την ανακοίνωση των πρώτων θετικών αποτελεσμάτων σχετικά με την ευεργετική δράση των αντιοξειδωτικών στο φαινόμενο της επαναιμάτωσης πλήθος άλλων ερευνητών μελέτησε τη δράση της εξωγενούς χορήγησης SOD σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών πειραματικών μοντέλων. Τα αποτελέσματα των μελετών στο σύνολο τους είναι αντίθετα: μεγάλος αριθμός πειραμάτων αποδεικνύει την ευεργετική δράση

της SOD στο επαναιματούμενο μυοκάρδιο ενώ ίδιος αριθμός πειραμάτων αποδεικνύει την αποτυχία της SOD να προστατέψει επαρκώς το μυοκάρδιο^{181,286,288-293}. Η διαφορετική οδός χορήγησης, η διαφορετική δόση SOD και οι διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες αυτές τις μελέτες αποτελούν προφανείς λόγους αυτής της αντίφασης στα αποτελέσματα. Νεώτερες μελέτες επισημαίνουν τη σημασία των διαφορετικών ισομορφών της SOD οι οποίες αποδεικνύεται ότι έχουν διαφορετική δράση στη προστασία από το σύνδρομο της επαναιμάτωσης. Υπάρχουν 3 διαφορετικές ισομορφές SOD: η αποκαλούμενη «εξωκυττάρια» ισομορφή της SOD που συναντάται κυρίως στο εξωκυττάριο χώρο, η Cu/ZnSOD που συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και η MnSOD που συναντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα μιτοχόνδρια. Πειραματικές μελέτες σε γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια που χαρακτηρίζονται από έλλειψη ή υπερέκφραση (*overexpression*) διαφόρων κάθε φορά ισομορφών SOD έδειξαν ότι η περισσότερο η MnSOD και λιγότερο η Cu/ZnSOD προσφέρουν προστασία στο σύνδρομο επαναιμάτωσης σε σχέση με την εξωκυττάρια ισομορφή της SOD²⁹⁴⁻²⁹⁷. Δεδομένου του γεγονότος ότι η MnSOD ισομορφή ανευρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια οι αναφερόμενες πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν την εξαιρετικής σημασίας συμβολή των μιτοχονδρίων στη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης²⁹⁶. Επίσης, πειραματικές μελέτες σε κουνέλια, έδειξαν ότι η υπερέκφραση εξωγενούς SOD, μέσω της χορήγησης γενετικώς τροποποιημένου κυτταρομεγαλοϊού φέρων το γενετικά κλωνοποιημένο ανθρώπινο γονίδιο κωδικοποίησης της ανθρώπινης εξωγενούς SOD, είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του μυοκαρδιακού stunning και της εμφραγματικής περιοχής που παρατηρήθηκε μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους ισχαιμίας – επαναιμάτωσης^{298,299}.

Προκειμένου να βελτιωθεί ο σχετικά βραχύς χρόνος ημίσειας ζωής της εξωγενούς χορηγούμενης SOD, δοκιμάστηκε η συνδεδεμένη με πολυαιθυλική γλυκόλη (*polyethylene Glycol – PEG*) μορφή της (SOD-PEG) με αντικρουόμενα αποτελέσματα^{300,301}. Επειδή η SOD-PEG είναι μία ουσία μεγάλου μοριακού βάρους που είναι αδύνατο να εισέλθει εντός των μυοκαρδιακών κυττάρων όπου θα μπορούσε να εκκαθαρίσει Δ.Μ.Ο., ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στην εξέλιξη ισομορφών SOD χαμηλού μοριακού βάρους (*Low-molecular-weight SOD*) με θετικά αποτελέσματα σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης³⁰².

Η προστασία του μυοκαρδίου αποκλειστικά από την CAT αποτελεί θέμα διχογνωμίας στη διεθνή βιβλιογραφία. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση αναστολέων της CAT, όπως το 3-amino-triazole (3-AT), είχε αντικρουόμενα αποτελέσματα στη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης θέτοντας σε

αμφισβήτηση το πραγματικό μέγεθος της συμμετοχής της CAT ως ενδογενή προστατευτικό μηχανισμό στο φαινόμενο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης³⁰³. Αυτός είναι ο λόγος για το οποίο η δοκιμή της CAT σε πειραματικές και κλινικές μελέτες επαναιμάτωσης περιορίστηκε κυρίως στη συνδυαστική χορήγηση με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες και κυρίως την SOD^{286,304}.

Παρόλα τα ενθαρρυντικά πειραματικά αποτελέσματα, η χρήση της SOD σε κλινικές μελέτες, με ή χωρίς την CAT, είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Οι Kodama K. et al. απέδειξαν ότι η παρουσία της SOD είχε σαν αποτέλεσμα το περιορισμό της νεκρωτικής περιοχής μετά την επαναιμάτωση μόνο στους ασθενείς με OEM και επιτυχημένη θρομβόλυση και όχι σε αυτούς με αποτυχημένη θρομβόλυση. Θεωρήθηκε ότι η SOD αναστέλλει την καταστρεπτική δράση των Δ.Μ.Ο. μετά την επαναιμάτωση στους επιτυχώς θρομβολυμένους ασθενείς⁷⁷. Η δε ενεργότητα της SOD στο πλάσμα ασθενών που υποβλήθηκαν σε επιτυχή πρωτογενή αγγειοπλαστική σχετίζεται θετικά με το βαθμό βελτίωσης της λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας μετά επαναιμάτωση³⁰⁵. Όμως, σε μία πολυκεντρική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, στη οποία συμμετείχαν 110 ασθενείς με OEM, η ενδοφλέβια χορήγηση της SOD πριν και μετά τη πρωτογενή αγγειοπλαστική απέτυχε να αποδείξει θετικά αποτελέσματα στη λειτουργικότητα της αριστεράς κοιλίας μετά την επαναιμάτωση³⁰⁶.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GP)

Αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς καταλύει την αντίδραση εξουδετέρωσης υπεροξειδίων των λιπιδίων. Η πραγματική συμμετοχή στην προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης έχει δειχθεί σε πειραματικές μελέτες στις οποίες γενετικώς τροποποιημένα (*transgenic*) ποντίκια με υπερέκφραση σε GP παρουσίασαν καλύτερη ανάκαμψη μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση σε σχέση με ποντίκια που ήταν γενετικώς τροποποιημένα στην έλλειψη του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase - GP)^{307,308}. Η επαρκής δράση της GP εξαρτάται από τη παρουσία του ιχνοστοιχείου σεληνίου (Se) το οποίο εμπεριέχεται σε κάθε μία από τις 4 υπομονάδες του μορίου της GP. Η έλλειψη Se ελαττώνει τη ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου που απαιτείται για να προκαλέσει διαστολική δυσλειτουργία σε καρδιές ποντικών προφανώς λόγω ελάττωσης της αντιοξειδωτικής δράσης της GP³⁰⁹.

Εκτός από την εξωγενή χορήγηση αντιοξειδωτικών, ένας άλλος πιθανός τρόπος προστασίας από το οξειδωτικό stress μετά επαναιμάτωση θα ήταν η ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών όπως αυτόν της GP. Η εξωγενής χορήγηση Se δοκιμάστηκε με θετικά αποτελέσματα στην απόδοση της αριστεράς κοιλίας και στη

πρόληψη αρρυθμιών μετά επαναιμάτωση σε καρδίες ποντικών κυρίως που επιτεύχθηκε μέσω της αύξησης της ενεργότητας της GP³¹⁰⁻³¹².

Κλινικές μελέτες σχετικά με τη δράση της PG σε ασθενείς που υποβάλλονται σε επείγουσα επαναιμάτωση μετά από OEM δεν υπάρχουν.

N-2-μερκαπτο-προπιονυλ-γλυκίνη (N-2-mercaptopyrionyl-glycine - MPG)

Η N-2-μερκαπτο-προπιονυλ-γλυκίνη (N-2-mercaptopyrionyl-glycine - MPG) είναι ένα παράγωγο αμινοξέος που περιέχει σουλφιδρικές ρίζες και έχει εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας για να ελαττώσει την ιστική βλάβη που προκαλείται μετά από ακτινοβολία³¹³. Ο πιθανός μηχανισμός δράσης είναι η άμεση «εκκαθάριση» Δ.Μ.Ο. και η συμμετοχή στη αναγέννηση της γλουταθειόνης. Η χορήγησή της σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία – επαναιμάτωση ελάττωσε σημαντικά την έκταση της νεκρωτικής μετεμφραγματικής περιοχής τόσο στη πρώιμη (εντός λεπτών) όσο και στην αργότερη φάση επαναιμάτωσης (48 h)^{314,315}. Πειραματικές μελέτες σε απομονωμένες καρδίες ποντικών, έδειξαν ότι εκτός από την άμεση «εκκαθαριστική» δράση κατά Δ.Μ.Ο, η προστατευτική επίδραση της MPG στο επαναιματωθέν μυοκάρδιο οφείλεται και σε 2 άλλους εξίσου σημαντικούς μηχανισμούς: στην ικανότητα της MPG να αναστέλλει το φαύλο κύκλο υπερφόρτωσης Na⁺ του κυττάρου και στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των μιτοχονδρίων³¹⁶. Κλινικές μελέτες με τη χρήση MPG ως προστατευτικός παράγοντας στο σύνδρομο επαναιμάτωσης δεν έχουν δημοσιευθεί.

Βιταμίνη E (Vitamin E)

Η βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που βρίσκεται κυρίως στο πλάσμα, στις χαμηλής – πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (Low-Density Lipoproteins - LDL) και στη κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων όλων των ιστών. Προσφέρει in situ προστασία από τις Δ.Μ.Ο κυρίως στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης. Σε πειραματικές μελέτες, χορήγηση υψηλών δόσεων συμπληρώματος βιταμίνης E ή ανάλογων αυτής, προστατεύει από το σύνδρομο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης³¹⁷⁻³¹⁹. Η χρόνια ή οξεία – λίγο πριν την επαναιμάτωση - χορήγηση του υδροδιαλυτού ανάλογου της βιταμίνης E, α-τοκοφερόλη (*alpha-tocopherol*) έδειξε επίσης καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χορήγηση λιποδιαλυτής βιταμίνης E³²⁰. Σε άλλες μελέτες όμως, η δράση της α-τοκοφερόλης φαίνεται να μην περιορίζει ούτε τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης ούτε το τελικό μέγεθος του εμφράγματος^{321,322}.

Οι κλινικές μελέτες περιορίζονται στη χρήση της α-τοκοφερόλης μόνο κατά τη διάρκεια καρδιακού χειρουργείου με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ταχεία ενδοστεφανιαία χορήγηση α-τοκοφερόλης λίγο πριν τη επαναιμάτωση σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη μείωσε την απελευθέρωση μυοκαρδιακών ενζύμων και το οξειδωτικό stress 8 h μετά το χειρουργείο³²³. Αντίθετα, σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη, η από του στόματος συνεχής χορήγηση α-τοκοφερόλης 7 ημέρες πριν το χειρουργείο σε συνδυασμό με βιταμίνη C – για 12 ώρες πριν το χειρουργείο – δεν την έκταση της μυοκαρδιακής νέκρωσης μετά από επαναιμάτωση όπως αυτή προσδιορίστηκε με σπινθηρογραφικό έλεγχο (²⁰¹Th)³²⁴. Τα αποτελέσματα χορήγησης βιταμίνης E ή υδροδιαλυτών ανάλογων αυτής δεν έχουν ακόμη δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες οξείας ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.

Αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης

Ο κυριότερος εκπρόσωπος αυτής της ομάδας αντιοξειδωτικών είναι η αλλοπουρινόλη. Αποτελεί ισχυρό ανταγωνιστή του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης το οποίο στη φάση της επαναιμάτωσης προάγει τη παραγωγή Δ.Μ.Ο. – κυρίως ·OH – χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα προϊόντα καταβολισμού των πουρίνων (ATP και ADP) όπως είναι η υποξανθίνη. Μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων αποδεικνύει τη προστατευτική δράση της αλλοπουρινόλης από το σύνδρομο επαναιμάτωσης μέσω της ελάττωσης του οξειδωτικού stress επιτυγχάνοντας τόσο μείωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης όσο και βελτίωση της λειτουργικότητας του ενδοθηλίου³²⁵⁻³²⁷. Εκτός από την έμμεση αντιοξειδωτική δράση της, μέσω της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης, η αλλοπουρινόλη έχει και άμεση αντιοξειδωτική δράση. Πειραματικές μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε το ανάλογο οξυπουρινόλη, το οποίο έχει μικρή ως ελάχιστη ανταγωνιστική δράση έναντι του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης, έδειξαν ότι και η οξυπουρινόλη προστατεύει από το σύνδρομο επαναιμάτωσης³²⁸⁻³³⁰. Σε σχέση με την αλλοπουρινόλη μεμονωμένες μελέτες έδειξαν ότι η οξυπουρινόλη επιτυγχάνει μεγαλύτερη ελάττωση της νεκρωτικής περιοχής μετά από επαναιμάτωση χωρίς όμως να σημαντική διαφορά στις αρρυθμίες επαναιμάτωσης³²⁹.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των πειραματικών μελετών σε συνδυασμό με την εκτεταμένη χρήση του φαρμάκου της αλλοπουρινόλης στην ευρύτερη κλινική πράξη, ώθησε τους ερευνητές να εξετάσουν τη προστατευτική της δράση σε κλινικές μελέτες ισχαιμίας –επαναιμάτωσης. Στην αρχή, η χορήγηση της μελετήθηκε σε

επιλεκτικές επεμβάσεις επαναιμάτωσης αορτοστεφανιαίας παράκαμψης όπου παρατηρήθηκε ελάττωση παραγωγής δεικτών οξειδωτικού stress (π.χ. TBARS) μαζί με βελτίωση κλινικών παραμέτρων - όπως δείκτες καρδιακής απόδοσης και ανάγκη για ινóτροπη θεραπεία - σε ασθενείς που έλαβαν αλλοπουρινόλη προεγχειρητικά^{331,332}. Η προστατευτική δράση της αλλοπουρινόλης αποδείχτηκε πρόσφατα και σε ασθενείς με OEM που υποβάλλονται σε επείγουσα πρωτογενή αγγειοπλαστική. Σε ασθενείς που έλαβαν αλλοπουρινόλη από το στόμα 60 min πριν τη επαναιμάτωση παρατηρήθηκε ελάττωση της απελευθέρωσης F2-ισοπροστανών και βελτίωση της καρδιακής απόδοσης τόσο πρώιμα όσο και όψιμα (6 μήνες) μετά την επέμβαση³³³.

Αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης

Η καπτοπρίλη, ένας από τους πιο γνωστούς και πιο ευρέως κλινικά μελετημένους αναστολείς Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγειοτενσίνης (αΜΕΑ) αποτελεί ισχυρό εκκαθαριστή Δ.Μ.Ο. πιθανώς λόγω της παρουσίας σημαντικού αριθμού σουλφιδριλικών ομάδων στο μόριο της³³⁴. Η αντιοξειδωτική δράση της καπτοπρίλης αποδείχθηκε σε πειράματα κυρίως σε σκύλους όπου η χορήγηση καπτοπρίλης πριν την επαναιμάτωση περιόρισε σημαντικά την έκταση του εμφράγματος και τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης³³⁵. Σε μελέτες σύγκρισης με άλλους αΜΕΑ η καπτοπρίλη παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ενώ η δράση της ενισχύεται όταν χορηγηθεί πριν την έναρξη της ισχαιμίας παρά λίγο πριν την επαναιμάτωση^{336,337}.

Η προστατευτική δράση των αΜΕΑ δεν περιορίζεται μόνο στη παρουσία σουλφιδριλικών ομάδων και στην αμιγώς «εκκαθαριστική» τους δράση. Και άλλοι αΜΕΑ που δεν έχουν σουλφιδριλικές ομάδες στο μόριο τους, και ως εκ τούτου δεν παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προστατεύουν από το σύνδρομο επαναιμάτωσης μέσω μηχανισμών αναστολής της αγγειοτενσίνης II (AT II) ή της αύξησης της κυκλοφορούσας βραδυκινίνης. Η χορήγηση κουανιπρίλης – ενός αΜΕΑ χωρίς σουλφιδριλικές ομάδες στο μόριο του – σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε χοίρο μείωσε σημαντικά τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης και την τελική νεκρωτική περιοχή³³⁸. Η άμεση αναστολή των υποδοχέων της AT II με τη χορήγηση candesartan, έδειξε σημαντική ελάττωση τόσο στη τελική νεκρωτική ζώνη όσο και στις αρρυθμίες επαναιμάτωσης σε πειραματικά μοντέλα χοίρου και ποντικού^{339,340}. Η ευεργετική δράση των AT II αναστολέων παρατηρήθηκε τόσο κατά τη χορήγηση candesartan πριν τη έναρξη ισχαιμίας όσο και κατά την χορήγηση λίγο πριν την επαναιμάτωση. Σε πειράματα σε σκύλους οι Preckel et al. απέτυχαν να αποδείξουν προστατευτική δράση του άμεσου αναστολέα της AT II, ιβερσαρτάνης³⁴¹.

Μετά ισχαιμία διάρκειας 1 h και επαναιμάτωση 3 h στη περιοχή αιματικής κατανομής του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, η χορήγηση ιβερσαρτάνης πριν την έναρξη της ισχαιμίας δεν ελάττωσε την τελική νεκρωτική περιοχή παρόλο που αύξησε την αιματική ροή μέσω παράπλευρων αγγείων στην ισχαιμική περιοχή. Πιθανώς, η χρήση του σκύλου ως πειραματόζωο και η διπλή εφ' άπαξ χορήγηση της ιβερσαρτάνης πριν την ισχαιμία να αποτελούν τα αίτια των αντικρουόμενων αυτών αποτελεσμάτων.

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός δράσης των αναστολέων των υποδοχέων AT II επιτυγχάνεται μέσω των αυξημένων επιπέδων της βραδυκινίνης. Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων AT II: οι AT₁ και οι AT₂. Η αγγειοσυσπαστική δράση της AT II επιτυγχάνεται κατά το μεγαλύτερο βαθμό μέσω των υποδοχέων AT₁ για αυτό και οι γνωστοί αναστολείς των υποδοχέων AT II αποκλείουν κυρίως μόνο τους υποδοχείς AT₁. Ο αποκλεισμός των υποδοχέων AT₁ προκαλεί αύξηση στη κυκλοφορούσα AT II επειδή καταργείται η αρνητική ανάδραση (*negative feedback*) στο σύστημα ομοιόστασης της AT II. Η αυξημένη τιμή της κυκλοφορούσας AT II, μέσω των ελεύθερων υποδοχέων AT₂, ενεργοποιεί τα κύτταρα του ενδοθηλίου ώστε να παράγουν αυξημένες ποσότητες βραδυκινίνης. Τα αυξημένα επίπεδα της τελευταίας πιθανόν να σχετίζονται με προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Πειράματα σε χοίρους έδειξαν ότι αναστολείς της βραδυκινίνης ή εκλεκτικοί αναστολείς των υποδοχέων όταν χορηγούνται μαζί με candesartan μετριάζουν το προστατευτικό αποτέλεσμα των αναστολέων AT II³⁴².

Με τις μελέτες αυτές αποδεικνύεται ότι η έμμεση (με την αναστολή του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης) ή άμεση (με την αναστολή των υποδοχέων της AT II) κατάργηση της δράσης της AT II αποτελεί σημαντικό προστατευτικό παράγοντα στο σύνδρομο επαναιμάτωσης. Ο ακριβής μηχανισμός προστασίας, αν και δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, περιλαμβάνει την αμιγώς αντιοξειδωτική δράση των αΜΕΑ αλλά και τη μεταβολή στην ομοιόσταση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Ειδικότερα, η τελευταία προκαλεί κατάργηση της αγγειοσυσπαστικής δράσης της αγγειοτενσίνης και αύξηση των επιπέδων βραδυκινίνης.

Σουλφιδριλικές θειολικές ενώσεις

Είναι γνωστό ότι η ισχαιμία προκαλεί σημαντική ελάττωση των κυτταρικών αποθεμάτων πρωτεϊνών πλούσιων σε θείο που αποτελούν ένα από τους πιο σημαντικούς ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστατεύοντας τη δομή και ελέγχοντας τη λειτουργία των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, των ενδοκυττάρων ενζύμων και των μεταγραφικών παραγόντων³⁴³. Οι περισσότερες από

αυτές τις πρωτεΐνες περιέχουν θείο με τη μορφή σουλφιδριλικών ομάδων (-SH) στο μόριο τους. Έλλειψη ικανής ποσότητας των πρωτεϊνών αυτών κατά τη φάση της επαναιμάτωσης θέτει το μυοκαρδιακό κύτταρο ευάλωτο στο οξειδωτικό stress μετά την επαναχορήγηση οξυγόνου. Ουσίες οι οποίες είναι πλούσιες σε -SH αποτελούν σημαντική πηγή θείου στη φάση της επαναιμάτωσης και δυνητικά θα μπορούσαν να μετριάσουν τις επιβλαβείς επιπτώσεις από το σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Η N-acetyl-cysteine (NAC) είναι μία ουσία πλούσια σε -SH που κλινικά χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της δηλητηρίασης από παρακεταμόλη (ακεταμινοφαίνη - acetaminophen). Υψηλή δόση παρακεταμόλης, μέσω του μεταβολίτη της N-acetyl-p-benzoquinole imine (NAPQI), προκαλεί σημαντική κατανάλωση των ενδοκυττάρων αποθεμάτων γλουταθειόνης (glutathione - GSH) κυρίως στο ήπαρ. Το κύτταρο τίθεται εξαιρετικά ευάλωτο ακόμα και στη μικρή, φυσιολογική δράση ελευθέρων ριζών οξυγόνου που υπό φυσιολογικές συνθήκες, θα αναχαιτίζονταν εύκολα από τη GSH. Η χορήγηση της NAC σε ασθενείς με δηλητηρίαση από παρακεταμόλη στοχεύει πρωτίστως στη αναπλήρωση των αποθεμάτων GSH και δευτερευόντος στη άμεση «εκκαθάριση» Δ.Μ.Ο. μετριάζοντας κατά το δυνατό τη καταστρεπτική επίδραση της παρακεταμόλης στο ηπατικό κύτταρο³⁴⁴.

Η χορήγησή της για την προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης βασίζεται κυρίως στη ικανότητα της να αναπληρώνει τα αποθέματα GSH. Οι Forman M et al. παρατήρησαν ελάττωση της «αποπληξίας» του μυοκαρδίου όταν χορήγησαν NAC επί 3 1/2 h αρχίζοντας 30 min πριν την επαναιμάτωση σε πειραματικό μοντέλο 90 min ισχαιμίας και 24 h επαναιμάτωσης³⁴⁵. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα και από τους Tang L et al. οι οποίοι παρατήρησαν μετρίαση της «αποπληξίας» του μυοκαρδίου και ελάττωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης σε απομονωμένες καρδίες που έλαβαν NAC πριν την έναρξη της ισχαιμίας³⁴⁶. Η έκταση του εμφράγματος δεν εξετάστηκε από τους ερευνητές. Στη πειραματική μελέτη των Forman M et al. η τελική νεκρωτική ζώνη δεν διέφερε μεταξύ των πειραματόζων που έλαβαν NAC και αυτών που έλαβαν placebo. Αντίθετα, οι Sochman J et al. παρατήρησαν σημαντική ελάττωση της τελικής νεκρωτικής περιοχής, καθώς και σημαντική ελάττωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης, σε πειράματα σε σκύλους που έλαβαν NAC³⁴⁷. Οι Calvillo L et al. απέτυχαν να αποδείξουν ελάττωση της νεκρωτικής περιοχής στα πειραματόζωα που έλαβαν NAC σε σχέση με αυτά που δεν έλαβαν (placebo). ελάττωση της τελικής νεκρωτικής περιοχής παρατηρήθηκε μόνο στα πειραματόζωα που έλαβαν συνδυασμό NAC και 5-μονονιτρικό-ισοσορβίτη (*Isosorbite 5-Mononitrate*)³⁴⁸. Πιθανή εξήγηση για αυτό πιθανώς να αποτελεί η παρατήρηση ότι η

χορήγηση NAC αυξάνει τη ενεργότητα των νιτροδών τα οποία έχουν προστατευτική για το μυοκαρδιακό κύτταρο δράση κατά τη φάση της ισχαιμίας³⁴⁹.

Παρόλο που τα δεδομένα από τις πειραματικές μελέτες ήταν αντικρουόμενα, οι Sochman J et al. δημοσίευσαν τη πρώτη κλινική παρατήρηση σχετικά με τη δράση της NAC σε ασθενή με OEM που υποβλήθηκε σε θεραπεία επαναιμάτωσης³⁵⁰. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε τη αφορμή για τη έναρξη πιλοτικών τυχαιοποιημένων μελετών χορήγησης NAC σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε θεραπεία επαναιμάτωσης είτε με θρομβόλυση ή με πρωτογενή αγγειοπλαστική. Πρώτοι οι Arstall M et al απέδειξαν ότι η χορήγηση NAC σε ασθενείς με OEM που υποβλήθηκαν σε θρομβόλυση με στρεπτοκινάση είναι ασφαλής και επιτυγχάνει καλύτερη διαφύλαξη της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας που συνοδεύεται από ελάττωση του οξειδωτικού stress³⁵¹. Τα ίδια αποτελέσματα είχαν και οι Sochman J et al. στη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη ISLAND (*Infarct Size Limitation: Acute N-acetylcysteine Defense*) στην οποία, εκτός από ασθενείς με θρομβόλυση, συμπεριλήφθηκαν και ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική³⁵². Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της χορήγησης NAC για τη προστασία του μυοκαρδίου από το σύνδρομο επαναιμάτωσης τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο, η περαιτέρω κλινική έρευνα σχετικά με τη χορήγηση της σε μεγαλύτερο και πιο ομοιογενές πληθυσμό ασθενών με OEM δεν έχει ακόμα επιτευχθεί για άγνωστους λόγους.

Άλλες ενώσεις πλούσιες σε σουλφιδριλικές ομάδες που έχουν δοκιμαστεί ως φάρμακα για τη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης με θετικά αποτελέσματα είναι η L-Cysteine, και η dimethylthiourea ^{353, 354}.

Ανταγωνιστές διαύλων Ca⁺⁺

Όπως αναφέρθηκε λεπτομερώς, η διαταραχή της ομοιόστασης του Ca⁺⁺ μετά τη επαναιμάτωση οδηγεί σε υπερφόρτωση του μυοκαρδιακού κυττάρου σε Ca⁺⁺ τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και εντός των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα παραγωγής ATP με αποτέλεσμα τη σημαντική έκπτωση της συσταλτικής ικανότητας του μυοκαρδιακού κυττάρου. Εκτός αυτού, Ca⁺⁺ - εξαρτώμενες πρωτεάσες ενεργοποιούνται παρουσία της υψηλής συγκέντρωσης ενδοκυττάρου Ca⁺⁺ και καταστρέφουν σημαντικές για τη λειτουργία του μυοκαρδιακού κυττάρου πρωτεΐνες. Ο αποκλεισμός των διαύλων Ca⁺⁺ κατά τη φάση της επαναιμάτωσης ή ακόμα νωρίτερα στη φάση της ισχαιμίας θα μπορούσε να μετριάσει τη υπερφόρτωση Ca⁺⁺ και τις αρνητικές επιδράσεις αυτής.

Πρώτοι οι Gross G et al. παρατήρησαν ότι η χορήγηση ανταγωνιστή των διαύλων Ca^{++} , της διϋδροπυριδίνης αμλοδιπίνη, λίγο πριν τη έναρξη της ισχαιμίας είχε ως αποτέλεσμα τη μετά επαναιμάτωση διατήρηση της συστολικής απόδοσης της αριστεράς κοιλίας και τη διατήρηση της ενεργειακής απόδοσης του μυοκαρδίου όπως αυτή εκτιμήθηκε με το ποσοστό απώλειας νουκλεοτιδίων της αδενοσίνης (ADP). Τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια τόσο σε απλά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε σκύλους όσο και σε μοντέλα πολλαπλά «απόπληκτου» μυοκαρδίου που επιτεύχθηκαν με επαναλαμβανόμενες σύντομης διάρκειας περιόδους ισχαιμίας και επαναιμάτωσης (15 min)^{355, 356}. Η προσθήκη διλτιαζέμης στο διάλυμα καρδιοπληγίας βελτίωσε τη περιοχική και συνολική συστολική απόδοση της αριστεράς κοιλίας σε πειράματα σε καρδίες χοίρων και νεογέννητων κουνελιών^{357, 358}.

Οι Tadokoro H et al. μελέτησαν τη επίδραση της οδού χορήγησης της διλτιαζέμης σε πειραματικό μοντέλο χοίρων «ανοιχτής θωρακοτομής» (*open-chest model*) που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία 60 min μετά απολίνωση του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και επαναιμάτωσης 3 h³⁵⁹. Η διλτιαζέμη χορηγήθηκε 10 min πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης είτε μέσω των στεφανιαίων φλεβών (ανάδρομη χορήγηση – retrograde infusion) είτε μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας (Δεξιό στεφανιαίο κόλπο – systematic infusion). Τα αποτελέσματα των δύο αυτών ομάδων συγκρίθηκαν με ομάδα placebo. Ευεργετικά αποτελέσματα για το επαναιματωθέν μυοκάρδιο είχε μόνο η ανάδρομη χορήγηση διλτιαζέμης. Προστατευτική δράση από τη βλάβη επαναιμάτωσης μετά ανάδρομη έγχυση αποδείχθηκε και για άλλους ανταγωνιστές Ca^{++} μεταξύ των οποίων και η φελοδιπίνη³⁶⁰. Επίσης προστατευτική δράση αποδείχθηκε και για τη διλτιαζέμη όταν αυτή χορηγήθηκε ενδοστεφανιαία σε χοίρους «ανοιχτής θωρακοτομής» μειώνοντας σημαντικά της τελική νεκρωτική περιοχή σε σχέση με τα πειραματόζωα που έλαβαν placebo^{361, 362}.

Εκτός από τη σημασία της οδού και του τρόπου χορήγησης των αναστολέων Ca^{++} εξετάστηκε και η σημασία του χρόνου έναρξης της χορήγησης σε σχέση με τη έναρξη της επαναιμάτωσης. Από το 1985 οι Lo et al. παρατήρησαν ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση βεραπαμίλης απέτυχε να προστατέψει το επαναιματωθέν μυοκάρδιο όταν χορηγήθηκε κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης μόνο³⁶³. Αργότερα, οι Herzog et al. αναφέρουν ότι η διλτιαζέμη ελάττωσε τη τελική νεκρωτική ζώνη όταν χορηγήθηκε ενδοστεφανιαία σε χοίρους αμέσως μετά την άρση της ισχαιμίας και για διάρκεια 12 min³⁶¹. Τέλος, οι Klein H et al. έδειξαν ότι η χορήγηση διλτιαζέμης πριν από την έναρξη της ισχαιμίας ελάττωσε τη τελική έκταση νεκρωμένου μυοκαρδίου σε χοίρους που υποβλήθηκαν σε 75 min ισχαιμίας ακολουθούμενη από 4 h επαναιμάτωση. Αντίθετα, η

ενδοφλέβια χορήγηση της 30 min προ της επαναιμάτωσης είχε ως αποτέλεσμα μη στατιστικώς σημαντική ελάττωση της τελικής νεκρωτικής ζώνης³⁶⁴. Η σημασία του χρόνου χορήγησης των ανταγωνιστών Ca^{++} έστω λίγο πριν τη επαναιμάτωση αντί μετά, αποδεικνύεται από τη μελέτη των Smart S et al. οι οποίοι παρατήρησαν ότι η χορήγηση νιφεδιπίνης ελάττωσε το μυοκαρδιακό stunning και τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης μόνο όταν χορηγήθηκε λίγο πριν έναρξη της επαναιμάτωσης και όχι όταν χορηγήθηκε μετά από την επαναιμάτωση μέχρι και το τέλος της περιόδου επαναιμάτωσης³⁶⁵.

Φαίνεται ότι τόσο ο τρόπος και η οδός χορήγησης των ανταγωνιστών Ca^{++} όσο και χρόνος έναρξης της χορήγησης τους, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα τους ως προστατευτικοί παράγοντες από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Η αποτελεσματικότητά τους ενισχύεται όταν οι ανταγωνιστές Ca^{++} χορηγούνται πριν από τη έναρξη της ισχαιμίας.

Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid - Vitamin C)

Το ασκορβικό οξύ είναι ευρέως γνωστό αντιοξειδωτικό και θεωρείται σαν ένα από τα πλέον ισχυρά υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά που ανευρίσκονται στο ενδοκυττάριο και στο εξωκυττάριο χώρο³⁶⁶. Η αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να είναι είτε άμεση, εξουδετερώνοντας άμεσα Δ.Μ.Ο. (κυρίως O_2^- , και $\cdot OH$), είτε έμμεσα αναπληρώνοντας τα αποθέματα ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών όπως η α-τοκοφερόλη και η GSH³⁶⁷. Η σημαντική αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος αποδείχθηκε για πρώτη φορά σε γενετικώς τροποποιημένα πειραματόζωα με συγγενή έλλειψη ασκορβικού οξέος. Στα πειραματόζωα αυτά παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπως αυτή μετρήθηκε με το προσδιορισμό πεντανίου και εθανίου στον εκπνεόμενο αέρα των πειραματόζωων. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων ελαττώθηκε σημαντικά όταν τα πειραματόζωα με τη συγγενή έλλειψη ασκορβικού οξέος έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με ασκορβικό οξύ (75mg/ 100g ΒΣ)³⁶⁸. Επιπρόσθετα, οι Tavazzi B et al. έδειξαν ότι σε απομονωμένες καρδιές ποντικών που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία 30 min, η επαναιμάτωση προκαλεί σημαντική παραγωγή Δ.Μ.Ο. (όπως αυτή προσδιορίστηκε με αύξηση των τιμών της MDA με τη μέθοδο της HPLC)⁴⁰. Σημειώνεται ότι η παραγωγή της MDA στις καρδιές ποντικών που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και ακολούθως σε επαναιμάτωση, ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σχέση τόσο με τις καρδιές ποντικών που υποβλήθηκαν μόνο σε ισχαιμία χωρίς επαναιμάτωση όσο και με τις καρδιές «ελέγχου», οι οποίες δεν υποβλήθηκαν καν σε ισχαιμία και στις οποίες οι τιμές MDA δεν ήταν ανιχνεύσιμες. Το σημαντικό στη μελέτη αυτή ήταν ότι όταν χορηγήθηκε ασκορβικό οξύ σε κάθε μία από τις ομάδες που αναφέρθηκαν (φυσιολογικές καρδιές, καρδιές που υποβλήθηκαν μόνο σε ισχαιμία και καρδιές που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση) οι

μετρούμενες τιμές ασκορβικού οξέος στο τέλος του πειράματος ήταν σημαντικά ελαττωμένες μόνο στην ομάδα επαναιμάτωσης προφανώς λόγω της αλληλεπίδρασης του ασκορβικού οξέος με τις παραγόμενες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης Δ.Μ.Ο.. Μετρήσεις σχετικά με το περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος ή άλλων κλινικών παραμέτρων δεν έγινε μελέτη των Tavazzi et al. Φαίνεται πάντως ότι το ασκορβικό οξύ αλληλεπιδρά με τις Δ.Μ.Ο. και πιθανώς η χορήγησή του στη φάση της επαναιμάτωσης μετριάξει τη επιβλαβή δράση των Δ.Μ.Ο. στο μυοκάρδιο.

Η αποτελεσματικότητα του ασκορβικού οξέος όσον αφορά τη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης δοκιμάστηκε σε σημαντικό αριθμό πειραματικών και κλινικών με αντικρουόμενα τελικά αποτελέσματα. Οι Nishinaka Y et al. δοκίμασαν τη δράση υψηλών δόσεων ασκορβικού οξέος σε πειραματικό μοντέλο «ανοιχτού θώρακα» σε σκύλους³⁶⁹. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι μετά αποκλεισμό του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, η ισχαιμία 2 h χωρίς επαναιμάτωση προκάλεσε σημαντική μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ελάττωση των συγκεντρώσεων GSH στα μιτοχόνδρια. Όταν την ίδια περίοδο ισχαιμίας ακολούθησε περίοδος επαναιμάτωσης 1 h, παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ελάττωση των αποθεμάτων GSH στα μιτοχόνδρια. Η χορήγηση υψηλών δόσεων ασκορβικού οξέος στα πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση ελάττωσε σημαντικά τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και ελάττωσε τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Επίσης, ο συνδυασμός ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης ελάττωσε σημαντικά τη τελική νεκρωτική περιοχή σε πειράματα «ανοιχτού θώρακα» σε σκύλους³⁷⁰. Αντίθετα, οι Bellows S et al. έδειξαν ότι η χορήγηση ασκορβικού οξέος μόνο ή σε συνδυασμό με α-τοκοφερόλη σε αναισθητοποιημένα κουνέλια «ανοιχτού θώρακα» δεν είχε καμία επίδραση στη τελική εμφραγματική περιοχή μετά ισχαιμία 30 min και επαναιμάτωση 4 h³⁷¹.

Παρόλο που τα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τη αποτελεσματικότητα του ασκορβικού οξέος στο σύνδρομο επαναιμάτωσης ήταν αντιφατικά, η χορήγηση του σε κλινικές μελέτες δοκιμάστηκε σχετικά σύντομα. Οι Dingchao H et al. σε μία τυχαίοποιημένη μελέτη χορήγησαν υψηλές δόσεις ασκορβικού οξέος (250 mg/Kg ΒΣ) σε σύνολο 85 ασθενών που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη (*Coronary Artery By-Pass Grafting - CABG*): 45 ασθενείς έλαβαν ασκορβικό οξύ ενώ 40 έλαβαν placebo³⁷². Η ομάδα των ασθενών που έλαβε ασκορβικό οξύ παρουσίασε μικρότερη αύξηση στο οξειδωτικό stress μετά τη επαναιμάτωση, όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη μέτρηση MDA, και μικρότερη μυοκαρδιακή βλάβη όπως αυτή προσδιορίστηκε με την τιμή απελευθέρωσης των μυοκαρδιακών ενζύμων (CK, CK-MB). Σημαντική ελάττωση παρατηρήθηκε, επίσης και στη ανάγκη απινίδωσης για τη ανάταξη κακοήθων

αρρυθμιών επαναιμάτωσης (κοιλιακή ταχυκαρδία/μαρμαρυγή) μετά το χειρουργείο. Οι Westhuyzen J et al. σε μία επίσης τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη στη οποία συμμετείχαν 76 ασθενείς που επρόκειτο να υποβληθούν σε CABG δοκίμασαν τη προστατευτική δράση του συνδυασμού ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης³²⁴. Η ομάδα των αντιοξειδωτικών έλαβε per os 750 IU α-τοκοφερόλης για 7-10 ημέρες πριν την επέμβαση και 1 gr ασκορβικό οξύ 12 ώρες πριν τη επέμβαση. Σε αντίθεση με τους Dingchao H et al. οι Westhuyzen J et al. δεν παρατήρησαν καμία διαφορά στη τελική εμφραγματική περιοχή, όπως αυτή προσδιορίστηκε με σπινθηρογράφημα μυοκαρδίου με ²⁰¹Th και με τη μέτρηση απελευθέρωσης μυοκαρδιακών ενζύμων. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε επίσης στις αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Στη μελέτη των Westhuyzen J et al., ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών απέτρεψε τη ελάττωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών που αποτελεί φυσική συνέπεια μετά την επαναιμάτωση, χωρίς όμως κλινικό όφελος.

Η χορήγηση ενός λιποδιαλυτού ανάλογου του ασκορβικού οξέος, 2-O-octadecylascorbic acid (CV-3611) σε πειραματικά μοντέλα σκύλων και ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα το περιορισμό της τελικής νεκρωτική περιοχής, των αρρυθμιών επαναιμάτωσης και τη συσσώρευσης και διήθησης των ουδετερόφιλων μέσω της δραστικής ελάττωσης παραγωγής Δ.Μ.Ο στη περιοχή του επαναιματωθέντος μυοκαρδίου^{373,374}.

Δεσφερριοξαμίνη (Desferrioxamine - DFO)

Είναι γνωστό ότι στη φάση της επαναιμάτωσης απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ιόντων Fe⁺³ και μικρότερες ποσότητες Cu⁺² που προέρχονται κυρίως από τη αποσύνθεση των μυοκαρδιακών κυττάρων λόγω της καταστροφικής δράσης των Δ.Μ.Ο. στις κυτταρικές μεμβράνες. Με διαθέσιμα ιόντα Fe⁺³ στη περιοχή της επαναιμάτωσης σχετικά ασθενείς Δ.Μ.Ο. μετατρέπονται σε εξαιρετικά τοξικές ελεύθερες ρίζες (όπως οι ρίζες •OH) μέσω των μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων Fenton προκαλώντας περαιτέρω κυτταρική καταστροφή. Η αναστολή των μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων Fenton έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός προστασίας από τη βλάβη επαναιμάτωσης.

