







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΟΠΙΣΘΙΟΥ ΑΚΡΟΥ  
ΣΤΗΝ ΕΚΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ,  
ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΡΟΗ**

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΒΑΡΝΑΒΑΣ Χ. ΒΑΡΝΑΒΑΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011**



«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 Βαρνάβα Βαρναβα:** 11-2-2008

-

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 638<sup>α</sup>/3-6-2008

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κατσούρας Χρήστος Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 13-6-2008

*«Η επίδραση της χρόνιας ισχαιμίας οπισθίου άκρου στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, την αγγειογένεση και την παράπλευρη στεφανιαία ροή. Πειραματική μελέτη»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** 677<sup>α</sup>/9-2-2011

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας –Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :** 721<sup>α</sup>/11-10-2011

<b>Γουδέβενος Ιωάννης</b>	Καθηγητής Παθολογίας –Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γεωργάτος Σπυρίδων</b>	Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μιχάλης Λάμπρος</b>	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπάη Μαρία</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Κωλέττης Θεόφιλος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων





**Νάκα Αικατερίνη**

Επίκουρη Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Περικλής Παππάς**

Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής  
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-10-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



**Η Γραμματέας της Σχολής**

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ**



*Ευχαριστώ θερμά όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω την εργασία και ιδιαίτερα:*

*Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Θεόφιλο Κωλέττη, τον Καθηγητή Παθολογίας-Καρδιολογίας κ. Ιωάννη Γουδέβενο και τον Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Λάμπρο Μιχάλη για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση τους, το αμέριστο και καθημερινό ενδιαφέρον τους, την πολύτιμη γνώση και εμπειρία, που μου προσέφεραν σε όλο το διάστημα της ερευνητικής μου πορείας. Τον κ. Dr. Ζήνωνα Κυριακίδη διευθυντή της Β Καρδιολογικής Κλινικής ΝΕΣΣ για την απαραίτητη συνδρομή του στη διεξαγωγή της έρευνας, με τις γνώσεις του στον τομέα της πειραματικής αγγειογένεσης και στην εφαρμογή της τεχνικής της απομονωμένης καρδιάς στα πειράματα ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη για την ουσιαστική και σημαντική συνεργασία του στην έρευνα με τη διενέργεια των πειραμάτων ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας. Το Καρδιαγγειακό Ινστιτούτο και ιδιαίτερα τον πρόεδρο αυτού κ. Dr. Απόστολο Παπαλόη, για την παροχή της απαραίτητης επιστημονικής υλικοτεχνικής υποδομής. Τη συνάδελφο κ. Dr. Αγγελάκη Μαρία για την προθυμία και την υπομονή της να με εκπαιδεύσει πάνω στις πειραματικές τεχνικές. Την υπεύθυνη συντονισμού και οργάνωσης των πειραμάτων κ. Ελένη Γκόγκα και τη συνεργάτη μου κ. Ελευθερία Καράμπελα για την αμέριστη συμπαράσταση τους, κατανόηση των καθημερινών προβλημάτων και κυρίως για τη φιλία τους.*

*Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Χριστόφορο και Ουρανία καθώς και τον αδερφό μου Δημήτριο, για την ηθική και οικονομική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*



*Αφιερώνεται*  
*στους γονείς μου*  
*Χριστόφορο και Ουρανία*  
*και*  
*στον αδερφό μου*  
*Δημήτρη*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου παραμένει σημαντική αιτία θνητότητας και νοσηρότητας για πολλές χώρες, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγεται και η Ελλάδα. Η θνητότητα αποδίδεται κυρίως σε κοιλιακές αρρυθμίες και σε οξεία καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ η νοσηρότητα στην επακόλουθη καρδιακή ανεπάρκεια. Σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου καθορίζει την πρόγνωση μετά από το σύμβαμα. Κατά συνέπεια, η κύρια στρατηγική για τη μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας επικεντρώνεται στη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος. Το μέγεθος του εμφράγματος επηρεάζεται άμεσα από τη διάρκεια της στεφανιαίας απόφραξης, την ισχαιμική περιοχή που μεταπίπτει σε εμφραγματική και την έλλειψη παράπλευρης αιματικής κυκλοφορίας στην ισχαιμική ζώνη. Πέρα της ελαχιστοποίησης της διάρκειας της στεφανιαίας απόφραξης, η επιλογή της μείωσης του μεγέθους του εμφράγματος με την εφαρμογή των πρωτοκόλλων της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας αποτελεί μία ακόμη καλά τεκμηριωμένη ενναλακτική τακτική. Ωστόσο, το τελευταίο διάστημα η προώθηση της νεοαγγείωσης στο μυοκάρδιο με την έννοια της ανάπτυξης νέων λειτουργικών παράπλευρων στεφανιαίων αγγείων κερδίζει συνεχώς έδαφος.

Η μελέτη αυτή επικεντρώνεται στην απάντηση ερωτημάτων που αφορούν μια πιθανή αγγειογένεση στο καρδιακό μυ, μετά από περιφερική ισχαιμία σκελετικών μυών, την επίδραση της στο μέγεθος ενός επικείμενου εμφράγματος του μυοκαρδίου και το συσχετισμό της με τα φαινόμενα της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.





## Πίνακας Περιεχομένων

<b>I. Γενικό Μέρος</b> .....	σελ. 1
<b>1. Ιστορική αναδρομή</b> .....	σελ. 1
<b>2. Στεφανιαία νόσος</b> .....	σελ. 1
2.1. Ορισμός.....	σελ. 1
2.2. Στένωση στεφανιαίων αρτηρίων.....	σελ. 2
2.2.1. Παθογένεση.....	σελ. 2
2.2.2. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης.....	σελ. 4
<b>3. Ισχαιμία του μυοκαρδίου</b> .....	σελ. 14
3.1. Οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου.....	σελ. 14
3.1.1. Μεταβολικές διαταραχές του μυοκαρδίου κατά την ισχαιμία.....	σελ. 15
3.2. Βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης.....	σελ. 20
<b>4. Μηχανισμοί προστασίας του μυοκαρδίου</b> .....	σελ. 28
4.1. Ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Preconditioning, IPC).....	σελ. 29
4.1.1. Μηχανισμός της ισχαιμικής προετοιμασίας.....	σελ. 30
4.1.2. Όψιμη ισχαιμική προετοιμασία/Δεύτερο παράθυρο προστασίας (Second window of protection, SWOP).....	σελ. 37
4.2. Μετα-ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Postconditioning, IPost).....	σελ. 38
4.2.1. Μηχανισμός της μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.....	σελ. 40
4.3. Ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση (Remote Ischemic Preconditioning, RIPC).....	σελ. 41
4.3.1. Μηχανισμός της εξ' αποστάσεως ισχαιμικής προετοιμασίας.....	σελ. 42
4.3.1.1. Χυμικοί παράγοντες.....	σελ. 43

4.3.1.2. Νευρικοί παράγοντες.....	σελ.46
4.3.1.3. Συστηματική απάντηση κατά την RIPC.....	σελ.49
4.3.2. Μυοκαρδιακοί παράγοντες προστασίας στην RIPC.....	σελ.50
4.4. Μετα-ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση (Remote Ischemic Postconditioning, RIPost).....	σελ.54
<b>5. Μετα-ισχαιμική αγγειογένεση.....</b>	<b>σελ.55</b>
5.1. Υποξική εξαρτώμενη αγγειακή αύξηση και φλεγμονή.....	σελ.57
5.2. Μηχανική εξαρτώμενη αύξηση και φλεγμονή.....	σελ.59
5.3. Αγγειακή ανάπτυξη και αρχέγονα κύτταρα.....	σελ.63
5.4. Κύτταρα φλεγμονής και προαγγειο-, αρτηριογεννητικοί μηχανισμοί.....	σελ.66
5.5. Αγγειογεννητικοί αυξητικοί παράγοντες και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.....	σελ.71
<b>6. Υπόθεση και σκοποί της μελέτης.....</b>	<b>σελ.74</b>
<b>II. Ειδικό Μέρος.....</b>	<b>σελ.79</b>
<b>A. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>σελ.79</b>
<b>1. Επιλογή πειραματικού πρότυπου.....</b>	<b>σελ.79</b>
1.1. Επίμυς.....	σελ.80
1.1.1. Η ανατομία της στεφανιαίας κυκλοφορίας στους επίμυες.....	σελ.80
1.1.2. Ο επίμυς ως μοντέλο ισχαιμίας μυοκαρδίου.....	σελ.81
1.2. Κόνικλος.....	σελ.82
1.2.1. Η ανατομία της στεφανιαίας κυκλοφορίας στους κόνικλους.....	σελ.82
1.2.2. Ο κόνικλος ως μοντέλο ισχαιμίας μυοκαρδίου.....	σελ.83

<b>2. Το πειραματικό πρωτόκολλο</b> .....	σελ.84
2.1. Πρώτο μέρος της μελέτης.....	σελ.84
2.2. Δεύτερο μέρος της μελέτης.....	σελ.87
<b>3. Τεχνικές στους επίμυες</b> .....	σελ.90
3.1. Αναισθησία.....	σελ.90
3.2. Πρόκληση περιφερικής ισχαιμίας.....	σελ.91
3.3. Τεχνική πρόκλησης εμφράγματος.....	σελ.93
3.4. Ευθανασία και υπολογισμός μεγέθους εμφράγματος.....	σελ.94
3.5. Τεχνική απομονωθείσας καρδιάς.....	σελ.96
3.5.1. Διάταξη Langendorff.....	σελ.96
3.5.2. Γενική αρχή της μεθόδου.....	σελ.98
3.5.3. Περιγραφή διάταξης Langendorff.....	σελ.99
3.5.4. Δεδομένα και πειραματικές παράμετροι στη Langendorff.....	σελ.109
3.5.5. Τεχνικές της μεθόδου.....	σελ.112
3.5.5.1. Αναισθησία.....	σελ.112
3.5.5.2. Αφαίρεση της καρδιάς.....	σελ.113
3.5.5.3. Σταθεροποίηση.....	σελ.114
3.5.5.4. Σύσταση, οξυγόνωση και θερμοκρασία διαλύματος.....	σελ.120
3.5.5.5. Ολική ισχαιμία και επαναιμάτωση.....	σελ.123
3.5.5.6. Τμηματική ισχαιμία και μέτρηση στεφανιαίας ροής.....	σελ.125
3.5.6. Το πειραματικό πρωτόκολλο στη διάταξη Langendorff.....	σελ.126
<b>4. Τεχνικές στον κόνικλο</b> .....	σελ.130
4.1. Πρόκληση περιφερικής ισχαιμίας.....	σελ.130
4.2. Αναισθησία και αερισμός.....	σελ.131
4.3. Τεχνική πρόκλησης εμφράγματος-επαναιμάτωσης.....	σελ.132

4.4.	Τεχνική ισχαιμικής προετοιμασίας.....	σελ.133
4.5.	Τεχνική μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.....	σελ.134
4.6.	Προσδιορισμός ισχαιμικής και εμφραγματικής περιοχής.....	σελ.134
<b>5.</b>	<b>Παθολογοανατομική μελέτη.....</b>	<b>σελ.137</b>
<b>6.</b>	<b>Στατιστική ανάλυση.....</b>	<b>σελ.138</b>
<b>B.</b>	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>σελ.139</b>
<b>1.</b>	<b>Πρώτο μέρος της μελέτης (Πρωτόκολλο σε επίμυες).....</b>	<b>σελ.139</b>
A	Ομάδα: Ισχαιμία μυοκαρδίου χωρίς επαναιμάτωση.....	σελ.139
B	Ομάδα: Ισχαιμία–επαναιμάτωση.....	σελ.142
Γ	Ομάδα: Μέτρηση παράπλευρης στεφανιαίας ροής.....	σελ.157
Δ	Ομάδα: Μέτρηση νεοαγγείων – Παθολογοανατομική μελέτη.....	σελ.160
<b>2.</b>	<b>Δεύτερο μέρος της μελέτης (Πρωτόκολλο σε κόνικλους).....</b>	<b>σελ.163</b>
A	Ομάδα: Ισχαιμία – επαναιμάτωση.....	σελ.163
B	Ομάδα: Ισχαιμική προετοιμασία–Ισχαιμία–Επαναιμάτωση.....	σελ.165
Γ	Ομάδα: Ισχαιμία–Μετα-ισχαιμική προετοιμασία-Επαναιμάτωση.....	σελ.167
	Σύγκριση κόνικλων ανά υποομάδα.....	σελ.169
Δ	Ομάδα: Μέτρηση νεοαγγείων/Παθολογοανατομική μελέτη.....	σελ.171
<b>Γ.</b>	<b>Συζήτηση.....</b>	<b>σελ.173</b>
<b>Δ.</b>	<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>σελ.187</b>
<b>Ε.</b>	<b>Περιορισμοί.....</b>	<b>σελ.189</b>
<b>ΣΤ.</b>	<b>Περίληψη στα ελληνικά.....</b>	<b>σελ.191</b>
<b>Ζ.</b>	<b>Περίληψη στα αγγλικά.....</b>	<b>σελ.193</b>
<b>Η.</b>	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>σελ.195</b>

## Συντομογραφίες

**ADP** διφωσφορική αδενοσίνη

**ATP** τριφωσφορική αδενοσίνη

**AKT** σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση

**bFGF** βασικός αυξητικός παράγοντας

ινοβλαστών

**cGMP** κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη

**Cx43** κοννεξίνη 43

**DAG** διακυλογλυκερόλη

**GSHPx** υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

**GTP** τριφωσφορική γουανοσίνη

**ERK** εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενη κινάση

**ETC** αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

**FGF** αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών

**FSS** υγρή διατμηματική τάση

**HIF** ο επαγώγιμος από υποξία παράγοντας

**IL** ιντερλευκίνη

**ICAM** ενδοκυτταρικό μόριο δέσμευσης

**iNOS** επαγώγιμη συνθετάση μονοξειδίου

αζώτου

**IPC** ισχαιμική προετοιμασία

**IPost** μετα-ισχαιμική προετοιμασία

**JAK** Janus κινάση

**LDL** λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

**MAPK** μιτογόνος επαγόμενη κινάση

**MHC** κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

**MMP** μεταλλοπρωτεϊνάση

**mPTP** μιτοχονδριακός πόρος μετάβασης

**NADH** δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης

**NF-κB** πυρηνικός παράγοντας κB

**NK** φυσικοί δολοφόνοι κυττάρων

**NO** μονοξείδιο του αζώτου

**PCr** φωσφοκρεατίνη

**PDH** πυροσταφυλική αφυδρογονάση

**PHD** προλύλ-υδροξυλάση

**PKA** πρωτεϊνική κινάση A

**PKC** πρωτεϊνική κινάση C

**PMN** πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα

**RIPC** ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση

**RIPost** μετα-ισχαιμική προετοιμασία από

απόσταση

**RISK** κινάση ισχαιμίας επαναιμάτωσης

**ROS** αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου

**SOD** υπεροξειδίου της δισμουτάσης

**SR** σαρκοπλασματικό δίκτυο

**STAT** εκκινητής της μεταγραφής

**SWOP** δεύτερο παράθυρο προστασίας

**TGF** αυξητικός παράγοντας

**TLR** υποδοχείς φυσικής ανοσίας

**TNF** παράγοντας νέκρωσης όγκων

**VCAM** αγγειακό κυτταρικό μόριο δέσμευσης

**VEGF** αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός

παράγοντας



# I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Ιστορική αναδρομή

Για περισσότερο από χίλια χρόνια, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι η καρδιά είναι η πηγή θερμότητας του ανθρώπινου σώματος. Πρώτος ο William Harvey απέδειξε ότι, το μυώδες αυτό όργανο λειτουργεί ως αντλία. Η συμβολή των ανατόμων του 18<sup>ου</sup> και 19<sup>ου</sup> αιώνα συνετέλεσε στην καλύτερη αντίληψη των διαταραχών της καρδιακής δομής, που σχετίζονται με τη λειτουργία της ως αντλία. Μόλις το 1950, η εκτενής μελέτη της καρδιακής λειτουργίας άρχισε να εμπλουτίζεται με τις νέες απόψεις για τις βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες του μυοκαρδιακού κυττάρου. Η αλματώδης εξέλιξη της μοριακής βιολογίας στο τέλος του 20<sup>ου</sup> αιώνα, συνέβαλε στην κατανόηση της σχέσης της σύνθεσης των πρωτεϊνών και του συνόλου της καρδιακής λειτουργίας. Οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν μια εξαιρετικά περίπλοκη μοριακή δομή, που οργανώνει την ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς και επιτρέπει τη βέλτιστη μηχανική απόδοση της αντλίας.

## 2. Στεφανιαία νόσος

### 2.1. Ορισμός

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η στεφανιαία κυκλοφορία δύναται να προσαρμόζεται στις μεταβαλλόμενες ανάγκες του μυοκαρδίου για αιμάτωση και οξυγόνωση. Κάτω από την ευρεία έννοια του όρου «στεφανιαία νόσος» συμπεριλαμβάνονται όλες εκείνες οι νοσηρότητες, οι οποίες βασίζονται σε μία α) αγγειακής, β) καρδιογενούς,

γ) αιματογενούς, ή δ) λειτουργικής αιτιολογίας δυσαναλογία ανάμεσα στην προσφορά (που εξαρτάται άμεσα απο την παροχή αίματος) και την πραγματική ανάγκη του μυοκαρδίου για οξυγόνο. Πιο αναλυτικά, η μείωση της παροχής οξυγόνου στο μυοκάρδιο οφείλεται κυρίως σε στένωση ή στενώσεις στο αγγειακό στεφανιαίο σύστημα, οπότε και προσδίδουμε τον όρο της στεφανιαίας ανεπάρκειας. Οι συνθήκες, κατά τις οποίες αυξάνονται οι μεταβολικές ανάγκες του μυοκαρδίου για περισσότερη οξυγόνωση συνδέονται είτε με αυξημένο καρδιακό έργο, είτε με συστηματική χαμηλή αρτηριακή πίεση στα πλαίσια ενός κυκλοφορικού σοκ είτε με μη επαρκή οξυγόνωση του αίματος και οδηγούν στη μειωμένη τροφοδοσία του μυοκαρδίου με οξυγόνο.

Ο κλινικός όρος «στεφανιαία νόσος» περιορίζεται στην ελλειπή οξυγόνωση του μυοκαρδίου λόγω παθολογικών στενωτικών αλλοιώσεων των στεφανιαίων αγγείων [1].

## **2.2. Στένωση στεφανιαίων αρτηριών**

### **2.2.1. Παθογένεση**

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί στη στένωση των στεφανιαίων αρτηριών και κατά επέκταση στην χρόνια ή οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου αποτελείται από τις παρακάτω συνιστώσες [1].



### *Αθηροσκλήρωση*

Βάσει ορισμού οι κλινικές εκφάνσεις της στεφανιαίας νόσου οφείλονται κατά κύριο λόγο στην αθηροσκλήρωση των εξωτοιχωματικών στελεχών των στεφανιαίων αρτηριών. Η ιδιαίτερη τάση των στεφανιαίων αρτηριών να αναπτύσσουν αθηροσκλήρωση ειδικά στο εγγύς τμήμα τους, εξηγείται από το γεγονός ότι σε αντίθεση με τις υπόλοιπες αρτηρίες των άλλων οργάνων, η θέση τους είναι πλησίον του καρδιακού κοιλιακού συστήματος, με αποτέλεσμα να γίνονται δέκτες μεγαλύτερων δυνάμεων πίεσης. Σε αυτό προστίθεται και ο παράγοντας των αυξημένων δυνάμεων διάτμησης, λόγω της διαρκούς αλλαγής θέσης και κατεύθυνσης του στεφανιαίου δέντρου, στον οποίο το αγγειακό τοίχωμα κατά φυσιολογικό τρόπο αντιδρά με ίνωση του έσω χιτώνα του. Η αθηροσκλήρωση αναγνωρίζεται ως η πρωταρχική αιτία της εκδήλωσης της στεφανιαίας νόσου και η διαρκής επιστημονική μελέτη του μηχανισμού ανάπτυξης της εμπλουτίζεται διαρκώς με νέα δεδομένα όπως θα αναλυθούν στην πορεία.

### *Αρτηριοσκλήρυνση*

Η έννοια της αρτηριοσκλήρυνσης σχετίζεται με τα ενδοτοιχωματικά αγγεία των κοιλιών και των θηλοειδών μυών. Τα αγγεία αυτά υπόκεινται με την αυξανόμενη ηλικία σε ινωτικές αλλαγές του έσω χιτώνα τους, ανεξάρτητες από αυτές που συναντάμε στους εξωτοιχωματικούς κλάδους. Σε συννοσηρότητες, όπως αυτές της αρτηριακής υπέρτασης και του σακχαρώδη διαβήτη, οι αλλοιώσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε στένωση του αγγείου, η οποία δε διακρίνεται σε στεφανιογραφικό έλεγχο ακόμα και με ταυτόχρονο φυσιολογικό εύρημα των μεγαλύτερων αγγείων. Αυτή η κατά κάποιο τρόπο αποξηραμένη κορυφή του στεφανιαίου δέντρου περιγράφεται ως νόσος μικρών αγγείων.

### *Στεφανιαίος σπασμός*

Ο στεφανιαίος σπασμός και οι στεφανιαίες αγγειακές συστολές εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή αθηροσκληρωτικών πλακών και αποτελούν το αποτέλεσμα ενός μη ισορροπημένου ισοζυγίου μεταξύ αγγειοδιασταλτικών, όπως του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, όπως της ενδοθηλίνης και άλλων επαγωγέων της αγγειοσύσπασης. Σε αυτούς, εκτός από τους α-αδρενεργικούς και παρασυμπαθητικούς μηχανισμούς, συγκαταλέγονται η ισταμίνη, η σεροτονίνη και παράγωγα του κύκλου του αραχιδονικού οξέος, όπως οι προσταγλαδίνες και τα λευκοτριένια.

### *Αρτηρίτιδα*

Η φλεγμονώδης συμμετοχή των στεφανιαίων αρτηριών στα πλαίσια μιας συστηματικής ασθένειας, όπως η οζώδη πολυαρτηρίτιδα, η αρτηρίτιδα Takayasu, η γιγαντοκυτταρική αρτηρίτιδα, η κοκκιωμάτωση Wegener ή η συφιλιδική μεσαορτίτιδα που προσβάλλει τα στεφανιαία στόμια ή η θρομβοεμβολή και ένα εκτεινόμενο μέχρι και τα στεφανιαία αγγεία διαχωριστικό ανεύρυσμα θεωρούνται επίσης αιτίες στένωσης των στεφανιαίων.

## **2.2.2. Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης**

### *Η αθηροσκλήρωση ως φλεγμονώδης αντίδραση*

Αρκετές παθοφυσιολογικές παρατηρήσεις σε πειραματόζωα και ανθρώπους οδηγούν στη διατύπωση μιας υπόθεσης, που βασίζεται σε ένα μηχανισμό αντίδρασης σε βλάβη, προτείνοντας αρχικά την ενδοθηλιακή αποφλοίωση ως το πρώτο βήμα για το σχηματισμό αθηροσκλήρωσης [2]. Η πιο πρόσφατη εκδοχή

αυτής της υπόθεσης δίνει πλέον έμφαση σε μια ενδοθηλιακή δυσλειτουργία παρά σε αποφλοίωση. Οποιαδήποτε διεργασία και αν ενεργοποιείται, κάθε χαρακτηριστική αλλοίωση της αθηροσκλήρωσης αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό στάδιο της χρόνιας φλεγμονής στην αρτηρία. Στις πιθανές αιτίες της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας περιλαμβάνονται η αυξημένη τιμή και η διαφοροποίηση του μορίου της λιποπρωτεΐνης LDL, οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από το κάπνισμα, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, γενετικές ανωμαλίες, αυξημένη συγκεντρώση ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και λοιμωγόνι μικροοργανισμοί όπως οι ερπετοϊοί, τα χλαμύδια (*Chlamydia pneumoniae*). Ανεξάρτητα από την αιτία της ενδοθηλιακής εκφύλισης, η αθηροσκλήρωση είναι χαρακτηριστική αντίδραση συγκεκριμένων αρτηριών [2-4].

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που προκύπτει από τη βλάβη έχει ως αποτέλεσμα αντισταθμιστικές αντιδράσεις, που τροποποιούν τις ομοιοστατικές ιδιότητες του ενδοθηλίου. Κατά συνέπεια, οι διάφορες μορφές τραυματισμού αυξάνουν τη δεσμευτικές ικανότητες και τη συνάφεια του ενδοθηλίου για τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια, καθώς επίσης και τη διαπερατότητα του. Η βλάβη επίσης επάγει την εμφάνιση προπηκτικής παρά αντιπηκτικής ιδιότητας και το σχηματισμό αγγειοδραστικών ουσιών, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Εάν η φλεγμονώδης απάντηση δεν ουδετοροποιήσει και δεν απομακρύνει αποτελεσματικά τα προσβαλλόμενα δομικά στοιχεία των αρτηριών, μπορεί να συνεχιστεί επ' αόριστον. Με αυτό τον τρόπο η φλεγμονώδης αντίδραση διεγείρει τη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους διεισδύουν στην περιοχή της φλεγμονής και αναπτύσσουν μία ενδιάμεση βλάβη. Εάν αυτή η ακολουθία συνεχιστεί αδιάκοπτα, το τοίχωμα της αρτηρίας παχύνεται, γεγονός που αντισταθμίζεται από τη βαθμιαία διαστολή

αυτής, έως ενός σημείου, για να παραμείνει ο αυλός αμετάβλητος, φαινόμενο το οποίο ονομάζεται αναδιαμόρφωση [5]. Όσον αφορά τα κύτταρα φλεγμονής, σπάνια συναντάμε κοκκιοκύτταρα σε κάθε φάση της φλεγμονής [6]. Αντίθετα η φλεγμονώδης απάντηση σε κάθε στάδιο της μεσολαβείται από παραγόμενα από μονοκύτταρα μακροφάγα και ειδικές υποκατηγορίες των T λεμφοκυττάρων [7, 8]. Η παρατεταμένη και συνεχιζόμενη φλεγμονή έχει ως συνέπεια την αύξηση του αριθμού των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων, που μεταναστεύουν από το αίμα και πολλαπλασιάζονται μέσα στη βλάβη. Με την ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων αποδεσμεύονται υδρολυτικά ένζυμα, κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες, που επιδεινώνουν τη βλάβη με επακόλουθη τη δημιουργία εστιακής νέκρωσης. Έτσι, κύκλοι συσσώρευσης από μονοπύρρηνα κύτταρα, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων και οργάνωση ινώδους ιστού οδηγούν σε περαιτέρω αύξηση και αναδιοργάνωση της βλάβης η οποία καταλήγει να περιορίζεται και να οριοθετείται κάτω από ένα ινώδες σκέπαστρο, το οποίο ουσιαστικά επικαλύπτει έναν πυρήνα λιπιδίων και νεκρωτικού ιστού, ή αλλιώς μια εξελισσόμενη και πολύπλοκη βλάβη. Στο ίδιο χρονικό σημείο, η αρτηρία αδυνατεί πλέον να αντισταθμίσει με τη διάταση των τοιχωμάτων, με συνέπεια η βλάβη να παρεισφύσει στον αυλό και να παρεμποδίσει τη ροή του αίματος [9-11].

Συνοπτικά τα μορφολογικά στάδια δημιουργίας και ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης είναι τα ακόλουθα:

α. μεμονωμένα αφρώδη μακροφάγα, β. πολλαπλά στρώματα αφρώδων μακροφάγων, γ. προσθήκη εξωκυττάρων λιπιδίων, δ. εξωκυττάρια πυρήνας λιπιδίων, ε. στρώματα ινώδους ιστού, στ. αιμάτωμα, θρόμβωση, συρρίγγιο, ζ. ασβέστωση, η. ινώδης ιστός.

### *Λιποπρωτεΐνη LDL και αλληλεπίδραση με ενδοθήλιο*

Μελέτες σε πειραματόζωα και ανθρώπους καταδεικνύουν ότι η υπερχοληστεριναιμία προκαλεί εστιακή ενεργοποίηση του ενδοθηλίου στις μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηρίες [12, 13]. Η διήθηση και παρακράτηση των μορίων της λιποπρωτεΐνης στο μέσο χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος κινητοποιεί μια φλεγμονώδη αντίδραση σε αυτό. Η διαφοροποίηση των μορίων της LDL μέσω οξείδωσης ή ενζυματική επεξεργασίας στον έσω χιτώνα οδηγεί στην απελευθέρωση φωσφολιπιδίων, τα οποία ενεργοποιούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, κυρίως στους χώρους της αιμοδυναμικής τάσης [13, 14]. Τυπικά πρότυπα αιμοδυναμικής ροής (χαμηλή μέση, αλλά υψηλής διακύμανσης δύναμη διάτμησης) προκαλούν την έκφραση φλεγμονώδων γονιδίων και την παραγωγή μορίων δέσμευσης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [15].

### *Κύτταρα του αίματος και ενδοθήλιο*

Το αιμοπετάλιο είναι το πρώτο κύτταρο του αίματος, που φθάνει στον τόπο της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης [16]. Οι γλυκοπρωτεΐνες του Ib και IIb/IIIa δεσμεύουν με τη σειρά τους επιφανειακά μόρια των ενδοθηλιακών κυττάρων, που ίσως συμβάλλουν στην περαιτέρω ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, όπως φαίνεται από μελέτες σε υπερχοληστεριναιμικά ποντίκια με την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, όπου μειώθηκαν η διήθηση λευκών αιμοσφαιρίων και η αθηροσκλήρωση [16]. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν διάφορους τύπους μορίων προσκόλλησης και δέσμευσης, ειδικούς για τα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία κατά την κυκλοφορία τους μέσα στο αίμα διερχόμενα από το σημείο φλεγμονής δεσμεύονται από τα αυτά τα μόρια [17]. Από τη στιγμή που το αγγειακό κυτταρικό μόριο δέσμευσης 1 (VCAM-1) είναι αυξημένο σε

υπερχοληστεριναιμικά αγγεία, κύτταρα (στην προκειμένη περίπτωση μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) που φέρουν τους αντίστοιχους υποδοχείς για το VCAM-1 προσκολλούνται κατά προτίμηση σε αυτά τα σημεία [18]. Στη συνέχεια κυτοκίνες που παράγονται από τον έσω χιτώνα, κινητοποιούν τα λευκά αιμοσφαίρια προς μετανάστευση μέσω των κυτταρικών συνάψεων στο υπενδοθηλιακό χώρο. Γενετική ή φαρμακευτική αναστολή κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης ειδικών για τα μονοκύτταρα φαίνεται να περιορίζει την αθηροσκλήρωση σε ποντίκια [19-23].

#### *Τα μακροφάγα κύτταρα στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας*

Ένας παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων (είτε κυτοκίνη είτε αυξητικός παράγοντας), που εκκρίνεται στο φλεγμένο μέσο χιτώνα, ωθεί τα μονοκύτταρα σε διαφοροποίηση προς μακροφάγα. Αυτό το στάδιο είναι σημαντικό για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής υποδοχέων αναγνώρισης για έμφυτη ανοσία, συμπεριλαμβανομένων και των υποδοχέων εκκαθάρισης και φυσικής ανοσίας στα μακροφάγα (Toll Like Receptors, TLR) [24-26]. Οι εκκαθαριστές υποδοχείς φέρνουν στο εσωτερικό του μακροφάγου ένα ευρύ φάσμα μορίων και σωματιδίων που φέρουν αυτά με τη σειρά τους μόρια με παθογονική μοριακή διάταξη [25]. Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες, τα αποπτωτικά θραύσματα κυττάρων και τα οξειδωμένα μόρια της LDL προσλαμβάνονται και καταστρέφονται μέσω αυτής της οδού. Εάν η χοληστερόλη, που προέρχεται από την απορρόφηση της οξειδωμένης LDL δεν μπορούν να κινητοποιηθεί από το κύτταρο σε επαρκή βαθμό, συσσωρεύεται ως κυτταροπλασματικό σταγονίδιο. Τελικά, το κύτταρο μετατρέπεται σε ένα αφρώδες κύτταρο, το οποίο αποτελεί το πρωτότυπο κύτταρο στην αθηροσκλήρωση.

Οι TLR δεσμεύουν επίσης μόρια με παθογονικά μοριακά σχέδια, αλλά σε αντίθεση με τους εκκαθαριστές υποδοχείς, μπορούν να κινητοποιήσουν μία ακολουθία σημάτων που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων [26]. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων παράγει φλεγμονώδεις κυτοκίνες, πρωτεάσες, κυτταροτοξικό οξυγόνο και ελεύθερες ρίζες αζώτου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε δενδριτικά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν επίσης αυτούς τους υποδοχείς. Οι βακτηριακές τοξίνες, πρωτεΐνες στρες, και τμήματα του DNA αναγνωρίζονται από τους TLR [26]. Επιπλέον, η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 (heat shock protein) και τα οξειδωμένα μόρια LDL μπορούν να ενεργοποιήσουν αυτούς τους υποδοχείς [27, 28]. Τα κύτταρα στις ανθρώπινες αθηρωματικές βλάβες εμφανίζουν ένα φάσμα TLR, και φλεγμονή της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να εξαρτάται εν μέρει από αυτή την οδό [29]. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από μελέτες, όπου με γενετική αφαίρεση ενός μορίου στο βιοχημικό μονοπάτι σημάτων των TLR αναστέλλεται η αθηροσκλήρωση σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια [30].

#### *Ο ρόλος των T λεμφοκυττάρων*

Όπως είναι γνωστό, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος 'περιπολούν' στους ιστούς του σώματος προς ανέρευση αντιγόνων [31, 32]. Στα σημεία από τα οποία διέρχονται συμπεριλαμβάνονται και οι αθηρωματικές περιοχές στις οποίες συναντάμε πάντα διηθήσεις από T λεμφοκύτταρα και ιδιαίτερα της ομάδας CD4+. Τα CD4+ αναγνωρίζουν πρωτεΐνες ως αντιγόνα, που προβάλλονται σε αυτά μετά από δέσμευση στα μόρια του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC class II molecules). Ενεργά CD4+ κύτταρα απέναντι σε οξειδωμένα μόρια LDL, πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60, πρωτεΐνες χλαμυδίων έχουν απομονωθεί σε

ανθρώπινες αθηρωματικές βλάβες [27, 33, 34]. Μια μικρή υποομάδα των T λεμφοκυττάρων, οι φυσικοί δολοφόνοι κυττάρων (natural killers T cells, NK) αναγνωρίζουν τα λιπιδικά αντιγόνα και η ενεργοποίησή τους σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια επιδεινώνει την αθηροσκλήρωση [35]. Επίσης τα CD8+ T λεμφοκύτταρα που συνδέονται με αντιγόνα μέσω του MHC I παρουσιάζονται στις αθηρωματικές βλάβες. Παρόμοια, η ενεργοποίηση αυτών επιταχύνει το κυτταρικό θάνατο και την αύξηση της αθήρωσης [36]. Άπαξ και δεσμευθεί ο αντιγονικός υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων, η ακολουθία των αντιδράσεων, που επάγονται καταλήγουν στην έκφραση κυτοκινών, μορίων κυτταρικής επιφάνειας και ενζύμων. Σε μη τροποποιημένα ποντίκια έχουν προκληθεί δύο ειδών αντιδράσεις [37]. Η τύπου 1 βοηθητική αντίδραση T (Th 1) κινητοποιεί τα μακροφάγα και ωθεί μια φλεγμονώδη αντίδραση όμοια με αυτή της όψιμης υπερευαισθησίας και δρα ειδικά έναντι ενδοκυττάρων παθογόνων μορίων. Στον αντίποδα, η τύπου 2 (Th 2) προκαλεί μια αλλεργική αντίδραση. Από μελέτες φαίνεται ότι η αθηρωματική βλάβη περιέχει κυτοκίνες, που ευνοούν την ανάπτυξη της Th 1 αντίδρασης [38, 39]. Επομένως τα T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε Th 1 δραστικά κύτταρα και προωθούν την παραγωγή της ιντερφερόνης- $\gamma$ , η οποία είναι μια κυτοκίνη κινητοποίησης των μακροφάγων. Η ιντερφερόνη  $\gamma$  με τη σειρά της καθιστά πιο αποτελεσματική την αντιγονική προβολή και αυξάνει τη σύνθεση των κυτοκινών φλεγμονής και συγκεκριμένα του καρκινικού παράγοντα νέκρωσης (TNF) και της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) [37]. Δρώντας συνεργιστικά αυτές οι κυτοκίνες υποκινούν την παραγωγή άλλων φλεγμονωδών και κυτταροτοξικών παραγόντων στα μακροφάγα και στα αγγειακά κύτταρα [32]. Όλες αυτές οι αλληλουχίες τείνουν στη δημιουργία αθήρωσης, γεγονός που επιβεβαιώνεται σε πειράματα αναστολής της ιντερφερόνης  $\gamma$  ή τροποποιημένης έλλειψης του υποδοχέα με αποτέλεσμα την



καθόλου ανάπτυξη αθηρωμάτωσης [40, 41]. Την ίδια κατάληξη έχει και η φαρμακευτική ή γενετική αναστολή της Th 1 αντίδρασης σε πειραματόζωα [42-45]. Αντίθετα οι κυτοκίνες που προκύπτουν από την Th 2 αντίδραση επιδεικνύουν αντιαθηρωματικές ανοσολογικές ωφέλειες [46]. Παρόλο αυτά εμπλέκονται στη δημιουργία ανευρυσμάτων με την επαγωγή ελαστολυτικών ενζύμων [47]. Εν τέλει οι κυτοκίνες των T λεμφοκυττάρων κατέχουν ένα βασικό ρόλο στη φλεγμονώδη ακολουθία των κυτοκινών κατά την αθηρωματική βλάβη, γεγονός που επιβεβαιώνεται με τις αυξημένες τιμές C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και ιντερλευκίνης 6 (IL-6) στο πλάσμα.

#### *Λεία μυϊκά κύτταρα*

Η μεταναστευτική τάση και ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών ινών κατά τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας εξηγείται καλύτερα αν λάβουμε υπόψιν μας την εμβρυακή προέλευση των λείων μυϊκών κυττάρων στην ανοικοδόμηση των αρτηριών στα διάφορα σημεία του αρτηριακού δέντρου. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά προέρχονται από διαφορετικές εμβρυακές περιοχές, ανάλογα με το μέρος του αρτηριακού δέντρου για το οποίο προορίζονται. Σε κάποια σπονδυλωτά, χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί στους ανθρώπους ακόμα, τα λεία μυϊκά κύτταρα του άνω τμήματος της θωρακικής αορτής έχουν καταβολή από το νευροεξώδερμα, ενώ τα κύτταρα της κοιλιακής αορτής από το παρέγχυμα [48]. Τα κύτταρα των στεφανιαίων αρτηριών φαίνεται να προέρχονται από τον τρίτο πρόδρομο πληθυσμό του ενδοκαρδιακού παρεγχύματος. Το γεγονός της ύπαρξης διαφορετικών γραμμών προέλευσης, μπορεί να θέσει και την υπόθεση ότι τα λεία μυϊκά κύτταρα σε διάφορα μέρη του αρτηριακού συστήματος θα αναποκρίνονται διαφορετικά στα ερεθίσματα που δέχονται, όπως για παράδειγμα αυτά που

επάγουν την αθηροσκλήρωση, όπως επίσης ότι ίσως αυτό είναι η αιτία της διαφοροποίησης των βλαβών των στεφανιαίων αγγείων και της καρωτίδας με αυτές των περιφερικών αρτηριών [49-52].

#### *Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία*

Τα λεία μυϊκά κύτταρα στο μέσο χιτώνα των αρτηριών, όπως και μέσα στη βλάβη περιβάλλονται από διαφορετικούς τύπους συνδετικού ιστού. Συνήθως στο μέσο χιτώνα η εξωκυττάρια ουσία αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και III, ενώ στις περιοχές της βλάβης από πρωτεογλυκάνες αναμεμιγμένες με χαλαρές σε διάταξη ίνες κολλαγόνου. Έχει παρατηρηθεί, ότι το κολλαγόνο οργανωμένο σε ινώδη πολυμερή μορφή αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο των λείων μυϊκών κυττάρων και όποτε επέρχεται εκφυλισμός του κολλαγόνου ή μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων τότε μόνο είναι σε θέση να ανταποκριθούν στα μιτωτικά ερεθίσματα και να πολλαπλασιαστούν [52]. Άλλα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η ινονεκτίνη και η θειϊκή ηπαράνη μπορούν και αυτά να εμπλέκονται στη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης, επειδή μπορούν επίσης να αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο και να επάγουν την παραγωγή κυτοκινών από τα μακροφάγα [53-55]. Ως εκ τούτου η εξωκυττάρια ουσία δεν παραμένει ουδέτερη και στην περίπτωση που λαμβάνουν χώρα αυτές οι διαντιδράσεις, τότε επηρεάζουν σε κύριο βαθμό τη φλεγμονώδη και ανοπολλαπλασιαστική απάντηση [56].

#### *Μηχανισμός ρήξης της αθηρωματικής πλάκας*

Ενεργοποιημένα μακροφάγα, Τ λεμφοκύτταρα και μαστοκύτταρα στο σημείο της ρήξης εκκρίνουν αρκετά είδη μορίων (κυτοκίνες φλεγμονής, πρωτεάσες, παράγοντες πήξης, αγγειοδραστικές ουσίες και ελεύθερες ρίζες) τα οποία

αποσταθεροποιούν τη βλάβη, παρεμποδίζουν τη δημιουργία μιας ινώδους κάψας, επιτίθενται στο κολλαγόνο της κάψας και σχηματίζουν θρόμβους [8, 57-59]. Όλες αυτές οι αντιδράσεις επάγουν την ενεργοποίηση και ρήξη της πλάκας με ακόλουθη θρόμβωση και μυοκαρδιακή ισχαιμία.

Δύο ειδών πρωτεασών αναφέρονται ως οι παράγοντες κλειδιά στην ενεργοποίηση της πλάκας: οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMP) και οι πρωτεάσες κυστεΐνης [60, 61]. Οι πρωτεάσες αυτές εμφανίζονται στην πλάκα και εκφυλίζουν τη δομή της. Η δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνών ελέγχεται σε πολλά επίπεδα: κυτοκίνες φλεγμονής επάγουν την έκφραση γονιδίων μεταλλοπρωτεϊνών, η πλασμίνη ενεργοποιεί πρώιμες μορφές αυτών και αναστολείς πρωτεϊνών (ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών) καταστέλουν τη δράση τους. Όμοια οι πρωτεάσες κυστεΐνης κινητοποιούνται από συγκεκριμένες κυτοκίνες και αναστέλονται από τις κυστατίνες [61]. Παρόλο αυτά τα πειραματικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα μιας και ορισμένοι τύποι μεταλλοπρωτεϊνών μειώνουν παρά αυξάνουν το μέγεθος της βλάβης.

### **3. Ισχαιμία του μυοκαρδίου**

Η ισχαιμία του μυοκαρδίου συνιστά μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου σε όλες τις προηγμένες χώρες του κόσμου και πολύ συχνά ευθύνεται για την χαμηλή ποιότητα ζωής πολλών ανθρώπων. Οι ενεργειακές ανάγκες του μυοκαρδίου ικανοποιούνται μόνο μέσα από την οδό του αερόβιου μεταβολισμού, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η απρόσκοπτη και η συνεχής παροχή οξυγόνου στον καρδιακό μύ. Για το λόγο αυτό, η απόφραξη κάποιου στεφανιαίου αγγείου οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας του μυοκαρδίου.

Ο πρωταρχικός στόχος στα στεφανιαία σύνδρομα παραμένει η μείωση της μυοκαρδιακής βλάβης και η βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Η έγκαιρη μυοκαρδιακή επαναιμάτωση είτε με θροβολυτική θεραπεία, είτε με πρωτογενή διαδερμική στεφανιαία αγγειοπλαστική, έτσι ώστε να αποκατασταθεί η αιματική ροή στην επηρεαζόμενη από το έμφρακτο περιοχή, παραμένει η πιο αποτελεσματική επέμβαση για τον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος, τη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας και του κλάσματος εξωθήσεως και τη βελτίωση της κλινικής έκβασης.

#### **3.1. Οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου**

Η οξεία απόφραξη μιας μεγάλης επικαρδιακής αρτηρίας για διάστημα μεγαλύτερο των 20 έως και 40 λεπτών οδηγεί αναπόφευκτα σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η αναπτυσσόμενη νέκρωση εξαπλώνεται από τα κέντρο της αποφραγμένης αγγειακής περιοχής και από ενδοκαρδιακά στρώματα, που υπόβλλονται σε πιο βαριά ισχαιμία, θεωρούμενα ως το μέτωπο του ισχαιμικού κύματος, προς λιγότερο

ισχαιμικές περιοχές του επικαρδίου. Οι καθοριστικοί παράγοντες της τελικής έκτασης του εμφράγματος είναι το μέγεθος και η τοποθεσία της περιοχής άρδευσης πέραν του σημείου απόφραξης [62], η υπολείπουσα αιματική ροή κατά την ισχαιμία μέσω στεφανιαίων παραπλεύρων, η θερμοκρασία [63], η αιμοδυναμική κατάσταση κατά την ισχαιμία, εξαρτώμενη κυρίως από την καρδιακή συχνότητα [64-66]. Η χρονική πορεία εξέλιξης του εμφράγματος διαφέρει ανάμεσα στους ζώντες οργανισμούς. Έτσι για παράδειγμα στα τρωκτικά που χαρακτηρίζονται από υψηλή καρδιακή συχνότητα και χαμηλή παράπλευρη ροή, η τελική έκταση εμφράγματος ολοκληρώνεται μετά από 30 λεπτά, αντίθετα σε μεγάλα θηλαστικά, όπως είναι ο άνθρωπος η εξέλιξη είναι πιο αργή και το έμφραγμα αναπτύσσεται σε ώρες. Στην περίπτωση παρουσίας επαρκούς παράπλευρης στεφανιαίας ροής, το ισχαιμικό μυοκάρδιο μπορεί να διασωθεί με την επαναιμάτωση ακόμα και ώρες αργότερα.

### **3.1.1. Μεταβολικές διαταραχές του μυοκαρδίου κατά την ισχαιμία**

#### *Μεταβολισμός του μυοκαρδίου*

Η καρδιά καταναλώνει την περισσότερη ενέργεια από κάθε άλλο όργανο και ταυτόχρονα αποτελεί το όργανο με τη μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου στο σώμα με 8-15ml O<sub>2</sub> min/100 g ιστού, που σε συνθήκες άσκησης μπορεί να φτάσει και τα 70ml. Η καρδιά πάλλεται περί τις 100.000 φορές την ημέρα, προωθεί 10 τόνους αίμα στο υπόλοιπο σώμα και ανακυκλώνει 6 κιλά τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που αντιστοιχεί όσο 20 30 φορές το βάρος της [67]. Το μεταβολικό εργοστάσιο της καρδιάς είναι πολύπλοκο και διαθέτει τρεις κύριους άξονες. Ο πρώτος άξονας είναι η αξιοποίηση του υποστρώματος, δηλαδή η

χρησιμοποίηση του καυσίμου, που προέρχεται από τα τρόφιμα. Αυτή η διαδικασία συνίσταται στην κυτταρική πρόσληψη, κυρίως των λιπαρών οξέων και τη γλυκόζης και στη συνέχεια την καταβολή αυτών μέσα από τη β-οξειδωση και τη γλυκόλυση. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ενδιάμεσος μεταβολίτης ακέτυλο-CoA, ο οποίος διοχετεύεται στο κύκλο του Krebs και παράγεται δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης (NADH) και διοξείδιο του άνθρακα. Ο δεύτερος άξονας είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, δηλαδή η παραγωγή ενέργειας από την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Τα συγκροτήματα της αναπνευστικής αλυσίδας (I έως IV) μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADH στο οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι μια ηλεκτροχημική κλίση πρωτονίου κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, καθώς NAD και νερό. Αυτή η κλίση οδηγεί τη σύνθεση της F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP, η οποία παράγει ATP από τη φωσφορυλίωση της ADP. Η τρίτη συνιστώσα είναι η μεταφορά και χρησιμοποίηση ATP, δηλαδή η μεταφορά ενέργειας και η κατανάλωση της από το μηχανικό κομμάτι της καρδιάς, τα μυοϊνίδια [68]. Η μεταφορά ATP επιτυγχάνεται από ένα μηχανισμό ενεργειακής μεταφοράς, που ονομάζεται μεταφορέας ενέργειας κρεατίνης κινάσης [69]. Η μιτοχονδριακή κρεατίνη κινάση καταλύει τη μεταφορά του υψηλού ενεργειακού χημικού δεσμού του φωσφορικού άλατος στο ATP στην κρεατίνη, έτσι ώστε να προκύψει φωσφοκρεατίνη (PCr) και ADP. Η φωσφοκρεατίνη, μικρότερο μόριο από το ATP διαχέεται από τα μιτοχόνδρια στα μυοϊνίδια, όπου η κινάση της κρεατίνης των μυοϊνιδίων καταλύει τον επανασχηματισμό του ATP από PCr. Μια σημαντική λειτουργία του συστήματος κινάσης κρεατίνης είναι να ενεργεί ως ρυθμιστής ενέργειας για να διατηρεί το ATP σε φυσιολογικά επίπεδα. Όταν η ζήτηση ενέργειας υπερβαίνει την προσφορά, το επίπεδο PCr πέφτει, διατηρώντας το ATP σε ένα κανονικό επίπεδο με το ελεύθερο ADP να αυξάνεται. Η αύξηση του ADP

αναστέλλει την λειτουργία πολλών ενδοκυττάρων ενζύμων, όπως της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH), της ακτινομυοσίνης ATPάσης και της Na-K ATPάσης, απαραίτητες για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής, προκαλώντας ανεπάρκεια του μηχανισμού συστολής της καρδιάς. Έτσι, μια μεταβολική διαταραχή στο καρδιακό κύτταρο μπορεί να συμβεί όταν τα επίπεδα PCr πέφτουν και αυξάνονται αυτά του ADP, ακόμα και αν το επίπεδο ATP παραμένει αμετάβλητο [69].

#### *Διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και οξειδωτικό στρες*

Η δυσλειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορεί να μειώσει την καρδιακή λειτουργία, λόγω ανεπαρκούς προσφοράς ATP στα καρδιακά κύτταρα [68]. Τα μιτοχόνδρια παίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαταραχή. Τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν δυσλειτουργία στη αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transfer Chain, ETC) μειώνοντας τη δραστηριότητα της ATP συνθετάσης και αυξάνοντας την παραγωγή των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) [70]. Τα μιτοχόνδρια έχουν αποδειχθεί ως η κύρια πηγή ROS και υπάρχουν αρκετοί παράγοντες, που μπορούν να επηρεάσουν τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, όπως οι κατεχολαμίνες, ο αυξημένος καρδιακός συμπαθητικός τόνος, η αυξημένη βασική ανάγκη οξυγόνου, ο επαγώγιμος από υποξία παράγοντας (hypoxia inducible factor, HIF), η αύξηση της αγγειοτενσίνης II και η διέγερση του παράγοντα νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) [71]. Υπάρχει μια πολύπλοκη παθοφυσιολογική σχέση μεταξύ ROS (και ως εκ τούτου του οξειδωτικού στρες) και της δυσλειτουργίας του μυοκαρδίου. Η αύξηση της παραγωγής ROS οδηγεί σε δυσλειτουργία της ETC, η οποία, με τη σειρά της, μειώνει τη μετατροπή του ATP προκαλώντας συσταλτική δυσλειτουργία του

μυοκαρδίου [72]. Οι ROS διεγείρουν την παραγωγή μη μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, παραγόντων μεταγραφής, και φλεγμονωδών κυτοκινών [73]. Επίσης προξενούν βλάβες στις αντλίες κατιόντων (αντλία Na-K ATPάση και Ca-ATPάση) οδηγώντας σε κυτταρική και μιτοχονδριακή υπερφόρτωση ασβεστίου, η οποία είναι η κύρια αιτία για το άνοιγμα των μιτοχονδριακών πόρων μετάβασης και διαπερατότητας (mitochondrial transition permeability pore, mPTP) [74]. Αυτό καθορίζει τη μιτοχονδριακή εκπόλωση και δυσλειτουργία οδηγώντας τα κύτταρα του μυοκαρδίου στο θάνατο μέσω νέκρωσης ή απόπτωσης [75]. Τέλος, οι ROS ενεργοποιούν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, με συνέπεια την απώλεια του κολλαγόνου, τη ολίσθηση σε ευθυγράμμιση των μυοϊνιδίων, τη διάταση της αριστερής κοιλίας και τη δυσανάλογη καρδιακή αναδιαμόρφωση [76]. Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή και τον καταβολισμό των ROS. Η τοξικότητα των ROS μπορεί να αποτραπεί από ένζυμα εκκαθαριστές όπως το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) και η καταλάση, καθώς και από άλλα μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, όταν η παραγωγή ROS είναι υπερβολική, δημιουργείται μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της αποικοδόμησης, με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες να έχει βλαπτικές συνέπειες στα κύτταρα του μυοκαρδίου [77, 78]. Ιδιαίτερα αυτό είναι σημαντικό κατά τη βλάβη μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση όπως θα δούμε παρακάτω. Οι ROS διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο και μπορούν να προκαλέσουν αναστρέψιμη (αποπλήκτον μυοκάρδιο, stunning myocardium) ή μη αναστρέψιμη βλάβη (έμφραγμα του μυοκαρδίου) ανάλογα με τη διάρκεια του ισχαιμικού επεισοδίου. Σε γενικές γραμμές, στο αποπλήκτον μυοκάρδιο, η ισχαιμική βλάβη είναι αναστρέψιμη, γιατί υπάρχει μόνο μείωση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου μετά από μια σύντομη περίοδο ισχαιμίας



ακολουθούμενη από επαναιμάτωση. Αντιθέτως, μεγαλύτερης διάρκειας ισχαιμία μπορεί να οδηγήσει στο κυτταρικό θάνατο και έμφραγμα του μυοκαρδίου [79]. Μετά από μια σύντομη περίοδο ισχαιμίας, κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης, η ενδοκυττάρια οξέωση, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, η υπερφόρτωση ασβεστίου και η μειωμένη ευαισθησία των συσταλόμενων πρωτεϊνών αποκαθίστανται. Η απόδειξη, ότι οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του αποπλήκτοντος μυοκαρδίου προέρχεται από πειράματα σε ζώα, όπου φαίνεται σε αναισθητοποιημένο σκύλο, ότι το μεγαλύτερο μέρος της μυοκαρδιακής απόπληξης, που προκαλείται από 15 λεπτή απόφραξη μπορεί να προληφθεί με χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων [80].

Το οξειδωτικό στρες κατέχει επίσης σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της έκτασης του εμφράγματος στο μυοκάρδιο. Σε μία μελέτη φαίνεται, ότι η διαγονιδιακή υπερέκφραση της SOD μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος σε ποντίκια γεγονός, που υποδηλώνει, ότι οι ROS είναι σημαντικοί διαμεσολαβητές της μυοκαρδιακής βλάβης στο έμφραγμα [81]. Ωστόσο, οι προσπάθειες και σε άλλα ζωικά μοντέλα, με στόχο τη SOD, για τη βελτίωση της έκβασης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, έχουν αποφέρει μικτά αποτελέσματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι αφενός η ενεργοποίηση των ROS αποτελεί έναν παράγοντα της βλάβης επαναιμάτωσης και μετεμφραγματικής νέκρωσης και αφετέρου η SOD μόνη της δεν επαρκεί εξουδετερώσει τις βλαβερές συνέπειες των ROS σε αυτήν την κατάσταση [82]. Τέλος, το οξειδωτικό στρες μετέχει στη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της καρδιάς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η συμβολή τους έγκειται στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και την απώλεια μυοκυττάρων μέσω απόπτωσης [83]. Αυτό στηρίζεται από

μελέτες όπου η διαγονιδιακή υπερέκφραση της GSHPx βελτιώνει την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου [84].

### **3.2. Βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης**

Η βλάβη επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που επιδέχεται διάφορες ανεξάρτητες αιτιολογίες. Κατά την πρώτη φάση της επαναιμάτωσης (εντός λεπτών), η ανάπτυξη της ισχαιμικής σύσπασης (ischemic contracture) φαίνεται να είναι η κύρια αιτία για τη νέκρωση των καρδιακών κυττάρων. Στη συνέχεια (λεπτά έως ώρες) διάφορες πρόσθετες αιτίες μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω αύξηση του κυτταρικού θανάτου, είτε από νέκρωση ή απόπτωση, είτε από ανεπάρκεια των αγγείων μπορεί επιδεινωθεί περαιτέρω τη μυοκαρδιακή βλάβη.

#### *Αιτίες της ισχαιμικής σύσπασης κατά την επανοξυγόνωση*

Η σύσπαση (δηλαδή η σταθερή βράχυνση και σκλήρυνση του μυοκαρδίου) μπορεί να έχει διάφορες αιτίες. Στο ισχαιμικό μυοκάρδιο η σύσπαση αναπτύσσεται βάση ενός μηχανισμού τετανίας [85]. Μελέτες σε καρδιακά κύτταρα και μυοϊνίδια έχουν δείξει, ότι η δύναμη που προκαλεί τη κυκλική κίνηση της μυοσίνης για διασταύρωση με την ακτίνη ξεκινά όταν το κυτταροπλασματικό ATP, μειώνεται σε ένα χαμηλό (100μmol/l), αλλά μη μηδενικό επίπεδο [86, 87]. Στην ισχαιμία, αυτό το παράθυρο της χαμηλής συγκεντρώσεως ATP υφίσταται μόνο για σύντομη περίοδο, επειδή τα κυτταρικά αποθέματα του ATP εξαντλούνται γρήγορα. Τότε η βράχυνση των μυοϊνιδίων παραμένει σταθερή, καθώς η διασταύρωση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης παραμένει σε συνημμένη κατάσταση. Η σύσπαση που αναπτύσσεται

από αυτόν τον ισχαιμικό μηχανισμό δεν προκαλεί στην ουσία μεγάλες δομικές βλάβες, αλλά οδηγεί σε ατέλεια του κυτταροσκελετού. Αυτό καθιστά τα καρδιακά κύτταρα πιο εύθραυστα και πιο επιρρεπή σε μηχανική βλάβη [88]. Όταν η εξάντληση ενέργειας αρθεί σύντομα, τότε η ισχαιμική τετανία είναι συνήθως αναστρέψιμη.

Αν όμως η ισχαιμία του μυοκαρδίου κύτταρα είναι παρατεταμένη, αναπτύσσεται σοβαρή σύσπαση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του κυτταροσκελετού, με συνέπεια να αυξάνεται η ευθραυστότητα των κυττάρων κατά την επαναιμάτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η τελοδιαστολική πίεση να αυξάνεται και η κοιλιακή διατασιμότητα να μειώνεται. Ουσιαστικά η σύσπαση συνοδεύεται από μία συγκεκριμένη μορφή ιστικής νέκρωσης αναφερόμενη ως η από συστολή νέκρωση ζώνης [89]. Η ιστολογική εικόνα χαρακτηρίζεται από υπερτεταμένα σαρκομέρια, υπερδιάταση ενδιάμεσων χώρων, και σαρκειλημματικές διαταραχές. Η εικόνα αυτή είναι αποτέλεσμα ισχυρών και ανομοιογενών μηχανικών δυνάμεων. Μια σειρά από μελέτες έδειξαν, ότι η παθογένεση της σύσπασης επαγόμενη από την επαναιμάτωση μπορεί να αναλυθεί σε κυτταρικό επίπεδο. Η ανάλυση αποκάλυψε δύο ανεξάρτητες αιτίες αυτού του μηχανισμού: (1) σύσπαση από υπερφόρτωση  $Ca^{2+}$  (2) τετανική σύσπαση Η πρώτη μορφή προκαλείται σε ένα καρδιακό κύτταρο, εάν αναπτύσσεται υπερφόρτωση  $Ca^{2+}$  κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και ταχύτατα κατόπιν επανεργοποιείται. Υψηλή κυτταροπλασματική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  και αύξηση της ενέργειας οδηγεί στην ανεξέλεγκτη κινητοποίηση του συσταλτικού μηχανισμού. Αντίθετα η τετανική σύσπαση μπορεί να εμφανισθεί κατά τη διάρκεια της επανοξυγόνωσης, αν η πρόσληψη ενέργειας του ισχαιμικού μυοκαρδίου πραγματοποιείται με χαμηλό ρυθμό. Επομένως, μπορεί να παρατηρηθεί μετά από παρατεταμένη ή βαριά ισχαιμία. Η τετανική σύσπαση δεν εξαρτάται απαραίτητα

από την υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$ . Αυτοί οι δύο μηχανισμοί για τη σύσπαση κατά την επαναιμάτωση περιγράφονται ξεχωριστά παρακάτω.