Η δεσφερριοξαμίνη (DFO) αποτελεί το πιο ευρέως κλινικά διαδομένο δεσμευτή ιόντων σιδήρου χρησιμοποιούμενο κυρίως σε καταστάσεις υπερφόρτωσης Fe⁺³ όπως η μεσογειακή αναιμία. Λόγω της ισχυρής σιδηροδεσμευτικής ικανότητάς της, η DFO έχει δοκιμαστεί εκτεταμένα ως παράγων προστασίας από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Πρώτοι οι Amborsio G et al. έδειξαν σε απομονωμένες καρδιές κουνελιών, ότι η χορήγηση DFO με την έναρξη της επαναιμάτωσης είχε σαν αποτέλεσμα τη καλύτερη

αποκατάσταση της συσταλτικής ικανότητας της αριστερής κοιλίας σε σχέση με απομονωμένες καρδιές που δεν έλαβαν DFO³⁷⁵. Η προστατευτική δράση της DFO στη μελέτη αυτή, ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο από τη παρατήρηση ότι στο απόβλητο διάλυμα «αιμάτωσης» (*effluent perfusate infusion*) των καρδιών που έλαβαν DFO το μεγαλύτερο ποσοστό Fe^{+3} ήταν συνδεδεμένο με το μόριο της DFO με τη μορφή Fe^{+3} – DFO συμπλεγμάτων. Αργότερα οι Bolli R et al. επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι η DFO προστατεύει από τη βλάβη επαναιμάτωσης και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα σκυλιών «ανοιχτού θώρακα»²²⁰. Στη προκειμένη μελέτη, οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντικό περιορισμό της βαρύτητας του φαινομένου του «απόπληκτου» μυοκαρδίου στα πειραματόζωα που έλαβαν DFO που συνοδεύτηκε από χαρακτηριστική ελάττωση των Δ.Μ.Ο. που μετρήθηκαν σε δείγματα αίματος από το στεφανιαίο κόλλο. Στη μελέτη αυτή οι Δ.Μ.Ο. μετρήθηκαν με μεθόδους άμεσου προσδιορισμού ESR μετά από ενδοστεφανιαία χορήγηση PBN ως spin traps. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και οι Williams R et al. οι οποίοι σε πειράματα σε απομονωμένες καρδιές κουνελιών παρατήρησαν σημαντική βελτίωση της λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας μετά επαναιμάτωση³⁷⁶. Επίσης, με τη χρήση της μεθόδου ESR, παρατήρησαν σημαντική ελάττωση της περιεκτικότητας Δ.Μ.Ο. σε κατεψυγμένα δείγματα επαναιματωθέντος μυοκαρδιακού ιστού. Οι πρώτες αυτές μελέτες απέδειξαν ότι η DFO αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα και ότι η «εκκαθαριστική» κατά των Δ.Μ.Ο. δράση της οφείλεται κυρίως στη δέσμευση των ελεύθερων ιόντων Fe^{+3} και τη αναστολή των σιδηρο-καταλυόμενων αντιδράσεων Haber-Weiss.

Ο ακριβής χρόνος έναρξης χορήγησης της DFO αποτελεί σημείο έντονης διαφωνίας στη διεθνή βιβλιογραφία. Ήδη, από τις πρώτες πειραματικές μελέτες των Bolli R et al. και Williams R et al, αποδείχθηκε ότι, προκειμένου να έχει θετικά αποτελέσματα, η χορήγηση της DFO πρέπει να ξεκινά πριν την ισχαιμία ή τουλάχιστον λίγο πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης^{220, 376}. Το ίδιο υποστηρίζεται από σημαντικό αριθμό πειραματικών μελετών στις οποίες η DFO χορηγήθηκε πριν την έναρξη της ισχαιμίας³⁷⁷⁻³⁸⁰. Σε απομονωμένες καρδιές ποντικών, οι DeBoer D et al., έλεγξαν τη προστατευτική δράση της DFO όταν αυτή χορηγήθηκε σε 3 διαφορετικές χρονικές φάσεις του πειράματος: πριν την έναρξη της ισχαιμίας, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (χορηγούμενη στο διάλυμα καρδιοπληγίας) και κατά τη έναρξη της επαναιμάτωσης³⁸¹. Παρόλο που η DFO δεν βελτίωσε τη συστολική απόδοση της αριστεράς κοιλίας σε καμία από τις ομάδες ανεξάρτητα από το στιγμή έναρξης χορήγησης, η ομάδα των πειραματόζωων που έλαβε DFO πριν τη έναρξη της ισχαιμίας παρουσίασε μικρότερη θνησιμότητα μετά την επαναιμάτωση. Αποδεικνύεται ότι η προστατευτική δράση της DFO επιτυγχάνεται κυρίως όταν αυτή χορηγηθεί πριν από τη έναρξη της ισχαιμίας.

Μεμονωμένες μελέτες έχουν αποτύχει να αποδείξουν προστατευτική δράση της DFO από τη βλάβη επαναιμάτωσης. Οι Watanabe B et al. έλεγξαν το αποτέλεσμα της χορήγησης DFO σε πειραματικό μοντέλο πιθήκου, έτσι ώστε οι συνθήκες ισχαιμίας / επαναιμάτωσης να προσομοιάζουν περισσότερο αυτές του ανθρώπου³⁸². Παρόλο που η χορήγηση της DFO άρχισε 2 h πριν τη έναρξη της ισχαιμίας, τα πειραματόζωα που έλαβαν DFO παρουσίασαν παραδόξως, 22% μεγαλύτερη τελική νεκρωτική περιοχή από εκείνη των πειραματόζωων που έλαβαν placebo. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική αλλά απέδειξε ότι σε πειραματόζωο που προσομοιάζει καλύτερα από κάθε άλλο το άνθρωπο η χορήγηση της DFO δεν είχε θετικά αποτελέσματα. Οι DeBoer D et al. παρατήρησαν επίσης αρνητικά αποτελέσματα στα πειραματόζωα που έλαβαν υψηλές δόσεις DFO υποστηρίζοντας για πρώτη φορά τη πιθανότητα τοξικής δράσης της DFO όταν αυτή χορηγείται σε υψηλές δόσεις³⁸¹.

Πρόσφατα, οι Paraskevaïdis I et al. , βασιζόμενοι στα θετικά αποτελέσματα της χορήγησης της DFO πριν την έναρξη της ισχαιμίας, μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της DFO όταν αυτή χορηγείται προληπτικά, πριν την έναρξη της ισχαιμίας (καρδιοπληγία), σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη (CABG)³⁸³. Παρατήρησαν ότι μετά την επέμβαση, οι ασθενείς που έλαβαν DFO είχαν καλύτερη συστολική απόδοση της αριστεράς κοιλίας, όπως αυτή εκτιμήθηκε με το κλάσμα εξώθησης, και εκτέθηκαν σε σημαντικά μικρότερο οξειδωτικό stress, σύμφωνα με τις μετρήσεις των TBARS στο περιφερικό αίμα το ασθενών μετά το χειρουργείο.

Συμπερασματικά, η DFO, λόγω της σιδηροδεσμευτικής της ικανότητας, αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα με προστατευτική δράση στο σύνδρομο επαναιμάτωσης ιδιαίτερα όταν χορηγείται πρώιμα, πριν την έναρξη της ισχαιμίας.

Μη-αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αδενοσίνη και αγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης

Στο φυσιολογικό μυοκάρδιο, η αδενοσίνη βρίσκεται σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις αλλά αυξάνει κατά τη φάση της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης λόγω του καταβολισμού των ATP και ADP. Η αδενοσίνη παρεμβάλλεται με ποικίλους τρόπους στο μηχανισμό της επαναιμάτωσης μέσω των υποδοχέων της A1, A2 και A3 που βρίσκονται στο μυοκαρδιακό κύτταρο, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα ουδετερόφιλα³⁸⁴. Η χορήγηση της αδενοσίνης για τη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης δεν έχει πλήρως αποδειχθεί καθώς στο σύνολο τους οι πειραματικές μελέτες που έχουν δημοσιευθεί έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε σκύλους που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία/επαναιμάτωση, η ενδοστεφανιαία χορήγηση αδενοσίνης ελάττωσε την τελική νεκρωτική περιοχή, τη ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μετά την επαναιμάτωση³⁸⁵. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αδενοσίνης A1, A2 και A3 μετά χορήγηση αγωνιστών των υποδοχέων αυτών είχε σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της νεκρωτικής περιοχής σε πειραματικές μελέτες μέσω κυρίως μέσω της αναστολής συσσώρευσης των ουδετερόφιλων³⁸⁶⁻³⁸⁸. Αντιθέτως, οι Homeister J et al. έδειξαν ότι η μονήρης χορήγηση αδενοσίνης δεν ελάττωσε την τελική νεκρωτική ζώνη μετά την επαναιμάτωση εκτός αν συνοδεύταν με ταυτόχρονη έγχυση λιδοκαΐνης³⁸⁹. Παρόμοια αρνητικά αποτελέσματα για τη αδενοσίνη και για τους αγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης A1, έδειξαν και άλλες πειραματικές μελέτες σε κουνέλια^{390, 391}. Η έλλειψη σημαντικού παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου στα κουνέλια πιθανώς να αποτελεί το αίτιο των αρνητικών αυτών αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αδενοσίνη πιθανώς να περιορίζει την τελική έκταση του εμφράγματος και μέσω της αγγειοδιαστολής στα παράπλευρα στεφανιαία αγγεία που αιματώνουν την ισχαιμική περιοχή. Παραδόξως, και η χορήγηση αναστολέων των υποδοχέων της αδενοσίνης A1 αποδείχθηκε επίσης προστατευτική μετά την επαναιμάτωση πιθανώς μέσω μηχανισμού αναστολής της συσσώρευσης των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων κυρίως στην απώτερη φάση της επαναιμάτωσης³⁹².

Αναστολείς του συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα ενεργοποιείται τόσο κατά τη φάση της ισχαιμίας όσο και της επαναιμάτωσης με αποτέλεσμα την παραγωγή αναφυλακτικών τοξίνων C3a, C4a και C5a. Οι παράγοντες συμπληρώματος προκαλούν άμεση τοξική βλάβη στη κυτταρική μεμβράνη αυξάνοντας τη κυτταρική διαβατότητα και ενισχύουν τη φλεγμονώδη αντίδραση τόσο κατά τη φάση της ισχαιμίας όσο και κατά τη φάση της επαναιμάτωσης

με την απελευθέρωση ισταμίνης και παράγοντα ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων (*Platelet Activator Factor - PAF*)³⁹³. Ακόμα περισσότερο ο παράγων C5a αποτελεί ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων που με τη σειρά τους κατά τη φάση της επαναιμάτωσης παράγουν μεγάλες ποσότητες Δ.Μ.Ο. όπως του σουπεροξειδίου. Αναστολή της δράσης των παραγόντων συμπληρώματος κυρίως με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των παραγόντων του συμπληρώματος, κυρίως του C5a, ή με τη χρήση αντισωμάτων κατά των υποδοχέων του C5a, έχει αποδειχθεί ότι έχει ευεργετικές ιδιότητες στο περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση^{394,395}.

Αναστολείς των διαύλων Na^+/H^+ (Na^+/H^+ Exchangers –NHE – inhibitors)

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς μυοκαρδιακής βλάβης κατά τη φάση της επαναιμάτωσης είναι ο φαύλος κύκλος της υπερφόρτωσης Ca^{++} . Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία υπερφόρτωσης του κυττάρου σε Ca^{++} είναι η δυσλειτουργία των αντλιών ανταλλαγής ιόντων Na^+/H^+ (Na^+/H^+ Exchanger - NHE) και Na^+/Ca^{++} όπως περιγράφηκε προηγουμένως (βλέπε σελ.33). Αυτή οδηγεί πρώτα σε ενδοκυττάρια υπερφόρτωση Na^+ και μετά σε υπερφόρτωση Ca^{++} . Η αναστολή της αντλίας των ιόντων Na^+/H^+ θα μπορούσε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης μέσω 2 κυρίως μηχανισμών: α) αναστολή του ρεύματος εκροής ιόντων H^+ από τον ενδοκυττάριο προς τον εξωκυττάριο χώρο και του ρεύματος εισροής ιόντων Na^+ διατηρώντας το ενδοκυττάριο pH χαμηλό - Η διατήρηση της ισχαιμικής οξέωσης, και κατά τη διάρκεια φάση της επαναιμάτωσης έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει από το σύνδρομο επαναιμάτωσης³⁹⁶ β) αναστολή του ρεύματος εισροής ιόντων Ca^{++} , που αποτελεί αποτέλεσμα της ενδοκυττάριας αύξησης της συγκέντρωσης σε Na^+ , και αποτροπή του φαινομένου της υπερφόρτωσης σε Ca^{++} .

Μεγάλος αριθμός πειραματικών μελετών έχει αποδείξει ότι η χορήγηση NHE αναστολέων προστατεύει το μυοκάρδιο τόσο από το κυτταρικό θάνατο μετά επαναιμάτωση όσο και από αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Η χορήγηση του αναστολέα των NHE, Cariporide, βελτίωσε τη λειτουργικότητα του επαναιματωθέντος μυοκαρδίου μετά παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας με ποικίλους μηχανισμούς, όπως η διατήρηση του μετα-ισχαιμικού ενδοκυττάριας pH, η διατήρηση ικανού αριθμού πρωτονίων (H^+) στο ενδοκυττάριο χώρο έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP και η αποκατάσταση της ομοιόστασης του Ca^{++} αποτρέποντας τη υπερφόρτωση σε Ca^{++} . Η χορήγηση και άλλων, νεότερων αναστολέων της αντλίας

NHE καθώς και αναστολέων της αντλίας $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ είχε επίσης θετικά αποτελέσματα στη προστασία του μυοκαρδίου από τη βλάβη επαναιμάτωσης.

Ο ακριβής χρόνος χορήγησης των NHE αναστολέων σε σχέση με τη χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης αποτελεί σημαντικό σημείο προσοχής. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα όταν ο αναστολέας NHE χορηγήθηκε αρκετά πριν, λίγο πριν ή μετά την επαναιμάτωση. Η θεραπεία με τον αναστολέα NHE, HOE- 694 ελάττωσε σημαντικά τη τελική νεκρωτική περιοχή όταν χορηγήθηκε νωρίς πριν την έναρξη της ισχαιμίας σε χοίρους «ανοιχτού-θώρακα» που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία 90 min και επαναιμάτωση 24 h³⁹⁷. Στην ίδια πειραματική μελέτη η χορήγηση του αναστολέα NHE 10 min πριν τη έναρξη της επαναιμάτωσης δεν ελάττωσε στατιστικά σημαντικά τη τελική εμφραγματική περιοχή. Σε αντίστοιχο πειραματικό μοντέλο οι Rohmann S et al. έδειξαν ότι η χορήγηση HOE- 694 πριν την έναρξη ισχαιμίας όσο και κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας είχε σαν αποτέλεσμα το περιορισμό της τελικής εμφραγματικής περιοχής μετά επαναιμάτωση³⁹⁸. Αντίθετα, οι Garcia-Dorado D et al. παρατήρησαν ότι η χορήγηση του αναστολέα NHE, HOE-642, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στο περιορισμό της τελικής εμφραγματικής περιοχής μετά επαναιμάτωση όταν χορηγήθηκε ενδοστεφανιαία κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης³⁹⁹. Στη ίδια μελέτη, η χορήγηση του HOE-642 πριν ακόμα την έναρξη της ισχαιμίας είχε σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της έκτασης της τελικής εμφραγματικής ζώνης. Αποδεικνύεται, ότι ο η θεραπεία με αναστολείς των αντλιών NHE έχει προστατευτικό αποτέλεσμα όταν η χορήγηση τους γίνεται πριν τη έναρξη της ισχαιμίας. Η προστατευτική ικανότητα αυτή μειώνεται σημαντικά όταν η χορήγηση τους γίνει κατά την έναρξη ή κατά τη διάρκεια της φάσης επαναιμάτωσης.

Το συμπέρασμα αυτό αποτελεί σημαντικό περιορισμό στη κλινική αποτελεσματικότητα των παραγόντων αυτών. Η χορήγηση τους πρέπει να ξεκινά πριν τη έναρξη της ισχαιμίας καθιστώντας με αυτό τον τρόπο σχεδόν αποκλειστική τη χορήγηση τους σε καταστάσεις εκλεκτικής επαναιμάτωσης μόνο, όπως σε περιπτώσεις επεμβάσεων CABG. Οι Boyce S et al. σε μία τυφλή, τυχαιοποιημένη πολυκεντρική κλινική υπό-μελέτη της μελέτης GUARDIAN (GUARDIAN CABG sub-study), εξέτασαν τα αποτελέσματα της χορήγησης Cariporide σε 2918 ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο που υποβλήθηκαν σε επείγον CABG και είχαν μεγάλο κίνδυνο για περιεγχειρητικό οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου⁴⁰⁰. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 4 ομάδες: ομάδα ελέγχου (n=743), ομάδα Cariporide 20mg (n=736), ομάδα Cariporide 80mg (n=705) και ομάδα Cariporide 120mg (n=734). Η Cariporide χορηγήθηκε ενδοφλεβίως επί 1 h, ξεκινώντας πριν τη έναρξη του χειρουργείου και συνεχίστηκε από την 2^η έως τη 7^η μετεγχειρητική ημέρα με ενδοφλέβιες εγχύσεις κάθε 8 ώρες στις

προαναφερθείσες για κάθε ομάδα δόσεις. Τα καταληκτικά σημεία της μελέτης αποτέλεσαν η κάθε αιτιολογίας θνησιμότητα (*all cause mortality*) ή εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου μέχρι και 6 μήνες μετά το CABG. Δεν υπήρξε διαφορά στην εκδήλωση εμφράγματος του μυοκαρδίου ή θανάτου κάθε αιτιολογίας μεταξύ των ασθενών που έλαβαν Cariporide στις δόσεις των 20mg και 80mg και της ομάδας ελέγχου. Σημαντική ελάττωση των κλινικών συμβάντων παρατηρήθηκε στη ομάδα των 120mg Cariporide σε σχέση με τη ομάδα ελέγχου (12.2 % vs. 16.2%, $p=0.02$)⁴⁰⁰. Η διαφορά αποδόθηκε κυρίως στην ελάττωση των συμβάντων τη 1^η μετεγχειρητική ημέρα. Αυτό αποτελεί έμμεση απόδειξη ότι η ευεργετική δράση της Cariporide οφείλεται πιθανώς στη προστασία από σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Η μελέτη GUARDIAN (the **GUARd During Ischemia Against Necrosis**) αποτέλεσε τη μεγαλύτερη κλινική μελέτη στη οποία Cariporide χορηγήθηκε σε 11590 ασθενείς πάσχοντες από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ασταθή στηθάγχη, non-ST elevation Myocardial infarction / Non-STEMI) ή ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε επέμβαση επαναιμάτωσης υψηλού κινδύνου για εκδήλωση θανάτου ή εμφράγματος του μυοκαρδίου. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 4 ομάδες διαφορετικής δόσης Cariporide όπως και στην υπο-μελέτη των ασθενών που υποβλήθηκαν σε CABG¹⁸⁰. Η χορήγηση Cariporide έγινε ενδοφλεβίως το νωρίτερο δυνατό μετά τη εισαγωγή του ασθενούς στη μελέτη και συνεχίστηκε από 2^η έως τη 7^η ημέρα νοσηλείας με ενδοφλέβιες εγχύσεις κάθε 8 ώρες στις προαναφερθείσες για κάθε ομάδα δόσεις. Τα καταληκτικά σημεία ήταν τα ίδια με αυτά της υπο-μελέτης CABG. Στις δόσεις των 20mg και 80mg, η χορήγηση Cariporide δεν είχε κανένα ευεργετικό αποτέλεσμα σε σχέση με τη ομάδα ελέγχου. Η συνολική πιθανότητα εκδήλωσης θανάτου ή εμφράγματος του μυοκαρδίου ελαττώθηκε κατά 10% (ποσοστό στατιστικά μη σημαντικό) μόνο στη ομάδα ασθενών που έλαβε την δόση των 120mg. Η διαφορά στα αποτελέσματα των δύο αυτών μελετών (GUARDIAN και GUARDIAN CABG sub-study) αποδόθηκε στο γεγονός ότι η Cariporide έχει προστατευτική δράση όταν χορηγείται πριν την έναρξη της ισχαιμίας γεγονός που είναι εφικτό μόνο σε καταστάσεις εκλεκτικής επαναιμάτωσης, όπως στις επεμβάσεις CABG¹⁵². Στο ίδιο λόγο αποδόθηκε και η αποτυχία ενός άλλου αναστολέα NHE, του Eniporide στη τυφλή, τυχαιοποιημένη πολυκεντρική μελέτη ESCAMI (Evaluation of Safety and Cardioprotective effect of Eniporide in Acute Myocardial Infarction)¹⁷⁹. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της Eniporide εξετάστηκε σε 1389 ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που υποβλήθηκαν σε θεραπεία επαναιμάτωσης με θρομβόλυση ή με πρωτογενή αγγειοπλαστική. Η χορήγηση της Eniporide έγινε ενδοφλεβίως σε διαφορετικές δόσεις (1mg -200mg) 10 min πριν τη έναρξη της

επαναιμάτωσης. Συνολικά, στη μελέτη αυτή η χορήγηση Eniporide δεν βελτίωσε τη κλινική πορεία των ασθενών ούτε ελάττωσε την τελική έκταση του εμφράγματος μετά την επιτυχή επαναιμάτωση.

Οι πειραματικές και κλινικές μελέτες αποδεικνύουν ότι οι αναστολείς NHE αποτελούν σημαντικούς προστατευτικούς παράγοντες από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Η χορήγησή τους πριν ή κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας έχει σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση ελαττώνοντας τη έκταση της νεκρωτικής περιοχής και την πιθανότητα εκδήλωσης κλινικών συμβάντων όπως θάνατος και επανέμφραγμα του μυοκαρδίου. Αντίθετα, η δράση τους περιορίζεται σημαντικά όταν αυτοί χορηγούνται κατά την έναρξη ή μετά την άρση της ισχαιμίας.

Αντι-αποπτωτικοί παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μία από τις πιο σημαντικές εκδηλώσεις του συνδρόμου της επαναιμάτωσης είναι ο κυτταρικός θάνατος με τη μορφή της κυτταρικής «απόπτωσης». Η διαδικασία της απόπτωσης ξεκινά από την φάση της ισχαιμίας και επιδεινώνεται ραγδαία στη φάση της επαναιμάτωσης⁴⁰¹. Αναστολή της αποπτωτικής διεργασίας θα μπορούσε πιθανόν να μετριάσει τον αριθμό των μυοκαρδιακών κυττάρων που καταστρέφονται μετά τη επαναιμάτωση με προφανή όφελος στη βελτίωση του κλάσματος εξώθησης. Στην υπόθεση αυτή στηρίχτηκε ένας σημαντικός αριθμός μελετών που απέδειξαν την προστατευτική δράση των αντι-αποπτωτικών παραγόντων στο σύνδρομο της επαναιμάτωσης. Σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε ποντίκια οι Vakena A et al. απέδειξαν ότι η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των τελικού παράγοντα συμπληρώματος C5 είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση της έκτασης του εμφράγματος μετά τη επαναιμάτωση λόγω που αποδόθηκε στην δραματική ελάττωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στο επαναιματωθέν μυοκάρδιο⁴⁰². Αποδεικνύεται ότι εκτός οι παράγοντες αναστολείς του συμπληρώματος εκτός από την αντιφλεγμονώδη δράση έχουν και σημαντική αντι-αποπτωτική δράση. Σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο οι Galang N et al. απέδειξαν ότι η αναστολή της παραγωγής Δ.Μ.Ο. στην επαναιμάτωση, με τη χορήγηση συνδυασμού SOD και CAT, βελτιώνει σημαντικά τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με τη δραστική ελάττωση του αριθμού αποπτωτικών μυοκαρδιακών κυττάρων στο επαναιματωθέν μυοκάρδιο⁴⁰³. Τέλος, οι Mocanu M et al. απέδειξαν ότι η αναστολή της Caspase, μίας πρωτεΐνης «κλειδί» στη διαδικασία της απόπτωσης, ελάττωσε δραστικά το μέγεθος της τελικής νεκρωτικής ζώνης, σε απομονωμένες καρδιές ποντικών που υποβλήθηκαν σε περιοχική ισχαιμία 35min και επαναιμάτωση 120min⁴⁰⁴. Τα αποτελέσματα των

μελετών αυτών αποδεικνύουν ότι η αντι-αποπτωτική δράση ορισμένων παραγόντων θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό βοήθημα στο περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση.

3. ΔΙΑΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η βλάβη από επαναιμάτωση αποτελεί ένα πολύπλοκο φαινόμενο που εμπλέκει πληθώρα παθοφυσιολογικών μηχανισμών που δρουν σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών λειτουργιών του ισχαιμούντος μυοκαρδιακού κυττάρου που εκτίθεται σε αιφνίδια και πλήρη επαναιμάτωση. Αυτό αποδεικνύεται από το πλήθος των φαρμακευτικών ουσιών που έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς και οι οποίες δρουν σε διαφορετικά επίπεδα στο παθοφυσιολογικό «καταρράκτη» του συνδρόμου της επαναιμάτωσης. Επίσης, η διαφορετική «επίδοση» της κάθε ουσίας ξεχωριστά σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες – η οποία σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να είναι είτε προστατευτική είτε ακόμα και καταστρεπτική για το επαναιματωθέν μυοκάρδιο – αποδεικνύει τη πολυδιάστατη φύση του φαινομένου της επαναιμάτωσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διάσταση μεταξύ των πειραματικών και κλινικών αποτελεσμάτων. Ουσίες που έχουν πειραματικά αποδεδειγμένη προστατευτική δράση στο σύνδρομο της επαναιμάτωσης αδυνατούν να αποδείξουν το ίδιο σε κλινικές μελέτες. Τρεις σημαντικοί λόγοι εξηγούν τη διάσταση μεταξύ πειραματικών και κλινικών αποτελεσμάτων: *η πολυπλοκότητα του φαινομένου της επαναιμάτωσης, η διαφορά στο χρόνο χορήγησης των αντιοξειδωτικών παραγόντων σε σχέση με την έναρξη της επαναιμάτωσης, και τέλος οι εγγενείς διαφορές μεταξύ των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται σε κάθε πειραματικό μοντέλο και του ανθρώπου.*

Πολυπλοκότητα του συνδρόμου της επαναιμάτωσης

Όπως αναφέρθηκε εκτεταμένα, το σύνδρομο της επαναιμάτωσης αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο φαινόμενο στο οποίο εμπλέκονται ποικίλοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων στο πλείστο των περιπτώσεων αποσκοπεί στη αναστολή κάποιων από τους μηχανισμούς αυτούς που συνθέτουν τον παθοφυσιολογικό «καταρράκτη» του συνδρόμου. Ποικίλοι άλλοι, όμως παραμένουν ανεπηρέαστοι. Ανάλογα με τις συνθήκες της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης, αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να μετριάσουν σημαντικά ή ακόμα και να αναστρέψουν το προστατευτικό αποτέλεσμα των αντιοξειδωτικών ουσιών. Επίσης, η δράση των αντιοξειδωτικών παραγόντων περιορίζεται σε διαφορετικό κάθε φορά κυτταρικό επίπεδο λειτουργίας. Υπάρχουν αντιοξειδωτικοί παράγοντες που αναστέλλουν τη δράση των Δ.Μ.Ο. στη κυτταρική μεμβράνη και δρουν κυρίως εξωκυττάρια ενώ άλλοι εμποδίζουν τη δράση των Δ.Μ.Ο. στα μιτοχόνδρια ή σε μεταγραφικούς παράγοντες

αναστέλλοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη διαδικασία απόπτωσης του μυοκαρδιακού κυττάρου. Η μεμονωμένη χορήγηση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα προστατεύει το μυοκαρδιακό κύτταρο σε ένα μόνο επίπεδο δράσης των Δ.Μ.Ο. αφήνοντας και πάλι σημαντικές κυτταρικές δομές ή κυτταρικά οργανίδια απροστάτευτα.

Ο πολύπλοκος μηχανισμός του συνδρόμου της επαναιμάτωσης σε συνδυασμό με τη διαφορετική, ανάλογα των συνθηκών, δράση των αντιοξειδωτικών φαρμάκων περιορίζουν σημαντικά τη κλινική εφαρμογή των φαρμάκων αυτών ως παράγοντες προστασίας από τη βλάβη της επαναιμάτωσης. Σε αυτούς τους λόγους οφείλεται η εκ διαμέτρου αντίθετη δράση αρκετών αντιοξειδωτικών παραγόντων οι οποίοι, ενώ παρουσίασαν εξαιρετικά αποτελέσματα στις πειραματικές μελέτες, η προστατευτική τους δράση δεν επιβεβαιώθηκε σε κλινικές μελέτες. Για να αποκλειστούν όσο το δυνατό περισσότεροι πιθανοί μηχανισμοί σε διαφορετικά επίπεδα κυτταρικής λειτουργίας που ευθύνονται για τη βλάβη επαναιμάτωσης, πρόσφατα έχει προταθεί από πολλούς ερευνητές η χορήγηση συνδυασμού αντιοξειδωτικών φαρμάκων^{405, 406}.

Χρόνος χορήγησης

Σημαντικό ρόλο στα αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ πειραματικών και κλινικών μελετών έπαιξε η σημαντική διαφορά στη σχεδίαση των πειραματικών μελετών σε σχέση με τις πραγματικές συνθήκες στην κλινική πράξη. Η συντριπτική πλειοψηφία των πειραματικών μελετών που εξέτασαν τη δράση των περισσότερων αντιοξειδωτικών παραγόντων σχεδιάστηκαν με σκοπό να δοκιμάσουν τη δράση της υπο-εξέταση ουσίας και μόνο, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη τις συνθήκες της συνήθους κλινικής πράξης. Σε μεγάλο αριθμό πειραματικών μελετών, αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες είχαν ευεργετικά για το μυοκάρδιο αποτελέσματα είχαν χορηγηθεί πριν την έναρξη της ισχαιμίας. Η προ-της-ισχαιμίας χορήγηση προστατευτικών για το σύνδρομο επαναιμάτωσης ουσιών, σε ασθενείς με OEM, είναι προφανώς αδύνατη. Αυτή είναι εφικτή μόνο σε καταστάσεις εκλεκτικής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, όπως οι περιπτώσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Αυτός είναι ο λόγος που αρκετές από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που είχαν προστατευτική δράση σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα, δεν κατάφεραν να αναπαράγουν τα θετικά αυτά αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες οξείας και αιφνίδιας επαναιμάτωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί η δράση της DFO, η οποία έχει προφανή ευεργετικά αποτελέσματα κυρίως όταν χορηγηθεί πριν τη έναρξη της ισχαιμικής περιόδου³⁸¹. Η προστατευτική δράση της DFO αποδείχθηκε μόνο σε κλινικές μελέτες εκλεκτικής επαναιμάτωσης αορτοστεφανιαίας παράκαμψης στις οποίες η προ-της-ισχαιμίας χορήγηση DFO είχε σαν αποτέλεσμα τη

βελτίωση της συστολικής απόδοσης μετά το χειρουργείο³⁸³. Παρομοίως, η χορήγηση αναστολέων της αντλίας NHE απέδειξε την προστατευτική τους δράση σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στα οποία χορηγήθηκε προληπτικά πριν την έναρξη της ισχαιμίας³⁹⁷. Η ίδια ουσία δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα όταν δοκιμάστηκε στη κλινική μελέτη GUARDIAN που αφορούσε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και υποβλήθηκαν σε επείγουσα επαναιμάτωση με αγγειοπλαστική¹⁸⁰. Αντίθετα, η ίδια ουσία όταν χορηγήθηκε στην υπο-μελέτη της GUARDIAN, που αφορούσε ίδιους ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε επείγουσα επαναιμάτωση με αορτοστεφανιαία παράκαμψη (CABG), είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική ελάττωση της εκδήλωσης περιεγχειρητικού εμφράγματος του μυοκαρδίου⁴⁰⁰. Η αντίθεση στα αποτελέσματα των δύο μελετών εξηγείται από το γεγονός ότι η προστατευτική δράση των αναστολέων των αντλιών NHE ελαττώνεται σημαντικά όταν οι ουσίες αυτές χορηγούνται κατά τη φάση της επαναιμάτωσης και όχι της ισχαιμίας.

Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι ο ακριβής χρόνος χορήγησης των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών ουσιών σε σχέση με την έναρξη της επαναιμάτωσης παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη προστατευτική δράση αυτών. Η δράση τους φαίνεται ότι ενισχύεται σημαντικά όταν αυτές χορηγούνται προληπτικά πριν την έναρξη της μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Αντίθετα όμως με τα πειραματικά δεδομένα, στη κλινική πράξη, η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών πριν τη έναρξη της ισχαιμίας είναι αδύνατη και αυτό πρέπει να λαμβάνεται σημαντικά υπόψη στη σχεδίαση πειραματικών μοντέλων ισχαιμίας – επαναιμάτωσης που εξετάζουν τη δράση αντιοξειδωτικών ουσιών στη προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Πειραματικό μοντέλο

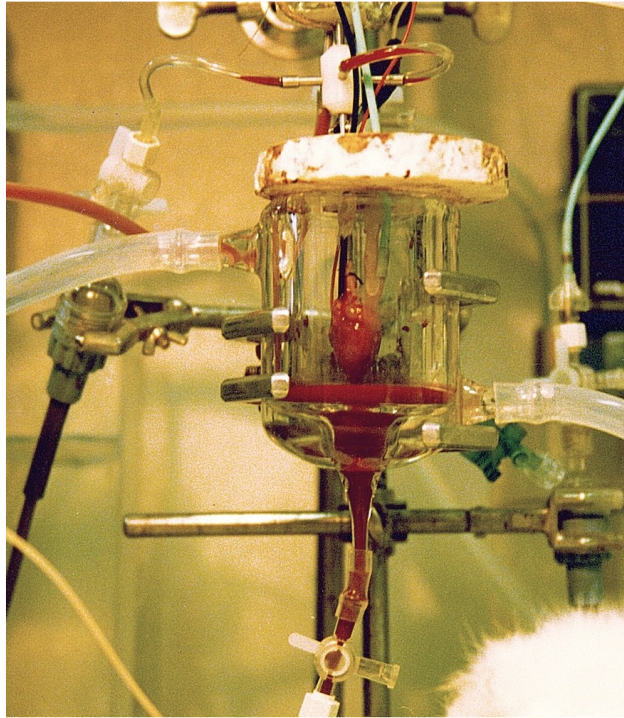
Υπάρχουν σημαντικές εγγενείς διαφορές μεταξύ των πειραματόζων που χρησιμοποιούνται στα πειραματικά μοντέλα και του ανθρώπου. Οι διαφορές εντοπίζονται κυρίως στη ανατομία και στη φυσιολογία των στεφανιαίων αγγείων. Οι πειραματικές μελέτες γίνονται κυρίως σε υγιή πειραματόζωα, συνήθως νεαρής ηλικίας. Αντίθετα, οι κλινικές μελέτες αφορούν ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας με χρόνια στεφανιαία νόσο που προφανώς έχει επιφέρει αλλοιώσεις στη λειτουργία των στεφανιαίων αγγείων. Είναι γνωστό ότι τα αθηρωματικά αγγεία παρουσιάζουν επηρεασμένη λειτουργικότητα του ενδοθηλίου σε σχέση με τα φυσιολογικά αγγεία. Η διαταραχή αυτή οφείλεται κυρίως στη ανώμαλη παραγωγή και βιοδιαθεσιμότητα του NO από το ενδοθήλιο^{407, 408}. Παρόλο που αυτό δεν έχει αποδειχθεί κλινικά ή

πειραματικά, είναι πιθανό η δράση των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων να είναι διαφορετική σε υγιή και νοσούντα αθηρωματικά στεφανιαία αγγεία επηρεάζοντας το πραγματικό αποτέλεσμά τους. Αυτό μπορεί να αποτελεί αίτιο της διάστασης των αποτελεσμάτων μεταξύ πειραματικών μελετών – όπου οι προστατευτικοί παράγοντες μελετώνται στα «φυσιολογικά» στεφανιαία αγγεία πειραματόζων – και κλινικών μελετών, όπου οι προστατευτικοί παράγοντες μελετώνται σε «νοσούντα» αθηρωματικά στεφανιαία αγγεία.

Η διαφορά στην ανατομία των στεφανιαίων αγγείων αποτελεί ένα άλλο πιθανό αίτιο της διάστασης των αποτελεσμάτων μεταξύ πειραματικών και κλινικών μελετών. Σημαντικός αριθμός πειραματικών μελετών έχει πραγματοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα σκύλου ή ποντικίου. Είναι αποδεδειγμένο πως, από την πρώιμη ισχαιμική περίοδο, τόσο ο σκύλος όσο και το ποντίκι, «επιστρατεύουν» άμεσα παράπλευρο δίκτυο στεφανιαίων αγγείων προκειμένου να διατηρήσουν την αιματική άρδευση της ισχαιμούσας περιοχής του μυοκαρδίου όσο το δυνατό καλύτερη⁴⁰⁹⁻⁴¹¹. Ο άνθρωπος αναπτύσσει σημαντικά μικρότερο παράπλευρο δίκτυο στεφανιαίων αγγείων σε καταστάσεις οξείας ισχαιμίας^{411, 412}. Δεδομένου ότι προστατευτικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί στο σύνδρομο επαναιμάτωσης επιδρούν στο παράπλευρο στεφανιαίο δίκτυο, μπορεί να υποθεθεί ότι η ευεργετική δράση που έχουν στα πειραματόζωα σε αντίθεση με το άνθρωπο μπορεί να οφείλεται στη επίδραση τους στο παράπλευρο στεφανιαίο δίκτυο των πειραματόζων σε αντίθεση με τον άνθρωπο.

Ένας σημαντικός αριθμός πειραματικών μελετών ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, έχει πραγματοποιηθεί σε απομονωμένες καρδιές υποστηριζόμενες με ειδικά διαλύματα άρδευσης μέσω μηχανικής αντλίας (isolated perfused hearts) (Εικ. 1). Τα πειραματικά αυτά μοντέλα αποτελούν ένα αξιόπιστο τρόπο μελέτης των αντιοξειδωτικών ουσιών σε καταστάσεις ισχαιμίας και επαναιμάτωσης αλλά δεν προσομοιάζουν τις κλινικές συνθήκες στις οποίες οι υπό εξέταση ουσίες μπορούν να έχουν παράπλευρη δράση τόσο στη καρδιά όσο και στο κυκλοφορικό σύστημα γενικότερα. Τέλος, σε διάφορα πειράματα, η χορήγηση των αντιοξειδωτικών παραγόντων έγινε με τέτοιο τρόπο (π.χ. ανάδρομη υπό πίεση έγχυση από το στεφανιαίο κόλπο και τις αντίστοιχες προς την ισχαιμούσα περιοχή καρδιακές φλέβες) που αντίστοιχη εφαρμογή στην κλινική πράξη θεωρείται δύσκολη έως αδύνατη⁴¹³.

Οι συνθήκες και η τεχνική του πειράματος πρέπει να οπωσδήποτε να λαμβάνονται υπόψη στο σχεδιασμό και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Προκειμένου τα πειραματικά αποτελέσματα να έχουν κλινική σημασία είναι απαραίτητο οι συνθήκες του πειράματος να προσομοιάζουν όσο το δυνατό περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες.



Εικόνα 1. Συσσκευή Langendorff. Απομονωμένη πάλλουσα καρδιά ποντικίου υποστηριζόμενη από αντλία άρδευσης με ειδικό διάλυμα άρδευσης

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας και νοσηρότητας σε όλο το δυτικό κόσμο. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί τη σημαντικότερη και πιο επικίνδυνη έκφραση της στεφανιαίας νόσου καθώς σχετίζεται με υψηλά ποσοστά πρώιμης αλλά και αψώτερης θνησιμότητας και νοσηρότητας. Μεγάλες πολυκεντρικές κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η πρώιμη και αψώτερη πρόγνωση των ασθενών που νοσούν από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου καθορίζεται κυρίως από την έκταση του εμφραγματικής – νεκρωμένης περιοχής του μυοκαρδίου. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί μια οξεία και εξελισσόμενη διαδικασία νέκρωσης διάρκειας ωρών κατά την οποία όσο νωρίτερα αποκατασταθεί η αιμάτωση στην ισχαιμούσα μυοκαρδιακή περιοχή τόσο λιγότερη έκταση του μυοκαρδίου θα νεκρωθεί. Η κατά το δυνατό πιο πρώιμη αποκατάσταση αιματικής ροής στο αποφραγμένο στεφανιαίο αγγείο αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο περιορισμού της έκτασης της νεκρωμένης περιοχής σε ασθενείς που πάσχουν από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Παρόλο, που η πρώιμη επαναιμάτωση αποτελεί απόλυτη ένδειξη στην κλινική πράξη της αντιμετώπισης του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών θα υποστεί επιπλοκές που οφείλονται στην επαναιμάτωση, περιορίζοντας σημαντικά τα οφέλη της επαναιμάτωσης – φαρμακευτικής ή μηχανικής. Το «Σύνδρομο της Επαναιμάτωσης» είναι ένα πολύ καλά μελετημένο παράδοξο φαινόμενο το οποίο περιλαμβάνει ένα φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που εμφανίζονται αμέσως μετά την επαναιμάτωση. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι κακοήθεις αρρυθμίες επαναιμάτωσης, η προσωρινή απώλεια της συσταλτικής ικανότητας του μυοκαρδίου (“myocardial stunning”), η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων και της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας – που εκδηλώνεται κυρίως με απώλεια αιματικής ροής παρόλη την πλήρη εξάλειψη της υπεύθυνης για το έμφραγμα στένωση (no-reflow phenomenon), αλλά και ο κυτταρικός θάνατος. Παραδόξως, κατά την φάση της επαναιμάτωσης, μυοκαρδιακά κύτταρα τα οποία επιβίωσαν της ισχαιμίας, υφίστανται άμεσο ή προγραμματισμένο θάνατο μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής απόπτωσης.

Το φαινόμενο «κλειδί» στο Σύνδρομο Επαναιμάτωσης είναι η επανεισαγωγή μοριακού οξυγόνου στα ισχαιμούντα μυοκαρδιακά κύτταρα και η ελακόλουθη παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.) από τα κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων. Ένας εξαιρετικά μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών δεικνύουν ότι οι Δ.Μ.Ο. αποτελούν ίσως τους πιο σημαντικούς διαμεσολαβητές στην έκφραση του συνδρόμου της επαναιμάτωσης.

Κάποιες από τις Δ.Μ.Ο. όπως το ανιόν του υπεροξειδίου, η υδροξυλική ρίζα και το υπεροξείδιο του αζώτου είναι εξαιρετικά δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν *άμεση* κυτταρική βλάβη και θάνατο μέσω της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων της μεμβράνης. Επιπρόσθετα, σχετικά λιγότερο τοξικές Δ.Μ.Ο., όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μπορούν μέσω των μεταλλο - καταλυόμενων αντιδράσεων Fenton, κυρίως παρουσία ελευθέρων ιόντων Fe^{++} , να μετατραπούν σε εξαιρετικά τοξικές Δ.Μ.Ο. και να προκαλέσουν *έμμεση* κυτταρική καταστροφή. Οι μεταλλο-καταλυόμενες αντιδράσεις μέσω των οποίων ασθενείς Δ.Μ.Ο. μετατρέπονται σε τοξικές Δ.Μ.Ο. αποτελούν ένα καλά μελετημένο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στο βιολογικό ιστούς αλλά σε περιορισμένο βαθμό καθώς η ποσότητα των ελευθέρων μετάλλων στους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μικρή. Στο μυοκαρδιακό ιστό που υπόκειται σε ισχαιμία η ποσότητα των ελευθέρων μετάλλων είναι πολύ μεγαλύτερη, λόγω της καταστροφής των μυοκαρδιακών κυττάρων, και ως εκ τούτου οι αντιδράσεις Fenton αποτελούν ένα σημαντικό έμμεσο μηχανισμό περαιτέρω καταστροφής των μυοκαρδιακών κυττάρων.

Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός που συμμετέχει στο σύνδρομο επαναιμάτωσης είναι η *απώλεια της ενδογενούς αντιοξειδωτικής* άμυνας των ισχαιμούντων μυοκαρδιακών κυττάρων. Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η GSH ελαττώνεται σημαντικά τόσο κατά τη φάση ισχαιμίας όσο και της επαναιμάτωσης κάνοντας το κύτταρο πιο ευάλωτο στο οξειδωτικό φορτίο.

Προκειμένου να περιοριστεί η δράση των Δ.Μ.Ο. κατά τη φάση της επαναιμάτωσης πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη δράση διάφορων αντιοξειδωτικών ουσιών με ποικίλα αποτελέσματα. Δυστυχώς, πολλά από τα αντιοξειδωτικά, παρόλο που έδειξαν ότι μπορούν να περιορίσουν το σύνδρομο επαναιμάτωσης στις πειραματικές μελέτες, απέτυχαν να επαναλάβουν τα θετικά αποτελέσματα τους στις κλινικές μελέτες. Η πολυπλοκότητα του φαινομένου και ο σχεδιασμός των πειραματικών μοντέλων αποτελούν δύο από τους πιο σημαντικούς λόγους για αυτή την αποτυχία.

Δεδομένου του πολύπλοκου παθοφυσιολογικού και βιοχημικού υποστρώματος του συνδρόμου της επαναιμάτωσης είναι πολύ πιθανό ότι μία και μόνο αντιοξειδωτική ουσία δεν θα ήταν ικανή να αναστείλει όλους τους μηχανισμούς οξειδωτικής βλάβης. Αντίθετα, συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να αναστείλει τον οξειδωτικό «καταρράκτη» σε διαφορετικές θέσεις επιτυγχάνοντας καλύτερο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα. Επίσης, η σχεδίαση των πειραματικών μοντέλων θα

έπρεπε να είναι τέτοια ώστε να προσομοιάζουν τις πραγματικές κλινικές συνθήκες έτσι ώστε τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών να μπορούν να αξιολογηθούν για τη σχεδίαση κλινικών μελετών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ελέγξει την αποτελεσματικότητα της χορήγησης συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών (“cocktail of antioxidants”) σε πειραματικό μοντέλο που να προσομοιάζει τις πραγματικές κλινικές συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου όσο το δυνατόν καλύτερα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρεις γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες που δρουν σε διαφορετικά σημεία του παθοφυσιολογικού «καταρράκτη» του συνδρόμου επαναιμάτωσης: το ασκορβικό οξύ, η δεσφερριζαμίνη και η N- ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το ασκορβικό οξύ αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους εκκαθαριστές Δ.Μ.Ο. που μπορεί να εξουδετερώσει τις Δ.Μ.Ο. που παράγονται κατά τη φάση της επαναιμάτωσης και είναι υπεύθυνες για την άμεση κυτταρική καταστροφή. Η δεσφερριζαμίνη αποτελεί ισχυρό δεσμευτή των ελευθέρων ιόντων Fe⁺⁺ και με αυτό τον τρόπο μπορεί να αναστείλει τις αντιδράσεις Fenton. Η χορήγησή της στη φάση της επαναιμάτωσης θα μπορούσε να αναστείλει την έμμεση καταστροφή των μυοκαρδιακών κυττάρων. Τέλος, η NAC αποτελεί γνωστό αντιοξειδωτικό παράγοντα με διπλή δράση: άμεση εκκαθάριση Δ.Μ.Ο. και σημαντικό δότη θειολικών ομάδων. Ειδικότερα, η τελευταία δράση της είναι σημαντική για αποκατάσταση των μειωμένων συγκεντρώσεων GSH. Η χορήγηση της θα μπορούσε να ενισχύσει σημαντικά την ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα. Η βασική υπόθεση της μελέτης συνίσταται στο ότι η συνδυασμένη χορήγηση των τριών ουσιών αυτών θα είχε καλύτερα αποτελέσματα αφενός μόνο από τη χορήγηση εικονικού φαρμάκου, αφετέρου δε από τη μονήρη χορήγηση καθεμίας από τις παραπάνω ουσίες ξεχωριστά.

Βασική προϋπόθεση για την κλινική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσης μελέτης ήταν η βασική υπόθεση του πειράματος να ελεγχθεί σε ένα πειραματικό μοντέλο που να προσομοιάζει τις πραγματικές συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο στο οποίο τόσο η οδός χορήγησης των ουσιών όσο και ο χρόνος χορήγησης τους, σε σχέση με τη χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης, να αντιστοιχούν σε αντίστοιχες καταστάσεις της καθημερινής κλινικής αντιμετώπισης του εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Όπως συμβαίνει στη καθημερινή ιατρική πράξη η ενδοφλέβια οδός αποτελεί την πιο διαδεδομένη οδό χορήγησης ουσιών στις επείγουσες καταστάσεις. Η ενδοφλέβια οδός διαθέτει τα πλεονεκτήματα της άμεσης χορήγησης ουσιών και ταυτόχρονα την ταχείας αύξησης των επιπέδων της χορηγούμενης ουσίας στο αίμα. Για αυτό έχει καθιερωθεί σαν πρώτη οδός χορήγησης σε επείγουσες καταστάσεις όπως το οξύ

έμφραγμα του μυοκαρδίου. Παρόλο που στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί διάφορες οδοί χορήγησης των αντιοξειδωτικών ουσιών, στο παρόν πειραματικό μοντέλο επιλέχθηκε η ενδοφλέβια οδός, όπως ακριβώς θα γινόταν στη μεγαλύτερη πλειοψηφία των ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ο έλεγχος της δράσης των χορηγούμενων αντιοξειδωτικών ουσιών σε καταστάσεις ισχαιμίας / επαναιμάτωσης που είναι παρόμοιες με τις κλινικές συνθήκες.

Ο χρόνος χορήγησης των υπό εξέταση ουσιών επιλέχθηκε πάλι με γνώμονα τις πραγματικές συνθήκες ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Καθώς στην κλινική πράξη η έναρξη της ισχαιμίας του μυοκαρδίου δεν μπορεί να είναι γνωστή – εκτός από τις περιπτώσεις επιλεκτικής ισχαιμίας, όπως σε περιπτώσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης – η χορήγηση των υπό εξέταση ουσιών πριν από την έναρξη της ισχαιμίας δεν έχει κλινική σημασία. Στο παρόν πειραματικό μοντέλο επιλέχθηκε η χορήγηση των υπό εξέταση ουσιών να γίνει λίγα *min* πριν την επαναιμάτωση σε δόση τέτοια ώστε να επιτευχθεί ταχεία συγκέντρωση των ουσιών στο αίμα των πειραματόζωων. Με αυτό τον τρόπο η πιθανή αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να ελεγχθεί εύκολα και στην κλινική πράξη.

Τέλος, η μέθοδος πρόκλησης ισχαιμίας επιλέχθηκε να γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε τα πειραματόζωα να εκτίθενται σε όσο το δυνατό μικρότερο σωματικό stress προ της έναρξης της διαδικασίας ισχαιμίας / επαναιμάτωσης. Για αυτό τον λόγο επιλέχθηκε η διαδερμική μέθοδος πρόκλησης και άρσης ισχαιμίας με τη χρήση ενδοαυλικού καθετήρα αγγειοπλαστικής με μπαλόνι. Σε σχέση με την ανοιχτή θωρακοτομή και απολίνωση του στεφανιαίου αγγείου η μέθοδος προσφέρει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα: α) τα πειραματόζωα εκτίθενται σε σημαντικά μικρότερο οξειδωτικό stress καθώς δεν υπόκεινται στη διαδικασία ενός μείζονος χειρουργείου. Με αυτό τον τρόπο μετριάζεται σημαντικά η πιθανότητα παρεμβολής του οξειδωτικού stress που παράγεται από την μείζονα καρδιοχειρουργική επέμβαση στα αποτελέσματα της μελέτης και β) η διαδερμική και ενδοαυλική πρόκληση ισχαιμίας και επαναιμάτωσης προσομοιάζουν καλύτερα και τους δύο κλινικούς τρόπους επαναιμάτωσης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου: την μηχανική (πρωτογενής αγγειοπλαστική) και την φαρμακευτική θρομβόλυση. Η επέμβαση ανοιχτής θωρακοτομής με σκοπό την επείγουσα αορτοστεφανιαία παράκαμψη και αποκατάσταση της αιματικής ροής μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι εξαιρετικά σπάνια.

Το παρόν πειραματικό μοντέλο σχεδιάστηκε ώστε να συνδυάζει και τις 3 αυτές αρχές προσομοίωσης των πραγματικών συνθηκών ισχαιμίας / επαναιμάτωσης. Η ισχαιμία προκαλείται και αίρεται με τη χρήση ενδοαυλικού καθετήρα αγγειοπλαστικής τοποθετούμενο *διαδερμικά*, ενώ η χορήγηση των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών ουσιών

γίνεται με ταχεία ενδοφλέβια χορήγηση λίγο πριν την άρση της ισχαιμίας και την έναρξη της επαναιμάτωσης. Με βάση αυτό τον σχεδιασμό του πειραματικού πρωτοκόλλου επιτυγχάνεται η κατά το δυνατό καλύτερη προσομοίωση των κλινικών συνθηκών ισχαιμίας / επαναιμάτωσης έτσι ώστε τα αποτελέσματα της παρούσης πειραματικής μελέτης να αποτελέσουν οδηγό για την περαιτέρω κλινική έρευνα.

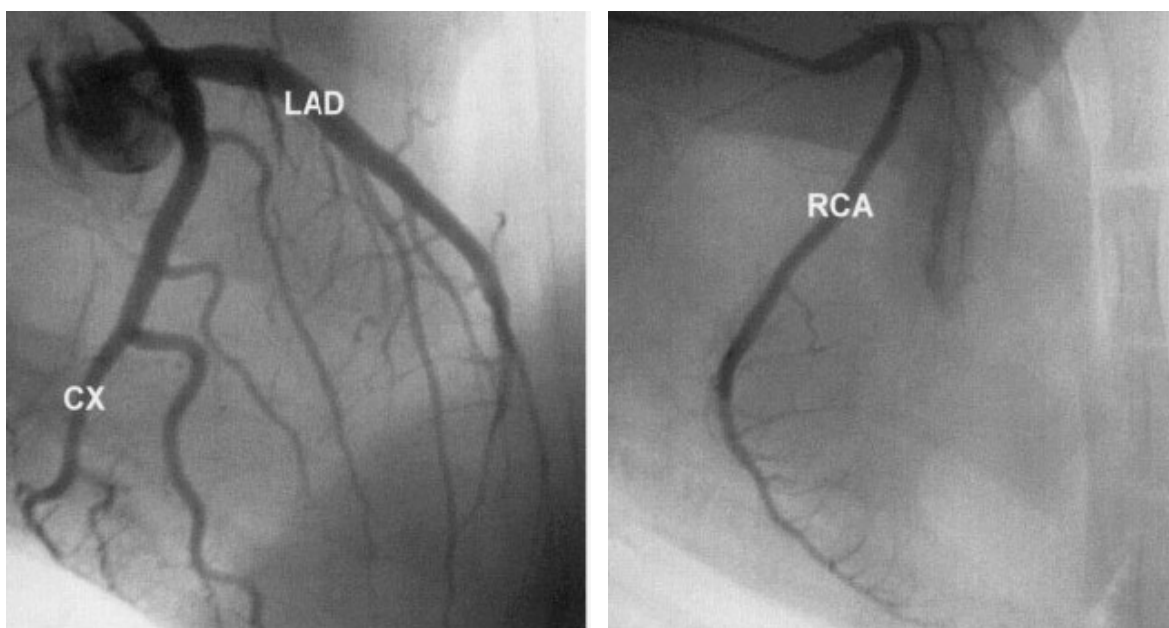
Επιλογή κατάλληλου πειραματόζωου

Στο παρόν πειραματικό μοντέλο, η προσομοίωση με τις πραγματικές συνθήκες εμφράγματος και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου που συναντώνται στην καθημερινή κλινική πράξη αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου τα αποτελέσματα της μελέτης να μπορούν να έχουν σαφή κλινική εφαρμογή. Για το σκοπό αυτό η επιλογή του κατάλληλου πειραματόζωου είναι πρωταρχικής σημασίας.

Ο σκύλος αποτελούσε παραδοσιακά το πειραματόζωο που ευρέως χρησιμοποιούνταν σε πειράματα ισχαιμίας του μυοκαρδίου. Εξαιτίας όμως του οικονομικού κόστους αλλά και της κοινωνικής ευαισθησίας προς τους σκύλους η χρήση τους σταδιακά εγκαταλείφθηκε και τα τελευταία χρόνια αντικαταστάθηκε από το χοίρο⁴⁴. Σήμερα, ο χοίρος αποτελεί ίσως το καταλληλότερο πειραματόζωο για την μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος και ίσως το ιδανικότερο για την μελέτη καταστάσεων ισχαιμίας και επαναιμάτωσης για τους λόγους που θα αναφερθούν πιο κάτω.

Γενικά, υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ του χοίρου και του ανθρώπινου οργανισμού κυρίως στην ανατομία και στην φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος. Ειδικότερα, η κατανομή των επικαρδιακών στεφανιαίων αγγείων του χοίρου προσομοιάζει αυτή του ανθρώπου. Υπάρχουν δύο στεφανιαίες αρτηρίες, η αριστερά και η δεξιά. Η αριστερή εκφύεται από τον αριστερό κόλπο του Valsava στη ρίζα της αορτής και μετά από σύντομη πορεία (Κύριο Στέλεχος - ΚΣ) διακλαδίζεται νωρίς στον Αριστερό Πρόσθιο Κατιόντα Κλάδο (ΑΠΚΚ) και στη Περισπωμένη αρτηρία (ΠΑ). Ακριβώς όπως και στον άνθρωπο, έτσι και στο χοίρο, ο ΑΠΚΚ αιματώνει κυρίως την περιοχή του προσθίου και του μεσοκοιλιακού τοιχώματος και η ΠΑ την μεγαλύτερη περιοχή του πλάγιου τοιχώματος. Η ΠΣ αρτηρία του χοίρου στην πορεία της κατά την κολποκοιλιακή αύλακα παρέχει 3-4 επιχείλιους κλάδους προς το πλάγιο τοίχωμα της αριστεράς κοιλίας, όπως και στο άνθρωπο. Από το δεξιό κόλπο του Valsava, εκφύεται η δεξιά στεφανιαία αρτηρία η οποία αιματώνει την περιοχή του κατώτερου τοιχώματος και της δεξιάς κοιλίας. Στον άνθρωπο, η Δεξιά στεφανιαία αρτηρία, μέσω του Οπισθίου Κατιόντα Κλάδου (ΟΚΚ) και των διαφραγματικών κλάδων του, αιματώνει μέρος του

μεσοκοιλιακού διαφράγματος, σε ποσοστό περίπου 80%. Στην περίπτωση αυτή η Δεξιά στεφανιαία αρτηρία (ΔΣΑ) ορίζεται ως επικρατούσα. Στο χοίρο, επικρατούσα δεξιά αρτηρία συναντάται σε ποσοστό μικρότερο από αυτό του ανθρώπου. (Εικ. 2) Τα στεφανιαία αγγεία του χοίρου έχουν διάμετρο από 2 έως 4mm, η οποία εξαρτάται από το βάρος και την ηλικία του πειραματόζωου. Στις μελέτες οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου οι χοίροι που συνήθως χρησιμοποιούνται ως πειραματόζωα είναι ηλικίας 3 έως 5 μηνών. Στην ηλικία αυτή το καρδιαγγειακό σύστημα είναι ώριμο και η διάμετρος των στεφανιαίων αγγείων προσομοιάζει αυτή του ανθρώπου ⁴¹⁵.



Εικόνα 2. Αγγειογραφικές εικόνες εκλεκτικού καθετηριασμού των στεφανιαίων αγγείων χοίρου (Πείραμα 2, Ομάδα C). Πανομοιότυπη ανατομία με αυτή του ανθρώπου. *LAD: Left anterior descending artery - ΑΠΚΚ, Cx: Circumflex artery - ΠΑ, RCA: Righth Coronary artery - ΔΣΑ*

Η φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος του χοίρου, και ειδικότερα αυτή της καρδιακής λειτουργίας και της στεφανιαίας κυκλοφορίας, είναι επίσης ίδια με αυτή του ανθρώπου. Οι βασικές αιμοδυναμικές παράμετροι και η καθ' υπέροχη διαστολική στεφανιαία κυκλοφορία στην αριστερή στεφανιαία αρτηρία είναι ίδιες στον άνθρωπο και στο χοίρο⁴¹⁶. Στο χοίρο η καρδιακή συχνότητα ηρεμίας κυμαίνεται από 80 – 110 παλμούς ανά λεπτό και εξαρτάται, όπως και στο άνθρωπο, από την ηλικία του ζώου – όσο μικρότερη η ηλικία του ζώου τόσο υψηλότερη η κατά λεπτό καρδιακή συχνότητα ⁴¹⁷. Παρόλο που η καρδιακή συχνότητα εξαρτάται από το βάρος και την ηλικία του

ζώου, το ίδιο δεν ισχύει και για τη μυοκαρδιακή μάζα τουλάχιστον σε ζώα μεγάλου βάρους. Στον άνθρωπο η μυοκαρδιακή μάζα εξαρτάται από το βάρος του σε αναλογία 5g/Kg βάρους σώματος (BΣ). Στους χοίρους βάρους μέχρι 30 Kg, η μυοκαρδιακή μάζα εξαρτάται από το βάρος του ζώου σε αναλογία παρόμοια με αυτή του ανθρώπου, αλλά σε ζώα μεγαλύτερου βάρους η αναλογία είναι περίπου η μίση (2,5 g/Kg BΣ).

Η χρήση του χοίρου σε πειράματα ισχαιμίας / επαναιμάτωσης προσφέρει ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με άλλα πειραματόζωα. Την πλήρη ή σχεδόν πλήρη απουσία παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου. Γενικά, η αντίδραση στο έμφραγμα του μυοκαρδίου αλλά και η έκταση της εμφραγματικής περιοχής εξαρτώνται από την παρουσία παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου. Άλλα ζώα, όπως ο σκύλος ή το ινδικό χοιρίδιο έχουν αρκετά ανεπτυγμένο παράπλευρο στεφανιαίο δίκτυο έτσι ώστε να παρέχεται κάποιο ποσοστό αιματικής ροής προς την εμφραγματική περιοχή κατά την διάρκεια της ισχαιμίας. Η ανάπτυξη του παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου δεν είναι ίδια σε όλα τα ζώα και ειδικότερα στο σκύλο παρουσιάζει σημαντική διακύμανση μεταξύ ζώων ίδιας φυλής και ηλικίας, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τις μετρήσεις της εμφραγματικής περιοχής για ίδια ζώα στο τέλος του πειράματος. Αντίθετα, ο χοίρος έχει ελάχιστα έως καθόλου ανεπτυγμένο παράπλευρο στεφανιαίο δίκτυο (<5% του συνολικού στεφανιαίου δικτύου) το οποίο, σε αντίθεση με άλλα ζώα, δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις σε ζώα όμοιας φυλής και ηλικίας⁴¹⁰. Η σχεδόν καθολική ανυπαρξία παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου αλλά και η ομοιογένεια της στεφανιαίας κατανομής και κυκλοφορίας μεταξύ ζώων ίδιας ηλικίας καθιστούν το χοίρο ως το ιδανικότερο πειραματόζωο για τη μελέτη του συνδρόμου ισχαιμίας / επαναιμάτωσης σε προ-κλινικό επίπεδο. Με τον τρόπο αυτό προσομοιάζονται καλύτερα οι πραγματικές καταστάσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου στις οποίες οι ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έχουν ελάχιστο ή καθόλου ανεπτυγμένο παράπλευρο δίκτυο.

Για την προσομοίωση, λοιπόν, καταστάσεων οξείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης ο χοίρος αποτελεί το καλύτερο πειραματόζωο και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε στη παρούσα πειραματική μελέτη. Αντίθετα, για τη μελέτη καταστάσεων χρόνιας ισχαιμίας, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν πιθανώς άλλα πειραματόζωα με καλά ανεπτυγμένο παράπλευρο δίκτυο όπως ο σκύλος, καθώς προσομοιάζουν καλύτερα τις καταστάσεις χρόνιας ισχαιμίας κατά τις οποίες οι ασθενείς έχουν κατά κανόνα έχουν αναπτύξει ώριμο παράπλευρο δίκτυο.

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε πειραματικό μοντέλο χοίρου ισχαιμίας – επαναιμάτωσης. Για την καλύτερη προσομοίωση των κλινικών συνθηκών της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (φαρμακευτικής ή μηχανικής) αποφασίστηκε η χρήση πειραματικού μοντέλου «κλειστού» θώρακα κατά το οποίο η ισχαιμία και η επαναιμάτωση επιτυγχάνεται με την διαδερμική και ενδοαυλική χρήση καθετήρων μπαλονιών χωρίς τα πειραματόζωα να εκτεθούν σε μείζονες επεμβάσεις θωρακοτομής (μοντέλα «ανοιχτού» θώρακα).

Γενικά η βασική αρχή της παρούσας πειραματικής μελέτης συνίσταται στην επίτευξη παρατεταμένης ισχαιμίας με την διαστολή ενδοαυλικών καθετήρων μπαλονιών και αποκλεισμό της αιματικής ροής ενός στεφανιαίου αγγείου με σκοπό την πρόκληση εμφράγματος. Στο τέλος της προκαθορισμένης περιόδου ισχαιμίας γίνεται άρση του αποκλεισμού του στεφανιαίου αγγείου και επίτευξη επαναιμάτωσης. Όπως και στις πραγματικές συνθήκες του εμφράγματος του μυοκαρδίου λίγο πριν την επίτευξη της επαναιμάτωσης γίνεται η ενδοφλέβια χορήγηση της υπό-εξέταση αντιοξειδωτικής ουσίας, του συνδυασμού αυτών ή φυσιολογικού ορού. Η αποτελεσματικότητα της κάθε αντιοξειδωτικής ουσίας ξεχωριστά ή ο συνδυασμός αυτών εκτιμήθηκε με την καταγραφή ποικίλων παραμέτρων καρδιακής λειτουργίας οι οποίοι σχετίζονται με το σύνδρομο επαναιμάτωσης όπως η συστολική λειτουργικότητα αριστεράς κοιλίας, βαθμονόμηση αιματικής επαναρροής στο αποφραγμένο αγγείο και οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Η αντιοξειδωτική δράση της κάθε ουσίας ή του συνδυασμού αυτών εκτιμήθηκε εμμέσως με τις τιμές συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου σε όλα τα πειραματόζωα. Τέλος, η έκταση της τελικής εμφραγματικής περιοχής – η οποία αποτελεί και το σημαντικότερο δείκτη βλάβης του μυοκαρδίου – μετρήθηκε με τη χρήση ειδικών παθολογοανατομικών τεχνικών ιστοτικής χρώσης.

Το ακριβές πειραματικό πρωτόκολλο καθώς και οι τεχνικές αναισθησίας, καθετηριασμού και επίτευξης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης καθώς και ο προσδιορισμός των κλινικών, βιοχημικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων που σχετίζονται με τη βλάβη από επαναιμάτωση περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

Προετοιμασία – εγκλεισμός πειραματόζων

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής μελέτης επιλέχθηκαν άρρενες χοίροι ηλικίας 3- 5 μηνών και βάρους 30 -35 Kg οι οποίοι εκτράφηκαν ειδικά για το σκοπό αυτό σε σύγχρονο εκτροφείο χοίρων. Πριν από κάθε πείραμα, κάθε πειραματόζωο φυλάσσονταν σε ξεχωριστό κλουβί στο ειδικό τμήμα προσωρινής φύλαξης πειραματόζων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για ένα 24ώρο. Με το τρόπο αυτό γινόταν ο κατάλληλος εγκλιματισμός του ζώου. Τα ζώα στερούνταν ξηράς τροφής για 12 ώρες και νερού για 4 ώρες προκειμένου να μπορούν να υποβληθούν σε ασφαλή διασωλήνωση και πλήρη αναισθησία από την έναρξη μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος.

Πρωτόκολλο αναισθησίας

Όλα τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε προαναισθησία με την ενδομυϊκή χορήγηση Azaperone (4mg/Kg) και Ketamine (5mg/Kg) 1 περίπου ώρα πριν την έναρξη του πειράματος⁴¹⁸. Μετά την μερική αναισθητοποίηση των πειραματόζων, τοποθετούνταν φλεβοκαθετήρας ευρείας διαμέτρου (18G) σε επιφανειακή φλέβα του αυτιού, για την έγχυση των αναισθητικών ουσιών. Ολική αναισθησία επιτυγχάνονταν με την ενδοφλέβια (i.v.) χορήγηση Pentothal (7mg/Kg). Με την εγκατάσταση πλήρους αναισθησίας, γινόταν διασωλήνωση του πειραματόζωου για την επίτευξη μηχανικής υποστήριξης της αναπνοής με τη βοήθεια αναπνευστήρα πίεσης – όγκου (Engstrom model 200, Engstrom, Sweden) με μείγμα οξυγόνου και αέρα (1:2), συχνότητα αναπνοών 14 -16 /min και αναλογία εισπνοής/εκπνοής 1:2. Η όγκος αερισμού είχε καθοριστεί στα 200-300ml/Kg/min και θετική τελοεκπνευστική πίεση στα 3-4 cm H₂O. Η αναισθησία διατηρούνταν με την συνεχή χορήγηση πτητικών αναισθητικών Sevofluran 1% και την περιοδική χορήγηση i.v. Fentanyl citrate (20μg/Kg) και Vecuronium Bromide (0.1mg/Kg). Ο μηχανικός αερισμός και η χορήγηση των πτητικών και ενδοφλέβιων αναισθητικών γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε να τόσο η αιμοδυναμική κατάσταση όσο και τα αέρια αίματος να διατηρούνται εντός των φυσιολογικών ορίων όπως ορίζει το πειραματικό πρωτόκολλο. Ζωτικά σημεία, ΗΚΓ και αέρια αίματος παρακολουθούνταν και καταγράφονταν καθ' όλη την διάρκεια του πρωτοκόλλου. Ηλεκτροκαρδιογραφική καταγραφή άρχιζε με την προαναισθησία του ζώου και συνεχίζονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε ταχύτητα χάρτου 25mm/sec.

Επεμβατική προετοιμασία του πειραματοζώου

Αμέσως μετά την πλήρη αναισθησία του πειραματοζώου, γίνονταν χειρουργική αποκάλυψη της δεξιάς έσω σφαγιτιδας φλέβας και τοποθέτηση θηκαριού διαμέτρου 7Fr με την χρήση ατραυματικής βελόνας παρακέντησης και οδηγού σύρματος διαμέτρου 0,035`` κατά την τεχνική Seldinger. Ένας διαγνωστικός καθετήρας Multipurpose 7Fr (HighFlow, Cordis Co., Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE), χρησιμοποιούνταν για τον καθετηριασμό του στεφανιαίου κόλπου. Η επιβεβαίωση της σωστής θέσης του καθετήρα γίνονταν με τη χρήση εκλεκτικής αγγειογραφίας του στεφανιαίου κόλπου. Ο καθετήρας τοποθετούνταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μέσα στο στεφανιαίο κόλπο για την συλλογή δειγμάτων αίματος για την μέτρηση της οξειδωτικού φορτίου μέσω του προσδιορισμού των TBARS. Ο καθετήρας τοποθετούνταν σε τέτοια θέση ώστε να επιτρέπεται η απροβλημάτιστη και αβίαστη συλλογή δειγμάτων αίματος με σκοπό την ελαχιστοποίηση της αιμόλυσης του αίματος προς ανάλυση. Ακολούθως, γινόταν διαδερμική παρακέντηση αμφοτέρων των μηριαίων αρτηριών με την χρήση της τεχνικής Seldinger, στις οποίες τοποθετήθηκαν θηκάρια διαμέτρου 7Fr στη δεξιά μηριαία αρτηρία και 6Fr στην αριστερή. Αμέσως μετά, γινόταν ηπαρινισμός του πειραματοζώου με τη χορήγηση ενδαρτηριακά ηπαρίνης 300 IU/Kg με σκοπό την διατήρηση του ενεργοποιημένου χρόνου πήξης (Active Clotting Time - ACT) μεταξύ 250-300 secs καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Υπό ακτινοσκόπηση, ένας διαγνωστικός καθετήρας τύπου PigTail 6Fr (SuperTorque, Cordis Co., Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE), κατευθυνόμενος πάνω σε οδηγό σύρμα 0,035" (Starter, Cordis Co., Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE), οδηγείται στην Αριστερή κοιλία του πειραματοζώου για την συνεχή μέτρηση της τελοδιαστολικής πίεσης της Αριστεράς κοιλίας (Left Ventricular End Diastolic Pressure -LVEDP) και για την εκτέλεση Αριστεράς κοιλιογραφίας. Το στέλεχος της Αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας καθετηριάζονταν εκλεκτικά με τη χρήση οδηγού καθετήρα αγγειοπλαστικής τύπου Hockey-Stick 7Fr (VistaBrite Tip, Cordis Co., Johnson & Johnson Med. Co., Waterloo, BE).

Πρωτόκολλο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών (Σχ. 9)

Μετά την προετοιμασία του πειραματοζώου και την πάροδο 1 ώρας για την σταθεροποίηση του πειραματοζώου, γίνονταν τυχαιοποίηση των πειραματοζώων σε μία από τις 5 υπό εξέταση ομάδες:

- Ομάδα A: έλαβε ασκορβικό οξύ (ascorbic acid) σε δόση 100mg/Kg
- Ομάδα B: έλαβε δεσφερριοξαμίνη (desferrioxamine) σε δόση 60mg/Kg
- Ομάδα C: έλαβε N-ακετυλ-κυστεΐνη (N-acetylcysteine, NAC) σε δόση φόρτισης 100 mg/Kg και μετά σε δόση συντήρησης 20 mg/Kg
- Ομάδα D: έλαβε τον συνδυασμό των παραπάνω φαρμάκων στις δόσεις που αναφέρονται (cocktail of antioxidants)

- Ομάδα E: έλαβε φυσιολογικό ορό και αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (control group).

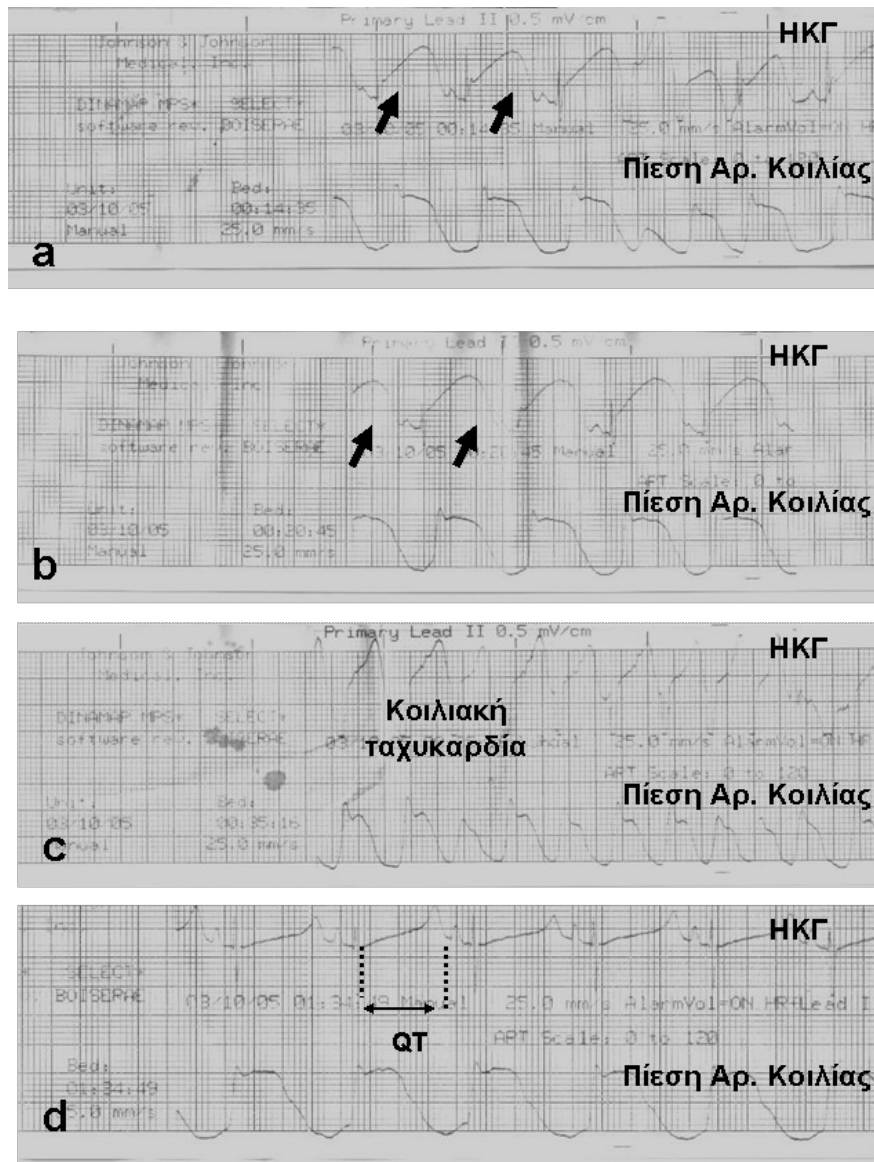
Η τυχαιοποίηση έγινε με βάση την χρονολογική σειρά των πειραμάτων. Το 1^ο πείραμα ορίστηκε να λάβει ασκορβικό οξύ (ομάδα A), το 2^ο να λάβει δεσφερριοξαμίνη (ομάδα B) και ούτω καθ' εξής. Μετά το τέλος του 1^{ου} κύκλου πειραμάτων, όπου τα πειραματόζωα έλαβαν όλες τις υπό εξέταση θεραπευτικές ουσίες, η τυχαιοποίηση των πειραματόζωων άρχιζε από την αρχή (π.χ. πειραματόζωο 6 έλαβε εκ νέου ασκορβικό οξύ, τα πειραματόζωο 7 έλαβε δεσφερριοξαμίνη κλπ). Σε περίπτωση θανάτου του πειραματόζωου κατά τη φάση της ισχαιμίας ή της επαναιμάτωσης αλλά πρό της συμπλήρωσης του πρωτοκόλλου, θεωρείται ότι το πείραμα δεν είχε ολοκληρωθεί και ως εκ τούτου το επόμενο πειραματόζωο ελάμβανε την υπό-εξέταση ουσία του προηγούμενου χωρίς τυχαιοποίηση. Παρόλο που αυτός ο τρόπος είναι ατελής όσον αφορά την τυχαιοποίηση των πειραματόζωων σε περίπτωση θανάτου προ της συμπλήρωσης του πρωτοκόλλου, είναι κατάλληλος προκειμένου να εξασφαλισθεί ο ίσος αριθμός πειραμάτων ανά ομάδα εξέτασης.

Όλα τα πειραματόζωα έλαβαν την υπό εξέταση θεραπευτική αγωγή i.v. διαλυμένη σε φυσιολογικό όρο 0.9%. Ο συνολικός όγκος του θεραπευτικού διαλύματος που χορηγήθηκε ήταν ίσος με 100ml και ίδιος για όλες τις ομάδες πειραματόζωων. Ο συνολικός χρόνος έγχυσης της υπό εξέταση θεραπευτικής αγωγής ήταν κοινός για όλες τις ομάδες και ίσος με 20min, εκτός από την ομάδα C στην οποία ο συνολικός χρόνος έγχυσης ήταν 75min. Η έναρξη έγχυσης των ουσιών ξεκινούσε κατά την φάση της ισχαιμίας, 20min πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης και συνεχίζονταν μέχρι και τα πρώτα 5min μετά την επαναιμάτωση σε όλες τις ομάδες, εκτός της ομάδα C. Στη τελευταία, γινόταν χορήγηση της NAC σε δόση φόρτισης για τα πρώτα 20min και σε δόση συντήρησης για τα υπόλοιπα 60min. Ο διαφορετικός αυτός τρόπος χορήγησης της NAC βασίστηκε σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες κατά τις οποίες η NAC έδειξε προστατευτικά αποτελέσματα στο σύνδρομο επαναιμάτωσης όταν χορηγήθηκε παρατεταμένα, σε δόση φόρτισης στην αρχή και συντήρησης στη συνέχεια^{345, 419}.