#### *Σύσπαση επαναιμάτωσης λόγω υπερφόρτωσης $\text{Ca}^{2+}$*

Στα ισχαιμικά κύτταρα μειώνεται η ενέργεια και αναπτύσσεται στη συνέχεια υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$  του σαρκελήμματος λόγω αντίστροφης λειτουργίας του σαρκελημματικού ανταλλαγέα  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Εάν η δυνατότητα των μιτοχονδρίων για σύνθεση ATP δεν είναι σοβαρά επηρεασμένη κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής περιόδου, η επαναοξυγόνωση οδηγεί σε γρήγορη αποκατάσταση της παραγωγής. Η επανασύνθεση του ATP επιτρέπει στα κύτταρα να ανακάμψουν από τις απώλειες της κυτοσολικής ισορροπίας κατιόντων, αλλά επανενεργοποιεί επίσης το συστατικό μηχανισμό, που είχε παραμείνει σε κατάσταση τετανικής σύσπασης από την απώλεια του ATP κατά την ισχαιμία. Το τελευταίο αποτέλεσμα συμβαίνει πιο γρήγορα από το πρώτο, και οδηγεί σε μια ανεξαρτήτου  $\text{Ca}^{2+}$  συστολή. Σε μια πιο λεπτομερή ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι η κυκλική πρόσληψη και απελευθέρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) σε επαναοξυγονωμένα κύτταρα ενεργοποιεί μια σύσπαση οφειλόμενη σε υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$  [90, 91]. Αυτές οι ταλαντοειδείς διακυμάνσεις του  $\text{Ca}^{2+}$  μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλές κυτοσολικές αιχμές συγκεντρώσεως  $\text{Ca}^{2+}$ . Η συχνότητα αυτών των αιχμών  $\text{Ca}^{2+}$  επηρεάζονται από τη συνεχή εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  σε όλη την έκταση του σαρκελήμματος κατά την αρχική φάση της επαναοξυγόνωσης [91]. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου η διασαρκελημματική κλίση  $\text{Na}^+$  εξακολουθεί να μειώνεται και ο ανταλλαγέας  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  λειτουργεί ακόμα κατά αντίστροφο τρόπο. Πειραματικά, σε διάφορα πρωτόκολλα έχει αποδειχθεί ότι διαντιδρά με τη σύσπαση λόγω υπερφόρτωσης  $\text{Ca}^{2+}$ : Πρώτον, η σύσπαση μπορεί

να προληφθεί με μια αρχική, χρονικά περιορισμένη αναστολή του συσταλτικού μηχανισμού. Για το σκοπό αυτό, η 2,3 βουτάνιο διόνη μονόξινη φωσφατάση έχει χρησιμοποιηθεί [92, 93]. Μέρος της προστατευτική δράσης των cGMP επαγόμενων δραστικών μορίων (NO, κολπικό νατριοουρητικό πεπτίδιο) ή της κυτοσολικής οξέωσης μπορεί επίσης να αποδοθούν στην αναστολή της συστολής μιας και οι παράγοντες αυτοί μειώνουν την ευαισθησία των μυοϊνιδίων στο  $Ca^{2+}$ . Δεύτερον, η σύσπαση μπορεί να ελαττωθεί με τη μείωση των ταλαντοειδών διακυμάνσεων του SR εξαρτόμενου  $Ca^{2+}$ . Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με παράγοντες που παρεμβαίνουν στη απομάκρυνση του SR- $Ca^{2+}$  ή στην αναστολή της εισροής  $Ca^{2+}$  στα κύτταρα, που εξακολουθεί να συμβαίνει κατά την πρώιμη φάση της επαναοξυγόνωσης. Η ανακύκλωση  $Ca^{2+}$  κατά μήκος του SR μπορεί να εμποδιστεί από συγκεκριμένους παράγοντες, που παρεμβαίνουν στη SR  $Ca^{2+}$  ATPάση ή στην αποδέσμευση του SR  $Ca^{2+}$  [90] ή με λιγότερο συγκεκριμένα μέσα όπως το αναισθητικό αλοθάνιο ή η ενδοκυττάρια οξέωση [94, 95].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η θεραπευτική αξία της αναστολής της μεταφοράς πρωτονίων κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης. Προηγουμένως είδαμε, ότι η διατήρηση της ισχαιμικής ενδοκυτταρικής οξέωσης κατά την αρχική φάση της επαναιμάτωσης προστατεύει τα καρδιακά κύτταρα από τη σύσπαση κατά την επαναοξυγόνωση [95]. Για να επιτευχθεί αποτελεσματική προστασία, απαιτείται ταυτόχρονη αναστολή των δύο μηχανισμών απέκκρισης οξέος, δηλαδή, του αντιμεταφορέα  $Na^+/H^+$  και του συμμεταφορέα  $Na^+/HCO_3^-$ . Μεμονωμένη αναστολή του ανταλλαγέα  $Na^+/H^+$  έχει αποτύχει να παρέχει προστασία στο μυοκάρδιο κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, τόσο σε πειραματικές μελέτες [96, 97], καθώς και σε κλινικές μελέτες [98]. Όταν τα καρδιομυοκύτταρα επαναοξυγονώνονται, υπό συνεχή κυτοσολική οξέωση,

μπορούν να ανακτήσουν μεταβολικά, ενώ η συσταλτική ενεργοποίηση παραμένει ανασταλμένη και η μετακίνηση του SR  $\text{Ca}^{2+}$  εξασθενημένη. Η μεταβολική ανάκαμψη οδηγεί στο φυσιολογικό επανέλεγχο των κυτταρικών κατιόντων, εξαλείφοντας έτσι τις αιτίες σύσπαση λόγω  $\text{Ca}^{2+}$ . Μια άλλη ενδιαφέρουσα αρχή της οξείας προστασίας επαναιμάτωσης είναι η χρήση παραγόντων διέγερσης διαλύματος [99, 100] ή μορίων γουανιλικής κυκλάσης στο μυοκάρδιο [101, 102]. Αύξηση των επιπέδων της κυτταρικής cGMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G. Η δράση της στα μυοϊνίδια (πιθανός στόχος: η τροπονίνη I) προκαλεί τον απιονισμό του  $\text{Ca}^{2+}$ , η οποία είναι επωφελής σε επαναοξυγονωμένα κύτταρα με υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$ . Η δράση στην SR- $\text{Ca}^{2+}$  ATPάση (ενδεχόμενος στόχος φωσφορική ρίζα) αναστέλλει την SR-εξαρτώμενη ανακύκλωση  $\text{Ca}^{2+}$  σε επαναοξυγονωμένα μυοκύτταρα. Και οι δύο ενέργειες περιορίζουν την επαγόμενη από  $\text{Ca}^{2+}$  σύσπαση. Επίσης χρησιμοποιώντας δότες NO στην επαναιμάτωση του μυοκαρδίου έχει ευεργετικές επιδράσεις, όπως η αναστολή των λευκοκυττάρων και η αγγειοδιαστολή. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί, ότι οι δότες NO μπορούν επίσης να προκαλέσουν απόπτωση σε καρδιακά κύτταρα, είτε μέσω ενός μηχανισμού ελεύθερων ριζών, είτε μέσω διαμεσολάβησης με cGMP.

#### *Τετανική σύσπαση επαναιμάτωσης*

Όσο η μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας αποκαθίσταται γρήγορα μετά από επαναιμάτωση/επαναοξυγόνωση, τα καρδιομυοκύτταρα τελούν υπό οξύ κίνδυνο σύσπασης λόγω υπερφόρτωσης  $\text{Ca}^{2+}$  [85]. Μετά από παρατεταμένη ισχαιμία η ικανότητα των μιτοχονδρίων να αποκαταστήσουν ταχέως μια φυσιολογική κυτταρική κατάσταση της ενέργειας ελαττώνεται. Ωστόσο, κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης τα κύτταρα μπορεί να περιέχουν πολύ χαμηλή (αν και

αυξανόμενη) συγκεντρώση ATP με αποτέλεσμα να εμφανίζεται τετανική σύσπαση. Σε σύγκριση με το διάστημα της ισχαιμίας, κατά την επαναιμάτωση τα κύτταρα μπορεί να περιέρχονται στο παράθυρο χαμηλής συγκέντρωσης κυτοσολικού ATP για πολύ περισσότερο χρόνο, κατάλληλο για την πρόκληση τετανικής σύσπασης. Ως εκ τούτου, η βράχυνση των κυττάρων μπορεί να είναι πολύ πιο έντονη από ό, τι παρατηρείται στην ισχαιμική τετανική σύσπαση. Στην περίπτωση που η τετανική σύσπαση επικρατεί στην οξεία βλάβη επαναιμάτωσης, οι θεραπευτικές παρεμβάσεις, που στοχεύουν στην κυτταροπλασματική υπερφόρτωση  $Ca^{2+}$  είναι αναποτελεσματικές, σε τέτοιο βαθμό, που η τετανική σύσπαση είναι ουσιαστικά ανεξάρτητη της συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$ . Πειραματικά είναι δυνατόν να αποδειχθεί η μείωση της τετανικής σύσπαση βελτιώνοντας τις συνθήκες ανάκτησης ενέργειας. Μια πρώτη προσέγγιση είναι η χρήση μιτοχονδριακού ενεργειακού υποστρωμάτος όπως, του ηλεκτρικού, με στόχο την επιτάχυνση της οξειδωτικής παραγωγής ενέργειας. Δεύτερον η εφαρμογή μέσων για την προστασία των μιτοχονδρίων από την αναπόφευκτη πρόσληψη  $Ca^{2+}$  ώστε να συνεχιστεί η αναπνευστική δραστηριότητα κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης.

#### *Εξάπλωση και έκταση της σύσπασης*

Οι κυτταρικοί μηχανισμοί, που συμβάλλουν στη σύσπαση επαναιμάτωσης φαίνεται να αποτελούν και τις κυριότερες αιτίες για θανατηφόρα βλάβη των κυττάρων, που συμβαίνει κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης. Εντούτοις υπολογισμοί σε μοντέλα δεν μπορούν να εξηγήσουν τη συνεχή γεωμετρία της ζωνοειδούς νέκρωσης, λόγω σύσπασης κατά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου [103]. Διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται να συμμετέχουν στην επέκταση της πρόωρης νέκρωσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, ότι η επικοινωνία μεταξύ

ισχαιμικών κυττάρων με τη μεσολάβηση των χασματικών συνάψεων, επιτρέπει την εξάπλωση της κυτταρικής βλάβης κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου [104]. Διάβαση του νατρίου μέσω των χασματικών συνάψεων των υπερσυσπασμένων κυττάρων στα γειτονικά τους και η επακόλουθη μεταβολή του  $Ca^{2+}$  μέσα από μια αντίστροφη λειτουργία του αντιμεταφορέα  $Na^+/Ca^{2+}$  μπορεί να οδηγήσει σε διάδοση της σύσπασης [105]. Επίσης, φαίνεται πιθανό ότι η μεταβολική σύζευξη συγχρονίζει το ρυθμό αναπλήρωσης του ATP στην επαναιμάτωση του μυοκαρδίου και ως εκ τούτου συγχρονίζει την ανάπτυξη της τετανικής σύσπασης. Εκτός από αυτούς τους χημικούς μηχανισμούς σύζευξης, τα κύτταρα, που τελούν υπό σύσπαση ανταλλάσσουν δυνάμεις με τα γειτονικά κύτταρα, που μπορούν να τα διαταράξουν. Αυτό συμβάλλει επίσης στην εξάπλωση της νέκρωσης.

#### *Όψιμη βλάβη επαναιμάτωσης*

Οι παθολογικοί μηχανισμοί, που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα εμφανίζονται κατά τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης. Άλλοι μηχανισμοί, που προέρχονται από το αγγειακό σύστημα και τα στοιχεία του αίματος δύνανται να επιδεινώσουν τη βλάβη επαναιμάτωσης και ενεργοποιούνται στις μετέπειτα ώρες. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι πρόσθετες αιτίες βλάβης καθιστούν, κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση, διαπερατή την ενδοθηλιακή επένδυση των αιμοφόρων αγγείων προκαλώντας έτσι διάμεσο οίδημα με την επαναρροή του αίματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε μυοκάρδιο που επαναιματώνεται, περιέρχονται σε ενεργοποιημένη κατάσταση, κατά την οποία εκφράζουν πρωτεΐνες δέσμησης, απελευθερώνουν κυτοκίνες και μειώνουν την παραγωγή του NO. Αυτό προωθεί τη δέσμηση, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων στον ιστό. Η



απελευθέρωση των ROS και πρωτεολυτικών ενζύμων από τα ενεργοποιημένα λευκά αιμοσφαίρια μπορούν να συμβάλουν στη βλάβη των μυοκυττάρων και αγγειακών κυττάρων. Αγγειακές στενώσεις προερχόμενες από προσκολλημένα λευκοκύτταρα μπορούν επίσης να προωθήσουν το φαινόμενο της μη επαναροής (no reflow), που ήδη ευνοείται από τη σύσπασση του ιστού και την αύξηση της πίεσης του διάμεσου οιδήματος. Φαίνεται, ότι αυτοί οι πρόσθετοι παθογενικοί μηχανισμοί της επαναιμάτωσης συμβάλλουν στην ανάπτυξη της έκτασης του μυοκαρδίου κυρίως κατά τις πρώτες 2 ώρες της επαναιμάτωσης, καθώς η νέκρωση πλησιάζει το τελικό μέγεθος της κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου.

#### 4. Μηχανισμοί προστασίας του μυοκαρδίου

Πριν από τη θρομβόλυση και την επαναγγείωση, στην κλινική θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου, αρκετές στρατηγικές, φαρμακολογικές ή επεμβατικές, διερευνήθηκαν με σκοπό τη μείωση του μέγεθος του εμφράγματος. Καμία από τις προτεινόμενες στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένων των υψηλών δόσεων βεραπαμίλης [65], δεν ήταν σε θέση να μειώσει σημαντικά μέγεθος του εμφράγματος. Μόνο σε συνδυασμό με την επαναιμάτωση, οι φαρμακολογικές και οι επεμβατικές στρατηγικές μπορούν να επηρεάσουν θετικά τους παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη του μεγέθους του εμφράγματος, δηλαδή, τη ροή του αίματος, τη θερμοκρασία, τον καρδιακό ρυθμό και ως εκ τούτου να επιβραδύνουν την ανάπτυξη του εμφράγματος και να διασώσουν το μυοκάρδιο στο τέλος όμως της επαναιμάτωσης.

Τις τελευταίες δεκαετίες, αρχικά σε πειραματικό στάδιο, περιγράφηκαν νέες παρεμβάσεις οι οποίες μπορούσαν να μειώσουν δραστικά την έκταση της νέκρωσης. Στις παρεμβάσεις αυτές ο καρδιακός μυς υποβάλλεται σε ένα ή περισσότερα μη θανατηφόρα επεισόδια ισχαιμίας (βραχείας διάρκειας από δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά) προ της παρατεταμένης στεφανιαίας απόφραξης ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο ενδογενείς καρδιοπροστατευτικούς μηχανισμούς. Στα αρχικά στάδια διερεύνησης αυτών των μηχανισμών η εφαρμογή των βραχέων ισχαιμικών επεισοδίων διενεργούνταν απευθείας στον καρδιακό μυ. Στην προκειμένη περίπτωση αποδίδεται ο όρος της *ισχαιμικής προετοιμασίας (Ischemic Preconditioning, IPC)*.

Ωστόσο η κλινική της εφαρμογή, περιορίζεται στην εκλεκτική περίπτωση της καρδιακής χειρουργική επέμβασης, στην οποία η χρονική στιγμή του ισχαιμικού

επεισοδίου μπορεί εύκολα να προβλεφθεί. Οι ασθενείς, που εμφανίζουν οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου απαιτούν μια θεραπευτική στρατηγική, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί κατά το χρόνο της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Από αυτή την άποψη, η μείωση της έκταση του εμφράγματος, κατά τη διενέργεια της διαδερμικής αγγειοπλαστικής, οδήγησε στα επόμενα χρόνια τη διακοπή επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου με βραχύβια εκ νέου επεισόδια απόφραξης στεφανιαίας, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται *μετα-ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic Postconditioning, IPost)*.

Τόσο το IPC όσο και το IPost απαιτούν μια επεμβατική εφαρμογή απευθείας στο μυοκάρδιο προκειμένου να επιτευχθεί καρδιοπροστασία, η οποίες σε ορισμένες κλινικές συνθήκες μπορεί να είναι μη πρακτικό και επιβλαβές. Για αυτόν το λόγο οι μελέτες προχώρησαν σε μια εναλλακτική και πιο προσιτή διαδικασία εφαρμογής του καρδιοπροστατευτικού ερεθίσματος σε όργανο ή ιστό απομακρυσμένο από την καρδιά, μια προσέγγιση που συνοψίζεται από το φαινόμενο της *ισχαιμικής (Remote preconditioning, RIPC) ή μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας εξ' αποστάσεως* αντίστοιχα (*Remote postconditioning, RIPost*).

#### **4.1. Ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic preconditioning, IPC).**

Ένα ισχυρός μηχανισμός για την προστασία του μυοκαρδίου από την ισχαιμία και κατά δεύτερον από τη βλάβη της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης είναι η ισχαιμική προετοιμασία ή προετοιμασία που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Murry et al., το 1986 . Ένα ή περισσότερα σύντομα επεισόδια μυοκαρδιακής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, πριν από μια παρατεταμένη ισχαιμία προστατεύει το μυοκάρδιο έναντι του εμφράγματος [106]. Αυτή η μείωση του μεγέθους του

εμφράγματος δεν οφείλεται σε βελτίωση της παράπλευρης ροής του αίματος στα στεφανιαία αγγεία και λειτουργεί μόνο σε συνδυασμό με την έγκαιρη επαναιμάτωση. Παράταση της διάρκειας της στεφανιαίας απόφραξης έως 3 ώρες καταργεί την προστασία από ισχαιμική προετοιμασία. Επιπλέον, το χρονικό πλαίσιο για την επιτυχή προστασία από την προετοιμασία είναι συγκεκριμένο. Αν η παρατεταμένη ισχαιμία λαμβάνει χώρα  $\geq 2$  ώρες μετά από το ερέθισμα της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της προετοιμασίας, η θετική επίδραση στη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος χάνεται, αλλά επαναδραστηριοποιείται 24-48 ώρες αργότερα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως καθυστερημένη ισχαιμική προετοιμασία (delayed ischemic preconditioning) [107].

Η IPC εφαρμόζεται σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, αλλά και σε διάφορα άλλα όργανα εκτός από την καρδιά, όπως ο εγκέφαλος, τα νεφρά, το ήπαρ, το πάγκρεας και οι σκελετικοί μύες [108]. Η καρδιοπροστατευτική δράση της IPC εκδηλώνεται όχι μόνο με μείωση του μεγέθους του εμφράγματος, αλλά και με βελτιωμένη ανάκτηση των συστατικών λειτουργιών κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης αρρυθμιών στα περισσότερα είδη, με εξαίρεση τους χοίρους, καθώς και με βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας [109, 110].

#### **4.1.1. Μηχανισμός της ισχαιμικής προετοιμασίας**

Η μετάδοση του σήματος της ισχαιμικής προετοιμασίας πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις: (1) οι πυροδότες ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια των κύκλων της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της προετοιμασίας και κινητοποιούν την προστατευτική διαδικασία, (2) οι μεσολαβητές δραστηριοποιούνται κατά τη διάρκεια της

προετοιμασίας ισχαιμίας/επαναιμάτωσης και/ή κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης ισχαιμίας και της μεταγενέστερης επαναιμάτωσης και επηρεάζουν την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος, (3) τα τελικά δραστικά μόρια είναι ενεργά κατά τη παρατεταμένη ισχαιμία και ακόλουθη επαναιμάτωση και επάγουν την τελική προστασία έναντι του κυτταρικού θανάτου [111].

### *Πυροδότες της IPC*

Οι πυροδότες της IPC μπορούν να υποδιαιρεθούν σε μηχανικά (θερμότητα ή διάταση) και σε βιοχημικά σήματα, τα οποία υποδιαιρούνται περαιτέρω σε εξαρτώμενα και ανεξάρτητα των υποδοχέων. Η αυξημένη απελευθέρωση της αδενοσίνης [112, 113], της βραδυκινίνης [114], των οπιοειδών [115, 116] και των προσταγλαδινών [117] κατά τη διάρκεια του κύκλου της σύντομης ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της προετοιμασίας, κινητοποιούν την προστασία μέσω των G-πρωτεϊνών. Άλλοι υποδοχείς-εξαρτώμενοι πυροδότες, όπως η ακετυλοχολίνη, η αγγειοτενσίνη, η ενδοθηλίνη και ενδεχομένως η νορεπινεφρίνη δε συμπεριλαμβάνονται στην ενδογενή καρδιοπροστασία από IPC, αλλά προστατεύουν όταν χορηγούνται εξογενώς. Εκτός από τους συγκεκριμένους υποδοχείς, η προετοιμασία προκαλείται επίσης από την εξωγενή χορήγηση των ROS, του NO, και του  $Ca^{2+}$ . Οι ROS εμπλέκονται επιπρόσθετα αιτιολογικά στην ενδογενή IPC [118]. Ο ρόλος του NO ως ενδογενή πυροδότη της IPC δεν είναι απόλυτα σαφής. Στους χοίρους [119] και τις απομονωμένες καρδιές κουνελιών [120], η IPC δεν αναστέλλεται από τον αποκλεισμό της NO συνθετάσης. Επίσης, σε διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη της ενδοθηλιακής NO συνθετάσης, η μυοκαρδιακή προστασία της IPC ισχαιμική προϋπόθεση δεν επηρεάζεται [121]. Εντούτοις, εξωγενής χορήγηση NO ενεργοποιεί την προετοιμασία [122]. Αυτές οι

αντιφάσεις μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός, ότι κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας ανεξάρτητοι οδοί της NO συνθετάσης συμβάλλουν σημαντικά στη σύνθεση NO [123].

#### *Ακολουθία διαμεσολάβησης της πρωτεΐνης κινάσης*

Η IPC διαμεσολαβείται από έναν καταρράκτη ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών [111]. Οι υποδοχείς-εξαρτώμενοι πυροδότες αδενοσίνη και οπιοειδή συνδέονται μέσω των ανασταλτικών G-πρωτεϊνών, μεταξύ των άλλων, με τη φωσφολίπαση C. Η φωσφολίπαση C καταλύει την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, που περιέχουν ινοσιτόλη σε τριφωσφορικό άλας και διακυλογλυκερόλη (DAG), που στη συνέχεια προωθεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης G. Για την επαγωγή της IPC από τον εξαρτώμενο υποδοχέα βραδυκινίνης και οπιοειδών, η οδός ενεργοποίησης των κινασών χαρακτηρίζεται από μια έντονη ποικιλομορφία και περιλαμβάνει επίσης την ενεργοποίηση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης κινάσης [124]. Το NO διεγείρει τη γουανιλική κυκλάση για να μετατρέψει την τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) στον ενδοκυτταρικό δεύτερο αγγελιοφόρο, την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP), που ενεργοποιεί με τη σειρά της την πρωτεϊνική κινάση G [120]. Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιείται με την IPC και μέσω της ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων [125]. Η πρωτεϊνική τυροσίνη κινάση ενεργοποιείται παράλληλα, ή κατόπιν της ενεργοποίησης της κινάσης C. Επίσης κινητοποιούνται άλλες δύο ομάδες μιτογόνων επαγόμενων κινασών η p38 και ERK 1/2.

### *Χρονικό σημείο επέμβασης των κινασών*

Αρχικά είχε θεωρηθεί, ότι η ενεργοποίηση της κινάσης, που παρατηρήθηκε μετά τους κύκλους της IPC [126, 127] και κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης ισχαιμίας [128, 129] ήταν σημαντικές για την προστασία από την IPC. Πρόσφατα αναφέρθηκε από τους Hausenloy et al., η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) και ERK 1/2 στις αρχές της επαναιμάτωσης μετά την ισχαιμία ως αποτέλεσμα της IPC [130]. Η αλληλεπίδραση της AKT και ERK 1/2 συγκλίνουν στην ενεργοποίηση της κινάσης p70S6, η οποία δρα αντιαποπτωτικά, αλλά και στην φωσφορυλίωση με συνέπεια την αναστολή της συνθετάσης της κινάσης γλυκογόνου 3β (GSK3β), με αποτέλεσμα την αύξηση του κατώτερου ορίου για το άνοιγμα των μιτοχονδριακών πόρων διαπερατότητας (mPTP) [131, 132]. Οι Hausenloy et al. καθώς και Downey & Cohen προτείνουν, ότι η IPC στοχεύει συγκεκριμένα στη βλάβη επαναιμάτωσης [133, 134].

### *Επιπρόσθετα αγγελιοφόρα μόρια*

Υπάρχουν στοιχεία για την εμπλοκή του TNF-α στην μετάδοση του σήματος της IPC. Χορήγηση TNF-α μιμείται της προετοιμασίας σε ποντίκια [135], σε απομονωμένες καρδιές αρουραίων [136, 137], σε καρδιές κουνελιών [138], ενώ σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, με έλλειψη TNF-α καταργείται η ενδογενής προστασία τόσο της οξείας [135], όσο και της όψιμης IPC [139]. Ωστόσο, ο βαθμός μείωσης του μεγέθους του εμφράγματος εξαρτάται από τη δόση του TNF-α. Προστασία από τον TNF-α παρατηρήθηκε μόνο σε χαμηλές δόσεις, ενώ κατά την περαιτέρω αύξηση των δόσεων του TNF-α εξασθενείται η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος [137], γεγονός που αντικατοπτρίζει αμφίδρομες ιδιότητες του TNF-α: Ο TNF-α δρα ως αγγελιοφόρο μόριο σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά το

ίδιο προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη των κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η προστασία στο έμφραγμα από τον εξωγενή TNF-α εξαρτάται από ένα μονοπάτι σηματοδότησης σφιγκολιπιδίων [137] περιλαμβάνοντας και ελεύθερες ρίζες. Με τον εξωγενή TNF-α, ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών αυξήθηκε και η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος από εξωγενή TNF-α αναστάληκε από την αντιοξειδωτική N-2-μερκαπτοπροπιονυλική γλυκίνη [136].

Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν, ότι η κοννεξίνη 43 (connexin 43, Cx43) αποτελεί βασικό στοιχείο για τη μετάδοση του σήματος της μυοκαρδιακής προστασίας κατά την IPC [140]. Η Cx43 είναι η κυρίαρχη κοννεξίνη στις κοιλίες και απαντάται κυρίως στο σαρκείλημα, όπου έξι μόρια κοννεξίνης συνενώνονται σε ένα κοννεξόνιο (connexon) ή ημικανάλι. Συστάδες απέναντι τοποθετημένων συνδετήρων από γειτονικά κύτταρα δημιουργούν τις χασματικές συνάψεις, οι οποίες είναι δομικά στοιχεία στη σύζευξη των κυττάρων. Τα μη συνδετικά ημικανάλια συμβάλλουν στη ρύθμιση του όγκου [141], την απελευθέρωση του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και  $\text{NAD}^+$  (νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) από το κυτταρόπλασμα [142] και την ενεργοποίηση των βιοχημικών οδών επιβίωσης των κυττάρων [143]. Το σημείο οριοθέτησης των συνδετήρων εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της Cx43 και ανάλογα με το σημείο της φωσφορυλίωσης στο μόριο, μπορεί να μειωθεί ή να αυξηθεί τη διαπερατότητα των πόρων [144, 145]

Η Cx43 αποτελεί στόχο πολλών κινασών συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής κινάσης A, C, G, των κινασών της τυροσίνης και καζεΐνης, μιτογόνων πρωτεϊνικών κινασών, αλλά και πρωτεϊνικών φωσφατασών. Η παρατεταμένη ισχαιμία μειώνει τη φωσφορυλίωση της Cx43 και συνδέεται με το άνοιγμα των Cx43-σχηματιζόμενων συνδετήρων και τη μετατόπιση της Cx43 μακριά από τις χασματικές συνάψεις προς την ελεύθερη μεμβράνη του πλάσματος ή το



κυτταρόπλασμα. Η IPC εξασθενεί την αποφωσφορυλίωση της Cx43 που προκαλείται από την ισχαιμία [146-148]. Η διατηρημένη φωσφορυλίωση λόγω IPC μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη σύνδεση της Cx43 με κινάσες, όπως η πρωτεΐνη κινάση C και p38 ενεργοποιημένες μιτογόνες πρωτεϊνικές κινάσες [148]. Άνοιγμα των Cx43 δομημένων καναλιών κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης μετά την ισχαιμία μπορεί να επιτρέψει την εξάπλωση του λεγόμενου παράγοντα θανάτου, κατά πάσα πιθανότητα ιόντων νατρίου, προωθώντας έτσι την πορεία προς τον κυτταρικό θάνατο [149, 150]. Περαιτέρω στοιχεία για τον κεντρικό ρόλο της Cx43 στην IPC προέρχονται από πειράματα σε ποντίκια με ετερόζυγη ανεπάρκεια Cx43. Σε αυτά τα ποντίκια η καρδιοπροστασία από IPC είχε απωλεσθεί [151, 152]. Οι χασματικές συνάψεις από Cx43 δεν απαιτούνται για την προστασία από IPC, μιας και η απώλεια της προστασίας έχει επίσης παρατηρηθεί μετά από προσομοίωση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε μυοκύτταρα απομονωμένα από Cx43-ανεπαρκή ποντίκια [153].

Ο μετατροπέας σημάτων και εκκινητής της μεταγραφής 3 (STAT3), ο οποίος μετατρέπει ερεθίσματα στρες από τη μεμβράνη πλάσματος στον πυρήνα, οδηγώντας κατά συνέπεια σε αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων, περιλαμβάνεται επίσης στην προστασία ενάντια στο έμφραγμα μετά από την ισχαιμία/επαναιμάτωση [154-156]. Η IPC προκαλεί μια αύξηση στη πρωτεϊνική συγκέντρωση του STAT3 στον πυρήνα [157]. Η φωσφορυλίωση του STAT3 και της σύνδεσης του στις περιοχές στόχους του STAT3 ενισχύεται μετά από την IPC [158]. Η σημασία του STAT3 για την IPC είναι τελικά εμφανής από ποντίκια με μια συγκεκριμένη καρδιακή διαγραφή STAT3, στα οποία η μείωση μεγέθους του εμφράγματος χάνεται [159].

### *Ο ρόλος των μιτοχονδρίων*

Τα μιτοχόνδρια ενεργούν ως ενισχυτές σημάτων. Μερικοί υποδοχείς-εξαρτώμενοι πυροδότες όπως η ακετυλοχολίνη και η βραδυκίνη, όχι όμως η αδενosίνη, εξαρτώνται από την απελευθέρωση των ROS από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων [115]. Υποθετικά, αυτή η απελευθέρωση των ROS εξαρτάται από την ενεργοποίηση των μιτοχονδριακών ATP-εξαρτώμενων καναλιών καλίου [160, 161]. Οι ROS με τη σειρά τους ενεργοποιούν, μέσω της πρωτεϊνικής οξειδωσης, τις προαναφερθείσες πρωτεϊνικές κινάσες. Αυτή η θετική ανατροφοδότηση λειτουργεί όπως ένας ενισχυτής. Προϋπόθεση για την παραγωγή των ROS, είτε με έναν αγωνιστή των ATP-εξαρτώμενων καναλιών καλίου, είτε με IPC, είναι η υποχρεωτική παρουσία Cx43 στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη [153, 162].

### *Τελικοί παράγοντες της IPC*

Τα μιτοχόνδρια θεωρούνται ο τελευταίος τροχός του φαινομένου της IPC [163]. Όλες οι κινάσες που περιλαμβάνονται στην IPC συγκλίνουν στη φωσφορυλίωση και καθ'αυτόν τον τρόπο στην αναστολή της GSK3β. Η αναστολή της GSK3β αυξάνει το κατώτατο όριο για το mPTP, που ανοίγει [132, 164] κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Το άνοιγμα του mPTP επιτρέπει την είσοδο των ιόντων και νερού στα μιτοχόνδρια, προκαλώντας μιτοχονδριακή διόγκωση, πιθανή μιτοχονδριακή κατάρρευση μεμβρανών και αποτυχία ενεργειακού εφοδιασμού των μιτοχονδρίων. Τέλος, με τη ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθερώνεται το κυτόχρωμα C και επάγεται η απόπτωση [165].

Ένας άλλος στόχος της IPC είναι η κυτταρική διόγκωση κατά την αλληλεπίδραση με την αυξημένη ευθραυστότητα του κυτταροσκελετού. Εκσεσημασμένη διόγκωση των κυττάρων προκαλεί ρήξη του σαρκειλήμματος και νέκρωση. Η διόγκωση των

καρδιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης μειώνεται με την IPC [166], αλλά ο μηχανισμός ρύθμισης του όγκου είναι ακόμα ασαφής [167]. Επιπλέον, η IPC αυξάνει τη σταθερότητα του κυτταροσκελετού με μείωση του εκφυλισμού των πρωτεϊνών που προάγεται μια καλπαΐνη [168].

Τέλος, η βελτίωση της επαναπρόσληψης του ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο μειώνει τις υπερβολικές και ασυντόνιστες συστολές των μυοϊνιδίων, αμέσως μετά την επαναιμάτωση. Με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης G, η φωσφολαμβάνη φωσφορυλιώνεται και ο ενδογενής αποκλεισμός της επαναπρόσληψης ασβεστίου υποχωρεί [169].

#### **4.1.2. Όψιμη ισχαιμική προετοιμασία/Δεύτερο παράθυρο προστασίας (Delayed ischemic preconditioning/Second window of protection, SWOP)**

Ενώ η προστατευτική επίδραση της οξείας IPC εκπνέει μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, μια καθυστερημένη προστασία έναντι του εμφράγματος του μυοκαρδίου εμφανίζεται περίπου 24 ώρες αργότερα [107, 111]. Αυτή η όψιμη IPC, ή αλλιώς δεύτερο παράθυρο προστασίας (second window of protection, SWOP) είναι λιγότερο ισχυρή από την οξεία IPC, αλλά διαρκεί για αρκετές ημέρες. Η προστασία εκδηλώνεται με μείωση του μεγέθους του εμφράγματος, αλλά και με τη βελτίωση της ανάκτησης των συστατικών λειτουργιών [170]. Το SWOP εξαρτάται από τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών (ενδοθηλιακή NO συνθετάση, κυκλοοξυγενάση-2, υπερμαγγανική δισμουτάση), δηλαδή από μια τροποποιημένη πρωτεϊνική έκφραση [171-174].

Οι εκκινητές του SWOP είναι σχεδόν πανομοιότυποι με εκείνους του IPC, δηλαδή η αδενοσίνη, τα οπιοειδή, οι ROS και το NO [170]. Επίσης, παρόμοια με την οξεία

IPC, η ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη πρωτεϊνικών κινασών, που περιλαμβάνουν την κινάση C, τη τυροσινική κινάση και μιτογόνες κινάσες. Επίσης η κινητοποίηση ενός καταρράκτη μεταγραφής (JAK-STAT, NF-κB) τροποποιεί την πρωτεϊνική έκφραση [155]. Η επαγωγίμη NO συνθετάση είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη με αυξημένη έκφραση [175]. Έτσι, η ενδοθηλιακή NO συνθετάση παράγει NO ως πυροδότη, το οποίο στη συνέχεια λειτουργεί ως μεσολαβητής μετά την αυξημένη έκφραση της επαγωγίμης NO συνθετάσης [171]. Αυξημένη έκφραση παρουσιάζει, επίσης η κυκλοοξυγενάση-2, δηλαδή υπάρχει συμμετοχή των προσταγλανδινών, όπως στη IPC [173, 174] και η υπερμαγγανική δισμουτάση, που μειώνει την τοξικότητα των ROS [172] στην οποία ενέχεται επίσης η αυξημένη έκφραση της αλδόξης αναγωγάσης [176]. Αν και η προστασία από το SWOP δεν είναι τόσο έντονη όσο στην IPC, είναι ένας ενδιαφέρων στόχος για τη φαρμακευτική πρόκληση της, επειδή το διάστημα προστασίας διαρκεί πολύ περισσότερο.

#### **4.2. Μετα-ισχαιμική προετοιμασία (Ischemic postconditioning, IPost)**

Μερικά χρόνια πριν, ένα άλλος μηχανισμός ενδογενούς μυοκαρδιακής προστασίας περιγράφηκε από τους Zhao et al. [177]. Σε σκύλους, τρεις κύκλοι ισχαιμίας/επαναιμάτωσης διάρκειας 30 δευτερολέπτων αμέσως με την έναρξη της επαναιμάτωσης επέφερε μείωση του μέγεθος του εμφράγματος, παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στην IPC. Η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος από την IPost ήταν επίσης ανεξάρτητη από τη στεφανιαία ροή. Το φαινόμενο της IPost έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα είδη συμπεριλαμβανομένων των ποντικών, των επίμυων, κόνικλων, χοίρων και κυρίως στον άνθρωπο [111]. Το χρονικό

πλαίσιο για την επιτυχή προστασία του μυοκαρδίου από IPost είναι πιο περιορισμένο από εκείνο της IPC. Καθυστέρηση λίγων δευτερολέπτων μέχρι αρκετών λεπτών (ανάλογα με την καρδιακή συχνότητα) μεταξύ της έναρξης της επαναιμάτωσης και της εφαρμογής των κύκλων της IPost [178, 179] ή μη κατάλληλος αριθμός των κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [180] μπορεί να άρει την προστατευτική επίδραση. Επίσης παρατηρήθηκε, ότι η διάρκεια της προηγηθέντας παρατεταμένης ισχαιμίας καθορίζει το βαθμό μείωσης της έκτασης του εμφράγματος σε αρουραίους. Έτσι, αύξηση της ισχαιμίας από τα 45 λεπτά στα 90 λεπτά μείωσε σταδιακά την προστασία από την IPost και ενώ η προστασία απωλέσθηκε με 120 min ισχαιμίας [181]. Προφανώς, όταν το μέγεθος του εμφράγματος κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής φάσης, φθάνει σε ένα μέγιστο πλατώ επίπεδο το IPost δε μειώνει τη βλάβη επαναιμάτωσης. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η ίδια μελέτη αναφέρει, ότι το IPost μετά από μικρή διάρκεια ισχαιμίας (15 και 30 λεπτά) αύξησε το μέγεθος του εμφράγματος. Η IPost καθυστερεί ανάπτυξη του εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης και έτσι επεκτείνει το παράθυρο για παρεμβάσεις. Σε πρωτόκολλο με σκύλους, το μέγεθος του εμφράγματος στις 3 ώρες της επαναιμάτωσης, είχε φτάσει στο 77% του τελικού μεγέθους του εμφράγματος, μετά από 24 ώρες επαναιμάτωσης. Αντίθετα, με την IPost, το μέγεθος του εμφράγματος στις 3 ώρες της επαναιμάτωσης μετρήθηκε στο 50% του τελικού [182].

#### 4.2.1. Μηχανισμός της μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας

Η μετάδοση του σήματος της IPost είναι ακόμα υπό διερεύνηση, αλλά παρόμοια στοιχεία όπως με της IPC, έχουν εντοπιστεί [111]. Η αδενοσίνη [183] και η βραδυκινίνη [184] συγκαταλλέγονται στους πυροδότες, τα ATP εξαρτώμενα μιτοχονδριακά κανάλια καλίου [185, 186], οι ROS [185] και η πρωτεΐνη κινάση C [185] εμπλέκονται επίσης. Όμοια με τις παρατηρήσεις στην IPC, η καρδιακά στοχευμένη εξάντληση των STAT3 σε ποντίκια καταργεί την IPost, 3 × 10s κύκλων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Ωστόσο, ένα ισχυρότερο ερέθισμα με 5 × 10s κύκλους ήταν επαρκές για την πρόκληση της προστασίας [187], γεγονός που υποδηλώνει μονοπάτια μεταγωγής σήματος με διαφορετικά κατώτατα όρια ενεργοποίησης. Οι Hausenloy και Yellon πρότειναν, ότι ένα συγκεκριμένο μοτίβο κινασών, το λεγόμενο κινάσες βλάβης επαναιμάτωσης και διάσωσης (Reperfusion Injury Salvage Kinases, RISK), συμπεριλαμβανομένου της φωσφατιδυλικής-3-ινοσιτόλης κινάσης, AKT, ERK1/2, p70S6 και της ενδοθηλιακής συνθετάσης NO, ενεργοποιούνται από την IPost στην πρώιμη επαναιμάτωση και ότι αυτή η ενεργοποίηση είναι υποχρεωτική για την προστασία του μυοκαρδίου [188]. Μία παρόμοια ενεργοποίηση της AKT και ERK1/2 παρατηρήθηκε στην πρώιμη επαναιμάτωση μετά από την IPC [133, 189]. Η ενεργοποίηση των RISK συγκλίνει στην αναστολή της φωσφορυλίωσης και συνεπώς αναστολής της GSK3β. Η αναστολή της GSK3β αυξάνει το κατώτατο όριο για το άνοιγμα των mPTP [131, 132] και αυτό συνδέεται με αυξημένη μιτοχονδριακή και κυτταρική επιβίωση. Σε μελέτη κινητοποιώντας τις RISK, η IPost αύξησε πράγματι τη φωσφορυλίωση των AKT και ERK1/2 κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, αλλά απέτυχε να μειώσει μέγεθος του εμφράγματος σε αναισθητοποιημένους χοίρους [190].

Το γεγονός ότι οι IPC και IPost μοιράζονται κοινές βιοχημικές οδούς, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτές οι μηχανισμοί είναι πράγματι όμοιοι. Πρόσφατα αποτελέσματα από μελέτες έδειξαν διαφορές στη μετάδοση του σήματος: προστασία του μυοκαρδίου μετά εφαρμογή IPC απαιτεί την ύπαρξη Cx43 και ποντίκια με έλλειψη Cx43 δεν μπορούν να προστατευθούν με την IPC [151, 152]. Αντίθετα, η IPost εξακολουθεί να είναι λειτουργικό σε Cx43-ανεπαρκή ποντίκια και η συνακόλουθη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος είναι στον ίδιο βαθμό όσο στα άγριου τύπου ποντίκια [191].

#### **4.3. Ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση (*Remote Ischemic Preconditioning, RIPC*)**

Μια εναλλακτική στρατηγική είναι η εφαρμογή του καρδιοπροστατευτικού ερεθίσματος σε όργανο ή ιστό απομακρυσμένα από την καρδιά, προσέγγιση που συνοψίζεται στο φαινόμενο της εξ αποστάσεως ισχαιμικής προετοιμασίας (RIPC), μια ιδέα που αρχικά επινοήθηκε από τους Przyklenk et al., το 1993 [192]. Οι μελετητές έκαναν την ενδιαφέρουσα ανακάλυψη, ότι προκαλώντας σύντομα επεισόδια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στην περιοχή άρδευσης της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που προέκυπτε από την απόφραξη του αριστερού πρόσθιου κατιόντα [192]. Αυτή η μορφή ενδοκαρδιακής προστασίας επεκτάθηκε αργότερα σε μη καρδιακά όργανα, με την παρατήρηση ότι μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου θα μπορούσε να μειωθεί με την πρόκληση σύντομη ισχαιμίας και επαναιμάτωσης είτε στα νεφρά [193], είτε στο λεπτό έντερο [194]

αμέσως πριν από την παρατεταμένη απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας [195, 196].

Αυτές οι αρχικές πειραματικές μελέτες βασίζονταν στη χρήση ενός μη καρδιακού οργάνου για το απομακρυσμένο ερέθισμα, η οποία απαιτεί μια επεμβατική διαδικασία για να εφαρμοστεί η IPC. Ωστόσο, για την κλινική εφαρμογή αυτής της καρδιοπροστατευτικής στρατηγικής ήταν απαραίτητη μια λιγότερο επεμβατική μέθοδος. Τα πρώτα βήματα προς αυτή την κατεύθυνση έγιναν από τους Birnbaum et al., το 1997, με την παρατήρηση, ότι ο βραχύς αποκλεισμός της ροής του αίματος προς τους σκελετικούς μύες των κάτω άκρων και η βηματοδότηση του γαστροκνήμιου μυός προ απόφραξης στεφανιαίας αρτηρίας ήταν σε θέση να μειώσει την επακόλουθη έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά 65%, στην καρδιά κόνικλου [197]. Μια λιγότερο επεμβατική μέθοδος, που χρησιμοποιεί την ισχαιμία οπίσθιου άκρου, ως ένα απομακρυσμένο ερέθισμα της IPC, αναφέρθηκε από τους Oxman et al., [198] οι οποίοι εφαρμόζοντας τουρνικέ στο οπίσθιο άκρο προκαλώντας 10λεπτη ισχαιμία άκρου ανέφεραν μείωση των αρρυθμιών επαναιμάτωσης σε καρδιά επίμυος μετά από παρατεταμένη ισχαιμία.

#### **4.3.1. Μηχανισμός της εξ' αποστάσεως ισχαιμικής προετοιμασίας**

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ένα επεισόδιο βραχείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης ενός οργάνου ή ιστού προσφέρει προστασία σε μια ακόλουθη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε ένα μακρινό όργανο ή έναν ιστό παραμένει προς τον παρόν ασαφής. Μελέτες προτείνουν ότι μερικά από τα βιοχημικά μονοπάτια και την ακολουθία μεταγωγής σημάτων, που ενεργοποιούνται στα καρδιακά κύτταρα πιθανόν να είναι παρόμοια με αυτά των μηχανισμών της IPC και



IPost [199]. Ωστόσο η μηχανιστική σύνδεση του απομακρυσμένου οργάνου ή ιστού με την καρδιά είναι αδιευκρίνιστη, παρόλο τις διάφορες κατά καιρούς προτάσεις που έχουν διατυπωθεί. Γεγονός όμως είναι, ότι οι περισσότερες μελέτες αναγνωρίζουν τρεις κύριους άξονες του φαινομένου αυτού και συγκεκριμένα χυμικούς, νευρικούς παράγοντες και μια συστηματική αντίδραση [200].

#### **4.3.1.1. Χυμικοί παράγοντες**

Το εύρημα, ότι μια περίοδος επαναιμάτωσης του προπονηθέντος οργάνου ή ιστού απαιτείται σε συνδυασμό με τη βραχεία ισχαιμία για την πρόκληση της προστασίας, οδήγησε στην υπόθεση, ότι η περίοδος επαναιμάτωσης χρησιμεύει σαν «ξέπλυμα» της ουσίας ή του χυμικού παράγοντα, που εκλύεται, έτσι ώστε να μεταφερθεί στην καρδιά με την κυκλοφορία [193, 194]. Αυτή η υπόθεση παγιώθηκε από μια μελέτη, που αναφέρει ότι το αίμα που λήφθηκε από κόνικλο στο οποίο εφαρμόστηκε ταυτόχρονα IPC στην καρδιά και στο νεφρό, μπόρεσε να μειώσει το μέγεθος μιας μυοκαρδιακής βλάβης κατά 77%, όταν μεταγγίσθηκε σε κόνικλο μάρτυρα, υποδεικνύοντας έτσι τη μεταφορά ενός ή περισσότερων χυμικών καρδιοπροστατευτικών παραγόντων [201]. Οι ίδιοι μελετητές κατέδειξαν, ότι η στεφανιαία απορροή απομονωμένης καρδιά κόνικλων, που αντιμετωπίστηκε με ένα πρωτόκολλο IPC, μπόρεσε να μειώσει την έκταση του εμφράγματος κατά 69% [202] και βελτίωσε την αποκατάσταση τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας [203], όταν χρησιμοποιήθηκε για την άρδευση απομονωμένης καρδιάς μάρτυρα κόνικλου. Οι μελετητές δεν παρατήρησαν διαφορά στις συγκεντρώσεις, είτε της αδενοσίνης είτε της νοραδρεναλίνης στη στεφανιαία απορροή και των δύο

απομονωθέντων καρδιών καταλήγοντας στο συμπέρασμα, ότι δεν αποτελούν χυμικούς καρδιοπροστατευτικούς παράγοντες [202].

Πειστική απόδειξη υπέρ ενός χυμικού μηχανισμού της RIPC παρείχε μια πειραματική μελέτη των Konstantinon et al., [204]. RIPC άκρου ενός χοίρου, στον οποίο είχε προηγηθεί μεταμόσχευση καρδιάς μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος στην μη νευρωμένη καρδιά, αποδεικνύοντας, ότι ένας χυμικός μεσολαβητής ήταν υπεύθυνος για την προστασία από την RIPC, αν και ένα κεντρομόλο αισθητήριο νεύρο ως οδός επικοινωνίας από το άκρο δεν μπορεί να αποκλειστεί [204]. Σε παρόμοιου τύπου μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από τους Kristiansen et al., φάνηκε, ότι καρδιές που αφαιρέθηκαν από επίμυ, στον οποίο είχε εφαρμοστεί RIPC υπέστησαν μικρότερο έμφραγμα, όταν υποβλήθηκαν σε παρατεταμένη ισχαιμία/επαναιμάτωση σε διάταξη Langendorff [205]. Σε περαιτέρω μελέτες ερευνήθηκε ο ρόλος ενδογενών ουσιών, όπως των οπιοειδών, των ενδοκανναβινοειδών, η απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία και η ακόλουθη διέγερση ενδοκυτταρικών καρδιοπροστατευτικών μηχανισμών [206, 207].

### *Οπιοειδή*

Η συμμετοχή των οπιοειδών στη μεταγωγή σήματος της RIPC αναφέρθηκε αρχικά από τους Patel et al., [206] το 2002. Απέδειξαν, ότι ο μη ειδικός ανταγωνιστής υποδοχέων οπιοειδών, η ναλοξόνη, ήταν σε θέση να αναστείλει τον περιορισμό του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που παρείχε η εντερική RIPC στον επίμυ [206]. Οι Dickson et al., [208] ενέπλεξαν τη δέσμευση των υποδοχέων οπιοειδών στην προστατευτική επίδραση της στεφανιαίας απορροής από προετοιμασμένες καρδιές αρουραίων στον ισχαιμικό εντερικό ιστό. Μεταγενέστερες πειραματικές μελέτες έχουν αναγνωρίσει το d1-υποδοχέα οπιοειδών στην RIPC άκρου στους

χοίρους [209] και στην RIPC της υπο-νεφρικής αορτής επίμυος [210]. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη απέτυχε να παράσχει αποδείξεις για την εμπλοκή του d1-οπιοειδών υποδοχέων και αντί αυτού εμπλέκει τον κ-υποδοχέα οπιοειδών στο RIPC, μετά από εφαρμογή του ερεθίσματος της RIPC στη μηριαία αρτηρία για μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε καρδιές επίμυων [211]. Έχει προταθεί, ότι τα ενδογενή οπιοειδή, που παράγονται κατά τη φάση του ερεθίσματος της RIPC στο απομακρυσμένο όργανο εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και δρουν άμεσα στο μυοκάρδιο προσφέροντας καρδιοπροστασία [206], αν και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διερευνηθεί η συνεισφορά των διαφορετικών υποτύπων υποδοχέων στην RIPC.

#### *Ενδοκανναβινοειδή*

Σε προηγούμενες μελέτες καταδεικνύεται η συμμετοχή της δέσμευσης του CB2 ενδοκανναβινοειδούς υποδοχέα του ενδογενούς συστήματος των κανναβινοειδών κατά την προστασία από τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης [212]. Μια πρόσφατη πειραματική μελέτη εμπλέκει την ενδογενή ενεργοποίηση του υποδοχέα CB2 στην αποτελεσματική μείωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου της RIPC με εντερικό ερέθισμα, με τη χρήση φαρμακευτικού CB2 ανταγωνιστή για την αναστολή της προστασίας της RIPC [207]. Οι συγγραφείς πρότειναν, ότι τα ενδοκανναβινοειδή, που παράγονται κατά την εντερική ισχαιμία μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να ενεργοποιήσουν τους CB2 υποδοχείς στο μυοκάρδιο.

#### 4.3.1.2. Νευρικοί παράγοντες

Μία από τις πρώτες μελέτες της RIPC παρείχε ενδείξεις, ότι ένα νευρικό μονοπάτι μπορεί να αποτελεί τη βάση της καρδιοπροστασίας, που προκαλείται από την απομακρυσμένη προετοιμασία ενός μη καρδιακού οργάνου. Οι Gho et al., [194] έδειξαν, ότι η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που προκαλείται από τη σύντομη ισχαιμία και επαναιμάτωση της πρόσθιας μεσεντέριας αρτηρίας θα μπορούσε να ανασταλεί με την παρουσία του ανταγωνιστή γαγγλίων, εξαμεθωνίου. Η υπόθεση για μια νευρική οδό αναπτύχθηκε περαιτέρω με την πρόταση, ότι ενδογενείς ουσίες, όπως η αδενοσίνη [213], η βραδυκινίνη [214], η CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) [215], που απελευθερώνονται κατά την RIPC απομακρυσμένου οργάνου, διεγείρει τις προσαγωγές νευρικές ίνες, οι οποίες στη συνέχεια μεταβιβάζουν το ερέθισμα στις απαγωγές νευρικές ίνες, που καταλήγουν στο μυοκάρδιο και προσδίδουν καρδιοπροστασία.

##### *Αδενοσίνη*

Η αδενοσίνη εμπλέκεται ως εν δυνάμει διαμεσολαβητικός παράγοντας της καρδιοπροστασίας κατά την εφαρμογή της RIPC, γεγονός που αποδεικνύεται από τη χορήγηση του μη ειδικού ανταγωνιστή των υποδοχέων αδενοσίνης, 8-σουλφοφενυλοθεοφυλλίνης (8-SPT), πριν από πρωτόκολλο RIPC σε νεφρά κόνικλων, με συνέπεια την αναστολή της μείωσης του μεγέθους του εμφράγματος του μυοκαρδίου [213]. Σε άλλη μελέτη από τους Takaoka et al., [216] αποδείχθηκε, ότι η χορήγηση 8-SPT, μετά το νεφρικό ερέθισμα της RIPC είχε επίσης τη δυνατότητα να εμποδίσει την καρδιοπροστασία, υποδηλώνοντας ότι η δέσμευση

του μυοκαρδιακού υποδοχέα είναι απαραίτητη για την καρδιοπροστασία, διαπίστωση, η οποία επίσης υποστηρίχθηκε από την εύρεση αυξημένων επιπέδων αδενοσίνης στο πλάσμα σε δείγματος αίματος από την καρωτιδική αρτηρία των κόνικλων, που είχαν υποβληθεί σε RIPC, σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν προετοιμασία μόνο με IPC [216]. Οι Ding et al., αργότερα απέδειξαν, ότι η τομή τμήματος νεφρικού νεύρου καταργεί την καρδιοπροστατευτική δράση, που προκαλείται από ένα ερέθισμα προετοιμασίας νεφρικής ισχαιμίας παρέχοντας ισχυρές αποδείξεις για ένα νευρικό μονοπάτι [217]. Στη συνέχεια ανέφεραν, ότι κατά τη διάρκεια της φάσης του ερεθίσματος της νεφρικής προετοιμασίας, η εκφόρτιση των νεφρικών προσαγωγών νεύρων αυξήθηκε και ότι αυτή η αυξημένη νευρική δραστηριότητα μπορούσε να ανασταλεί από την 8-SPT [217]. Περαιτέρω στοιχεία, που συνδέουν την αδενοσίνη σε μια νευρική οδό της καρδιοπροστασίας δόθηκαν από τους Liem et al., [218] οι οποίοι μετά την επιβεβαίωση, ότι η προ της RIPC χορήγηση του εξαμεθώνιου ή 8-SPT, που προκαλείται από σύντομη ισχαιμία και επαναιμάτωση του μεσεντερίου, καταργεί τη μείωση του μεγέθους εμφράγματος του μυοκαρδίου, απέδειξαν ότι η τοπική χορήγηση της αδενοσίνης στο αγγειακό πλέγμα του μεσεντερίου προσέδωσε επίσης καρδιοπροστασία κατά τρόπο, που ήταν εξαρτώμενη από το εξαμεθώνιο [218]. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση, ότι βραχεία επεισόδια ισχαιμίας του λεπτού εντέρου μπορούν να δημιουργήσουν αδενοσίνη, η οποία ενεργοποιεί μεσεντέρια προσαγωγά αισθητήρια νεύρα. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές αναφέρουν, ότι η χορήγηση 8-SPT μετά την RIPC ήταν επίσης σε θέση να εμποδίσει την καρδιοπροστασία, γεγονός, που υποδηλώνει ότι η δέσμευση της αδενοσίνης στους υποδοχείς του μυοκαρδίου απαιτείται επίσης για την προστασία του.

Μια επόμενη πειραματική μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε η ισχαιμία άκρου ως ερέθισμα RIPC, επιβεβαίωσε τη μεσολάβηση της αδενοσίνης στη νευρική οδό [219]. Οι Dong et al., [219] έδειξαν, ότι η επίδραση της RIPC στον περιορισμό του εμφράγματος του μυοκαρδίου αναστάλθηκε με την αφαίρεση του μηριαίου νεύρου, γεγονός, που υποδηλώνει ότι μία άθικτη νευρική οδός απαιτείται για τα προσαγωγα νευρικά σήματα από τα προετοιμασμένα άκρα. Η ενδοαρτηριακή έγχυση αδενοσίνης διαπιστώθηκε επίσης ότι μειώνει το έμφραγμα του μυοκαρδίου [219].

### *Βραδυκινίνη*

Οι Schoemaker και van Heijningen [214] παρουσίασαν, ότι η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος του μυοκαρδίου, που προκλήθηκε από σύντομη ισχαιμία-επαναιμάτωση της μεσεντερικής αρτηρίας, μπορούσε να καταργηθεί από προηγούμενη χορήγηση του HOE140, ενός συγκεκριμένου ανταγωνιστή των υποδοχέων B2 βραδυκινίνης. Επιπλέον διαπίστωσαν, ότι η ενδοαρτηριακή μεσεντερική χορήγηση της βραδυκινίνης ήταν επίσης σε θέση να επάγει καρδιοπροστασία κατά τέτοιο τρόπο, που εξαρτάτο από γαγγλιακό αποκλεισμό με εξαμεθώνιο [214]. Οι ερευνητές υποστήριξαν, ότι η βραδυκινίνη που παράγεται κατά τη διάρκεια της εξ' αποστάσεως εντερικής προετοιμασίας, μπορεί να διεγείρει τα μεσεντέρια προσαγωγά αισθητήρια νεύρα, τα οποία μεσολαβούν στη συνέχεια για το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα [214]. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε επόμενη μελέτη από τους Wolfrum et al., [220], οι οποίοι παρατήρησαν επίσης, ότι η ενεργοποίηση της μυοκαρδιακής πρωτεϊνικής κινάσης ε (PKC-ε), μετά από σύντομη εντερική ισχαιμία αναστάλθηκε από το HOE-140 και το εξαμεθώνιο,

γεγονός, που υποδηλώνει ότι η PKC-ε ήταν τοποθετημένη κατάντη της βραδυκινίνης και της νευρικής οδού.

*Πεπτίδια σχετιζόμενα με το γονίδιο της καλσιτονίνης (Calcitonin gene-related peptide, CGRP)*

Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν ενοχοποιήσει το CGRP, ένα νευροδιαβιβαστή, που απελευθερώνεται από τα ευαίσθητα στην καψαϊκίνη αισθητήρια νεύρα, ως δυνητικό μεσολαβητή των IPC [221] και RIPC [215, 222]. Αυτά μπορούν να συνοψιστούν στα εξής: η εξ'αποστάσεως εντερική προετοιμασία παράγει μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο διεγείρει τα ευαίσθητα στην καψαϊκίνη αισθητήρια νεύρα στον εντερικό αγγειακό σύστημα, απελευθερώνεται CGRP στην κυκλοφορία του αίματος (όπου τα επίπεδα έχουν αναφερθεί να αυξάνονται κατά την RIPC), το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται προς την καρδιά, όπου δραστηριοποιεί την μυοκαρδιακή PKC-ε [221, 223].

#### **4.3.1.3. Συστηματική απάντηση κατά την RIPC**

Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση της RIPC οργάνου ή ιστού στο προφίλ της μυοκαρδιακής μεταγραφή γονιδίων [224, 225] και στη φλεγμονώδη συστηματική αντίδραση [226] και έχουν ανακαλύψει, ότι η φλεγμονώδης αντίδραση καταστέλλεται και ένα ευνοϊκό προφίλ στη μεταγραφή των γονιδίων φαίνεται να ενεργοποιείται με αντιφλεγμονώδη και αντιαποπρωτικά αποτελέσματα. Η σημασία μιας τέτοιας απάντησης στην καρδιοπροστατευτική δράση, που επάγεται από την RIPC προς το παρόν είναι ασαφής και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

#### 4.3.2. Μυοκαρδιακοί παράγοντες προστασίας στην RIPC

Μόλις το καρδιοπροστατευτικό σήμα μεταφερθεί από το απομακρυσμένο όργανο στην καρδιά, ενδοκυτταριοί μηχανισμοί μεταγωγής σήματος επιστρατεύονται από τα καρδιομυοκύτταρα, οι οποίοι είναι παρόμοιοι με αυτούς, που συμμετέχουν στις IPC [110] και IPost [227]. Αυτοί περιλαμβάνουν τη δέσμευση μορίων στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφανείας, που είναι συνδεδεμένοι με την πρωτεΐνη G, όπως της αδενοσίνης [213], της βραδυκινίνης [214], των οπιοειδών [206], της αγγειοτενσίνης [228] και των ενδοκανναβινοειδών [207]. Η δέσμευση σε αυτούς τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων φαίνεται να ενεργοποιεί τότε ενδοκυτταρίες κινάσες, όπως την PKC-ε [220] και άλλους παράγοντες μεταγωγής σήματος όπως τις ROS [229], το NO και τα μιτοχονδριακά κανάλια K-ATP [213]. Εάν η RIPC επίσης, ενεργοποιεί κινάσες της κατηγορίας RISK με αποτέλεσμα την αναστολή της διάνοιξης των mPTP, όπως και στην IPC και IPost απομένει να διευκρινιστεί [199]. Σε αυτό το ερώτημα, μια μελέτη προτείνει, ότι η ενεργοποίηση των μιτογόνων πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs) JNK, p38 και ERK1/2 στο απομακρυσμένο όργανο μπορεί να συμβάλει στην καρδιοπροστασία από RIPC [230]. Οι συγγραφείς αυτής της μελέτης αναφέρουν, ότι η ισχαιμική προετοιμασία του λεπτού εντέρου ενεργοποίησε τις MAPKs στο εντερικό ιστό, αλλά όχι στο μυοκάρδιο με συνέπεια το μειωμένο μέγεθος εμφράγματος του μυοκαρδίου και ότι η φαρμακευτική αναστολή αυτών των κινασών κατήργησε την RIPC. Ωστόσο, πρέπει να καθοριστεί αν οι Akt και MAPKs ενεργοποιούνται στο μυοκάρδιο κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, ως μέρος του μονοπατιού RISK.



### *Μιτοχονδριακά κανάλια K<sup>+</sup>-ATP*

Τόσο το μυοκαρδιακό σαρκείλημα, όσο και τα μιτοχονδριακά κανάλια K-ATP έχουν αναγνωρισθεί ως κρίσιμοι εκκινήτες ή μεσολαβητές στο καρδιοπροστατευτικό φαινόμενο της IPC [110]. Το τρέχον μοντέλο προτείνει, ότι η δέσμευση μορίων στην επιφάνεια του κυττάρου ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία καταλήγουν στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα το άνοιγμα των μιτοχονδριακών καναλιών K-ATP. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή μιτοχονδριακών ROS, οι οποίες επάγουν στη συνέχεια καρδιοπροστασία, είτε με την ενεργοποίηση των RISK [110], είτε αναστέλλοντας το άνοιγμα του mPTP [231]. Εάν αυτή η αλληλουχία ισχύει και στην RIPC, προς το παρόν είναι άγνωστο, αν και αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει το άνοιγμα των καναλιών αυτών με την RIPC με χρήση φαρμακευτικών ανταγωνιστών των K-ATP καναλιών, όπως η γλιβενκλαμίδα και το 5-υδροξυδεκανοϊκό οξύ [204, 205, 213]. Η υπόθεση, ότι τα κανάλια K-ATP ασκούν τις δράσεις τους στα εξ αποστάσεως όργανα ή ιστούς προς τη καρδιά είναι χρήζει περαιτέρω έρευνας.