Η ισχαιμία επιτεύχθηκε ενδοαυτικά με την διαστολή ενός καθετήρα – μπαλονιού αγγειοπλαστικής διαστάσεων 2.5 x 10 mm που τοποθετήθηκε στη μεσότητα της περισπωμένης αρτηρίας του πειραματόζωου οδηγούμενο πάνω σε σύρμα-οδηγό αγγειοπλαστικής 0,014". Με τη διαστολή επιτυγχάνονταν πλήρης απόφραξη της αρτηρίας και αποκλεισμός της ροής του αίματος με συνέπεια την καθολική ισχαιμία στη περιοχή που αιματώνεται από το 2^ο ήμισυ της περισπωμένης αρτηρίας. Η πλήρης απόφραξη της αρτηρίας επιβεβαιώνονταν με εκλεκτική στεφανιογραφία κατά την οποία, η περιφέρεια του αγγείου πέραν του διατεταμένου μπαλονιού δεν σκιαγραφούταν. Ταυτόχρονα, η παρουσία ανασπάσεων του διαστήματος ST στο ΗΚΓ αποτελούσε ένδειξη διατοίχωματικής ισχαιμίας (Εικ. 3). Η συνδυασμένη παρουσία αγγειογραφικών σημείων ολικής απόφραξης της περισπωμένης αρτηρίας και ηλεκτροκαρδιογραφικών ενδείξεων ανάσπασης του ST διαστήματος αποτελούσε

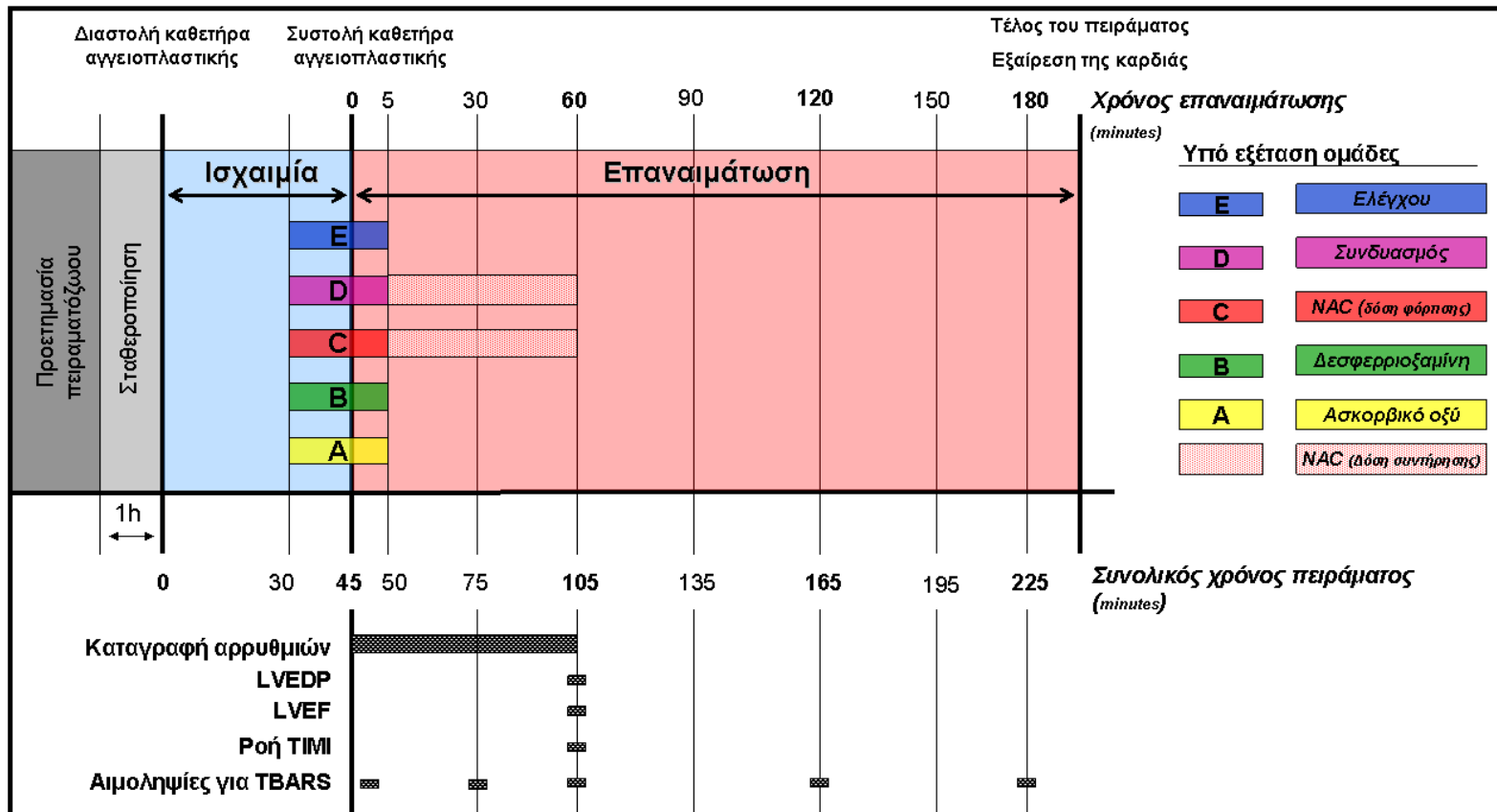
απαραίτητο κριτήριο διατοιχωματικής ισχαιμίας και απαραίτητη προϋπόθεση για τη συνέχιση του πειράματος.

Μετά την πάροδο 45 min (περίοδος ισχαιμίας) γινόταν συστολή του μπαλονιού με την χρήση αρνητικής πίεσης και απόσυρσή του από το στεφανιαίο αγγείο που σηματοδοτούσε την έναρξη της περιόδου της επαναιμάτωσης, διάρκειας 210 min.



Εικόνα 3. Σειρά ηλεκτροκαρδιογραφημάτων (ΗΚΓ) με ταυτόχρονη καταγραφή της LVEDP.

a. Έναρξη ισχαιμίας. Χαρακτηριστικές ανασπάσεις του ST διαστήματος. b. επιδείνωση των ανασπάσεων ST μετά 45min ισχαιμίας. c. Εμφάνιση κοιλιακής ταχυκαρδίας (VT) αμέσως μετά την επαναιμάτωση. d. ομαλοποίηση του ΗΚΓ στο τέλος της περιόδου της επαναιμάτωσης. Χαρακτηριστική η παράταση του QT διαστήματος.



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου της παρούσας πειραματικής μελέτης. Στο σχήμα υποδεικνύονται οι χρόνοι εκτέλεσης του πειράματος, η διάρκεια της περιόδου της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης, οι χρόνοι χορήγησης των διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών και του συνδυασμού τους καθώς και οι χρόνοι παρακολούθησης των αρρυθμιών, των τιμών της καρδιακής λειτουργίας (LVEDP, LVEF, TIMI flow). Τέλος επισημαίνονται οι χρόνοι λήψης των δειγμάτων αίματος από το στεφανιαίο κόλπο για την εκτίμηση του οξειδωτικού stress (TBARS blood samples).

Καταγραφή των αρρυθμιών επαναιμάτωσης και της LVEDP – εκτίμηση της συστολικής λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας και της στεφανιαίας ροής μετά την επαναιμάτωση.

Καθ' όλη τη διάρκεια των πρώτων 60 min μετά την επαναιμάτωση γινόταν συνεχής καταγραφή όλων των κοιλιακών αρρυθμιών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται: κοιλιακή μαρμαρυγή (Ventricular fibrillation – VF), εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία (Sustained Ventricular Tachycardia - SVT), μη-εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία (non-sustained Ventricular Tachycardia - NSVT) και ο ιδιοκοιλιακός ρυθμός (idioventricular rhythm). Η SVT για το τερματισμό της οποίας απαιτήθηκε καρδιομετατροπή με ηλεκτρική απινίδωση θεωρείται παρόμοιας σοβαρότητας με την VF και για αυτό το λόγο αποφασίστηκε να καταγράφεται μαζί με τις VF (VF/SVT).

Για την εκτίμηση της συνολικής λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της LVEDP. Η άμεση, επεμβατική μέτρηση της LVEDP αποτελεί αποδεδειγμένο δείκτη δυσλειτουργίας της αριστεράς κοιλίας που έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος πειραματικών και κλινικών μελετών⁴²⁰⁻⁴²². Η μέτρηση της LVEDP γινόταν πριν ακριβώς την έναρξη της ισχαιμίας (τιμή αναφοράς) και στα 60 min μετά την επαναιμάτωση. Την ίδια ακριβώς χρονική στιγμή (60 min μετά την επαναιμάτωση) γινόταν Αριστερή κοιλιογραφία σε Δεξιά Πρόσθια Λοξή προβολή 30° (Right Anterior Oblique - RAO) για την εκτίμηση της συνολικής συστολικής ικανότητας της Αριστεράς κοιλίας καθώς και των τμηματικών διαταραχών κινητικότητας που προέκυπταν μετά το προκληθέν έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η εκτίμηση της συστολικής ικανότητας, γινόταν με τον υπολογισμό του κλάσματος εξώθησης της Αριστεράς κοιλίας (Left Ventricular Ejection Fraction - LVEF), το οποίο προσδιορίζονταν μετά το τέλος του πειράματος από ανεξάρτητο παρατηρητή ο οποίος δεν είχε γνώση της ομάδας που είχε τυχαιοποιηθεί το πειραματόζωο. Η ακριβής μέτρηση του LVEF έγινε με τη χρήση ειδικού προγράμματος εκτίμησης των αγγειογραφικών εικόνων (CAAS, Pie Medical, Maastrich, The Netherlands). Επισημαίνεται ότι οι μετρήσεις της LVEDP γίνονταν πριν την εκτέλεση της κοιλιογραφίας έτσι ώστε οι μετρήσεις να μην επηρεάζονται από την υπερφόρτωση όγκου και πίεσης καθώς και την δράση του σκιαγραφικού κατά την κοιλιογραφία.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η βλάβη του ενδοθηλίου και η επίδραση που έχει το σύνδρομο επαναιμάτωσης στη ροή του αποφραγμένου αγγείου, μετά την αποκατάσταση ροής στο αγγείο γινόταν στεφανιογραφία και εκτίμηση της ροής στο αγγείο σύμφωνα με την ταξινόμηση TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction – TIMI classification)⁴²³. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά TIMI η ροή στο αγγείο βαθμολογείται ως εξής:

- ροή TIMI 0 = ολική απόφραξη χωρίς ροή μετά το σημείο απόφραξης,

- ροή *TIMI 1* = αργή και ατελής σκιαγράφιση του αγγείου περιφερικότερα του σημείου απόφραξης,
- ροή *TIMI 2* = αργή αλλά πλήρης σκιαγράφιση του αγγείου μέχρι το τελικό τμήμα του,
- ροή *TIMI 3* = φυσιολογική σκιαγράφιση μέχρι το τελικό τμήμα του αγγείου.

Ανάλογα με την αγγειογραφική εικόνα της ροής στη περισπωμένη αρτηρία μετά την επαναιμάτωση, το πειραματόζωο βαθμολογούταν με 0 – 3 σύμφωνα με την κατάταξη κατά TIMI. Άριστη αποκατάσταση ροής μετά την επαναιμάτωση ορίστηκε η επίτευξη ροής TIMI 3. Η εκτίμηση της ροής με στεφανιογραφία γινόταν στα 60 min μετά την επαναιμάτωση.

Υπολογισμός της μυοκαρδιακής περιοχής σε κίνδυνο και της εμφραγματικής (νεκρωτικής) περιοχής του μυοκαρδίου

Ο πιο σημαντικός παθολογοανατομικός και κλινικός δείκτης βλάβης από το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι η έκταση της εμφραγματικής – νεκρωτικής περιοχής. Η έκταση του εμφράγματος μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς καθιερωμένους παράγοντες που καθορίζουν την πρόγνωση των ασθενών μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου^{424, 425}. Η κατά το δυνατό ελάττωση της έκτασης του εμφράγματος αποτελεί τον πρώτιστο στόχο σε κάθε θεραπεία επαναιμάτωσης, φαρμακευτική ή μηχανική, στους ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Στις πειραματικές μελέτες ισχαιμίας / επαναιμάτωσης η εκτίμηση της τελικής νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου μετά την επαναιμάτωση αποτελεί το πιο ισχυρό καταληκτικό σημείο. Προκειμένου να επιτευχθεί ακριβής σύγκρισή της εμφραγματικής περιοχής σε πειραματόζωα που έλαβαν θεραπεία για την μετρίαση των αποτελεσμάτων του συνδρόμου με αυτά που δεν έλαβαν (placebo) έχει βιβλιογραφικά καθιερωθεί ο υπολογισμός του ποσοστού της τελικά εμφραγματικής μυοκαρδιακής περιοχής (infracted area - I) σε σχέση με την περιοχή που ήταν σε κίνδυνο να νεκρωθεί (area at Risk - R) κατά την διάρκεια του εμφράγματος. Ο λόγος I/R είναι ο πλέον καθιερωμένος δείκτης έκτασης εμφράγματος που χρησιμοποιείται στις μελέτες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης¹⁶. Ο δείκτης I/R αποτέλεσε το σημαντικότερο καταληκτικό σημείο έκτασης του εμφράγματος στη παρούσα πειραματική μελέτη. Ο προσδιορισμός της περιοχής σε κίνδυνο (R) και της εμφραγματικής περιοχής (I) καθώς και ο λόγος I/R, μετά το πέρας του πειράματος περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Για την πιο αξιόπιστη εκτίμηση της έκτασης της εμφραγματικής περιοχής μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου χρησιμοποιήσαμε την τεχνική χρώσης με 2, 3, 5-

triphenyl tetrazolium chloride (TTC)^{426, 427}. Η τεχνική βασίζεται στην ικανότητα του TTC να συνδέεται σταθερά και μόνιμα με δεϋδρογονάσες των ιστών σχηματίζοντας σύμπλοκα άλατα του TTC (tetrazolium salts) που φέρουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα «του κεραμιδιού». Δεδομένου ότι οι δεϋδρογονάσες αποτελούν ένζυμα που βρίσκονται ακέραια στο ζωντανό μυοκαρδιακό ιστό η σύνδεση του με το TTC χρωματίζει την αντίστοιχη περιοχή με το χαρακτηριστικό «κόκκινο του κεραμιδιού». Αντίθετα, η περιοχή του μυοκαρδίου που δεν θα έχει το χαρακτηριστικό χρώμα «κόκκινο του κεραμιδιού» θα αντιστοιχεί στην εμφραγματική περιοχή⁴²⁸.

Μετά το τέλος της περιόδου επαναϊμάτωσης (210 min) το μπαλόνι αγγειοπλαστικής επανατοποθετούνταν στη περισπωμένη αρτηρία του πειραματόζωου και διαστέλλονταν με σκοπό την επαναπόφραξη του αγγείου σε σημείο ίδιο με αυτό που είχε προκληθεί το έμφραγμα. Η ακριβής επανατοποθέτηση του μπαλονιού γινόταν χρησιμοποιώντας του επιχείλιους κλάδους του αγγείου ως οδηγιά σημεία. Μετά, χρωστική ουσία Evans Blue 2%, σε δόση 2ml/Kg, εγχέονταν ταχύτατα στην Αριστερά κοιλία της πάλλουσας καρδιάς του πειραματόζωου διαμέσου του καθετήρα 6Fr Pigtail που βρισκόταν στην Αριστερή κοιλία του ζώου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Με αυτό τον τρόπο, ολόκληρη η καρδιά του πειραματόζωου βαφόταν σε χρώμα κυανό εκτός της περιοχής που αντιστοιχούσε στην περιοχή που υπόκειντο σε ισχαιμία (περιοχή σε κίνδυνο - R) καθώς το διασταλμένο μπαλόνι απέκλειε από την κυκλοφορούσα χρωστική την περιοχή αυτή. Τρία (3) min μετά την έγχυση της χρωστικής ουσίας Evans Blue, το πειραματόζωο θυσιάζονταν ακαριαία με ενδοκαρδιακή ταχεία έγχυση διαλύματος KCl εντός της αριστερής κοιλίας. Η ευθανασία με ενδοκαρδιακή έγχυση KCl αποτελεί διαδεδομένη μέθοδο ευθανασίας σε πλήρως αναισθητοποιημένα πειραματόζωα και προκαλεί ακαριαίο και μη επώδυνο θάνατο⁴²⁹.

Αμέσως μετά την επέλευση του θανάτου και της παύσης της καρδιακής λειτουργίας, γινόταν ανοιχτή θωρακοτομή και ταχύτατη εξαίρεση της καρδιάς. Με τη χρήση χειρουργικής λεπίδας γινόταν εξαίρεση της Δεξιάς κοιλίας και των κόλπων της καρδιάς, και διατομή της παραμένουσας Αριστεράς κοιλίας από τη βάση προς την κορυφή σε τομές πάχους 0.5cm. Τα τεμάχια της καρδιάς του κάθε πειραματόζωου αποστέλλονταν άμεσα σε ομάδα του τμήματος Ιατροδικαστικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που ήταν υπεύθυνη για την προετοιμασία και χρώση των τεμαχίων και τον προσδιορισμό της εμφραγματικής περιοχής του μυοκαρδίου και της περιοχής σε κίνδυνο, αντίστοιχα. Η Ιατροδικαστική ομάδα δεν είχε γνώση σχετικά με την ομάδα που άνηκε το πειραματόζωο και το θεραπευτικό σχήμα που είχε λάβει. Η περιοχή σε κίνδυνο (R) αναγνωρίζονταν ως η περιοχή του μυοκαρδίου που δεν είχε βαφτεί σε χρώμα κυανό. Σε κάθε τεμάχιο η περιοχή αυτή περιγράφονταν με την ινδική μελάνη, ώστε να είναι εμφανής και μετά τον εμβалτισμό των τεμαχίων σε TTC. Μετά, τα

τεμάχια εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα 1% TTC για 30 min στους 37° C. Η θερμοκρασία εμβαπτισμού διατηρούνταν σταθερή με τη χρήση ειδικού υδατόλουτρου ρυθμιζόμενης και σταθερής θερμοκρασίας.

Στο τέλος αυτής της διαδικασίας 2 διαφορετικού χρώματος περιοχές αναγνωρίζονταν μέσα στη περιοχή σε κίνδυνο (R): η κεχρωσμένη με TTC περιοχή με το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα «του κεραμιδιού» που αντιστοιχεί στην περιοχή του μυοκαρδίου που παρέμεινε βιώσιμη, και την μη κεχρωσμένη με TTC περιοχή που αντιστοιχεί στην εμφραγματική – νεκρωμένη περιοχή του μυοκαρδίου (Εικ. 4). Τα τεμάχια φωτογραφίζονταν με ψηφιακή κάμερα υψηλής ανάλυσης (Nikon Coolpix 4300, ανάλυση φώτο-αισθητήρα 4 Mpixels). Η επιφάνεια της εμφραγματικής περιοχής (I) και της περιοχής σε κίνδυνο (R) μετριούνταν με ειδικό ψηφιακό πρόγραμμα H/Y (UTSHCA- Image Tool / Shareware Software) πάνω στις ψηφιακές φωτογραφίες κάθε τεμαχίου. Το εμβαδό κάθε περιοχής πολλαπλασιάζονταν με το πάχος του τεμαχίου (0.5 cm) υπολογίζοντας τον όγκο σε κάθε τεμάχιο. Αθροίζοντας τους όγκους για την καρδιά κάθε πειραματόζωου, υπολογίζονταν ο συνολικός όγκος της εμφραγματικής περιοχής (I) και της περιοχής σε κίνδυνο (R). Ο λόγος I/R καθόριζε το ποσοστό της περιοχής σε κίνδυνο που είχε τελικά νεκρωθεί. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η κανονική κατανομή των μετρήσεων ο λόγος του συνολικού όγκου της περιοχής σε κίνδυνο σε σχέση με τον συνολικό όγκο της Αριστεράς κοιλίας (LV volume) του πειραματόζωου καθορίστηκε. Με αυτό τον τρόπο μπορούσαν να προσδιοριστούν πειραματόζωα τα οποία υπέστησαν συνολικά εκτεταμένο έμφραγμα του μυοκαρδίου – ασχέτως του λόγου I/R . Στα πειραματόζωα αυτά η απροσδόκητα μεγάλη έκταση του εμφράγματος θα μπορούσε να επηρεάσει τους δείκτες συστολικής και διαστολικής λειτουργικότητας και να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Αποφασίστηκε ότι τυχόν πειράματα με μεγάλο λόγο R/LV volume θα αποκλείονταν από τη τελική στατιστική ανάλυση.

Μέτρηση οξειδωτικού φορτίου

Η εκτίμηση του οξειδωτικού φορτίου έγινε με την μέτρηση των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου. Η ποσότητα των TBARS που ανιχνεύεται στους βιολογικούς ιστούς ή στο αίμα αποτελεί ένα έμμεσο δείκτη οξειδωτικού φορτίου που χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικές και κλινικές μελέτες^{383, 430, 431}. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των TBARS στο αίμα του στεφανιαίου κόλπου έγινε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια του πειράματος έτσι ώστε να προσδιοριστεί πέραν της απολύτου τιμής συγκέντρωσης τους και η κινητική τους μετά την επαναιμάτωση. Το 1^ο δείγμα λαμβάνονταν τη χρονική στιγμή 0 min μετά τον καθετηριασμό του στεφανιαίου κόλπου και ακριβώς πριν την έναρξη της περιόδου της ισχαιμίας. Με την άρση της ισχαιμίας και την έναρξη της επαναιμάτωσης δείγματα αίματος λαμβάνονταν την χρονική στιγμή 2 min,

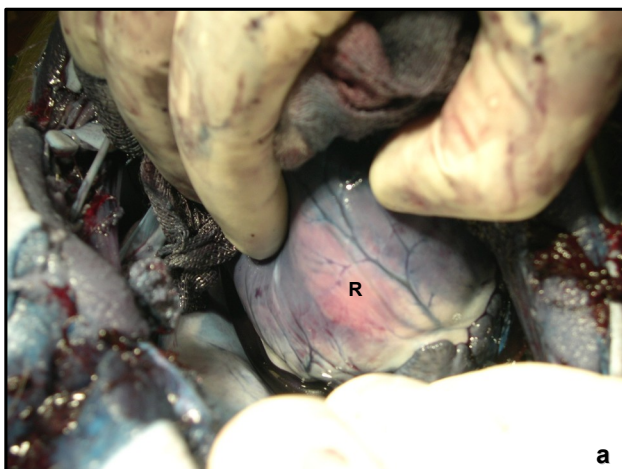
30 min, 60 min, 120 min και 180 min (Σχ.9). Η αναρρόφηση του αίματος γινόταν βραδέως και προσεκτικά έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος αιμόλυσης. Τα δείγματα μεταγγίζονταν προσεκτικά σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Όλα τα δείγματα τοποθετούνταν σε πάγο και μεταφέρονταν άμεσα στο τμήμα Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων όπου υπόκειντο σε φυγοκέντρωση στους 4°C για 15 min προκειμένου να διαχωριστεί ο ορός από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Ακολούθως, ο απομονωμένος ορός αίματος συλλέγονταν με μικρή πιπέτα, μεταγγίζονταν σε σωληνάκια τύπου Eppendorf και φυλάσσονταν σε βαθειά κατάψυξη (-80 °C) μέχρι την τελική επεξεργασία της μέτρησης των TBARS.

Η συγκέντρωση των TBARS προσδιορίζονταν με την μέθοδο φασματοσκοπίας φθορισμού που έχει τελειοποιηθεί από τους Wasowicz W et al⁴³². Συγκεκριμένα, 50μL ορού διαλύονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρητικότητας 10ml που περιέχουν 1ml αποσταγμένο H₂O. Μετά προστίθενται 1ml από ένα διάλυμα που περιείχε 20 mmol/l θειο-βαρβιτουικό οξύ (thio-barbituric acid - TBA) και acetic acid (AA) για να επιτευχθεί το επιθυμητό pH για την αντίδραση, το οποίο έπρεπε να είναι μεταξύ 2.4 – 2.6. Γινόταν ανάδευση και θέρμανση του διαλύματος επί 1 ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 95-100°C και έπειτα αναμονή επί 30 min προκειμένου να επανέλθει η θερμοκρασία του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά προστίθενται 25μL από διάλυμα HCL (5mol/L) έτσι ώστε να επιτευχθεί το τελικό pH του διαλύματος που έπρεπε να είναι 1.6-1.7. Γινόταν προσθήκη 3.5 ml n-butanol και ανάδευση επί 5 min. Η φάση της βουτανόλης αφαιρούταν μετά από φυγοκέντρωση του διαλύματος 1500 x g για 10 min. Ακολουθούσε η ανάλυση φασματοσκοπίας φθορισμού της αφαιρούμενης φάσης της βουτανόλης με φασματοσκοπική συσκευή Perkin – Elmer (Model 204; Perkin – Elmer, Norwalk, CT) σε μήκος κύματος 525 nm για διέγερση και 547 nm για εκπομπή.

Εικ. 4.

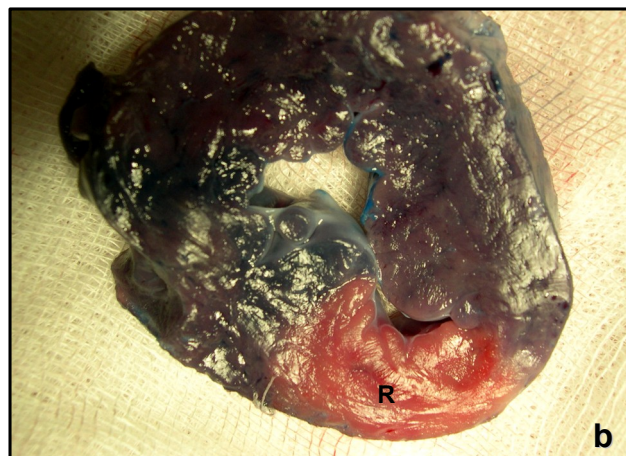
α.
του
του
Evans

κυανή
εκτός
στην



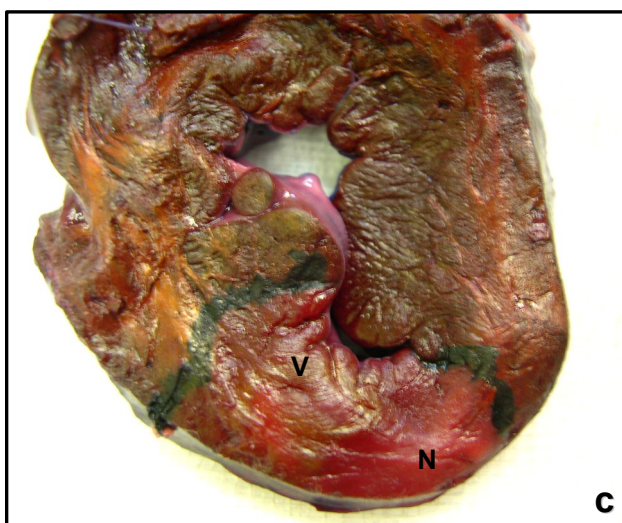
Μακροσκοπική εικόνα μετά το τέλος πειράματος. Παρασκευή της καρδιάς πειραματόζωου μετά την χρώση με Blue 2% και πριν την αφαίρεση της. Εμφανίζεται χαρακτηριστικά η χρώση όλου του μυοκαρδιακού ιστού από την περιοχή που αντιστοιχεί περιοχή σε κίνδυνο (area at risk - R)

β. Εγκάρσια τομή πάχους 0.5cm στην οποία απεικονίζεται η κυανή χρώση του μυοκαρδίου και η περιοχή σε κίνδυνο (R).



γ. Η ίδια τομή μετά τη χρώση με TTC. Διακρίνεται η περιοχή σε κίνδυνο σημεινόμενη με ινδική μελάνη. Εντός αυτής αναγνωρίζονται, η περιοχή με κόκκινο χρώμα που αντιστοιχεί στο νεκρωμένο μυοκάρδιο (Necrotic

χρώμα
σε



- N) και νησίδες ιστού με χαρακτηριστικό ζωηρό χρυσίζων του «κεραμιδιού» που αντιστοιχούν βιώσιμες περιοχές (Viable - V)

Στατιστική ανάλυση

Στη παρούσα μελέτη όλες οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση - mean values \pm standard deviation (SD). Ο έλεγχος κανονικότητας ή μη της κάθε κατανομής έγινε με τη δοκιμασία Kolmogoro- Smirnov.

Η στατιστική σύγκριση μεταξύ των ομάδων υπό εξέταση έγινε με Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis of Variance - ANOVA) κατά Ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Η δοκιμασία Bonferroni (Bonferroni's test) χρησιμοποιήθηκε για τις μετέπειτα (post-hoc) στατιστικές αναλύσεις προκειμένου να ανακαλυφθούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε μεταβλητές που δεν είχαν από την αρχή του πειράματος προκαθοριστεί (Post-Hoc analysis). Η στατιστική ανάλυση διακύμανσης που αφορούσε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (TBARS) στις υπό εξέταση ομάδες έγινε με το γενικό γραμμικό μοντέλο στατιστικής ανάλυσης (General Linear Model - GLM). Για τη μεταβολή των τιμών TBARS σε σχέση με το χρόνο και τη σύγκρισή τους μεταξύ των υπό εξέταση ομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο σύγκρισης της «επιφανείας – εμβαδού κάτωθεν της καμπύλης μεταβολής» (Area Under the Curve - AUC).

Η στατιστική σύγκριση των κατηγορηματικών μεταβλητών στις υπό εξέταση ομάδες έγινε με τη χρήση του στατιστικού μοντέλου Fisher Exact test. Οι διαφορές με πιθανότητα του 5% ή λιγότερη θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές ($p \leq 0.05$). Η πλήρης στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πειραματικής μελέτης έγινε με την χρήση εξειδικευμένου προγράμματος στατιστικής επεξεργασίας SPSS 13.0, Chicago, Illinois, US.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γενικά

Συνολικά 28 γουρούνια χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια των πειραμάτων. Από αυτά, 3 πέθαναν πριν την έναρξη του πειραματικού πρωτοκόλλου και πριν την τυχαιοποίηση. Το 1^ο απεβίωσε στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας και πριν την τυχαιοποίηση εξαιτίας διαχωρισμού του στελέχους της αριστεράς στεφανιαίας αρτηρίας κατά την προσπάθεια καθετηριασμού του με τον οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Έγινε άμεση προσπάθεια αντιμετώπισης της επιλοκής με αγγειοπλαστική στο στέλεχος με μπαλόνι, η οποία απέβη ανεπιτυχής με αποτέλεσμα το θάνατο του πειραματόζωου εξαιτίας εκτεταμένου εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Τα άλλα 2 πειραματόζωα πέθαιναν εξαιτίας σημαντικής και παρατεταμένης βραδυκαρδίας κατά την φάση της διασωλήνωσης και κατά τη φάση της εισαγωγής στην αναισθησία, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, παρουσιάστηκε σημαντική και παρατεταμένη βραδυκαρδία, ανθεκτική στη χορήγηση μεγάλων δόσεων ατροπίνης που οδήγησε τα πειραματόζωα στο θάνατο.

Ως εκ τούτου, είκοσι-πέντε (25) συνολικά πειραματόζωα προετοιμάσθηκαν και τυχαιοποιήθηκαν επιτυχώς στις 5 διαφορετικές θεραπευτικές κατηγορίες (n = 5 πειραματόζωα ανά θεραπευτική ομάδα). Παρακάτω θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα για κάθε πείραμα ανά ομάδα.

Ομάδα Ασκορβικού οξέος (Α)

Πείραμα 1^ο :

Χοίρος, ηλικίας 4μηνών και 15 , βάρους 32Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 16 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/80mmHg και καρδιακή συχνότητα 86 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 70\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Κατά τον καθετηριασμό παρατηρήθηκε παροδικός σπασμός του στελέχους χωρίς αιμοδυναμικές διαταραχές, ο οποίος αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με ενδοστεφανιαία χορήγηση (intra-coronary - i.c) νιτροδών. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Σύστολη του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια VF/SVT = 5 . Επιπλέον καταγράφηκαν 25 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμική επιβάρυνση.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

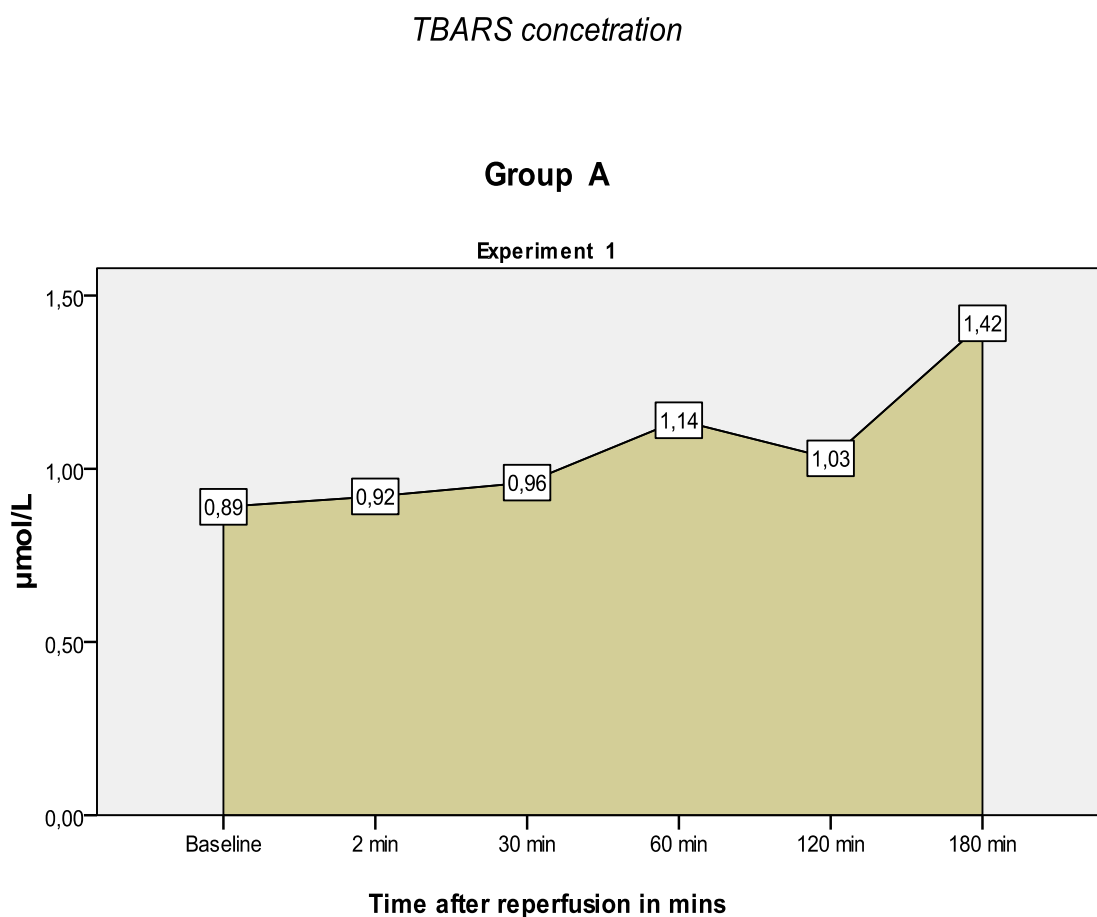
LVEDP post = 12 mmHg, αύξηση κατά 4mmHg και +50% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 42 %, ελάττωση κατά 28 μονάδες και -40,0% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,35. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 20,2% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 20,2%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 2° :

Χοίρος, ηλικίας 4μηνών και 28 , βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 14 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 112/76mmHg και καρδιακή συχνότητα 110 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 9\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόني αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον δεν καταγράφηκαν επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

$LVEDP\ post = 16\ mmHg$, αύξηση κατά $7\ mmHg$ και $+77,8\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή)

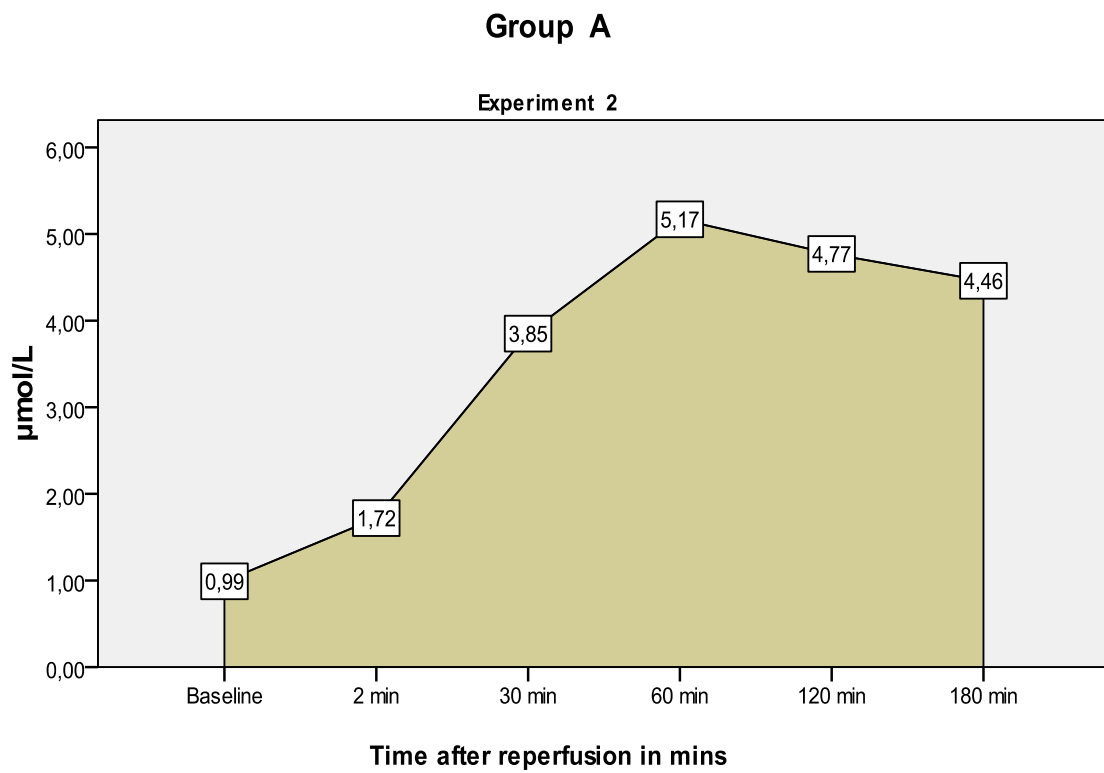
$EF\ post = 56\%$, ελάττωση κατά 12 μονάδες και $-17,65\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,45. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 14,1% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 14,1%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Πείραμα 3^ο :

Χοίρος, ηλικίας 3μηνών και 5 , βάρους 31Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 12 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 124/85mmHg και καρδιακή συχνότητα 110 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 72\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Κατά τον καθετηριασμό παρατηρήθηκε παροδικός σπασμός του στελέχους χωρίς αιμοδυναμικές διαταραχές, ο οποίος αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με ενδοστεφανιαία χορήγηση (intra-coronary - i.c) νιτροδών. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια VF/SVT = 0 . Επιπλέον καταγράφηκαν 10 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμικές επιπλοκές.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 16 mmHg, αύξηση κατά 8mmHg και +100% μεταβολή από την αρχική τιμή)

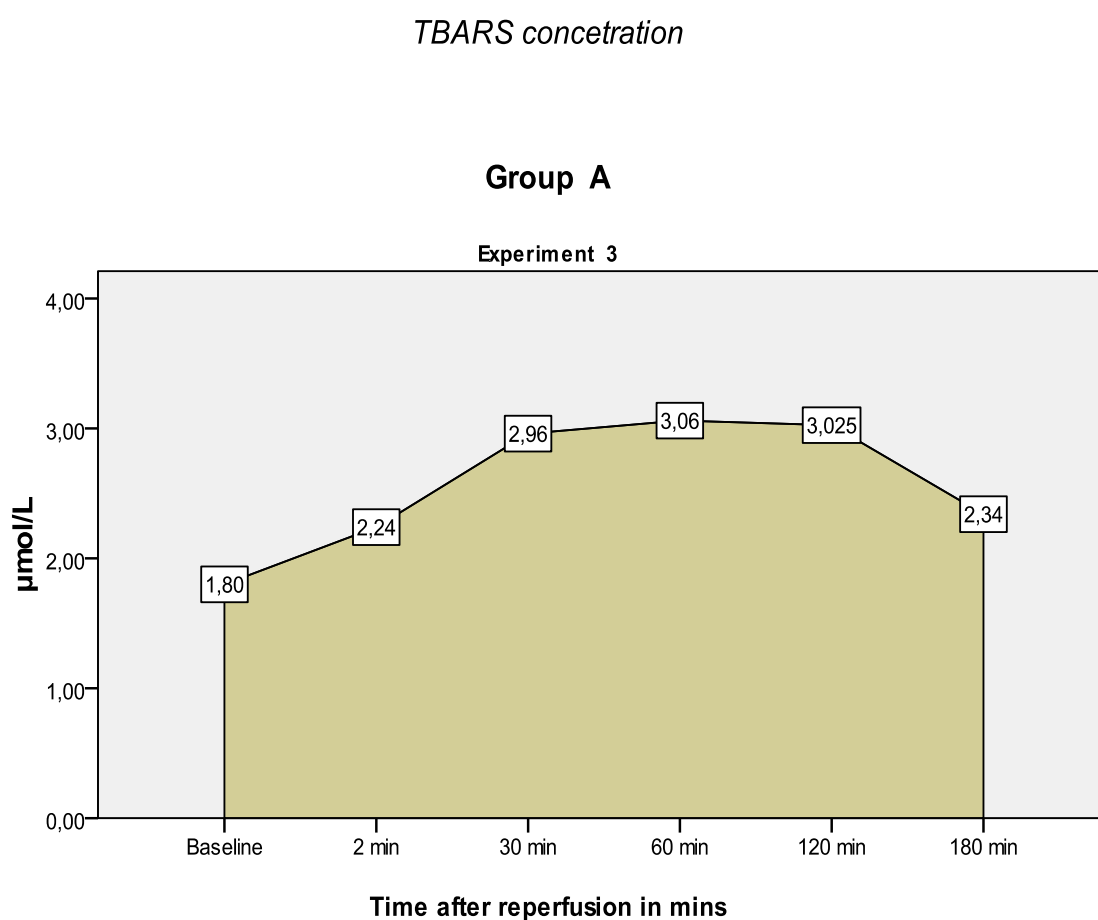
EF post = 58 % , ελάττωση κατά 14 μονάδες και -19,447% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,49. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 12,7% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 12,7%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 4° :

Χοίρος, ηλικίας 3μηνών και 14 , βάρους 34Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 20ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Ανεπιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα αλλά χωρίς επιπλοκές. Άμεσος καθετηριασμός των δύο κοινών μηριαίων αρτηριών μετά χειρουργική αποκάλυψη τους και άμεση επισκόπηση αυτών. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 112/76mmHg και καρδιακή συχνότητα 110 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 76\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 12 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 14 mmHg, αύξηση κατά 6mmHg και +75% μεταβολή από την αρχική τιμή)

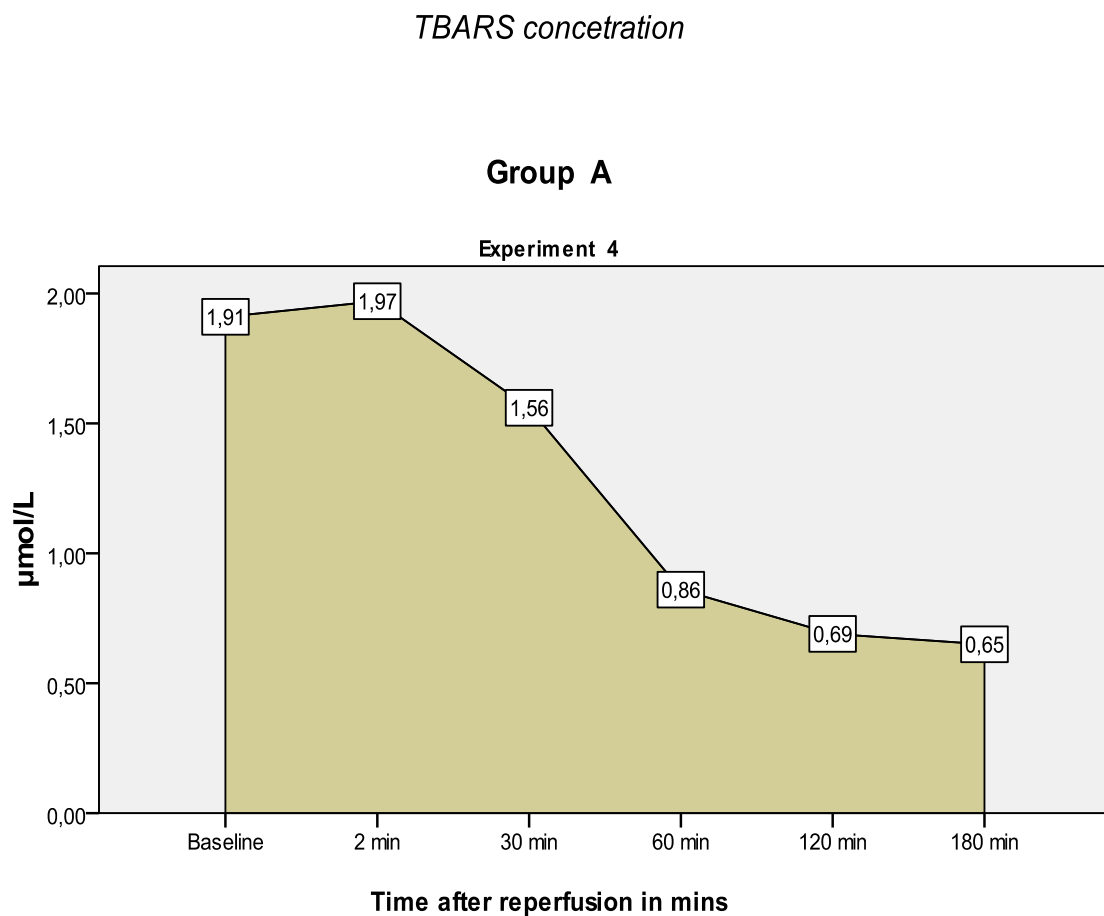
EF post = 53 % , ελάττωση κατά 23 μονάδες και -30,26% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,42. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 18,0% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 17,3%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 5^ο :

Χοίρος, ηλικίας 4μηνών και 30 , βάρους 34Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 122/80mmHg και καρδιακή συχνότητα 121 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 72\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 10 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 13 mmHg, αύξηση κατά 5mmHg και +65,50% μεταβολή από την αρχική τιμή)

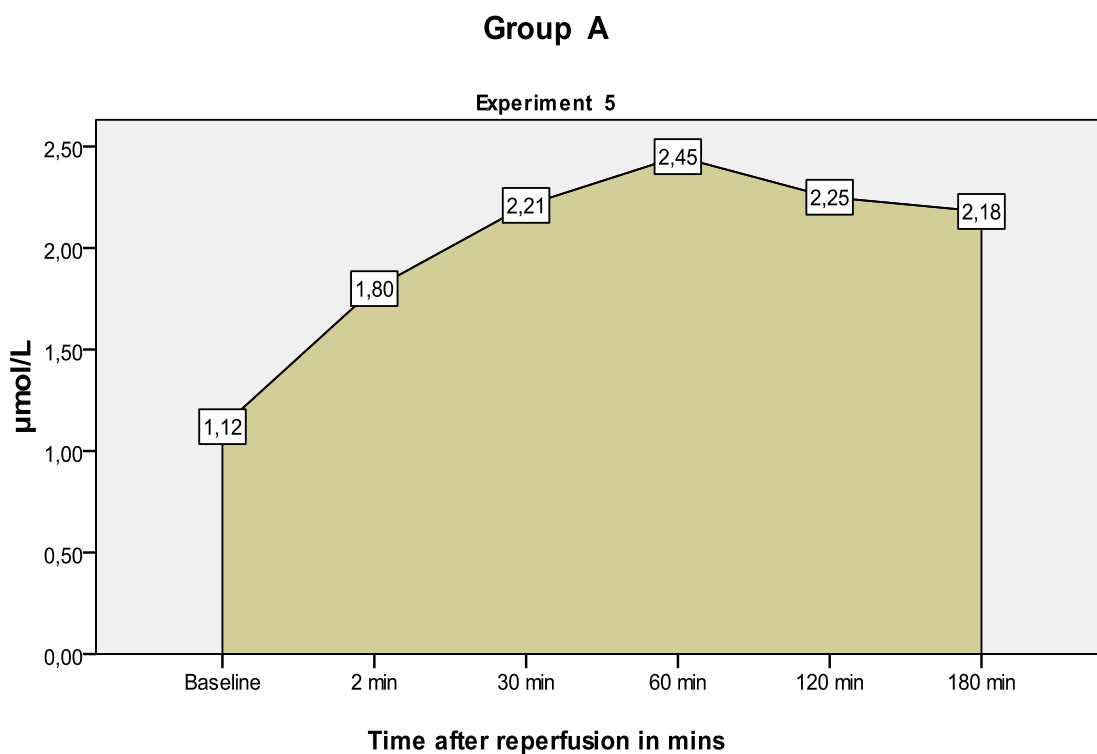
EF post = 50 %, ελάττωση κατά 22 μονάδες και -30,56% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,40. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 16,8% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 16,8%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Ομάδα Δεσφερριοξαμίνης (B)

Πείραμα 1^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 16 , βάρους 32 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 12 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 105/70mmHg και καρδιακή συχνότητα 98 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 9\ mmHg$$

$$EF\ pre = 74\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν ένα (1) επεισόδια ($VF/SVT = 1$) κακοήθεις αρρυθμίες. Επιπλέον καταγράφηκαν 7 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

$LVEDP\ post = 29\ mmHg$, αύξηση κατά 18mmHg και +211,1% μεταβολή από την αρχική τιμή)

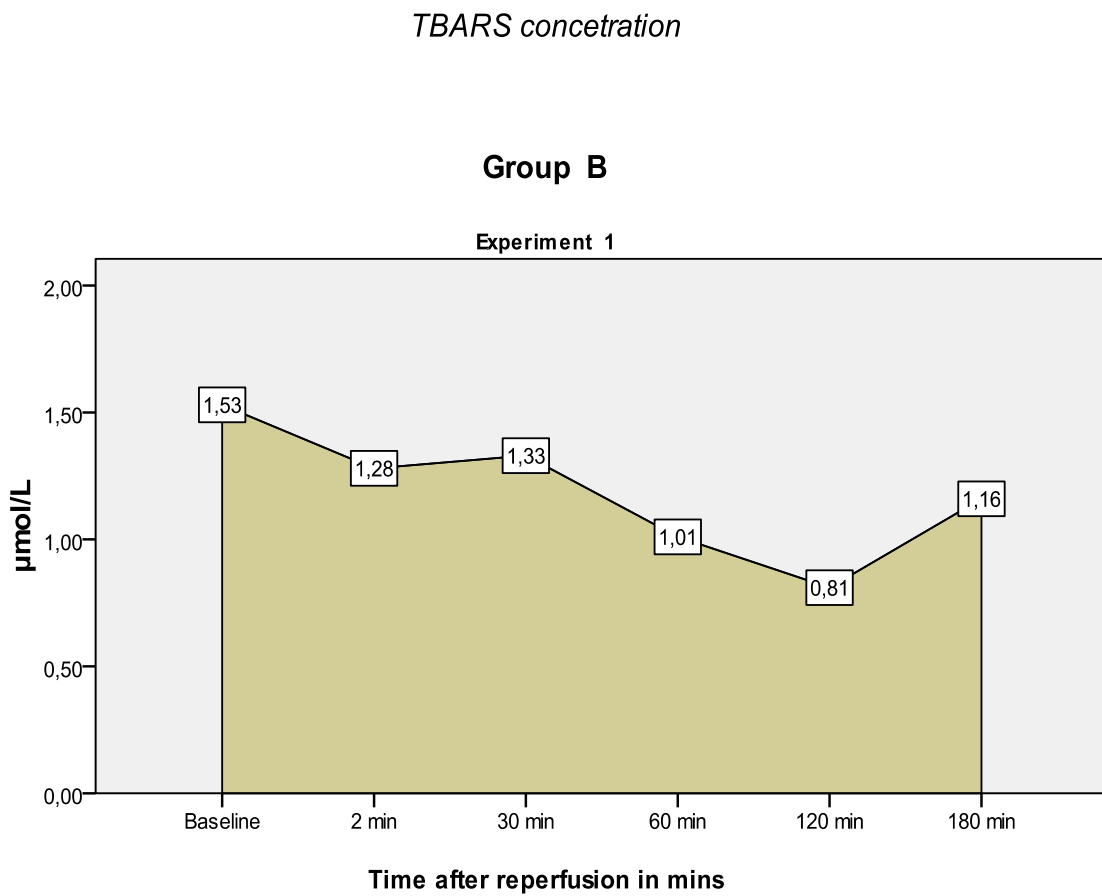
$EF\ post = 55\ \%$, ελάττωση κατά 19 μονάδες και -25,68% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,52. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 14,2% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 14,28%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 2^ο :

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 26 , βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 18 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 102/63mmHg και καρδιακή συχνότητα 92 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 5\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Παρουσία σπασμού του στελέχους ο οποίος αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με χορήγηση νιτροδών i.c.. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 23 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 24 mmHg, αύξηση κατά 19mmHg και +380.0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 45 %, ελάττωση κατά 23 μονάδες και -33.82% μεταβολή από την αρχική τιμή.

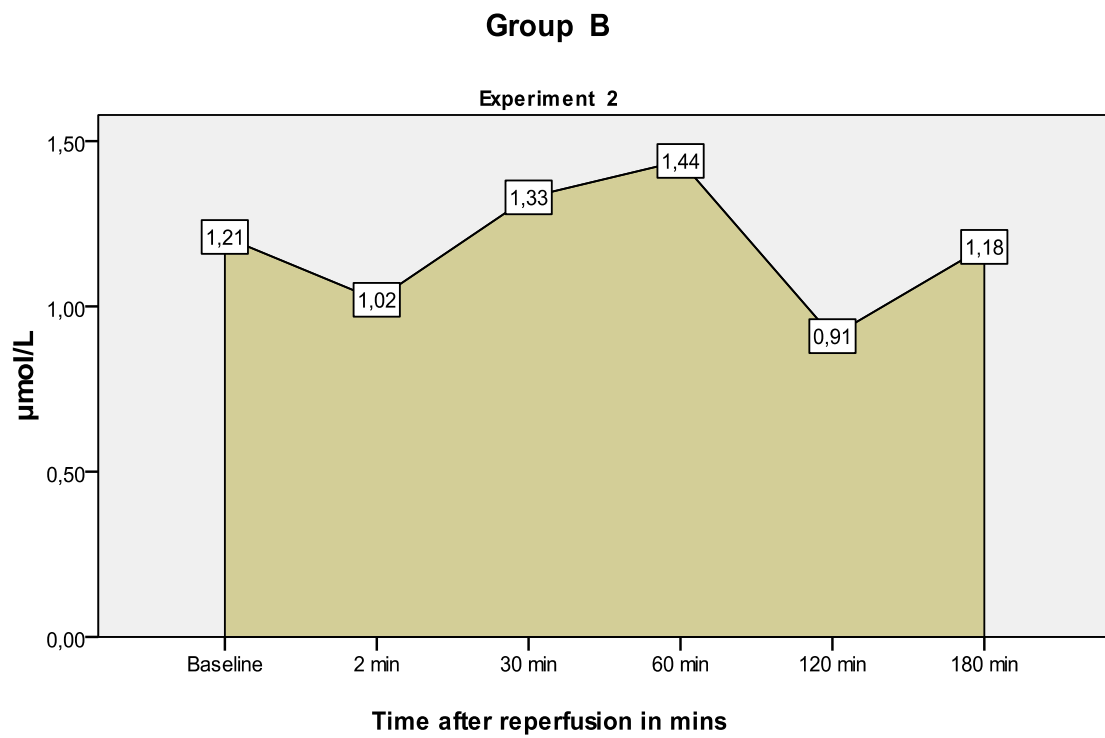
Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,31. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 6,5% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 6,5%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της

TBARS concentration



Πείραμα 3^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 22 , βάρους 32Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 98/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 95 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 6\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Σύστολη του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας (VF/SVT). Επεισόδια VF/SVT = 1. Επιπλέον καταγράφηκαν 13 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμικές επιπλοκές.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

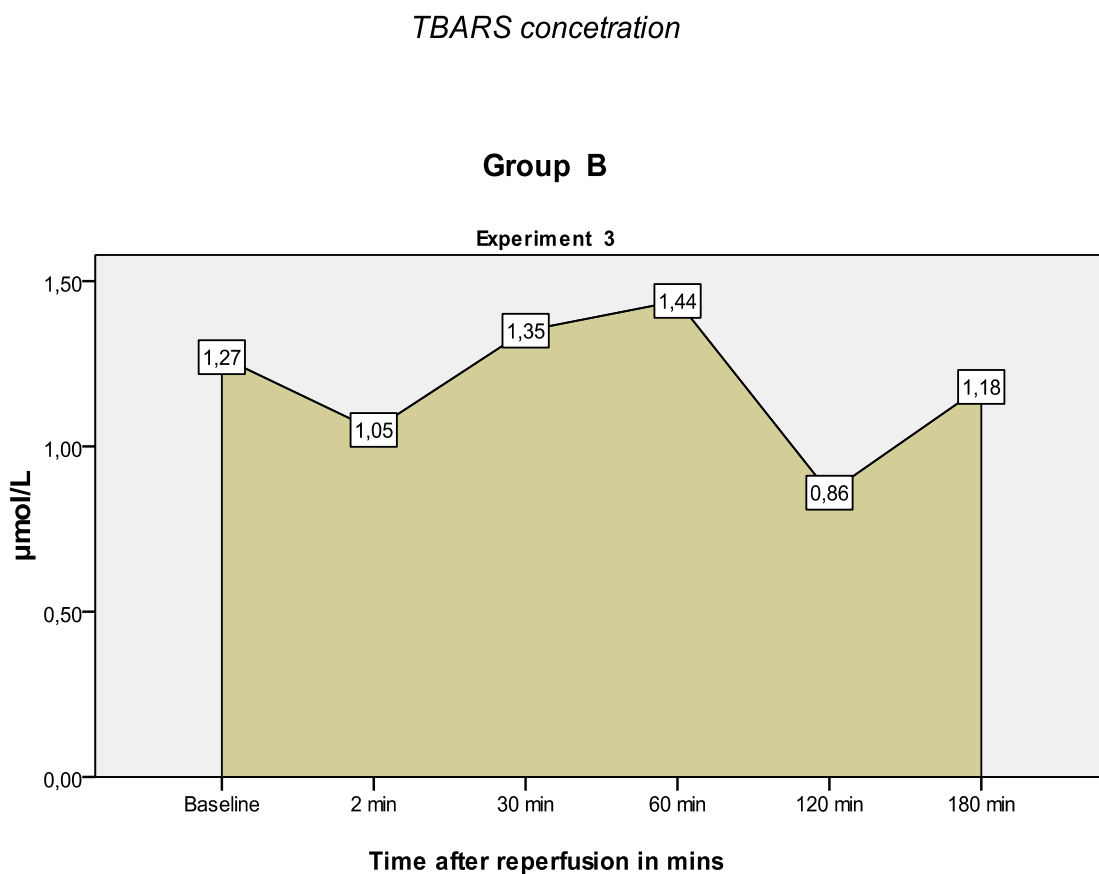
LVEDP post = 22 mmHg, αύξηση κατά 16mmHg και +266,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 47 %, ελάττωση κατά 21 μονάδες και -30,88% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,39. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 9,3% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 9,3%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 4^ο:

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 8 , βάρους 31 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 20 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός της δεξιάς κοινής μηριαίας αρτηρίας χωρίς επιπλοκές. Η αριστερή κοινή μηριαία παρασκευάστηκε χειρουργικά. Μετά ανεπιτυχή προσπάθεια παρακέντησης της αρτηρίας, έγινε μικρο-χειρουργική τομή και επιτυχής τοποθέτηση του θηκαριού χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγιτίδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 126/88mmHg και καρδιακή συχνότητα 117 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 76\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 17 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 26 mmHg, αύξηση κατά 19 mmHg και +271,4% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 46%, ελάττωση κατά 28 μονάδες και -36,84% μεταβολή από την αρχική τιμή.

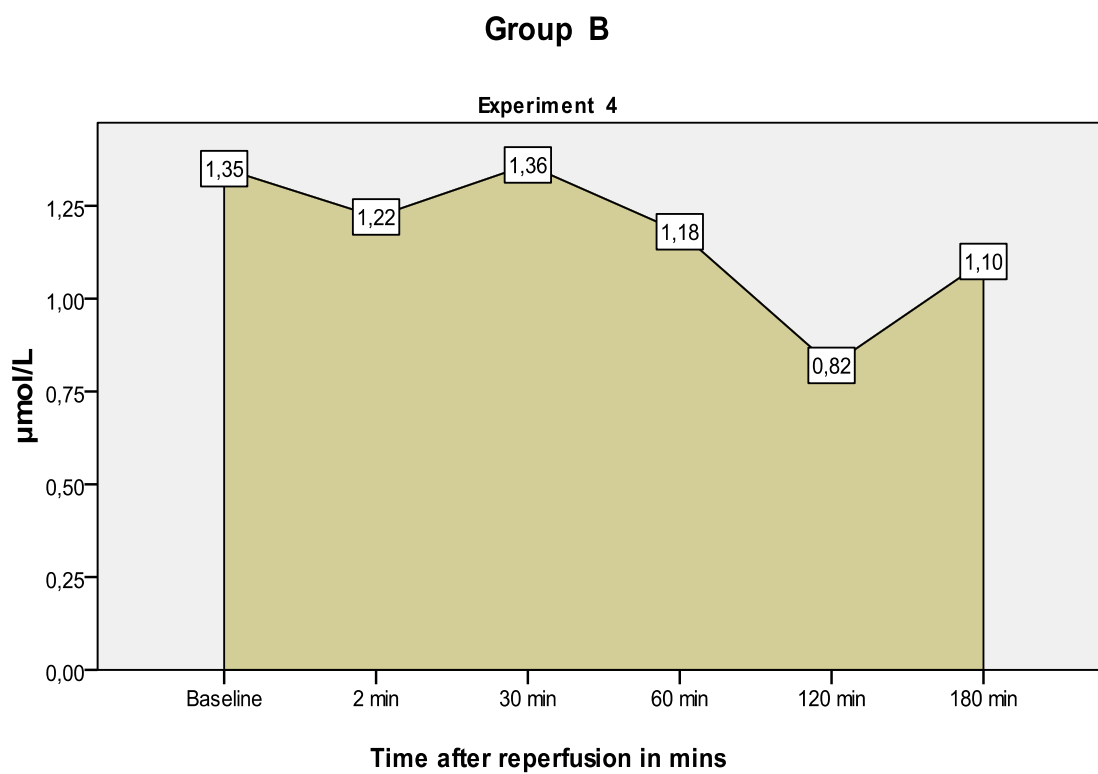
Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,42. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 10,9% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 10,9%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται

TBARS concetration



Πείραμα 5^ο:

Χοίρος, ηλικίας 5 μηνών και 2 , βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 102/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 96 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 75\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 14 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 23 mmHg, αύξηση κατά 15mmHg και +187,5% μεταβολή από την αρχική τιμή)

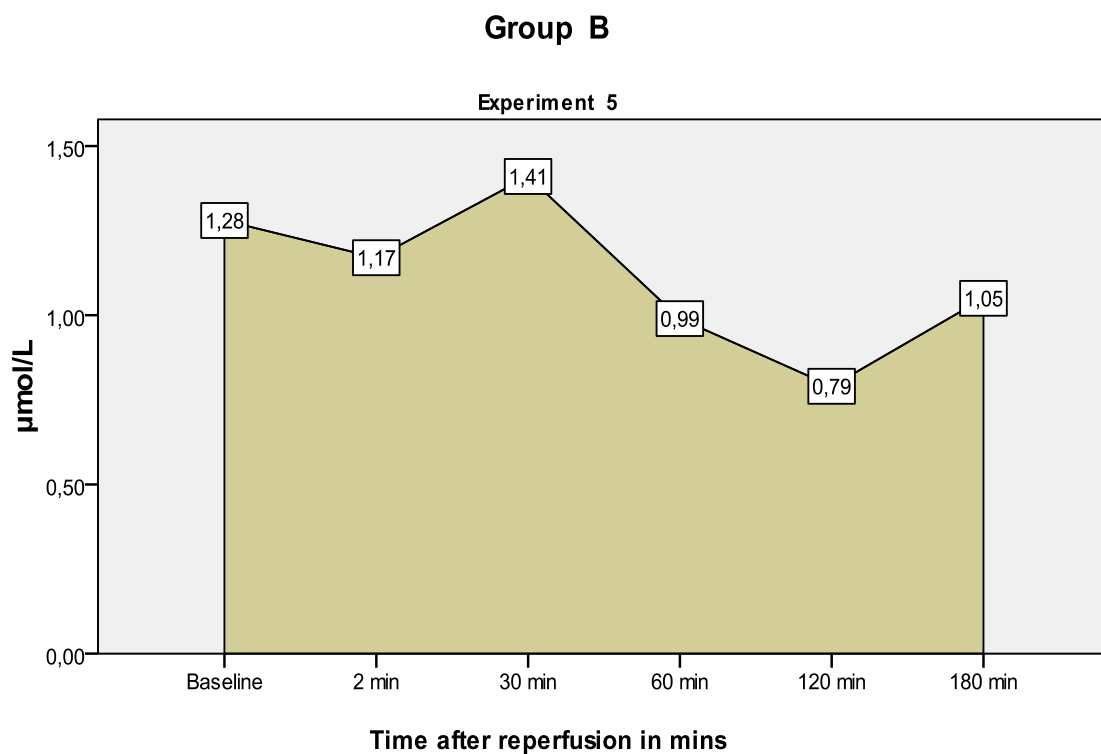
EF post = 48 % , ελάττωση κατά 27 μονάδες και -26,00% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,40. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 9,9% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 9,9%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Ομάδα N- ακετυλ-κυστεΐνης (C)

Πείραμα 1°:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 21 , βάρους 34Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 22 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 97 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 12\ mmHg$$

$$EF\ pre = 64\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκε ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 1$. Επιπλέον καταγράφηκαν 17 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post= 15 mmHg, αύξηση κατά 3mmHg και +25,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

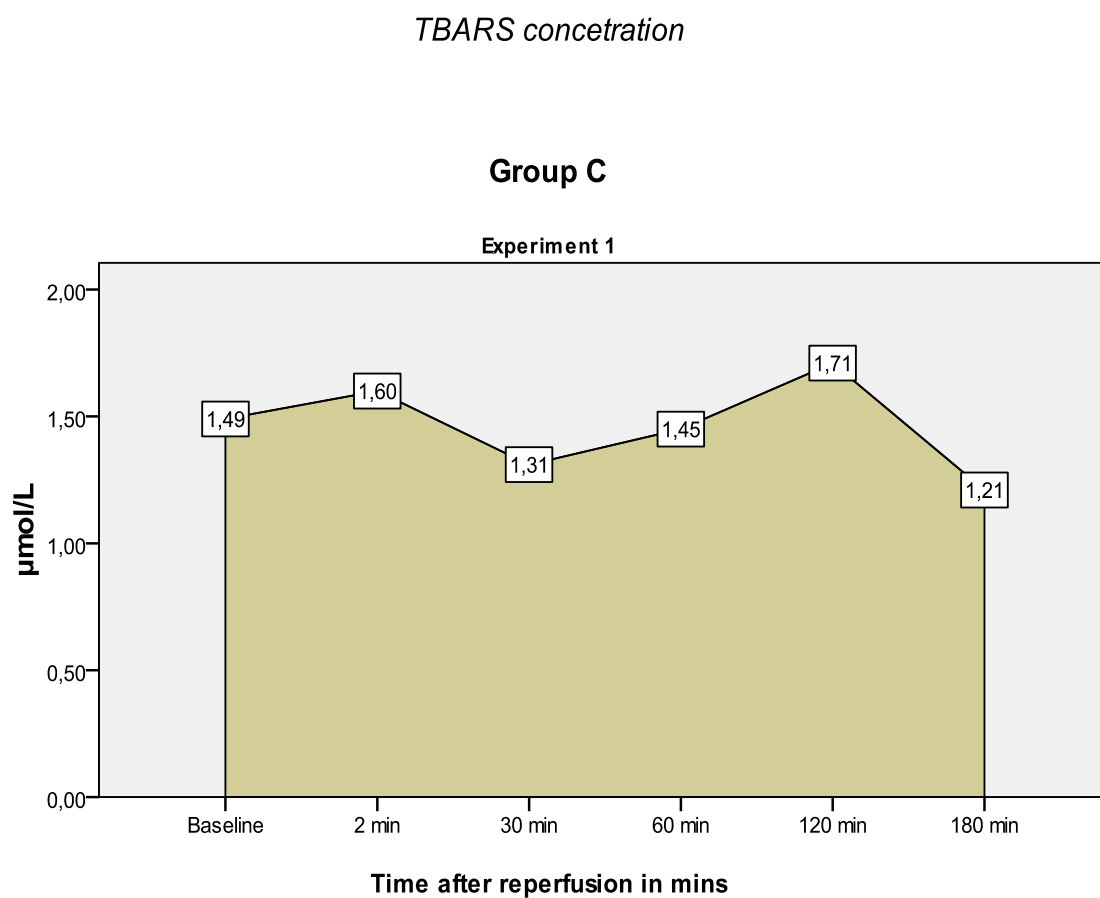
EF post = 53 %, ελάττωση κατά 11 μονάδες και -17,19% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,41. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 5,3% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 5,3%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 2^ο:

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 5 , βάρους 32Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 16 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Ανεπιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας δεξιά. Ως εκ τούτου, επιχειρήθηκε επιτυχώς η χειρουργική αποκάλυψη και παρασκευή της αριστερής έσω σφαγίτιδας φλέβας. Η ανατομική θέση της αριστερής έσω σφαγίτιδας φλέβας απαιτεί περισσότερους χειρισμούς του καθετήρα για τον καθετηριασμό του στεφανιαίου κόλλου. Μετά παρατεταμένη προσπάθεια, επιτεύχθηκε χωρίς επιπλοκές ο καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλου και η του λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 114/70mmHg και καρδιακή συχνότητα 106 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 6\ mmHg$$

$$EF\ pre = 65\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνη αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκε ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 1$. Επιπλέον καταγράφηκαν 17 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

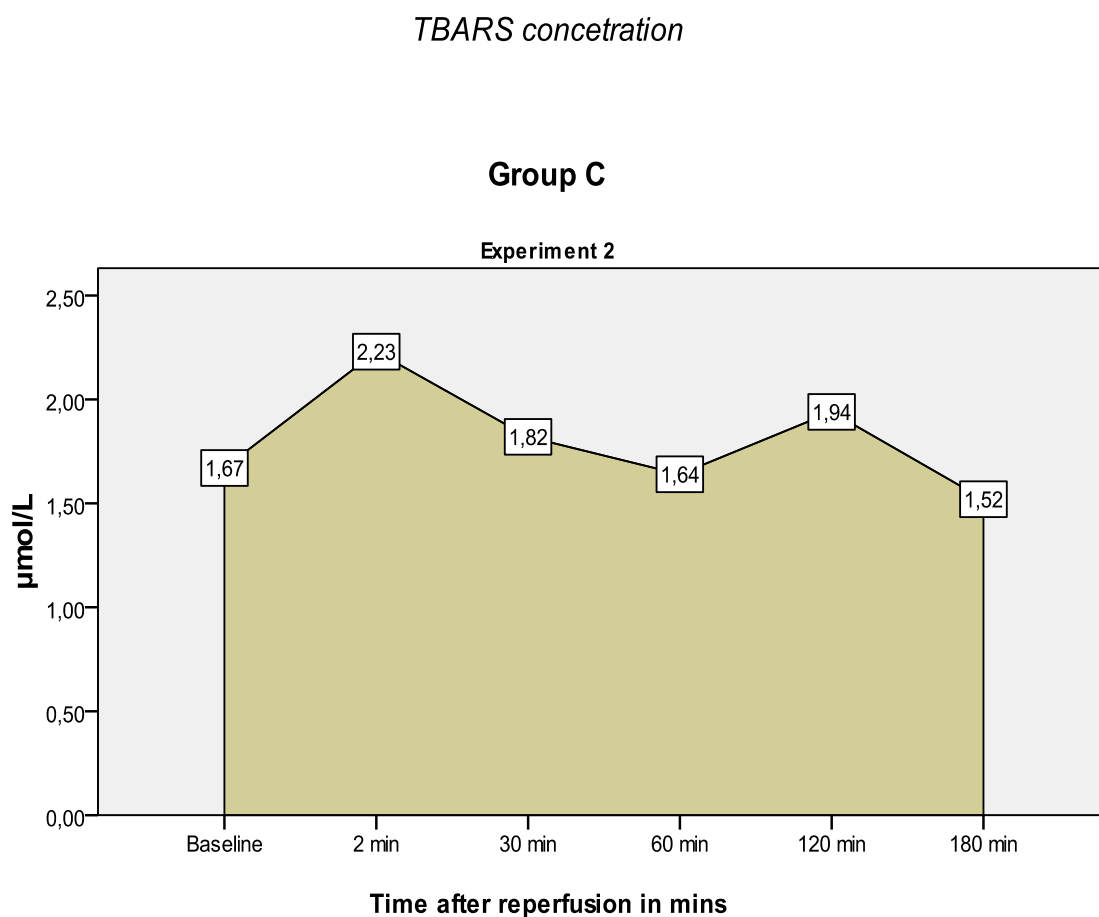
$LVEDP\ post = 8\ mmHg$, αύξηση κατά $2\ mmHg$ και $+16,1\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή)

$EF\ post = 46\ \%$, ελάττωση κατά $19\ μονάδες$ και $-29,23\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,37. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 17,0% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 17,0%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 3^ο :

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 18 , βάρους 33Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 15 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 100/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 86 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκε ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 1$. Επιπλέον καταγράφηκαν 7 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

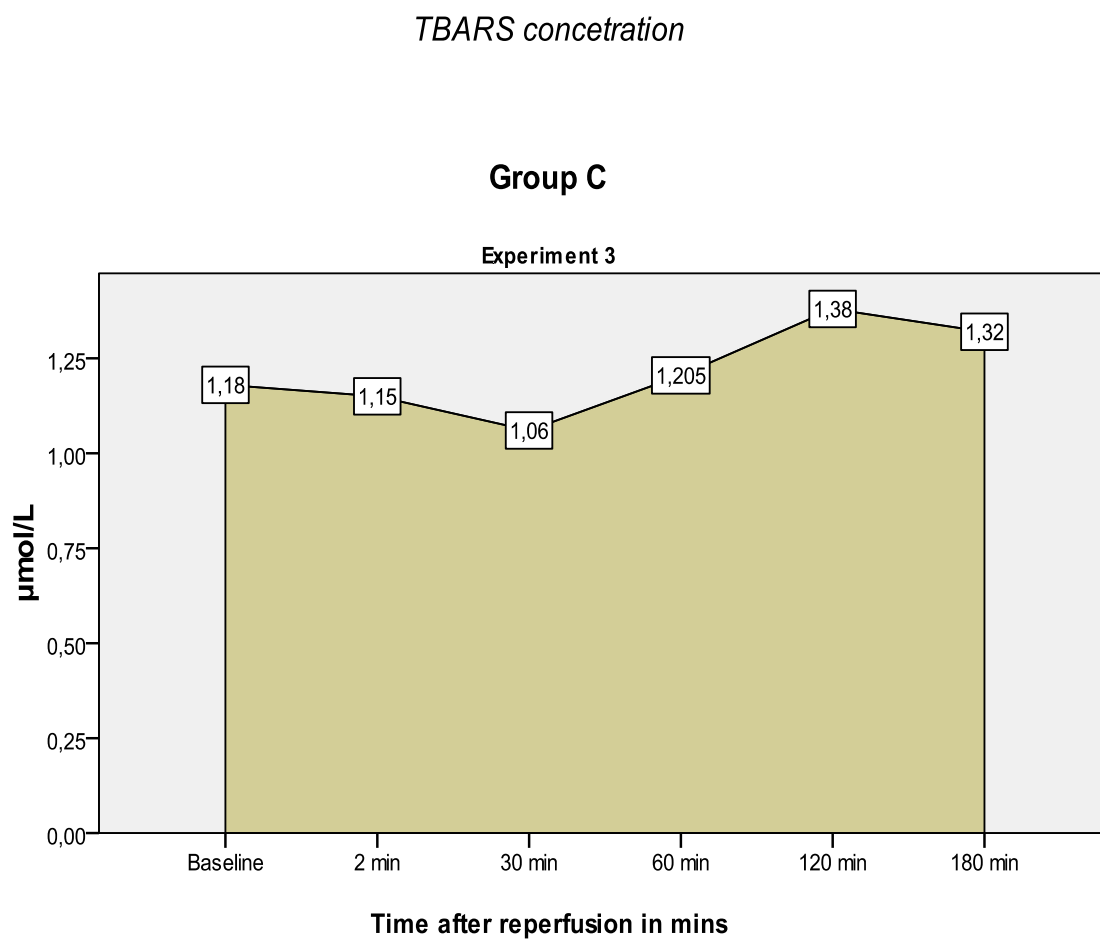
LVEDP post = 14 mmHg, αύξηση κατά 5 mmHg και +55,50% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 46 %, ελάττωση κατά 24 μονάδες και -34,291% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,33. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 13,0% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 13,0%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 4^ο:

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 13 ημερών, βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 103/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 94 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

LVEDP pre = 9 mmHg

EF pre = 70 %

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκε ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 1$. Επιπλέον καταγράφηκαν 9 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμικές διαταραχές.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 15 mmHg, αύξηση κατά 3mmHg και +25,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

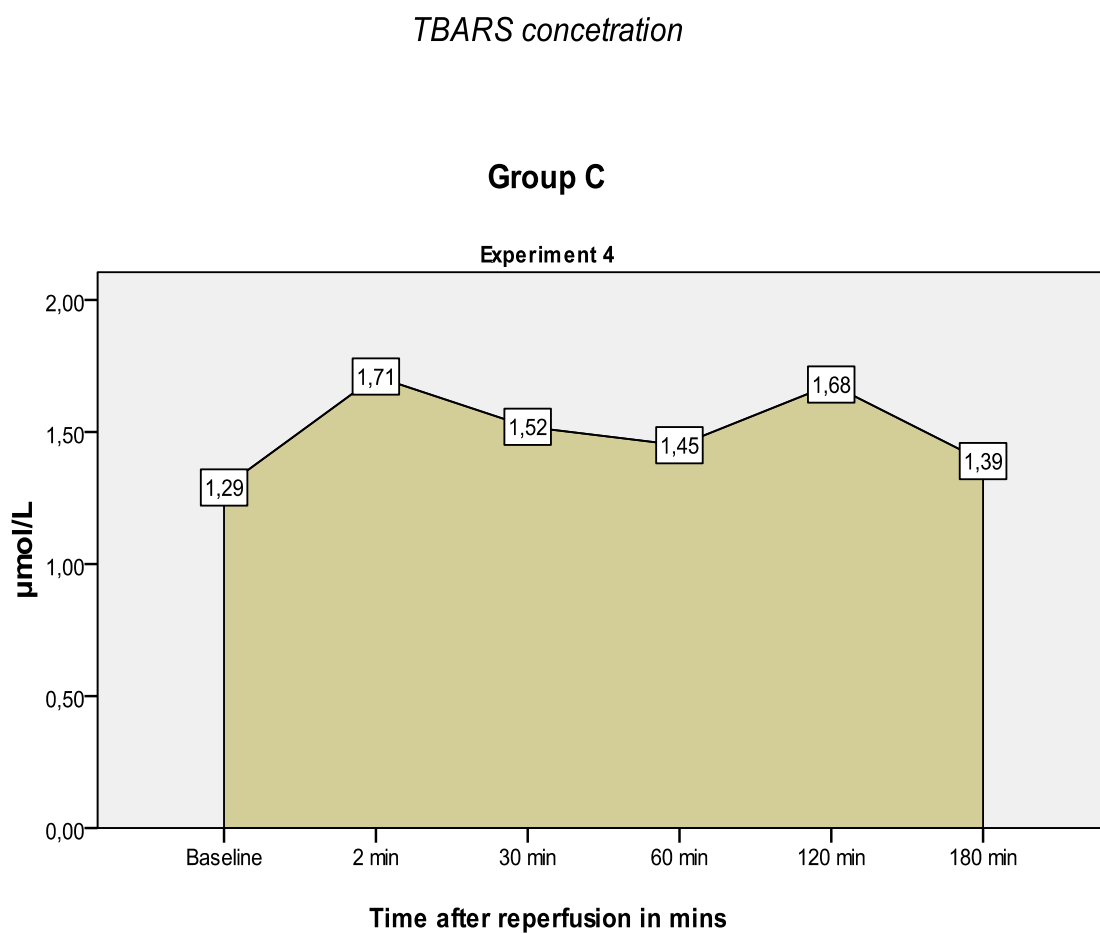
EF post = 53 %, ελάττωση κατά 11 μονάδες και -17,19% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,41. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 5,3% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 5,3%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 5^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 11 ημερών, βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 117/74mmHg και καρδιακή συχνότητα 116 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 70\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν επεισόδια κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια VF/SVT = 0. Επιπλέον καταγράφηκαν 12 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμική επιβάρυνση.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 13 mmHg, αύξηση κατά 5mmHg και +71,2% μεταβολή από την αρχική τιμή)