### *Μονοξειδίο του αζώτου*

Το NO διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο ως μεσολαβητής της καρδιοπροστασίας από IPC και SWOP [110]. Τα αποτελέσματα, που αφορούν τη συμμετοχή του NO στο RIPC έχουν διερευνηθεί με τη χρήση φαρμακευτικών αναστολέων της NO συνθετάσης και έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [222, 232]. Ωστόσο, οι Tokuno et al., [233] έχουν προτείνει την ενεργοποίηση της iNOS ως εκκινήτη για μια καθυστερημένη RIPC της καρδιάς με ερέθισμα την εγκεφαλική ισχαιμία. Στη μελέτη τους έδειξαν ότι, η άμφω απόφραξη των έσω καρωτίδων προκαλώντας μόνιμη εγκεφαλική ισχαιμία μπορούσε να μειώσει το μέγεθος του εμφράγματος του

μυοκαρδίου σε καρδιές ποντικών για 24 ώρες αργότερα και ότι αυτή η καρδιοπροστατευτική δράση απουσίαζε σε iNOS ποντίκια [233]. Ο πραγματικός ρόλος του NO στο υποκείμενο βιοχημικό μονοπάτι της RIPC πρέπει ακόμα να διερευνηθεί, αν και έχει κάποιες πειραματικές μελέτες το συνδέουν την ενεργοποίηση του CGRP στην απομακρυσμένο όργανο [222].

### Πρωτεΐνη κινάση C

Είναι αποδεδειγμένο, ότι η PKC κατέχει ένα σημαντικό ρόλο ως μεσολαβητής σήματος στην IPC, με την PKC-ε να αποτελεί την κύρια καρδιοπροστατευτική ισομορφή [110]. Πειραματικές μελέτες έχουν συνδέσει την ενεργοποίηση της PKC με το φαινόμενο της RIPC αποδεικνύοντας, ότι η προστασία μπορεί να κατασταλεί από τον μη ειδικό αναστολέα της PKC, χελερυθρίνη [220, 223, 229]. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν διαπιστώσει ενεργοποίηση της PKC-ε ως απάντηση της δέσμησης του υποδοχέα βραδυκινίνης B2 [220] και του μεσολαβητή CGRP [223] στις καρδιές, που προστατεύονται από RIPC.

### *Μιτοχονδριακός πόρος mPTP*

Ο mPTP είναι ένα μη-συγκεκριμένο κανάλι υψηλής αγωγιμότητας της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης, του οποίου το άνοιγμα στο πρώτα λεπτά της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης επάγει τον κυταρικό θάνατο με την αποσύνδεση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα την εξάντληση του ATP και το μιτοχονδριακό οίδημα [234]. Προλαμβάνοντας το άνοιγμα του στο χρόνο της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου κερδίζεται ισχυρή καρδιοπροστασία και αποτελεί ένα μηχανισμό ενίσχυσης της ενδογενούς καρδιοπροστασίας στο φαινόμενο της IPC και IPost [199]. Μια πρόσφατη πειραματική μελέτη εμπλέκει έμμεσα το mPTP

στην προστασία από RIPC αποδεικνύοντας, ότι η μείωση το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε καρδιά επίμυος μετά από προετοιμασία περιφερικού άκρου γίνεται κατά τρόπο, που να είναι εξαρτώμενη της παρεμβολής σε ένα υποδοχέα κ οπιοειδών [211]. Επιπλέον, σε καρδιομυοκύτταρα, ο αγωνιστής του υποδοχέα κ οπιοειδών έχει αποδειχθεί, ότι προκαλεί τη διάνοιξη του mPTP [211]. Ωστόσο, μια πιο άμεση απόδειξη απαιτείται για να εμπλέξει την αναστολή του mPTP στην καρδιά κατά την RIPC.

## ROS

Το οξειδωτικό στρες κατέχει έναν διπλό ρόλο στον καθορισμό της οξείας μυοκαρδιακής βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση. Ο επιζήμιος ρόλος του συνοψίζεται στη μεσολάβηση της βλάβης επαναιμάτωσης. Ωστόσο, ο ευεργετικός ρόλος αφορά τη διαμεσολάβηση της καρδιοπροστατευτική δράσης των IPC και IPost [110, 227]. Μια μελέτη από τους Weinbrenner et al., αναφέρεται σε ένα πιθανό ωφέλιμο ρόλο σηματοδότησης για τις ROS κατά την RIPC [210]. Σε αυτή τη μελέτη ένας εκκαθαριστής ROS ήταν σε θέση να καταργήσει την προστασία, που προκλήθηκε από τη RIPC [210]. Εάν οι ελεύθερες ρίζες, που παράγονται από την προετοιμασία οργάνου ή ιστού ή στο μυοκάρδιο συμμετέχουν στην προστασία, προς το παρόν είναι ασαφές και απαιτεί περαιτέρω εξέταση.

#### **4.4. Μετα-ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση (Remote Ischemic Postconditioning, RIPost)**

Η πρόταση του IPost το 2003 από τον Zhao et al., [177] εισήγαγε μια καρδιοπροστατευτική παρέμβαση, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί μετά την έναρξη της ισχαιμίας του μυοκαρδίου και κατά τη στιγμή της μυοκαρδιακής επαναιμάτωσης. Η ομάδα Vinten-Johansen [235] έσπευσε να εφαρμόσει τις αρχές της IPost στην καρδιοπροστατευτική μεθοδολογία της RIPC, με αποτέλεσμα την εισαγωγή της έννοιας της RIPost. Σε αναισθητοποιημένους επίμυες απέδειξαν ότι εφαρμόζοντας 5λεπτο επεισόδιο νεφρικής ισχαιμίας, ακολουθούμενο από 5 λεπτά επαναιμάτωσης, μετά την έναρξη της ισχαιμίας του μυοκαρδίου και αμέσως πριν από την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, μειώνεται το μέγεθος έμφραγμα του μυοκαρδίου, μέσω ενός μηχανισμού, που απαιτεί τη δέσμευση της αδενοσίνης σε υποδοχέα [235]. Είναι ενδιαφέρον, ότι όταν η νεφρική ισχαιμία δε διακοπτόταν πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, δεν παρατηρόταν καρδιοπροστασία, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της φάσης επαναιμάτωσης στο απομακρυσμένο όργανο, έτσι ώστε να «ξεπλυθεί» ο χυμικός παράγοντας [235].

Επόμενες πειραματικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία της RIPost, ως αξιόπιστης καρδιοπροστατευτικής παρέμβασης στον κόνικλο [236] και σε καρδιές χοίρων [237] χρησιμοποιώντας την ισχαιμία άκρων ως το ερέθισμα της RIPost.

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί αυτής της διεργασίας παραμένουν ακόμη ασαφείς και θεωρούνται παρόμοιοι με αυτούς που εμφανίζονται στη IPost και στη μετάδοση του καρδιοπροστατευτικού σήματος της RIPC, χρειάζονται όμως περαιτέρω πειραματικά πρωτόκολλα για τον ακριβή προσδιορισμό τους.

## 5. Μετα-ισχαιμική αγγειογένεση

Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές μορφές της αγγειακής ανάπτυξης:

α. η αγγειοπλασία ή αγγειοποίηση αναφέρεται στο σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων από τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα.

β. η αγγειογένεση και

γ. η αρτηριογένεση αναφέρονται στη εκβλάστηση και την επακόλουθη σταθεροποίηση των βλαστών από στηρικτικά κύτταρα

δ. η ανάπτυξη παράπλευρων αγγείων υποδηλώνει την επέκταση της προϋπάρχοντων αγγείων, σχηματίζοντας γέφυρες επικοινωνίας μεταξύ των αρτηριακών αγγειακών δικτύων [238].

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, το αγγειακό σύστημα προκύπτει πρώτα από την αγγειοπλασία κατά την οποία τα ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα για να διαμορφώσουν αυτά με τη σειρά τους ένα πρωταρχικό τριχοειδικό αγγειακό δίκτυο. Η ακόλουθη αύξηση και επέκταση αυτών των αγγείων σε ένα τριχοειδές δίκτυο αναφέρεται ως αγγειογένεση. Τα αγγεία, που προκύπτουν σταθεροποιούνται κατόπιν με την επιστράτευση των τοιχωματικών στηρικτικών κυττάρων και της παραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, μια διαδικασία, που καλείται αρτηριογένεση. Στη συνέχεια το αγγειακό δίκτυο φθάνει σε ένα υψηλό επίπεδο οργάνωσης με ωρίμανση, τόσο στο τοιχωματικό επίπεδο των αγγείων, όσο και στο επίπεδο σχηματισμού αγγειακού δικτύου. Η προέλευση, ο αριθμός, ο τύπος, η οργάνωση των τοιχωματικών κυττάρων και η σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας εξαρτώνται από τη θέση και τη λειτουργία των αγγείων, αλλά και από τα ερεθίσματα του ιστού μέσα στον οποίο αναπτύσσονται. Πιο συγκεκριμένα η

ανάπτυξη των παράπλευρων αγγείων συμμετέχει στην ωρίμανση του αγγειακού δικτύου. Αυτή η παράπλευρη ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από τη διεύρυνση μικρών προϋπάρχοντων αναστομών προς μεγάλης χωρητικότητας και παροχής αρτηρίες και οδηγούνται από τις αλλαγές στην ενδοαυλική τριβή διαχωρισμού της ροής του αίματος.

Η νεοαγγείωση εμφανίζεται επίσης στον ενήλικο κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, όπως στην ανάπτυξη όγκου ή σε ισχαιμικές ασθένειες. Οι τέσσερις κύριες διεργασίες της αγγειοπλασίας, της αγγειογένεσης, της αρτηριογένεσης, και της ανάπτυξης παραπλεύρων συμβάλλουν στην επιδιόρθωση και την αναδιαμόρφωση των ιστών κατά τη διάρκεια οξέων και χρόνιων ισχαιμικών αγγειακών παθήσεων και αντιπροσωπεύουν τους τελικούς στόχους της θεραπευτικής νεοαγγείωσης, με στόχο την παροχή μιας εναλλακτική στρατηγικής θεραπείας για ασθενείς με ισχαιμία κάτω άκρων και στεφανιαίας νόσου. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι μερικές ομάδες έχουν ενσωματώσει τη αύξηση των παραπλεύρων κατά την έναρξη της ισχαιμίας στην μεταγεννητική αρτηριογένεση, όπου και οι δύο όροι χρησιμοποιούνται εξίσου [239].

Η σημασία κάθε μιας από αυτές τις διαδικασίες παραμένει ασαφής [238]. Παρ'όλα αυτά, θεωρώντας την ανάπτυξη παραπλεύρων, την αρτηριογένεση, την αγγειογένεση και αγγειοποίηση ως διακριτές διαδικασίες, που συμβαίνουν σε διαφορετικούς ιστούς προχωρούμε στην παρακάτω απλούστευση. Είναι σαφές, ότι οι παραπάνω διαδικασίες είναι μέρη του ίδιου μηχανισμού με προκαθορισμένη διαδοχή γεγονότων, που οδηγούν στην νεοαγγείωση. Είναι επίσης πιθανή η αλληλοσυμπλήρωση και ταυτόχρονη μετάβαση από τη μία στην άλλη διαδικασία. Έτσι, η ανάπτυξη παραπλεύρων και η αρτηριογένεση παρέχουν μαζική αιματική ροή στον ιστό, αλλά η αύξηση της τριχοειδικής πυκνότητας (δηλαδή η

αγγειογένεση), ίσως απαιτείται για να διασωθεί η ισχαιμική περιοχή. Η αγγειογένεση και η ανάπτυξη παραπλευρών οδηγούνται από διαφορετικά, αλλά εν μέρει αλληλοκαλυπτόμενα κυτταρικά και μοριακά μονοπάτια.

Η υποξία, στα πλαίσια της ισχαιμίας, είναι γνωστό, ότι αποτελεί ένα ερέθισμα για την πρόκληση αγγειογένεσης, ενώ η υγρή διατμητική τάση (Fluid Shear Stress) αποτελεί το σημαντικότερο ερέθισμα για την έναρξη της ανάπτυξης παραπλευρών. Εκτός από αυτούς τους συγκεκριμένους αρχικούς πυροδότες, η αγγειογένεση και η ανάπτυξη παραπλευρών μοιράζονται αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, πρωτεάσες, και φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία παίζουν διαφορετικούς ρόλους στην προώθηση και βελτιστοποίηση αυτών των διαδικασιών. Η παρουσία των φλεγμονωδών κυττάρων αποτελεί ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μετα-ισχαιμικής επαναγγείωσης [240].

### **5.1. Υποξική εξαρτώμενη αγγειακή αύξηση και φλεγμονή**

Ένα σημαντικό κινητήριο ερέθισμα για την μετα-ισχαιμική αγγειακή ανάπτυξη είναι η υποξία εντός του περιβάλλοντα ιστού. Ο κύριος μηχανισμός της υποξικής επαγόμενης αγγειογένεσης περιλαμβάνει την αύξηση των πρωτεϊνών του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα (HIF). Υπάρχουν δύο εναλλακτικές οξυγονορυθμιζόμενες HIF-υπομονάδες, οι HIF-1 και HIF-2, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στο οξυγόνο, διαφοροποιημένη έκφραση σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και την επιλεκτική ενεργοποίηση τουλάχιστον κάποιων γονιδίων στόχων [241]. Επιπλέον, ο HIF-1 είναι μια ετεροδιμερή πρωτεΐνη, που περιέχει δύο υπομονάδες, την HIF-1α και β, που ενώνονται με συγκεκριμένα στοιχεία υποξικής απόκρισης στην κανονιστική περιοχή πολλών

ευαίσθητων στην υποξία γονιδίων, όπως αυτού που εκφράζει τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF)-A [242].

Η υποξία ελέγχει τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η ενεργοποίηση του HIF-1α είναι απαραίτητη για τη διήθηση και ενεργοποίηση μυελογενών κυττάρων *in vivo* μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου του VEGF. Ο HIF-1α είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της γλυκολυτικής ικανότητας των μυελογενών κύτταρα και όταν HIF-1α είναι απών, η κυτταρική αποθήκη ATP μειώνεται δραστικά. Οι μεταβολικές δυσλειτουργίες έχουν ως αποτέλεσμα τη διαταραχή στη συνάθροιση, στην κινητικότητα και στη διεισδυτικότητα των μυελογενών κυττάρων [243]. Η υποξία καταστέλλει επίσης την ενεργοποίηση, που προκαλείται από το θάνατο των κυττάρων από τη διέγερση TCR/CD3, με αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση των κυττάρων. Η ανάλυση μικροσυστοιχίας πρότεινει τη συμμετοχή της αδρενομεδουλλίνης ενός προϊόντος του γονιδίου του HIF-1 σε αυτή τη διαδικασία [244]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί, ότι η υποξία τροποποιεί την ικανότητα πρόσφυσης των φλεγμονωδών κυττάρων. Έκθεση της προμονοκυτταρικής σειράς U937 σε υποξία οδήγησε σε αυξημένη πρόσφυση σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέτοιες αυξήσεις εξαρτώνται της μεταγραφής και έχουν αποκλειστεί από αντισώματα, που στρέφονται κατά της ιντεγκρίνης β2 του ποντικού. Μεταγενέστερες μελέτες εντόπισαν μια θέση δέσμευσης για τον HIF-1 στο γονίδιο CD18. Η δέσμευση του HIF-1 έχει αποδειχθεί *in vivo* και η ανάλυση των μεταλλάξεων της θέσης του HIF-1 μέσα στον υποκινητή CD18 είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της εξαρτώμενης της υποξίας επαγωγής [245].

Επιπρόσθετα οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να ελέγξουν τη HIF-1 εξαρτώμενη ακολουθία σήματος. Η IL-1β αυξάνει έντονα τη δραστηριότητα του HIF-1α σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων ηπατώματος, τονίζοντας έναν



πιθανό ρόλο του HIF-1α ως παράγοντα στη φλεγμονώδη διαδικασία [246]. Επίσης ο TGFb συγκεκριμένα μειώνει, τόσο τα επίπεδα mRNA όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα μιας HIF-1α σχετιζόμενης προλυλ-υδροξυλάσης (PHD) της PHD-2, μέσω του Smad μονοπατιού. Αυτό έχει ως συνέπεια, ο εκφυλισμός του HIF-1α να αναστέλλεται σε τέτοιο βαθμό, που καθορίζεται από τη διαταραχή στον εκφυλισμό μιας πρωτεΐνης αναφοράς, που περιέχει τον HIF-1α οξυγονοεξαρτώμενο τομέα εκφύλισης στον οποίο περιλαμβάνονται οι PHD-στόχοι [247]. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί, ότι η υποξία μπορεί να ενεργοποιήσει μεταγραφή γονιδίων στα μακροφάγα κύτταρα με μηχανισμούς, που είναι ανεξάρτητοι από τον HIF. Για παράδειγμα, η υποξία αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου των μακροφάγων, το οποίο συνδέεται με την αυξημένη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στον εκκινητή CXCL-8 και την ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης του προαγγειογενετικού CXCL8 mRNA [248, 249].

## **5.2. Μηχανική εξαρτώμενη αγγειακή αύξηση και φλεγμονή**

Οι φυσικές δυνάμεις, που παράγονται μέσα στα παράπλευρα αρτηριόλια, μετά από μια αύξηση της ροής αίματος είναι επίσης σημαντικά ερεθίσματα για την αγγειακή αύξηση. Η άνοδος στη ροή αίματος προκύπτει από τη διαφορά στην πίεση, μεταξύ προϋπάρχοντων αρτηριολίων, που συνδέουν ανάντη του σημείου απόφραξης και εκείνων κατόντη. Οι φυσικές δυνάμεις, όπως η αυξημένη FSS ενεργοποιούν την αναδιαμόρφωση των αγγειακών τοιχωμάτων. Χρόνια υψηλή τιμή FSS, με αποχέτευση της παράπλευρης ροής άμεσα στο φλεβικό σύστημα με χρήση μιας τελικοτελικής αναστόμωσης, μεταξύ του ακραίου κολοβώματος της αποφραγμένης μηριαίας αρτηρίας και της συνοδευτικής φλέβας, έχει αποδειχθεί

ότι υπερνικά τους ανατομικούς περιορισμούς των παράπλευρων αρτηριών και είναι δυνατικά ικανή να αποκαταστήσει εντελώς τη μέγιστη παράπλευρη παροχή [250]. Η FSS ενεργοποιεί τα Ras-ERK, Rho-, και NO- (αλλά όχι Akt-) μονοπάτια που επάγουν την παράπλευρη αρτηριακή αύξηση [250, 251].

Η κύρια φυσιολογική απάντηση στη FSS είναι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων ελέγχονται από στοιχεία στους εκκινητές τους, που ανταποκρίνονται στη διαμητική τάση [252]. Ενδιαφέρον αποτελεί, ότι η υψηλή FSS οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης, κυτοκινών και υποδοχών κυτοκινών.

Οι κυτοκίνες είναι ισχυροί μεσολαβητές προσκόλλησης των κυττάρων και της κυτταρικής μετανάστευσης, μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με την οικογένεια των υποδοχών των G-πρωτεϊνών- (CCR, CXCR ή CX3CR), που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα. Η πιο εκτεταμένα μελετημένη κυτοκίνη, που συμβάλλει στη μετα-ισχαιμική νεοαγγείωση είναι η χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων -1 (MCP-1). Η MCP-1 φαίνεται να αυξορυθμίζεται στο χώρο της ανάπτυξης παραπλεύρων [253]. Ομοίως, τα ποντίκια, που στερούνται το MCP-1 υποδοχέα CCR2 δείχνουν σημαντική μείωση της βαθμολογίας ενεργητικής κίνησης άκρου και περισσότερη μυϊκή ατροφία γαστροκνήμιου. Μορφομετρική ανάλυση δείχνει επίσης μικρότερη αύξηση της διαμέτρου των παραπλεύρων σε ποντίκια με έλλειψη CCR2 [254]. Διαγονιδιακά ποντίκια, που εκφράζουν το γονίδιο JE-MCP-1, υπό τον έλεγχο του εκκινητή της α-καρδιακής βαριάς αλυσίδας μυοσίνης παρουσιάζουν μειωμένη εμφραγματική περιοχή, μικρότερο σχηματισμό ουλών και βελτίωση της αριστερής κοιλιακής λειτουργίας, μετά από ισχαιμία του μυοκαρδίου. Αυτά τα ποντίκια εμφανίζουν επίσης επαγωγή της διήθησης μακροφάγων και νεοαγγείωση [255]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα, ότι μονοκλωνικά αντισώματα που στρέφονται

κατά του ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) παρεμποδίζουν την νεοαγγείωση, γεγονός που υποδηλώνει, ότι η μέσω ICAM-1/Mac-1 πρόσφυση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο των παράπλευρων αρτηριών είναι ένα ουσιαστικό βήμα για την ανάπτυξη περαιτέρω παραπλεύρων.

Επιπλέον, η *in vivo* θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα κατά του ICAM-1 καταργεί εντελώς τη διεγερτική δράση του MCP-1 στην ανάπτυξη παράπλευρων αρτηριών. Ως εκ τούτου, ο μηχανισμός της αρτηριογένεσης διαμεσολαβούμενος από την MCP-1-προκαλείται περισσότερο μέσω εντοπισμού και έλξης των μονοκυττάρων και όχι με απευθείας αρτηριογεννητική επίδραση της ίδιας MCP-1 [256]. Παραδόξως, τα αποτελέσματα σχετικά με MCP-1-και CCR2-ανεπαρκή ποντίκια ποικίλουν. Μερικές μελέτες επιδεικνύουν παρόμοια τριχοειδική πυκνότητα και αιμάτωση των ιστών σε ποντίκια, που στερούνται MCP-1 ή CCR2 [257, 258]. Η χειρουργική διαδικασία, που χρησιμοποιείται για να προκαλέσει ισχαιμία, το είδος του ιστού, καθώς και η ύπαρξη αντισταθμιστικών μηχανισμών, όπως η αύξηση στην έκφραση της MCP-1 σε CCR2 -ανεπαρκή ποντίκια, μπορεί να ευθύνεται για αυτές τις αποκλίσεις [259].

Επιπλέον μια μεγάλη ποικιλία κυτοκίνων μπορεί επίσης να επηρεάσει την επιστράτευση των λευκοκυττάρων με συνέπεια να επηρεάζει την ανάπτυξη των παραπλεύρων και την απάντηση των ιστών στην ισχαιμία. Κατά αυτήν την άποψη, οι CXCL-9 και -10 μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς τους CXCR3, μπορούν να διαμορφώσουν το μεταϊσχαιμικό σχηματισμό παραπλεύρων. Η ισχαιμία, που προκαλείται από την απολίνωση της μηριαίας αρτηρίας βελτιώνει τον αριθμό των κυττάρων, που εκφράζουν το CXCR3 και το επίπεδο των απολήξεων τους CXCL-9 και -10. Το αγγειογραφικό σκορ, η μέτρηση της ανάκαμψης της αρτηριακής ροής και η ανάλυση της τριχοειδικής πυκνότητας

δείχνουν σημαντική μείωση της ισχαιμικής/μη-ισχαιμική αναλογίας κάτω άκρου στα CXCR3-ανεπαρκή ποντίκια. Η επίδραση αυτή σχετίζεται με μια σημαντική μείωση στα μακροφάγα κύτταρα και στη διήθηση των CD3+ λεμφοκυττάρων [260].

Η ισχαιμία των ιστών διεγείρει επίσης την έκφραση του mRNA της φρακταλκίνης. Η φρακταλκίνη επάγει το σχηματισμό νέων αγγείων στο αφαιρεθέν τμήμα αορτής επίμυος και στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη πτηνού με αύξηση της έκφραση του HIF-1, που προκύπτει από CX3CR1. Η *in vivo* αγγειογένεση από φρακταλκίνη καταστέλλεται από τη λειτουργική αναστολή του VEGF υποδοχέα 2 (KDR) και της Rho GTPase. Η ισχαιμία οπίσθιου άκρου επίμυος αντιμετωπίστηκε ικανοποιητικά με έγχυση αέρας μορφής φρακταλκίνης [261]. Επιπλέον, η απώλεια της λειτουργικότητας του CX3CR1 επιβραδύνει την επούλωση τραύματος και στις δύο περιπτώσεις, CX3CR1-ανεπαρκών ποντίκια και σε άγριου τύπου ποντίκια που έλαβαν αντι-CX3CR1-εξουδετερωτικά αντισώματα. Αντίθετα, η μεταφορά του μυελού των οστών από δότες ποντίκια άγριου τύπου, και όχι από δότες με έλλειψη CX3CR1, αποκαθιστά την επούλωση των τραυμάτων σε ποντίκια με έλλειψη CX3CR1. Άμεσες επιπτώσεις της διάσπασης του CX3CR1 στο σημείο του τραύματος περιλαμβάνουν τη σημαντική μείωση των μακροφάγων και των προϊόντων μακροφάγων, όπως TGF- $\beta$ 1 και VEGF-A. Συνέπεια αυτού, είναι η νεοαγγείωση να μειώνεται σημαντικά [262].

Μετά από ισχαιμία αριστερού οπίσθιου άκρου, η αναλογία ισχαιμικής/κανονικής αιμάτωσης άκρου και η τριχοειδική πυκνότητα είναι σταθερά χαμηλότερα σε ποντίκια με έλλειψη P-σελεκτίνης σε σύγκριση με άγριου τύπου ποντίκια. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων που διηθεί και εκφράζει VEGF-A είναι επίσης μειωμένος σε P-σελεκτίνη-ανεπαρκή ποντίκια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η P-σελεκτίνη μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ισχαιμία, που προκαλείται

από νεοαγγείωση με την προώθηση της έγκαιρης φλεγμονώδους διήθησης μονοπύρηνων κυττάρων [263].

Τέλος, FSS μπορεί επίσης να αυξήσει τη σύνθεση των μορίων φλεγμονής. Άμεση μηχανική μυοκαρδιακή διάταση, που σχετίζεται με έμφραγμα του μυοκαρδίου, με μέγιστη έκταση εμφράγματος και περιεμφραγματικές ζώνες, ωθεί το μυοκάρδιο στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TNFα και IL-6 [264]. Το μηχανικό ερέθισμα δρα μέσω δυναμικών αισθητήρων (ιντεγκρινών, κυτταροσκελετού και σαρκειλημματικών πρωτεϊνών) και πυροδοτεί ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής σήματος, μιτογονικές πρωτεϊνικές κινάσες, μεταγωγή εντολής JAK, ενεργοποίηση της μεταγραφής STAT και βιοχημικών μονοπατιών, που ελέγχονται από την καλσινευρίνη. Αυτά τα μονοπάτια ενεργοποιούν σύστοιχους κατάντη πυρηνικούς μεταγραφικούς παραγόντες, όπως ο NFκB και AP-1, οι οποίοι απαιτούνται για την επαγωγή των περισσότερων γονιδίων κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένης της TNFα και IL-6 [265].

### **5.3. Αγγειακή ανάπτυξη και αρχέγονα κύτταρα**

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν, ότι μετά τη γέννηση η νεοαγγείωση δεν βασίζεται αποκλειστικά στην αγγειογένεση και την ανάπτυξη παραπλευρών, αλλά περιλαμβάνει, επίσης, κυκλοφορούντα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (EPC), που προέρχονται από το μυελό των οστών. Ένα συγκεκριμένο υποσύνολο των ενδοθηλιακών πρόδρομων κυττάρων έχει αποδειχθεί, ότι εδραιώνεται και ενσωματώνεται στο σημείο της νεοαγγείωσης εντός του ισχαιμικού ιστού, όπου στη συνέχεια ολοκληρώνεται η διαφοροποίηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, η σχετική συμβολή των κυκλοφορούντων EPC στα αγγεία των οργάνων και των

όγκων στους ενήλικες ποικίλει και μπορεί να κυμαίνεται από ελάχιστη [266-268], έως πολύ σημαντική [269]. Αρκετοί παράγοντες συμβάλλουν σε αυτές τις μεγάλες διαφορές, συμπεριλαμβανομένων της απόκρισης των EPC στα περιβάλλοντα ερεθίσματα, τα πειραματικά μοντέλα ζώων και τη μέθοδο απομόνωσης των πρόδρομων κυττάρων. Ειδικότερα, η κλίση της υποξίας, η οποία κατευθύνει τα EPC να συγχωνευτούν σε αγγειακά ανεξάρτητες δομές εντός της ισχαιμικής περιοχής, μπορεί να είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της ποικιλότητας. Πράγματι, η έκταση της ενσωμάτωσης είναι ανάλογος με το βαθμό της ιστικής ισχαιμίας [270]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την πιθανή έλλειψη ενσωμάτωσης κυττάρων του μυελού των οστών σε αγγειακές δομές σε μη ισχαιμικούς μύες κνήμης, όπως αναφέρεται σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας οπίσθιου άκρου [267]. Επιπλέον, τα EPC που προέρχονται από το μυελό των οστών φαίνονται να είναι μια ετερογενή ομάδα κυττάρων, που προέρχεται από πολλαπλές πρόδρομες ουσίες και παρουσιάζεται σε διάφορα στάδια της ενδοθηλιακής διαφοροποίησης στο περιφερικό αίμα. Τέλος, μη μυελικά πρόδρομα c-kit (+) CD45- έχουν επίσης αποδειχθεί, ότι συμβάλλουν στην νεοαγγείωση μετά τον τοκετό σε βαθμό που είναι παρόμοιος με αυτόν των EPC του μυελού των οστών [271].

Παρόλα αυτά, όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν, ότι κάποιοι πληθυσμοί των πρόδρομων κυττάρων δεν προάγουν την αγγειακή ανάπτυξη με την ενσωμάτωση τους στα τοιχώματα των αγγείων, αλλά μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστηρικτικά κύτταρα με την έκκριση αυξητικών παραγόντων σε παθολογικούς ιστούς και να συμβάλουν με αυτόν τον τρόπο στην νεοαγγείωση και αναδιαμόρφωση ιστικών αγγείων μέσω μιας παρακρινούς διαδικασίας [272-274]. Σύμφωνα με αυτή την άποψη, τα πρόδρομα κύτταρα, που προέρχονται από το

μυελό των οστών συσσωρεύονται γύρω από τις εκκολαπτόμενες παράπλευρες αρτηρίες. Αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ινοβλάστες, περικύτταρα, και αρχικά ως λευκοκύτταρα, που χρωματίζονται θετικά για πολλούς αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες [267]. Οι αιμοποιητικές κυτοκίνες, μέσω διαβαθμισμένης ανάπτυξης του SDF-1 (Stroma cell derived factor 1) των αιμοπεταλίων, υποστηρίζουν την κινητοποίηση και την πρόσληψη CXCR4+ και VEGFR1+ πρόδρομων κυττάρων γύρω από αγγειακές δομές, οι οποίες στη συνέχεια προωθούν την ανάπτυξη παραπλεύρων [275].

Ομοίως, ο VEGF αρκεί ως μέσο κλήσης των κυκλοφορούντων μυελοειδών μονοπύρηνων κυττάρων και είναι απαραίτητος για την περιαγγειακή τοποθέτηση και κατακράτηση τους μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης του SDF-1 [276]. Επιπλέον τα πρόδρομα κύτταρα από το ανθρώπινο περιφερικό αίμα έχει αποδειχθεί να διαφοροποιούνται τόσο σε πρώιμα και όσο και σε όψιμα EPC. Τα πρώιμα EPC εκφράζουν δείκτες μονοκυτταρικής γραμμής, διαθέτουν σχήμα ατράκτου, παρουσιάζουν μέγιστη αύξηση κατά τις 2 έως 3 εβδομάδες και πεθαίνουν στις 4 εβδομάδες [274, 277]. Τα όψιμα EPC σε σχήμα κυβόλιθου εμφανίζονται αργά στις 2 έως 3 εβδομάδες, παρουσιάζουν εκθετική αύξηση κατά τις 4 έως 8 εβδομάδες, και ζουν μέχρι και 12 εβδομάδες. Τα πρώιμα EPC διαφοροποιούνται από τα όψιμα στην έκφραση της VE-cadherin (vascular endothelial) και των γονιδίων Flt-1, KDR, και CD45. Επιπλέον, τα πρώιμα EPC επάγουν την ανάπτυξη αγγείων κυρίως από την παρακρινή λειτουργία τους, ενώ τα όψιμα EPC εμφανίζουν αγγειοποιητικές ιδιότητες [277]. Τέλος, μεταμοσχευμένα EPC, που προέρχονται από CD14+ ή CD14- κύτταρα φάνηκαν να ενσωματώνονται σε αγγειακές δομές ποντικών μετά από ισχαιμία οπίσθιου άκρου, εμφανίζοντας σημαντικά βελτιωμένη νεοαγγείωση, υποστηρίζοντας την

παρατήρηση για αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων και EPC [278].

#### **5.4. Κύτταρα φλεγμονής και προαγγειο-, αρτηριογενετικοί μηχανισμοί**

##### *Μονοκύτταρα*

Η αυξορύθμιση των χημειοτακτικών μορίων προκαλεί διείσδυση των διαφόρων τύπων των φλεγμονωδών κυττάρων στην ισχαιμική περιοχή. Τα επίπεδα των μονοκυττάρων σχετίζονται άμεσα με την ένταση της νεοαγγείωσης. Οι συγκεντρώσεις μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα επηρεάστηκαν από μία μόνο έγχυση του αντιμεταβολίτη 5-φθοριοουρακίλη (5-FU), με αποτέλεσμα σημαντικό φαινόμενο ανάκαμψης μετά από μια φάση εξάντλησης. Επτά ημέρες μετά την απολίνωση μηριαίας αρτηρίας, η παροχή και ο αριθμός των ορατών παράπλευρων αρτηριών αυξήθηκε στην ομάδα υπερακόντισης. Το εύρημα αυτό συνδέεται με την αυξημένη συσσώρευση των μονοκυττάρων στο μηρό 3 ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση. Σε ένα δεύτερο ζωικό μοντέλο, η χορήγηση 5-FU προκαλεί σημαντική μείωση του αριθμού των μονοκυττάρων στο αίμα την 4η ημέρα, που ακολουθείται από φαινόμενο ανάκαμψης κατά την 12η ημέρα. Η ροή του αίματος του ποδός, η οποία αξιολογείται με απεικόνιση Doppler προ και σε διάφορα χρονικά σημεία μετά τη χειρουργική επέμβαση, αυξήθηκε από την 7η μέχρι την 21η ημέρα στα ποντίκια της ομάδας ανάκαμψης. Αντίθετα, η απολίνωση κατά τη διάρκεια της φάσης εξάντλησης των μονοκυττάρων είχε ως αποτελέσματα τη μείωση της ανασύστασης της ροής του αίματος. Αυτή η αναστολή αντιστρέφεται με έγχυση απομονωμένων μονοκυττάρων [279].



### *T Λεμφοκύτταρα*

Τα T λεμφοκύτταρα έχουν επίσης αποδειχθεί να μεσολαβούν στη μετα-ισχαιμική νεοαγγείωση. Ως εκ τούτου, CD4+ T λεμφοκύτταρα-ανεπαρκή ποντίκια εμφανίζουν σημαντική μείωση της μετα-ισχαιμικής νεοαγγείωσης [280, 281]. Επιπλέον, CD8-ανεπαρκή ποντίκια εμφανίζουν μειωμένη έκφραση IL-16 και μειωμένη πρόσληψη CD4+ T-κυττάρων στο χώρο ανάπτυξης παράπλευρων αγγείων. Εξωγενής χορήγηση CD8+ T-κύτταρων, σε CD8-ανεπαρκή ποντίκια αμέσως μετά την απολίνωση μηριαίας αρτηρία, έδειξε επιλεκτική εγκατάσταση τους στο ισχαιμικό οπίσθιο άκρο και έκφραση της IL-16. Η αποκατάσταση της έκφρασης IL-16 συνοδεύθηκε με σημαντική CD4+ μονοκυτταρική διήθηση σε ισχαιμικό άκρο, γρηγορότερη αποκατάσταση της ροής του αίματος, και μειωμένη μυϊκή ατροφία και ίνωση [282].

Πρόσφατα έχει τονιστεί ο ρόλος των κυττάρων φυσικών δολοφόνων (Natural Killers). Η ανάπτυξη παραπλεύρων είναι μειωμένη σε C57BL/6 ποντίκια με εξασθενημένα NK λόγω αντι-NK1.1 αντισωμάτων και σε διαγονιδιακά ποντίκια με ανεπάρκεια NK κυττάρων. Η ανάπτυξη των αγγείων, ωστόσο, δεν επηρεάζεται σε ποντίκια με έλλειψη Ja281, που στερούνται των NK1.1+ NK κυττάρων T, δείχνοντας ότι τα κύτταρα NK, παρά τα NK των κυττάρων T, εμπλέκονται στην ανάπτυξη παραπλεύρων [283]. Ο χρόνος της αποκατάστασης της αιμάτωσης ελλείπει NK ή κύτταρα CD4 T δείχνουν ότι τα κύτταρα NK παίζουν ρόλο στην έναρξη της ανάπτυξης παραπλεύρων.

### Ουδετερόφιλα

Αντίθετα, τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (PMN) εμφανίζουν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες. Ως εκ τούτου, η προσθήκη PMN σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος και αιμοπεταλίων εξασθενεί την αιμάτωση και το σχηματισμό τριχοειδών σε ποντίκια χωρίς θύμο και με ισχαιμία οπισθίου άκρου [284]. Τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα προσκολλούνται στο αγγειακό ενδοθήλιο, ενεργοποιούνται και στη συνέχεια έχουν τη δυνατότητα να μεσολαβήσουν την ενδοθηλιακή βλάβη με τη δημιουργία υψηλών επιπέδων ROS ή την απελευθέρωση λυσοσωμικών πρωτεϊνών. Οι ROS (συμπεριλαμβανομένων του υπεροξειδίου, το υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανιόντων υδροξυλίου και αντιδραστικών ειδών του αζώτου, όπως το μονοξειδίου του αζώτου και υπεροξυνιτρικό) αναφέρονται ότι τονώνουν τη μετα-ισχαιμική επαναγγείωση σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά την εμποδίζουν σε υψηλές [285]. Στον ισχαιμικό ιστό οι ROS ως επί το πλείστον προέρχονται από τα ουδετερόφιλα, όπως φαίνεται από την σημαντική μείωση μετά τη χορήγηση αναστολέα της οξειδάσης της NADPH των ουδετερόφιλων και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του CD18 μορίου προσκόλλησης των ουδετερόφιλων. Οι ROS δρουν επίσης με την ικανότητά τους να επάγουν την έκφραση και ενεργοποίηση του ιστικού παράγοντα [286, 287]. Μείωση των ROS συσχετίστηκε με σημαντικά μικρότερο μέγεθος του εμφράγματος και σημαντική αύξηση της στεφανιαίας ροής [286].

Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν επίσης λυσοσωμικές πρωτεΐνες, όπως η ελαστάση. Η ελαστάση είναι υπεύθυνη για την αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, μέσω της πέψης των ενδοθηλιακών πρωτεϊνών στην επιφάνεια των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης και της ινονεκτίνης [288]. Στο μοντέλο της ισχαιμίας οπισθίου άκρου, αναστολέας ελαστάση ουδετερόφιλων αντιστρέφει

εντελώς την ανασταλτική επίδραση των PMN, γεγονός που υποδηλώνει την αντιαγγειογενετική δράση των ουδετερόφιλων ελαστασών [284].

### *Αιμοπετάλια*

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παρατηρείται επίσης στα οξεία ισχαιμικά επεισόδια. Συγκεντρωμένα ευρήματα δείχνουν, ότι τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και η ενεργοποίησή τους επάγει τη στάση των λευκοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο [289]. Τα αιμοπετάλια επίσης περιέχουν τους κύριους παράγοντες αγγειογένεσης, δηλαδή τους VEGF-A, ANG-1, PDGF, bFGF και θρομβίνη αλλά και τους αντι-αγγειογενετικούς, θρομβοσπονδίνη, PF-4, και ενδοστατίνη. Ωστόσο, παρά την παρουσία των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, η συνολική δράση των αιμοπεταλίων ή των στοιχείων που απελευθερώνει η θρομβίνη είναι διεγερτική προς την αγγειογένεση [290]. Ειδικότερα, η θρομβίνη έχει αποδειχθεί ότι προωθεί την αγγειακή ανάπτυξη. Καταστολή της παραγόμενης από την πήξη θρομβίνης, με χρήση αντιπηκτικών φαρμάκων, αμέσως μετά την πρόκληση ιστικής ισχαιμίας εμποδίζει την νεοαγγείωση in vivo απόκριση σε μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιου άκρου τρωκτικού [291]. Η θρομβίνη, καθώς και το πεπτιδίο ενεργοποίησης του PAR-1 υποδοχέα, αύξησαν τις αγγειακές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και τους αυξητικούς παράγοντες, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας MMP -1, MMP-2, τον VEGF-A, την Ang-2 και τους υποδοχείς VEGFR2 και CXCR2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Η θρομβίνη μπορεί επίσης να τονώσει την απελευθέρωση του VEGF-A και της ANG-1 από τα αιμοπετάλια και να προκαλέσει το σχηματισμό ενός σωλήνα ενδοθηλιακών κυττάρων σε σύστημα μεμβρανώδους γέλης [290]. Η θρομβίνη αυξορυθμίζει σημαντικά το ογκογονιδίο-α (GRO-α) σε διάφορα κυτταρικές γραμμές

όγκου καθώς και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η GRO-α είναι μια κυτοκίνη CXC με αγγειογενετικές ιδιότητες μετά από δέσμευση στο CXCR2 υποδοχέα της. Η GRO-α ενισχύει την αγγειογένεση στο χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσού, γεγονός που υποδηλώνει, ότι GRO-α μεσολαβεί της προαγγειογενετικής επίδρασης της θρομβίνης [292].

Τα αιμοπετάλια επίσης, φαίνεται να χρησιμεύουν και ως «γέφυρα» κυττάρων, που μπορούν από τη μία να προσελκύσουν τα EPC και από την άλλη να υποστηρίξουν την απευθείας πρόσφυση τους, παρέχοντας μια κολλώδη επιφάνεια. Τα αιμοπετάλια παρέχουν το σημαντικό μήνυμα, που προωθεί την επιστράτευση των πρόδρομων κυττάρων από το μυελό των οστών στα σημεία της αγγειακής βλάβης. Η δέσμευση των κυττάρων του μυελού των οστών στα αιμοπετάλια πραγματοποιείται μέσω της P-σελεκτίνη και GPIIb ιντεγκρίνης των αιμοπεταλίων. Τα ευαιθητοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν επίσης την κυτοκίνη SDF-1α, υποστηρίζοντας έτσι περισσότερο την πρωταρχική πρόσφυση και μετανάστευση των πρόδρομων κυττάρων μέσω σηματοδότησης CXCR4 [293]. Επιπλέον, συνεπώαση των EPC με αιμοπετάλια για 5 ημέρες προκαλεί την διαφοροποίηση των EPC από ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα [294]. Τα ανθρώπινα EPC, επίσης εκφράζουν λειτουργική PAR-1. Η ενεργοποίηση της PAR-1, που προκαλείται από τη θρομβίνη προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξαρτώμενη CXCR4 μετανάστευση και διαφοροποίηση, οδηγώντας σε προαγγειογενετικό αποτέλεσμα [295].

Συνοψίζοντας θα μπορούσε κανείς να προτείνει το ακόλουθο σχήμα: κατά την ισχαιμία CD8<sup>+</sup> T κύτταρα διεισδύουν στο χώρο της ανάπτυξης παράπλευρων αγγείων και προσελκύουν CD4<sup>+</sup> μονοπύρηννα κύτταρα μέσα από την έκφραση της IL-16. Τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα ελέγχουν τη δημιουργία παραπλεύρων στην οξεία

ισχαιμία, τουλάχιστον εν μέρει, με την πρόσληψη των μονοκυττάρων στο σημείο του ενεργού σχηματισμού παράπλευρης αρτηρίας, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν το σχηματισμό αγγείων με τη σύνθεση αγγειογενετικών/αρτηριογενετικών κυτοκινών.

### **5.5. Αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία**

Η παρουσία των παραπάνω αναφερόμενων κυττάρων φλεγμονής σχετίζεται με την τοπική έκκριση αγγειογενετικών/αρτηριογενετικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των κυτοκινών κυρίως της IL-1β, των κύριων αυξητικών παραγόντων, δηλαδή του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF), του βασικού παράγοντα αύξησης ινοβλαστών (bFGF) και μεταλλοπρωτεϊνολυτικών θεμέλιας ουσίας (MMP) [296, 297]. Σε μια μελέτη, εμφραγματικά ποντίκια με ανεπάρκεια θρομβοσπονδίνης-1 (TSP-1) παρουσίασαν σταθερή πυκνότητα μακροφάγων και επομένως μια αύξηση στην έκφραση των κυτοκινών MCP-1, φλεγμονώδους πρωτεΐνης-1α, IL-1β, IL-6 και TGF-β, που οδήγησε σε πιο εκτεταμένη μετεμφραγματική αναδιαμόρφωση από του άγριου τύπου ποντίκια [298].

Οι πρωτεΐνες MMPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην νεοαγγείωση. Αν και κατά την έναρξη του σχηματισμού αγγείων πιστεύεται, ότι οι MMPs διεγείρουν την αγγειακή αύξηση μέσω εκφυλισμού και αναδιάταξης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η δράση αυτών των πρωτεασών είναι πιο πολύπλοκη και μπορούν να περιλαμβάνουν και άλλες οδούς, όπως τη διέγερση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών και την αποσύνθεση αναστολέων [299]. Ειδικότερα, οι αυξητικοί παράγοντες bFGF και VEGF μπορούν να απελευθερωθούν από το εξωκυττάριο

χώρο μετά από αναδιάταξη του μορίου των πρωτεογλυκανών. Η πρωτεολυτική τροποποίηση των αυξητικών παραγόντων μπορεί επίσης να αλλάξει τις ιδιότητές τους. Ως εκ τούτου, οι MMP-3 και MMP-9 διασπούν τον VEGF-A165 σε μικρότερο μόριο με ιδιότητες παρόμοιες με τον VEGF-A121 [300]. Τέλος, η αλληλεπίδραση πρωτεάσης με τις ιντεγκρίνες στην επιφάνεια μεταναστευτικών λευκοκυττάρων μπορεί να διευκολύνει τη διήθηση τους μέσα σε ινώδη ουσία [299]. Η επαναγγείωση είναι αυξημένη σε ισχαιμικά οπίσθια άκρα ποντικών με ανεπάρκεια στην αντιφλεγμονώδη IL-10 [301]. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα αποκλείεται από την αναστολή MMP, παρά μια σταθερή αυξορύθμιση του VEGF [302]. Η διήθηση των λευκοκυττάρων στην εμφραγματική καρδιά και η επακόλουθη επαναγγείωση του μυοκαρδίου είναι μειωμένη σε ποντίκια με έλλειψη ενεργοποιητή πλασμινογόνου/MMP 9 κάτι που επιβεβαιώνει την καίρια σχέση μεταξύ πρωτεϊνών, φλεγμονής και αγγειογένεσης [303]. Παρόλο που τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ένα σημαντικό επίπεδο της MMP-9, η MMP-9 των μακροφάγων είναι αυτή που συμμετέχει στη δημιουργία τριχοειδικών διακλαδώσεων. Μεταμόσχευση μυελού των οστών άγριου τύπου ποντικών σε MMP-9-ανεπαρκή ποντίκια αποκαθιστά τη τριχοειδική διακλάδωση, ενισχύοντας περαιτέρω τη συμβολή των μακροφάγων, που προέρχονται από μυελό των οστών για την παροχή της απαραίτητης MMP-9 [304]. Από τα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνονται επίσης ειδικοί προαυξητικοί παράγοντες. Ένα πεπτιδίο που εκκρίνεται από τα μακροφάγα, το PR39, αναστέλλει την από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεοσωματίου εξαρτώμενη αποδόμηση του HIF-1α, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της διαμόρφωσης των αγγειακών δομών *in vitro* και την αυξημένη αγγείωση του μυοκαρδίου σε ποντίκια [305]. Το PR39 επίσης συνδέεται με την

υπομονάδα A7 του 26S πρωτεοσωματίου και εμποδίζει την αποδόμηση του αναστολέα IκBa του NF-κB από το σύμπλεγμα ουβικιτίνης-πρωτεοσωματίου [306]. Τέλος έκφραση της MCP-1 λόγω σοβαρής ισχαιμίας οπίσθιου άκρου, που ενισχύθηκε έντονα από μεταφορά γονιδίων του FGF-2 και ο αποκλεισμός της MCP-1 δραστηριότητας μέσω μιας επικρατούσας αρνητικής μετάλλαξης, καθώς και η έλλειψη λειτουργικού CCR2 υποδοχέα της, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάκτησης της ροής του αίματος που οφειλόταν σε θεραπευτική νεοαγγείωση [307]. Η PlGF διεγείρει τη φλεγμονή, την αγγειογένεση και την ανάπτυξη παραπλευρών σε ισχαιμικό μυοκάρδιο και άκρο. Η φλεγμονώδης επίδραση της PlGF μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη κινητοποίηση των πρόδρομων μυελοϊκών κυττάρων, που προέρχονται από το μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα και στην αυξημένη διείσδυση λευκοκυττάρων, που εκφράζουν τον υποδοχέα τύπου VEGF I σε φλεγμονώδεις ιστούς και στην παρατεταμένη ενεργοποίηση των μυελοϊκών κυττάρων [308]. Ορμόνες όπως η αγγειοτασίνη II φαίνεται επίσης να ελέγχουν τη νεοαγγείωση [309-311]. Διείσδυση των φλεγμονωδών μονοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων, καταστέλλει στον ισχαιμικό ιστό τον υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II τύπου 1 σε AT1α-ανεπαρκή ποντίκια. Η μειωμένη νεοαγγείωση στο AT1α-ανεπαρκή ποντίκια αντιστρέφεται με ενδομυϊκή μεταμόσχευση μονοκυττάρων, που προέρχονται από άγριου τύπου ποντίκια, παρέχοντας ένδειξη, ότι η οδός του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II-AT1 προωθεί την ανάπτυξη των αιμοφόρων υποστηρίζοντας τη διήθηση των κυττάρων φλεγμονής και την έκφραση αγγειογενετικών κυτταροκινών [310, 312].

## 6. Υπόθεση και σκοποί της μελέτης

Κατά την προσπάθεια διευκρίνισης του μηχανισμού δράσης, αλλά και των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών, των αυξητικών παραγόντων της αγγειογένεσης, έχουν αναπτυχθεί, περιγραφεί και μελετηθεί διάφορα ζωικά μοντέλα χρόνιας ισχαιμίας άκρου. Σε ένα τέτοιο μοντέλο χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιου άκρου κόνικλου, έχει αποδειχθεί ότι από την στιγμή της εγκατάστασης της ισχαιμίας και για χρονικό διάστημα 10 ημερών, κινητοποιούνται ενδογενείς μηχανισμοί, που επάγουν την αγγειογένεση και οδηγούν σε ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας στο πάσχον άκρο (πιθανότατα λόγω της ενδογενούς απελευθέρωσης αγγειογενετικών παραγόντων). Μετά το χρονικό αυτό διάστημα και μέχρι την 40η ημέρα από την πειραματική εγκατάσταση της ισχαιμίας, δεν παρατηρείται περαιτέρω ανάπτυξη παράπλευρων αγγείων, σε σημαντικό τουλάχιστον βαθμό [313, 314]. Αυτός είναι και ο λόγος, που η μελέτη της ενδογενούς αγγειογεννητικής ικανότητας διενεργείται την 10η ημέρα από την εγκατάσταση της ισχαιμίας, ενώ εξωγενείς αγγειογενετικές ουσίες χορηγούνται και μελετώνται μετά την 10η ημέρα [315, 316].

Η χορήγηση εξωγενών αγγειογενετικών παραγόντων σε πολλές μελέτες επί πειραματόζωων, δρα ευνοϊκά, επάγοντας την αγγειογένεση τοπικά, εκεί όπου και χορηγήθηκαν [315, 317]. Το θέμα όμως της συστηματικής δραστηριότητας των ουσιών αυτών παραμένει ανοιχτό. Σε κάποιες από τις μελέτες αυτές, η αγγειογένεση αφορούσε τόσο το μέλος στο οποίο χορηγούνταν τοπικά οι αγγειογενετικές ουσίες, όσο και το ετερόπλευρο σκέλος. Σε μια πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οιστρογόνα, τα οποία επήγαγαν τη νεοαγγείωση όχι μόνο στο ισχαιμικό άκρο, αλλά και στο ετερόπλευρο, μη ισχαιμικό άκρο κόνικλου [318].



Άλλες, ωστόσο, μελέτες, όπως μια πρόσφατη των Gowdak et al., έδειξαν ότι η χορήγηση, μέσω αδενοϊού, του γονιδίου που κωδικοποιεί τον VEGF21, προκάλεσε νεοαγγείωση μόνο τοπικά, στο μη ισχαιμικό σκέλος στο οποίο χορηγήθηκε και όχι στο ετερόπλευρο άκρο. Στην ίδια αυτή μελέτη φάνηκε, ότι η επαγόμενη νεοαγγείωση δρούσε προστατευτικά, βελτιώνοντας την ιστική αιμάτωση μετά την επαγωγή ισχαιμίας στο ενιόμενο άκρο των ζωικών μοντέλων (κουνέλια και επίμυες) που χρησιμοποιήθηκαν [319].

Το θέμα της συστηματικής δράσης των τοπικά χορηγούμενων αγγειογενετικών ουσιών χαρακτηρίζεται επίσης από αντικρουόμενα δεδομένα. Στην προαναφερθείσες μελέτες, τόσο η ισχαιμία του οπισθίου άκρου, όσο και τα χορηγούμενα οιστρογόνα, παρά την ανάπτυξη της τοπικής νεοαγγείωσης, δεν προκάλεσαν αγγειογένεση στη μη ισχαιμική καρδιά. Σε άλλες όμως μελέτες, η ισχαιμική προετοιμασία ενός σκέλους φάνηκε να είχε συστηματικές επιδράσεις [197]. Οι δε Kharbanda et al., [320] έδειξαν ότι η παροδική ισχαιμία άκρου στους ανθρώπους, δρα ως ισχαιμική προθέρμανση και για απομακρυσμένες περιοχές, ένα δεδομένο με πιθανές σημαντικές κλινικές συνέπειες και εφαρμογές.

### *Υπόθεση*

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, διαμορφώσαμε την εξής υπόθεση:

Αμέσως μετά την εγκατάσταση πλήρους και οξείας ισχαιμίας σε ένα άκρο ζώου, κινητοποιούνται μηχανισμοί νεοαγγείωσης, που περιλαμβάνουν ενδογενείς αγγειογενετικούς παράγοντες. Οι ενδογενείς αυτοί παράγοντες, όπως έχει αποδειχθεί, προκαλούν την ανάπτυξη παράπλευρων αγγείων στο πάσχον άκρο. Εάν λοιπόν και παρά τα αντικρουόμενα δεδομένα, η εξωγενής χορήγηση αγγειογενετικών παραγόντων επάγει την αγγειογένεση και σε απομακρυσμένα

σημεία του σώματος [318], υποθέτουμε ότι και οι ενδογενείς αγγειογεννητικοί μηχανισμοί έχουν παρομοίως απομακρυσμένες επιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, υποθέτουμε ότι οι μηχανισμοί αυτοί, στο χρονικό διάστημα των 10 ημερών στο οποίο και δρουν, προωθούν την αγγειογένεση και την ανάπτυξη παραπλεύρων αγγείων στη μη ισχαιμική καρδιά. Εάν η υπόθεση αυτή ευσταθεί, τότε ενδέχεται η διεργασία αυτή να μειώνει την έκταση ενός μελλοντικού εμφράγματος.

### *Σκοποί της μελέτης*

Με βάση την παραπάνω υπόθεση, σχεδιάσαμε ένα πρωτόκολλο έρευνας, βασισμένο στο μοντέλο της χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιου άκρου και εξετάσαμε τα παρακάτω ερωτήματα:

Δύναται η χρόνια ισχαιμία του οπίσθιου άκρου να επάγει μια εξ' αποστάσεως αγγειογένεση σε όργανα πλούσια σε αιματική ροή, όπως είναι η καρδιά και κατά συνέπεια να αυξηθεί το παράπλευρο στεφανιαία δίκτυο στη μη ισχαιμική καρδιά;

Εάν η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα είναι καταφατική, είναι τότε το νεοδημιουργηθέν παράπλευρο δίκτυο λειτουργικό και ικανό να διατηρήσει τη στεφανιαία ροή σε συνθήκες ισχαιμίας του μυοκαρδίου μειώνοντας την έκταση του εμφράγματος;

Εν κατακλείδει, υπάρχει συσχετισμός της δράσης της χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιου άκρου με τα καρδιοπροστατευτικά καθιερωμένα πρωτόκολλα της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας;

Για την απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα, στο μοντέλο χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιου άκρου πειραματόζωου (επίμυες και κόνικλοι) προκαλούμε πειραματικά έμφραγμα μυοκαρδίου σε συνθήκες *in vivo* και *ex vivo*. Τα καταληκτικά σημεία που θα μελετηθούν είναι:

- α) η έκταση του εμφράγματος σε συνθήκες *in vivo*
- β) η λειτουργικότητα και οι αιμοδυναμικές παράμετροι της αριστερής κοιλίας κατά την μυοκαρδιακή ισχαιμία/επαναιμάτωση σε συνθήκες *ex vivo*
- γ) το μέγεθος της στεφανιαίας ροής προ και κατά μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε συνθήκες *ex vivo*
- γ) η νεοαγγείωση, με την έννοια τόσο του απόλυτου αριθμού, όσο και της πυκνότητας των παράπλευρων αγγείων, που αναπτύσσονται στον καρδιακό ιστό
- δ) η σύγκριση της επίδρασης στη μείωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου μεταξύ της χρόνιας ισχαιμίας, της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.



## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Υλικά και μέθοδοι

#### 1. Επιλογή πειραματικού πρότυπου

Για τη μελέτη του παθοφυσιολογικού μηχανισμού του εμφράγματος του μυοκαρδίου έχουν δημιουργηθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα προς αυτό το σκοπό. Τα μοντέλα επεκτείνονται από μεγάλα ζωικά μοντέλα σχεδιασμένα να μιμούνται την ανθρώπινη κλινική κατάσταση μέχρι επίμυες, ποντίκια με τροποποιημένα γονίδια (*in vivo*), απομονωθείσες καρδιές (*ex vivo*) και καλλιέργειες κυττάρων (*in vitro*). Για την καθιέρωση ενός χρήσιμου μοντέλου μελέτης ισχαιμικής καρδιακής νόσου δε χρειαζόμαστε μόνο ένα μοντέλο παθογενετικού μηχανισμού, δηλαδή να κατανοήσουμε πώς και γιατί παρουσιάστηκε η βλάβη και η δυσλειτουργία, αλλά και μοντέλα για την ανάπτυξη περαιτέρω παρεμβάσεων, όπως χειρουργικών, επαναγγείωσης, μηχανικής ιστών και μεγάλου φάσματος φαρμακευτικών δοκιμών.

Τα πειραματικά μοντέλα, που στοχεύουν στη μελέτη της ισχαιμίας του μυοκαρδίου στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου οργανισμού είναι σημαντικά δεδομένου των περιορισμών, που ανακύπτουν κατά τις ανθρώπινες δοκιμές. Εάν ο ερευνητής επιθυμεί να είναι κοντά στις συνθήκες της ανθρώπινης ιατρικής ή μελετά την επιρροή των εξωκαρδιακών παραγόντων στις ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις, το πρότυπο της επιλογής θα πρέπει να είναι σε ζώντα οργανισμό. Αυτό περιλαμβάνει επίσης την ανάπτυξη νέων κλινικών μεθόδων, εργαλείων και φαρμακευτικών ουσιών. Τα περισσότερα σε ζώντες οργανισμούς (*in vivo*) πειράματα ισχαιμίας

μυοκαρδίου έχουν καθιερωθεί στο σκύλο, το χοίρο, το κόνικλο, τον επίμου ή το ποντίκι. Αν και άλλα είδη έχουν χρησιμοποιηθεί, η συσσωρευμένη εμπειρία αυτών των συχνά χρησιμοποιημένων εργαστηριακών ζώων σε συνθήκες μυοκαρδιακής ισχαιμίας δεν μπορεί να παραβλεφθεί.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις και με κύρια κριτήρια το μοντέλο της πειραματικής πρόκλησης οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου να χαρακτηρίζεται από αξιοπιστία και επαναληψιμότητα στην εφαρμογή του, όπως και από τη δυνατότητα εφαρμογής αυτής τόσο σε συνθήκες *in vivo*, όσο και *ex vivo*, καταλήξαμε στην επιλογή για τη δική μας μελέτη στον ο επίμου του γένους *Wistar* και στο κόνικλο του γένους *New Zealand*.

## **1.1. Επίμους**

### **1.1.1. Η ανατομία της στεφανιαίας κυκλοφορίας στον επίμου**

Οι δύο στεφανιαίες αρτηρίες μετά την έκφυσή τους από την αορτή, εισχωρούν στο μυοκάρδιο και περιβάλλονται από αυτό καθ' όλη τη διαδρομή τους. Συγκεκριμένα, η αριστερή στεφανιαία αρτηρία μετά την έκφυσή της, διέρχεται ανάμεσα από την αριστερή πλευρά του πνευμονικού κώνου και το ωτίο του αριστερού κόλπου. Η ανατομική θέση των στεφανιαίων αγγείων και το μικρό τους μέγεθος καθιστά δύσκολη, αν όχι αδύνατη, την προσπέλασή τους με γυμνό οφθαλμό. Η αιμάτωση της αριστερής κοιλίας γίνεται στο μεγαλύτερο μέρος της από έναν μόνο κύριο κλάδο, ο οποίος διχάζεται κοντά στην κορυφή της καρδιάς. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι στον επίμου δεν εκφύεται περισπώμενος κλάδος από την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Κατά μήκος του αγγείου εκφύονται μικροί κλάδοι, οι οποίοι

όμως δεν είναι σημαντικοί. Αντίστοιχα με την αριστερή στεφανιαία αρτηρία, η δεξιά πορεύεται μεταξύ του δεξιού χείλους του πνευμονικού κώνου και του σύστοιχου ωτίου.