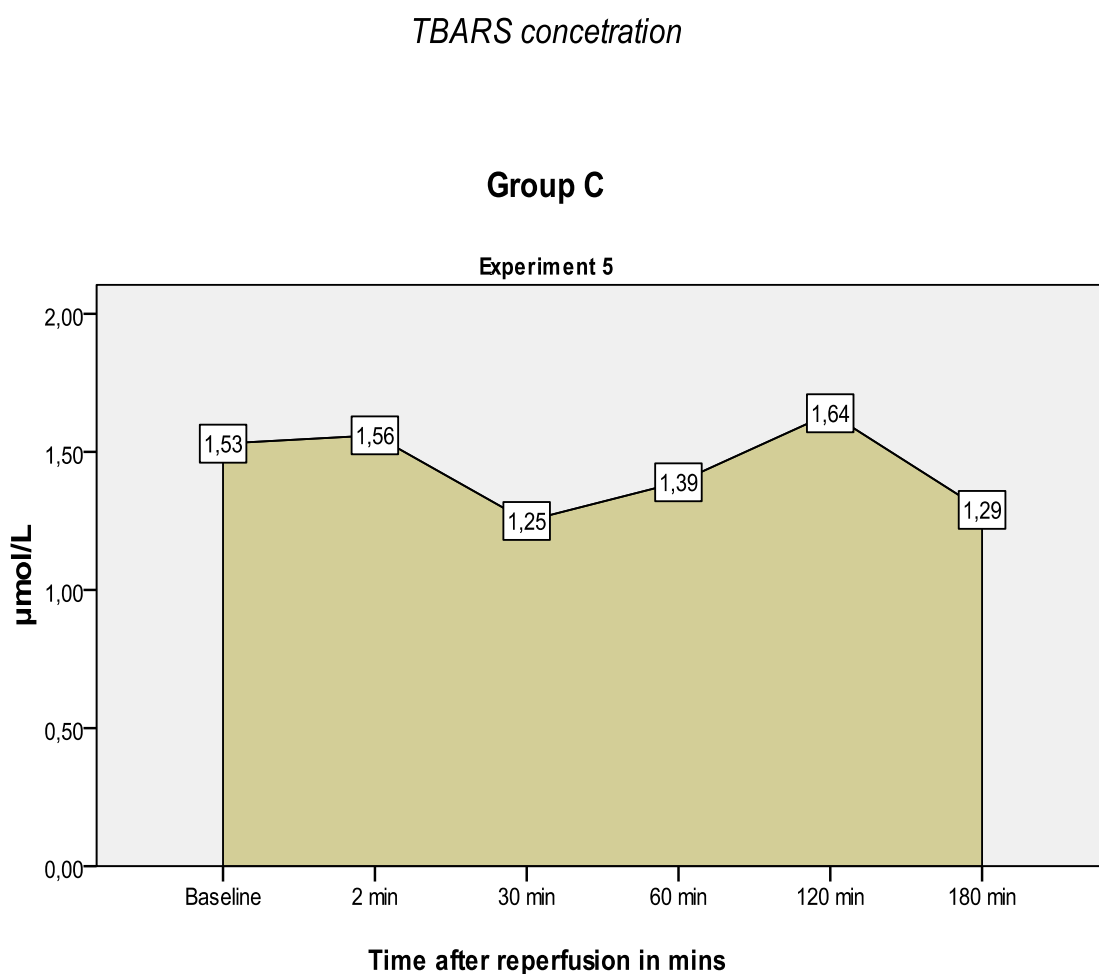
EF post = 48 %, ελάττωση κατά 22 μονάδες και -31,43% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,35. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 11,8% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 11,8%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Ομάδα συνδυασμού αντιοξειδωτικών (D)

Πείραμα 1^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 2 ημερών, βάρους 31Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 17 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 95/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 97 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 72\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Με την εισαγωγή του σύρματος αγγειοπλαστικής παρατηρήθηκε έντονος σπασμός του αγγείου, κυρίως κατά το περιφερικό τμήμα αυτού, ο οποίος αντιμετωπίστηκε έγκαιρα και επιτυχώς με τη χορήγηση νιτροδών i.c.. Ακολούθησε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκαν δύο (2) επεισόδια κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 2$. Επιπλέον καταγράφηκαν 12 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

$LVEDP\ post = 12\ mmHg$, αύξηση κατά $4\ mmHg$ και $+50,0\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή)

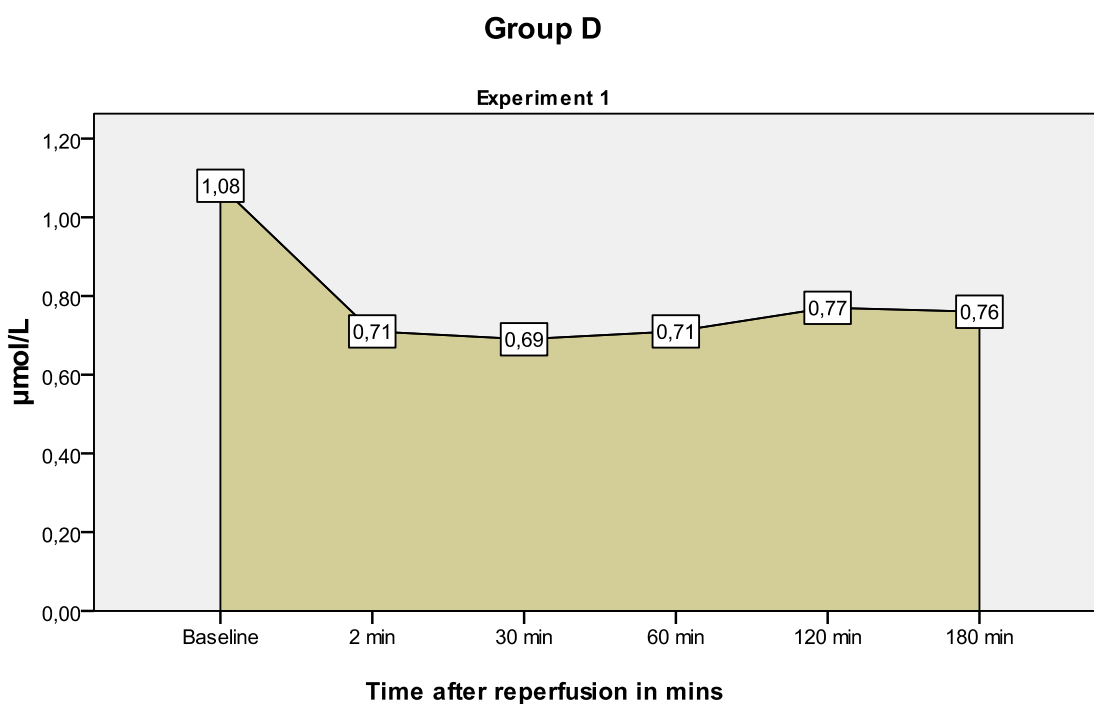
$EF\ post = 42\ \%$, ελάττωση κατά 30 μονάδες και $-41,67\%$ μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,48. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 8,9% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 8,9%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concentration



Πείραμα 2^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 12 ημερών, βάρους 34Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 12 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 100/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 102 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 64\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση καταγράφηκε ένα (1) επεισόδιο κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 1$. Επιπλέον καταγράφηκαν 15 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 18 mmHg, αύξηση κατά 10mmHg και +125,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

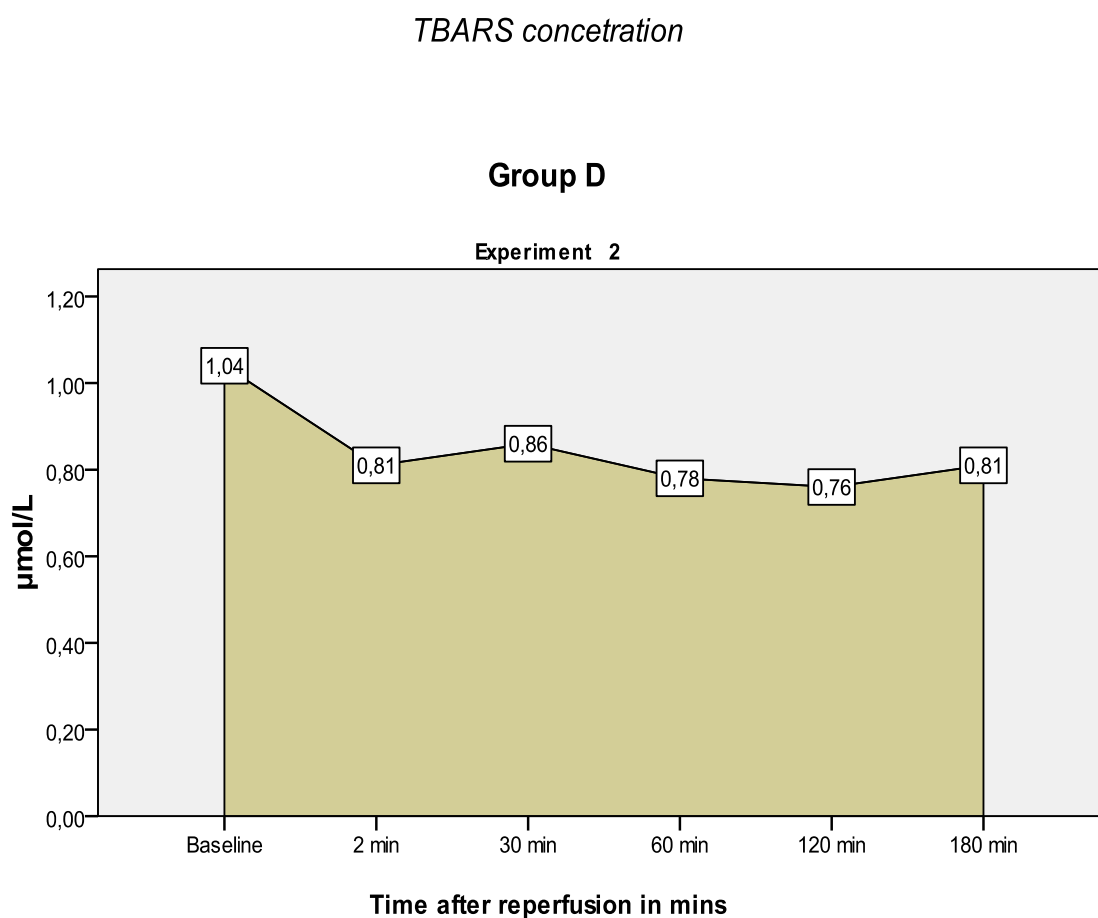
EF post = 40 %, ελάττωση κατά 24 μονάδες και -37,59% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,49. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 14,8% της συνολικής μάζας της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 14,8%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 3^ο:

Χοίρος, ηλικίας 4 μηνών και 10 ημερών, βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 110/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 92αλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 63\%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν επεισόδια κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια VF/SVT = 0. Επιπλέον καταγράφηκαν 6 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 10 mmHg, αύξηση κατά 3mmHg και +42,9% μεταβολή από την αρχική τιμή)

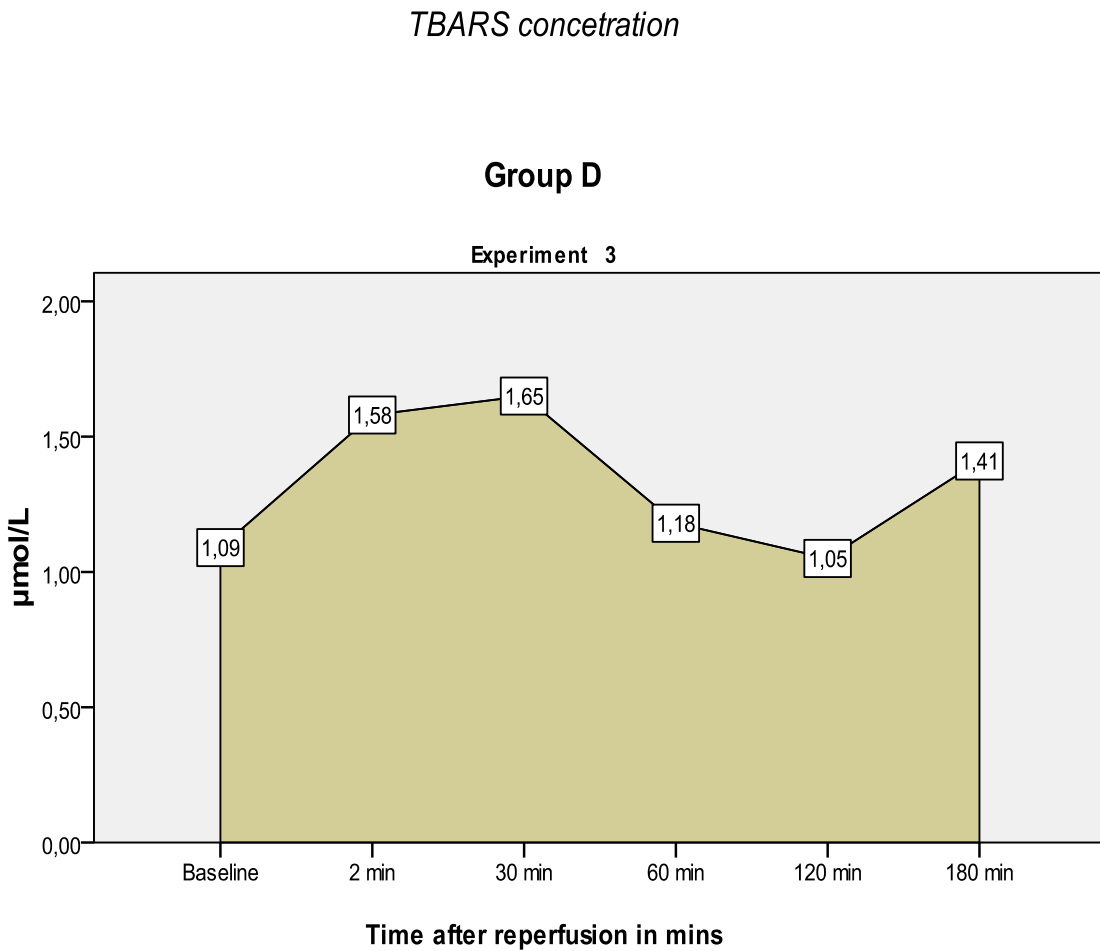
EF post = 48 %, ελάττωση κατά 18 μονάδες και -28,57% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

ο,36. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 13,0% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 13,0%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 4^ο:

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 16 ημερών, βάρους 31 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 115/80mmHg και καρδιακή συχνότητα 86 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 10\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν επεισόδια κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 8 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 17 mmHg, αύξηση κατά 7mmHg και +70,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

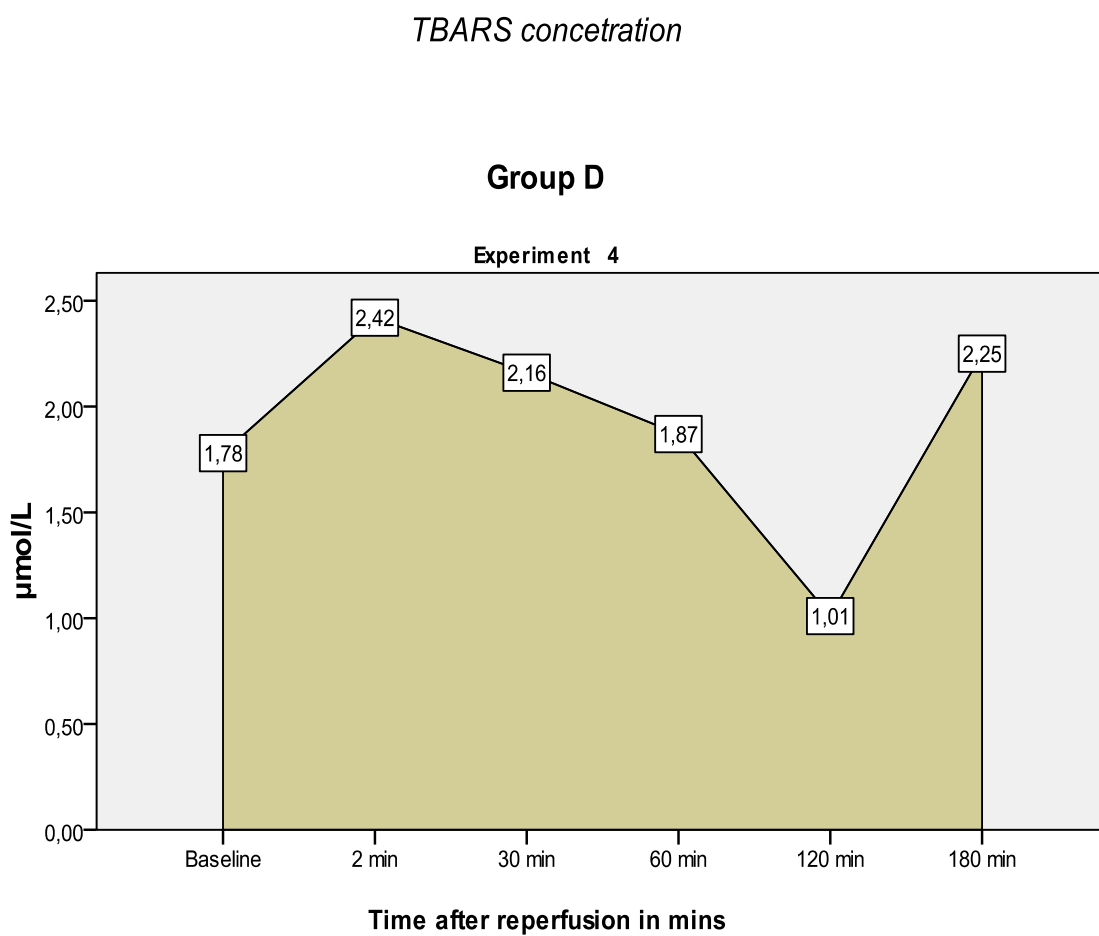
EF post = 54 %, ελάττωση κατά 14 μονάδες και -20,59% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,33. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 17,5% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 17,5%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 5^ο:

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 25 ημερών, βάρους 32 Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 21 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 118/60mmHg και καρδιακή συχνότητα 83 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 71\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν επεισόδια κακοήθους αρρυθμίας. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν, σχετικά με τα προηγούμενα πειράματα, μεγάλος αριθμός επεισοδίων υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας (31 επεισόδια).

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 18 mmHg, αύξηση κατά 10mmHg και +125,0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

EF post = 52 %, ελάττωση κατά 19 μονάδες και -26,76% μεταβολή από την αρχική τιμή.

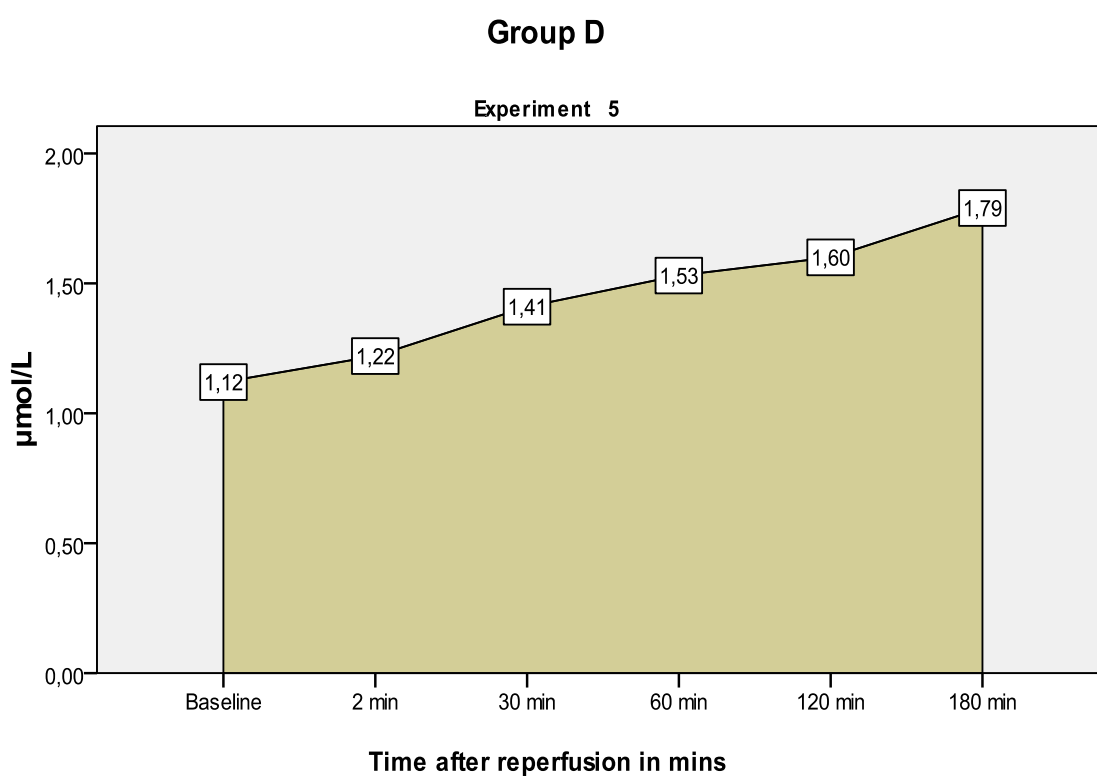
Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,31. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 25,2% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 25,2%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Ομάδα Ελέγχου (E)

Πείραμα 1^ο :

Χοίρος, ηλικίας 3 μηνών και 22 ημερών, βάρους 34Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 22 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 115/74 mmHg και καρδιακή συχνότητα 96 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

LVEDP pre = 8 mmHg

EF pre = 72 %

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του, έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια VF/SVT = 0. Επιπλέον καταγράφηκαν 5 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 16 mmHg, αύξηση κατά 8mmHg και +100% μεταβολή από την αρχική τιμή)

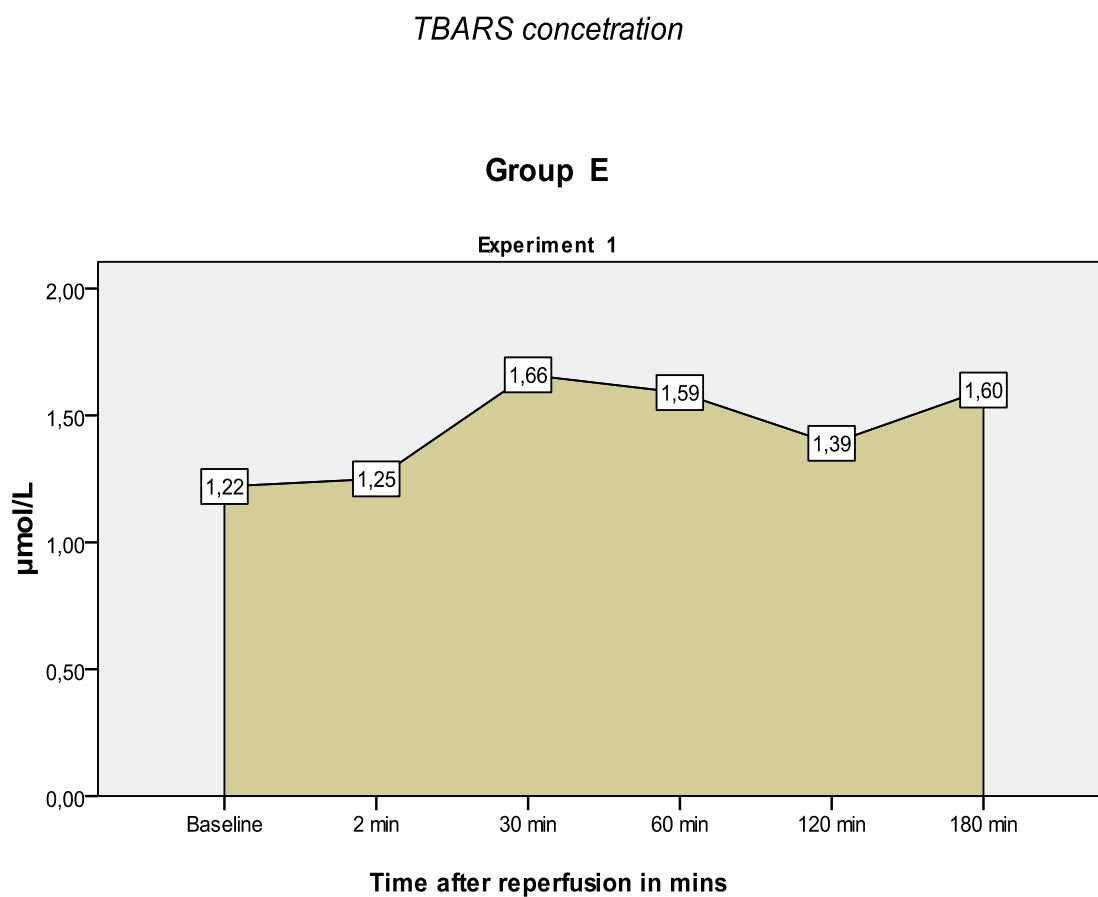
EF post = 35 %, ελάττωση κατά 37 μονάδες και -51.39% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

0,25. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 15,8% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 15,8%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 2^ο :

Χοίρος, ηλικίας 3μηνών και 7 ημερών, βάρους 31Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 20 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 98/64 mmHg και καρδιακή συχνότητα 102 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 8\ mmHg$$

$$EF\ pre = 70\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του, έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 16 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 12 mmHg, αύξηση κατά 6mmHg και +50% μεταβολή από την αρχική τιμή)

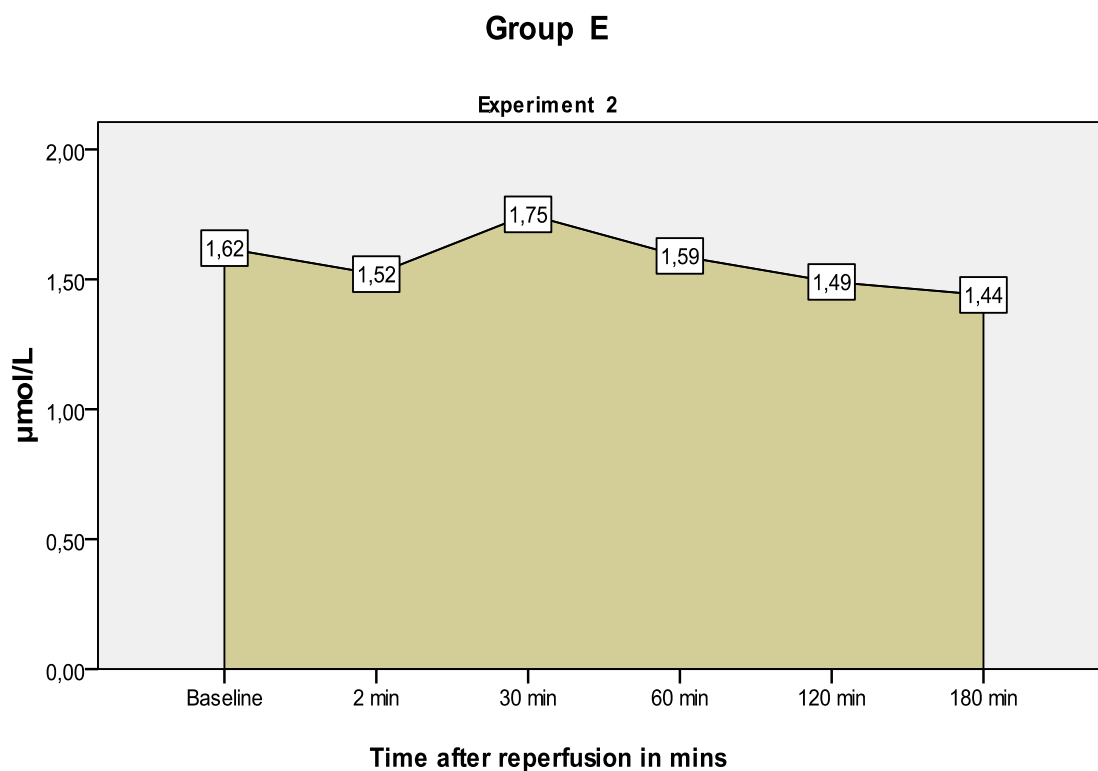
EF post = 42 %, ελάττωση κατά 27 μονάδες και -38,57% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 1 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία της καρδίας του πειραματόζωου in vitro έγινε η εκτίμηση του λόγου της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με αυτή σε κίνδυνο (I/R) η οποία μετρήθηκε σε 0,29. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 16,1% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 16,1%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Πείραμα 3° :

Χοίρος, ηλικίας 3μηνών και 18 ημερών, βάρους 31Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 16 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών αμφοτερόπλευρα χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 112/76mmHg και καρδιακή συχνότητα 110 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 65\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Κατά τον καθετηριασμό παρατηρήθηκε παροδικός σπασμός του στελέχους χωρίς αιμοδυναμικές διαταραχές, ο οποίος αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με ενδοστεφανιαία χορήγηση (intra-coronary - i.c) νιτροδών. Μετά την αποκατάσταση του σπασμού επιτεύχθηκε αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια VF/SVT = 0 . Επιπλέον καταγράφηκαν 13 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 14 mmHg, αύξηση κατά 7mmHg και +100% μεταβολή από την αρχική τιμή)

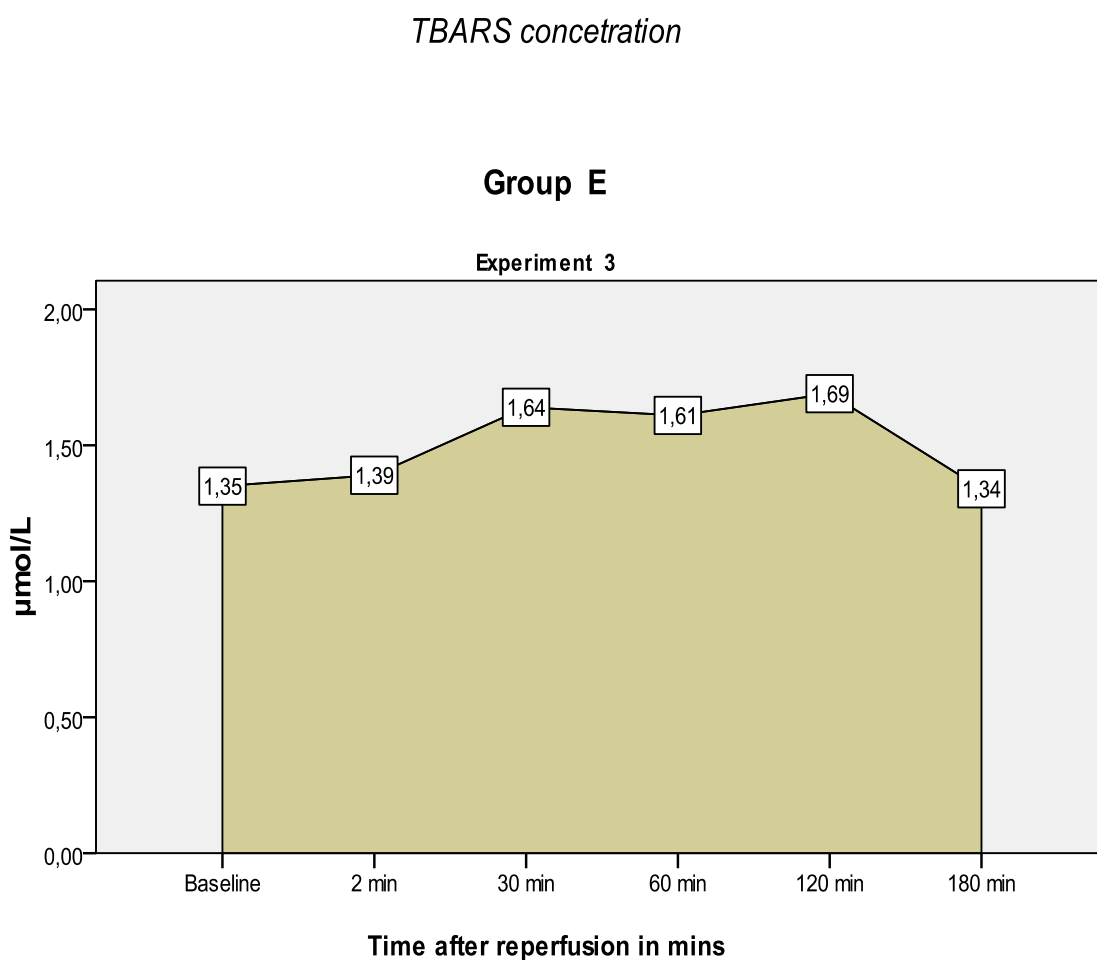
EF post = 45 %, ελάττωση κατά 20 μονάδες και -30,77% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 2 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

ο,28. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 18,0% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 18,0%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 4° :

Χοίρος, ηλικίας 4μηνών και 8 ημερών, βάρους 33Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 23 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός της δεξιάς κοινής μηριαίας αρτηρίας. Για τον καθετηριασμό της αριστερής κοινής μηριαίας αρτηρίας, μετά ανεπιτυχή προσπάθεια διαδερμικής προσπέλασης, απαιτήθηκε χειρουργική αποκάλυψη της αρτηρίας και εν συνεχεία επιτυχής προσπέλαση με άμεση παρακέντηση. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγιτίδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 112/76mmHg και καρδιακή συχνότητα 110 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 68\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής και αποκλεισμός της μεσότητας της περισπωμένης αρτηρίας με καθετήρα μπαλόνι αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια $VF/SVT = 0$. Επιπλέον καταγράφηκαν 15 επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας βραχείας διάρκειας χωρίς αιμοδυναμική επίπτωση.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 7 mmHg, αύξηση κατά 0mmHg και +0% μεταβολή από την αρχική τιμή)

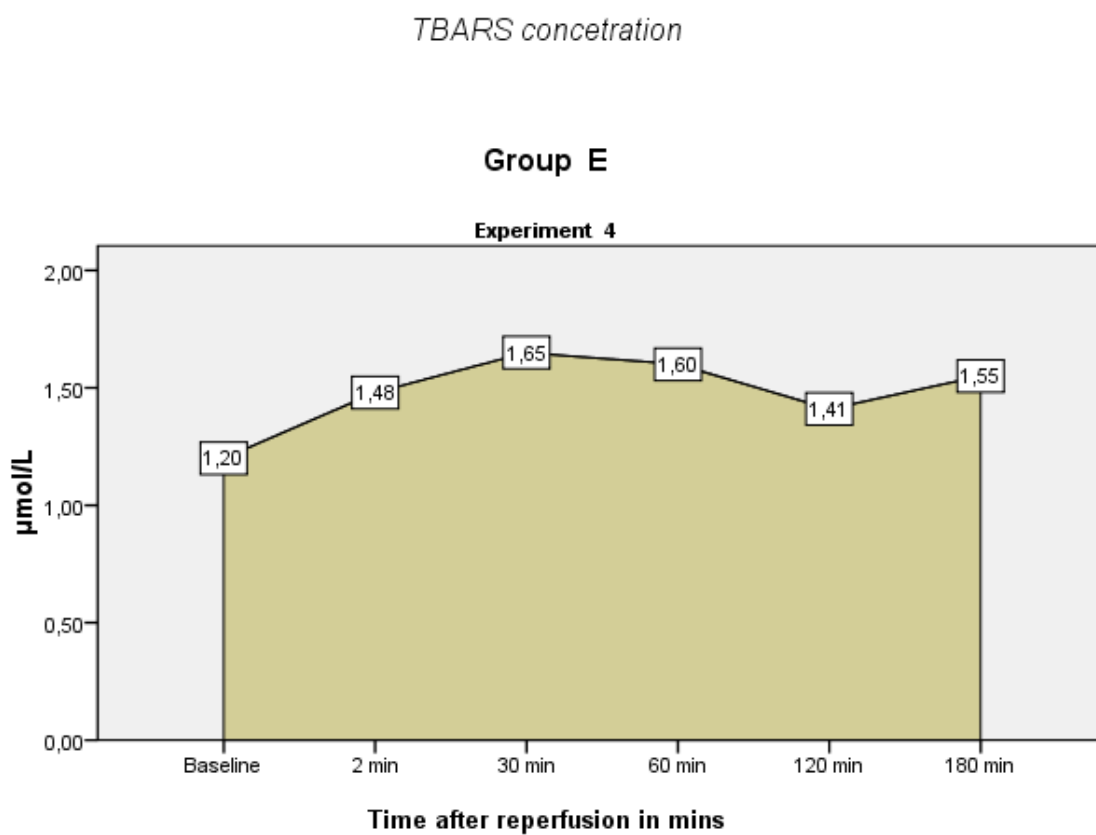
EF post = 52 %, ελάττωση κατά 16 μονάδες και -23,53% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Η ροή TIMI ήταν 3 και εκτιμήθηκε ως άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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

ο,27. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 18,1% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 18,1%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Πείραμα 5^ο :

Χοίρος, ηλικίας 5 μηνών και 2 ημερών, βάρους 35Kg. Παραλαβή προς εγκλεισμό την προηγούμενη ημέρα. Παραμονή χωρίς τροφή, παρά μόνο νερό, επί 24 ώρες.

Προνάρκωση και εισαγωγή στην αναισθησία χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής διαδερμικός καθετηριασμός των κοινών μηριαίων αρτηριών άμφω χωρίς επιπλοκές. Επιτυχής αποκάλυψη της έσω σφαγίτιδας φλέβας και εν συνεχεία εκλεκτικός καθετηριασμός του στεφανιαίου κόλπου. Λήψη φλεβικού αίματος για την μέτρηση των TBARS (baseline).

Καλή αιμοδυναμική κατάσταση του πειραματόζωου με αρτηριακή πίεση 100/62mmHg και καρδιακή συχνότητα 88 παλμούς/min. Μέτρηση των τιμών της τελοδιαστολικής πίεσης της αριστεράς κοιλίας (LVEDP-pre) και του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF pre) προ της ισχαιμίας:

$$LVEDP\ pre = 7\ mmHg$$

$$EF\ pre = 70\ \%$$

Ακολούθως έγινε επιτυχής εκλεκτικός καθετηριασμός του στελέχους με οδηγό καθετήρα αγγειοπλαστικής. Έναρξη ισχαιμίας και διατήρηση αυτής επί 45 min χωρίς επιπλοκές. Συστολή του μπαλονιού και απόσυρσή του χωρίς επιπλοκές. Έναρξη περιόδου επαναιμάτωσης.

Κατά τη συνεχή παρακολούθηση των αρρυθμιών επί 1 h μετά την επαναιμάτωση δεν καταγράφηκαν κακοήθεις αρρυθμίες. Επεισόδια VF/SVT = 0. Στο παρόν πειραματόζωο δεν καταγράφηκαν επεισόδια υπερκοιλιακής αρρυθμίας.

1 ώρα μετά την επαναιμάτωση έγιναν οι μετρήσεις της τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVEDP post) του κλάσματος εξώθησης (ejection fraction – EF post) και της αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο (ροή TIMI). Τα αποτελέσματα ήταν:

LVEDP post = 15 mmHg, αύξηση κατά 8mmHg και +114,3% μεταβολή από την αρχική τιμή)

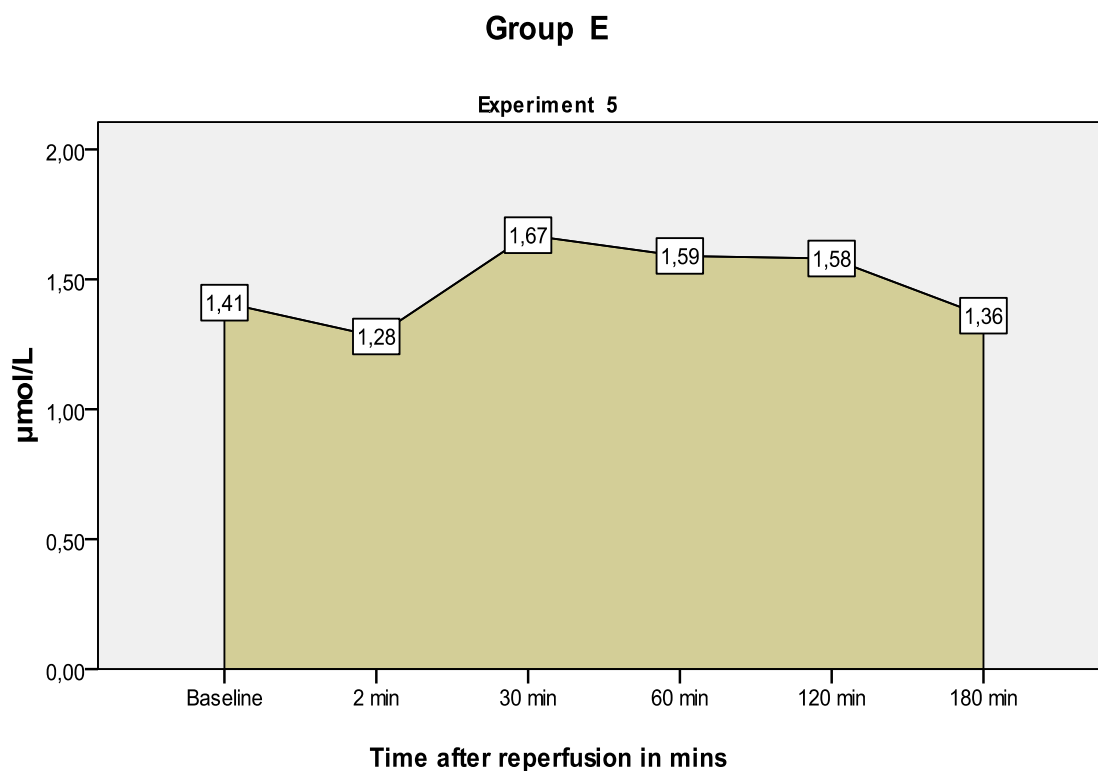
EF post = 40 %, ελάττωση κατά 30 μονάδες και -42,86% μεταβολή από την αρχική τιμή.

Δεν ανιχνεύθηκε ροή στο στεφανιαίο αγγείο – η ροή TIMI ήταν 0 και εκτιμήθηκε ως μη άριστη.