### **1.1.2. Ο επίμυς ως μοντέλο ισχαιμίας μυοκαρδίου**

Το μοντέλο επίμυος τμηματικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας και εμφράγματος σε συνθήκες *in vivo* έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από τρεις δεκαετίες. Όταν χρησιμοποιείται χωρίς επαναιμάτωση, αυτό το πρότυπο είναι συνήθως κατάλληλο για τη μελέτη αναδιαμόρφωσης καρδιακού ιστού (*remodeling*) και τη μετεφραγματική καρδιακή ανεπάρκεια, όπως και για την εξακρίβωση ινώδους ιστού και φλεγμονής σχετιζόμενη με την επισκευή αυτού [321]. Για τον προσδιορισμό της έκτασης και των ορίων του εμφράγματος του μυοκαρδίου, η επαναιμάτωση είναι υποχρεωτική, επειδή η καρδιά των επίμυων (όπως του κόνικλου και του ποντικιού) δεν έχει παράπλευρη στεφανιαία κυκλοφορία οπότε και η διακοπή της ροής αίματος σε μια περιοχή οδηγεί στην απώλεια μυοκαρδιακών κυττάρων σε εκείνο το τμήμα. Η διαδικασία επαναιμάτωσης και προσδιορισμού του μεγέθους του εμφράγματος στον επίμυ δίνουν τη δυνατότητα για τη δημιουργία και καθιέρωση πρωτοκόλλων, που αφορούν την καθυστέρηση κυτταρικού θανάτου και επιφέρουν καρδιοπροστασία σε ένα πρότυπο ζώοντα οργανισμό [322]. Οι δυνατότητες για μετρήσεις αιμοδυναμικών παραμέτρων είναι περιορισμένες στην καρδιά αρουραίων και πραγματοποιούνται κατά κύριο λόγο σε συνθήκες *ex vivo* με τη μέθοδο της απομονωθείσας καρδιάς.

## **1.2. Κόνικλος**

### **1.2.1. Η ανατομία της στεφανιαίας κυκλοφορίας στον κόνικλο**

Οι στεφανιαίες αρτηρίες στον κόνικλο, όπως περιγράφονται από παλιότερες μελέτες [323] διακρίνονται στη δεξιά και αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Το μεγαλύτερο μέρος της καρδιάς τροφοδοτείται από την αριστερή στεφανιαία και τους κλάδους της. Εκτός από εκείνους τους κλάδους, που αιματώνουν το τοίχωμα της αριστερής κοιλίας, ένας μεγάλος διαφραγματικός κλάδος εκφύεται επίσης από την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. Αντίθετα, δε συναντάται αριστερός κοιλιακός κλάδος προς τον καρδιακό κόμβο και ούτε οπίσθος κατιόντας. Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά των στεφανιαίων αρτηριών του κουνελιού είναι μια κυρίως ενδοκαρδιακή πορεία ακόμη και των κύριων κορμών και μια απόκλιση και των κύριων δεξιών και αριστερών στεφανιαίων αρτηριών στο επίπεδο της κολποκοιλιακής αύλακας. Αντίθετα από τον άνθρωπο, τα κυρίως σώματα των στεφανιαίων αρτηριών βυθίζονται νωρίς στο μυοκάρδιο, διέρχονται έξω και πλάγια στα τοιχώματα των αντίστοιχων κοιλιών τους και διαιρούνται τελικά στην επιφάνειά τους. Η κατανομή αυτή αφήνει την περιοχή του κόμβου παραδόξως τρωτή σε απόφραξη, δεδομένου ότι υπάρχει μικρή ανατομική δυνατότητα για τη αναστόμωση σε αυτήν την περιοχή [323]. Για τον κολποκοιλιακό κόμβο και τη δέσμη του, η μόνη διαθέσιμη αρτηριακή τροφοδοσία είναι αυτή από τη διαφραγματική αρτηρία. Στην προέλευσή τους, οι κλάδοι από τη διαφραγματική αρτηρία είναι κάθετοι στο μακρύ άξονά της και διασχίζουν προς τα επάνω το δεξί κοιλιακό διαφραγματικό ενδοκάρδιο για να φθάσουν στο δεμάτιο του His και έπειτα τον κολποκοιλιακό κόμβο. Αυτή η διαδρομή αρτηριακής αιμάτωσης είναι



διαφορετική από ότι στον άνθρωπο, στον οποίο ο ανεφοδιασμός αίματος αυτής της περιοχής προέρχεται από την οπίσθια περιοχή του κοιλιοκοιλιακού κόμβου εκφυόμενος από τον καρδιακό κόμβο. Στον κόνικλο παρουσιάζεται μια μόνο ενδοκοιλιακή αρτηρία, εκφυόμενη από τον αριστερή περισπώμενη αρτηρία χωρίς ενδοκοιλιακούς κλάδους της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας.

### **1.2.2. Ο κόνικλος ως μοντέλο ισχαιμίας μυοκαρδίου**

Τα μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας στους κόνικλους σε συνθήκες *in vivo* μπορούν να είναι τόσο οξέα, όσο και χρόνια. Αυτό περιγράφεται εκτενέστατα από το Downey και τους συναδέλφους σε μελέτες τμηματικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας, ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας και φαρμακευτικής καρδιοπροστασίας [322, 324-326]. Ένα πλεονέκτημα αυτού του πειραματικού μοντέλου είναι η δυνατότητα να μεταφερθούν τα αποτελέσματα από τη τεχνική απομονωθείσας καρδιάς (*ex vivo*) σε πειραματικές συνθήκες *in vivo* χωρίς την αλλαγή του ζωικού είδους. Αυτό το πλεονέκτημα βρίσκει εφαρμογή στα πρότυπα των επίμυων και των ποντικιών. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι μέσω της σίτισης (για παράδειγμα λιπιδαιμική διατροφή) μπορούν να προκληθούν αρτηριοσκληρυντικές αλλαγές στο στεφανιαίο τους δίκτυο.

## 2. Το πειραματικό πρωτόκολλο

Η μελέτη περιελάμβανε αρσενικούς επίμους του γένους Wistar βάρους  $252 \pm 23$  γραμμαρίων και αρσενικούς κόνικλους του γένους New Zealand βάρους 2.8-3.5 χιλιογραμμάρων. Τα πειραματόζωα έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα και το πρωτόκολλο είναι σύμφωνο με την Ελληνική (Προεδρικό Διάταγμα υπ' αριθ. 160/ 3 Μαΐου 1991, τεύχος πρώτο, αριθμός φύλλου 64) και Ευρωπαϊκή νομοθεσία (*European Union directive for the protection of animals used for scientific purposes*, 2010/63/EU) για τη φροντίδα και χρήση εργαστηριακών ζώων. Όλα τα πειραματόζωα παρέμειναν σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και δωδεκάωρη εναλλαγή φωτός-σκότους, ενώ η πρόσβασή τους σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη.

Η μελέτη αποτελείται από δύο μέρη, που περιγράφονται παρακάτω.

### 2.1. Πρώτο μέρος της μελέτης

Στο πρώτο μέρος της μελέτης 110 επίμους τυχαιοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Στους μισούς επίμους κάθε ομάδας προκλήθηκε περιφερική ισχαιμία στο αριστερό οπίσθιο άκρο με βάση το μοντέλο ισχαιμίας οπίσθιου άκρου κόνικλου [317], ενώ στους άλλους μισούς πραγματοποιήθηκε εικονική επέμβαση και αποτέλεσαν τους μάρτυρες του πειράματος. Τα ζώα μετά την πρόκληση της αρτηριακής ανεπάρκειας παρέμειναν πέραν της καθημερινής τους φροντίδας χωρίς περαιτέρω παρεμβάσεις για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων.

### *A Ομάδα*

Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, στους επίμυες της πρώτης ομάδας (n=50) προκλήθηκε οξεία ισχαιμία του μυοκαρδίου (in vivo) χωρίς επαναιμάτωση με σύγκλιση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας με ράμμα. Μετά το πέρας είκοσι τεσσάρων ωρών, τα ζώα που επιβίωσαν θυσιάστηκαν με σκοπό να εκτιμήσουμε το μέγεθος του εμφράγματος.

### *B Ομάδα*

Στη δεύτερη ομάδα οι επίμυες (n=20) υπέστησαν ευθανασία, οι καρδιές αφαιρέθηκαν και μελετήθηκαν με τη μέθοδο της απομονωθείσας καρδιάς (ex vivo). Οι καρδιές, αμέσως μετά την αφαίρεση τους αρδεύθηκαν ανάδρομα σε διάταξη Langendorff, όπου αρχικά σταθεροποιήθηκαν και εν συνεχεία επιτεύχθηκε με διακοπή της άρδευσης, ολική ισχαιμία μυοκαρδίου χρονικού διαστήματος είκοσι λεπτών (20min) με ακόλουθη επαναιμάτωση σαράντα πέντε λεπτών (45min). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας καταγράφηκαν οι αιμοδυναμικοί παράμετροι της καρδιακής λειτουργίας, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, όπως επίσης και στη φάση της επαναιμάτωσης.

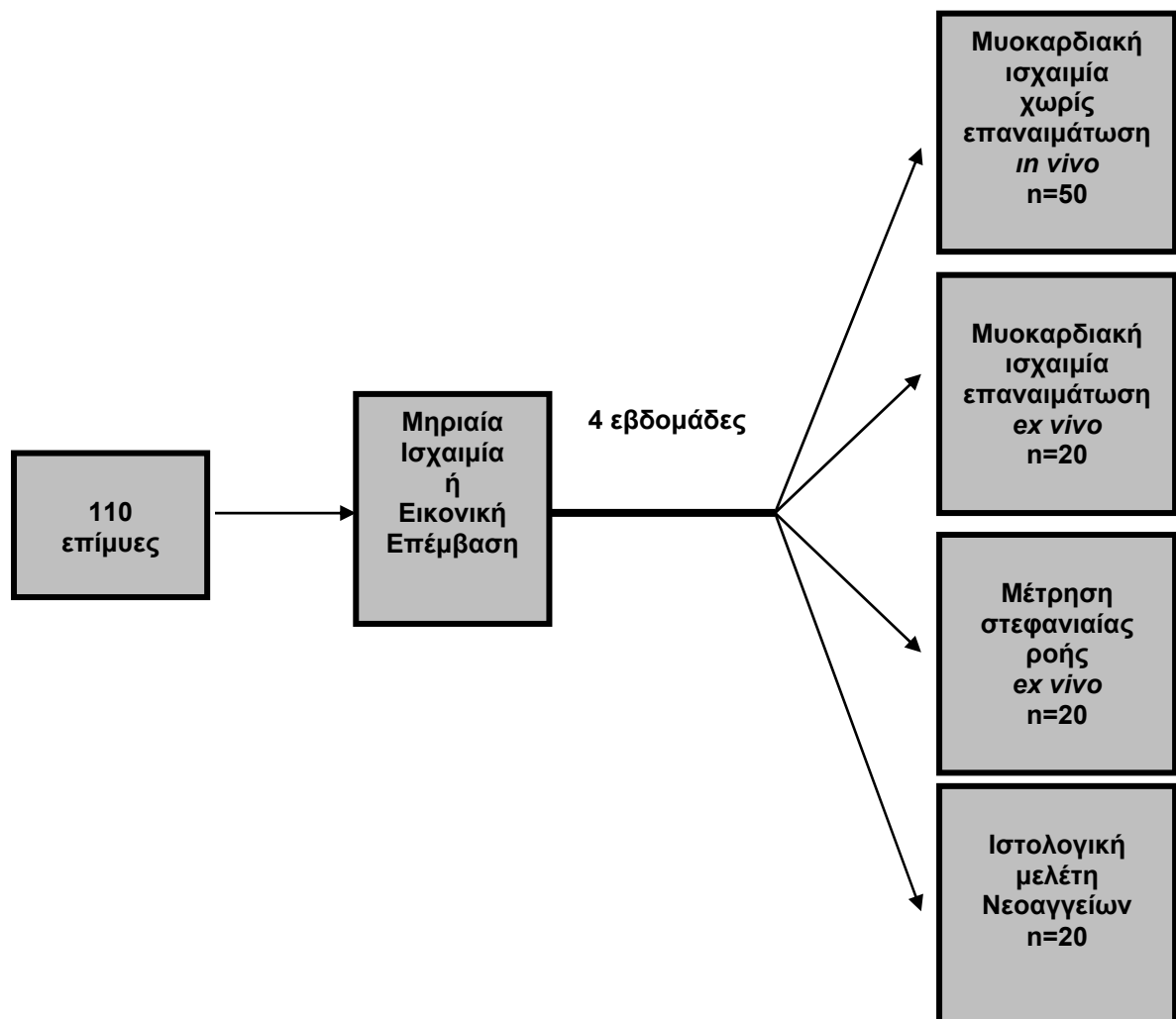
### *Γ Ομάδα*

Οι επίμυες της τρίτης ομάδας (n=20) χρησίμευσαν στη μέτρηση της παράπλευρης στεφανιαίας ροής με τη μέθοδο της απομονωθείσας καρδιάς σε διάταξη Langendorff. Η στεφανιαία ροή προσδιορίστηκε αρχικά σε διαφορετικές διαδοχικές πιέσεις των στεφανιαίων αγγείων. Κατόπιν τούτου, υπό τμηματική μυοκαρδιακή ισχαιμία επαναπροσδιορίστηκε η στεφανιαία ροή στις ίδιες με προηγουμένως πιέσεις.

### Δ Ομάδα

Τέλος στην τέταρτη ομάδα επίμυων (n=20) μετά την ευθανασία αυτών ακολούθησε ιστολογική εξέταση της καρδιάς για τον προσδιορισμό και καταμέτρηση νεοαγγείων.

Σχηματικά το πρώτο μέρος του πειραματικού πρωτοκόλλου απεικονίζεται στο διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Πρώτο μέρος της μελέτης.

## 2.2. Δεύτερο μέρος της μελέτης

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης 120 κόνικλοι τυχαιοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Όπως και στο πρώτο μέρος οι μισοί κόνικλοι σε κάθε ομάδα χρησίμευσαν ως μάρτυρες με μόνη παρέμβαση αυτή της εικονικής επέμβασης, ενώ οι υπόλοιποι υποβλήθηκαν σε εγχείρηση πρόκλησης περιφερικής αρτηριακής ανεπάρκειας αριστερού οπισθίου άκρου. Το διάστημα των τεσσάρων εβδομάδων προ των περαιτέρω πειραματικών διαδικασιών τηρήθηκε και εδώ.

### *A Ομάδα*

Στην πρώτη ομάδα (n=30) μετά από αναισθησία και διασωλήνωση ακολούθησε οξεία ισχαιμία μυοκαρδίου με σύγκλιση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας με ράμμα για διάστημα 30 λεπτών και επαναιμάτωση διάρκειας 180 λεπτών. Αμέσως μετά το τέλος της επαναιμάτωσης τα ζώα θανατώθηκαν και οι καρδιές τους αφαιρέθηκαν με σκοπό τη μέτρηση της έκτασης της ισχαιμικής και εμφραγματικής περιοχής και τον υπολογισμό του λόγου της εμφραγματικής προς την ισχαιμική περιοχή (I/R).

### *B Ομάδα*

Στη δεύτερη ομάδα κόνικλων (n=20) εφαρμόστηκε πρωτόκολλο ισχαιμικής προετοιμασίας αποτελούμενο από δύο κύκλους ισχαιμίας διάρκειας 5 λεπτών και επαναιμάτωσης 10 λεπτών αντίστοιχα. Η λήξη του δεύτερου κύκλου επαναιμάτωσης της προετοιμασίας πλαισιώθηκε από την παρατεταμένη μυοκαρδιακή ισχαιμία (30 λεπτά) και εν συνεχεία από την επαναιμάτωση (180

λεπτά). Όμοια ακολουθήθηκε η διαδικασία προσδιορισμού του κλάσματος εμφραγματικής προς ισχαιμικής περιοχής.

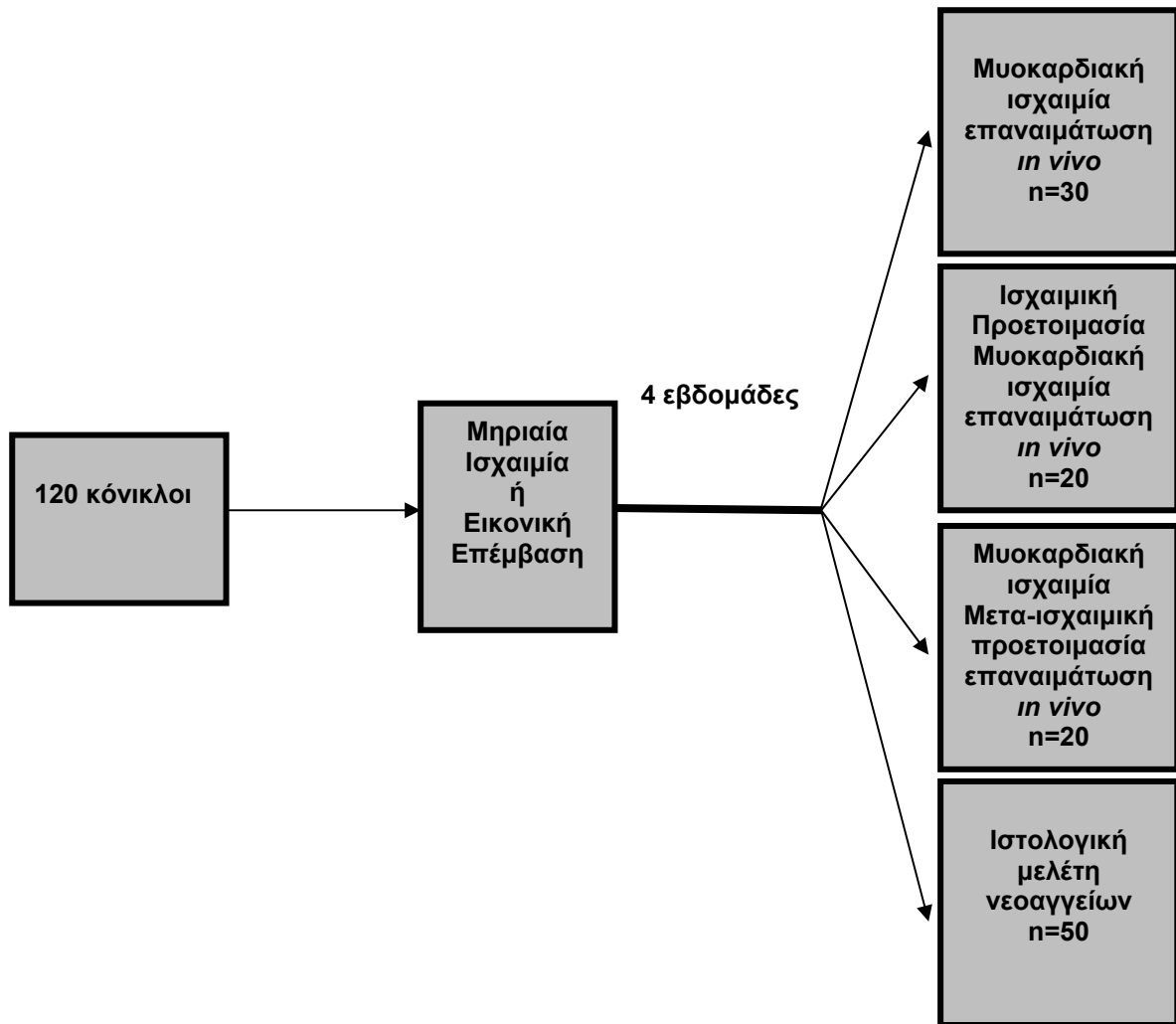
#### *Γ Ομάδα*

Οι κόνικλοι της τρίτης ομάδας (n=20) υποβλήθηκαν μεταξύ μυοκαρδιακής ισχαιμίας (30 λεπτά) και έναρξης της επαναιμάτωσης (180 λεπτά) σε μετα-ισχαιμική προετοιμασία έξι κύκλων ισχαιμίας-επαναιμάτωσης διάρκειας 10 δευτερολέπτων έκαστος. Ο λόγος εμφραγματική προς ισχαιμική περιοχή υπολογίστηκε με τη λήξη της επαναιμάτωσης.

#### *Δ Ομάδα*

Τέλος οι κόνικλοι της τέταρτης ομάδας (n=50) θυσιάστηκαν και οι καρδιές τους χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική μελέτη. Όπως και στους επίμυες έγινε προσδιορισμός και καταμέτρηση νέων παράπλευρων στεφανιαίων αγγείων.

Σχηματικά το δεύτερο μέρος της μελέτης απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.

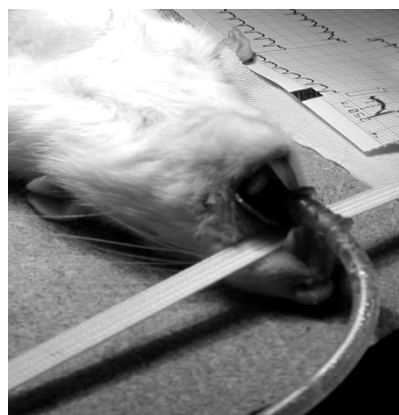


Διάγραμμα 2: Δεύτερο μέρος της μελέτης.

### 3. Τεχνικές στους επίμυες

#### 3.1. Αναισθησία

Αρχικά οι επίμυες τοποθετούνται σε ειδικό κουτί εμποτισμένο με αιθέρα για δύο με τρία λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αναισθητοποίηση των ζώων, προκειμένου στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η διασωλήνωση (εικόνα 1). Η διασωλήνωση της τραχείας γίνεται με φλεβοκαθετήρα μεγέθους 16G με τη βοήθεια λαρυγγοσκοπίου, ο οποίος συνδέεται με κατάλληλο αναπνευστήρα (μοντέλο 7025, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy), στις ακόλουθες ρυθμίσεις: εισπνεόμενος όγκος=3ml, συχνότητα=70 αναπνοές ανά λεπτό. Η επιτυχία της διασωλήνωσης επιβεβαιώνεται με την καλή έκπτωση του θώρακα όσο ο επίμυς είναι στον αναπνευστήρα. Η αναισθησία διατηρείται με τη χορήγηση μείγματος 100% οξυγόνου και 2% ισοφλουρανίου. Η χορήγηση μείγματος ισοφλουρανίου και οξυγόνου αποδεδειγμένα έχει πολύ καλά αποτελέσματα με χαμηλή περιεγχειρητική θνητότητα της τάξης του 5 % και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων μας [327].

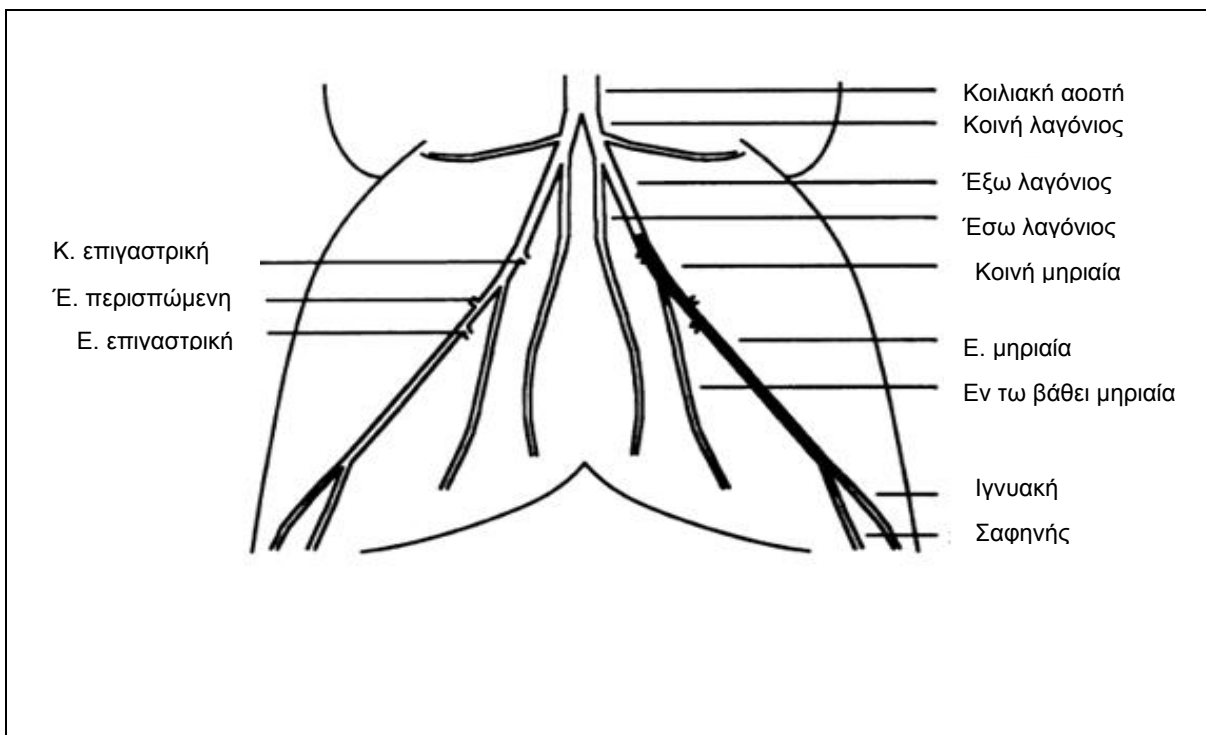


Εικόνα 1: Η διασωλήνωση.



### 3.2. Πρόκληση περιφερικής ισχαιμίας

Μετά από αναισθησία, όπως περιγράφεται παραπάνω, διενεργείται επιμήκης τομή κάτω από τον αριστερό βουβωνικό σύνδεσμο. Μέσω της τομής αυτής αποκαλύπτεται και παρασκευάζεται καθ' όλο το μήκος της η μηριαία αρτηρία μαζί με τους κυρίους κλάδους της (την κάτω επιγαστρική, την εν τω βάθει μηριαία, την έξω περισπώμενη και την επιπολής επιγαστρική). Παρασκευάζονται επίσης και οι περιφερικότεροι τελικοί της κλάδοι, η ιγνυακή και η σαφηνής αρτηρία. Ακολουθεί απολίνωση της έξω λαγονίου αρτηρίας και των προαναφερθέντων κύριων κλάδων της μηριαίας. Τέλος, η μηριαία αρτηρία αφαιρείται ολοκληρωτικά, από την έκφυσή της μέχρι προ του διχασμού της σε ιγνυακή και σαφηνή αρτηρία (εικόνα 2)



Εικόνα 2: Περιφερική ισχαιμία στους επίμυες. Η σκιασμένη περιοχή της μηριαίας αρτηρίας είναι αυτή που αφαιρείται.

Ακολουθεί σύγκλιση του χειρουργικού τραύματος με ράμμα μετάξης 3-0. Μετά την επέμβαση τα πειραματόζωα αναρρώνουν κάτω από στενή παρακολούθηση και φροντίδα.

Κάθε ζώο λαμβάνει χλωριονατριούχο ορό 0,9% (50 ml υποδορίως) κατά την διάρκεια της επεμβάσεως. Επίσης την ημέρα της επεμβάσεως και για 5 ημέρες μετά, χορηγείται αντιβιοτική προφύλαξη (κεφαζολίνη, 15 mg/kg ενδομυϊκά ημερησίως). Καθ' όλη την μετεγχειρητική περίοδο το ζώο λαμβάνουν επί ενδείξεων δυσφορίας, αναλγησία (βουπρενορφίνη 0,04 mg/kg υποδορίως).

Η εικονική επέμβαση στα ζώα-μάρτυρες περιλαμβάνει παρόμοια αναισθησία, τη διενέργεια της επιμήκους τομής και στο τέλος τη συρραφή του τραύματος. Η χορήγηση υγρών, αντιβιοτικής προφύλαξης και αναλγησίας είναι επίσης η ίδια.

Τέσσερις εβδομάδες μετά την επέμβαση, όλοι οι επίμυες εξετάζονται κλινικά για σημεία μυϊκής ατροφίας και απομακρυσμένης νέκρωσης. Η νέκρωση θεωρείται σημαντική, εφόσον είναι μακροσκοπικά εμφανής, στον άκρο πόδα ή τον αστράγαλο. Το διάστημα αυτό, επιβάλλεται προκειμένου να αναρρώσουν οι επίμυες και να ολοκληρωθεί η ενδογενής αγγειογένεση. Σε προηγούμενες μελέτες φαίνεται, ότι η κινητοποίηση των ενδογενών αγγειογεννητικών μηχανισμών και ο σχηματισμός παράπλευρων αγγείων συμβαίνει και ολοκληρώνεται μέσα σε χρονικό διάστημα τουλάχιστον 10 ημερών [313-315, 317].

### 3.3. Τεχνική πρόκλησης εμφράγματος

Το μοντέλο πρόκλησης εμφράγματος πραγματοποιείται σύμφωνα με την μεθοδολογία, που περιγράφεται σε ανάλογες δημοσιεύσεις [328, 329]. Το πειραματόζωο λαμβάνει αναισθησία και αερισμό, όπως περιγράφεται πιο πάνω. Μετά από ξύρισμα, διενεργείται αριστερή θωρακοτομή, όπως αυτή περιγράφηκε από τους Sellye et al., [329] και τροποποιήθηκε από τους Hu et al., [330]. Οι θωρακικοί μύες τέμνονται εγκαρσίως αποκαλύπτοντας τον θωρακικό κλωβό. Ενίοτε, η έσω μαστική αρτηρία τραυματίζεται, ωστόσο η αιμορραγία σταματά αυτόματα. Ένα κυρτό ψαλίδι με αμβλύ άκρο εισάγεται μεταξύ 5<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> πλευράς, περίπου 2 mm αριστερά από το στέρνο. Με την προσπέλαση αυτή αποφεύγουμε τον τραυματισμό και την αιμορραγία από την έσω επιγαστρική αρτηρία. Το χάσμα διευρύνεται με την άσκηση ελαφράς πίεσης και εν συνεχεία τέμνεται η 6<sup>η</sup> πλευρά με ανατομικό ψαλίδι. Το περικάρδιο αφαιρείται με χρήση λαβίδας. Εν συνεχεία η καρδιά συλλαμβάνεται με ράμμα μέταξας 6-0 (ethicon) από την κορυφή της και εξωτερικεύεται με έλξη χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία. Ακολουθώντας εισαγάγουμε ένα ράμμα μέταξας 6-0 στον πνευμονικό κώνο, φροντίζοντας να αναδυθεί περίπου στο σημείο έκφυσης του αριστερού ωτίου. Με την περίδεση του ράμματος αυτού, επιτυγχάνουμε απολίνωση του προσθίου κατιόντος κλάδου πολύ κοντά στην έκφυσή του, προκαλώντας ένα εκτεταμένο έμφραγμα. Εφόσον μάλιστα τα παραπάνω ανατομικά οδηγία σημεία ακολουθούνται με συνέπεια, τα εμφράγματα, που προκαλούνται τοιουτοτρόπως έχουν συγκρίσιμα μεγέθη [328, 330, 331]. Η καρδιά επανατοποθετείται στην θέση της, εντός του θώρακα και το θωρακικό τοίχωμα συγκλείεται με τη συρραφή των μεσοπλευρίων μυών. Με την εφαρμογή ελαφράς πλευρικής πίεσης, ο αέρας απομακρύνεται από την θωρακική κοιλότητα

και καθώς το δέρμα, το υποδόριο και οι μύες λειτουργούν ως βαλβίδα, ο πνευμοθώρακας εκκενώνεται. Λίγο μετά την διακοπή του χορηγούμενου ισοφλουρανίου, το ζώο ανακτά τις αισθήσεις του. Η θνητότητα της επέμβασης αυτής, σύμφωνα με την εμπειρία μας, ανέρχεται σε περίπου 5%.

### 3.4. Ευθανασία και υπολογισμός μεγέθους εμφράγματος

Η μέτρηση του μεγέθους της εμφραγματικής περιοχής στο συγκεκριμένο πειραματικό πρότυπο έγινε με τη βοήθεια της χρώσης του χλωριούχου τριφενυλτετραζολίου. Η εφαρμογή της μεθόδου είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στη διεθνή βιβλιογραφία. Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα των ενζύμων της διϋδρογενάσης και των συμπαραγόντων τους να αντιδρούν με τα άλατα τετραζολίου στους ιστούς και να σχηματίζουν μια επιφάνεια ροζ απόχρωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το μυοκάρδιο, που έχει επιβιώσει μετά την πειραματική πρόκληση της οξείας ισχαιμίας να χρωματίζεται ροζ, ενώ οι νεκρωμένες περιοχές να αναγνωρίζονται ως αποχρωματισμένες (λευκή περιοχή), (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Παρασκευάσμα καρδιάς επίμυος μετά από χρώση με χλωριούχο τριφενυλτετραζόλιο. Η κόκκινη χρώση αντιστοιχεί σε υγρή και ισχαιμική περιοχή, ενώ η λευκή χρώση σε νεκρωμένο μυοκάρδιο.

Η μέθοδος του χλωριούχου τριφενυλτετραζολίου είναι ικανή να ανιχνεύει την μυοκαρδιακή νέκρωση, αφού περάσουν τουλάχιστον 3 ώρες από την έναρξη της ισχαιμίας στους επίμυες. Στη δική μας μελέτη, τα πειραματόζωα υπόκεινται στη διαδικασία αυτή 24 ώρες μετά την πρόκληση της ισχαιμίας. Πιο συγκεκριμένα, οι επίμυες αναισθητοποιούνται και με τη βοήθεια ψαλιδιού, γίνεται τομή του διαφράγματος χωρίς να προκληθεί τραυματισμός των οργάνων της θωρακικής κοιλότητας. Ακολούθως, γίνεται αποκλεισμός της αορτής με κυρτή λαβίδα και έγχυση χλωριούχου καλίου στην αριστερή κοιλία της καρδιάς, με σκοπό τη διακοπή της μηχανικής λειτουργίας της καρδιάς στη φάση της διαστολής [322, 332-334].

Από τη καρδιά, που αφαιρείται από το ζώο, απομακρύνεται το περικάρδιο και το μυοκάρδιο των δύο κόλπων και της δεξιάς κοιλίας. Η απομονωμένη αριστερή κοιλία παραμένει στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 1 με 2 ώρες και στη συνέχεια τεμαχίζεται σε 4 με 5 παράλληλες φέτες. Τα τεμάχια αυτά εμβαπτίζονται σε διάλυμα χλωριούχου τριφενυλτετραζολίου 1% για 15 με 20 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Αμέσως μετά οι φέτες τοποθετούνται σε διάλυμα φορμόλης 10% για άλλα 20 λεπτά περίπου, προκειμένου να μονιμοποιηθεί η χρώση και να επιτύχουμε πιο έντονη αντίθεση. Μετά την αποξήρανση του ιστού, οι φέτες τοποθετούνται ανάμεσα σε δύο αντικειμενοφόρες πλάκες, με σταθερή απόσταση μεταξύ τους της τάξης των 2mm, και σαρώνονται με υψηλή ανάλυση (Scanjet 4750c/5500c, Hewlett- Packard, Palo Alto, CA, USA). Οι εικόνες, που λαμβάνονται αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Από τις εικόνες αυτές και με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (Image Tool, University of Texas, USA), υπολογίζονται οι επιφάνειες της εμφραγματικής και μη περιοχής. Το κλάσμα της εμφραγματικής περιοχής, ως προς ολόκληρη την επιφάνεια κάθε φέτας πολλαπλασιάζεται με το βάρος της

φέτας, με σκοπό να υπολογίσουμε την εμφραγματική μάζα. Το άθροισμα της εμφραγματικής μάζας σε κάθε φέτα διαιρείται με τη συνολική μάζα της αριστερής κοιλιάς, και έτσι υπολογίζουμε το μέγεθος του εμφράγματος.

*Εμφραγματική περιοχή/Μάζα αριστερής κοιλιάς (%) =  $\Sigma$  (Εμφραγματική μάζα/Συνολική μάζα αριστερής κοιλιάς)  $\times$  100*

### **3.5. Τεχνική απομονωθείσας καρδιάς**

#### **3.5.1. Διάταξη Langendorff**

Η τεχνική της παρασκευής απομονωθείσας αρδευόμενης καρδιάς καθιερώθηκε το 1897 από τον Oscar Langendorff. Η μέθοδος αναπτύχθηκε βάσει της απομονωμένης καρδιάς βατράχων, που είχε εφαρμόσει ο Elias Cyon στο Ινστιτούτο Φυσιολογίας Carl Ludwig στη Λειψία, Γερμανία το 1866. Οι παρατηρήσεις, που έγιναν χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους οδήγησε σε σημαντικές ανακαλύψεις στο τέλος του 19ου και στην αρχή 20ου αιώνα, που αποτελούν τη βάση για τη φυσιολογία της καρδιάς. Αυτές περιελάμβαναν το ρόλο της θερμοκρασίας, των ιόντων οξυγόνου και ασβεστίου για τη συσταλτικότητα της καρδιάς, την προέλευση της ηλεκτρικής δραστηριότητας στους κόλπους, την αρνητική χρονότροπη δράση του πνευμονογαστρικού, την επίπτωση όπως και τη χημική μετάδοση των νευρικών ώσεων στο πνευμονογαστρικό από την ακετυλοχολίνη. Ο ίδιος ο Langendorff απέδειξε, ότι η καρδιά λαμβάνει τις θρεπτικές ουσίες και το οξυγόνο της από το αίμα μέσω των στεφανιαίων αρτηριών

και ότι η καρδιακή μηχανική λειτουργία αντανακλάται από τις αλλαγές στη στεφανιαία κυκλοφορία.

Η απλότητα της απομονωθείσας καρδιάς, το ευρύ φάσμα των μετρήσεων που μπορούν να γίνουν χρησιμοποιώντας αυτήν την μέθοδο, η επαναληψιμότητα της και το σχετικά χαμηλότερο κόστος την καθιστούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στη σύγχρονη καρδιαγγειακή και φαρμακολογική έρευνα, παρά τους όποιους λίγους περιορισμούς που έχει.

Η απομονωθείσα καρδιά είναι κατάλληλη για οποιαδήποτε θηλαστικό. Αν και έχει αναφερθεί η άρδευση καρδιών, που απομονώθηκαν από μεγάλο ζώα ή ακόμα και τον άνθρωπο, αυτό συνήθως δεν χρησιμοποιείται [335-339]. Η πιο συχνά μελετημένη και καλύτερα χαρακτηρισμένη καρδιά είναι αυτή του επίμου. Αυτό οφείλεται στο σχετικά χαμηλότερο κόστος, στον εύκολο χειρισμό και στον απλό εξοπλισμό, που απαιτείται. Εντούτοις η καρδιά του επίμου υφίσταται έναν περιορισμό και αυτός έχει να κάνει με το βραχείας διάρκειας δυναμικό ενεργείας του [335, 337]. Αν και αυτό μπορεί να περιορίσει τη χρήση του επίμου στη διάταξη Langendorff για τις μελέτες της αρρυθμογέννησης και των αντιαρρυθμικών φαρμάκων, οι απομονωθείσες καρδιές επίμου υπερσχύουν των άλλων πειραματικών πρότυπων, που εξετάζουν αρρυθμίες ισχαιμική αιτιολογίας [340]. Αυτό έγκειται στο ότι η καρδιά του επίμου παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό κοιλιακής μαρμαρυγής ισχαιμικής προέλευσης, παρόλο τη σύντομη διάρκεια δυναμικού ενεργείας. Σε αντίθεση με τον επίμου, ο επιπολασμός κοιλιακής μαρμαρυγής σε απομονωθείσες καρδιές κόνικλων με ισοδύναμες μεγέθους ισχαιμικές ζώνες, είναι πολύ χαμηλότερος [341, 342]. Η καρδιά του κόνικλου έχει δυναμικό ενεργείας, όπως και διάστημα QT περί τις τρεις φορές μεγαλύτερο από αυτό του επίμου και ακόμα παρουσιάζει διάστημα RR, που είναι μικρότερο όσο

δύο στο μήκος [341, 342]. Αυτή η μορφολογία της ηλεκτροφυσιολογίας έχει αντίκτυπο στην έναρξη και τη συντήρηση της κοιλιακής μαρμαρυγής στις απομονωθείσες καρδιές κόνικλου και τις καθιστούν λιγότερο κατάλληλες για τη μελέτη των αντιαρρυθμικών φαρμάκων [340].

### **3.5.2. Γενική αρχή της μεθόδου**

Η τεχνική της απομονωθείσας καρδιάς είναι σήμερα κατά ένα μεγάλο μέρος βασισμένη στις προσαρμογές της μεθόδου, που περιγράφεται αρχικά από τον Langendorff [343]. Η παρασκευή καρδιών κατά Langendorff περιλαμβάνει το καθετηριασμό της αορτής. Η καρδιά αφαιρείται από τον αναισθητοποιημένο επίμυ, κατόπιν συγκρατείται με τις λαβίδες από την ανοιγμένη αορτική ρίζα και εφαρμόζεται σε μια σταθερή κάννουλα-παροχή στο σημείο διαπότισης της διάταξης. Αυτή η κάννουλα-παροχή είναι συνδεδεμένη με την εκροή μιας δεξαμενής, που περιέχει ένα οξυγονωμένο διάλυμα έγχυσης σε σταθερή θερμοκρασία σε 37 °C. Το διάλυμα έγχυσης εμπλουτίζεται συνεχώς με ένα μίγμα αερίου, που περιέχει 5% CO<sub>2</sub> / 95% O<sub>2</sub> εξασφαλίζοντας την ιοντική ισορροπία για μελέτες άρδευσης σε αερόβιες συνθήκες. Στην πλειοψηφία των μελετών στη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται φυσιολογικό διάλυμα διττανθρακικού άλατος, που μιμείται το ιοντικό περιεχόμενο του πλάσματος, όπως καθορίζεται από Krebs και Henseleit, το οποίο πρέπει να προωθηθεί στην καρδιά σε θερμοκρασία 37 °C, υπό συνεχή προσθήκη 5% CO<sub>2</sub>, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται φυσιολογικό pH 7.4 [337, 339, 344]. Το διάλυμα έγχυσης προωθείται ανάδρομα στη φορά της κυκλοφορίας στην ανιούσα αορτή, είτε υπό σταθερή υδροστατική πίεση, είτε υπό σταθερή ροή με χρήση μιας αντλίας. Και στις δύο περιπτώσεις αυτή η ανάδρομη ροή κλείνει τις



πτυχές της αορτικής βαλβίδας, με αποτέλεσμα το διάλυμα να μην εισέρχεται στην αριστερή κοιλία, αλλά να μετατοπίζεται μέσω των στεφανιαίων στομιών στις στεφανιαίες αρτηρίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαποτίζεται ολόκληρη η κοιλιακή μάζα της καρδιάς και εν συνεχεία το διάλυμα έγχυσης άγεται από τη στεφανιαία φλεβική κυκλοφορία μέσω του στεφανιαίου κόλπου στον ανοικτό δεξί κόλπο.

### 3.5.3. Περιγραφή διάταξης Langendorff

Στο δικό μας πειραματικό πρωτόκολλο, οι καρδιές των επίμυων μελετήθηκαν σε μια εξελιγμένη διάταξη Langendorff τύπου ML870B2-V (ADInstruments Ltd, United Kingdom). Σχηματικά μια διάταξη Langendorff απεικονίζεται στην εικόνα 5.

Ο εγκέφαλος της πειραματικής μας διάταξης είναι μία κεντρική μονάδα τύπου Power Lab 8/30 ML 870 (ADInstruments Ltd, United Kingdom).



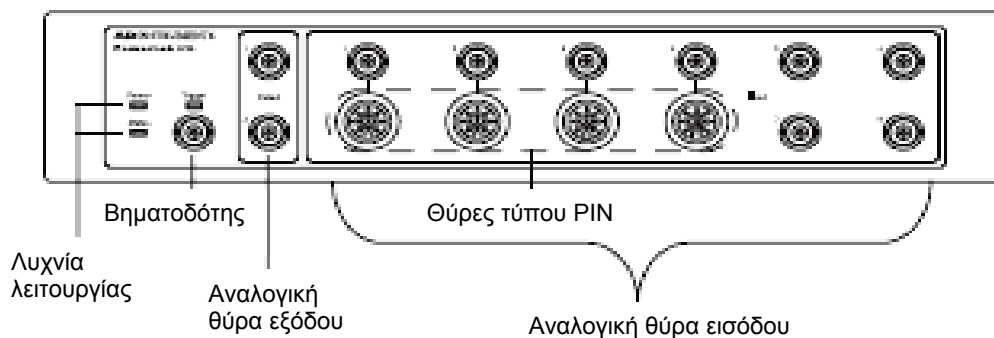
Εικόνα 4: Η κεντρική μονάδα PowerLab.

Το σύστημα PowerLab είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα υλικού και λογισμικού με δυνατότητα καταγραφής, επίδειξης και ανάλυσης πειραματικών στοιχείων. Το υλικό περιλαμβάνει τη μονάδα καταγραφής PowerLab με τις διάφορες βοηθητικές



του συνδεσμολογίες και το λογισμικό, που αποτελείται από το πρόγραμμα LabChart (ADInstruments Chart 5, v5.4.2) με συμπληρωματικές ενότητες και επεκτάσεις, οι οποίες εφαρμόζονται στον υπολογιστή στον οποίο συνδέεται το PowerLab. Το PowerLab έχει τη δική του σημαντική υπολογιστική ικανότητα και εκτελεί πολλούς αλγόριθμους κατά τη διάρκεια της καταγραφής στοιχείων, μιας και περιέχει μικροεπεξεργαστή, μνήμη και εξειδικευμένους αναλογικούς ενισχυτές για τη βελτίωση σημάτων. Οι λειτουργίες δειγματοληψίας, παραγωγής και επικοινωνίας ελέγχονται από τον εσωτερικό μικροεπεξεργαστή με συχνότητα 240 MHz, ο οποίος μπορεί να εξασφαλίσει 16 MB μνήμη τυχαίας προσπέλασης για την αποθήκευση ή ενδιάμεση αποθήκευση στοιχείων.

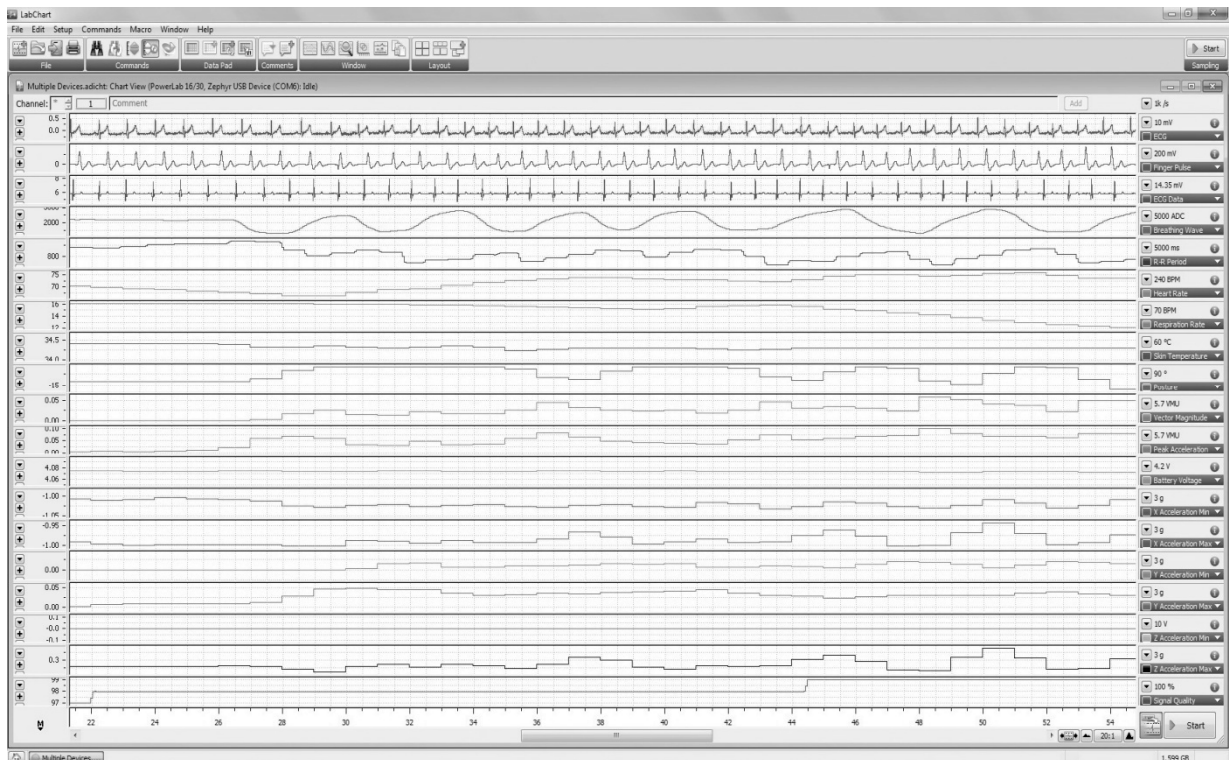
Το PowerLab 8/30 έχει οκτώ θύρες για την καταγραφή εξωτερικών αναλογικών σημάτων και δύο ανεξάρτητες θύρες εξόδου, επίσης τύπου BNC με δυνατότητα βηματοδότησης.



Εικόνα 6: Θύρες εισόδου και εξόδου στο PowerLab.

Οι θύρες εισόδου μπορούν να λαμβάνουν εξωτερικά αναλογικά σήματα της τάξεως μέχρι  $\pm 10$  V. Κάθε θύρα διαθέτει έναν ανεξάρτητα προγραμματισμένο ενισχυτή σήματος, φίλτρο και σύζευξη AC/DC. Οι αναλογικές θύρες εισόδου του PowerLab χρησιμοποιούνται για να καταγράψουν τα εξωτερικά σήματα πριν από

την ψηφιοποίηση. Τα αναλογικά σήματα κατόπιν ενισχύονται από τους εσωτερικούς ενισχυτές και ψηφιοποιούνται από έναν παλμικό-ψηφιακό μετατροπέα στα 16 bit. Ο μετατροπέας μπορεί να συλλέξει μέχρι 400.000 δείγματα ανά δευτερόλεπτο. Η διαδικασία συλλογής κατευθύνεται ανεξάρτητα από το μικροεπεξεργαστή μέσω μιας μηχανής ελέγχου, που διαθέτει άμεση πρόσβαση στη μνήμη. Η κεντρική μονάδα επεξεργασίας ομαδοποιεί τα δείγματα και τα διαβιβάζει έπειτα στον υπολογιστή, όπου το λογισμικό λαμβάνει, καταγράφει και επιδεικνύει τα στοιχεία. Το PowerLab επικοινωνεί με τον υπολογιστή μέσω θύρας USB 2.0, με μέση μεταφορά δεδομένων μέχρι 480 Mbits ανά δευτερόλεπτο. Άπαξ και μεταφερθούν τα στοιχεία από το PowerLab στον υπολογιστή, αυτά είναι διαθέσιμα με τη βοήθεια του λογισμικού για επίδειξη, χειρισμό, εκτύπωση, αποθήκευση και ανάκτηση μέσω μιας πλατφόρμας εργασίας, που εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή.

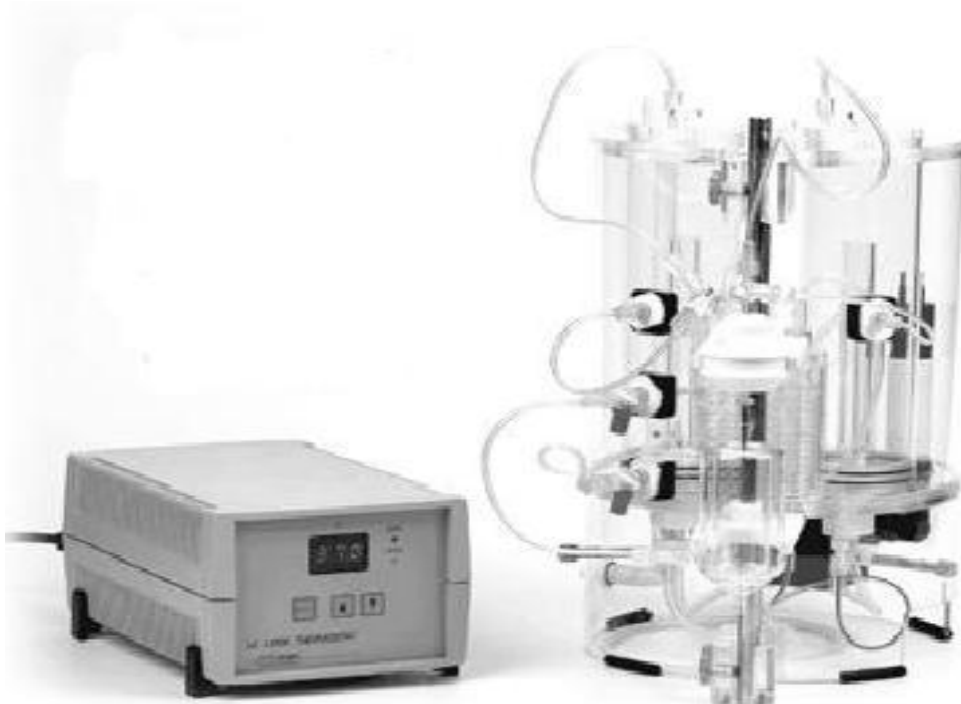


Εικόνα 7: Η πλατφόρμα εργασίας του PowerLab στον υπολογιστή.

Δύο 16bit ψηφιακοί-αναλογικοί μετατροπείς χρησιμοποιούνται για να παρέχουν αναλογικής παραγωγής βηματοδότηση, μέσω των αναλογικών εξόδων του PowerLab. Οι ψηφιακοί-αναλογικοί μετατροπείς μπορούν να παράγουν σταθερά επίπεδα συνεχούς ή εναλλασσόμενης τάσης, υπό έλεγχο λογισμικού. Η συχνότητα βηματοδότησης είναι απολύτως ανεξάρτητη από τη συχνότητα λήψης αναλογικού σήματος στις εισόδους. Η παραγωγή βηματοδότησης ελέγχεται μέσω ενός προγραμματισμένου δικτύου σταδιακής μείωσης, έτσι ώστε να προκύπτουν διαφορετικές σειρές ηλεκτρικών σημάτων. Έπειτα, το σήμα διαχωρίζεται σε ένα θετικό και αρνητικό μέσω των ρυθμιστικών ενισχυτών. Τα σήματα μπορούν να ανέλθουν έως και 50  $\mu\text{A}$  σε κάθε εκφόρτιση.

Επιπρόσθετα η επικοινωνία του PowerLab με τα υπόλοιπα περιφερικά υλικά (κονσόλα ελέγχου αντλίας, περισταλτική αντλία, μετατροπείς πιέσεων, ενισχυτές σημάτων) και ο έλεγχος αυτών επιτυγχάνεται μέσω συνδεσμολογίας τύπου I<sup>2</sup>C. Μέσω αυτής της θύρας παρέχεται ενέργεια στα υπόλοιπα υλικά και πρόσβαση του λογισμικού στη λειτουργία αυτών.

Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει σύστημα διπλοτοιχωματικών υαλίνων οργάνων, που αποθηκεύουν ή οδηγούν το διάλυμα έγχυσης στην καρδιά. Μέσα σε αυτό το σύστημα ανακυκλώνεται, θερμαίνεται και διατηρείται σε σταθερή και προεπιλεγμένη θερμοκρασία νερό με τη βοήθεια ενός θερμοστάτη - κυκλοφορητή τύπου ML 176-V (Panlab s. l., Spain). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ότι εξασφαλίζεται και διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του διαλύματος έγχυσης και κατά συνέπεια της καρδιάς που διαποτίζεται (στην προκειμένη περίπτωση του πειράματος στους 37 °C).



Εικόνα 8: Ο θερμοστάτης (αριστερά) και το υάλινο διπλοτοιχωμικό σύστημα δεξαμενών και σωληνώσεων (δεξιά).

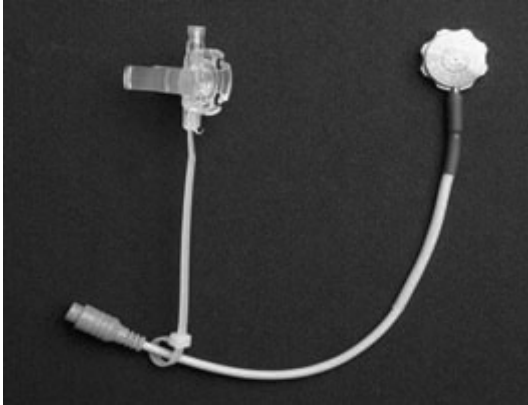
Το διάλυμα έγχυσης μεταφέρεται μέσω μιας περιστροφικής αντλίας τύπου ML 172 (Miniplus Peristaltic Pump, ADInstruments) η οποία κατευθύνεται από την κονσόλα ελέγχου αντλίας τύπου ML 175 (STH Pump Controller, ADInstruments).



Εικόνα 9: Η περιστροφική αντλία (αριστερά) και η κονσόλα ελέγχου της (δεξιά).

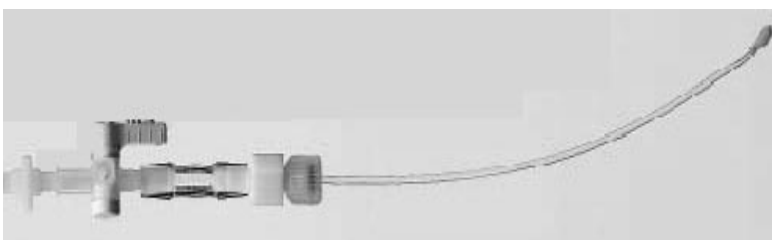
Με την κονσόλα ελέγχου της αντλίας μπορούμε να αυξομειώσουμε την ταχύτητα της περισταλτικής αντλίας, προκειμένου να διασφαλίζεται μέση σταθερή ροή ή πίεση άρδευσεως. Η κονσόλα επικοινωνεί με συνδεσμολογία τύπου BNC, μέσω ενός ενισχυτή σήματος με το μετατροπέα μέτρησης πίεσης διαπότισης των στεφανιαίων. Σε συνθήκες πειράματος, υπό σταθερή ροή μία τάση ελέγχου παραδίδεται στην αντλία, οπότε αυξάνοντας την τάση αυξάνεται και η ταχύτητα της αντλίας, άρα και της ροής. Αντίθετα, όταν επιθυμούμε να εργαστούμε υπό συνθήκες σταθερής πίεσης άρδευσης των στεφανιαίων, η κονσόλα χρησιμοποιεί ένα σύστημα αρνητικής ανατροφοδότησης, το οποίο μεταφέρει συνεχώς το σήμα της πίεσης σε θύρα εισόδου της και άμεσα διαφοροποιείται η εντολή ροής στην περισταλτική αντλία. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια σταθερή πίεση άρδευσης με μεγάλη ακρίβεια και μικρή απόκλιση της τάξης  $\pm 1$  mmHg. Τέλος, το σήμα ροής και πίεσης καταγράφονται και επιδεικνύονται από το λογισμικό στον υπολογιστή.

Στα σημαντικά υλικά της διάταξης Langendorff συγκαταλέγονται οι δύο μετατροπείς μέτρησης πίεσης τύπου MLT 844 της αριστερής κοιλίας και της πίεσης άρδευσης των στεφανιαίων και οι ενισχυτές τύπου γέφυρας Wheatstone ML 221.



Εικόνα 10: Μετατροπέας πίεσης (αριστερά) και ενισχυτής τύπου γέφυρας (δεξιά).

Ο φυσιολογικός μετατροπέας πίεσης MLT844 είναι ένας ακριβής μετατροπέας και αυτό οφείλεται στην αρχή της λειτουργίας του, που βασίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, δηλαδή την παραγωγή τάσης, όταν αυτός δεχτεί μηχανική πίεση ή ταλάντωση. Ένα σύστημα σωληνώσεων και θόλου γεμίζεται με νερό προσέχοντας να μην παραμείνει σε αυτό καμία φυσαλίδα. Η οπίσθια πλευρά του θόλου αποτελείται από μία μεμβράνη, η οποία έρχεται σε επαφή με το μετατροπέα και μεταφέρει ουσιαστικά τις διακυμάνσεις της πίεσης ή ταλάντωσης (εικόνα 10). Το σύστημα σωληνώσεων του μετατροπέα μέτρησης πίεσης αριστερής κοιλίας καταλήγει σε ένα καθετήρα στην άκρη του οποίου είναι προσαρμοσμένο ένα, κατάλληλο για ισοογκομετρικές μετρήσεις, ελαστικό μπαλόνι, το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται μέσα στην αριστερή κοιλία της καρδιάς.



Εικόνα 11: Το ενδοκοιλιακό σύστημα καθετήρα και μπαλονιού.



Το μπαλόνι φουσκώνεται με νερό μέσω των σωληνώσεων και εφάπτεται στα έσω τοιχώματα της αριστερής κοιλίας. Οι ταλαντώσεις που προκαλούνται κατά τη συστολή και διαστολή της κοιλίας μεταφέρονται στο μπαλόνι, εν συνεχεία σε όλο το υγρό μέσο των σωληνήσεων και αποτυπώνονται στη μεμβράνη στο μετατροπέα πίεσης. Το μπαλόνι πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λεπτότερο, εύκαμπτο και συμβατό με τους βιολογικούς ιστούς. Τα τυποποιημένα μπαλόνια λάτεξ, που χρησιμοποιούνται συνήθως από τους ερευνητές στη διάταξη Langendorff δεν έχουν τη δυνατότητα να ικανοποιήσουν όλα αυτά τα κριτήρια. Γι αυτό πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν ιδιοκατασκευές, που γίνονται από μεμβράνη οικιακής χρήσης [345, 346], γεγονός που εφαρμόστηκε ενίοτε και στο δικό μας πρωτόκολλο.

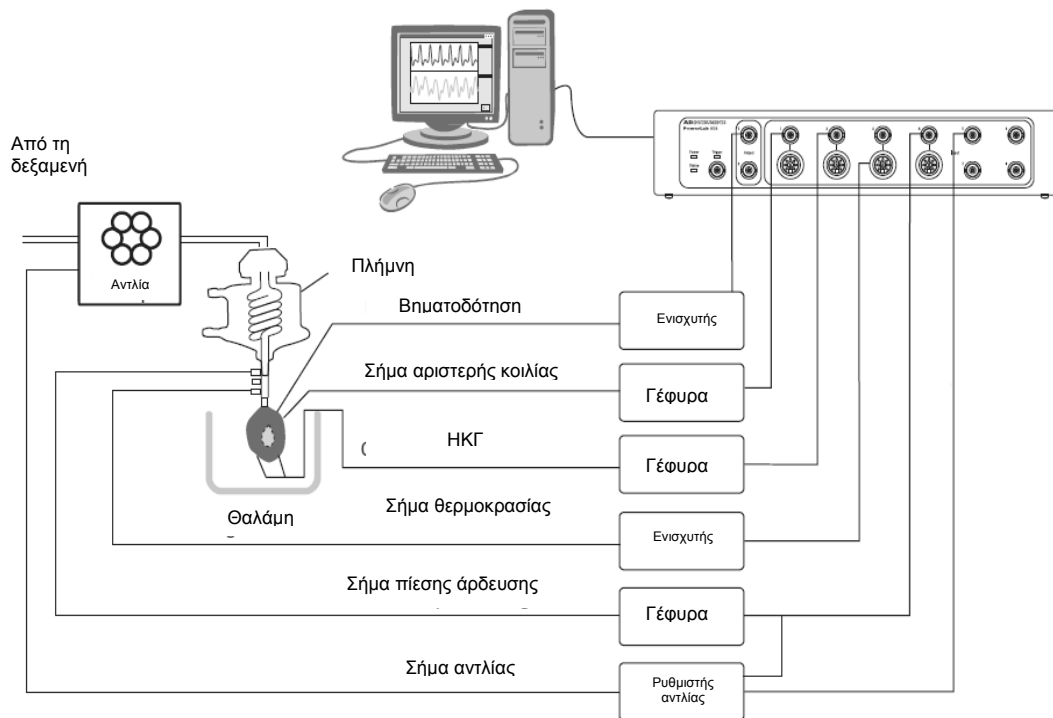
Αντίθετα, το σύστημα σωληνώσεων του δεύτερου μετατροπέα συνδέεται στην κορυφή μίας πλήμνης, όπου καταλήγουν οι παροχές μεταφοράς του διαλύματος έγχυσης και στη βάση της οποίας βρίσκεται προσαρμοσμένη η κάνουλα γύρω από την οποία στερεώνεται η ανιούσα αρτηρία. Η συνδεσμολογία αυτή που δημιουργείται, καθιστά όλο το μήκος της στεφανιαίας κυκλοφορίας μέχρι και τη

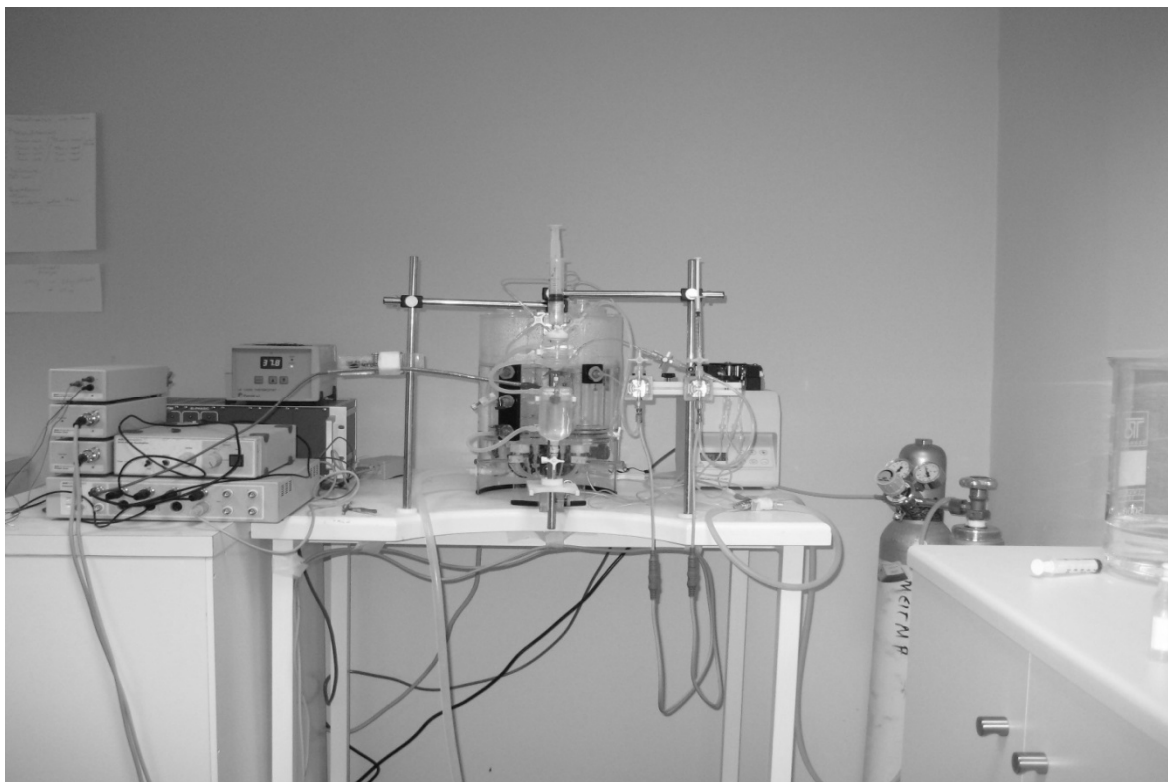


Εικόνα 12: Η πλήμνη.

μεμβράνη του θόλου του μετατροπέα μέσω της πλήμνης και των σωληνώσεων, ένα ενιαίο σύστημα αγωγών, το οποίο εμφανίζει την ίδια τιμή πίεσης σε κάθε

σημείο του. Επομένως η πίεση που καταγράφεται στο δεύτερο μετατροπέα αντικατοπτρίζει την πίεση του στεφανιαίου δικτύου και διαπύσης του μυοκαρδίου. Κατά την εκτέλεση του πειράματος οι μετατροπείς δημιουργούν δυναμικό τάσης, τόσο από την πίεση στα στεφανιαία, όσο και από την ταλάντωση της αριστερής κοιλίας. Το δυναμικό αυτό διαβιβάζεται στις γέφυρες, οι οποίες αφενός το φιλτράρουν και αφετέρου το ενισχύουν. Κατόπιν, το σήμα μεταφέρεται στο PowerLab, όπου ψηφιοποιείται και αντιστοιχείται σε μονάδες πίεσης. Τέλος, το λογισμικό αναλαμβάνει την προβολή των τιμών με μορφή αναλογικού σήματος. Το ολοκληρωμένο σύστημα Langendorff, που περιγράψαμε παρουσιάζεται και απεικονίζεται σχηματικά στις παρακάτω εικόνες.





Εικόνα 13: Σχηματική (άνω) και φωτογραφική απεικόνιση (κάτω) της διάταξης Langendorff που χρησιμοποιήθηκε.

#### **3.5.4. Δεδομένα και πειραματικές παράμετροι στη Langendorff**

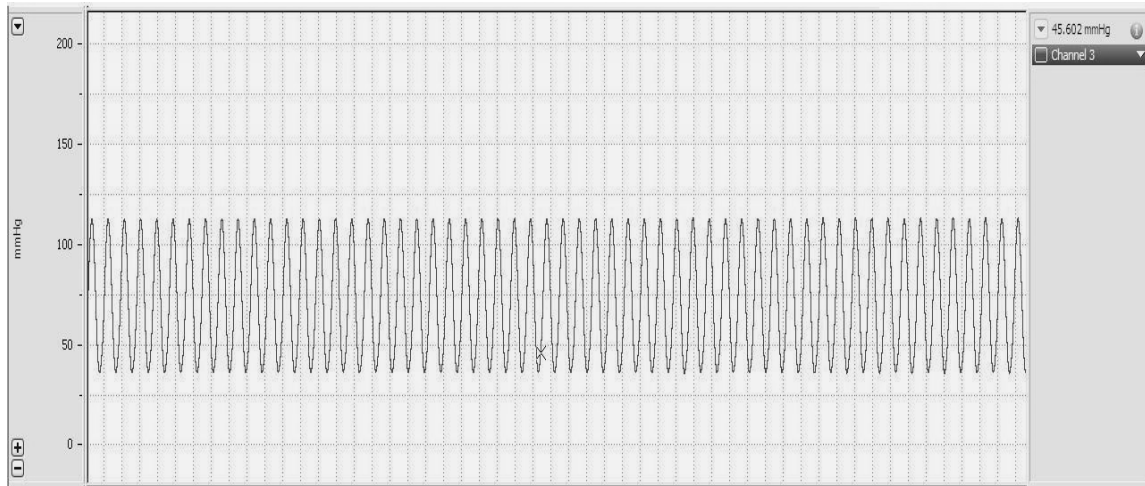
Όπως προαναφέρθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος καταγράφονται με τη βοήθεια ενός κατάλληλου λογισμικού διάφορες παράμετροι, οι οποίες αποτελούν στοιχεία της συμπεριφοράς της καρδιάς του επίμυος κάτω από τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες, που ορίζονται από το πρωτόκολλο.

Συγκεκριμένα, οι παράμετροι περιγράφουν την αιμοδυναμική κατάσταση της απομονωθείσας καρδιάς, αποτυπώνονται από το λογισμικό σε πραγματικό χρόνο και παρέχοντας μας άμεση εικόνα του πειράματος οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Επιπλέον, το λογισμικό εκτελεί σειρά αλγορίθμων υπολογίζοντας έτσι δείκτες καρδιακής λειτουργίας. Με τη δυνατότητα, που παρέχεται από το λογισμικό για την

αποθήκευση τους, είμαστε στη θέση να επανακαλέσουμε αυτά τα δεδομένα και να τα επεξεργαστούμε.

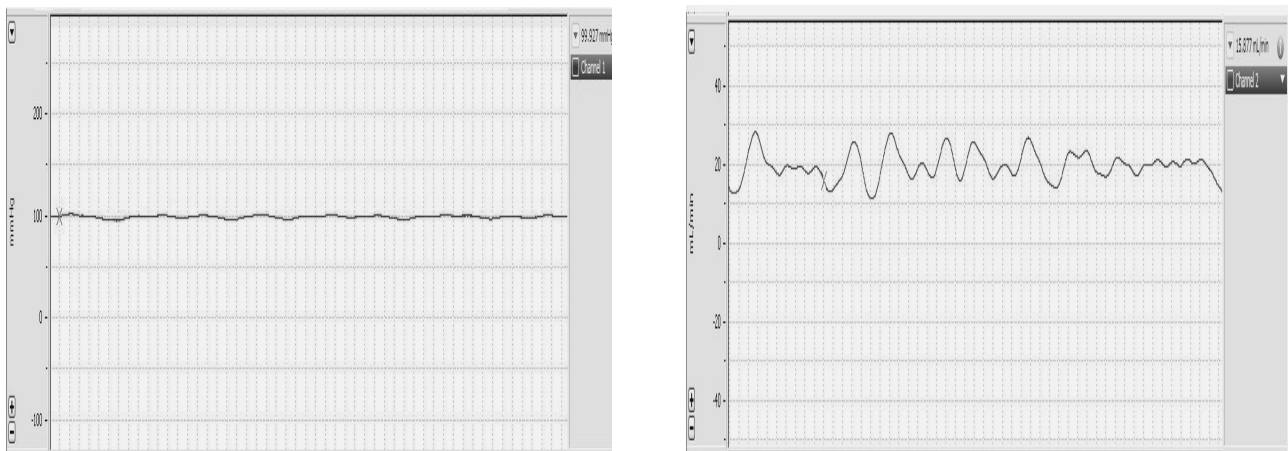
Οι παράμετροι, οι οποίες καταγράφονται είναι οι ακόλουθες:

Η στιγμιαία πίεση, η μέγιστη συστολική και τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (SP,  $SP_{max}$ : systolic pressure και EDP: enddiastolic pressure).

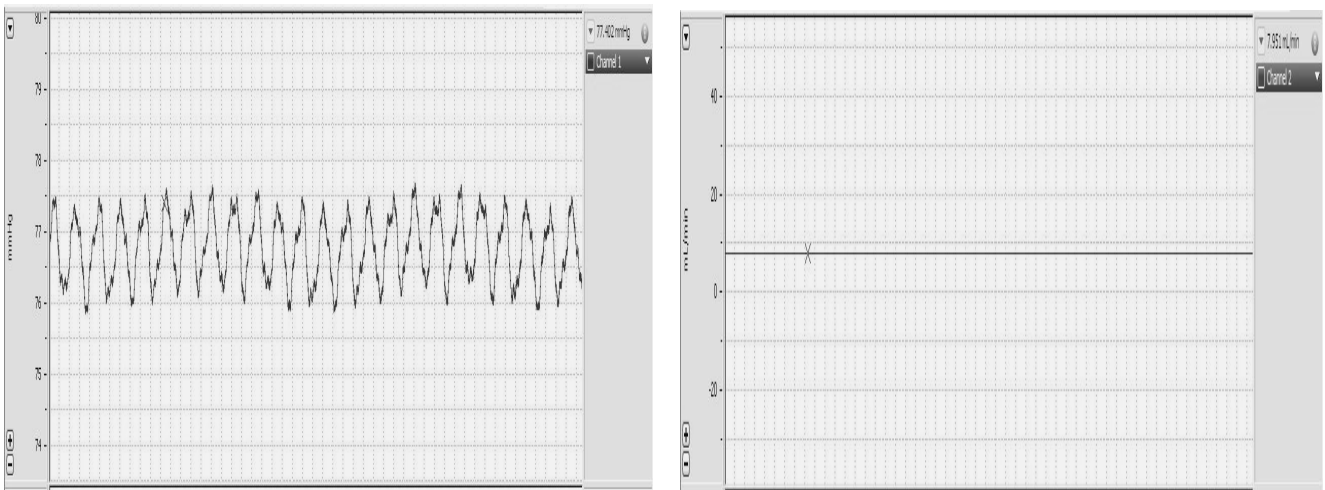


Εικόνα 14: Η πίεση της αριστερής κοιλίας.

Η πίεση άρδευσης των στεφανιαίων (PP: perfusion pressure) είτε σταθερή υπό μεταβαλλόμενη ροή (F: flow) είτε μεταβαλλόμενη πίεση άρδευσης υπό σταθερή ροή.

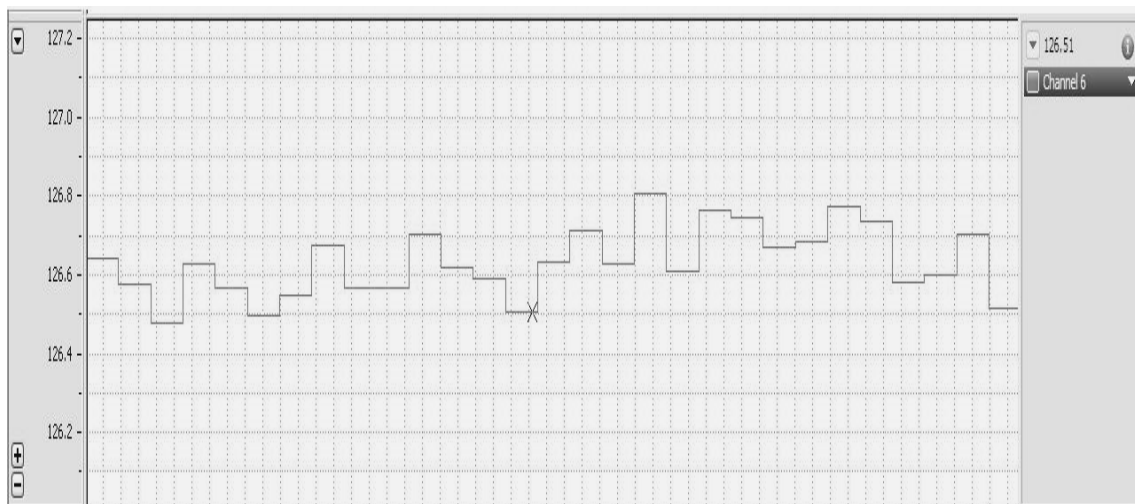


Εικόνα 15: Καταγραφή σταθερής πίεσης διαπότισης στεφανιαίων (αριστερά) υπό προσαρμοσμένη μεταβαλλόμενη ροή (δεξιά).



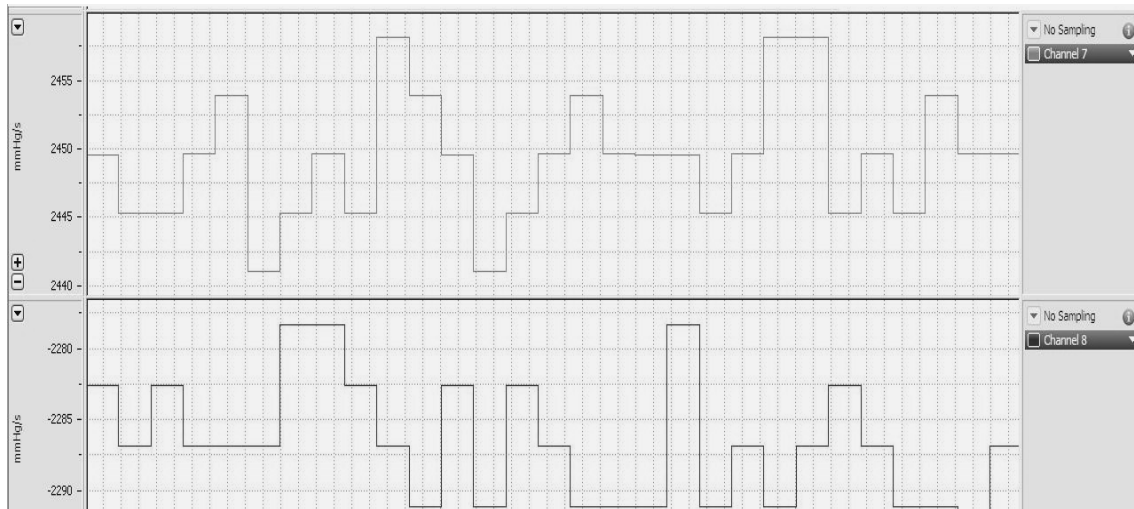
Εικόνα 16: Καταγραφή μεταβαλλόμενης πίεσης διαπότισης στεφανιαίων (αριστερά) υπό σταθερή ροή (δεξιά).

Σημαντικοί δείκτες συσταλτικότητας, που υπολογίζονται από το λογισμικό είναι η αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας (LVDP: Left Ventricular Developed Pressure), που καθορίζεται από τη διαφορά της μέγιστης συστολικής και της τελοδιαστολικής πίεσης



Εικόνα 17: Καταγραφή της αναπτυσσόμενης πίεσης αριστερής κοιλίας (LVDP).

Και η μέγιστη θετική και αρνητική κατά μονάδα χρόνου μεταβολή της πίεσης της αριστερής κοιλίας (+dp/dt, -dp/dt).



Εικόνα 18: Η μέγιστη θετική (άνω) και αρνητική (κάτω) μεταβολή της πίεσης της αριστερής κοιλίας στη μονάδα του χρόνου.

### 3.5.5. Τεχνικές της μεθόδου

#### 3.5.5.1. Αναισθησία

Η χειρουργική επέμβαση στο ζώο, για την αφαίρεση της καρδιάς, απαιτεί προηγουμένως την εκτέλεση γενικής αναισθησίας. Η αναισθησία μπορεί να επιτευχθεί, είτε με την εισπνοή πτητικών ουσιών, όπως το αλοθάνιο, είτε με έγχυση βαρβιτουρικών [335, 344]. Ο αιθέρας πρέπει να αποφεύγεται λόγω της ιδιότητας του να διεγείρει το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Αν και οι δύο μέθοδοι έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους, προτιμάται η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση βαρβιτουρικών (ειδικά θειοπεντάλη) ή μη βαρβιτουρικών όπως μίγματος κεταμίνης-ξυλαζίνης, γιατί δεν απαιτείται κανένας περίπλοκος εξοπλισμός για τη χορήγηση τους και η επίδραση τους στην καρδιακή λειτουργία υφίεται εντελώς

μέσα σε λίγα λεπτά [344]. Ειδικότερα, στη δική μας μελέτη οι επίμυες ακινητοποιούνται και λαμβάνουν μίγμα κεταμίνης (60-80 mg/kg) και ξυλαζίνης (8 mg/kg), το οποίο χορηγείται άπαξ ενδοπεριτοναϊκά. Η κεταμίνη, ανταγωνιστής των υποδοχέων N- μεθύλ- δ- ασπαρτικού οξέος του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι παράγωγο της κυκλοεξανόνης και προκαλεί διαχωριστική αναισθησία, η οποία χαρακτηρίζεται από αναλγησία, καταληψία και αμνησία, ενώ η ξυλαζίνη, ανταγωνιστής των α<sub>2</sub> υποδοχέων προκαλεί αναισθησία, μυοχάλαση και αναλγησία. Εν τέλει οποιοσδήποτε είναι η επιλογή της διαδικασίας αναισθησίας, πρέπει να καταβληθεί προσπάθεια να κρατηθεί το ζώο απαλλαγμένο από ένα αγχωτικό εξωτερικό περιβάλλον πριν από την ευθανασία του και να ελαχιστοποιήσουμε τους χειρισμό μας. Πριν από τη χειρουργική επέμβαση η πλήρης απουσία ανταπόκρισης στον πόνο αξιολογείται με το αντανεκλαστικό απόσυρσης άκρου σε ένα ερέθισμα πόνου.

### **3.5.5.2. Αφαίρεση της καρδιάς**

Με την έναρξη της αναισθησίας το ζώο τοποθετείται σε ύπτια θέση και τα άκρα του εκτείνονται και ακινητοποιούνται με επιθέματα προσφέροντας, έτσι την κατάλληλη πρόσβαση για την αφαίρεση της καρδιάς. Η ακόλουθη διαδικασία περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες και έχει καθιερωθεί [337, 344, 347-349]. Εν συντομία, η βάση του διαφράγματος αποκαλύπτεται από μια διακοιλιακή τομή. Κατόπιν το διάφραγμα τέμνεται και εμφανίζεται η θωρακική κοιλότητα. Στη συνέχεια, ακολουθώντας τις συνδέσεις χόνδρου στις πλευρές, ο θώρακας αποκόπτεται και παρασκευάζεται η καρδιά. Με λεπτούς χειρισμούς, η καρδιά ανασηκώνεται με τις άκρες των δακτύλων για να αποφευχθεί ο τραυματισμός της και αποκολλάται με

τομή από την αορτή, την κοίλη φλέβα και τις πνευμονικές αρτηρίες. Αμέσως μετά την αφαίρεση, η καρδιά τοποθετείται σε ένα δοχείο, που περιέχει παγωμένο στους 4 °C διάλυμα Krebs-Henseleit εμπλουτισμένο με κλασσική ηπαρίνη, αφενός για να απομακρυνθεί το αίμα και να μη σχηματισθούν θρόμβοι στα στεφανιαία και στις κοιλότητες της και αφετέρου για να προφυλαχθεί από την ισχαιμική βλάβη με την προσωρινή παύση της λειτουργίας της. Ο χρόνος της ισχαιμίας κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας πρέπει να ελαχιστοποιείται και να καταβάλλεται προσπάθεια να είναι σταθερά μικρός, δεδομένου ότι αύξηση του χρόνου αυτής της προσωρινής ισχαιμικής περιόδου μπορούν να αποκτήσουν χαρακτήρα ισχαιμικής προετοιμασίας για την καρδιά. Βάσει των προηγούμενων μελετών τα αποδεκτά όρια χρόνου από τη στιγμή που αφαιρείται η καρδιά από την ανοικτή θωρακική κοιλότητα, συμπεριλαμβανομένου και του εμβαπτίσματος στο κρύο διάλυμα έως τη προσαρμογή της και άρδευση της στη διάταξη δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 30 δευτερόλεπτα [337, 344].

### **3.5.5.3. Σταθεροποίηση**

#### *Καθετηριασμός αορτής*

Αφού αφαιρεθεί και ξεπλυθεί καλά η καρδιά από τα υπολείμματα αίματος, καθετηριάζεται η ανιούσα αορτή με την παροχή-κάνουλα της διάταξης Langendorff και συγκρατείται σε αυτή με περίδεση ράμματος μέταξας. Πριν από τον καθετηριασμό είναι απαραίτητο να επιθεωρηθεί η κάνουλα και το σύστημα σωληνώσεων, που συνδέουν την αορτική κάνουλα με τη δεξαμενή διαλύματος έγχυσης για να διαπιστωθεί ότι πληρώνονται από το διάλυμα και είναι ελεύθερα από φυσαλίδες αέρος. Για τον λόγο αυτό μερικοί ερευνητές συμβουλεύουν να



πραγματοποιείται πριν τον καθετηριασμό έναρξη ήπιας στάγδην έγχυσης διαλύματος [337, 344]. Επιπρόσθετα ο καθετηριασμός της ανιούσας διενεργείται με λεπτές κινήσεις, έτσι ώστε να αποφεύγεται η διάταση και η ρήξη των τοιχωμάτων της και προσέχουμε να μην εισχωρήσει η κάνουλα βαθιά μέσα σε αυτή, γιατί σε αντίθετη περίπτωση αποφράσσονται τα στεφανιαία στόμια και καταστρέφονται οι αορτικές βαλβίδες με αποτέλεσμα την αποτυχία της ανάδρομης άρδευσης.

#### *Άρδευση/Σταθερή ροή ή σταθερή πίεση*

Εφόσον έχουμε σιγουρευτεί για τη σωστή και σταθερή περίδεση της καρδιάς στην κάνουλα, αυξάνουμε τη ροή έγχυσης και αφαιρούμε με ένα ψαλίδι τον περιττό λιπώδη και συνδετικό ιστό. Η καρδιά αποκτά ένα ρόδινο χρώμα, αποτέλεσμα της αφαίρεσης του αίματος από τα τριχοειδή αγγεία. Η σύνδεση του μετατροπέα μέτρησης πίεσης άρδευσης με την κάνουλα μας επιτρέπει να εξακριβώσουμε τη στιγμιαία πίεση διαπότισης των στεφανιαίων, έτσι ώστε να προσαρμόσουμε τη ταχύτητα της αντλίας, άρα και της παροχής για να πετύχουμε την επιθυμητή πίεση άρδευσης. Συνήθως για τη σταθεροποίηση της καρδιάς επιλέγουμε μια πίεση άρδευσης στο εύρος 60 – 70mmHg. Σημειώνεται, ότι ανεξάρτητα εάν θέλουμε να εκτελέσουμε το πείραμα υπό συνθήκες σταθερής ροής ή σταθερής πίεσης η σταθεροποίηση της καρδιάς πρέπει να πραγματοποιείται υπό σταθερή ροή και εν συνεχεία επιλέγουμε ποιο τύπο άρδευσης θα ακολουθήσουμε [345].

Ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος και οι δύο τρόποι άρδευσης έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Και στις δύο οντότητες (ελλείψει οποιασδήποτε επιβληθείσας ισχαιμίας) και ανάλογα με το είδος του πειραματόζωου, η προκύπτουσα στεφανιαία ροή με αναίμακτο διάλυμα έγχυσης είναι συχνά στο

εύρος 8 - 12 ml/min/g υγρού βάρους ιστού, μια τιμή που είναι αρκετές φορές πιο πάνω από αυτήν της ροής αίματος *in vivo*. Ενώ η διαπότιση υπό σταθερή ροή προσθέτει ένα επιπλέον στοιχείο σταθερότητας στο πείραμα, έχει το μειονέκτημα, ότι αντίθετα από την άρδευση υπό σταθερή πίεση, αγνοούνται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί και δε μεταβάλλεται αυτόματα η ποσότητα έγχυσης, που παραδίδεται σε ολόκληρη την καρδιά, όταν υπάρχουν αλλαγές στη συχνότητα ή στο καρδιακό έργο ή ακόμα και όταν εφαρμόζεται η τμηματική ισχαιμία, υπό την οποία περίπτωση ο ίδιος όγκος παροχής θα πρέπει να διαποτίσει ένα πολύ μικρότερο πεδίο άρδευσης. Η αλλαγή μεταξύ της σταθερής ροής και της σταθερής πίεσης άρδευσης δεν είναι εύκολη με τις απλές συσκευές. Προκειμένου να λυθεί αυτό το πρόβλημα οι Shattock et al., [350] ανέπτυξαν ένα σύστημα ηλεκτρικής ανατροφοδότησης με σκοπό να ελέγχεται η περισταλτική αντλία. Αυτό το σύστημα είναι διαθέσιμο, όπως περιγράψαμε πιο πάνω, στη δική μας κονσόλα ελέγχου της περισταλτικής αντλίας και μας επιτρέπει να μεταπηδήσουμε, με την ενεργοποίηση ενός πλήκτρου, αμέσως μεταξύ σταθερής πίεσης και σταθερής ροής, επιτρέποντας τον άμεσο έλεγχο της πίεσης άρδευσης και της στεφανιαίας ροής. Αυτό το τελευταίο στοιχείο είναι ιδιαίτερης σημασίας στις μελέτες της αγγειακής λειτουργίας και παράπλευρης κυκλοφορίας.

### *Βηματοδότηση*

Ο καρδιακός ρυθμός και η συσταλτική λειτουργία της καρδιάς επιστρέφουν μέσα σε μερικά δευτερόλεπτα μετά τον καθετηριασμό της ανιούσας αορτής.. Για να επανέλθει όμως η πλήρης συσταλτική λειτουργία της καρδιάς απαιτούνται έως και δέκα λεπτά [344].

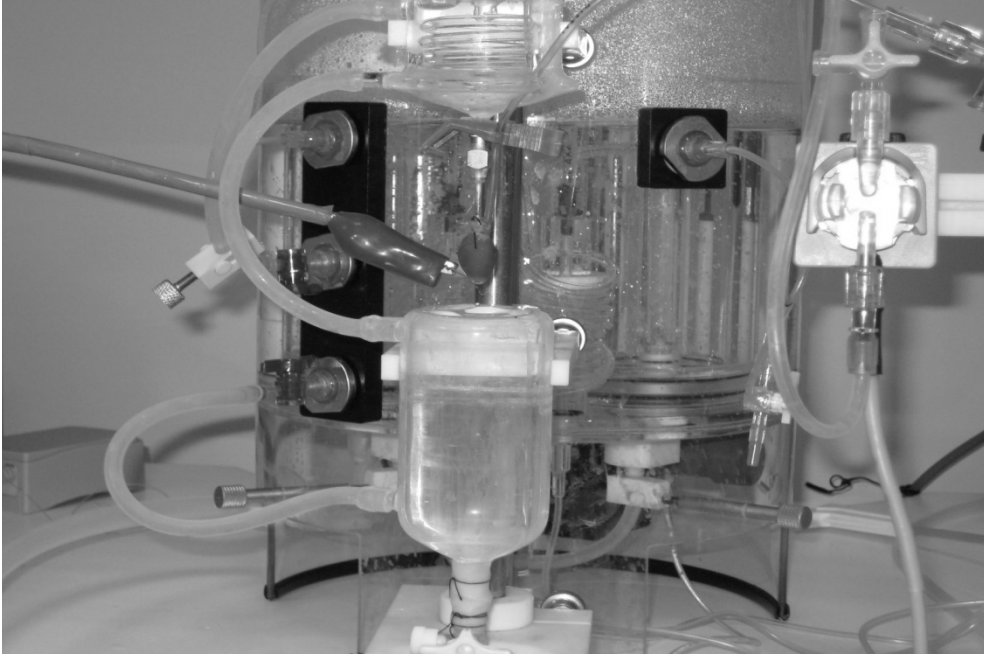
Όμως, όπως αναφέρεται [337] ο φλεβόκομβος της καρδιάς του επίμυος δεν αιματώνεται από τα στεφανιαία αγγεία, αλλά από εξωκαρδιακά αγγεία τα οποία αποκόπτονται κατά την αφαίρεση της καρδιάς και αυτό συνεπάγεται το γεγονός ότι η λειτουργία του φλεβοκόμβου θα διαρκεί φυσιολογικά, όσο το επιτρέπουν τα απόθεμα οξυγόνου, των θρεπτικών υλικών και η σταθερή διατήρηση της θερμοκρασίας του ιστού που τον αποτελεί. Προκειμένου το δικό μας πειραματικό πρωτόκολλο να εκτελεστεί σε σταθερή καρδιακή συχνότητα, προχωρούμε σε τεχνητή βηματοδότηση, με συχνότητες από 300 έως 330 σφύξεις ανά λεπτό, η οποία υπερκερεί το φλεβόκομβο [347-349]. Το ένα ηλεκτρόδιο του βηματοδότη εφάπτεται του δεξιού κόλπου και το δεύτερο συνδέεται με την κάνουλα.

#### *Πίεση αριστερής κοιλίας / Προφόρτιο*

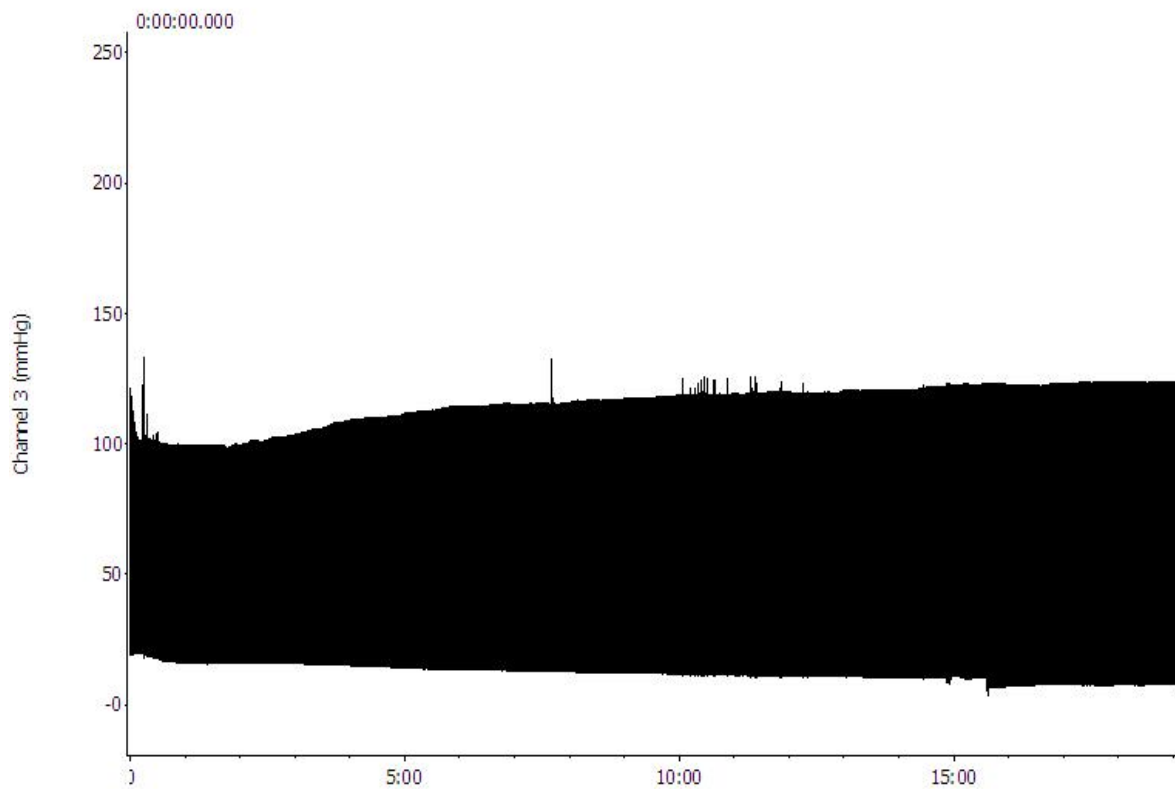
Για τη μέτρηση της αριστερής ενδοκοιλιακής πίεσης διενεργείται μια τομή στον αριστερό κόλπο και προωθείται μέσω αυτής και της μιτροειδούς βαλβίδας το μπαλόνι, που περιγράψαμε πιο πάνω. Το μπαλόνι τη στιγμή της εισαγωγής του είναι εξαερωμένο και περιέχει ελάχιστη ποσότητα έως καθόλου νερό, σε αντίθεση με το συνοδό σύστημα σωληνώσεων, που το συνδέει με το μετατροπέα πίεσης. Μόλις το μπαλόνι τοποθετηθεί στη σωστή θέση, πληρώνεται με όγκο νερού χρησιμοποιώντας μία σύριγγα, η οποία προσαρμόζεται στο θόλο του συστήματος σωληνώσεων. Ο όγκος πλήρωσης του μπαλονιού ουσιαστικά αντιστοιχεί στο τελοδιαστολικό όγκο και η πίεση που ασκεί στην τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας. Η επιθυμητή πίεση, που ρυθμίζεται με αυτόν τον τρόπο κυμαίνεται στα 6 – 8mmHg [347-349].

Έχοντας ρυθμίσει τη βηματοδότηση, τη ροή και κατα συνέπεια την πίεση άρδευσης και τη τελοδιαστολική πίεση, δίδεται ο απαιτούμενος χρόνος

προκειμένου να αποκατασταθούν οι αιμοδυναμικές παράμετροι και προτού προχωρήσουμε σε οποιαδήποτε πειραματική παρέμβαση, θεωρούμε ως ελάχιστο χρόνο σταθερής λειτουργίας το διάστημα των δέκα λεπτών [347].



LabChart Reader Window



Εικόνα 19: Σταθεροποιημένη καρδιά, όπως φαίνεται στη διάταξη Langendorff (άνω) και στο διάγραμμα πίεσης αριστερής κοιλίας (κάτω).

#### 3.5.5.4. Σύσταση, οξυγόνωση και θερμοκρασία διαλύματος

##### *Σύσταση*

Το διάλυμα έγχυσης, που χρησιμοποιήσαμε αναφέρεται στην πλειοψηφία των μελετών στη λογοτεχνία και είναι βασισμένο σε ένα διάλυμα διττανθρακικών αλάτων, όπως καθορίζεται από τους Krebs και Henseleit [351]. Αυτό το διάλυμα θεωρητικά μιμείται το βασικό ιοντικό περιεχόμενο του αίματος ή του πλάσματος, έχει pH 7.4 σε θερμοκρασία 37°C και αποτελείται από την ακόλουθη σύνθεση σε mM: NaCl 118.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, γλυκόζη 11.0 και CaCl<sub>2</sub> 2.5. Το μειονέκτημα αυτού του διαλύματος είναι το γεγονός, ότι οι Krebs και Henseleit δεν έλαβαν υπόψη τους, ότι ένα μεγάλο μέρος του ασβεστίου στο αίμα είναι συνδεδεμένο στις πρωτεΐνες και η ιονισμένη συγκέντρωση ασβεστίου στο πλάσμα είναι περίπου η μισή από τη συνιστώμενη περιεκτικότητα. Κατά συνέπεια, στα πειράματα των απομονωθέντων καρδιών έχουν χρησιμοποιηθεί και ακόμα χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου στο διάλυμα τους μιας δεν περιέχεται πρωτεΐνη ή μόρια ικανά να δεσμεύσουν το ασβέστιο. Αυτό σημαίνει, ότι σε πολλές μελέτες, η καρδιά βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς ινότροπης δράσης, εφόσον εργάζεται στα ανώτερα όρια της καμπύλης ασβεστίου/δυναμικού του μυϊκού κυττάρου. Για αυτό το λόγο πολλοί ερευνητές προσπαθούν να επιλύσουν αυτό το πρόβλημα με τη χρησιμοποίηση των ιονισμένων συγκεντρώσεων ασβεστίου της τάξης 1.2 – 1.8 mM. Αναφερόμενοι στο ασβέστιο είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι κατά την προετοιμασία του διαλύματος, που εμπεριέχει τα ιόντα ασβεστίου και φωσφορικού άλατος, υπάρχει το ενδεχόμενο κροκίδωσης των μορίων φωσφορικού άλατος ασβεστίου με συνέπεια την απόφραξη των στεφανιαίων αρτηρίων και την καταστροφή της παρασκευασμένης

καρδιάς. Αυτό το πρόβλημα επιλύεται εύκολα με την προσθήκη της ποσότητας ασβεστίου στο τέλος της παρασκευής του διαλύματος και ενώ προηγουμένως έχουμε εξασφαλίσει μείωση του pH του διαλύματος με εμπλουτισμό με αέριο μίγμα 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>.

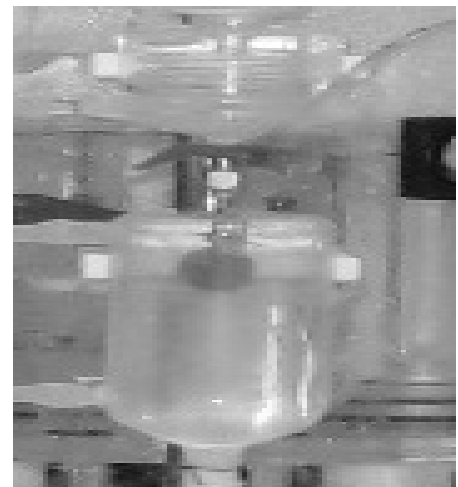
### *Οξυγόνωση*

Βασικό στη διατήρηση της απομονωθείσας καρδιάς είναι η συνεχής και ικανοποιητική παροχή οξυγόνου, έτσι ώστε να υποστηρίζεται ο κανονικός μεταβολισμός, να διατηρούνται τα διαμεμβρανικά δυναμικά και να εκτελείται φυσιολογικά η σύσπαση του καρδιακού κυττάρου. Έτσι, στη διάταξη Langendorff το οξυγόνο εξασφαλίζεται με συνεχή εμπλουτισμό αέριου μίγματος 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> του διαλύματος μέσω μιας παροχής, η οποία καταλήγει σε έναν υάλινο διαχυτή μέσα στη δεξαμενή αποθήκευσης του διαλύματος. Η αναφερόμενη περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub> απαιτείται για να ρυθμιστεί το σωστό pH στην τιμή 7.4 για το διάλυμα έγχυσης που βασίζεται σε διττανθρακικά άλατα.

### *Θερμοκρασία*

Άλλο ένας παράγοντας με τον οποίο έχει ισχυρή σχέση η καρδιακή συσταλτική λειτουργία είναι η θερμοκρασία. Για παράδειγμα, ένα από τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα της αλλαγής θερμοκρασίας είναι οι αλλαγές στην καρδιακή συχνότητα. Λόγω της σχέσης έργου-συχνότητας, οι αλλαγές στη θερμοκρασία επιφέρουν επιπτώσεις στο μέγεθος της συσταλτικότητας. Επομένως, η άρδευση είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται σε, ή πλησίον της κανονικής θερμοκρασίας σώματος των ειδών που μελετούνται [337, 344]. Η θερμοκρασία της καρδιάς μπορεί να επηρεαστεί από τη θερμοκρασία του αέρα, που την περιβάλλει και τη

θερμότητα του παρεχόμενου διαλύματος. Η απαραίτητη θερμοκρασία και των δύο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση διπλοτοιχωματικών υάλινων επενδύσεων των δεξαμενών, των σωληνώσεων μεταφοράς διαλύματος και της καρδιακής θαλάμης. Στις υάλινες αυτές επενδύσεις ανακυκλώνεται διαρκώς μία θερμοστατικά ελεγχόμενη ποσότητα νερού στην επιθυμητή για το πείραμα θερμοκρασία με τη βοήθεια του προαναφερόμενου θερμοστάτη-κυκλοφορητή. Η διατήρηση μιας σταθερής θερμοκρασίας επηρεάζει την πειραματική ακολουθία μας, όπως και εξαρτάται από αυτήν. Σε συνθήκες ισχαιμίας η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου καθορίζεται σε ένα βαθμό από τη θερμοκρασία του μυϊκού ιστού που ισχαιμεί, αλλά και αντίστροφα η ίδια η ισχαιμία επιδρά στη θερμοκρασία του ιστού. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε την καρδιακή θαλάμη, η οποία βρίσκεται κάτω από την απομονωθείσα καρδιά και είναι γεμάτη με φυσιολογικό ορό στην ορισμένη για το πείραμα θερμοκρασία. Κατά την έναρξη της ισχαιμίας η θαλάμη αυτή μετατοπίζεται προς την καρδιά και αυτή βυθίζεται μέσα στον ορό με αποτέλεσμα η θερμοκρασία της παραμένει και τότε σταθερή. Στη δική μας πειραματική διάταξη οι καρδιές αρδεύτηκαν σε θερμοκρασία των 37 °C.



Εικόνα 20: Η καρδιακή θαλάμη.



### 3.5.5.5. Ολική ισχαιμία και επαναιμάτωση

#### *Διαδικασία*

Η τεχνική της απομονωθείσας καρδιάς ενδείκνυται για τη μελέτη των επιπτώσεων στο μυοκάρδιο της ισχαιμίας και υποξίας. Ισχαιμία ολόκληρης της καρδιάς, δηλαδή ολική ισχαιμία ή ισχαιμία μηδενικής ροής καθώς και βαθμιαία ισχαιμία ολόκληρης της καρδιάς μπορεί να προκληθεί, είτε με παντελής διακοπή, είτε με μερική μείωση ροής του διαλύματος έγχυσης [339, 352, 353]. Η διάρκεια της ισχαιμίας ποικίλει και συνήθως εκτείνεται από 15 έως και 30 λεπτά [347]. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας γίνεται παύση της τεχνητής βηματοδότησης και αναλαμβάνει ο φλεβόκομβος [347]. Τα διάφορα επίπεδα υποξίας μπορούν επίσης να επιτευχθούν εύκολα μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση οξυγόνου, που εμπλουτίζει το διάλυμα έγχυσης [339, 352, 353]. Η επαναιμάτωση επιτυγχάνεται με επαναφορά της άρδευσης στη τιμή ροής που διατηρούσαμε κατά τη σταθεροποίηση. Αυτό συνεπάγεται ότι ενδεχομένως η πίεση άρδευσης των στεφανιαίων αγγείων δύναται πλέον να έχει μεταβληθεί μετά τις όποιες συνέπειες της μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Το διάστημα της επαναιμάτωσης κυμαίνεται από 30 έως 120 λεπτά.

#### *Αιμοδυναμικά στοιχεία / Ισχαιμική τετανία / Υπερτετανία*

Η διάταξη Langendorff παρέχει τις πολύτιμες πληροφορίες για το αριστερό κοιλιακό σύστημα: συστολική και διαστολική πίεση, όπως και τα παράγωγα τους. Σημαντικοί παράμετροι κατά τη μελέτη της ισχαιμίας είναι η έννοια της ισχαιμικής τετανίας και κατά την επαναιμάτωση της υπερτετανίας. Ως ισχαιμική τετανία ορίζεται η απότομη αύξηση της διαστολικής πίεσης της αριστερής κοιλίας κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, ενώ ως υπερτετανία η μέγιστη διαστολική πίεση της

αριστεράς κοιλίας κατά τα πρώτα πέντε λεπτά της επαναιμάτωσης. Μηχανιστικά η ισχαιμική τετανία περιλαμβάνει μία ανεξάρτητα του ασβεστίου διασταύρωση των ινών ακτίνης και μυοσίνης, καθώς το ATP στο μυοκάρδιο εξαντλείται κάτω από κάποια κατώτερα όρια υποχιλιοστής μοριακής συγκέντρωσης.

Οι παράμετροι αυτοί έχουν διαπιστωθεί, ότι πιθανόν επιδρούν στη μετα-ισχαιμική αποκατάσταση είτε με την ταχεία είσοδο τους, είτε με τη διάρκεια και έκταση τους [354-356]. Επιπρόσθετα η ισχαιμική σύσπαση μπορεί να επιταχύνει τη μείωση ATP και την υπερφόρτωση ασβεστίου [357] όπως και να εμποδίζει την αναγέννηση ATP κατά την επαναιμάτωση [358]. Η καθυστέρηση της έναρξης ή η μείωση του μεγέθους της τετανικής ισχαιμικής σύσπασης ίσως επηρεάζει θετικά το μεταισχαιμικό αποτέλεσμα, όπως φαίνεται σε κάποιες κάποιες μελέτες, που παρατηρούν καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα μετά από καθυστέρηση ανάπτυξης ισχαιμικής τετανίας με χορήγηση αδενοσίνης [359-366]. Επίσης έχει τεκμηριωθεί χαρακτηριστική βελτίωση της μετα-ισχαιμικής αποκατάστασης, όταν αποφεύχθηκε η σύσπαση, ανεξάρτητα από την ισχαιμική διάρκεια [367]. Εν τούτοις, η ισχαιμική σύσπαση και η μετα-ισχαιμική αποκατάσταση μπορούν να μη συσχετιστούν, υπό συγκεκριμένους όρους, συμπεριλαμβανομένης της ισχαιμικής προετοιμασίας [368].

#### *Λοιπές μελέτες*

Οι μελέτες της καρδιακής λειτουργίας διενεργούνται εύκολα με την απομονωμένη καρδιά και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη παρακολούθηση των βιοχημικών και μεταβολικών γεγονότων, που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και την πρώιμη επαναιμάτωση. Απελευθέρωση κυτταρικών συστατικών, όπως ένζυμα και πρωτεΐνες ως αποτέλεσμα της ισχαιμίας και της υποξίας, καθώς και δείκτες του

καρδιακού μεταβολισμού μπορούν να καθοριστούν στη στεφανιαία απορροή. Στο τέλος της άρδευσης ο καρδιακός ιστός μπορεί να καταψυχθεί για περαιτέρω μεταβολική ανάλυση. Τέλος, η διάταξη είναι πολύ χρήσιμη για τη μελέτη των μεταβολικών οδών υπό ισχαιμικές συνθήκες, μιας και προσφέρεται η δυνατότητα να μεταβληθούν τα συστατικά στο διάλυμα έγχυσης και να ταυτοποιηθούν τα μεταβολικά προϊόντα μπορούν να καθοριστούν στη στεφανιαία απορροή.

### **3.5.5.6. Τμηματική ισχαιμία και μέτρηση στεφανιαίας ροής**

Τμηματική ισχαιμία μπορεί να προκληθεί στην απομονωθείσα καρδιά με την απολίνωση μιας στεφανιαίας αρτηρίας και το μέγεθος της ισχαιμικής περιοχής μπορεί να μεταβληθεί με την αλλαγή της θέσης της απόφραξης του στεφανιαίου κλάδου [339, 352, 353]. Ακολούθως η επαναιμάτωση μπορεί να επιτευχθεί εύκολα αφαιρώντας την απολίνωση. Η αριστερή στεφανιαία αρτηρία χρησιμοποιείται πιο συχνά για πρόκληση τμηματικής ισχαιμίας [339, 353]. Η ομοιόμορφη ανατομία της στεφανιαίας κυκλοφορίας της καρδιάς του επίμουσ επιτρέπει τη δημιουργία ισχαιμικών περιοχών παρομοίου μεγέθους. Ένας άλλος τρόπος πρόκλησης περιφερειακής ισχαιμίας (εναλλακτική της απολίνωσης στεφανιαίων αρτηριών) έχει καθιερωθεί από τους Ankiran και Curtis, οι οποίοι αντικατέστησαν την κανονική αορτική κάνουλα με έναν καθετήρα διπλού αυλού [369]. Ο καθετήρας τοποθετήθηκε στην αορτή έτσι ώστε κάθε αυλός να εισέρχεται στο αριστερό ή δεξιό στεφανιαίο στόμιο, έτσι ώστε κάθε στεφανιαία αρτηρία να αρδεύεται ανεξάρτητα από την άλλη και η εκλεκτική μείωση άρδευσης της μίας να ισοδυναμεί με απολίνωση και ακόλουθη τμηματική ισχαιμία. Το μέγεθος της ισχαιμικής περιοχής μπορεί να υπολογιστεί από την ποσοστιαία επί τοις εκατό πτώση στη

στεφανιαία ροή ή αύξηση της στεφανιαίας αγγειακής αντίστασης, υπό σταθερή πίεση ή ροή άρδευσης, αντίστοιχα [339]. Η επαλήθευση της απόφραξης γίνεται με τη χορήγηση χρωστικής ουσίας ή φθοριομένων μικροσφαιριδίων στο τέλος της άρδευσης.

Η μέτρηση της στεφανιαίας ροής υπολογίζεται όπως αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες [370] και συγκεκριμένα υπό σταθερή πίεση άρδευσης συλλέγεται σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα η στεφανιαία απορροή και ύστερα ο όγκος αυτός αναγάγεται στη μονάδα χρόνου και βάρους της απομονωθείσας καρδιάς, δηλαδή σε ml/min/g.

### **3.5.6. Το πειραματικό πρωτόκολλο στη διάταξη Langendorff**

Στους επίμυες της δεύτερης ομάδας μελετήθηκε η υπόθεση, ότι η χρόνια ισχαιμία οπίσθιου άκρου δύναται να μειώσει τη δυσλειτουργία της απομονωθείσας καρδιάς μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Για το λόγο αυτό οι καρδιές αυτών των επίμυων αναρτήθηκαν στη διάταξη, αρδεύτηκαν σε συνθήκες σταθερής ροής στους 37 °C υπό πίεση διαπότισης στεφανιαίων 60 – 70mmHg και αφού σταθεροποιήθηκαν, υπέστησαν ολική ισχαιμία με διακοπή-μηδενισμό της ροής διαλύματος έγχυσης, επόμενως και της άρδευσης των στεφανιαίων και του υποκείμενου μυοκαρδίου (global ischemia ή zero flow ischemia). Η ολική ισχαιμία διήρκεσε 20 λεπτά και ακολούθησε επαναιμάτωση 45 λεπτών με επανεκκίνηση της άρδευσης των στεφανιαίων αγγείων. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας ο βηματοδότης απενεργοποιήθηκε. Όλες οι παρασκευασμένες καρδιές πριν την έναρξη της ισχαιμίας παρέμειναν σταθερές και χωρίς αρρυθμολογικά φαινόμενα για διάστημα 10 λεπτών.

Η συστολική (SP), τελοδιαστολική (EDP), η αναπτυσσόμενη πίεση (LVDP), η μέγιστη θετική και αρνητική κατά μονάδα χρόνου μεταβολή της πίεσης ( $\pm dp/dt$ ) της αριστερής κοιλίας καταγράφηκαν και στο τέλος της επαναιμάτωσης υπολογίστηκε η ποσοστιαία μετα-ισχαιμική αποκατάσταση των τιμών τους σε σύγκριση με αυτές κατά τη φάση της σταθεροποίησης (πριν την έναρξη της ισχαιμίας). Ορίσαμε ως  $SP_0$ ,  $EDP_0$ ,  $LVDP_0$ ,  $\pm dp/dt_0$  και  $SP$ ,  $EDP$ ,  $LVDP$ ,  $\pm dp/dt$  τις τιμές πριν την ισχαιμία και στο τέλος της επαναιμάτωσης αντίστοιχα. Η αποκατάσταση υπολογίστηκε από τους λόγους  $SP/SP_0$ ,  $EDP/EDP_0$ ,  $LVDP/LVDP_0$ ,  $\pm dp/dt/\pm dp/dt_0$  επί 100%.

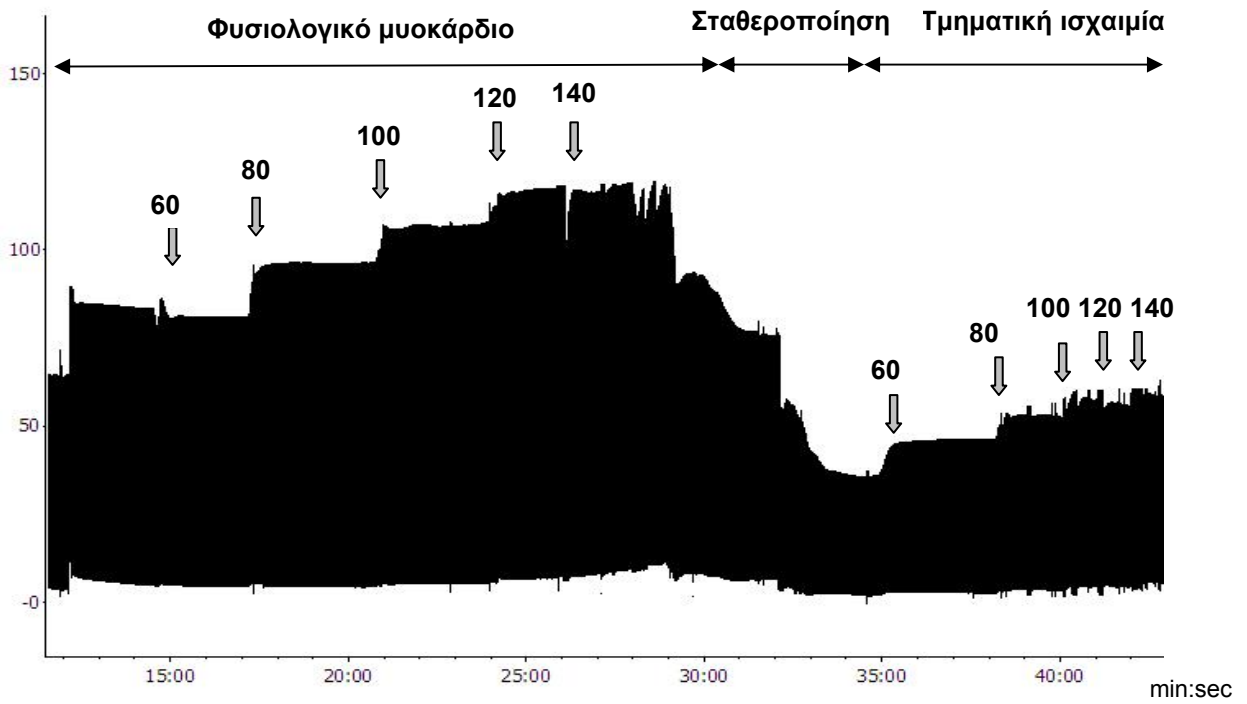
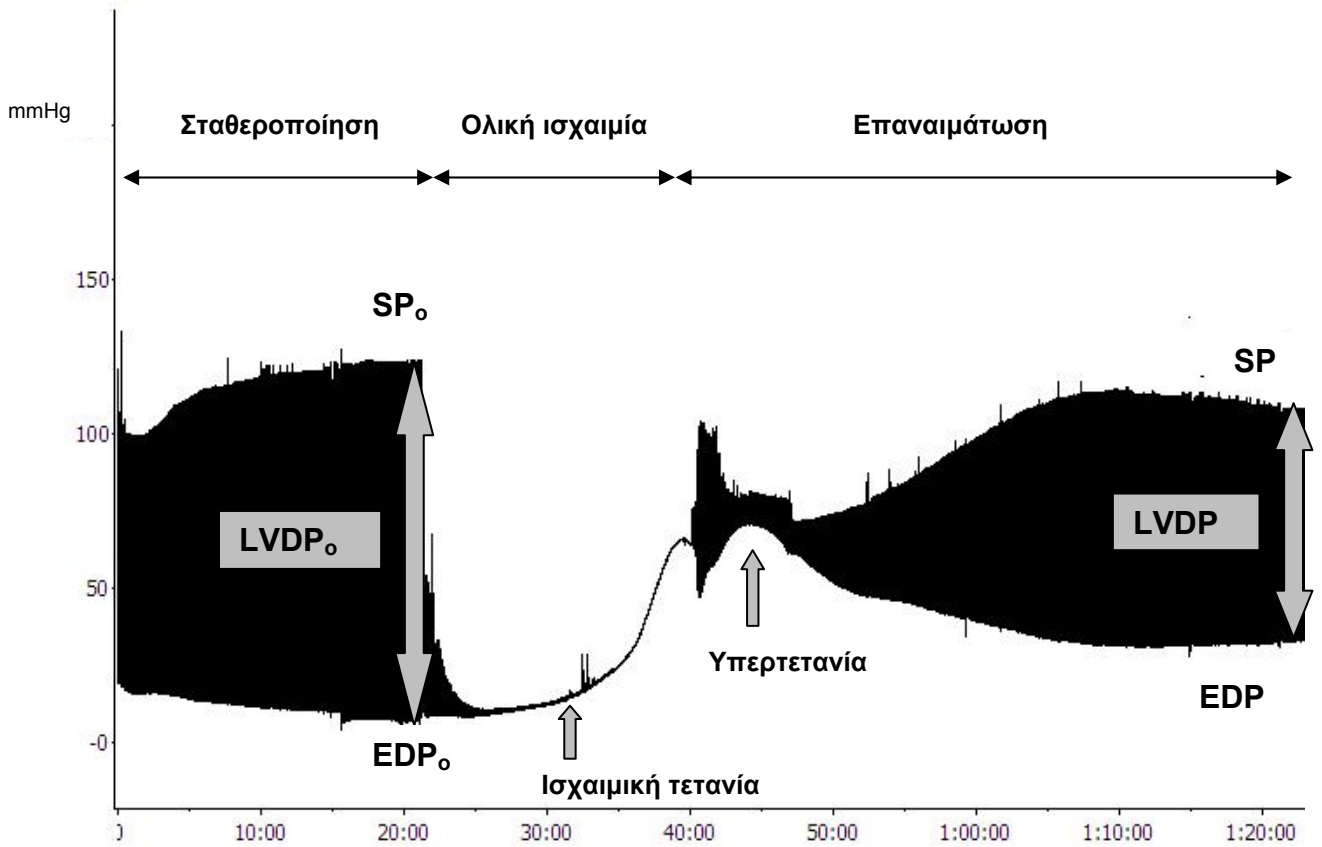
Επιπλέον σημειώθηκε το χρονικό διάστημα από την έναρξη της ισχαιμίας μέχρι την είσοδο της ισχαιμικής τετανίας (TOC: time to onset contracture) και η μέγιστη τιμή διαστολικής στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης. Το χρονικό σημείο κατά την ισχαιμία, στο οποίο καταγράφεται αύξηση της διαστολικής πίεσης πέραν των 20mmHg θεωρήθηκε ως το σημείο αναφοράς για την έναρξη της ισχαιμικής τετανίας, όπως χρησιμοποιείται και σε άλλες μελέτες [371].

Το διάγραμμα καταγραφής των αιμοδυναμικών στοιχείων όπως προκύπτει συμπυκνόμενο για τη διάρκεια του πειράματος παρουσιάζεται παρακάτω (διάγραμμα 3).

Η τρίτη ομάδα επίμυων χρησίμευσε για την εξακρίβωση του υποκείμενου μηχανισμού, που προσδίδει καρδιοπροστασία και που βάσει προηγούμενων μελετών μας είχε οδηγήσει στην υπόθεση της αγγειογένεσης από απόσταση και εν προκειμένω τη επέκταση και διεύρυνση του παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου. Σε αυτό το πειραματικό μέρος διαφοροποιήσαμε τη σύσταση του διαλύματος Krebs με την προσθήκη αδενοσίνης σε τελική συγκέντρωση 0.01% [370]. Η αδενοσίνη προκαλεί αγγειοδιαστολή και η προσθήκη της αποσκοπεί όχι μόνο στη μέγιστη διεύρυνση των στεφανιαίων αγγείων, αλλά και στην κινητοποίηση παράπλευρων

νεοαγγείων, που πιθανόν υπό φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας δεν επιστρατεύονται από το μυοκάρδιο.

Οι καρδιές αφαιρέθηκαν και σταθεροποιήθηκαν όπως προηγουμένως υπό σταθερή ροή. Στη συνέχεια τροποποιήσαμε με την κονσόλα ελέγχου της αντλίας τη συνθήκη άρδευσης σε λειτουργία σταθερής πίεσης και τροφοδοτήσαμε τις καρδιές σε πέντε διαφορετικές διαδοχικά αυξανόμενες πιέσεις και ειδικότερα στα 60, 80, 100, 120 και 140mmHg. Σε κάθε πίεση άρδευσης η στεφανιαία απορροή συλλέχθηκε για διάστημα δύο λεπτών με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα. Ολοκληρώνοντας τη συλλογή στα 140mmHg επιστρέψαμε στα 60mmHg για να ακολουθήσει τμηματική ισχαιμία με απολίνωση του πρόσθιου κατιόντα σύμφωνα με τα ανατομικά σημεία πρόκλησης εμφράγματος, όπως στο *in vivo* σκέλος. Η διαδικασία συλλογής στεφανιαίας απορροής επαναλήφθηκε στις ίδιες με πριν την ισχαιμία πιέσεις. Στο τέλος του πειράματος οι καρδιές ζυγίστηκαν και η στεφανιαία ροή σε κάθε πίεση άρδευσης υπολογίστηκε σε μονάδες ml/min/g καρδιακού ιστού. Οι καταγραφές των αιμοδυναμικών στοιχείων, όπως προκύπτουν συμπτυγμένες για την όλη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Καταγραφές αριστερής κοιλίας για ολική (άνω) και τμηματική ισχαιμία (κάτω).