Μετά το πέρας της περιόδου επαναιμάτωσης και την ιστολογική προετοιμασία 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 0,36. Η μάζα της περιοχής σε κίνδυνο (R) αντιστοιχούσε στο 19,5% της συνολική μάζα της αριστεράς κοιλίας (R/LV = 19,5%).

Το οξειδωτικό φορτίο όπως αυτό εκτιμήθηκε με τις συνεχείς μετρήσεις της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

TBARS concetration



Συνολική παρουσίαση των αποτελεσμάτων και στατιστική σύγκριση

Πριν την εκτέλεση των στατιστικών συγκριτικών μετρήσεων έγινε έλεγχος της κανονικής κατανομής των μεταβλητών χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov test. Όλες οι μεταβλητές βρέθηκαν να έχουν κανονική κατανομή. Ειδικότερα για τη μεταβλητή των TBARS σε σχέση με το χρόνο τα αποτελέσματα του Kolmogorov-Smirnov test παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

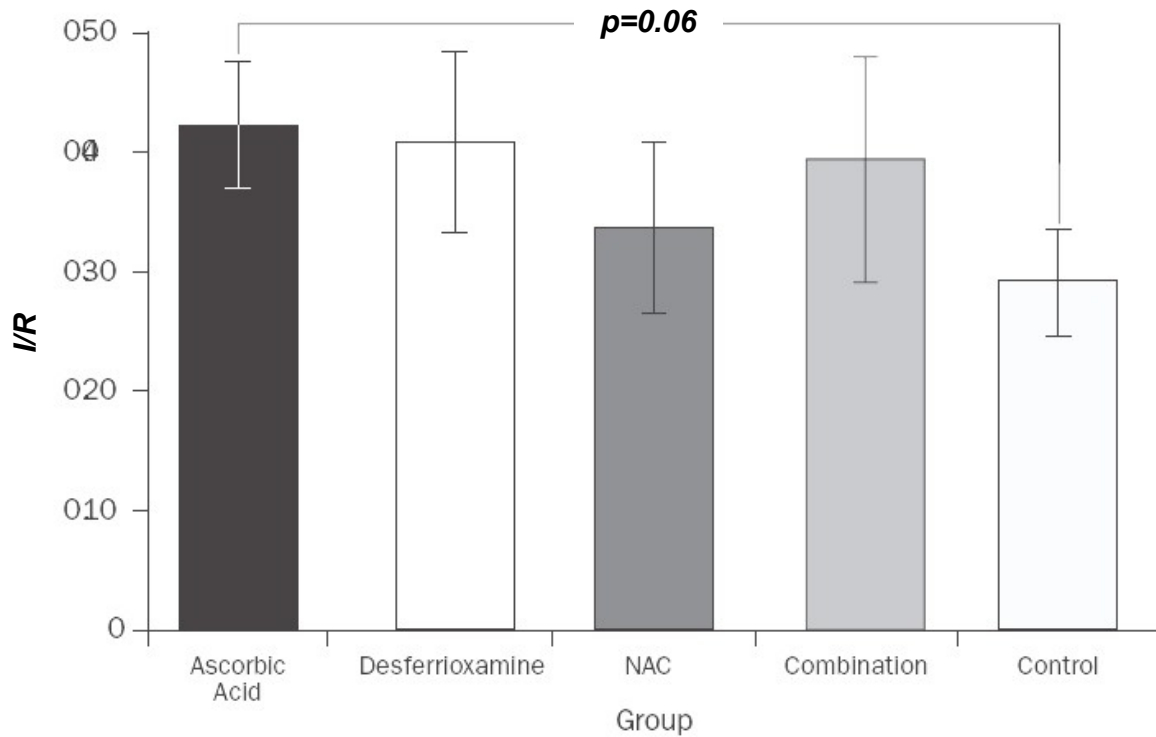
Πίνακας 3. Έλεγχος κανονικής κατανομής των τιμών TBARS.

	Baseline	2min	15min	30min	60min	120min	180min
Kolmogorov-Smirnov Z test	0.567	0.468	0.664	0.972	1.348	1.100	0.929
Asympto. Sig (2 - tailed)	0.905	0.981	0.769	0.301	0.053	0.178	0.353

Λόγος μυοκαρδιακής εμφραγματικής (νεκρωτικής - I) περιοχής του μυοκαρδίου σε σχέση με την περιοχή σε κίνδυνο (R) - (I/R ratio)

Στο τέλος του πειράματος ο λόγος (I/R ratio) της περιοχής του μυοκαρδίου που τελικά νεκρώθηκε (εμφραγματική, νεκρωτική περιοχή : “*Infarcted, I*”) σε σχέση με την περιοχή του μυοκαρδίου που ήταν σε ισχαιμία και κίνδυνο εμφράγματος (“*area at risk*”, R) για το σύνολο των πειραμάτων ήταν: 0.42 ± 0.05 για την ομάδα A, 0.40 ± 0.07 στην ομάδα B, 0.33 ± 0.07 στην ομάδα C, 0.39 ± 0.08 στην ομάδα D and 0.29 ± 0.04 για την ομάδα ελέγχου (Control group - ομάδα E) (Πίνακας 4) Η στατιστική ανάλυση ANOVA ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο λόγο I/R μεταξύ των υπό εξέταση ομάδων ($p=0.03$) (Πίνακας 5). Η περαιτέρω κατά ομάδες ανάλυση (post-hoc analysis) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη κατά ομάδες σύγκριση. Ο λόγος I/R στην ομάδα που έλαβε ασκορβικό οξύ (ομάδα A) παρατηρήθηκε αυξημένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ομάδα E). Η διαφορά αυτή ήταν οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0.06$) και αντικατοπτρίζει ισχυρή τάση προς αύξηση της νεκρωτικής περιοχής του μυοκαρδίου στα πειραματοζώα που έλαβαν ασκορβικό οξύ σε σχέση με αυτά που δεν έλαβαν (Σχ. 10).

Δεδομένου του κοινού βάρους και ηλικίας όλων των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η αναλογία της περιοχής του μυοκαρδίου σε κίνδυνο



(R) σε σχέση με το συνολική μάζα του μυοκαρδίου (LV, λόγος R/LV) δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων σύγκρισης ($p=0.48$) (Πίνακες 6 και 7).

Σχήμα 10. Συγκριτική αναπαράσταση του λόγου I/R μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 4. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων I/R σε όλες τις ομάδες

	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
IR ratio	Control	,2902	,04279	,01914	,2371	,3433	,25	,36
	DES	,4080	,07530	,03367	,3145	,5015	,31	,52
	Vit C	,4220	,05263	,02354	,3567	,4873	,35	,49
	NAC	,3360	,07127	,03187	,2475	,4245	,22	,41
	Combination	,3940	,08503	,03803	,2884	,4996	,31	,49

Πίνακας 5. Ανάλυση ANOVA για την τιμή I/R μεταξύ των ομάδων

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IR	Between Groups	,061	4	,015	3,390	,028
	Within Groups	,090	20	,005		
	Total	,152	24			

Πίνακας 6. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων των τιμών R/LV

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
R/LV Control	5	17,500	1,5379	,6877	15,591	19,409	15,8	19,5
DES	5	10,162	2,8008	1,2525	6,684	13,640	6,5	14,2
Vit C	5	16,221	2,9403	1,3150	12,570	19,872	12,7	20,2
NAC	5	12,923	4,9208	2,2006	6,813	19,033	5,3	17,5
Combination	5	15,894	6,0539	2,7074	8,377	23,410	8,9	25,2
Total	25	14,540	4,5410	,9082	12,665	16,414	5,3	25,2

Πίνακας 7. Ανάλυση ANOVA των τιμών R/LV

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
R/LV	Between Groups	176,017	4	44,004	2,760	,48
	Within Groups	318,876	20	15,944		
	Total	494,893	24			

Αρρυθμίες

Στις αρρυθμίες μελετήθηκαν η συχνότητα εμφάνισης κοιλιακών και υπερκοιλιακών αρρυθμιών κατά την 1^η ώρα επανααιμάτωσης. Στην ομάδα ελέγχου (ομάδα E) κανένα πειραματόζωο δεν εμφάνισε κακοήθεις αρρυθμίες VF/SVT (0%). Σημαντικός αριθμός κακοήθων αρρυθμιών VF/SVT εμφάνισαν 4 πειραματόζωα της ομάδας C (NAC, 80.0%), και 2 πειραματόζωα της ομάδας B (Desferrioxamine, 40.0%). Σε αμφότερες τις ομάδες A (Ascorbic acid) και ομάδα D (συνδυασμός αντιοξειδωτικών) 1 πειραματόζωο εκδήλωσε επεισόδια VF/SVT (20.0%) (Πίνακας 8). Δύο (2) πειραματόζωα είχαν επαναλαμβανόμενα επεισόδια VF/SVT : 1 πειραματόζωο στην ομάδα A εκδήλωσε 5 επαναλαμβανόμενα επεισόδια VF/SVT ενώ 1 πειραματόζωο στην ομάδα Δ εκδήλωσε 2 συνεχόμενα επεισόδια VF. Όλα τα επεισόδια αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με χορήγηση ηλεκτρικής απινίδωσης (320 Joules) εφάπαξ. Η πλειοψηφία των επεισοδίων (6/7, 85.7%) εκδηλώθηκαν στα πρώτα 10min της επανααιμάτωσης.

Σημαντικός αριθμός επεισοδίων καλοήθους αρρυθμιών – μη-εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας (NSVT) και ο ιδιοκοιλιακού ρυθμού (idioventricular rhythm) εκδηλώθηκαν σε όλες τις ομάδες πειραματόζωων: στην ομάδα ελέγχου (ομάδα E) εκδηλώθηκαν 9.8 ± 6.9 επεισόδια, στην ομάδα A 11.4 ± 8.9 , στην ομάδα B 14.8 ± 5.8 , στην ομάδα C 11.0 ± 3.8 και στην ομάδα D 14.4 ± 9.9 . Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην εκδήλωση των αρρυθμιών μεταξύ των θεραπευτικών ομάδων ($p = 0.16$).

Πίνακας 8. Παρουσίαση των επεισοδίων κακοήθων αρρυθμιών VF/SVT ανά ομάδα

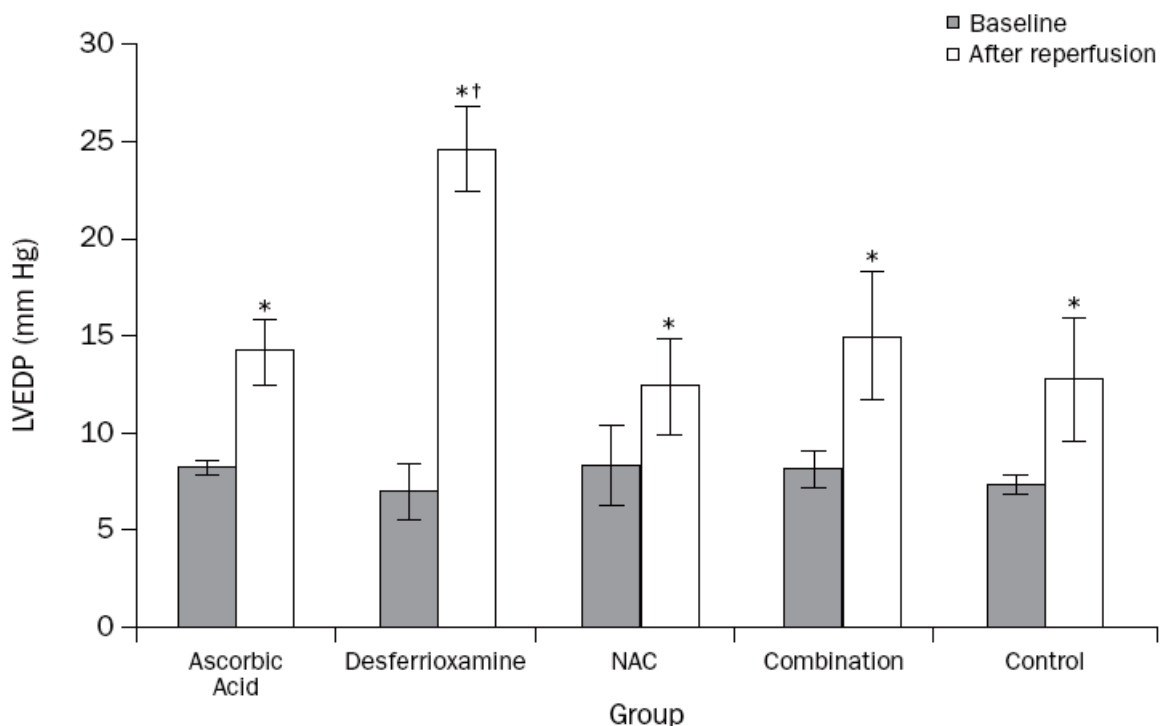
		GROUP					Total
		Control	DES	Vit C	NAC	Combination	
VF/ SVT	No	5	3	4	1	3	16
	Yes	0	2	1	4	1	9
Total		5	5	5	5	5	25

Πίνακας 9. Στατιστική σύγκριση των επεισοδίων κακοήθων αρρυθμιών

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7,639(a)	4	,106
Likelihood Ratio	9,203	4	,056
Linear-by-Linear Association	3,426	1	,064

Εκτίμηση της συστολικής λειτουργίας της Αριστεράς κοιλίας

Η λειτουργικότητα της Αριστεράς κοιλίας έγινε με την μέτρηση της LVEDP και την αγγειογραφική εκτίμηση του κλάσματος εξώθησης της Αριστεράς κοιλίας (EF). Η LVEDP εκτιμήθηκε σε όλα τα πειραματόζωα μετά την πάροδο 1 ώρας από την έναρξη της επαναιμάτωσης και πριν την εκτέλεση της κοιλιογραφίας. Σε όλες τις ομάδες θεραπείας, η LVEDP αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με την τιμή κατά την έναρξη του πειράματος ($p < 0.05$ για κάθε μία από τις πειραματικές ομάδες) (Πίνακες 10, 11, 12). Η στατιστική ανάλυση με το μοντέλο ANOVA αποκάλυψε στατιστικώς σημαντικές διαφορές της μεταβολής της LVEDP – τόσο στην απόλυτη όσο και στην σχετική (%) ($p < 0.01$ και για τους 2 τύπους μεταβολής). Η περαιτέρω ανάλυση κατά ομάδες (post-hoc analysis) ανέδειξε η LVEDP αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στην ομάδα Β σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες ($p < 0.01$) (Σχ. 11). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην μεταβολή της LVEDP στην σύγκριση μεταξύ των υπολοίπων



ομάδων πειραματόζωων. (Σχ. 11)

Σχήμα 11. Συγκριτική αναπαράσταση των τιμών της LVEDP πριν και 60min μετά την επαναιμάτωση. † $p < 0.01$ μεταξύ της ομάδας της δεσφερριοξαμίνης (DES) και όλων

των άλλων ομάδων. * $p < 0.05$ για όλες τις ομάδες, οι τιμές της LVEDP μετά την επαναιμάτωση είναι σημαντικά αυξημένες σε σχέση με πριν.

Πίνακας 10. Αναλυτική παρουσίαση των τιμών της LVEDP πριν την επαναϊμάτωση (Baseline LVEDP), 1h μετά την επαναϊμάτωση (LVEDP at 1h post reperfusion) και της διαφοράς τους (difference LVEDP, %) για όλες τις ομάδες.

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Baseline LVEDP	Control	5	7,40	,548	,245	6,72	8,08	7	8
	DES	5	7,00	1,581	,707	5,04	8,96	5	9
	Vit C	5	8,20	,447	,200	7,64	8,76	8	9
	NAC	5	8,40	2,302	1,030	5,54	11,26	6	12
	Combination	5	8,20	1,095	,490	6,84	9,56	7	10
	Total	25	7,84	1,375	,275	7,27	8,41	5	12
LVEDP at 1h post reperfusion	Control	5	12,80	3,564	1,594	8,38	17,22	7	16
	DES	5	24,60	2,408	1,077	21,61	27,59	22	28
	Vit C	5	14,20	1,789	,800	11,98	16,42	12	16
	NAC	5	12,40	2,702	1,208	9,05	15,75	8	15
	Combination	5	15,00	3,742	1,673	10,35	19,65	10	18
	Total	25	15,80	5,315	1,063	13,61	17,99	7	28
Difference LVEDP	Control	5	5,40	3,435	1,536	1,13	9,67	0	8
	DES	5	17,60	1,949	,872	15,18	20,02	15	19
	Vit C	5	6,00	1,581	,707	4,04	7,96	4	8
	NAC	5	3,60	1,673	,748	1,52	5,68	1	5
	Combination	5	6,80	3,271	1,463	2,74	10,86	3	10
	Total	25	7,88	5,570	1,114	5,58	10,18	0	19

-/-

Difference LVEDP (%)	Control	5	72,860	47,4910	21,2386	13,892	131,828	,0	114,3
	DES	5	263,202	74,4330	33,2874	170,781	355,623	187,5	380,0
	Vit C	5	73,056	18,6753	8,3518	49,867	96,244	50,0	100,0
	NAC	5	43,673	22,4481	10,0391	15,800	71,546	16,7	71,2
	Combination	5	82,571	39,9892	17,8837	32,918	132,225	42,9	125,0
	Total	25	107,073	90,7399	18,1480	69,617	144,528	,0	380,0

Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση ANOVA για όλες τις ομάδες.

Baseline LVEDP	Between Groups	7,360	4	1,840	,968	,447
	Within Groups	38,000	20	1,900		
	Total	45,360	24			
LVEDP at 1h post reperfusion	Between Groups	506,000	4	126,500	14,709	,000
	Within Groups	172,000	20	8,600		
	Total	678,000	24			
Difference LVEDP	Between Groups	618,240	4	154,560	24,456	,000
	Within Groups	126,400	20	6,320		
	Total	744,640	24			
Difference LVEDP (%)	Between Groups	156619,473	4	39154,868	19,105	,000
	Within Groups	40989,914	20	2049,496		
	Total	197609,388	24			

Πίνακας 12. Post-hoc analysis των αποτελεσμάτων. Αναδεικνύεται η σημαντική αύξηση της LVEDP στη ομάδα της δεσφερριτοξαμίνης (DES) σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες.

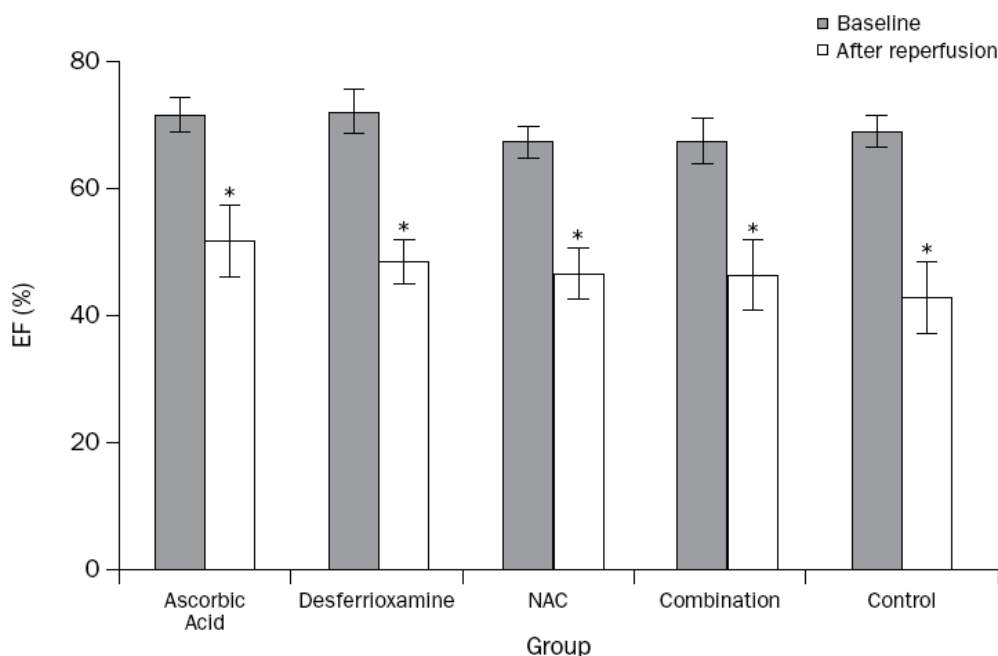
Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Difference LVEDP	Control	DES	-12,20(*)	1,590	,000	-17,21	-7,19
		Vit C	-,60	1,590	1,000	-5,61	4,41
		NAC	1,80	1,590	1,000	-3,21	6,81
		Combination	-1,40	1,590	1,000	-6,41	3,61
	DES	Control	12,20(*)	1,590	,000	7,19	17,21
		Vit C	11,60(*)	1,590	,000	6,59	16,61
		NAC	14,00(*)	1,590	,000	8,99	19,01
		Combination	10,80(*)	1,590	,000	5,79	15,81
	Vit C	Control	,60	1,590	1,000	-4,41	5,61
		DES	-11,60(*)	1,590	,000	-16,61	-6,59
		NAC	2,40	1,590	1,000	-2,61	7,41
		Combination	-,80	1,590	1,000	-5,81	4,21
	NAC	Control	-1,80	1,590	1,000	-6,81	3,21
		DES	-14,00(*)	1,590	,000	-19,01	-8,99
		Vit C	-2,40	1,590	1,000	-7,41	2,61
		Combination	-3,20	1,590	,578	-8,21	1,81
Combination	Control	1,40	1,590	1,000	-3,61	6,41	
	DES	-10,80(*)	1,590	,000	-15,81	-5,79	
	Vit C	,80	1,590	1,000	-4,21	5,81	

		NAC	3,20	1,590	,578	-1,81	8,21
		-//-					
Difference LVEDP (%)	Control	DES	-190,342(*)	28,6321	,000	-280,631	-100,054
		Vit C	-,196	28,6321	1,000	-90,484	90,093
		NAC	29,187	28,6321	1,000	-61,102	119,475
		Combination	-9,711	28,6321	1,000	-100,000	80,577
	DES	Control	190,342(*)	28,6321	,000	100,054	280,631
		Vit C	190,147(*)	28,6321	,000	99,858	280,435
		NAC	219,529(*)	28,6321	,000	129,240	309,817
		Combination	180,631(*)	28,6321	,000	90,342	270,919
	Vit C	Control	,196	28,6321	1,000	-90,093	90,484
		DES	-190,147(*)	28,6321	,000	-280,435	-99,858
		NAC	29,382	28,6321	1,000	-60,906	119,671
		Combination	-9,516	28,6321	1,000	-99,804	80,773
	NAC	Control	-29,187	28,6321	1,000	-119,475	61,102
		DES	-219,529(*)	28,6321	,000	-309,817	-129,240
		Vit C	-29,382	28,6321	1,000	-119,671	60,906
		Combination	-38,898	28,6321	1,000	-129,187	51,390
	Combination	Control	9,711	28,6321	1,000	-80,577	100,000
		DES	-180,631(*)	28,6321	,000	-270,919	-90,342
		Vit C	9,516	28,6321	1,000	-80,773	99,804
		NAC	38,898	28,6321	1,000	-51,390	129,187

Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση το κλάσμα εξώθησης της Αριστεράς κοιλίας (EF) μετρήθηκε ελαττωμένο σε σχέση με την αρχική τιμή, σε κάθε μία από τις ομάδες των πειραματόζων ($p < 0.01$ για όλες τις ομάδες). Η μεταβολή αυτή στο κλάσμα εξώθησης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης ($p = 0.185$) (Πίνακας 13, Σχ. 12).

Πίνακας 13. ANOVA ανάλυση των τιμών του κλάσματος εξώθησης (EF)

	Between Groups	205,760	4	51,440	1,720	,185
EF	Within Groups	598,000	20	29,900		
	Total	803,760	24			



Σχήμα 12. Συγκριτική αναπαράσταση της μεταβολής του κλάσματος εξώθησης (EF) πριν και μετά 60min της επαναιμάτωσης. * $p < 0.05$ για όλες τις ομάδες, στατιστικά σημαντική ελάττωση του EF για όλες τις ομάδες μετά την επαναιμάτωση. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Στεφανιαία ροή μετά την επαναιμάτωση

Τα πειραματόζωα εκείνα στα οποία παρατηρήθηκε άριστη ροή TIMI 3, 60 min μετά την επαναιμάτωση ήταν 3 στην ομάδα C, 1 στις ομάδες A, B, και E, και κανένα στην ομάδα B. Μία τάση προς καλύτερη αποκατάσταση ροής παρατηρήθηκε την ομάδα C (NAC) συγκρινόμενη με την ομάδα B (desferrioxamine, $p=0.08$ Fisher exact test).

Ειδικότερα όσον αφορά την σύγκριση μεταξύ της κατηγοριοποιημένης μεταβλητής της επίτευξης άριστης ροής TIMI 3 στις διάφορες ομάδες πειραματόζωων ανέδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 14:

Πίνακας 14. Παρουσίαση στατιστικής σύγκρισης μεταξύ των ομάδων όσον αφορά την επίτευξη άριστης ροής TIMI 3 μετά την επαναιμάτωση.

Συγκρινόμενες ομάδες		Στατιστική σημαντικότητα (p)
E	A	0.778
	B	0.500
	C	0.262
	D	0.778
A	B	0.500
	C	0.262
	D	0.778
B	C	0.083
	D	0.500
D	C	0.262

Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό stress εκτιμήθηκε με την μέτρηση της συγκέντρωσης των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλλου, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Σχ. 9)

Οι αρχικές τιμές των TBARS δεν διέφεραν μεταξύ των διαφόρων πειραματικών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα η στατιστική ανάλυση μεταβολής των τιμών TBARS σε σχέση με τις αρχικές τιμές (0 min) πριν την έναρξη της ισχαιμίας ανά πειραματική ομάδα ανέδειξε τα παρακάτω στατιστικά αποτελέσματα (Πίνακας 15):

Πίνακας 15. Στατιστική σύγκριση μεταξύ αρχικών και μετά επαναιμάτωση τιμών των TBARS.

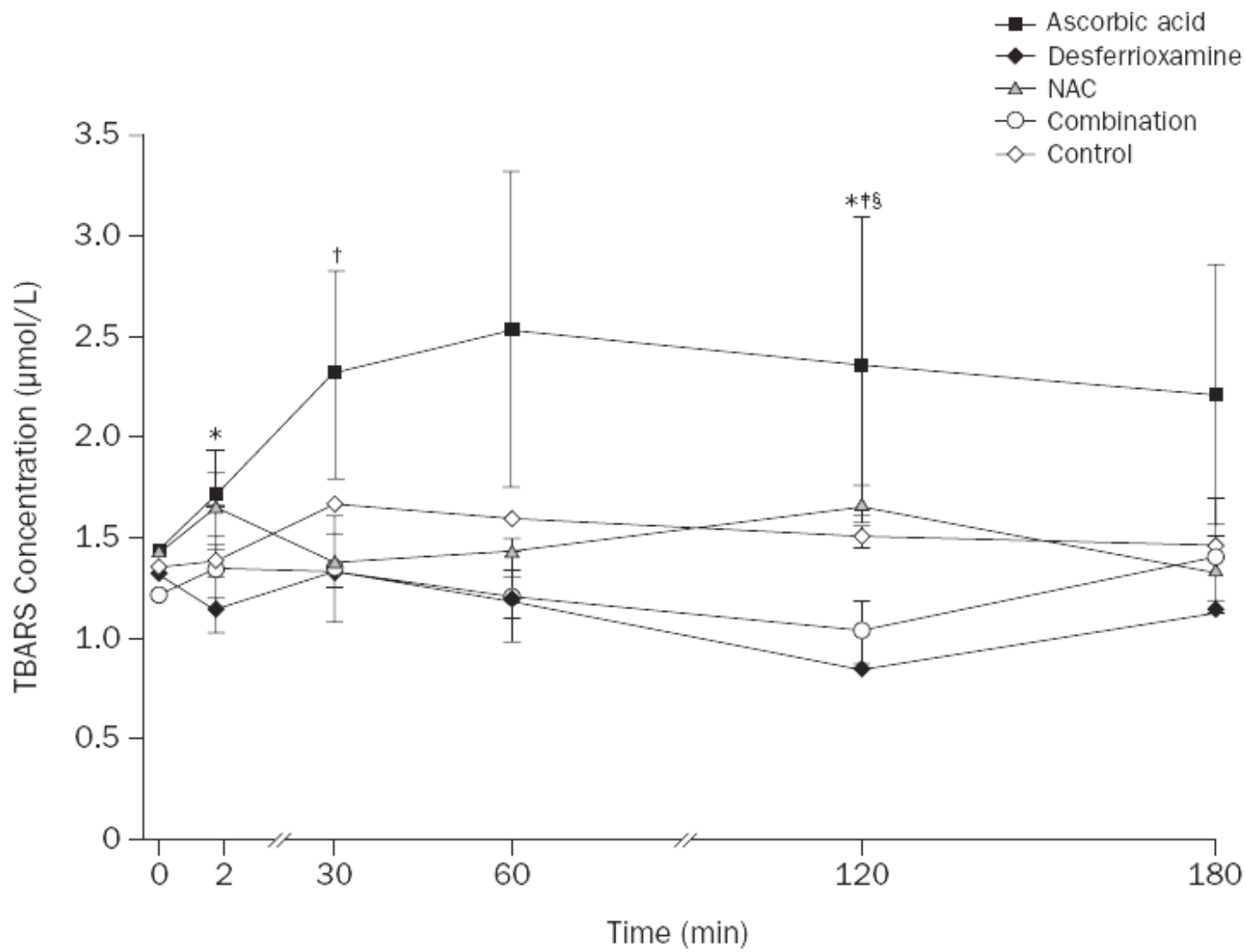
Ομάδα A (Vitamin C)		Στατιστική σημαντικότητα (p)
0 min	2 min	0.059
	30 min	0.157
	160 min	0.238
	120 min	0.285
	180 min	0.317
Ομάδα B (Desferrioxamine)		Στατιστική σημαντικότητα (p)
0 min	2 min	0.002*
	30 min	0.669
	160 min	0.457
	120 min	0.002*
	180 min	0.033*
Ομάδα C (NAC)		Στατιστική σημαντικότητα (p)
0 min	2 min	0.132
	30 min	0.704
	160 min	0.924
	120 min	0.007
	180 min	0.378
Ομάδα D (Combination)		Στατιστική σημαντικότητα (p)
0 min	2 min	0.556
	30 min	0.501
	160 min	0.957
	120 min	0.418

	180 min	0.404
Ομάδα E (Control)		Στατιστική σημαντικότητα (p)
	2 min	0.757
	30 min	0.006
0 min	160 min	0.038
	120 min	0.120
	180 min	0.433

* Σημειώνεται ότι οι τιμές αυτές αφορούν ελάττωση των τιμών TBARS σε σχέση με τις αρχικές τιμές στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές.

Συγκρινόμενες με τις αρχικές τιμές, η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα C, στα 120min μετά την επαναιμάτωση και στην E από τα 30min έως τα 60 min μετά την επαναιμάτωση. Στην ομάδα B, παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των τιμών των TBARS αμέσως μετά την επαναιμάτωση στα 2min καθώς επίσης και μετά τα 120min έως το τέλος των 180min. Στην ομάδα συνδυασμού των αντιοξειδωτικών ουσιών (ομάδα D) δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των τιμών των TBARS μετά την επαναιμάτωση.

Η στατιστική σύγκριση των μεταβολών των τιμών των TBARS μεταξύ των διαφόρων θεραπευτικών ομάδων του πειράματος έγινε με τη σύγκριση των AUC και τη χρήση στατιστικού μοντέλου ANOVA. Η ανάλυση ANOVA των AUC για όλες τις θεραπευτικές ομάδες του πειράματος για το σύνολο της περιόδου επαναιμάτωσης (180min) δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων τιμών των TBARS ανά ομάδα σε κάθε μία ξεχωριστά τις χρονικές στιγμές μέτρησης τους αποκάλυψε ότι στην ομάδα A οι τιμές των TBARS ήταν στατιστικά μεγαλύτερες από ότι στην ομάδα B. Η διαφορά αυτή εντοπίστηκε μόνο στη χρονική στιγμή των 120min μετά την επαναιμάτωση. Δεν ανιχνεύθηκαν άλλες διαφορές μεταξύ των υπολοίπων ομάδων σε όλες τις χρονικές στιγμές ελέγχου των TBARS (Σχ. 13).



Σχήμα 13. Μέση (Mean ± SEM) συγκέντρωση των TBARS σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την διάρκεια της επαναιμάτωσης.
 * $p = 0.02$ για τη σύγκριση της ομάδας Desferrioxamine έναντι βασικής τιμής έναρξης του πειράματος.
 † $p = 0.02$ για τη σύγκριση της ομάδας ελέγχου έναντι βασική τιμής έναρξης του πειράματος,
 ‡ για τη σύγκριση της ομάδας N-ακετυλ-κυστίνης (NAC) έναντι βασική τιμής έναρξης του πειράματος,

§ $p=0.05$ για τη σύγκριση της ομάδας *Ascorbic acid* έναντι ομάδας *Desferrioxamine*.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη εξετάσαμε την αποτελεσματικότητα τριών διαφορετικών γνωστών αντιοξειδωτικών παραγόντων στην πρόληψη του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Οι υπό εξέταση αντιοξειδωτικές ουσίες χορηγήθηκαν η κάθε μία ξεχωριστά και όλες μαζί σε συνδυασμό. Η χορήγηση των ουσιών έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να προσομοιάζει τις πραγματικές συνθήκες χορήγησης φαρμάκων στην κλινική πράξη. Για αυτό το λόγο οι αντιοξειδωτικές ουσίες χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως, λίγο πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης όπως ακριβώς θα συνέβαινε σε κάθε περίπτωση αντιμετώπισης ενός ασθενή με έμφραγμα του μυοκαρδίου που πρόκειται να υποβληθεί σε μηχανική (πρωτογενή αγγειοπλαστική) ή φαρμακευτική (θρομβόλυση) επαναιμάτωση. Το πειραματόζωο και το πειραματικό μοντέλο, επιλέχθηκαν και σχεδιάστηκαν, αντίστοιχα, με τέτοιο τρόπο ώστε να υπερκεραστούν οι περιορισμοί παρόμοιων πειραματικών μελετών στις οποίες τα ήδη χρησιμοποιούμενα πειραματικά μοντέλα δεν προσομοιάζαν τις κλινικές συνθήκες. Στις περιπτώσεις αυτές ουσίες που αποδείχθηκαν προστατευτικές στις πειραματικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν το ίδιο στις κλινικές μελέτες^{324, 381, 406, 433}. Η πιθανότερη εξήγηση του παράδοξου αυτού φαινομένου είναι ότι οι πειραματικές συνθήκες στις οποίες δοκιμάστηκαν οι αντιοξειδωτικές αυτές ουσίες δεν αντιστοιχούσαν στις κλινικές συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης – πειραματικά μοντέλα «ανοιχτού θώρακα», χορήγηση των ουσιών πριν την έναρξη της ισχαιμίας.

Προηγούμενες πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν εξετάσει την αποτελεσματικότητα των τριών αντιοξειδωτικών παραγόντων ξεχωριστά (Vit C, NAC και desferrioxamine) στην προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Στο παρόν πειραματικό μοντέλο υποθέσαμε ότι ο συνδυασμός των τριών αυτών αντιοξειδωτικών ουσιών, θα είχε πιθανώς καλύτερα αποτελέσματα. Θεωρήσαμε ότι ο συνδυασμός αυτών των τριών αντιοξειδωτικών ουσιών που δρουν σε διαφορετικά στάδια στον «καταρράκτη» των παθοφυσιολογικών μηχανισμών του συνδρόμου επαναιμάτωσης, θα είχε συνεργική δράση με αποτελέσματα καλύτερα από αυτά της μονομερούς χορήγησης των ουσιών αυτών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η ενδοφλέβια χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών είτε ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό, σε πειραματικό μοντέλο χοίρου «κλειστού θώρακα» δεν περιορίζει τις βλάβες από επαναιμάτωση. Ειδικότερα ο συνδυασμός των αντιοξειδωτικών ουσιών δεν περιορίζει ούτε την έκταση της εμφραγματικής περιοχής, που αποτελεί και το σημαντικότερο καταληκτικό σημείο της μελέτης μας, ούτε το οξειδωτικό φορτίο μετά την επαναιμάτωση. Επίσης, είναι

ανεπαρκής η προστασία που παρέχει από τις άλλες κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου επαναιμάτωσης όπως η επιβράδυνση της στεφανιαίας ροής (no-reflow phenomenon), οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης και η δυσλειτουργία της αριστεράς κοιλίας.

Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα ευρέως γνωστό και αποδεδειγμένα δραστικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό που βρίσκεται σε ικανές ποσότητες εντός των κυττάρων διαφόρων ιστών του ανθρωπίνου σώματος³⁶⁶. Μπορεί να δρα είτε άμεσα, απενεργοποιώντας τις υδατοδιαλυτές υπεροξυαλικές ρίζες, είτε έμμεσα αποκαθιστώντας τις αντιοξειδωτικές ικανότητες της γλουταθειόνης (GSH), ενός ισχυρού ενδογενούς αντιοξειδωτικού³⁶⁷. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αδρανοποιούνται κατά την αντίδραση τους με το ασκορβικό οξύ. Η αντίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του ασκορβικού οξέος σε μονοδεϋδροασκορβικό οξύ πρωτογενώς και σε δεϋδροασκορβικό οξύ δευτερογενώς. Η κύρια αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος συνίσταται σε αυτή την ικανότητα του να αδρανοποιεί τις υψηλής τοξικότητας δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως οι υδροξυλικές ρίζες και το υπεροξειδίο του υδρογόνου, με αντίκρισμα την παραγωγή οξειδωμένων μορφών ασκορβικού οξέος που είναι πολύ πιο σταθερές και σχετικά ανενεργές ουσίες. Οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος μετατρέπονται στην αντιοξειδωτική της μορφή με τη δράση του ενζύμου της γλουταθειόνης (GSH)^{366, 367}.

Προηγούμενες πειραματικές μελέτες που εξέτασαν την δράση του ασκορβικού οξέος στο σύνδρομο επαναιμάτωσης κατέληξαν σε διφορούμενα αποτελέσματα. Μερικές από αυτές έδειξαν προστατευτική δράση του ασκορβικού οξέος όταν χορηγήθηκε μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά τόσο σε μεμονωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα.^{369, 370} Σε άλλες μελέτες η χορήγηση του ασκορβικού οξέος απέτυχε να προστατεύσει το μυοκάρδιο από το σύνδρομο επαναιμάτωσης, ακόμα και όταν αυτό χορηγήθηκε πριν την έναρξη της ισχαιμίας^{371, 434}.

Στη παρούσα πειραματική μελέτη, το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής αυξήθηκε στα πειραματόζωα που έλαβαν ασκορβικό οξύ παρόλο που η αύξηση αυτή δεν υπερέβη τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Παρατηρήθηκε όμως μια πολύ ισχυρή στατιστική τάση προς την αύξηση της εμφραγματικής περιοχής σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ($p=0.06$). Η αυξητική μεταβολή της εμφραγματικής περιοχής θα μπορούσε να αποδοθεί σε οξειδωτική βλάβη καθώς στην ίδια ομάδα παρατηρήθηκε και παράλληλη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου, όπως αυτό προσδιορίστηκε με τη

μέτρηση της συγκέντρωσης των TBARS. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης είναι σύμφωνα με παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών σχετικά με την προ-οξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος^{435, 436}.

Αυτό το παράδοξο φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από δύο μηχανισμούς. Οι Vera JC et al, σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, έχουν δείξει ότι η κύρια μορφή διακίνησης του ασκορβικού οξέος από και προς τον ενδοκυττάριο χώρο είναι η οξειδωμένη μορφή του, το δεϋδροασκορβικό οξύ (dehydroascorbic acid, DHA)⁴³⁶. Ενδοκυττάρια το DHA ανάγεται εκ νέου σε ασκορβικό οξύ μέσω των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορφών, όπως είναι η GSH. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται η συνέχιση της αντιοξειδωτικής δράσης του ασκορβικού οξέος στον ενδοκυττάριο χώρο^{437, 438}. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας της επαναιμάτωσης παρατηρείται σημαντική ελάττωση όλων των ενδογενών ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένου και της GSH. Δεδομένης της έλλειψης της GSH ελαττώνεται σημαντικά η αναγωγή του DHA σε ασκορβικό οξύ περιορίζοντας σημαντικά την αντιοξειδωτική του δράση. Με τη σειρά του, το DHA είναι μία εξαιρετικά ασταθής χημική ένωση η οποία σε περιβάλλον απουσίας ενζυμικών μηχανισμών ικανών για την επαναγωγή του DHA σε ασκορβικό οξύ, διασπάται σε οξαλικό και θρεονικό οξύ μέσω μίας πολύπλοκης ακολουθίας αντιδράσεων.