## 4. Τεχνικές στον κόνικλο

### 4.1. Πρόκληση περιφερικής ισχαιμίας

Η τεχνική πρόκλησης της περιφερικής αρτηριακής ανεπάρκειας στον κόνικλο πραγματοποιείται ακολουθώντας την ίδια διαδικασία και ανατομικά σημεία, όπως στον επίμου και εχέι περιγραφεί παλαιότερα [313, 315, 317]. Εν συντομία, τα ζώα αναισθητοποιούνται με ένα μίγμα κεταμίνης (60-80mg/kg) και ακεπρομαζίνης (0.8 mg/kg) μετά από προνάρκωση με ξυλαζίνη (2.5 mg/kg). Μια διαμήκης τομή εκτελείται εκτεινόμενη κάτω από τον αριστερό βουβωνικό σύνδεσμο έως ενός σημείου πλησίον τη επιγονατίδας. Η μηριαία αρτηρία παρασκευάζεται σε ολόκληρο το μήκος της και όλοι οι κλάδοι της, συμπεριλαμβανομένης της κάτω επιγαστρικής, εν τω βάθει μηριαίας, έξω περισπωμένης, και επιπολής επιγαστρικής αρτηρίας απολινώνονται και αφαιρούνται. Η ιγνυακή, η σαφηνής και η έξω λαγόνιος απολινώνονται επίσης και τελικά η μηριαία απομακρύνεται από την έκφυση ως τη διακλάδωση της. Μετεγχειρητικά τα πειραματόζωα φροντίζονται και παρακολουθούνται στενά και λαμβάνουν για 5 ημέρες προφυλακτική δόση αντιβίωσης (κεφαζολίνη (15 mg/kg ενδομυϊκά ημερησίως) και επί πόνου αναλγησία (βουπρενορφίνη 0,04 mg/kg υποδορίως).

Η εικονική επέμβαση στα ζώα-μάρτυρες περιλαμβάνει παρόμοια αναισθησία, τη διενέργεια της επιμήκους τομής και στο τέλος τη συρραφή του τραύματος. Η χορήγηση αντιβιοτικής προφύλαξης και αναλγησίας είναι επίσης η ίδια.

Με την πάροδο της τέταρτης εβδομάδας όλα τα ζώα επιθεωρούνται για μακροσκοπική ατροφία ή νέκρωση αριστερού οπίσθιου άκρου).



## 4.2. Αναισθησία και αερισμός

Όπως περιγράφεται σε πρόσφατες μελέτες, οι κόνικλοι αναισθητοποιούνται με αργή έγχυση νατριούχου θειοπεντάλης (Pentothal, Abbott) σε μια φλέβα αυτιού [372-374]. Ο μηχανικός αερισμός εκτελείται με διασωλήνωση μέσω τραχειοστομίας και αφού έχει προηγηθεί γρήγορη χειρουργική αποκάλυψη της τραχείας. Ο τραχειοσωλήνας συνδέεται στη συνέχεια σε μια αναπνευστική συσκευή θετικής πίεσης για μικρά ζώα (MD Industries, Mobile, AL, USA) και ρυθμίζεται στις 35 αναπνοές/λεπτό, έτσι ώστε να διατηρηθούν τα αέρια και το pH αίματος μέσα στα φυσιολογικά όρια. Στη συνέχεια αποκαλύπτονται η κοινή καρωτίδα και η έσω σφαγίτιδα και καθετηριάζονται. Μέσω της κοινής καρωτίδας αποκτάμε συνεχή έλεγχο πίεσης του αίματος και καρδιακού ρυθμού μέσω ενός μετατροπέα πίεσης, που συνδέεται με ένα όργανο καταγραφής. Η έσω σφαγίτιδα χρησιμεύει για τη χορήγηση υγρών, φυσιολογικού ορού με ρυθμό 1ml ανά 30 λεπτά εμπλουτισμένο με 1000UI ηπαρίνης ανά 100ml και αναισθησίας επί ένδειξης.



Εικόνα 21: Τραχειοστομία, αερισμός και καθετηριασμός καρωτίδας στον κόνικλο.

### 4.3. Τεχνική πρόκλησης εμφράγματος-επαναιμάτωσης

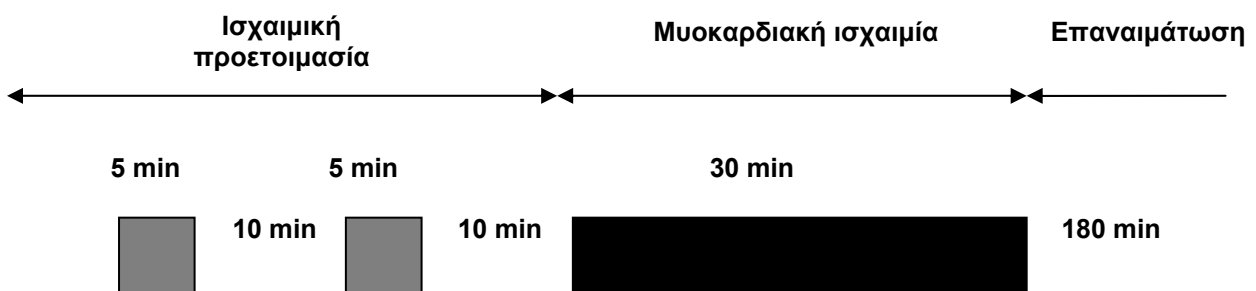
Η μεθοδολογία περιγράφεται σε παλιότερες δημοσιεύσεις [372-374] και έχει ως εξής: Ο θώρακας ξυρίζεται και διενεργείται αριστερή θωρακοτομή στο τέταρτο μεσοπλεύριο διάστημα. Τυχόν αιμορραγία από διατέμνοντα ιστό μυικό και συνδετικό ελέγχεται με χρήση διαθερμίας. Το πλάτος του μεσοπλεύριου διαστήματος διευρύνεται περαιτέρω με χρήση διαστολέα ασκώντας ήπια πίεση στις πλευρές. Τότε η καρδιά εμφανίζεται σε όλο το μέγεθος της και εν συνεχεία αποκαλύπτεται με αφαίρεση του περικάρδιου. Ένα ράμμα μέταξας 3-0 εισαγάγεται και αναδύεται στο μυοκάρδιο γύρω από έναν προεξέχων κλάδο της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Η ισχαιμία προκαλείται με το τράβηγμα των ακρών του ράμματος μέσα από ένα μικρό τμήμα ενός μαλακού σωλήνα, ο οποίος εφάπτεται σταθερά στην αρτηρία με τη βοήθεια ενός σφιγκτήρα. Η επιτυχής πρόκληση της ισχαιμίας επιβεβαιώνεται από τη μείωση πίεσης του αίματος στο όργανο καταγραφής και από τη μακροσκοπική κυάνωση της καρδιάς. Το διάστημα της μυοκαρδιακής ισχαιμίας ανέρχεται στα 30 λεπτά. Η επαναιμάτωση επιτυγχάνεται με λύσιμο του σφιγκτήρα και απελευθέρωση του μαλακού σωλήνα από την επιφάνεια της καρδιάς. Η διάρκεια της επαναιμάτωσης ορίζεται στα 180 λεπτά.



Εικόνα 22: Μυοκαρδιακή ισχαιμία στον κόνικλο.

#### 4.4. Τεχνική ισχαιμικής προετοιμασίας

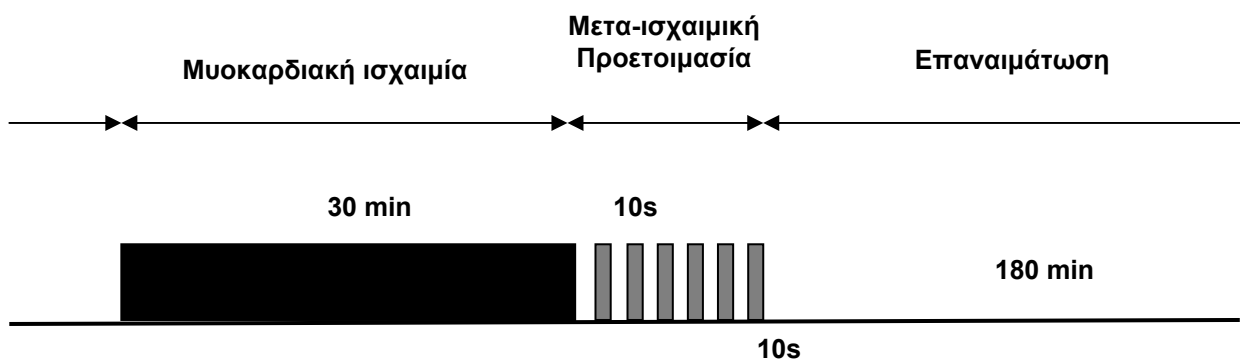
Η ισχαιμική προετοιμασία περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες και επιλέχθηκε η υιοθέτηση αλγόριθμου, που οδηγεί σε προστασία και μείωση της έκτασης του εμφράγματος [375]. Μετά την αποκάλυψη της καρδιάς ακολουθείται η ίδια διαδικασία τοποθέτησης του ράμματος για πρόκληση μυοκαρδιακής ισχαιμίας και προχωρούμε σε δημιουργία ισχαιμικού επεισοδίου διάρκειας 5 λεπτών με έλξη των άκρων του ράμματος μέσα από το μαλακό σωλήνα και σταθεροποίηση αυτού με το σφιγκτήρα. Την ισχαιμία των 5 λεπτών ακολουθεί διάστημα επαναιμάτωσης διάρκειας 10 λεπτών. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλη μία φορά και στη συνέχεια μεταβαίνουμε στην παρατεταμένη ισχαιμία των 30 λεπτών και στην επαναιμάτωση των 180 λεπτών. Συνοπτικά αναφερόμαστε στο παραπάνω πρωτόκολλο ως ισχαιμική προετοιμασία δύο κύκλων 5/10 λεπτών. Σχηματικά απεικονίζεται το πρωτόκολλο παρακάτω.



Διάγραμμα 4: Το πρωτόκολλο της ισχαιμικής προετοιμασίας.

#### 4.5. Τεχνική μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας

Η μετα-ισχαιμική προετοιμασία βασίστηκε και αυτή σε προτεινόμενους κύκλους από πειράματα [376, 377]. Συγκεκριμένα μετά την παρατεταμένη μυοκαρδιακή ισχαιμία των 30 λεπτών με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία προκαλούμε έξι αλληπάληλα επεισόδια ισχαιμίας διάρκειας 10 δευτερολέπτων, τα οποία συνοδεύονται από αντίστοιχα διαστήματα 10 δευτερολέπτων επαναιμάτωσης. Η κύρια επαναιμάτωση των 180 λεπτών ξεκινά μετά τη λήξη του έκτου και τελευταίου επεισοδίου παροδικής ισχαιμίας. Σε αυτή την περίπτωση όπως φαίνεται και σχηματικά πιο κάτω εφαρμόζουμε μετα-ισχαιμική προετοιμασία έξι κύκλων 10/10 δευτερολέπτων.

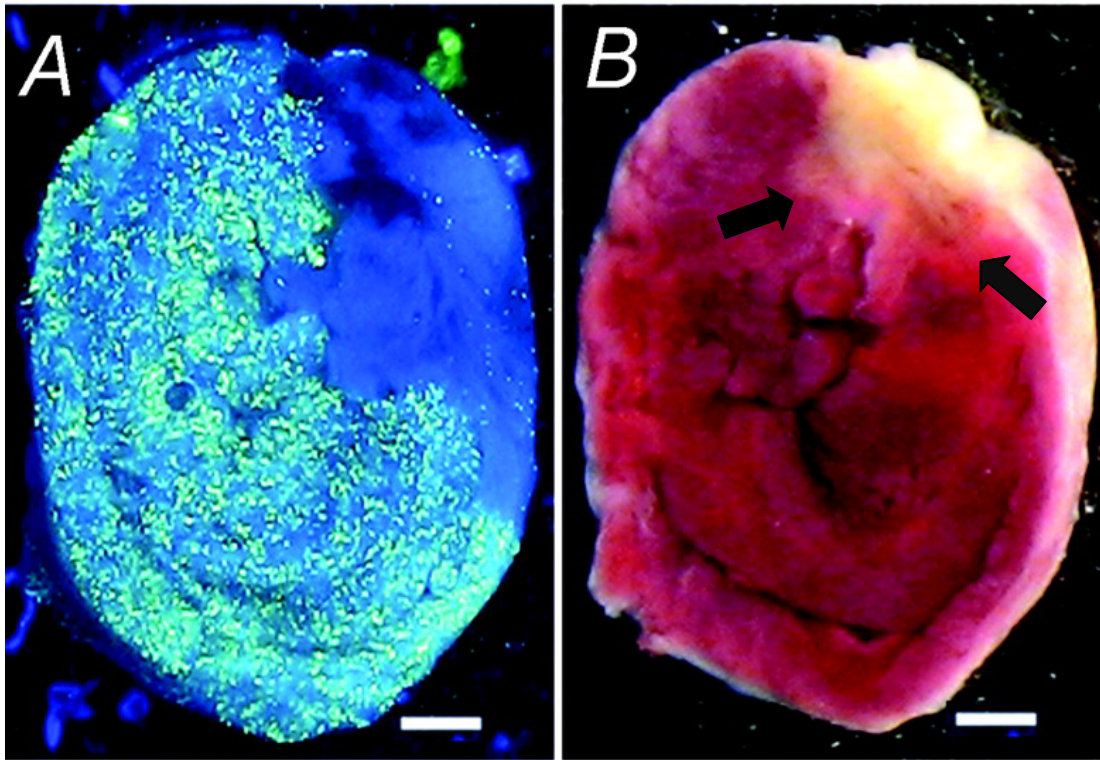


Διάγραμμα 5: Το πρωτόκολλο της μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.

#### 4.6. Προσδιορισμός ισχαιμικής και εμφραγματικής περιοχής

Μετά το τέλος της περιόδου της επαναιμάτωσης, οι καρδιές αφαιρούνται, αναρτούνται σε συσκευές άρδευσης και διαποτίζονται ανάδρομα μέσω της ανιούσας αορτής, με φυσιολογικό ορό, με παροχή 10 ml/min, υπό πίεση 50 mmHg σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Σημειώνεται ότι δεν αφαιρείται το ράμμα με

οποίο προκαλέσαμε την ισχαιμία από την καρδιά. Όταν όλο το υπόλοιπο αίμα αφαιρεθεί από τις στεφανιαίες αρτηρίες, η στεφανιαία απολίνωση εφαρμόζεται ξανά στο ίδιο σημείο, με το ράμμα να δένεται σε κόμπιο αυτή τη φορά και 5ml διαλύματος μικροσφαιριδίων φθορισμού διαμέτρου 2-9  $\mu\text{m}$  (Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA, USA) σε φυσιολογικό ορό εγχύονται αργά, μέσα σε διάστημα 5 λεπτών για τη σκιαγράφιση και διαχωρισμό του υγιούς ιστού από την ισχαιμική περιοχή. Εν συνεχεία οι καρδιές καταψύχονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες και έπειτα τεμαχίζονται σε τμήματα πάχους 3mm με φορά από την κορυφή προς τη βάση. Ύστερα, οι τομές επωάζονται σε διάλυμα TTC περιεκτικότητας 1% με ρυθμιστικό ισοτονικό διάλυμα φωσφορικού άλατος με pH 7.4, για 20 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Το TTC, όπως προαναφέραμε, αντιδρά με τα ένζυμα διυδρογενάσων και αμινονικοτινικής δινουκλεϊκής αδενίνης στον υγιή ιστό και προκύπτει ένα ζωηρό κόκκινο χρώμα. Η ισχαιμική περιοχή δε χρωματίζεται. Κατόπιν οι τομές καρδιών εμβαπτίζονται σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% για 24 ώρες για να αποκαλυφθεί καλύτερα η εμφραγματική περιοχή. Οι τομές στη συνέχεια τοποθετούνται μεταξύ δύο επίπεδων υάλινων επιφανειών και εξετάζονται κάτω από το υπεριώδες φως για να προσδιοριστούν τα όρια μεταξύ του ισχαιμόντος και υγιούς ιστού. Η εμφραγματική, η ισχαιμική και η κανονική περιοχή αποτυπώνονται επάνω σε ένα φύλλο οξικού άλατος, που τοποθετείται πάνω στη μία υάλινη επιφάνεια. Τα σκαριφήματα σαρώνονται, αποθηκεύονται σε υπολογιστή και πλανιμετρώνται με ειδικό πρόγραμμα (Image Tool, University of Texas, USA). Η ισχαιμική περιοχή μετασχηματίζεται αυτόματα σε μονάδα όγκου με τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων περιοχών με το πάχος των 3mm. Ο όγκος της εμφραγματικής και της ισχαιμικής περιοχής εκφράζεται σε κυβικά εκατοστόμετρα ( $\text{cm}^3$ ) και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναλογία εμφραγματικής /ισχαιμικής περιοχής (%I/R).



Εικόνα 23: Διαχωρισμός ισχαιμικής-υγιούς περιοχής με μικροσφαιρίδια φθορισμού (αριστερά) και εμφραγματικής-υγιούς με TTC και φορμόλη (δεξιά).

## 5. Παθολογοανατομική μελέτη

Τέσσερις εβδομάδες μετά από την πρόκληση περιφερικής ισχαιμίας, οι επίμυες του πρώτου μέρους της μελέτης από την τέταρτη ομάδα και οι κόνικλοι του δεύτερου επίσης από την τέταρτη ομάδα θυσιάστηκαν με ενδοκαρδιακή έγχυση χλωριούχου καλίου. Οι καρδιές αφαιρέθηκαν, ξεπλύθηκαν με κρύο φυσιολογικό ορό και εν συνεχεία εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% για 24 ώρες. Ένα κεντρικό εγκάρσιο τμήμα κάθε καρδιάς σκηνώθηκε σε παραφίνη και δύο τμήματα ιστού 3mm στο πάχος λήφθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διαφάνειες Superfrost (Thermo Fisher Scientific Inc.). Το πρώτο τμήμα υποβλήθηκε σε χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη για την αρχική αξιολόγηση και στο δεύτερο διενεργήθηκε μελέτη ανοσοϊστοχημείας με αντίσωμα ακτίνης λείων μυϊκών ινών (Polyclonal Antibody, RB-9010-P, Lab Vision, USA) για την ανίχνευση μικρών αγγείων (μη-τριχοειδών, μη-λεμφικών). Δεδομένου ότι τα τριχοειδή και τα λεμφικά αγγεία στερούνται τοίχωμα λείων μυϊκών ινών, η χρήση αυτής της μεθόδου επιτρέπει τον προσδιορισμό προτριχοειδικών αρτηριολίων [378]. Τα ιστολογικά τεμάχια αξιολογήθηκαν τυφλά στο διαχωρισμό των ομάδων σε εικονικής επέμβασης και αρτηριακής ανεπάρκειας από έναν παθολογοανατόμο. Τα αιμοφόρα αγγεία καθορίστηκαν σε ολόκληρο το ιστολογικό τμήμα, χρησιμοποιώντας έναν ×40 αντικειμενικό φακό και αναφέρονται ως πυκνότητα αγγείων (σύνολο αγγείων διαιρούμενο με την ολική μυοκαρδιακή επιφάνεια μέτρησης σε τετραγωνικά χιλιοστά). Αγγεία τα οποία συγκέντρωναν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, διάμετρο <50μm, προφανής διακριτός αυλός, θετική χρώση σε ακτίνη λείων μυϊκών ινών, με τουλάχιστον μία στιβάδα λείας μυϊκής ίνας θεωρήθηκαν αρτηριόλια και

συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Αντίθετα, οι μεγάλοι μεγέθους αρτηρίες ή φλέβες (οι άμεσοι κλάδοι του επικαρδιακού στεφανιαίου δικτύου) αποκλείστηκαν.

## **6. Στατιστική ανάλυση**

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές δίνονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το Student's t-test για τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Οι κατηγοριοποιημένες μεταβλητές συγκρίθηκαν με τη δοκιμή two-tailed Fisher's exact test. Η στεφανιαία ροή πριν και κατά τη διάρκεια της τμηματικής ισχαιμίας στις διάφορες πιέσεις άρδευσης αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη στατιστική δοκιμασία ανάλυσης μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η επίδραση των διαφορετικών πιέσεων άρδευσης εξετάστηκε επίσης χρησιμοποιώντας το Newman-Keuls multi-stage test. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 0.05.



## **B. Αποτελέσματα**

### **1. Πρώτο μέρος της μελέτης (Πρωτόκολλο σε επίμυες)**

Στο πρώτο μέρος μελετήθηκαν συνολικά 110 επίμυες μέσου βάρους  $252 \pm 23g$ . Οι τέσσερις ομάδες που προέκυψαν μετά από τυχαιοποίηση περιελάμβαναν κατά σειρά 50, 20, 20 και 20 πειραματόζωα αντίστοιχα. Μετά την πρόκληση της αριστερής αρτηριακής ανεπάρκειας και με το πέρας των τεσσάρων εβδομάδων οι επίμυες εξετάστηκαν μακροσκοπικά για σημεία ενδεικτικά της χρόνιας αρτηριακής ισχαιμίας, στα οποία συμπεριλαμβάνονταν η εικόνα ατροφίας άκρου και νέκρωσης του δέρματος. Όλοι οι επίμυες με χρόνια ισχαιμία άκρου παρουσίαζαν τα παραπάνω σημεία.

#### ***A Ομάδα: Ισχαιμία μυοκαρδίου χωρίς επαναιμάτωση***

Κατά την χειρουργική επέμβαση αφαίρεσης της μηριαίας αρτηρίας προέκυψε απώλεια τεσσάρων πειραματόζωων, δύο από τους μάρτυρες και δύο από την υποομάδα περιφερικής ισχαιμίας. Στη συνέχεια, μετά την διενέργεια εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά την 24ώρη παρακολούθησή τους, η θνητότητα ανήλθε σε 30.4% (7/23) στην ομάδα της εικονικής επέμβασης και 21.7% (5/23) στην υποομάδα με ισχαιμία άκρου, αλλά αυτή η διαφορά δεν βρίσκεται στα όρια στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0.73$ ).

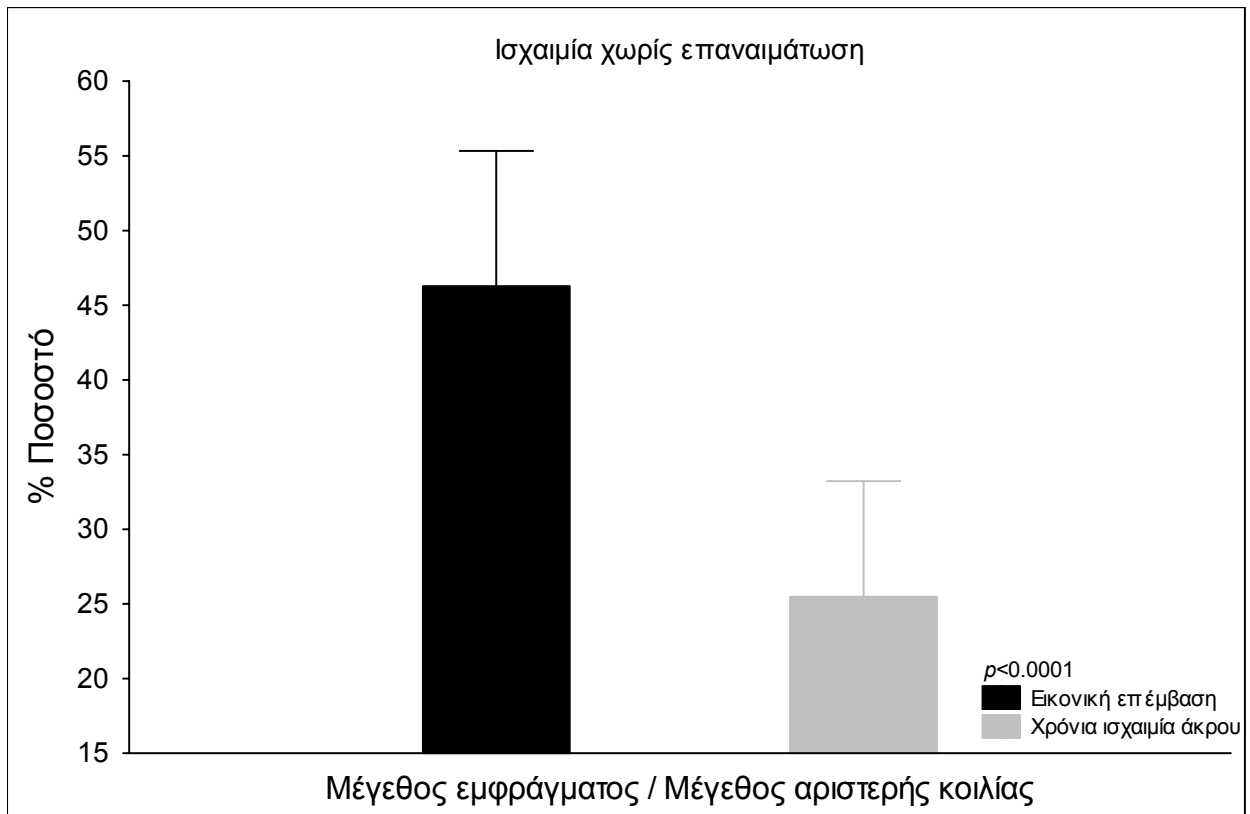
Μετά από 24 ώρες από την πρόκληση του εμφράγματος, το μέσο μέγεθος έμφραγματικής περιοχής ήταν  $46.2 \pm 9.5\%$  για την υποομάδα της εικονικής επέμβασης, ενώ η υποομάδα της χρόνιας περιφερικής ισχαιμίας παρουσίασε ένα μέσο μέγεθος της τάξης του  $25.4 \pm 8.1\%$  με τις τιμές αυτές να εμφανίζουν μεταξύ

τους σημαντική στατιστική διαφορά με  $p < 0.0001$ . Το μέγεθος του εμφράγματος κάθε επίμυος δίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Μέγεθος εμφράγματος ως % αναλογία του μεγέθους της αριστερής κοιλίας

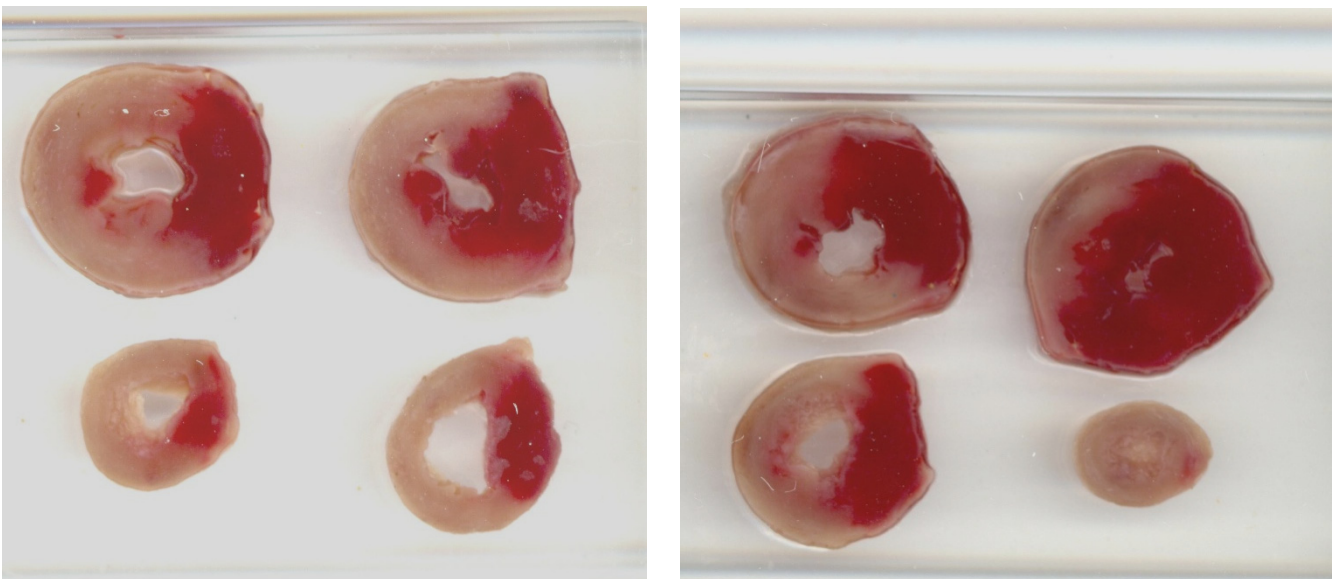
% Μέγεθος εμφράγματος / Μέγεθος αριστερής κοιλίας		
<i>Επίμυος</i>	<i>Ομάδα εικονικής επέμβασης</i>	<i>Ομάδα χρόνιας αρτηριακής ανεπάρκειας</i>
1	35.46	24.34
2	49.71	17.50
3	59.40	33.05
4	43.32	24.63
5	55.74	21.00
6	57.00	32.57
7	47.34	14.20
8	40.00	36.32
9	38.00	15.10
10	47.04	23.30
11	53.87	38.91
12	28.44	24.80
13	52.10	22.21
14	49.38	25.36
15	43.56	32.10
16	39.62	23.50
17		27.40
18		21.73
Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	46.2 ±9.5	25.4±8.1
<i>p</i>	< 0.0001	

Η στατιστική διαφορά τους απεικονίζεται στο διάγραμμα 6 και χρώσεις



Διάγραμμα 6: Στατιστική διαφορά στο μέγεθος του εμφράγματος ανάμεσα στους μάρτυρες και την ομάδα της περιφερικής ισχαιμίας.

της εμφραγματικής περιοχής των δύο ομάδων παρουσιάζονται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Χαρακτηριστικές χρώσεις εμφραγματικής περιοχής για την ομάδα της εικονικής επέμβασης (αριστερά) και μηριαίας ισχαιμίας (δεξιά).

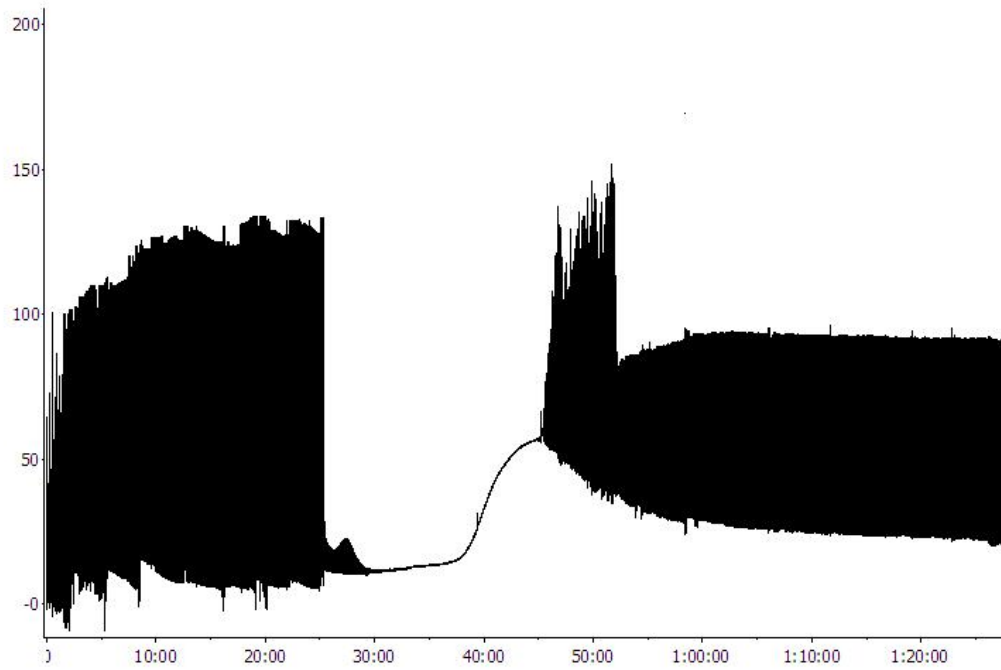
***B Ομάδα: Ισχαιμία–επαναιμάτωση***

Την πειραματική διαδικασία της δεύτερης ομάδας ολοκλήρωσαν συνολικά 16 επίμυες, ενώ δύο ζώα από κάθε υποομάδα αποκλείστηκαν από την τελική ανάλυση εξαιτίας μη ικανοποιητικής αιμοδυναμικής συμπεριφοράς κατά τη φάση της σταθεροποίησης στη διάταξη Langendorff. Ως κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ορίσαμε πίεση άρδευσης <60mmHg και >80mmHg, αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας <100mmHg και μη επιτυχής βηματοδοτικός ρυθμός κατά τη σταθεροποίηση.

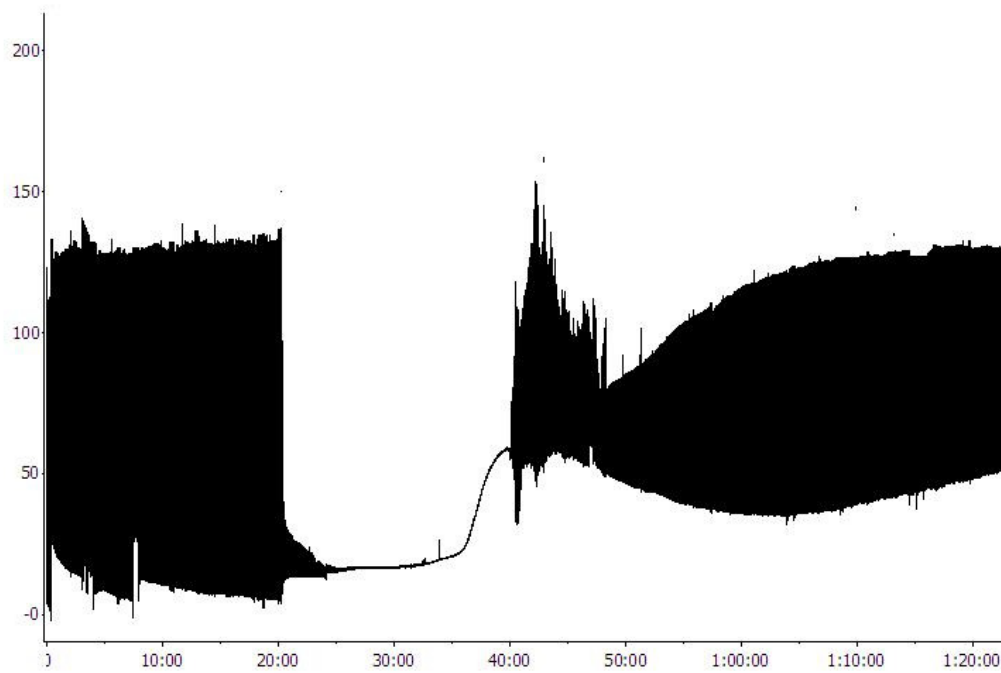
***Καταγραφή αιμοδυναμικής συμπεριφοράς αριστερής κοιλίας***

Οι αιμοδυναμικές παράμετροι της αριστερής κοιλίας μελετήθηκαν σε δύο φάσεις: είτε σε συνεχή ροή πειράματος (real time mode), λειτουργία παρακολούθησης η οποία επιτρέπει τη παρέμβαση μας στη ρύθμιση ροής διαλύματος και την ανεύρεση κατάλληλης θέσης βηματοδότησης στο στάδιο της σταθεροποίησης, είτε μετά το πέρας του πειράματος σε μορφή αποθηκευμένου αρχείου το οποίο επιδέχεται την σύμπτυξη και την παρουσίαση ολόκληρου του χρονικού διαστήματος του πειράματος στους X (χρόνος) και Ψ (στιγμιαία πίεση αριστερής κοιλίας) άξονες.

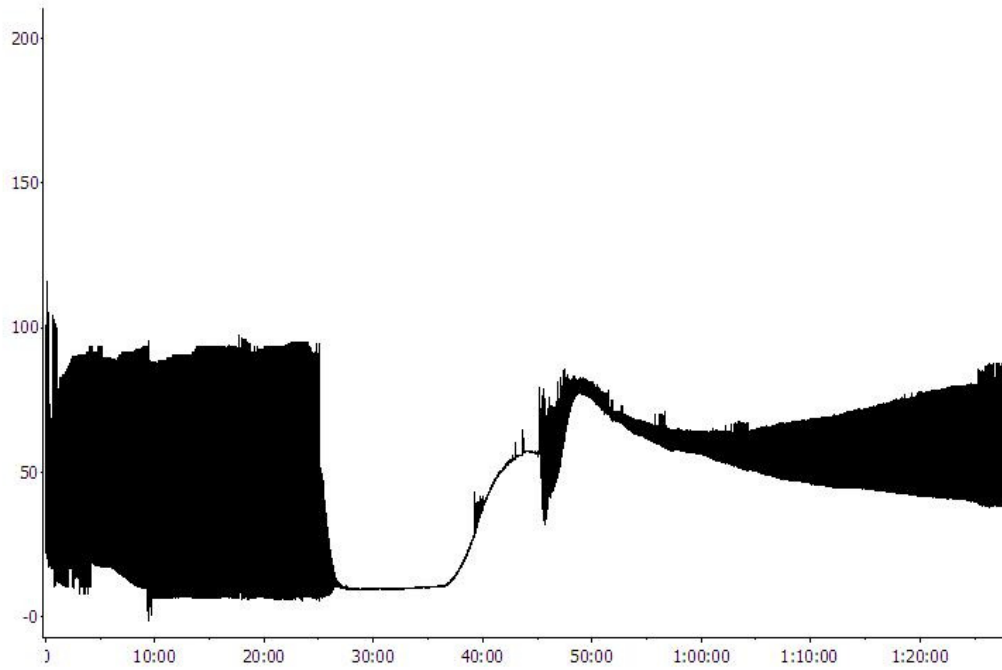
Οι καταγραφές των δύο ομάδων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω

*Ομάδα εικονικής επέμβασης*

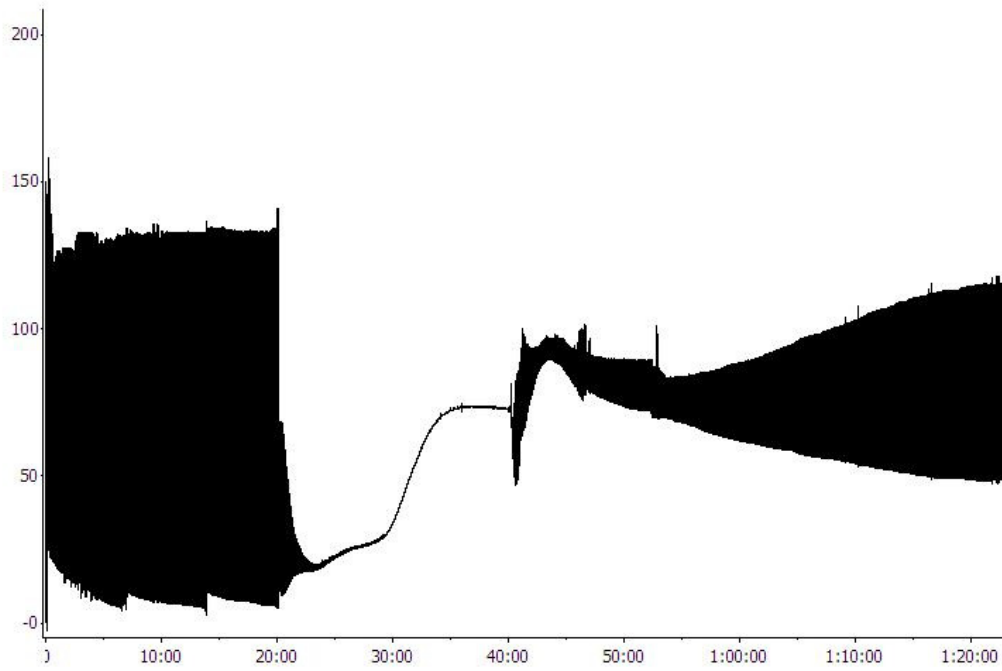
## Εικονική επέμβαση 1



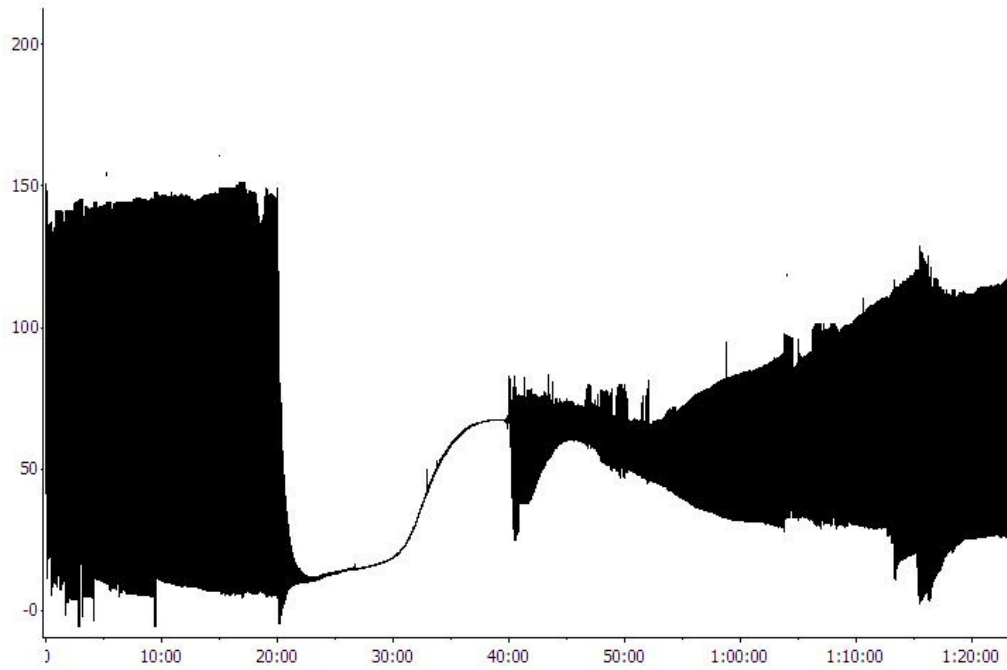
## Εικονική επέμβαση 2



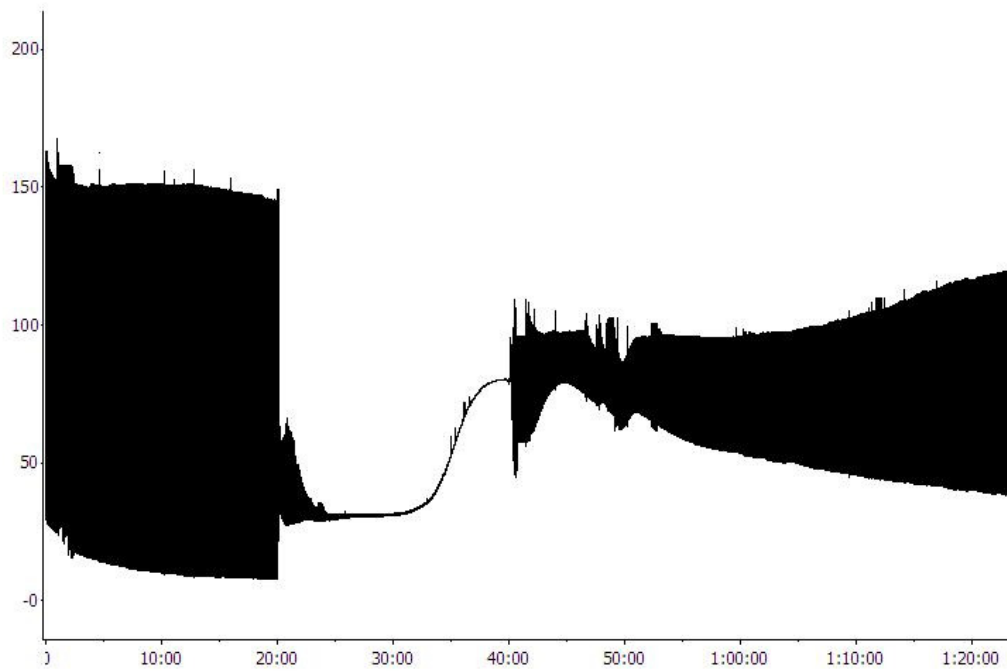
Εικονική επέμβαση 3



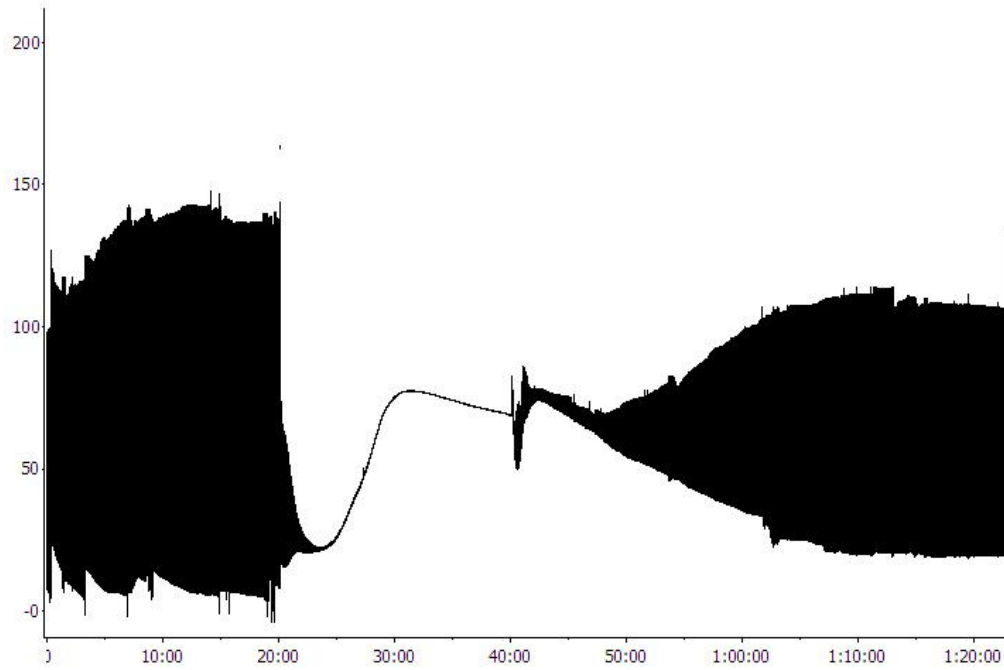
Εικονική επέμβαση 4



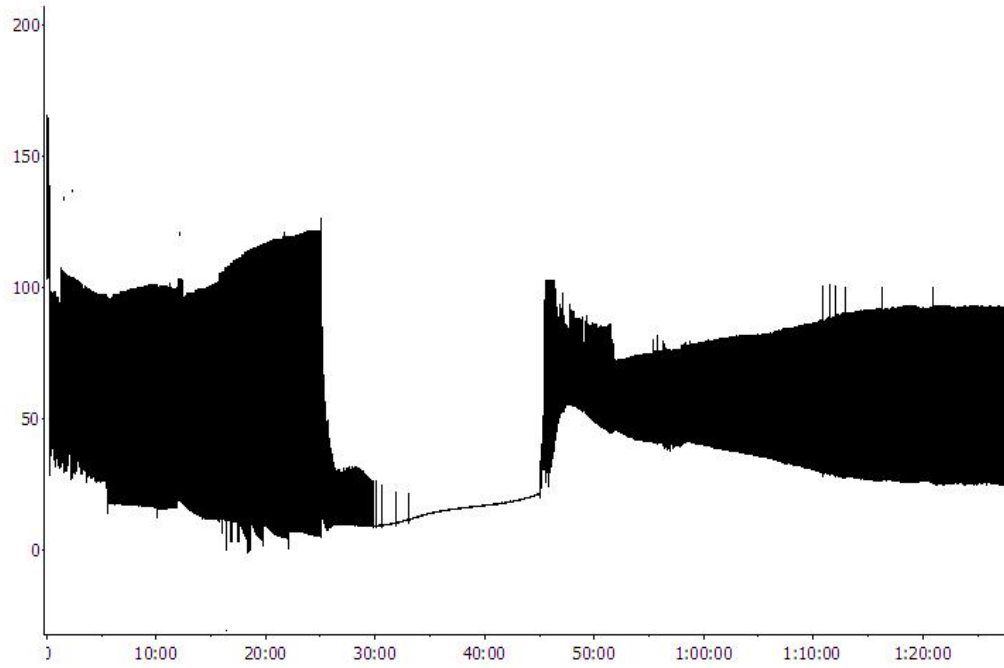
Εικονική επέμβαση 5



Εικονική επέμβαση 6

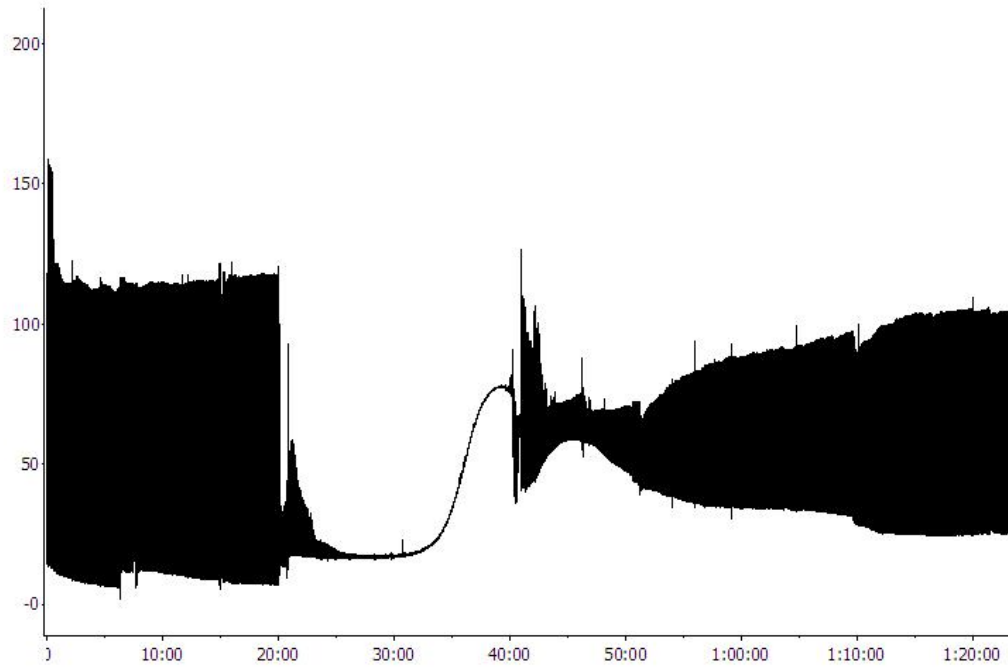


Εικονική επέμβαση 7

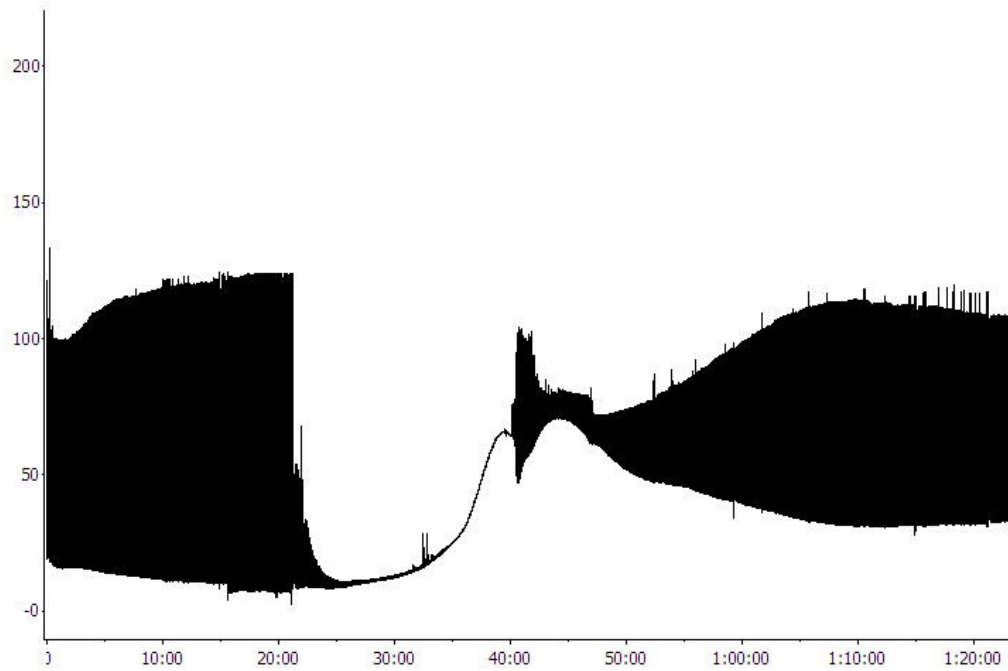


Εικονική επέμβαση 8

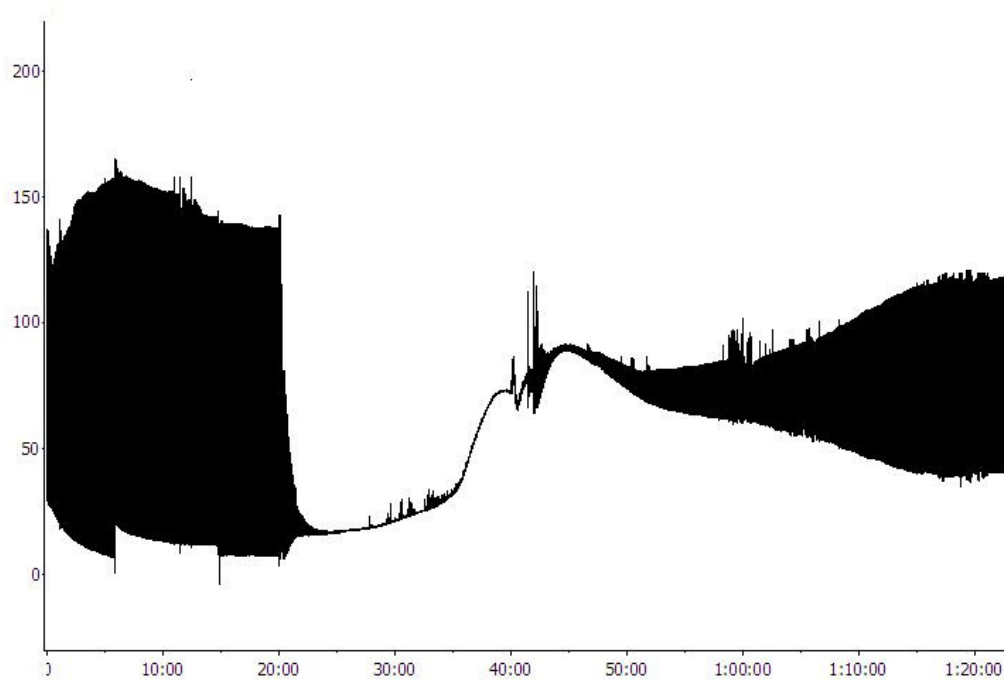


*Ομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου*

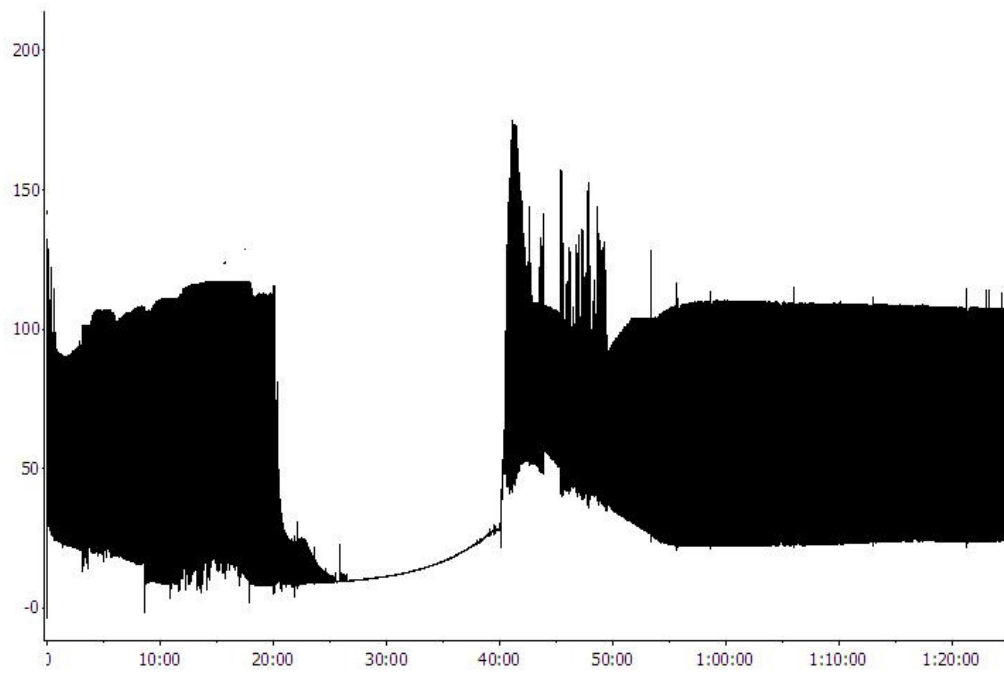
## Μηριαία Ισχαιμία 1



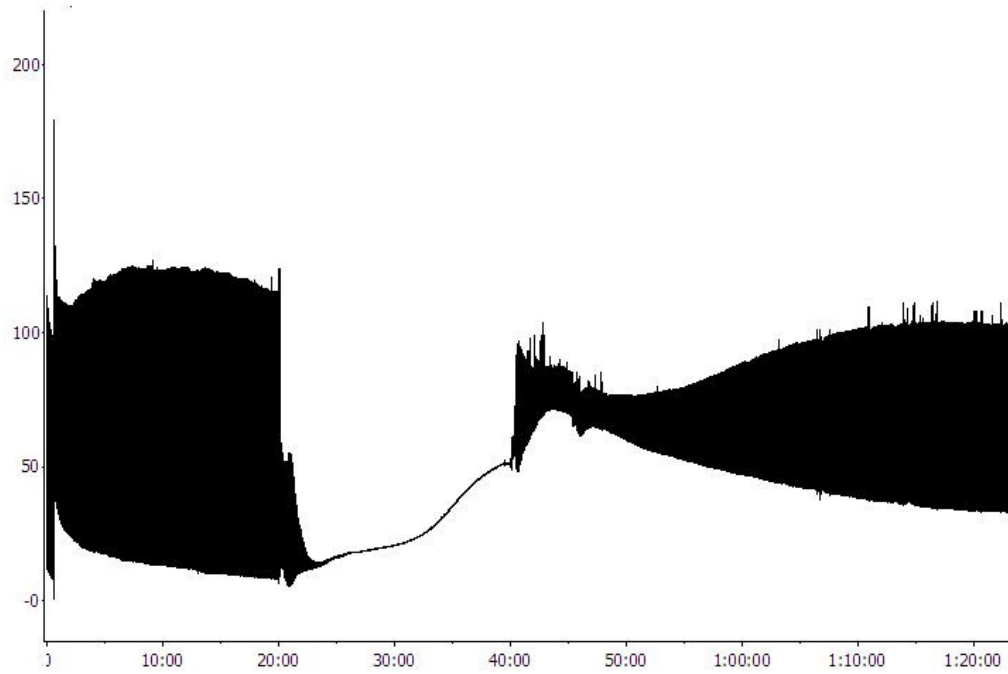
## Μηριαία Ισχαιμία 2



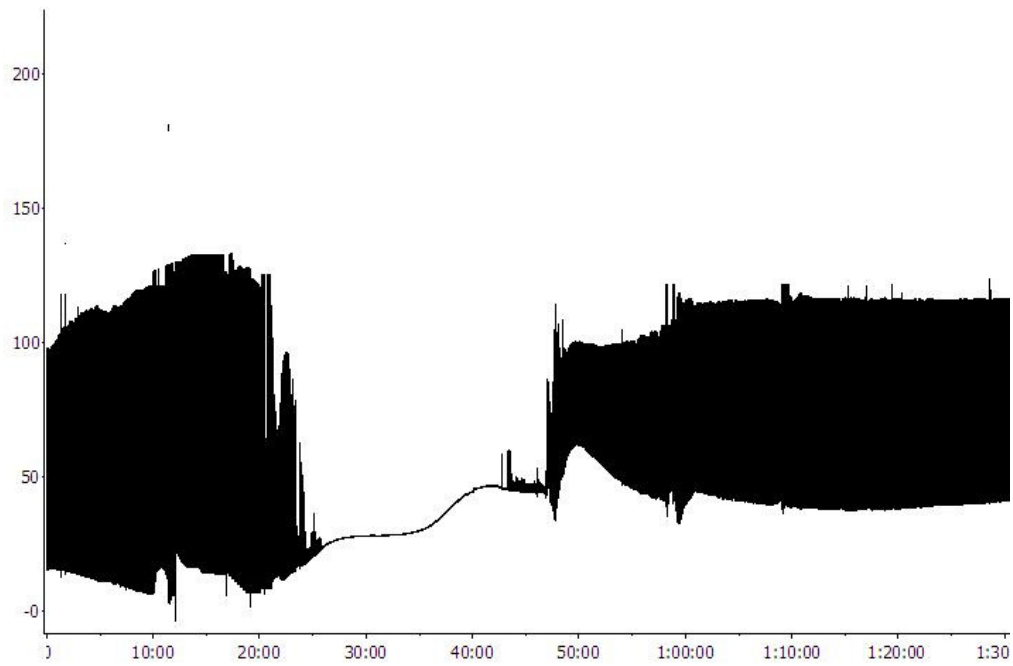
Μηριαία Ισχαιμία 3



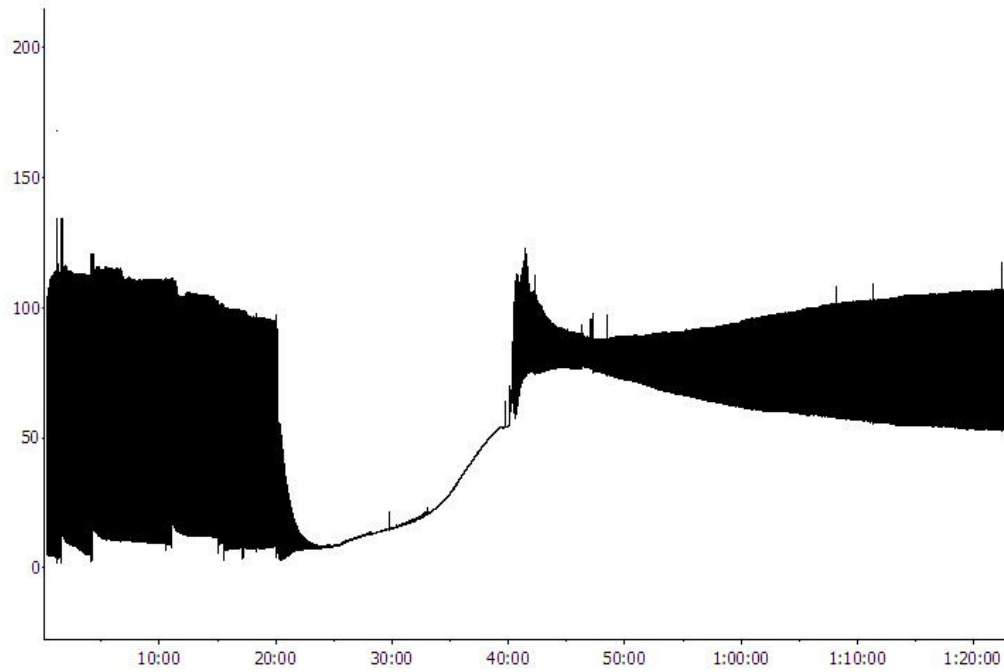
Μηριαία Ισχαιμία 4



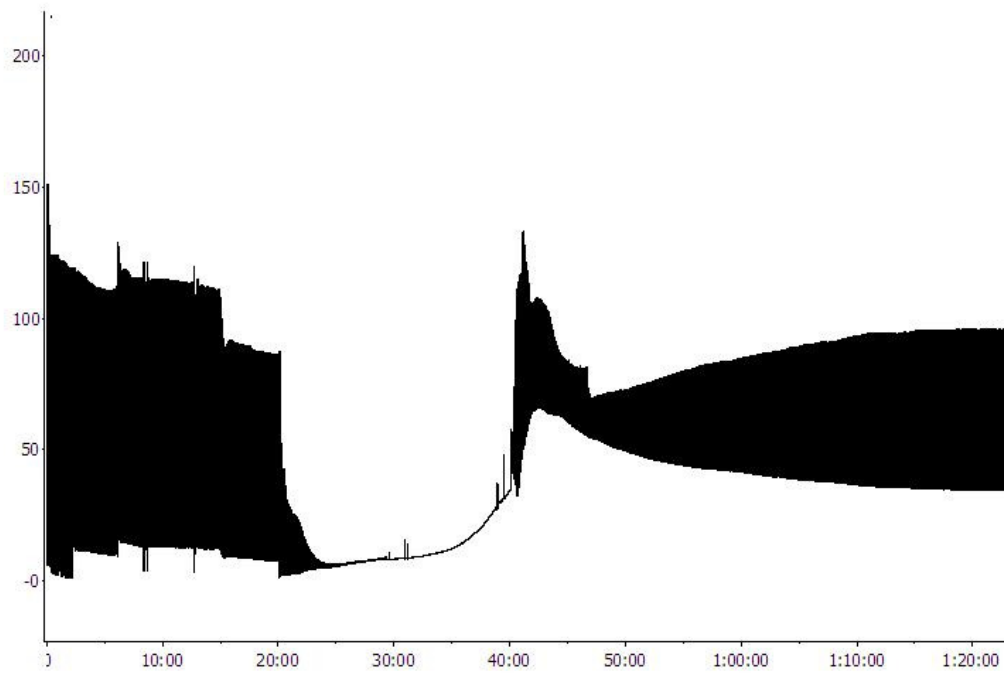
Μηριαία Ισχαμία 5



Μηριαία Ισχαμία 6



Μηριαία Ισχαιμία 7



Μηριαία Ισχαιμία 8

*Ισχαιμική τετανία/Υπερτετανία*

Η ισχαιμική σύσπαση εμφανίστηκε στα  $11.92 \pm 3.85$  min μετά από την έναρξη της ολικής ισχαιμίας στις καρδιές επίμυων με εικονική επέμβαση, ενώ οι καρδιές επίμυων με μηριαία αρτηριακή ανεπάρκεια στα  $15.18 \pm 1.66$  min, χρονικό σημείο το οποίο διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την υποομάδα ελέγχου ( $p=0.045$ ).

Αντίθετα, η μέγιστη τιμή της διαστολικής πίεσης (υπερτετανία) κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης δεν διέφερε ( $p=0.61$ ) μεταξύ των δύο υποομάδων όπου η υποομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου παρουσίασε μέγιστη διαστολική πίεση  $66.5 \pm 13.5$  mmHg και η ομάδα ελέγχου  $69.8 \pm 11.8$  mmHg.

*Αποκατάσταση αιμοδυναμικών παραμέτρων (SP, EDP, LVDP,  $+dp/dt_{max}$ ,  $-dp/dt_{max}$ )*

Σημαντικές στατιστικές διαφορές επισημάνθηκαν στην αιμοδυναμική συμπεριφορά της αριστερής κοιλίας στα ζώα με χρόνια ισχαιμία άκρου σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Οι διαφορές αυτές επικεντρώνονται στο λόγο αποκατάστασης της εκάστοτε παραμέτρου στο τέλος της επαναιμάτωσης σε σχέση με τη σταθεροποίηση. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά κυρίως στη συστολική λειτουργία των καρδιών των πειραματόζωνων, αλλά και η διαστολική λειτουργία διαφοροποιείται εν μέρει ανάμεσα στις δύο υποομάδες.

Η μέγιστη συστολική πίεση της αριστερής κοιλίας στο τέλος της επαναιμάτωσης στα ζώα με χρόνια ισχαιμία άκρου παρουσίασε πιο βελτιωμένη αποκατάσταση από ό, τι στους μάρτυρες με μέση τιμή  $0.96 \pm 0.11$  έναντι  $0.83 \pm 0.09$  και σημαντική στατιστική διαφορά ( $p=0.018$ ). Ομοίως, η αναλογία τιμών LVDP στο τέλος της επαναιμάτωσης προς τις τιμές της σταθεροποίησης ήταν υψηλότερη ( $p=0.0081$ ) στην υποομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου ( $0.68 \pm 0.06$ ), έναντι της υποομάδας ελέγχου ( $0.59 \pm 0.05$ ). Επιπλέον, η αποκατάσταση της  $+dp/dt_{max}$  ήταν ανώτερη

( $p=0.0044$ ) στα ζώα με χρόνια ισχαιμία άκρου ( $0.70\pm 0.08$ ) από ό, τι στους μάρτυρες ( $0.59\pm 0.04$ ).

Σε αντίθεση με τη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας, οι διαφορές στη διαστολική ήταν λιγότερο έντονες. Η αποκατάσταση της  $-dp/dt_{max}$  ανήλθε στο  $0.86\pm 0.14$  στην υποομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου έναντι  $0.72\pm 0.10$  της τιμής σταθεροποίησης, με μόλις μικρή σημαντική στατιστική διαφορά ( $p=0.041$ ). Αντίθετα, η τελοδιαστολική πίεση στο τέλος της επαναιμάτωσης αυξήθηκε και στις δύο υποομάδες, επιδεικνύοντας η υποομάδα της εικονικής επέμβασης αύξηση κατά  $5.5\pm 2.59$  και η υποομάδα της χρόνιας ισχαιμίας άκρου κατά  $4.62\pm 1.11$  των τιμών σε σχέση με αυτές στη σταθεροποίηση αντίστοιχα με αποτέλεσμα την μη ύπαρξη στατιστικής διαφοράς ανάμεσα τους ( $p=0.39$ ).

Η συστολική λειτουργία, η αποκατάσταση της στο τέλος της επαναιμάτωσης και η σύγκριση μεταξύ των δύο υποομάδων συνοψίζονται στον πίνακα 2 και το διάγραμμα 7

Η διαστολική λειτουργία καθώς και οι χρόνοι εισόδου της ισχαιμικής σύσπασης και οι τιμές της υπερτετανίας παρουσιάζονται στον πίνακα 3 και η στατιστική σύγκριση στο διάγραμμα 8.

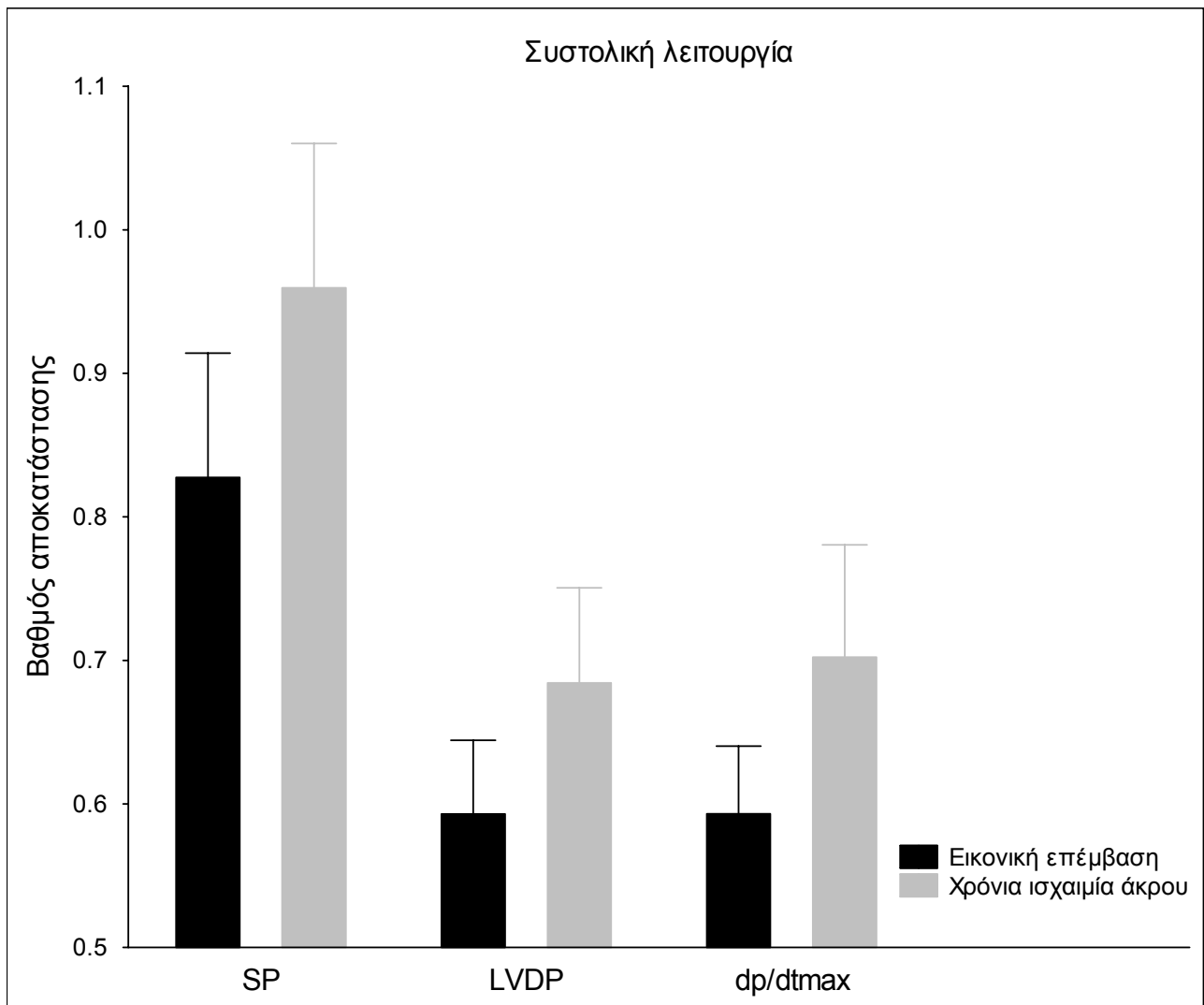
Πίνακας 2: Η αποκατάσταση της συστολικής λειτουργίας της ομάδας της εικονικής επέμβασης (SHO) και της μηριαίας ισχαιμίας (LI).

Συστολική λειτουργία						
Επίμυς	<i>SP</i>		<i>LVDP</i>		$+dp/dt_{max}$	
	SHO	LI	SHO	LI	SHO	LI
1	0.71	0.89	0.58	0.71	0.56	0.74
2	0.99	0.87	0.61	0.64	0.61	0.66
3	0.90	0.87	0.53	0.61	0.62	0.58
4	0.87	0.95	0.53	0.79	0.49	0.79
5	0.83	0.89	0.67	0.64	0.63	0.68
6	0.83	0.96	0.60	0.67	0.64	0.74
7	0.75	1.13	0.66	0.63	0.61	0.62
8	0.74	1.11	0.56	0.78	0.58	0.81
Μέση τιμή						
±	0.83±0.09	0.96±0.11	0.59±0.05	0.68±0.06	0.59±0.04	0.70±0.08
τυπική απόκλιση						
<i>p</i>	0.018		0.0081		0.0044	

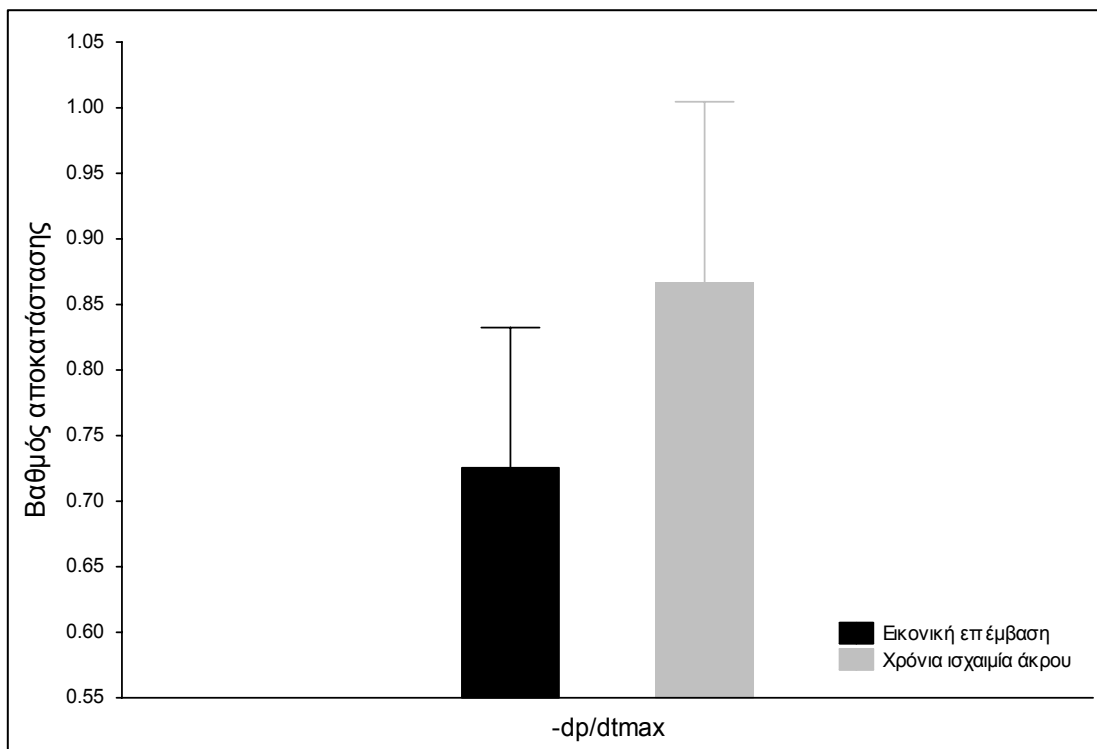
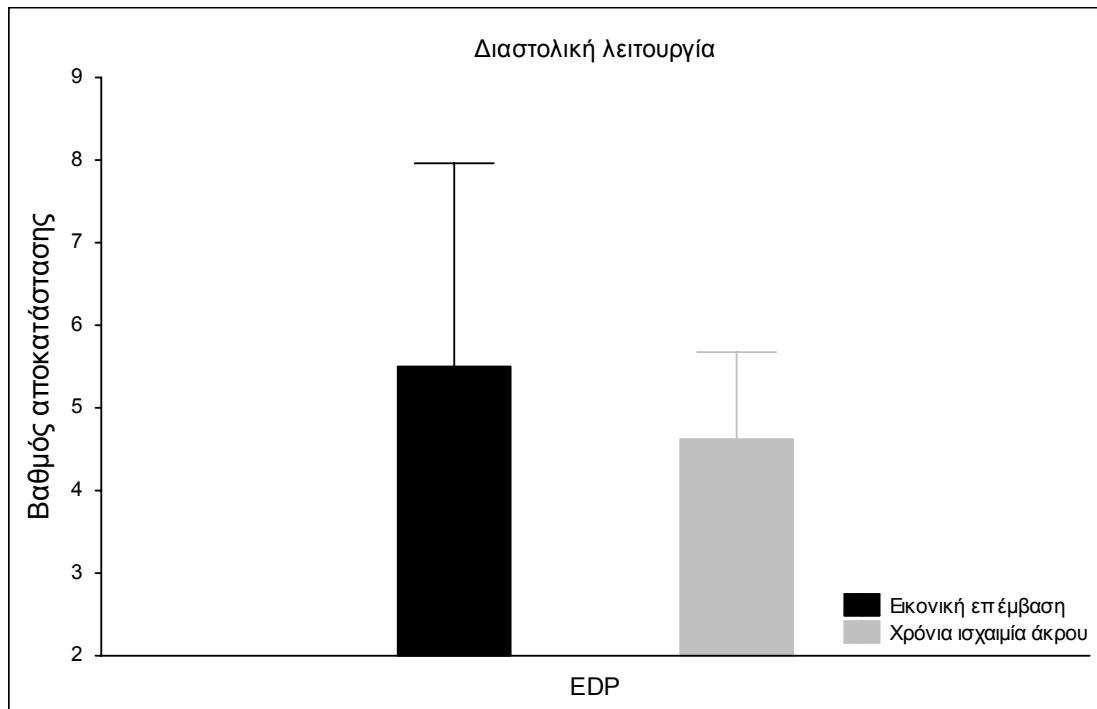
Πίνακας 3: Η αποκατάσταση της διαστολικής λειτουργίας της ομάδας της εικονικής επέμβασης (SHO) και της μηριαίας ισχαιμίας (LI).

Επίμυς	Διαστολική λειτουργία							
	EDP		$-dp/dt_{max}$		Onset Contracture (sec)		Hypercontracture (mmHg)	
	SHO	LI	SHO	LI	SHO	LI	SHO	LI
1	3.50	3.64	0.71	0.81	760	770	59.7	58.8
2	10.21	4.51	0.83	0.93	955	904	62.7	70.9
3	5.35	5.81	0.56	0.78	700	935	77	88.6
4	8.25	2.94	0.60	1.20	584	1099	89.6	53
5	5.06	4.02	0.88	0.86	653	820	60.9	71.4
6	4.97	5.36	0.70	0.76	752	945	79.1	46.5
7	2.06	6.20	0.82	0.77	281	860	74.2	77.4
8	4.61	4.48	0.71	0.83	1036	955	55.8	66
Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση	5.5±2.59	4.62±1.11	0.72±0.10	0.86±0.14	715.2±231	910.8±99.6	69.8±11.8	66.5±13.5
<i>p</i>	0.39		0.041		0.045		0.61	





Διάγραμμα 7: Στατιστική επεξεργασία της συστολικής λειτουργίας.



Διάγραμμα 8: Στατιστική επεξεργασία της διαστολικής λειτουργίας.

**Γ Ομάδα: Μέτρηση παράπλευρης στεφανιαίας ροής**

Κατά τη μέτρηση της παράπλευρης στεφανιαίας ροής αποκλείστηκαν 2 ζώα από κάθε υποομάδα, καθότι δεν ανταποκρίθηκαν στα παραπάνω αναφερόμενα κριτήρια στη φάση της σταθεροποίησης, οπότε συνολικά 16 πειραματόζωα ολοκλήρωσαν τη μελέτη της στεφανιαίας ροής (8 από κάθε υποομάδα).

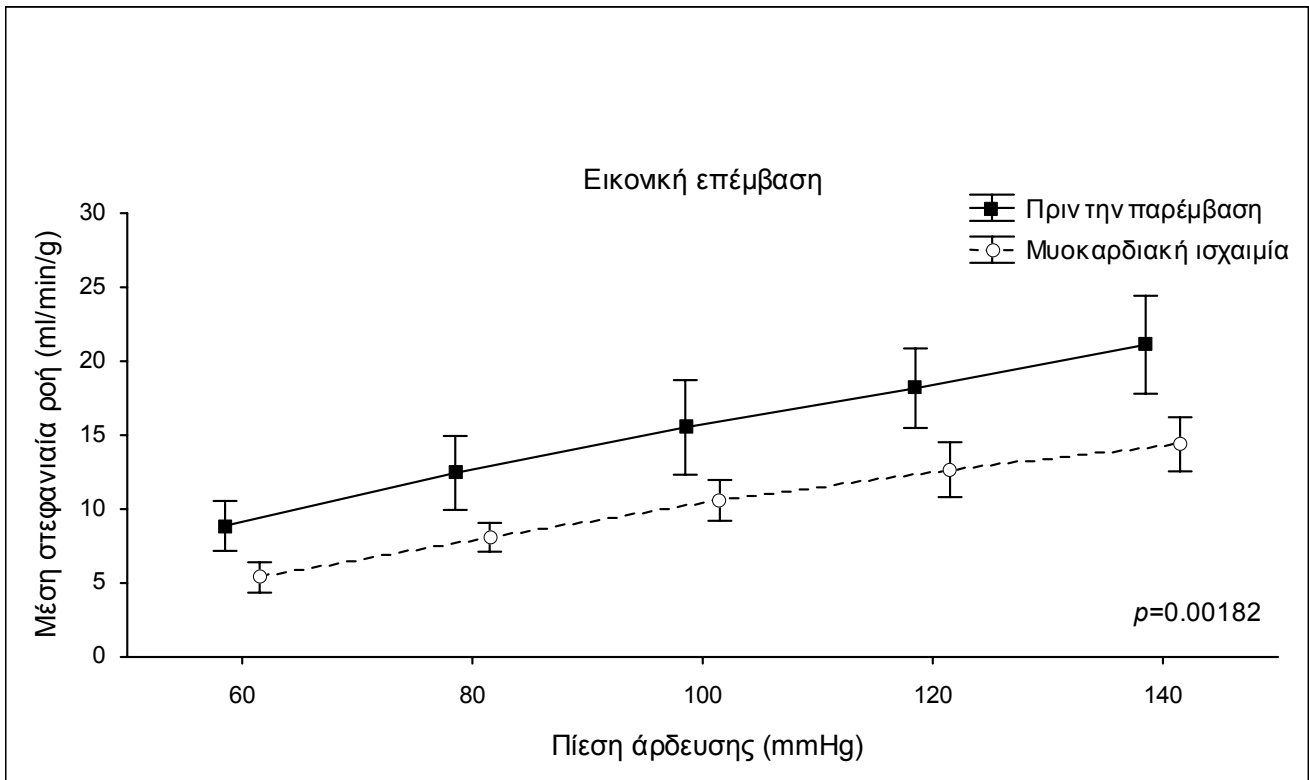
Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά ανάμεσα στις τιμές της στεφανιαίας ροής κάθε υποομάδας στις πιέσεις της βασικής γραμμής ( $p > 0.05$ ). Σε συνθήκες τμηματικής ισχαιμίας η στεφανιαία ροή στα ζώα με χρόνια ισχαιμία άκρου ήταν αυξημένη σε κάθε επιμέρους πίεση άρδευσης σε σύγκριση με τη στεφανιαία ροή των μαρτύρων ( $p < 0.05$ ), (πίνακας 4).

Επιπρόσθετα, τα πειραματόζωα με εικονική επέμβαση παρουσίασαν κατά τη διάρκεια της τμηματικής ισχαιμίας συνολικά στατιστικά σημαντική μείωση της στεφανιαίας ροής σε κάθε μία από τις πέντε διαφορετικές διαδοχικές πιέσεις άρδευσης των στεφανιαίων ( $p = 0.00182$ ) σε σύγκριση με την αντίστοιχη στεφανιαία ροή σε κάθε πίεση πριν την παρέμβαση. Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε πιο έντονα στις πιέσεις των 120 και 140mmHg (διάγραμμα 9).

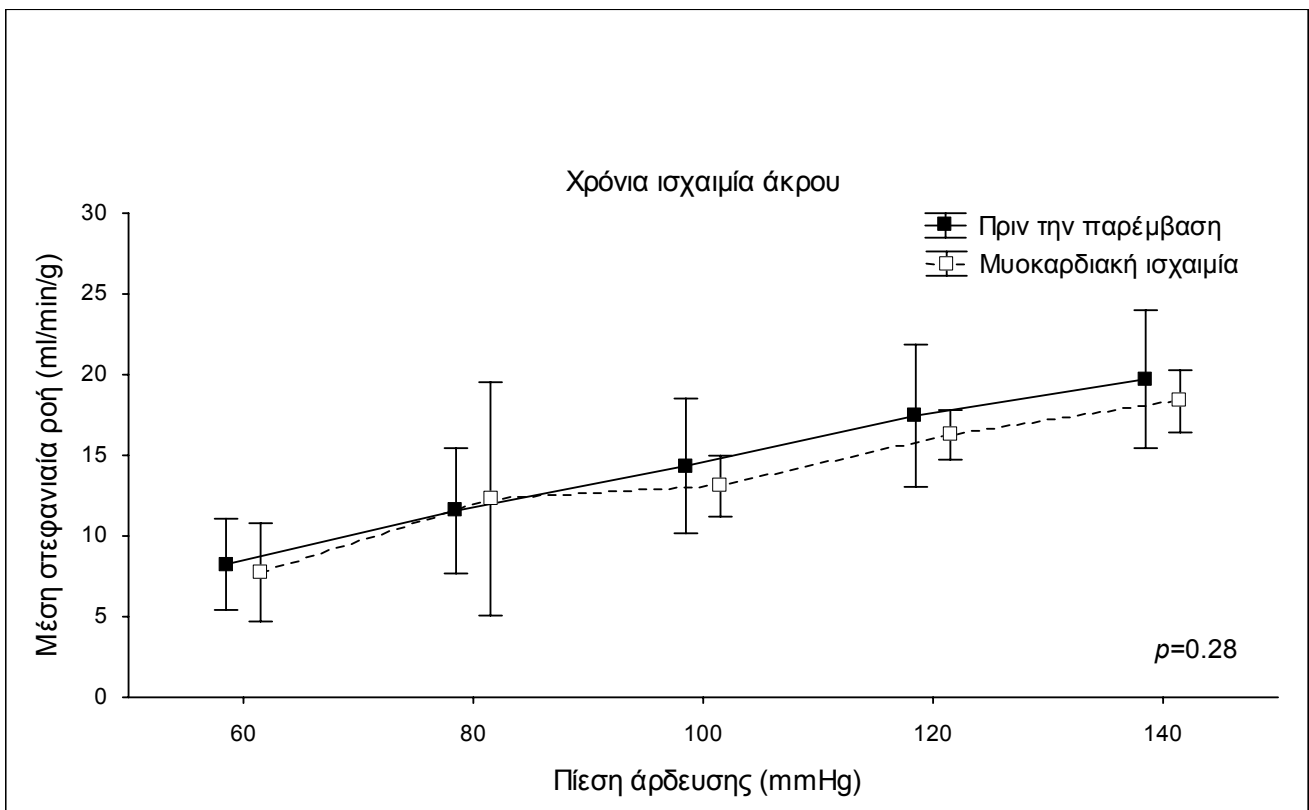
Αντίθετα στις καρδιές των επίμυων με χρόνια ισχαιμία άκρου δε σημειώθηκε σημαντική στατιστικά μείωση στη στεφανιαία ροή σε κάθε πίεση άρδευσης προ και μετά την εγκατάσταση της τμηματικής ισχαιμίας ( $p = 0.28$ ), (διάγραμμα 10).

Πίνακας 4: Στεφανιαία ροή προ και κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας.

Πίεση άρδευσης (mmHg)	Μέση στεφανιαία ροή ± τυπική απόκλιση (ml/min/g)		<i>p</i>
	Εικονική επέμβαση	Χρόνια ισχαιμία άκρου	
<i>Πριν την παρέμβαση</i>			
60	8.87±2.02	8.83±1.00	0.96
80	12.45±2.99	11.53±1.73	0.51
100	15.53±3.83	15.03±2.41	0.78
120	18.18±3.22	18.36±3.29	0.92
140	21.11±3.96	21.02±3.76	0.96
<i>Μυοκαρδιακή ισχαιμία</i>			
60	5.38±1.23	7.09±1.24	0.025
80	8.09±1.17	10.16±1.56	0.015
100	10.59±1.65	13.70±1.82	0.006
120	12.67±2.22	15.91±1.75	0.012
140	14.38±2.19	17.84±2.30	0.014



A



B

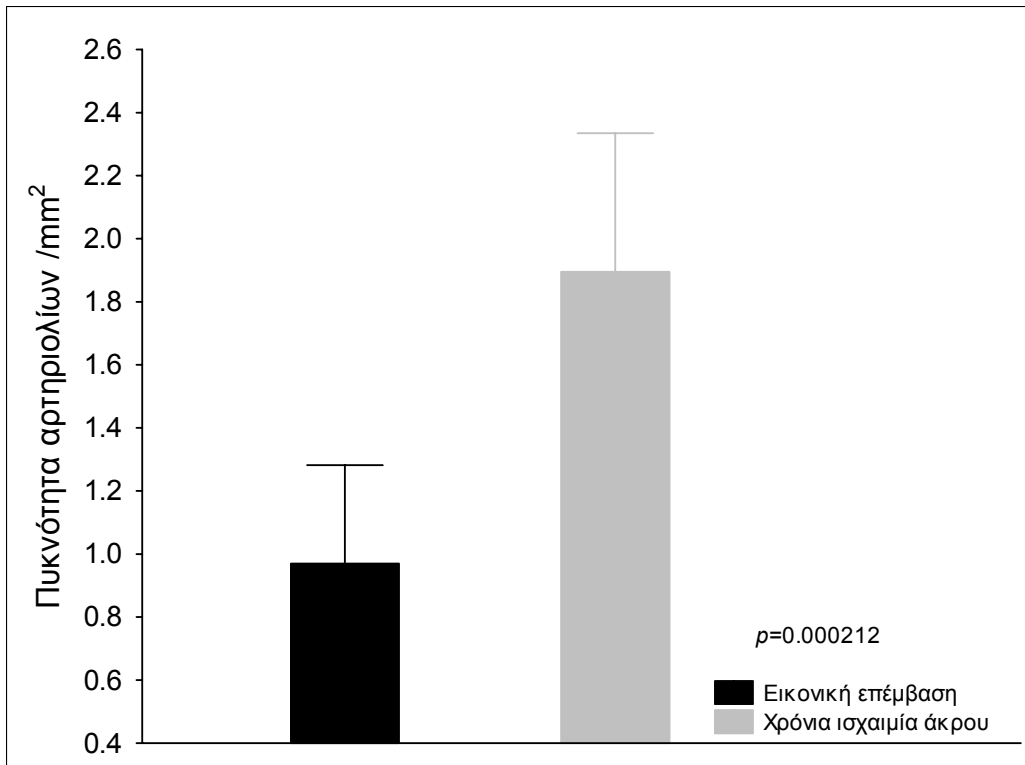
Διάγραμμα 9: Μέση στεφανιαία ροή της ομάδας εικονικής επέμβασης (A) και χρόνιας ισχαιμίας άκρου (B) σε συνάρτηση με τις διαδοχικές πιέσεις άρδευσης των στεφανιαίων.

**Δ Ομάδα: Μέτρηση νεοαγγείων – Παθολογοανατομική μελέτη**

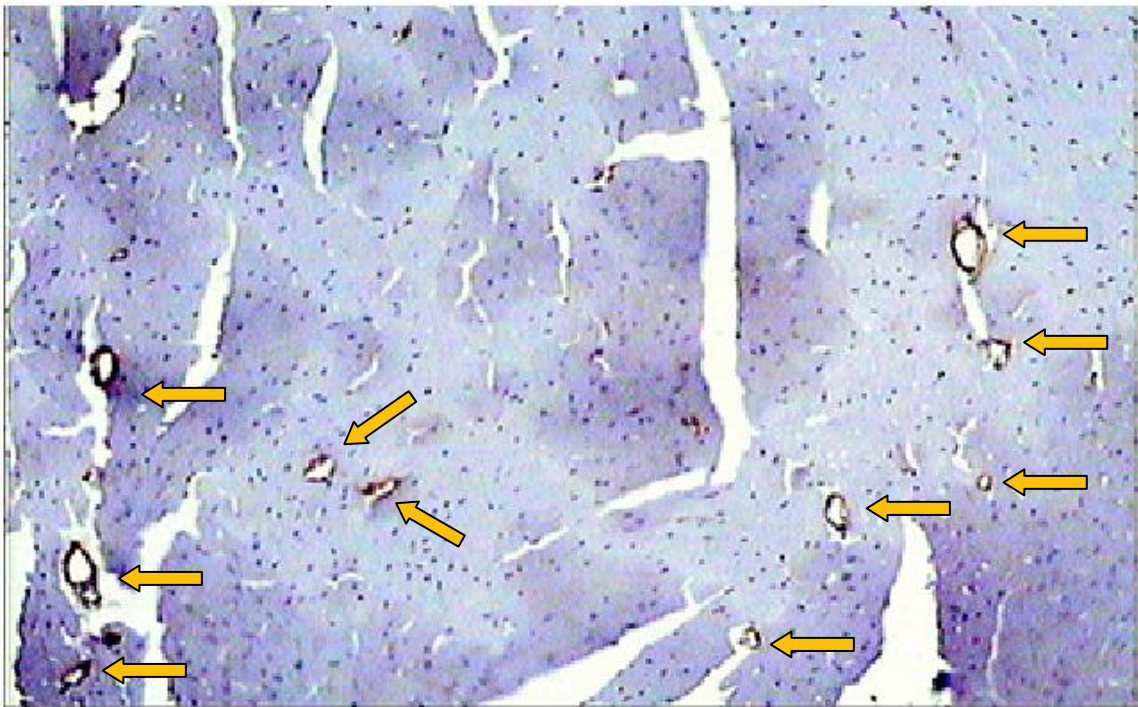
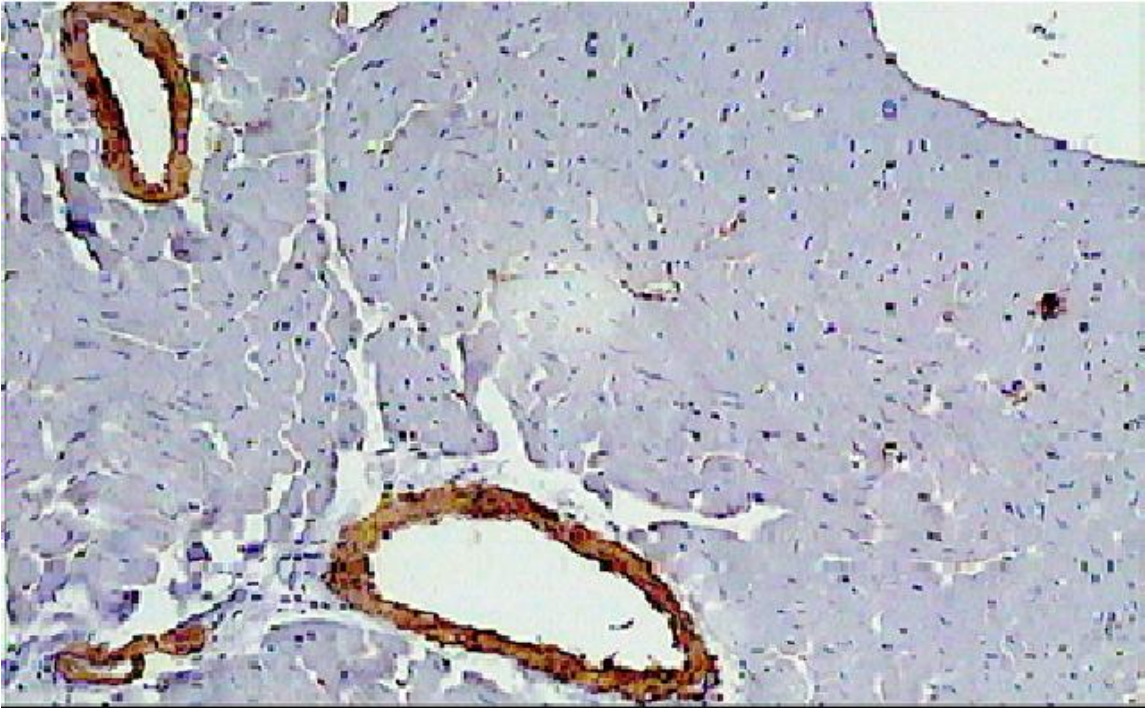
Στην ιστολογική μελέτη συμπεριλήφθηκαν 18 ζώα με απώλεια δύο μαρτύρων κατά τη διάρκεια της διασωλήνωσης και αναισθησίας. Μετά από τέσσερις εβδομάδες η πυκνότητα αγγείων ήταν υψηλότερη ( $p=0.000212$ ) στους επίμυες με περιφερική ισχαιμία ( $1.9\pm 0.463$ ) από ό,τι σε αυτούς με εικονική επέμβαση ( $0.97\pm 0.328$ ), (πίνακας 5, εικόνα 25). Οι περιοχές του ιστού που εξετάστηκαν ήταν συγκρίσιμες ( $p=0.24$ ) τόσο στην υποομάδα της εικονικής επέμβασης όσο και σε αυτήν της χρόνιας ισχαιμίας ( $37.5\pm 12.5\text{mm}^2$  εναντίον  $45.3\pm 14.8\text{mm}^2$ , αντίστοιχα).

Πίνακας 5: Η πυκνότητα των αρτηριολίων στις δύο ομάδες.

Πυκνότητα αρτηριολίων /mm <sup>2</sup>		
Επίμυς	Εικονική επέμβαση	Χρόνια ισχαιμία άκρου
1	1.24	1.8
2	0.84	2.2
3	0.75	2.43
4	1.36	1.65
5	0.425	1.2
6	0.76	2.38
7	1.3	1.96
8	1.06	1.22
9		2.41
10		1.7
Μέση τιμή±τυπική απόκλιση	0.97±0.328	1.9±0.463
<i>p</i>	0.000212	



Διάγραμμα 10: Στατιστική ανάλυση της πυκνότητας των νεοαγγείων στο μυοκάρδιο.



Εικόνα 25: Ιστολογικές τομές από μυοκάρδιο επίμυων εικονικής επέμβασης (άνω) και επίμυων με μηριαία ισχαιμία (κάτω). Με βέλη σημειώνονται τα αρτηρίδια με θετική αντίδραση στο αντίσωμα ακτίνης.



## **2. Δεύτερο μέρος της μελέτης (Πρωτόκολλο σε κόνικλους)**

Ο συνολικός αριθμός των κόνικλων, μέσου βάρους  $2.8 \pm 0.6 \text{ kg}$ , που συμμετείχαν στο δεύτερο μέρος της μελέτης μας ανήλθε σε 120. Μετά την πρόκληση της μηριαίας ισχαιμίας, με τυχαιοποίηση σε τέσσερις ομάδες προέκυψαν 30 στην Α, 20 στη Β, 20 στη Γ και 50 στη Δ ομάδα κόνικλοι αντίστοιχα. Η θνητότητα, που παρατηρήθηκε οφειλόταν σε αιμορραγικά συμβάματα, που προέρχονταν είτε από την πρόκληση της αρτηριακής ισχαιμίας, κατά την εκτέλεση ή μετά το πέρας αυτής, είτε σε χειρουργικούς χειρισμούς κατά την διαδικασία αποκάλυψης της καρδιάς με θωρακοτομή ή σε αιμοδυναμική αστάθεια κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

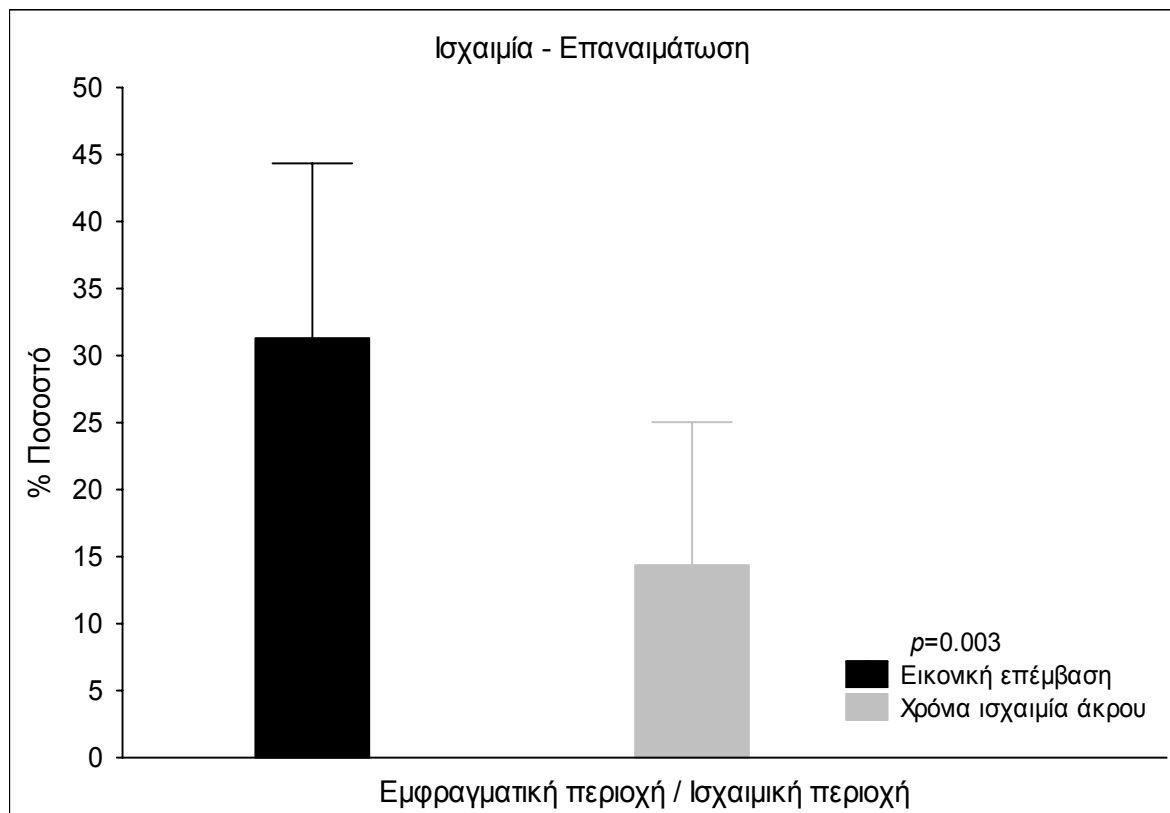
### ***Α Ομάδα: Ισχαιμία – επαναιμάτωση***

5 κόνικλοι από τους μάρτυρες αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω κατάληξης αυτών κατά την ισχαιμία – επαναιμάτωση. Από την υποομάδα της χρόνιας αρτηριακής ισχαιμίας υπήρξε μία απώλεια μετά την πρόκληση της περιφερικής ισχαιμίας.

Τέσσερις εβδομάδες αργότερα καθορίστηκε η επί τοις εκατό αναλογία της εμφραγματικής προς την ισχαιμική περιοχή (%I/R: infarcted area/area at risk) με τις καρδιές των πειραματόζων, που είχαν υποστεί μηριαία ισχαιμία να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικό μικρότερο ποσοστό ( $p=0.003$ ) από αυτών των μαρτύρων, με μέσο ποσοστό  $14.37 \pm 11.22\%$  έναντι  $31.31 \pm 13.73\%$  για τα ζώα με μηριαία ισχαιμία και εικονική επέμβαση αντίστοιχα (πίνακας 6).

Πίνακας 6: Αναλογία % εμφραγματικής προς ισχαιμική περιοχή στην ομάδα Α μυοκαρδιακής ισχαιμίας επαναιμάτωσης.

% Μέγεθος εμφραγματικής περιοχής / Μέγεθος ισχαιμικής περιοχής		
Κόνικλος	Ομάδα εικονικής επέμβασης	Ομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου
1	34.80	19.68
2	22.49	27.69
3	19.05	13.64
4	17.80	38.32
5	19.51	5.59
6	53.49	8.38
7	51.88	5.43
8	27.47	4.34
9	23.38	2.24
10	43.19	8.16
11		10.21
12		28.26
13		5.41
14		23.82
Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση	31.31±13.73	14.37±11.22
<i>p</i>		0.003



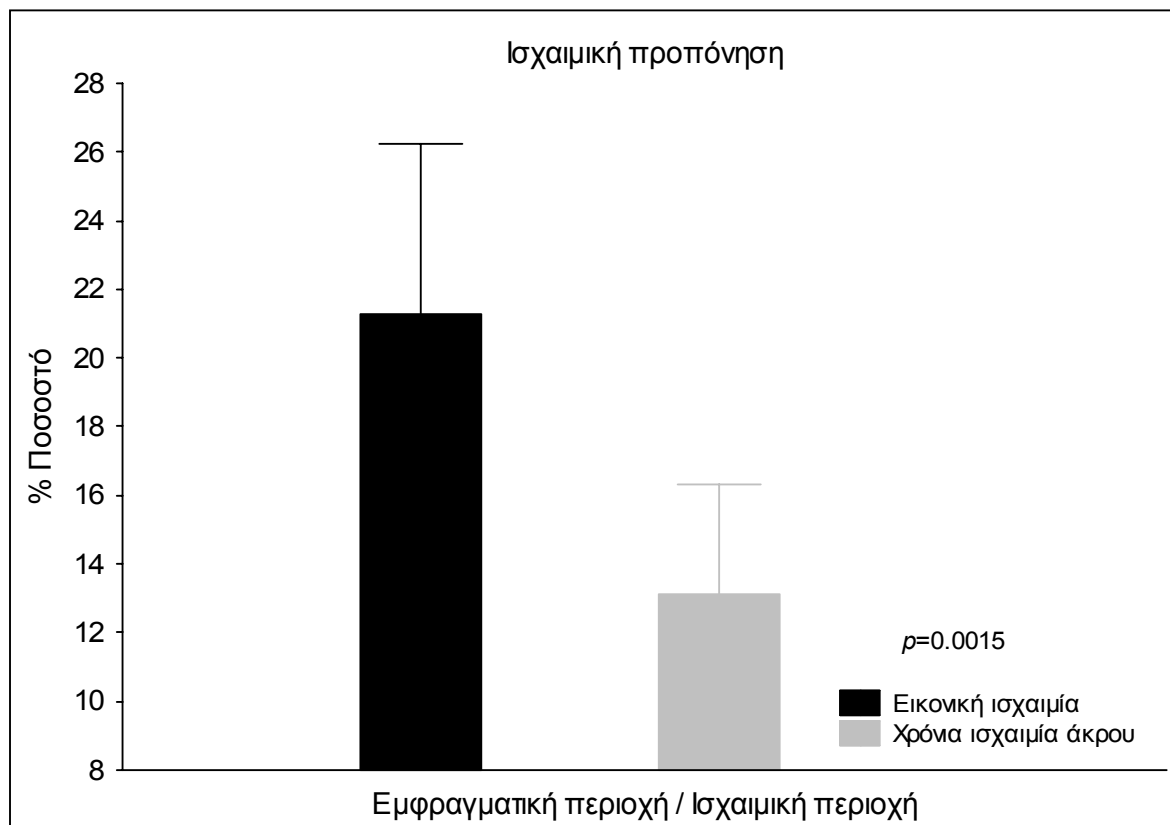
Διάγραμμα 11: Η αναλογία I/R μετά από ισχαιμία επαναιμάτωση.

### ***B Ομάδα: Ισχαιμική προετοιμασία–Ισχαιμία–Επαναιμάτωση***

Στους μάρτυρες αυτής της ομάδας εμφανίστηκαν δύο θάνατοι κατά τη μυοκαρδιακή ισχαιμία, ενώ στα ζώα με μηριαία ισχαιμία ένας θάνατος κατά το διάστημα της παρακολούθησης των τεσσάρων εβδομάδων. Ο συνδυασμός χρόνιας περιφερικής αρτηριακής ανεπάρκειας και ισχαιμικής προετοιμασίας είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστική σημαντική μείωση ( $p=0.0015$ ) της αναλογίας I/R στα ζώα που εφαρμόστηκε στα  $13.13\pm 3.34\%$  σε σύγκριση με τους μάρτυρες, οι οποίοι υποβλήθηκαν μόνο σε ισχαιμική προετοιμασία και εμφάνισαν εμφραγματική περιοχή στα  $21.26\pm 5.21\%$ .

**Πίνακας 7:** Αναλογία % εμφραγματικής προς ισχαιμική περιοχή στην ομάδα Β ισχαιμικής προετοιμασίας-μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

% Μέγεθος εμφραγματικής περιοχής / Μέγεθος ισχαιμικής περιοχής		
Ισχαιμική προετοιμασία		
Κόνικλος	Ομάδα εικονικής επέμβασης	Ομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου
1	22.82	9.15
2	15.76	15.55
3	18.52	13.27
4	27.22	12.26
5	27.73	14.12
6	14.30	16.28
7	25.31	13.17
8	18.44	6.98
9		17.40
Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση	21.26±5.21	13.13±3.34
<i>p</i>	0.0015	



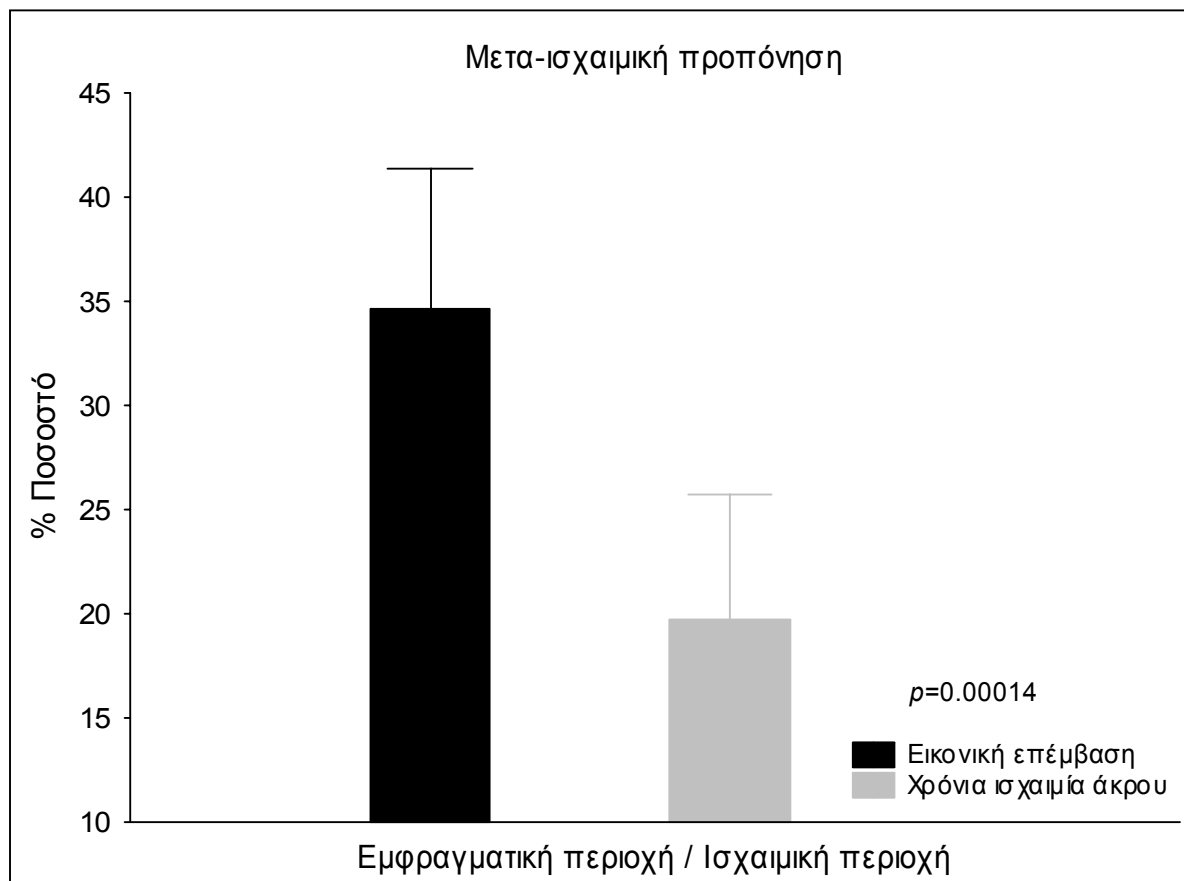
Διάγραμμα 12: Η αναλογία I/R στο συνδυασμό χρόνιας ισχαιμίας άκρου και ισχαιμικής προετοιμασίας.

### **Γ Ομάδα: Ισχαιμία–Μετα-ισχαιμική προετοιμασία-Επαναιμάτωση**

Το τρίτο τμήμα της μελέτης ολοκλήρωσαν 19 ζώα με μία απώλεια από τους μάρτυρες, λόγω αιμοδυναμικής αστάθειας κατά την μυοκαρδιακή ισχαιμία. Η εφαρμογή χρόνιας ισχαιμίας άκρου με μετα-ισχαιμική προετοιμασία συνετέλεσε σε μικρότερο ποσοστό εμφραγματικής περιοχής  $19.75 \pm 6.27\%$  έναντι  $34.65 \pm 7.03\%$  της εικονικής επέμβασης με την μετα-ισχαιμική προετοιμασία, διαφορά η οποία βρίσκεται μέσα σε στατιστικά σημαντικά πλαίσια ( $p=0.00014$ ).

**Πίνακας 8:** Αναλογία % εμφραγματικής προς ισχαιμική περιοχή στην ομάδα Γ μυοκαρδιακής ισχαιμίας-μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας-επαναιμάτωσης.

% Μέγεθος εμφραγματικής περιοχής / Μέγεθος ισχαιμικής περιοχής		
Μετα-ισχαιμική προετοιμασία		
Κόνικλος	Ομάδα εικονικής επέμβασης	Ομάδα χρόνιας ισχαιμίας άκρου
1	37.84	16.63
2	41.39	13.16
3	39.53	16.91
4	31.99	21.78
5	33.34	15.02
6	45.49	17.04
7	22.90	18.37
8	30.79	24.04
9	28.56	35.17
10		19.38
Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση	34.65±7.03	19.75±6.27
<i>p</i>		0.00014

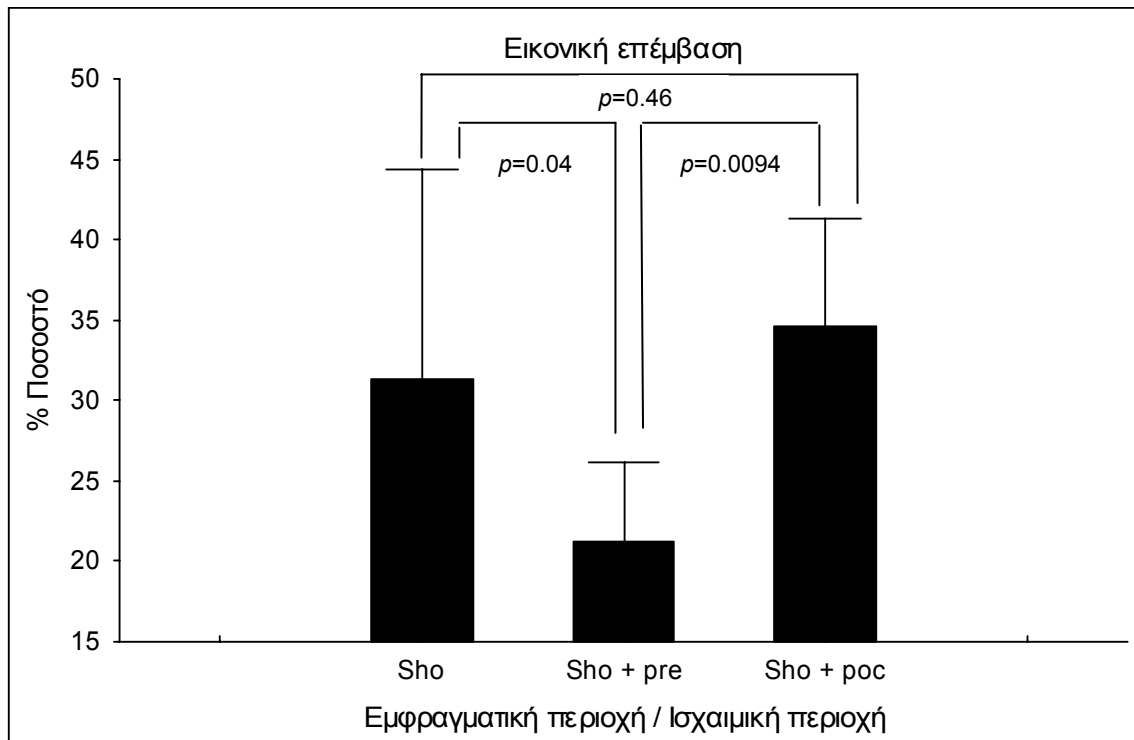


Διάγραμμα 13: Η αναλογία I/R στο συνδυασμό χρόνιας ισχαιμίας άκρου και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.

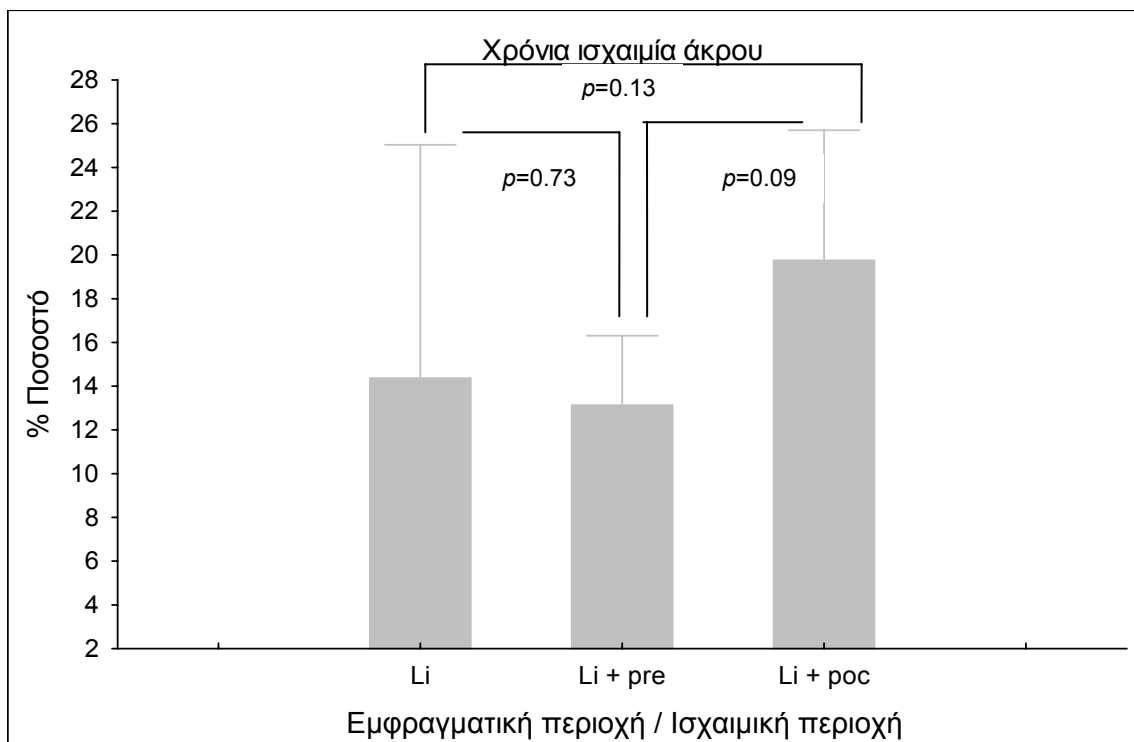
### **Σύγκριση κόνικλων ανά υποομάδα**

Διαφορές παρατηρήθηκαν στην % αναλογία I/R μεταξύ των μαρτύρων των τριών ομάδων. Η ομάδα μαρτύρων με ισχαιμική προετοιμασία εμφάνισε στατιστικά μικρότερο μέγεθος εμφράγματος από την ομάδα μαρτύρων Α (μόνο μυοκαρδιακή ισχαιμία) ( $p=0.04$ ) και τη Γ ομάδα μαρτύρων (μετα-ισχαιμική προετοιμασία) ( $p=0.0094$ ). Αντίθετα δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά μεταξύ των μαρτύρων της Α και Γ ομάδας ( $p=0.46$ ), (διάγραμμα 13Α).

Οι κόνικλοι με χρόνια ισχαιμία άκρου από κάθε ομάδα δε διέφεραν μεταξύ τους στο ποσοστό εμφραγματικής περιοχής. Συγκεκριμένα η ομάδα Α έναντι της Β και Γ δεν παρουσιάζει καμία στατιστική διαφορά ( $p=0.73$  και  $p=0.13$  αντίστοιχα) και όμοια η Β έναντι της Γ ( $p=0.09$ ), (διάγραμμα 14).



A



B

Διάγραμμα 14: Σύγκριση των κόνικλων εικονικής επέμβασης (Sho) (A) και μηριαίας ισχαιμίας (Li) (B). Ως Pre και Poc η ισχαιμική και μετα-ισχαιμική προετοιμασία αντίστοιχα.