Ο δεύτερος μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει την πιθανή προ-οξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος είναι το φαινόμενο της «αυτό-οξείδωσης» (ascorbic acid “auto-oxidation”). Πρόκειται για ένα γνωστό φαινόμενο που συμβαίνει κυρίως κατά την παρουσία ελευθέρων ιόντων Fe και Cu. Είναι γνωστό ότι ελεύθερα ιόντα Fe και Cu – τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στο μυοκάρδιο μετά την επαναιμάτωση – μπορούν να συνδεθούν με αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το ασκορβικό οξύ, και μέσω πολύπλοκων μεταλλο-καταλυόμενων βιοχημικών αντιδράσεων να οδηγήσουν σε οξείδωση του ασκορβικού οξέος⁴³⁹.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μας μελέτης το ασκορβικό οξύ χορηγούμενο στο τέλος της ισχαιμικής περιόδου και την πρώιμη περίοδο της επαναιμάτωσης απέτυχε να προστατεύσει το μυοκάρδιο από τις βλαβερές συνέπειες του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Η αδυναμία της ενδοκυττάριας δράσης του ασκορβικού οξέος και ο μηχανισμός της «αυτό-οξείδωσης» του είναι πιθανώς μία εξήγηση τόσο για την αποτυχία της αντιοξειδωτικής του δράσης όσο και για την διαφαινόμενη προ-οξειδωτική του δράση, αντίστοιχα.

Δεσφερριοξαμίνη

Η δεσφερριοξαμίνη έχει ευρέως μελετηθεί σε πλήθος πειραματικών μελετών κυρίως για την ικανότητα εκκαθαρισμού των ελευθέρων ριζών O₂. Η βασική αντιοξειδωτική ικανότητα της δεσφερριοξαμίνης οφείλεται κυρίως στην ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ιόντων Fe αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τις μεταλλοκαταλυόμενες αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss⁴⁴⁰. Οι τελευταίες αποτελούν έναν γνωστό εναλλακτικό τρόπο παραγωγής δραστικών μορφών O₂ (Δ.Μ.Ο). Η αναστολή τους με την χρήση σιδηροδεσμευτικών ουσιών όπως η δεσφερριοξαμίνη θεωρείται ότι ελαττώνει την παραγωγή Δ.Μ.Ο και περιορίζει την τοξική δράση τους στο μυοκάρδιο κατά την φάση της επαναιμάτωσης.

Πολλές από τις πειραματικές μελέτες που εξέτασαν την δράση της δεσφερριοξαμίνης στο σύνδρομο επαναιμάτωσης έδειξαν θετικά αποτελέσματα, κυρίως όταν η δεσφερριοξαμίνη χορηγήθηκε πριν την έναρξη της ισχαιμίας^{376, 441}. Βασίζομενοι στα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των πειραματικών μελετών εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της δεσφερριοξαμίνης και σε κλινικές μελέτες, ιδιαίτερα σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη (CABG)^{383, 442}. Στις κλινικές μελέτες αυτές εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της δεσφερριοξαμίνης στην πρόληψη ενός άλλου φαινομένου σχετιζόμενο με την έκλυση Δ.Μ.Ο, αυτό της καθολικής επαναιμάτωσης μετά την καρδιοπληγία σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε CABG. Και στις δύο αυτές κλινικές μελέτες των Drossos G et al και Paraskevaïdis A et al η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης πριν την έναρξη της καρδιοπληγίας είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση του κλάσματος εξώθησης της αριστεράς κοιλίας μετά CABG η οποία αποδόθηκε στον περιορισμό παραγωγής Δ.Μ.Ο όπως αυτή εκτιμήθηκε με την των τιμών των TBARS στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα της δεσφερριοξαμίνης.

Τα θετικά αποτελέσματα τόσο των πειραματικών όσο και των κλινικών μελετών που αναφέρθηκαν βασίζονται κυρίως στο ότι η δεσφερριοξαμίνη χορηγήθηκε πριν την έναρξη της ισχαιμίας – «πρώιμη χορήγηση». Κάτι τέτοιο είναι αδύνατο να επιτευχθεί στην καθημερινή κλινική αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς η ακριβής έναρξη της ισχαιμίας του μυοκαρδίου είναι αδύνατο να προβλεφθεί εκ των προτέρων. Όπως διαπιστώνεται και στη παρούσα μελέτη, η καθυστερημένη χορήγηση της δεσφερριοξαμίνης δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική με την πρώιμη. Αυτό επιβεβαιώνουν και άλλες μελέτες στις οποίες η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης αργότερα στη φάση της ισχαιμίας ή λίγο πριν την επαναιμάτωση απέτυχε να προστατεύσει το μυοκάρδιο από το σύνδρομο επαναιμάτωσης^{441, 443}. Στη μελέτη τους οι Reddy R et al έλεγξαν την επίδραση της δεσφερριοξαμίνης στην αντιμετώπιση του συνδρόμου

επαναιμάτωσης σε σκύλους οι οποίοι υποβλήθηκαν σε περιόδους ισχαιμίας 2 ωρών και επαναιμάτωσης 4 ωρών. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες: στην 1^η η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης ξεκίνησε 30min πριν την έναρξη της ισχαιμίας, στη 2^η η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης ξεκίνησε στο τέλος της περιόδου ισχαιμίας και 5min πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης και η 3^η ομάδα η οποία αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Χαρακτηριστικά, η περιοχή νέκρωσης ήταν σημαντικά μικρότερη στα πειραματόζωα της 1^{ης} ομάδας ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη περιοχή νέκρωσης στα πειραματόζωα της 2^{ης} ομάδας ⁴⁴¹. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Lesnefsky J et al στην μελέτη των οποίων η δεσφερριοξαμίνη χορηγήθηκε στο τέλος της ισχαιμικής περιόδου -10min πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης ⁴⁴³.

Το πειραματικό πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να προσομοιάζει επακριβώς τις κλινικές συνθήκες του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου και της επαναιμάτωσης. Γι' αυτό το λόγο αποφασίστηκε η χορήγηση των αντιοξειδωτικών φαρμάκων να γίνεται στο τέλος της ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση παρόμοια με την πραγματική περίπτωση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αποδείχθηκε ότι η χορήγηση της δεσφερριοξαμίνης λίγο πριν την επαναιμάτωση είναι ανεπαρκής για την προστασία του μυοκαρδίου από το σύνδρομο επαναιμάτωσης.

Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της LVEDP όπως αυτή καταγράφηκε 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση, υποδεικνύοντας πιθανώς μία τοξική δράση της δεσφερριοξαμίνης στο μυοκάρδιο. Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί προηγουμένως και οφείλεται κυρίως στην προ-οξειδωτική δράση της δεσφερριοξαμίνης^{444, 445}. Οι Borg et al μελέτησαν σε ποντίκια την δράση της δεσφερριοξαμίνης και πρότειναν μία διφασική συμπεριφορά της δεσφερριοξαμίνης – αντιοξειδωτική/προ-οξειδωτική η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη: στις μικρές δόσεις η δεσφερριοξαμίνη δρα ως ισχυρή σιδηρο-δεσμευτική ουσία παρουσιάζοντας έτσι ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ σε μεγάλες δόσεις μπορεί παραδόξως να ενισχύσει το οξειδωτικό stress στο μυοκαρδιακό κύτταρο⁴⁴⁴.

Παρόλο που ο προτεινόμενος μηχανισμός της προ-οξειδωτικής δράσης της δεσφερριοξαμίνης θα μπορούσε να εξηγήσει την επιβλαβή της δράση στην μυοκαρδιακή λειτουργία στην φάση της επαναιμάτωσης, προκειμένου να γίνει αποδεκτός θα έπρεπε να συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση του οξειδωτικού φορτίου όπως αυτή μετρήθηκε σε όλα τα πειραματόζωα με τον προσδιορισμό των TBARS. Παραδόξως, στην ομάδα της δεσφερριοξαμίνης παρατηρήθηκε ελάττωση των TBARS ιδιαίτερα στα 120min μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η δεσφερριοξαμίνη μπορεί να επιτύχει αντιοξειδωτική δράση και ότι η επιδείνωση της

καρδιακής συστολικής λειτουργικότητας πρέπει να αποδοθεί σε άλλο μηχανισμό. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλή λιπόφιλη ιδιότητα της δεσφερριοξαμίνης, η οποία αποτελεί σημαντικό περιορισμό στην ικανότητα της να διεισδύει στον ενδοκυττάριο χώρο και να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων. Έτσι, παρόλη την ικανοποιητική αντιοξειδωτική της δράση στον εξωκυττάριο χώρο, η δεσφερριοξαμίνη αδυνατεί να προστατέψει τους ενδοκυττάρους ευαίσθητους μηχανισμούς ομοιόστασης και παραγωγής ενέργειας στον ενδοκυττάριο χώρο και τα μιτοχόνδρια που έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή παραγωγής ενέργειας από το μυοκαρδιακό κύτταρο και την εκδήλωση διαστολικής και συστολικής δυσλειτουργίας¹⁹.

N-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC)

Η NAC αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες με διπλή δράση: ως εκκαθαριστής Δ.Μ.Ο. και ως πρόδρομος ουσία για την σύνθεση του ισχυρού ενδογενούς αντιοξειδωτικού, της αναγομένης γλουταθειόνης⁴⁴⁶. Η NAC έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως παράγοντας πρόληψης της εξάντλησης των ενδοκυττάρων αποθεμάτων γλουταθειόνης προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα από τις καταστρεπτικές συνέπειες του οξειδωτικού stress. Προηγούμενες, πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση της NAC νωρίς κατά την ισχαιμική περίοδο μπορεί να ελαττώσει σημαντικά την βλάβη από επαναιμάτωση περιορίζοντας την έκταση της κυτταρικής νέκρωσης και την ένταση του μυοκαρδιακού stunning^{346, 347}. Αντίθετα, η χορήγηση της NAC αργότερα στην φάση της ισχαιμίας ή της επαναιμάτωσης απέτυχε να προστατεύσει το μυοκάρδιο^{345, 348}. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα μας κατά τα οποία η NAC απέτυχε να περιορίσει την έκταση της νέκρωσης και τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης.

Στην παρούσα μελέτη, τα πειραματόζωα που έλαβαν NAC εμφάνισαν παρόμοιο αριθμό αρρυθμιών NSVT και ιδιοκυκλικού ρυθμού με τις υπόλοιπες ομάδες. Παρατηρήθηκε όμως σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης κακοήθων αρρυθμιών VF/SVT. Αυτό εκτός ότι αποτελεί πιθανή ένδειξη προ-αρρυθμικής δράσης της NAC αποδεικνύει ότι η NAC δεν προστατεύει από ένα σημαντικό κλινικό φαινόμενο του συνδρόμου επαναιμάτωσης, τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης. Προηγούμενες, πειραματικές μελέτες έδειξαν προστατευτική δράση της NAC από τις αρρυθμίες επαναιμάτωσης, αλλά αυτό επιτεύχθηκε όταν η NAC χορηγήθηκε από την αρχή της ισχαιμικής περιόδου μέχρι το τέλος της περιόδου επαναιμάτωσης^{347, 380, 447}. Αυτό, παρόλο που μπορεί να επιτευχθεί σε καταστάσεις επιλεκτικής ισχαιμίας όπως σε

πειραματικά μοντέλα ή σε επεμβάσεις αορτοστεφανιαίας παράκαμψης, δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί σε καταστάσεις οξείας ισχαιμίας όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Η προ-αρρυθμική δράση της NAC στο παρόν πειραματικό μοντέλο δεν μπορεί να εξηγηθεί επαρκώς. Η τεκμηριωμένη αύξηση του οξειδωτικού stress στην ομάδα της NAC (προ-οξειδωτική δράση), όπως αυτή ανιχνεύτηκε με τον προσδιορισμό των TBARS, πιθανόν να αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό. Οι ουσίες που αποτελούν δότες θειολικών ομάδων, όπως η NAC, μπορούν να οξειδωθούν προς Δ.Μ.Ο. όπως οι θειολικές και υπερόξυ-σουλφυδριλικές ρίζες με ισχυρή οξειδωτική δράση οι οποίες μπορούν να περιορίσουν σημαντικά την αναμενόμενη αντιοξειδωτική δράση της NAC⁴⁴⁸. Προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη αποδείξει την προ-οξειδωτική δράση της NAC σε κλινικά και πειραματικά μοντέλα^{449, 450}.

Συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών

Πληθώρα αντιοξειδωτικών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν τόσο σε πειραματικά όσο και σε κλινικά μοντέλα με διαφορεόμενα αποτελέσματα. Πολλά από αυτά έχουν αποδείξει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* αλλά αδυνατούν να αναπαράγουν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα *in vivo*. Δεδομένης αυτής της ασυμφωνίας μεταξύ των *in vitro* και *in vivo* αποτελεσμάτων πολλοί ερευνητές υποστήριξαν ότι πιθανώς ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε να είχε καλύτερο αποτέλεσμα εξαιτίας της πιθανής συνεργικής τους δράσης.

Η συνεργική δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών θα μπορούσε είτε να αφορά την αλληλοενίσχυση και αναπαραγωγή μιας αντιοξειδωτικής ουσίας με τη βοήθεια άλλων είτε την δράση διαφορετικών αντιοξειδωτικών ουσιών σε διαφορετικά επίπεδα στον «καταρράκτη» της παθοφυσιολογικής διαδικασίας του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Στην πρώτη περίπτωση επιτυγχάνεται η παράταση του χρόνου ζωής και δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών ενώ στη δεύτερη επιτυγχάνεται πολύπλευρη και σε διαφορετικές φάσεις αντιοξειδωτική δράση αποκόποντας κατά το δυνατό περισσότερους οδούς παραγωγής Δ.Μ.Ο.

Προηγούμενες μελέτες εξέτασαν την αντιοξειδωτική δράση συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών με αντιφατικά αποτελέσματα. Οι Gao et al μελέτησαν την δράση του συνδυασμού χορήγησης γλουταθειόνης και ασκορβικού οξέος σε απομονωμένες καρδιές ποντικών που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία 30min και επαναιμάτωση 30min. Ο συνδυασμός χορηγήθηκε κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης και η αντιοξειδωτική του δράση συγκρίθηκε με αυτή της χορήγησης της κάθε μια από τις ουσίες ξεχωριστά. Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι επιπλέον

χορήγηση ασκορβικού οξέος αύξησε την αντιοξειδωτική δράση της γλυταθειόνης όπως αυτή εκτιμήθηκε με τα επίπεδα νιτροτυροσινών που παράχθηκαν από τα μυοκαρδιακά κύτταρα.

Στη μελέτη τους οι Karwatowska-Prokopczyk E et al εξέτασαν κατά πόσο οι Δ.Μ.Ο, οι διαταραχές ομοιόστασης του Ca^{++} και οι διαταραχές της αντλίας Na^+/H^+ , συμμετέχουν στην παθοφυσιολογική διαδικασία του συνδρόμου επαναιμάτωσης μέσω ενός κοινού ή διαφόρων ξεχωριστών μηχανισμών. Για να το διαπιστώσουν αυτό υπέβαλαν απομονωμένες καρδιές ποντικών σε ισχαιμία και ακολούθως σε επαναιμάτωση και χορήγησαν αντιοξειδωτικές ουσίες είτε μόνες είτε σε συνδυασμό, με γνωστή δράση σε διαφορετικές θέσεις στον καταρράκτη της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Οι ουσίες που επιδέχθηκαν ήταν οι διμεθυλοουρία (DMTU), η δεσφερριοξαμίνη, η αμιλορίδη και η διμεθυλοαμιλορίδη (DMA) και ο αναστολέας διαύλων Ca^{++} διλτιαζέμη. Στη πειραματική αυτή μελέτη αποδείχθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση των ουσιών αυτών όταν χορηγήθηκαν ξεχωριστά ήταν η ίδια. Όταν οι ουσίες αυτές χορηγήθηκαν σε συνδυασμό οι περισσότεροι συνδυασμοί αποδείχθηκαν ίσης αντιοξειδωτικής δράσης με τις ουσίες που χορηγήθηκαν ξεχωριστά εκτός του συνδυασμού της DMTU ή της δεσφερριοξαμίνης με την αμιλορίδη.⁴⁵¹ Αποδεικνύεται, ότι ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών δεν προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη μονήρη χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών εκτός περιορισμένου αριθμού συνδυασμών σε επιλεγμένα πειραματικά πρωτόκολλα.

Η μελέτη μας επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών που δοκίμασαν συνδυασμούς ουσιών για την αντιμετώπιση της βλάβης που προκαλείται από την επαναιμάτωση. Ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών σε ενδοφλέβια χορήγηση χορηγούμενα λίγο πριν την επαναιμάτωση, σε συνθήκες που προσομοιάζουν την κλινική αντιμετώπιση του εμφράγματος, δεν προστατεύει επαρκώς από το σύνδρομο επαναιμάτωσης. Η αύξηση της τιμής των TBARS, όπως αυτή μετρήθηκε στην ομάδα ελέγχου του συγκεκριμένου πειραματικού μοντέλου, επιβεβαιώνει την παρουσία και την συμμετοχή του οξειδωτικού stress στο σύνδρομο επαναιμάτωσης. Οι Δ.Μ.Ο. αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές στη παθοφυσιολογία και κατά συνέπεια στις συνέπειες του συνδρόμου επαναιμάτωσης. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών παρόλο που ελάττωσε συνολικά το οξειδωτικό φορτίο μετά την επαναιμάτωση, δεν προσέφερε την αναμενόμενη προστασία από αυτό. Είναι πιθανό, οι αντιοξειδωτικές ουσίες να μην προσφέρουν επαρκή προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης γιατί δεν μπορούν τελικά να φθάσουν στην τελική μυοκαρδιακή περιοχή επαναιμάτωσης. Ο τρόπος και ο χρόνος χορήγησης των αντιοξειδωτικών ουσιών και του συνδυασμού τους παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά τους.

Τρόπος και χρόνος χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών

Τρόπος χορήγησης

Προηγούμενες μελέτες σε χοίρους είχαν αποδείξει ευεργετική δράση αντιοξειδωτικών ουσιών όταν αυτές χορηγήθηκαν ανάδρομα διαμέσου των καρδιακών φλεβών^{413, 452}. Στη μελέτη τους οι Kuratt C et al εξέτασαν τη αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης (GSH) και της Cariporide καθώς και του συνδυασμού τους σε πειραματικό μοντέλο χοίρων κλειστού θώρακα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης⁴¹³. Η χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών έγινε λίγο πριν τέλος της ισχαιμίας (5 min) η οποία επιτεύχθηκε με το φούσκωμα καθετήρα μπαλονιού αγγειοπλαστικής στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο. Παρόλο που η χορήγηση της GSH και της Cariporide ξεχωριστά δεν ήταν αποτελεσματική στον περιορισμό της εμφραγματικής περιοχής, ο συνδυασμός τους χορηγούμενος ανάδρομα δια των καρδιακών φλεβών πέτυχε σημαντική ελάττωση της έκτασης της μυοκαρδιακής νέκρωσης. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η συνδυαστική αντιοξειδωτική δράση των δύο αυτών ουσιών σε διαφορετικά σημεία του παθοφυσιολογικού μηχανισμού του συνδρόμου επαναιμάτωσης – άμεση εκκαθαριστική δράση των Δ. Μ. Ο. για την GSH και διατήρηση του ενδοκυττάριου ισοζυγίου ηλεκτρολυτών για την Cariporide - είχε σαν αποτέλεσμα στον περιορισμό της νέκρωσης στην ισχαιμική μυοκαρδιακή περιοχή.

Οι Kobayashi S et al έλεγξαν την αποτελεσματικότητα χορήγησης της δεσφερριοξαμίνης διαμέσου των καρδιακών φλεβών και συνέκριναν την προστατευτική της δράση με ομάδα ελέγχου στην οποία η ίδια δόση δεσφερριοξαμίνης χορηγήθηκε ενδοφλέβια σε πειραματικό μοντέλο χοίρων ανοιχτού θώρακα⁴⁵². Ίδιος αριθμός πειραματόζων χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου η οποία έλαβε διάλυμα φυσιολογικού ορού N/S 0.9% ενδοφλέβια. Η χορήγηση της δεσφερριοξαμίνης ξεκίνησε λίγο πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης όπως και στην παρούσα πειραματική μελέτη. Η προστατευτική δράση της δεσφερριοξαμίνης εκτιμήθηκε με την έκταση της νεκρωμένης μυοκαρδιακής περιοχής ως ποσοστό της περιοχής σε κίνδυνο (I/R ratio). Η ομάδα η οποία έλαβε την δεσφερριοξαμίνη ανάδρομα διαμέσου των καρδιακών φλεβών είχε σημαντικά μικρότερη εμφραγματική περιοχή σε σχέση με την ομάδα που έλαβε την ίδια ποσότητα δεσφερριοξαμίνης ενδοφλέβια (I/R ratio 48.5 ± 21.4% στην ομάδα της ανάδρομης χορήγησης vs. 70.6 ± 16.4% στην ομάδα ενδοφλέβιας χορήγησης, $p < 0.05$). Σημειώνεται ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε την δεσφερριοξαμίνη ενδοφλέβια και της ομάδας ελέγχου (70.6 ± 16.4% στην ομάδα ενδοφλέβιας χορήγησης vs. 73.9 ± 13.5% στην ομάδα ελέγχου, $p = NS$).

Αποδεικνύεται ότι πιθανόν τα αντιοξειδωτικά φάρμακα να μην μπορούν να φθάσουν την μυοκαρδιακή περιοχή ισχαιμίας μετά την επαναιμάτωση. Το οίδημα των αρτηριολίων καθώς και η συγκόλληση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων στο τελικό τμήμα των αρτηριολίων αποτελούν γνωστούς μηχανισμούς απόφραξης της μικροκυκλοφορίας μετά την επαναιμάτωση η διακοπή της οποίας εμποδίζει τις αντιοξειδωτικές ουσίες να φθάσουν στην ισχαιμική περιοχή τουλάχιστον σε συγκεντρώσεις που να επιφέρουν επαρκή αντιοξειδωτική δράση⁴⁵³⁻⁴⁵⁵.

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες καθώς και ο συνδυασμός τους πιθανώς να ήταν πιο αποτελεσματικές εάν χορηγούνταν διαμέσου των καρδιακών φλεβών ή χορηγούνταν νωρίτερα κατά την διάρκεια της ισχαιμίας ή ακόμα και πριν την ισχαιμία. Η χορήγηση όμως των ουσιών αυτών διαμέσου των καρδιακών φλεβών δεν είναι τουλάχιστον επί του παρόντος κλινικά εφικτή ιδιαίτερα στη περίπτωση της πλέον διαδεδομένης μεθόδου επαναιμάτωσης, της ενδοφλέβιας θρομβόλυσης. Ο εκλεκτικός καθετηριασμός των καρδιακών φλεβών και η χορήγηση ουσιών παρόλο που είναι δυνατός με ελάχιστα επεμβατικές διαδερμικές μεθόδους γίνεται επιλεκτικά με συγκεκριμένες κλινικές ενδείξεις. Η χορήγηση των ουσιών αυτών δια των καρδιακών φλεβών θα μπορούσε μόνο να επιχειρηθεί στην περίπτωση άμεσης μηχανικής επαναιμάτωσης με αγγειοπλαστική με μπαλόνι. Ακόμα και τότε όμως, η πολυπλοκότητα της μεθόδου καθετηριασμού των καρδιακών φλεβών θα αύξανε δραματικά το χρόνο επαναιμάτωσης ελαττώνοντας σημαντικά οποιοδήποτε κλινικό όφελος από την επίτευξη έγκαιρης επαναιμάτωσης με οποιοδήποτε μέσο (μηχανική ή φαρμακευτική θρομβόλυση).

Χρόνος χορήγησης

Οι ουσίες που χορηγήθηκαν στη παρούσα πειραματική μελέτη έχουν αποδείξει σημαντική αντιοξειδωτική δράση και τελικά προστασία έναντι του συνδρόμου επαναιμάτωσης όταν χορηγήθηκαν νωρίς κατά την ισχαιμική περίοδο ή ακόμα και πριν την έναρξη της ισχαιμίας. Είναι πιθανό η χορήγηση του συνδυασμού των αντιοξειδωτικών ουσιών, του ασκορβικού οξέος, της δεσφερριοξαμίνης και της Ν-ακετυλ-κυστεΐνης, να είχε ευεργετικά αποτελέσματα εάν χορηγούνταν νωρίς κατά την ισχαιμική περίοδο ή ακόμα πριν την έναρξη της. Παρόλο που επιστημονικά θα είχε ενδιαφέρον μία τέτοια μελέτη, η κλινική της αξία θα ήταν εξαιρετικά περιορισμένη καθώς στις πραγματικές κλινικές συνθήκες του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθίσταται αδύνατη η ακριβής πρόβλεψη του χρόνου έναρξης της μυοκαρδιακής ισχαιμίας και ως εκ τούτου η προληπτική χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτό είναι δυνατό μόνο σε καταστάσεις προκαθορισμένης μυοκαρδιακής ισχαιμίας όπως

στην περίπτωση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Η διερεύνηση της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών σε τέτοιες καταστάσεις δεν αποτέλεσε σημείο έρευνας της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι στο παρόν πειραματικό μοντέλο χοίρου, «κλειστού θώρακα», το οποίο προσομοιάζει τις κλινικές συνθήκες ισχαιμίας /επαναιμάτωσης, η ενδοφλέβια χορήγηση τριών αντιοξειδωτικών ουσιών - μόνες ή σε συνδυασμό - δεν προσφέρει επαρκή προστασία από τις επιβλαβείς επιπτώσεις του συνδρόμου επαναιμάτωσης.

Το σύνδρομο επαναιμάτωσης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου παραμένει ένα άλυτο πρόβλημα για τη σύγχρονη καρδιολογία. Απαιτούνται περαιτέρω πειραματικές μελέτες με τη χρήση διαφορετικών - ίσως πιο δραστικών - ουσιών, σε διάφορους συνδυασμούς, χορηγούμενες είτε ενδοφλεβίως είτε ανάδρομα διαμέσου των καρδιακών φλεβών που να μπορούν να επιτύχουν δραστικές συγκεντρώσεις στη ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου προκειμένου να επιτευχθεί επαρκής προστασία από το παράδοξο φαινόμενο του συνδρόμου επαναιμάτωσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επιγραμματικά η παρούσα πειραματική μελέτη έδειξε ότι:

- Η ενδοφλέβια χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών – ασκορβικού οξέος, δεσφερριζαμίνης και N-ακετυλ-κυστεΐνης – λίγο πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης, σε πειραματικό μοντέλο χοίρου «κλειστού» θώρακα που προσομοιάζει τις κλινικές συνθήκες ισχαιμίας / επαναιμάτωσης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, δεν επαρκεί για την προστασία του μυοκαρδίου από το σύνδρομο επαναιμάτωσης.
- Η μονήρης ενδοφλέβια χορήγηση ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικού για την προστασία από το σύνδρομο επαναιμάτωσης έχει προ-οξειδωτική δράση και πιθανώς να αυξάνει το μέγεθος της εμφραγματικής περιοχής μετά την επαναιμάτωση.
- Η μονήρης ενδοφλέβια χορήγηση δεσφερριζαμίνης οδηγεί σε σημαντική αύξηση της LVEDP 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση η οποία πρέπει να αποδοθεί στη χαμηλή λιπόφιλη σύσταση της ουσίας, την χαμηλή ενδοκυττάρια διεισδυτικότητα και ως εκ τούτου την ανεπαρκή ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική δράση.
- Η μονήρης ενδοφλέβια χορήγηση της N-ακετυλ-κυστεΐνης συνοδεύεται από ισχυρή προ-αρρυθμική δράση με εκδήλωση κακοήθων αρρυθμιών σε ποσοστό σημαντικά μεγαλύτερο των άλλων ομάδων της παρούσης πειραματικής μελέτης.
- Η συνδυασμένη χορήγηση των παραπάνω αντιοξειδωτικών ουσιών, οι οποίες δρουν σε διαφορετικά σημεία στον παθοφυσιολογικό «καταρράκτη» του συνδρόμου επαναιμάτωσης, δεν περιορίζει τις βλάβες από επαναιμάτωση.

Εισαγωγή

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί τη σημαντικότερη και πιο επικίνδυνη έκφραση της στεφανιαίας νόσου καθώς σχετίζεται υψηλά ποσοστά πρώιμης αλλά και αργότερης θνησιμότητας και νοσηρότητας. Παρόλο, που η πρώιμη επαναιμάτωση αποτελεί απόλυτη ένδειξη στην κλινική πράξη της αντιμετώπισης του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών θα υποστεί επιπλοκές που οφείλονται σε καθ' εαυτή την επαναιμάτωση, περιορίζοντας σημαντικά τα οφέλη της θρομβόλυσης – φαρμακευτικής ή μηχανικής. Το «Σύνδρομο της Επαναιμάτωσης» είναι ένα πολύ καλά μελετημένο παράδοξο κλινικό φαινόμενο στο οποίο περιλαμβάνονται ένα φάσμα κλινικών επιπλοκών που εμφανίζονται αμέσως μετά την επαναιμάτωση. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι κακοήθεις αρρυθμίες επαναιμάτωσης, η προσωρινή απώλεια συσταλτικής ικανότητας του μυοκαρδίου (“myocardial stunning”), η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων και της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας – που εκδηλώνεται κυρίως με απώλεια αιματικής ροής παρόλη την πλήρη εξάλειψη της υπεύθυνης για το έμφραγμα στένωση (no-reflow phenomenon), αλλά και ο κυτταρικός θάνατος. Παραδόξως, κατά την φάση της επαναιμάτωσης, μυοκαρδιακά κύτταρα τα οποία επιβίωσαν της ισχαιμίας, υπόκεινται σε άμεσο κυτταρικό θάνατο ή σε προγραμματισμένο θάνατο μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής απόπτωσης.

Το φαινόμενο «κλειδί» στο Σύνδρομο Επαναιμάτωσης είναι η επανεισαγωγή μοριακού οξυγόνου στα ισχαιμούντα μυοκαρδιακά κύτταρα και η επακόλουθη παράγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.) από τα κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοθηλίου των στεφανιαίων αγγείων. Προκειμένου να περιοριστεί η δράση

των Δ.Μ.Ο. κατά τη φάση της επαναιμάτωσης πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη δράση διάφορων αντιοξειδωτικών ουσιών με ποικίλα αποτελέσματα. Δυστυχώς, πολλά από τα αντιοξειδωτικά, παρόλο που απέδειξαν ότι μπορούν να περιορίσουν το σύνδρομο επαναιμάτωσης στις πειραματικές μελέτες, απέτυχαν να επαναλάβουν τα θετικά αποτελέσματα τους στις κλινικές μελέτες. Η πολυπλοκότητα του φαινομένου και ο σχεδιασμός των πειραματικών μοντέλων αποτελούν δύο από τους πιο σημαντικούς λόγους για αυτή την αποτυχία.

Σκοπός λοιπόν, της παρούσας μελέτης είναι να ελέγξει την αποτελεσματικότητα της χορήγησης συνδυασμού αντιοξειδωτικών ουσιών (“cocktail of antioxidants”) σε πειραματικό μοντέλο που να προσομοιάζει τις πραγματικές κλινικές συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου όσο το δυνατόν καλύτερα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρεις γνωστές αντιοξειδωτικές ουσίες που δρουν σε διαφορετικά σημεία του παθοφυσιολογικού «καταρράκτη» του συνδρόμου επαναιμάτωσης: το ασκορβικό οξύ, η δεσφερριτοξαμίνη και η N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC). Το ασκορβικό οξύ αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους εκκαθαριστές Δ.Μ.Ο. που μπορεί να εξουδετερώσει τις Δ.Μ.Ο. που παράγονται κατά τη φάση της επαναιμάτωσης και είναι υπεύθυνες για την *άμεση* κυτταρική καταστροφή. Η δεσφερριτοξαμίνη αποτελεί ισχυρό δεσμευτή των ελευθέρων ιόντων Fe⁺⁺ και με αυτό τον τρόπο μπορεί να εμποδίσει την έμμεση παραγωγή των Δ.Μ.Ο. μέσω αναστολής των μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων Fenton. Τέλος, η NAC αποτελεί γνωστό αντιοξειδωτικό παράγοντα με διπλή δράση: άμεση εκκαθάριση Δ.Μ.Ο. και σημαντικό δότη θειολικών ομάδων. Ειδικότερα, η τελευταία δράση της είναι σημαντική για αποκατάσταση των μειωμένων ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων GSH. Η χορήγηση της θα μπορούσε να *ενισχύσει σημαντικά την ενδοκυττάρια αντιοξειδωτική άμυνα*. Η βασική υπόθεση της μελέτης συνίσταται στο ότι η συνδυασμένη χορήγηση των τριών ουσιών αυτών θα είχε καλύτερα αποτελέσματα από τη μονήρη χορήγηση καθεμίας από τις παραπάνω ουσίες ξεχωριστά.

Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής μελέτης επιλέχθηκαν 25 άρρενες χοίροι ηλικίας 3- 5 μηνών και βάρους 30 -35 Kg οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πλήρη γενική αναισθησία και εν συνεχεία σε περίοδο ισχαιμίας διάρκειας 45min και επαναιμάτωσης 210min. Η ισχαιμία επιτεύχθηκε με διαδερμική ενδοαυλική τοποθέτηση ειδικού καθετήρα αγγειοπλαστικής στη μεσότητα της περισπωμένης αρτηρίας. Με το φούσκωμα του καθετήρα επιτυγχάνονταν ολική απόφραξη του αγγείου και έμφραγμα του μυοκαρδίου ενώ με το ξεφούσκωμα επιτυγχάνονταν η

επαναιμάτωση στον επιθυμητό χρόνο. Η επιλογή της διαδερμικής ενδοαυλικής απόφραξης / διάνοιξης του στεφανιαίου αγγείου (πειραματικό μοντέλο «κλειστού» θώρακα), χωρίς την εκτέλεση ανοιχτής θωρακοτομής και χειρουργικής απολίνωσης του (πειραματικό μοντέλο «ανοιχτού» θώρακα), έγινε ώστε να περιοριστεί το οξειδωτικό stress που υπόκεινται τα πειραματόζωα πριν ακόμα την έναρξη του πειραματικού πρωτοκόλλου ισχαιμίας / επαναιμάτωσης.

Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 5 ομάδες και έλαβαν: η Ομάδα Α: έλαβε ασκορβικό οξύ (ascorbic acid) σε δόση 100mg/Kg, η Ομάδα Β: έλαβε δεσφερριοξαμίνη (desferrioxamine) σε δόση 60mg/Kg, η Ομάδα C: έλαβε Ν-ακετυλ-κυστεΐνη (N-acetylcysteine, NAC) σε δόση φόρτισης 100 mg/Kg και μετά σε δόση συντήρησης 20 mg/Kg, η Ομάδα D: έλαβε τον συνδυασμό των παραπάνω φαρμάκων στις δόσεις που αναφέρονται (cocktail of antioxidants), και η Ομάδα Ε: έλαβε φυσιολογικό ορό και αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου (control group). Προκειμένου να διασφαλιστεί η ομοιότητα του πειραματικού πρωτοκόλλου με τις πραγματικές κλινικές συνθήκες ισχαιμίας / επαναιμάτωσης κατά τη διάρκεια ενός οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου η έγχυση των υπό εξέταση αντιοξειδωτικών ουσιών έγινε 15min πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης και συνεχίστηκε για 5min μετά από αυτήν.

Όλοι οι παράγοντες της καρδιακής λειτουργίας που σχετίζονται με το σύνδρομο μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. Μία ώρα μετά την επαναιμάτωση εκτιμήθηκαν το κλάσμα εξώθησης της Αριστεράς κοιλίας (LVEF), η τελοδιαστολική πίεση της Αριστεράς κοιλίας (LVEDP), η ροή στο αποφραγμένο στεφανιαίο αγγείο κατά TIMI (TIMI flow). Όλες οι κοιλιακές αρρυθμίες καταγράφηκαν και ταξινομήθηκαν σε καλοήθειες (μη εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία –NSVT) και κακοήθειες (εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία /κοιλιακή μαρμαρυγή – SVT/VF). Η έκταση του εμφράγματος υπολογίστηκε ως ο λόγος της νεκρωμένης (εμφραγματικής – Infarcted “ I ”) περιοχής σε σχέση με την περιοχή που ήταν σε κίνδυνο ισχαιμίας (area at risk, “R”, I/R ratio). Η νεκρωμένη περιοχή υπολογίστηκε με τη μέθοδο χρώσης με TTC. Το οξειδωτικό stress εκτιμήθηκε με επανειλημμένες μετρήσεις των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου καθ’ όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου.

Αποτελέσματα

Δεν υπήρξε διαφορά στην έκταση του εμφράγματος μεταξύ των ομάδων όπως αυτή προσδιορίστηκε με το λόγο I/R. Ο λόγος I/R ήταν μεγαλύτερος, χωρίς απόλυτη στατιστική σημαντικότητα, στη ομάδα Α σε σχέση με την ομάδα Ε (p=0.06). Το οξειδωτικό stress, όπως αυτό εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό των TBARS στο φλεβικό αίμα του στεφανιαίου κόλπου, αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες σε σχέση με τις βασικές

τιμές της κάθε ομάδας. Οι τιμές TBARS δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων σε όλες τις μετρήσεις κατά την διάρκεια του πρωτοκόλλου (ANOVA ανάλυση όλων των AUC μεταξύ των ομάδων, $p=0.09$).

Η ομάδα C εκδήλωσε στατιστικά μεγαλύτερο αριθμό κακοήθων αρρυθμιών σε σχέση με την ομάδα E (SVT/VF 80% για τη ομάδα της NAC και 0% για την ομάδα ελέγχου, $p=0.02$). Η LVEDP αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες σε σχέση με τις βασικές τιμές. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της LVEDP στην ομάδα B σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες ($p < 0.001$ για σύγκριση με όλες τις ομάδες).

Συμπέρασμα

Στο παρόν πειραματικό μοντέλο χοίρου, ισχαιμίας / επαναιμάτωσης, «κλειστού» θώρακα, που προσομοιάζει τις κλινικές συνθήκες επαναιμάτωσης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η χορήγηση τριών αντιοξειδωτικών ουσιών – του ασκορβικού οξέος, της δεσφερριξαμίνης και της N-ακετυλ-κυστεΐνης – μόνες ή σε συνδυασμό δεν περιορίσε τις επιβλαβείς συνέπειες του συνδρόμου επαναιμάτωσης.

SUMMARY

Effectiveness of antioxidants in reducing the deleterious effects of reperfusion syndrome. An experimental study

Dimitrios N. Nikas

Background

To attenuate myocardial reperfusion injury several antioxidants have been tested demonstrating conflicting results, mainly in experimental protocols that did not approximate clinical situations. We are testing the efficacy of three different antioxidants [ascorbic acid (AA), desferrioxamine (DESFER) and N-acetyl-cysteine (NAC)] administered intravenously, solely and in combination, in a preclinical swine model.

Methods

Twenty-five pigs under general anaesthesia were subjected to myocardial ischemia (45 min) and reperfusion (210 min) percutaneously, by circumflex artery (LCx) balloon occlusion. Pigs were divided in 5 groups (N=5 per group) and received: 100mg/kg of AA (group A), 60mg/kg of DESFER (group B), a loading dose of NAC 100mg/kg for 20 minutes and 20mg/kg maintenance dose (group C), all 3 drugs in combination (group D) and normal saline (group E - control). The infusion of all substances started 15 minutes before and was completed 5 minutes after reperfusion

except of the administration of NAC which was terminated 60 minutes post-reperfusion. Ejection fraction, Left Ventricular End Diastolic Pressure (LVEDP), TIMI flow and all ventricular arrhythmias were recorded. Oxidative stress was estimated by serial measurements of thio-barbituric acid reactive substances (TBARS) in coronary sinus blood. Infarct size was assessed as a percentage of the area at risk (I/R ratio), using the tetrazolium red staining method.

Results

The I/R ratio was larger, but not significantly, in group A compared to group E ($p=0.06$), while it did not differ among other groups. Oxidative stress was similar between all treatment groups. Animals in group C developed more ventricular arrhythmias than control animals (group E, $p=0.02$). LVEDP was significantly elevated post-reperfusion in every treatment group ($p<0.01$ for all groups) (Figure 3). Mean difference was for group A: $+6.0 \pm 1.6$ mmHg, for group B: $+17.6 \pm 1.9$ mmHg, for group C: $+3.6 \pm 1.7$ mmHg, for group D: $+6.8 \pm 3.2$ mmHg and for group E: $+5.4 \pm 3.4$ mmHg. ANOVA comparison between groups, revealed that LVEDP elevation was significantly higher in group B compared to all other groups ($p<0.001$). No significant changes were found among any of the other groups. No difference was found in all other parameters studied.

Conclusion

In this experimental swine model, the antioxidants studied, administrated solely or in combination, did not reduce either the deleterious effects of reperfusion injury or the extent of myocardial necrosis.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