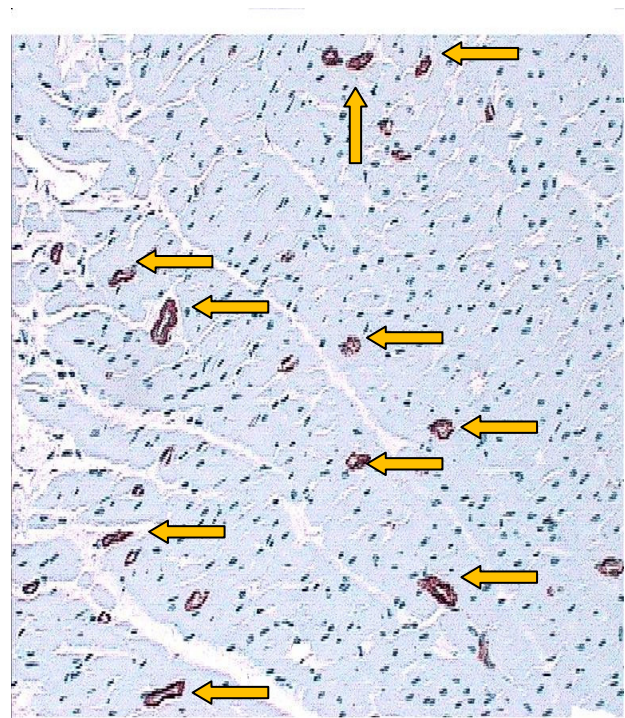
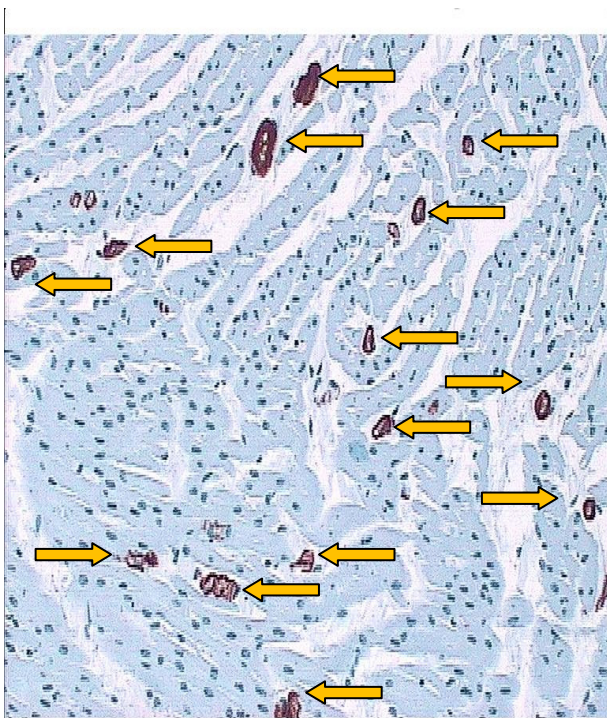
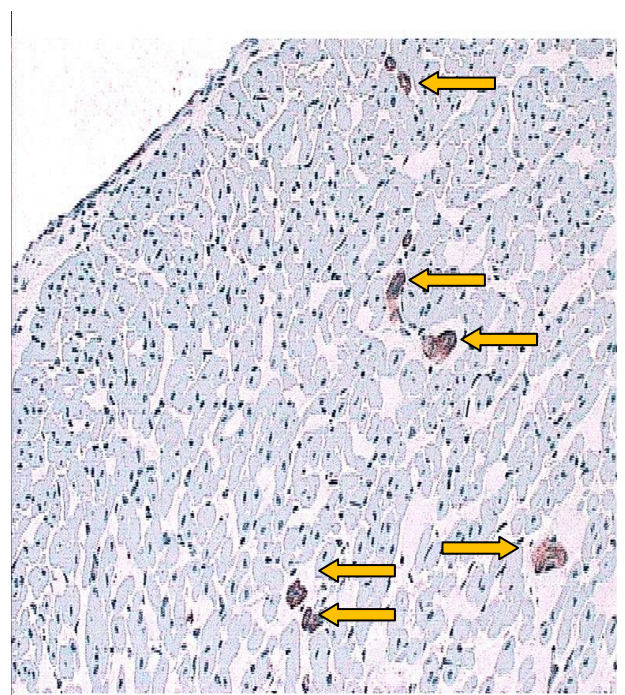
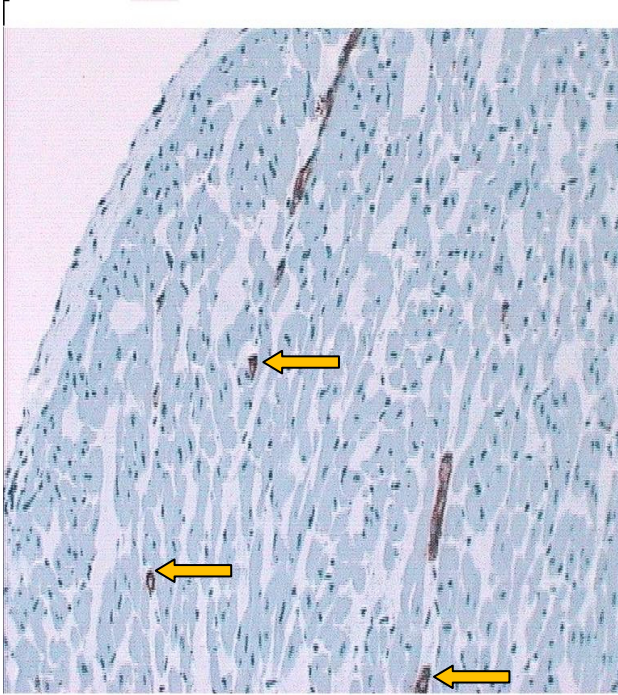


**Δ Ομάδα: Μέτρηση νεοαγγείων/Παθολογοανατομική μελέτη**

Κατά την πρόκληση της μηριαίας ισχαιμίας και στο επόμενο διάστημα παρακολούθησης των πειραματόζων προέκυψαν 6 απώλειες από την υποομάδα της χρόνιας ισχαιμίας άκρου. Κατά την ιστολογική μελέτη μετρήθηκαν αρτηριόλια σε 10 διαφορετικά οπτικά πεδία από το υπενδοκάρδιο και μυοκάρδιο αντίστοιχα και υπολογίστηκε η πυκνότητα ανά τετραγωνικό χιλιοστό αυτών στις δύο παραπάνω περιοχές. Οι καρδιές κόνικλων με χρόνια μηριαία ισχαιμία υπερτερούσαν στατιστικά στην πυκνότητα αρτηριολίων έναντι των μαρτύρων, τόσο στο υπενδοκάρδιο ( $p=0.01$ ) και στο μυοκάρδιο ( $p=0.009$ ), όσο και στο σύνολο των αγγείων ( $p=0.008$ ), (πίνακας 9, εικόνα 26).

**Πίνακας 9:** Ο αριθμός των αρτηριολίων /mm<sup>2</sup> σε υπενδοκάρδιο και μυοκάρδιο στις δύο ομάδες.

	Εικονική επέμβαση	Χρόνια ισχαιμία άκρου	<i>p</i>
Υπενδοκάρδιο	113±13	103±14	0.01
Μυοκάρδιο	114±16	102±12	0.009
Συνολικός αριθμός	227±28	205±25	0.008



Εικόνα 26: Ιστολογικές τομές κόνικλων με εικονική επέμβαση (άνω σειρά) και με μηριαία ισχαιμία (κάτω). Με βέλη σημειώνονται τα αρτηριόλια.

## Γ. Συζήτηση

Η μείωση της έκτασης του εμφράγματος, η προστασία βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού και κυρίως η επιβράδυνση ή ακόμα η αντιστροφή της πορείας του προς την απόπτωση μετά από οξύ στεφανιαίο επεισόδιο αποτελούν τα τελευταία χρόνια κύριο αντικείμενο μελέτης της βασικής καρδιολογικής έρευνας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι μέθοδοι της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας, που εφαρμόζονται είτε απευθείας στον καρδιακό μυ είτε περιφερικά, σε απόσταση από το μυοκάρδιο. Βασικό χαρακτηριστικό αυτών των μεθόδων είναι το χρονικό σημείο διενέργειας τους σε σχέση με την κύρια παρατεταμένη μυοκαρδιακή ισχαιμία, το τοποθετείται εντός λεπτών προ ή μετά αυτής.

Άλλος ένας τομέας στον οποίο επικεντρώνεται η βασική καρδιολογική έρευνα για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του μυοκαρδίου, είναι αυτός της θεραπευτικής αγγειογένεσης επαγόμενη από ενδογενείς ή εξωγενείς αγγειογενετικούς παράγοντες. Προς το παρόν υπάρχουν μελέτες, που καταδεικνύουν τη δυνατότητα πρόκλησης αγγειογένεσης στο μυοκάρδιο, αλλά ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η ακολουθία και ο μηχανισμός δημιουργίας νεοαγγείων και οι άμεσα σε αυτήν εμπλεκόμενοι παράγοντες. Παρόλο αυτά, αποτελεί κοινή πεποίθηση από τους περισσότερους ερευνητές, ότι τα πειραματικά πρωτόκολλα που εμπεριέχουν τις παραπάνω προσεγγίσεις (ισχαιμική και μετα-ισχαιμική προετοιμασία, θεραπευτική αγγειογένεση) αλληλοσυμπληρώνονται μεταξύ τους και πιθανόν ο μηχανισμός και ο τρόπος με τον οποίο δρουν καρδιοπροστατευτικά να καθορίζεται και να καθοδηγείται από κάποιο κοινό βιοχημικό μονοπάτι.

Στη δική μας μελέτη ερευνήσαμε την επίδραση της χρόνιας ισχαιμίας περιφερικών σκελετικών μυών, που προκλήθηκε βάσει ενός μοντέλου χρόνιας περιφερικής αρτηριακής ανεπάρκειας, στο ισχαιμόν μυοκάρδιο και κατά επέκταση προσπαθήσαμε να ερευνήσουμε εάν ανακύπτουν καρδιοπροστατευτικές συνέπειες, που μεταφράζονται όχι μόνο με μείωση του μέγεθος του εμφράγματος, αλλά και με βελτίωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας μεταϊσχαιμικά. Η ειδοποιός διαφορά της μελέτης μας με τα μέχρι στιγμής πειραματικά δεδομένα, όπως προκύπτει από εκτενή βιβλιογραφική αναζήτηση, έγκειται στο γεγονός ότι, εξετάζονται οι επιπτώσεις της χρόνιας ισχαιμίας των σκελετικών μυών, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μελέτες, που διαπραγματεύονται τα αποτελέσματα οξείας ή παροδικής ισχαιμίας των περιφερικών σκελετικών μυών στο μυοκάρδιο. Επιπλέον, βάση παλαιότερων μελετών, που υποστηρίζουν [313, 315, 317, 318, 379-386] την ανάπτυξη τοπικής αγγειογένεσης και παράπλευρης κυκλοφορίας, στα πλαίσια χρόνιας ισχαιμίας άκρου, συμπεριλάβαμε στην αρχική υπόθεση της καρδιοπροστασίας από τη χρόνια ισχαιμία άκρου ένα δεύτερο σκέλος έρευνας. Πιο συγκεκριμένα εξετάσαμε τη δυνατότητα των αγγειογενετικών παραγόντων, που δρουν τοπικά στο σημείο της χρόνιας αρτηριακής ανεπάρκειας, να επάγουν επίσης τη δημιουργία νεοαγγείων σε όργανα με πλούσια αιμάτωση, απομακρυσμένα από το σημείο της ισχαιμίας, όπως είναι για παράδειγμα η καρδιά. Στη δε καρδιά ένα τέτοιο εύρημα σημαίνει την ανάπτυξη και επέκταση ενός παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου.

Τα αποτελέσματα του πειραματικού μας πρωτοκόλλου αποδεικνύουν, ότι η χρόνια ισχαιμία οπισθίου άκρου σε δύο διαφορετικά πειραματικά μοντέλα (επίμυς και κόνικλος) οδηγεί σε κυτταροπροστασία του ισχαιμόντος μυοκαρδίου, πιθανόν λόγω διατήρησης της αιματικής του ροής, παρά την απόφραξη και διακοπή

τμήματος της στεφανιαίας κυκλοφορίας. Πιο συγκεκριμένα η παρούσα μελέτη χρόνιας ισχαιμίας σκελετικών μυών συνοψίζεται στα εξής καταληκτικά σημεία:

α. Ελαττώνεται η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (που εκφράζεται είτε ως ποσοστό τοις εκατό της συνολικής αριστερής κοιλιακής μάζας, είτε ως ποσοστό της ισχαιμικής περιοχής) μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία με ή χωρίς επαναιμάτωση.

β. Μειώνεται η αριστερή κοιλιακή συστολική δυσλειτουργία μετά από ολική ισχαιμία μυοκαρδίου και επαναιμάτωση.

γ. Προστατεύεται το ισχαιμόν μυοκάρδιο στον ίδιο βαθμό με τις καθιερωμένες μεθόδους της ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας.

δ. Διατηρείται η στεφανιαία ροή αίματος κατά τη διάρκεια τμηματικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας, λόγω του γεγονότος ότι,

ε. Αυξάνεται η πυκνότητα των μη-τριχοειδικών στεφανιαίων αρτηριολίων.

#### *Μείωση της έκτασης του εμφράγματος μετά από ισχαιμία χωρίς επαναιμάτωση*

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας όσο αφορά την έκταση του εμφράγματος συμφωνούν με αυτά προηγούμενων ερευνών, όπου φαίνεται ότι η ισχαιμία ενός περιφερικού σκελετικού μύος έχει ως συνέπεια τη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία ακολουθούμενη από επαναιμάτωση [197, 204, 205, 225, 320, 387-392]. Η ερμηνεία για αυτά τα ευρήματα δεν έχει πλήρως διατυπωθεί και διάφορες εξηγήσεις έχουν προταθεί, όπως η καταστολή γονιδίων φλεγμονής [194], η τροποποίηση της λειτουργίας των ATP εξαρτώμενων διαύλων καλίου στα μιτοχόνδρια [392-421], ο κυτταρικός πυρηνικός παράγοντας kappa-B-p105 ή η επαγωγίμη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου [171, 389, 422-443] και η δράση ελεύθερων ριζών [71, 73, 238, 444]. Ένας κοινός

παρονομαστής της δράσης αυτών των μηχανισμών είναι η μείωση της βλάβης επαναιμάτωσης, μετά από την ισχαιμία-επαναιμάτωση. Εντούτοις, στις προηγούμενες μελέτες δεν παρέχεται μια σαφή εικόνα ως προς το εάν τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη της ισχαιμίας περιφερικών σκελετικών μυών εμφανίζονται ακόμα και για την περίπτωση της μυοκαρδιακής ισχαιμίας χωρίς συνοδή επαναιμάτωση. Όπως έχει διαπιστωθεί, η επαναιμάτωση αφενός επιδεινώνει, στην πρώιμη φάση της τη μυοκαρδιακή βλάβη, που έχει συντελεστεί κατά την ισχαιμία, αφετέρου μεταφέρει στο ισχαιμόν μυοκάρδιο, με την επαναρροή, καρδιοπροστατευτικούς παράγοντες, που έχουν δημιουργηθεί από την ισχαιμία των περιφερικών σκελετικών μυών [193, 194]. Αυτό συνεπάγεται, ότι σε μια υπαρκτή τεκμηριωμένη προστασία του μυοκαρδίου πρόσθετοι μηχανισμοί κυτταροπροστασίας ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής ισχαιμίας, ακόμα και αν δεν ακολουθεί το στάδιο της επαναιμάτωσης. Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζουμε μια χαρακτηριστική μείωση της νεκρωτικής περιοχής στους επίμυες κατά περίπου 45%, μετά από μόνιμη απόφραξη της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας στα πειραματόζωα με χρόνια ισχαιμία των σκελετικών μυών του οπίσθιου άκρου. Επομένως, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν, ότι η χρόνια ισχαιμία άκρου παρέχει σαφή και ικανοποιητικού βαθμού προστασία στα κύτταρα του μυοκαρδιακού ιστού κατά τη διάρκεια και μετά την καρδιακή ισχαιμία, χωρίς να είναι απαραίτητη ή μοναδική προϋπόθεση η επαναιμάτωση του ιστού. Το εύρημα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα και ταυτόχρονα στην αναζήτηση του επιπρόσθετου μηχανισμού, που δραστηριοποιείται κατά την ισχαιμία και ελαττώνει το μέγεθος της ιστικής βλάβης, που αφενός επιφέρει η μυοκαρδιακή ισχαιμία και αφετέρου η επαναιμάτωση. Συνυπολογίζοντας το διάστημα των τεσσάρων εβδομάδων της περιφερικής μυικής

ισχαιμίας είμαστε σε θέση να διατυπώσουμε την υπόθεση ενός ήδη πυροδοτημένου και εγκατεστημένου μηχανισμού καρδιοπροστασίας, προ του επεισοδίου της μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Έτσι, βασισμένοι στις παλαιότερες μελέτες στον τομέα της αγγειογένεσης [313, 315, 317, 318, 379-386] και θεωρώντας τη δράση των ενδογενών αγγειογενετικών παραγόντων, που εμφανίζονται σε ένα μεταϊσχαιμικό ιστό, συστηματική και όχι τοπικά εξαρτώμενη, η νεοαγγειογένεση στο μυοκάρδιο με τη μορφή λειτουργικών και ικανών να διατηρήσουν αμετάβλητη τη στεφανιαία ροή σε συνθήκες ισχαιμίας, παράπλευρων αγγείων, εμφανίζεται ως ένας πρώτος επαρκής μηχανισμός, που δύναται να περιορίσει τη μυοκαρδιακή νέκρωση.

#### *Δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση*

Ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι οι θετικές επιπτώσεις της χρόνιας αρτηριακής ισχαιμίας άκρου στην αριστερή κοιλιακή λειτουργία μετά από ολική ισχαιμία (ισχαιμία μηδενικής ροής) και επαναιμάτωση στη διάταξη Langendorff. Αναλυτικότερα οι δείκτες της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας στο τέλος της επαναιμάτωσης, δηλαδή η μέγιστη συστολική πίεση, η αναπτυσσόμενη πίεση καθώς επίσης και ο ρυθμός μεταβολής της μέγιστης πίεσης της αριστερής κοιλίας στη μονάδα του χρόνου (πρώτη παράγωγος), που αντικατοπτρίζει τη συσταλτικότητα αυτής, παρουσίασαν στην ομάδα της χρόνιας ισχαιμίας καλύτερη αποκατάσταση των τιμών που εμφάνισαν κατά τη φάση της σταθεροποίησης, έναντι της ομάδας της εικονικής επέμβασης.

Επιπλέον κατά τη διάρκεια της ολικής ισχαιμίας, η διαστολική δυσλειτουργία που προκαλείται, είναι μικρότερου βαθμού στις καρδιές από επίμυες με χρόνια ισχαιμία, όπως διαπιστώνεται από το σχεδιάγραμμα καταγραφής πιέσεων της

αριστερής κοιλίας. Αυτό στηρίζεται στην παρατήρηση, ότι οι καρδιές των επίμυων με χρόνια ισχαιμία άκρου υπεισέρχονται σε ισχαιμική τετανία πιο καθυστερημένα, σε σχέση με τους μάρτυρες, κατά την ολική ισχαιμία, οπότε και η χρονική διάρκεια της ισχαιμικής τετανίας, επομένως και η έκθεση του μυοκαρδίου σε αυτή μέχρι την έναρξη της επαναιμάτωση είναι βραχύτερη. Το όφελος για το ισχαιμόν μυοκάρδιο, που προκύπτει από την αναστολή της μετάπτωσης σε ισχαιμική τετανία ή από τον περιορισμό του χρονικού διαστήματος της σύσπασης επιβεβαιώνεται από αρκετές μελέτες [445-454]. Στις μελέτες αυτές αναφέρεται ότι η φαρμακευτική παρέμβαση στους υποδοχείς της αδενοσίνης A1 με ανάλογα, που μιμούνται τη δράση της αδενοσίνης είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του χρόνου της ισχαιμικής τετανίας. Κοινός παρονομαστής αυτής της μείωσης είναι το άνοιγμα των μιτοχονδριακών διαύλων  $K^+$ . Οι μιτοχονδριακοί δίαυλοι  $K^+$  και ειδικότερα το άνοιγμα αυτών κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στην καρδιοπροστασία. Πιο συγκεκριμένα σε φυσιολογικές συνθήκες, που το δυναμικό της μεμβράνης του μιτοχονδρίου είναι υψηλό, αυξάνεται η εισροή  $K^+$  στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την αλκαλοποίηση του μιτοχονδριακού δικτύου και την περίσσεια σε ROS [455]. Σε ισχαιμικές συνθήκες στις οποίες το δυναμικό της μεμβράνης ελαττώνεται, το άνοιγμα των καναλιών προσθέτει ένα παράλληλο μονοπάτι αγωγιμότητας  $K^+$  το οποίο εμποδίζει τη σύσπαση του δικτύου και την επέκταση των ενδομεμβρανώδων χώρων του μιτοχονδρίου [393, 456]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη περαιτέρω λειτουργία των μιτοχονδρίων και την παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο και τη διατήρηση αυτού σε συνθήκες ισχαιμίας.

Η διαστολική λειτουργία στο τέλος της επαναιμάτωσης στους επίμυες με χρόνια ισχαιμία άκρου παρουσιάζεται βελτιωμένη σε σύγκριση με τους μάρτυρες, παρόλο που καταγράφηκε αύξηση της τελοδιαστολικής πίεσης και να μην υπήρξε



στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες. Αυτή η παρατήρηση δικαιολογείται από το γεγονός ότι η αρνητική πρώτη παράγωγος της μέγιστης πίεσης της αριστερής κοιλίας, που αντανακλά τη χάλαση αυτής, εμφάνισε στατιστικά πιο βελτιωμένη αποκατάσταση. Από μια άλλη οπτική γωνία, κρίνοντας συλλογικά τα αποτελέσματα του πειράματος, φαίνεται ότι η μείωση του νεκρού μυοκαρδιακού ιστού μετά από την καρδιακή ισχαιμία μεταφράζεται περισσότερο σε διατήρηση της συστολικής και σε μιάς μικρότερης έκτασης της διαστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Το γεγονός της δυσανάλογης αποκατάστασης της διαστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας στα πειράματά μας είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αλλά μπορεί να αποδοθεί στην ελάχιστη ή και καθόλου σημαντική επίδραση της χρόνιας ισχαιμίας των σκελετικών μυών στο βιοχημικό μηχανισμό, που καθορίζει το μέγεθος της βλάβης, που προκύπτει από την επαναιμάτωση. Πιο συγκεκριμένα η βιοχημική οδός, που οδηγεί σε διαστολική δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο έχει βρεθεί να συνδέεται με αυξημένη εισροή ασβεστίου στα καρδιακά κύτταρα κατά την επαναιμάτωση [457]. Συγκρίνοντας αυτό το πειραματικό μέρος με το προηγούμενο, πρέπει να σημειώσουμε τη καθοριστική διαφορά, που υφίσταται στην απουσία προηγουμένως και την παρουσία σε αυτό το πείραμα της επαναιμάτωσης. Αυτό συνεπάγεται την ύπαρξη πέραν του ενός μηχανισμών καρδιοπροστασίας, οι οποίοι δραστηριοποιούνται σε διαφορετικά σημεία, αφενός στο πρώτο πείραμα προ και κατά της μυοκαρδιακής ισχαιμίας (νεοαγγειογένεση) και στο παρόν κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης (πιθανό άνοιγμα μιτοχονδριακών διαύλων  $K^+$ ). Το επόμενο ερώτημα το οποίο ανακύπτει, εαν αποδεχθούμε την ύπαρξη δύο μηχανισμών αφορά την αποτελεσματικότητά τους στην καρδιοπροστασία. Σε αυτό το ερώτημα, η δυσανάλογη αποκατάσταση της διαστολικής (έναντι της

συστολικής) λειτουργίας, που παρατηρείται στα πειράματά μας, ενισχύει το συμπέρασμά μας σχετικά με τους τομείς που οφελούνται της χρόνιας ισχαιμίας των σκελετικών μυών και που όπως αποδεικνύεται ο περιορισμός της βλάβης από ισχαιμία επαναιμάτωση δεν προβάλλει στις άμεσες και πρωτεύοντες θετικές συνέπειες.

#### *Διατήρηση της στεφανιαίας ροής αίματος*

Η υπόθεση που διατυπώσαμε όσο αφορά τον πιθανό μηχανισμό προστασίας που ενεργοποιείται από τη χρόνια ισχαιμία σκελετικών μυών και προωθεί μια νεοαγγειογένεση στον καρδιακό μυ, πέρα από την ιστολογική μελέτη του μυοκαρδίου για την εξακρίβωση της ύπαρξης νέων παράπλευρων στεφανιαίων αγγείων, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, απαιτεί και τη λειτουργική αξιολόγηση αυτών, αν δηλαδή είναι σε θέση υπό συνθήκες μυοκαρδιακής ισχαιμίας να διαφυλάξουν ακέραια την διαπότιση και την αιμάτωση του μυοκαρδίου, οπότε και κατά συνέπεια να περιορίσουν την μυοκαρδιακή βλάβη και απόπτωση.

Στη μελέτη μας παραθέτουμε μία σημαντική μείωση στη στεφανιαία ροή αίματος μετά από απόφραξη της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας στους επίμυες της ομάδας ελέγχου, αλλά ταυτόχρονα η ομάδα της χρόνιας αρτηριακής ανεπάρκειας επιδεικνύει μια διατήρηση της στεφανιαίας ροής, με μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέγεθος της πριν και μετά τον αποκλεισμό του αριστερού στεφανιαίου σκέλους. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ένα λειτουργικό δίκτυο παράπλευρης κυκλοφορίας μεταξύ των κλάδων της δεξιάς και της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, το οποίο αναταποκρίνεται ικανοποιητικά (κάτω από μέγιστη αγγειοδιαστολή, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη αδενοσίνης) σε συνθήκες μυοκαρδιακής ισχαιμίας, αναπληρώνοντας ως ένα βαθμό την απώλεια της

στεφανιαίας ροής αίματος από την απόφραξη ενός κεντρικού στεφανιαίου κλάδου. Δεδομένης της ανατομίας του στεφανιαίου δικτύου του επίμυος το οποίο πέραν των βασικών στεφανιαίων κλάδων, το χαρακτηρίζει η έλλειψη ενός παράπλευρου δικτύου, η ερμηνεία της συντήρησης της στεφανιαίας ροής στην ομάδα της χρόνιας ισχαιμίας άκρου μπορεί να δοθεί από τη δημιουργία και επέκταση ενός νέου παράπλευρου λειτουργικού στεφανιαίου δικτύου. Κατά συνέπεια η νεοαγγειογένεση, που λαμβάνει χώρα στο κοιλιακό μυοκάρδιο και η οποία ίσως προωθείται σε πρώτο βαθμό από την αρτηριακή ανεπάρκεια και σε δεύτερο βαθμό η χρόνια ισχαιμία σκελετικών μυών αποτελούν έναν προεξέχων μηχανισμό για τη μείωση της νεκρωτικής περιοχής μετά από απολίνωση των στεφανιαίων αρτηριών είτε με συνοδή επαναιμάτωση είτε με μόνιμη διακοπή της στεφανιαίας κυκλοφορίας.

#### *Χρόνια ισχαιμία άκρου και ισχαιμική-, μετα-ισχαιμική προετοιμασία*

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος στο μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του κόνικλου εξετάσαμε την αναλογία εμφραγματικής προς την ισχαιμική περιοχή του καρδιακού ιστού. Ο στόχος μας σε αυτή την περίπτωση ήταν τριπλός. Στο πρώτο σκέλος ερευνήσαμε την επίδραση της χρόνιας ισχαιμίας, στο δεύτερο συνδυάσαμε τη χρόνια ισχαιμία με κύκλους ισχαιμικής προετοιμασίας και τέλος στο τρίτο προσθέσαμε στη μηριαία ισχαιμία επεισόδια μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας. Από τα αποτελέσματα του πρώτου σκέλους φαίνεται ότι η χρόνια ισχαιμία άκρου παρέχει καρδιοπροστασία μειώνοντας την εμφραγματική περιοχή όπως και στο πείραμα με τους επίμυες κατά 54.1%, γεγονός που συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων μελετών που εξέτασαν την ισχαιμία περιφερικών μυών, πλην όμως παροδικής [204, 225, 320, 389, 390]. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι οι

κόνικλοι έλαβαν επαναιμάτωση σε αντίθεση με τους επίμυες στο αντίστοιχο πείραμα.

Στο δεύτερο σκέλος η προσθήκη ισχαιμικής προετοιμασίας σε ήδη υπάρχουσα χρόνια ισχαιμία, αλλά και στην ομάδα της εικονικής επέμβασης επέφερε μια μείωση της τάξης του 38.2% της εμφραγματικής περιοχής. Συγκρίνοντας την ομάδα εικονικής επέμβασης στο πρώτο σκέλος με την εικονική επέμβαση που έλαβε ισχαιμική προετοιμασία διαπιστώνεται η αναμενόμενη στατιστικά σημαντική μείωση της έκτασης του εμφράγματος ( $p=0.04$ ). Εάν όμως συγκρίνουμε τους κόνικλους με μηριαία ισχαιμία και αυτούς με το συνδυσμό της ισχαιμικής προετοιμασίας παρατηρούμε ότι δεν έχει επέλθει καμία σημαντική διαφορά ( $p=0.73$ ).

Στο τρίτο μέρος ο συνδυασμός χρόνιας ισχαιμίας και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος κατά 43%. Εντύπωση προκαλεί ότι η ομάδα της εικονικής επέμβασης με μετα-ισχαιμική προετοιμασία δε διαφέρει από την ομάδα της εικονικής επέμβασης του πρώτου σκέλους ( $p=0.46$ ), ενώ παρουσιάζει σημαντική διαφορά με το συνδυασμό εικονικής επέμβασης και ισχαιμικής προετοιμασίας ( $p=0.0094$ ). Αντίθετα, δεν εμφανίζει η μείωση του μεγέθους του εμφράγματος καμία στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στους κόνικλους με μόνο χρόνια ισχαιμία ( $p=0.13$ ) ή με χρόνια ισχαιμία και ισχαιμική προετοιμασία ( $p=0.09$ ).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα: Πρώτον, η χρόνια ισχαιμία των περιφερικών σκελετικών μυών επιδεικνύει καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις και σε ένα δεύτερο είδος, τον κόνικλο, άρα δεν είναι ειδική μόνο για κάποιο συγκεκριμένο οργανισμό. Δεύτερον, σε μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης επιβεβαιώνεται η μείωση του εμφράγματος, οπότε ο

μηχανισμός που προωθεί η χρόνια ισχαιμία των σκελετικών μυών δραστηριοποιείται πιθανόν και στο διάστημα της επαναιμάτωσης. Εάν ισχύει κάτι τέτοιο ο μηχανισμός αυτός πιθανόν να μοιράζεται το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι με τα καθιερωμένα φαινόμενα της ισχαιμικής- και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας. Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να στηριχθεί από την παρατήρηση, ότι ο συνδυασμός χρόνιας ισχαιμίας και ισχαιμικής- και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας δεν παρουσίασε καμία διαφορά από τη μεμονωμένη χρόνια ισχαιμία, επομένως δε σημειώθηκε κάποιο αθροιστικό αποτέλεσμα, γεγονός που θα παρέπεμπε σε διαφορετικούς δρώντες μηχανισμούς. Η παρέκκλιση στο αποτέλεσμα της ομάδας της εικονικής επέμβασης με μετα-ισχαιμική προετοιμασία σε σύγκριση με την απλή εικονική επέμβαση, θα μπορούσε να εξηγηθεί ως απώλεια ή αναστολή της θετικής καρδιοπροστασίας της μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας από το προκαλούμενο στρες κατά και μετά την εικονική επέμβαση.

#### *Μέτρηση νεοαγγείων / Πυκνότητα στεφανιαίων αγγείων*

Η παθολογοανατομική μελέτη ανέδειξε μια χαρακτηριστική αύξηση στη νεοαγγείωση στο κοιλιακό μυοκάρδιο μετά από τη χρόνια ισχαιμία άκρου στην πυκνότητα αυτών ανά  $\text{mm}^2$  επιφανείας καρδιακού ιστού έναντι των μαρτύρων. Αυτές οι αλλαγές αφορούν μικρά αρτηριόλια με διάμετρο  $<50\mu\text{m}$ , παρατηρήθηκαν και στα δύο πειραματόζωα επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα συμπεράσματά μας ότι αυτή η διαδικασία δεν είναι χαρακτηριστική ενός συγκεκριμένου είδους. Κατά τη διάρκεια της χρόνιας ισχαιμίας άκρου, η αιμάτωση των ιστών διατηρείται χάρη στην ανάπτυξη μιας παράπλευρης κυκλοφορίας. Το κύριο ερέθισμα για την έναρξη της αρτηριογένεσης είναι η αυξανόμενη πίεση διάτμησης ή διαχωρισμού μέσα στα προϋπάρχοντα παράπλευρα αγγεία και στις μικρές αρτηρίες πλησίον του σημείου

μιας κριτικής στένωσης ή ολικής απόφραξης [240]. Η νεοαγγείωση υποστηρίζεται από τους αυξητικούς παράγοντες, τις κυτοκίνες, τις πρωτεάσες και τα κύτταρα φλεγμονής, που εκκρίνονται τοπικά κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, αλλά κυκλοφορούν και μπορούν να ενεργήσουν στους μακρινούς ιστούς, όπως στο κοιλιακό μυοκάρδιο [240, 458].

Σε προηγούμενη μελέτη έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν τα ερεθίσματα για την τοπική ή την εξ' αποστάσεως διαδικασία της νεοαγγειογένεσης [459]. Σε αυτές τις μελέτες οι VEGF, HIF-1a και ο bFGF έχουν προταθεί ως οι κύριοι παράγοντες για την αγγειογένεση και το σχηματισμό αρτηριολίων [459]. Εντούτοις, η αγγειογένεση ρυθμίζεται από πιο σύνθετους μοριακούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν τη συμμετοχή των πολλαπλάσιων των αναφερόμενων παραγόντων.

Η χρόνια ισχαιμία σκελετικών μυών και τα καρδιοπροστατευτικά οφέλη που περιγράφονται στη μελέτη μας δίνουν τη δυνατότητα να συμπεράνουμε ότι συμπεριφέρεται αφενός όπως τα φαινόμενα της ισχαιμικής- και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας και αφετέρου ως ένας πυροδότης της αγγειογένεσης. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες για την αλληλεπίδραση μεταξύ των σκελετικών μυών και του μυοκαρδίου εμπλέκουν τη φολλιστατίνη (follistatin-like 1), μια εξωκυττάρια γλυκοπρωτεΐνη, που εκκρίνεται από τους σκελετικούς μυς σαν απάντηση σε ισχαιμική τους προσβολή [460, 461]. Η φολλιστατίνη βρέθηκε να υποκινεί την αγγειογένεση, μέσω της δυνατότητάς της να ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης Akt-eNOS. Σε αυτή τη μελέτη [461], η χειρουργικά προκαλούμενη ισχαιμία οπίσθιου άκρου σε πειραματικό πρότυπο με ποντίκια, με ένα πρωτόκολλο σχεδόν ίδιο με τα πειράματά μας, οδήγησε στην επαγωγή της φολλιστατίνης στο σκελετικό μυ και αύξησε τα επίπεδα της στον ορό. Επιπλέον, τα πρόσφατα

στοιχεία δείχνουν ότι η φολλιστατίνη έχει πολλαπλές ιδιότητες, παρουσιάζοντας όχι μόνο αγγειογενετική δράση, αλλά μπορεί επίσης να επιδρά καρδιοπροστατευτικά, εμφανίζοντας ακόμα και αντιαποπρωτική ιδιότητα στα καρδιομυοκύτταρα [462].

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι σκελετικοί μύες εκκρίνουν παράγοντες, αναφερόμενοι ως “μυοκίνες”, που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των μακρινών ιστών, όπως άθικτο κοιλιακό myocardium [463]. Αυτά τα συμπεράσματα ενισχύουν την υπόθεσή μας, δηλαδή ότι η χρόνια ισχαιμία σκελετικών μυών αυξάνει την παραγωγή παραγόντων που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την αγγειογένεση που κυκλοφορούν και μπορούν να ενεργήσουν σε άλλα αγγειακά δίκτυα, όπως αυτό της στεφανιαίας κυκλοφορίας.





#### **Δ. Συμπεράσματα**

Το μοντέλο της χρόνιας ισχαιμίας οπίσθιου άκρου, επί εδάφους χρόνιας αρτηριακής ανεπάρκειας με αφαίρεση της μηριαίας αρτηρίας αποδεικνύεται να παρέχει καρδιοπροσταστατευτικά οφέλη, ελαττώνοντας την έκταση του εμφράγματος σε μυοκαρδιακή ισχαιμία χωρίς ή με ακόλουθη επαναιμάτωση. Η μείωση του εμφράγματος αποδίδεται κατά πρώτο βαθμό σε μια νεοαγγειογένεση, που λαμβάνει χώρα στο κοιλιακό μυοκάρδιο και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός λειτουργικού παράπλευρου στεφανιαίου δικτύου, το οποίο είναι ικανό να διατηρεί τη στεφανιαία ροή κάτω από συνθήκες μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Το εκτεταμένο στεφανιαίο δίκτυο στην ομάδα της χρόνιας ισχαιμίας επαληθεύεται από την παθολογοανατομική μελέτη καρδιακών τομών στα δύο είδη πειραματόζων που χρησιμοποιήθηκαν. Πέραν της μείωσης της εμφραγματικής περιοχής, διατηρείται η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, ακόμα και σε συνθήκες ολικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας ή μηδενικής ροής, στοιχείο που υποδηλώνει, ότι η χρόνια ισχαιμία των σκελετικών μυών αποτελεί το ερέθισμα για την δραστηριοποίηση ενός δεύτερου μηχανισμού. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί στο μυοκάρδιο εξ' αποστάσεως και ίσως να μοιράζεται το ίδιο μονοπάτι με την ισχαιμική- και μετα-ισχαιμική προετοιμασία, μιας και ο συνδυασμός της χρόνιας ισχαιμίας με κάθε ένα από αυτά τα φαινόμενα δεν κατέληξε σε περαιτέρω μείωση της εμφραγματικής περιοχής.



## **Ε. Περιορισμοί της μελέτης**

Η μελέτη μας βασίστηκε και σχεδιάστηκε σε πειραματικά πρότυπα και μοντέλα, έτσι ώστε να απαντήσει με σαφήνεια στα ερωτήματα που τέθηκαν και που αφορούν την ύπαρξη προστασίας του μυοκαρδίου ως συνέπειας της χρόνιας ισχαιμίας των σκελετικών μυών, λόγω αρτηριακής ανεπάρκειας. Πιστεύουμε ότι τα αποτελέσματα μας δίνουν τη δυνατότητα να δώσουμε βάσιμες απαντήσεις, εντούτοις υπάρχουν σημεία τα οποία δε διερευνήθηκαν και που πιθανόν να περιορίζουν την ισχύ της μελέτης μας. Πρώτον δε μετρήθηκαν αγγειογενετικοί παράγοντες τόσο στον ορό, όσο και στον ισχαιμικό περιφερικό σκελετικό και τον καρδιακό ιστό. Η συγκεκριμένη μέτρηση θα πρόσθετε ένα πιθανό μοριακό μηχανισμό αγγειογένεσης από απόσταση. Δεύτερον δεν προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των κατεχολαμινών στον ορό μετά την πρόκληση της μηριαίας ισχαιμίας και έτσι δε συνεκτιμήθηκαν αυτοί οι παράγοντες στη μείωση του εμφράγματος. Τρίτον δε μετρήθηκαν στο φυσιολογικό και ισχαιμικό καρδιακό ιστό οι πρωτεϊνικές κινάσες, που εμπλέκονται στα φαινόμενα της ισχαιμικής- και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας, έτσι ώστε να διευκρινιστεί το μοριακό μονοπάτι του μηχανισμού προστασίας από τη χρόνια ισχαιμία περιφερικών μυών.



## ΣΤ. Περίληψη στα ελληνικά

**Υπόβαθρο:** Η ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας παρατηρείται σε σκελετικούς μύες ως απάντηση μετά από χρόνια ισχαιμία. Επιπλέον η ισχαιμία αυτών, παροδική ή οξεία, παρέχει κυτταροπροστασία στο μυοκάρδιο.

**Σκοπός:** Εξετάσαμε την επίδραση της χρόνιας ισχαιμίας περιφερικών σκελετικών μυών στο μέγεθος του εμφράγματος και στην νεοαγγείωση του μυοκαρδίου.

**Μέθοδοι:** Σε επίμυες τύπου Wistar και κόνικλους τύπου New Zealand προκλήθηκε ισχαιμία οπισθίου άκρου με αφαίρεση της αριστερής μηριαίας αρτηρίας. Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, στους επίμυες εκτιμήθηκε το μέγεθος του εμφράγματος χωρίς επαναιμάτωση, η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση, η νεοαγγείωση και η στεφανιαία ροή, ενώ στους κόνικλους προσδιορίστηκε ο λόγος εμφραγματική/ισχαιμική περιοχή (I/R) μετά από ισχαιμία επαναιμάτωση σε συνδυασμό με πρωτόκολλα προετοιμασίας και η νεοαγγείωση.

**Αποτελέσματα:** Στους επίμυες μετά από ισχαιμία άκρου το μέγεθος του εμφράγματος ήταν μικρότερο ( $p < 0.0001$ ), η λειτουργία της αριστερής κοιλίας μετά την επαναιμάτωση βελτιώθηκε (αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας:  $p = 0.008$ ;  $\max + dp/dt$ :  $p = 0.004$ ;  $\max - dp/dt$ :  $p = 0.041$ ), ενώ η στεφανιαία ροή δε μειώθηκε κατά την ισχαιμία ( $F = 1.36$ ,  $p = 0.28$ ) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Στους κόνικλους με ισχαιμία άκρου, μετά ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και συνδυασμού ισχαιμικής και μετα-ισχαιμικής προετοιμασίας ο λόγος I/R ήταν μικρότερος ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.0015$ ,  $p = 0.00014$ ), ενώ η πυκνότητα των στεφανιαίων αγγείων ήταν υψηλότερη, τόσο στους επίμυες ( $p = 0.00021$ ) όσο και στους κόνικλους ( $p = 0.008$ ).

**Συμπέρασμα:** Η χρόνια ισχαιμία περιφερικών σκελετικών μυών δρα καρδοπροστατευτικά, επάγοντας την ανάπτυξη παράπλευρης στεφανιαίας κυκλοφορίας.



## Z. Περίληψη στα αγγλικά

**Background:** Collateral growth occurs as an adaptive response in skeletal muscles after chronic ischemia. Furthermore acute or transient ischemia of these confers cytoprotection to the myocardium.

**Aim:** We examined the effects of chronic ischemia of peripheral skeletal muscles on infarct size and neovascularization of myocardium.

**Methods:** Hind-limb ischemia was induced in Wistar rats and New Zealand rabbits by excision of the left femoral artery. Four weeks thereafter, in the rat series, infarct size without reperfusion, left ventricular function after ischemia/reperfusion, neovascularization and coronary flow were determined, whereas in the rabbit series, infarct area/area at risk ratio (I/R ratio) after ischemia/reperfusion combined with conditioning protocol and neovascularization were assessed.

**Results:** Chronic limb ischemia rats demonstrated smaller infarct size ( $p < 0.0001$ ), improved left ventricular function at the end of reperfusion (developed pressure:  $p = 0.008$ ;  $\max dp/dt$ :  $p = 0.004$ ;  $\max -dp/dt$ :  $p = 0.041$ ), whereas coronary flow remained unchanged during ischemia ( $F = 1.36$ ,  $p = 0.28$ ) compared to the controls ( $F = 5.65$ ,  $p = 0.00182$ ). Chronic limb ischemia rabbits exhibited a smaller I/R ratio after ischemia/reperfusion and application of pre- and postconditioning ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.0015$ ,  $p = 0.00014$ ), while coronary vessel density was higher in both rat ( $0.00021$ ) and rabbit series ( $p = 0.008$ ).

**Conclusion:** Chronic ischemia of peripheral skeletal muscles confers cardioprotection, augmenting coronary collateral flow.





## H. Βιβλιογραφία

- [1] Riede UN, Drexler H. Herzleistungsstörungen. In: Riede UN, Schaefer HE, eds. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2 ed. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag 1999:480-95.
- [2] Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973 Jun 29;180(93):1332-9.
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.
- [4] Ross R. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis*. 1981 Sep-Oct;1(5):293-311.
- [5] Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987 May 28;316(22):1371-5.
- [6] Stary HC. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:463-74.
- [7] Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986 Mar-Apr;6(2):131-8.
- [8] van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, et al. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest*. 1989 Aug;61(2):166-70.
- [9] Libby P, Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:585-94.
- [10] Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:539-55.
- [11] Falk E, Shah PK, Fuster V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996:492-510.
- [12] Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):750-4.
- [13] Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Oct;14(5):421-30.
- [14] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 May;18(5):842-51.
- [15] Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14871-6.
- [16] Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002 Oct 7;196(7):887-96.
- [17] Eriksson EE, Xie X, Werr J, et al. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*. 2001 Jul 16;194(2):205-18.
- [18] Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):788-91.
- [19] Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):894-7.
- [20] Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):275-81.
- [21] Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003 Feb;111(3):333-40.
- [22] Veillard NR, Kwak B, Pelli G, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. 2004 Feb 6;94(2):253-61.

- [23] Lutters BC, Leeuwenburgh MA, Appeldoorn CC, et al. Blocking endothelial adhesion molecules: a potential therapeutic strategy to combat atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Oct;15(5):545-52.
- [24] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, et al. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 29;92(18):8264-8.
- [25] Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):123-8.
- [26] Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- [27] Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Oct 1;22(10):1547-59.
- [28] Miller YI, Chang MK, Binder CJ, et al. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol.* 2003 Oct;14(5):437-45.
- [29] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002 Mar 12;105(10):1158-61.
- [30] Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):416-21.
- [31] Bobryshev YV, Lord RS. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol.* 1995 Aug;58(3):307-22.
- [32] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Dec;21(12):1876-90.
- [33] Stemme S, Faber B, Holm J, et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3893-7.
- [34] de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, et al. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to Chlamydia pneumoniae. *Cardiovasc Res.* 2000 Dec;48(3):402-8.
- [35] Tupin E, Nicoletti A, Elhage R, et al. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. *J Exp Med.* 2004 Feb 2;199(3):417-22.
- [36] Ludewig B, Freigang S, Jaggi M, et al. Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 7;97(23):12752-7.
- [37] Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, et al. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58.
- [38] Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999 Jul;145(1):33-43.
- [39] Uyemura K, Demer LL, Castle SC, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1996 May 1;97(9):2130-8.
- [40] Gupta S, Pablo AM, Jiang X, et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997 Jun 1;99(11):2752-61.
- [41] Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Jun;22(6):661-70.
- [42] Laurat E, Poirier B, Tupin E, et al. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001 Jul 10;104(2):197-202.
- [43] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res.* 2001 Sep 28;89(7):E41-5.
- [44] Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, et al. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1596-601.
- [45] Elhage R, Jawien J, Rudling M, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1;59(1):234-40.
- [46] Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(3):427-37.

- [47] Shimizu K, Shichiri M, Libby P, et al. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):300-8.
- [48] Topouzis S, Majesky MW. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. *Dev Biol*. 1996 Sep 15;178(2):430-45.
- [49] Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, et al. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res*. 1997 Dec;81(6):940-52.
- [50] Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol*. 1981 May;89(2):379-83.
- [51] Babaev VR, Bobryshev YV, Stenina OV, et al. Heterogeneity of smooth muscle cells in atheromatous plaque of human aorta. *Am J Pathol*. 1990 May;136(5):1031-42.
- [52] Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, et al. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell*. 1996 Dec 13;87(6):1069-78.
- [53] Assoian RK, Marcantonio EE. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*. 1996 Dec 1;98(11):2436-9.
- [54] Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res*. 1998 Mar 23;82(5):548-56.
- [55] Wesley RB, 2nd, Meng X, Godin D, et al. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Mar;18(3):432-40.
- [56] Smith RE, Hogaboam CM, Strieter RM, et al. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. *J Leukoc Biol*. 1997 Nov;62(5):612-9.
- [57] Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1084-8.
- [58] Moreno PR, Falk E, Palacios IF, et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):775-8.
- [59] Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):396-9.
- [60] Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003 Oct 1;59(4):812-23.
- [61] Liu J, Sukhova GK, Sun JS, et al. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1359-66.
- [62] Schulz R, Gres P, Konietzka I, et al. Regional differences of myocardial infarct development and ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2005 Jan;100(1):48-56.
- [63] Maeng M, Mortensen UM, Kristensen J, et al. Hypothermia during reperfusion does not reduce myocardial infarct size in pigs. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jan;101(1):61-8.
- [64] Heusch G, Schulz R. The role of heart rate and the benefits of heart rate reduction in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J*. 2007(9):Suppl F:F8-14.
- [65] Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR, et al. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circ Res*. 1985 May;56(5):651-65.
- [66] Schulz R, Rose J, Skyschally A, et al. Bradycardic agent UL-FS 49 attenuates ischemic regional myocardial dysfunction and reduces infarct size in swine: comparison with the beta-blocker atenolol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995 Feb;25(2):216-28.
- [67] Abozguia K, Shivu GN, Ahmed I, et al. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*. 2009;15(8):827-35.
- [68] Scolletta S, Biagioli B. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed Pharmacother*. 2010 Mar;64(3):203-7.
- [69] Bessman SP, Geiger PJ. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*. 1981 Jan 30;211(4481):448-52.
- [70] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res*. 2001 Jan;49(1):17-26.

- [71] Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, et al. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol*. 2009 Mar;104(2):131-9.
- [72] Tsutsui H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med*. 2001 Dec;40(12):1177-82.
- [73] Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J*. 2005 Jul 1;389(Pt 1):83-9.
- [74] Javadov S, Karmazyn M, Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Sep;330(3):670-8.
- [75] Wagner M, Siddiqui MA. Signaling networks regulating cardiac myocyte survival and death. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Sep;10(9):928-37.
- [76] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009 Feb 15;81(3):449-56.
- [77] Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):547-55.
- [78] Jassem W, Fuggle SV, Rela M, et al. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002 Feb 27;73(4):493-9.
- [79] Zaugg M, Schaub MC, Foex P. Myocardial injury and its prevention in the perioperative setting. *Br J Anaesth*. 2004 Jul;93(1):21-33.
- [80] Bolli R. Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 1998 Jun;93(3):156-62.
- [81] Chen Z, Siu B, Ho YS, et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Nov;30(11):2281-9.
- [82] Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I270-6.
- [83] Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1737-44.
- [84] Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2004 Feb 3;109(4):544-9.
- [85] Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S644-8.
- [86] Altschuld RA, Wenger WC, Lamka KG, et al. Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin. *J Biol Chem*. 1985 Nov 15;260(26):14325-34.
- [87] Nichols CG, Lederer WJ. The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990 Feb;68(2):183-94.
- [88] Schluter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, et al. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol*. 1996 Aug;271(2 Pt 2):H428-34.
- [89] Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1983 Feb;15(2):67-73.
- [90] Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, et al. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997 Dec 16;96(12):4372-9.
- [91] Schafer C, Ladilov Y, Inserre J, et al. Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*. 2001 Aug 1;51(2):241-50.
- [92] Siegmund B, Kliez T, Schwartz P, et al. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1991 Feb;260(2 Pt 2):H426-35.
- [93] Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):1160-74.
- [94] Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol*. 1995 Apr;268(4 Pt 2):H1531-9.

- [95] Schafer C, Ladilov YV, Siegmund B, et al. Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1457-63.
- [96] Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, et al. Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*. 2002 Sep;55(4):739-48.
- [97] Klein HH, Pich S, Bohle RM, et al. Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation*. 2000 Oct 17;102(16):1977-82.
- [98] Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, et al. The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Nov 15;38(6):1644-50.
- [99] Padilla F, Garcia-Dorado D, Agullo L, et al. L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res*. 2000 Jun;46(3):412-20.
- [100] Schluter KD, Weber M, Schraven E, et al. NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am J Physiol*. 1994 Oct;267(4 Pt 2):H1461-6.
- [101] Hempel A, Friedrich M, Schluter KD, et al. ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):H244-9.
- [102] Padilla F, Garcia-Dorado D, Agullo L, et al. Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*. 2001 Aug 15;51(3):592-600.
- [103] Garcia-Dorado D, Theroux P, Desco M, et al. Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am J Physiol*. 1989 May;256(5 Pt 2):H1266-73.
- [104] Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*. 1997 Nov 18;96(10):3579-86.
- [105] Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, et al. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):280-7.
- [106] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.
- [107] Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993 Sep;88(3):1264-72.
- [108] Lang SC, Elsasser A, Scheler C, et al. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning--identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol*. 2006 Mar;101(2):149-58.
- [109] Schulz R, Cohen MV, Behrends M, et al. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2001 Nov;52(2):181-98.
- [110] Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*. 2003 Oct;83(4):1113-51.
- [111] Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz*. 2008 Mar;33(2):88-100.
- [112] Schulz R, Rose J, Post H, et al. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflugers Arch*. 1995 Jun;430(2):273-82.
- [113] Skyschally A, Schulz R, Gres P, et al. Coronary microembolization does not induce acute preconditioning against infarction in pigs-the role of adenosine. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 1;63(2):313-22.
- [114] Schulz R, Post H, Vahlhaus C, et al. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation*. 1998 Sep 8;98(10):1022-9.
- [115] Cohen MV, Yang XM, Liu GS, et al. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res*. 2001 Aug 3;89(3):273-8.
- [116] Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 May;280(5):H2175-81.
- [117] Gres P, Schulz R, Jansen J, et al. Involvement of endogenous prostaglandins in ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 15;55(3):626-32.

- [118] Skyschally A, Schulz R, Gres P, et al. Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Feb;284(2):H698-703.
- [119] Post H, Schulz R, Behrends M, et al. No involvement of endogenous nitric oxide in classical ischemic preconditioning in swine. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 May;32(5):725-33.
- [120] Qin Q, Yang XM, Cui L, et al. Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoKATP-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug;287(2):H712-8.
- [121] Guo Y, Li Q, Wu WJ, et al. Endothelial nitric oxide synthase is not necessary for the early phase of ischemic preconditioning in the mouse. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Mar;44(3):496-501.
- [122] Nakano A, Liu GS, Heusch G, et al. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jul;32(7):1159-67.
- [123] Martin C, Schulz R, Post H, et al. Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ: NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia. *Cardiovasc Res*. 2007 Apr 1;74(1):46-55.
- [124] Cohen MV, Philipp S, Krieg T, et al. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Apr;42(4):842-51.
- [125] Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, et al. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res*. 1999 Nov 26;85(11):1092-100.
- [126] Maulik N, Yoshida T, Zu YL, et al. Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):H1857-64.
- [127] Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res*. 2001 Feb 2;88(2):175-80.
- [128] Baines CP, Wang L, Cohen MV, et al. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Feb;30(2):383-92.
- [129] Yang XM, Sato H, Downey JM, et al. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Mar;29(3):991-9.
- [130] Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 1;63(2):305-12.
- [131] Forster K, Paul I, Solenkova N, et al. NECA at reperfusion limits infarction and inhibits formation of the mitochondrial permeability transition pore by activating p70S6 kinase. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jul;101(4):319-26.
- [132] Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(11):1535-49.
- [133] Downey JM, Cohen MV. We think we see a pattern emerging here. *Circulation*. 2005 Jan 18;111(2):120-1.
- [134] Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Ischemic preconditioning targets the reperfusion phase. *Basic Res Cardiol*. 2007 Sep;102(5):445-52.
- [135] Smith RM, Suleman N, McCarthy J, et al. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNFalpha gene. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 15;55(3):553-60.
- [136] Lecour S, Rochette L, Opie L. Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2005 Jan 1;65(1):239-43.
- [137] Lecour S, Smith RM, Woodward B, et al. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 May;34(5):509-18.
- [138] Ichikawa Y, Miura T, Nakano A, et al. The role of ADAM protease in the tyrosine kinase-mediated trigger mechanism of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2004 Apr 1;62(1):167-75.
- [139] Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, et al. Tumor necrosis factor-alpha does not modulate ischemia/reperfusion injury in naive myocardium but is essential for the development of late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Jul;37(1):51-61.
- [140] Schulz R, Boengler K, Totzeck A, et al. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev*. 2007 Dec;12(3-4):261-6.

- [141] Quist AP, Rhee SK, Lin H, et al. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol.* 2000 Mar 6;148(5):1063-74.
- [142] De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol.* 2002 Jun;191(3):269-82.
- [143] Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8648-57.
- [144] Bao X, Reuss L, Altenberg GA. Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):20058-66.
- [145] Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, et al. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res.* 2006 Jun 23;98(12):1498-505.
- [146] Jain SK, Schuessler RB, Saffitz JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2003 May 30;92(10):1138-44.
- [147] Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, et al. Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jan;286(1):H214-21.
- [148] Schulz R, Gres P, Skyschally A, et al. Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. *Faseb J.* 2003 Jul;17(10):1355-7.
- [149] Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):473-8.
- [150] Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):386-401.
- [151] Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, et al. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Oct;283(4):H1740-2.
- [152] Schwanke U, Li X, Schulz R, et al. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin 43-deficient mice--a further in vivo study. *Basic Res Cardiol.* 2003 May;98(3):181-2.
- [153] Li X, Heinzl FR, Boengler K, et al. Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Jan;36(1):161-3.
- [154] Bolli R, Dawn B, Xuan YT. Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Feb;13(2):72-9.
- [155] Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic Res Cardiol.* 2007 Jul;102(4):279-97.
- [156] Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, et al. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell.* 2007 Feb 9;128(3):589-600.
- [157] Xuan YT, Guo Y, Han H, et al. An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 31;98(16):9050-5.
- [158] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Role of the protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation.* 2005 Sep 27;112(13):1971-8.
- [159] Smith RM, Suleman N, Lacerda L, et al. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004 Sep 1;63(4):611-6.
- [160] Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res.* 2001 Apr 27;88(8):802-9.
- [161] Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000 Sep 15;87(6):460-6.
- [162] Heinzl FR, Luo Y, Li X, et al. Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ Res.* 2005 Sep 16;97(6):583-6.
- [163] Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, et al. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):274-85.
- [164] Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. GSK3beta inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2007 Jul;102(4):341-9.
- [165] Di Lisa F, Canton M, Menabo R, et al. Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol.* 2003 Jul;98(4):235-41.

- [166] Diaz RJ, Armstrong SC, Battish M, et al. Enhanced cell volume regulation: a key protective mechanism of ischemic preconditioning in rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Jan;35(1):45-58.
- [167] Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning through opening of swelling-activated chloride channels? *Circ Res.* 2001 Dec 7;89(12):E48.
- [168] Insele J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, et al. Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2004 Oct 1;64(1):105-14.
- [169] Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2005 Apr 1;66(1):123-31.
- [170] Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res.* 2000 Nov 24;87(11):972-83.
- [171] Bolli R, Dawn B, Tang XL, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol.* 1998 Oct;93(5):325-38.
- [172] Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, et al. The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 15;55(3):495-505.
- [173] Sato H, Bolli R, Rokosh GD, et al. The cardioprotection of the late phase of ischemic preconditioning is enhanced by postconditioning via a COX-2-mediated mechanism in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Oct;293(4):H2557-64.
- [174] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Mechanism of cyclooxygenase-2 upregulation in late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 May;35(5):525-37.
- [175] Guo Y, Jones WK, Xuan YT, et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11507-12.
- [176] Shinmura K, Bolli R, Liu SQ, et al. Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2002 Aug 9;91(3):240-6.
- [177] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Aug;285(2):H579-88.
- [178] Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):74-85.
- [179] Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, et al. Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005 Jul;100(4):295-310.
- [180] Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, et al. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol.* 2006 Nov;101(6):502-7.
- [181] Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, et al. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Mar;292(3):H1551-60.
- [182] Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, et al. Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2007 Jan;102(1):90-100.
- [183] Yang XM, Philipp S, Downey JM, et al. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol.* 2005 Jan;100(1):57-63.
- [184] Penna C, Mancardi D, Tullio F, et al. Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2008 Jul;103(4):368-77.
- [185] Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 2006 Mar;101(2):180-9.
- [186] Yang XM, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Sep 1;44(5):1103-10.
- [187] Boengler K, Buechert A, Heinen Y, et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res.* 2008 Jan 4;102(1):131-5.
- [188] Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):240-53.



- [189] Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, et al. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H971-6.
- [190] Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Mar;290(3):H1011-8.
- [191] Heusch G, Buchert A, Feldhaus S, et al. No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jul;101(4):354-6.
- [192] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993 Mar;87(3):893-9.
- [193] McClanahan T, Nao B, Wolke L, et al. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J*. 1993;7:A18.
- [194] Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996 Nov 1;94(9):2193-200.
- [195] Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, et al. Cardioprotection 'outside the box'--the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2003 May;98(3):149-57.
- [196] Bolte CS, Liao S, Gross GJ, et al. Remote preconditioning-endocrine factors in organ protection against ischemic injury. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2007 Sep;7(3):167-75.
- [197] Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997 Sep 2;96(5):1641-6.
- [198] Oxman T, Arad M, Klein R, et al. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 2):H1707-12.
- [199] Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2007 Nov;116(2):173-91.
- [200] Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008 Aug 1;79(3):377-86.
- [201] Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, et al. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis*. 1999 Aug;8(2):123-9.
- [202] Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 2):H2451-7.
- [203] Dickson EW, Porcaro WA, Fenton RA, et al. "Preconditioning at a distance" in the isolated rabbit heart. *Acad Emerg Med*. 2000 Apr;7(4):311-7.
- [204] Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005 Jun 27;79(12):1691-5.
- [205] Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, et al. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Mar;288(3):H1252-6.
- [206] Patel HH, Moore J, Hsu AK, et al. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Oct;34(10):1317-23.
- [207] Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, et al. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 28;579(1-3):246-52.
- [208] Dickson EW, Tubbs RJ, Porcaro WA, et al. Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jul;283(1):H22-8.
- [209] Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Oct;285(4):H1435-43.
- [210] Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, et al. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):591-9.
- [211] Zhang SZ, Wang NF, Xu J, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology*. 2006 Sep;105(3):550-6.

- [212] Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, et al. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *J Leukoc Biol.* 2004 Mar;75(3):453-9.
- [213] Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, et al. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 2):H1542-7.
- [214] Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 May;278(5):H1571-6.
- [215] Tang ZL, Dai W, Li YJ, et al. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Mar;359(3):243-7.
- [216] Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol.* 1999 Feb;33(2):556-64.
- [217] Ding YF, Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao.* 2001 Feb;53(1):7-12.
- [218] Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, et al. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jul;283(1):H29-37.
- [219] Dong JH, Liu YX, Ji ES, et al. [Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats]. *Sheng Li Xue Bao.* 2004 Feb 25;56(1):41-6.
- [220] Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, et al. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 15;55(3):583-9.
- [221] Li YJ, Xiao ZS, Peng CF, et al. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol.* 1996 Sep 12;311(2-3):163-7.
- [222] Xiao L, Lu R, Hu CP, et al. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol.* 2001 Sep 14;427(2):131-5.
- [223] Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, et al. Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul Pept.* 2005 Apr 15;127(1-3):217-24.
- [224] Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics.* 2004 Sep 16;19(1):143-50.
- [225] Konstantinov IE, Arab S, Li J, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Nov;130(5):1326-32.
- [226] Peralta C, Fernandez L, Panes J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001 Jan;33(1):100-13.
- [227] Vinten-Johansen J. Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. *Heart Fail Rev.* 2007 Dec;12(3-4):235-44.
- [228] Singh D, Chopra K. Evidence of the role of angiotensin AT(1) receptors in remote renal preconditioning of myocardium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2004 Mar;26(2):117-22.
- [229] Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, et al. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 15;55(3):590-601.
- [230] Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, et al. Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovasc Res.* 2008 Apr 1;78(1):108-15.
- [231] Costa AD, Jakob R, Costa CL, et al. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28;281(30):20801-8.
- [232] Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, et al. Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning? *Pathophysiology.* 2001 Mar;7(4):271-4.
- [233] Tokuno S, Hinokiyama K, Tokuno K, et al. Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jun 1;22(6):995-1001.
- [234] Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Apr;35(4):339-41.

- [235] Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol*. 2005 Sep;100(5):404-12.
- [236] Li CM, Zhang XH, Ma XJ, et al. Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Scand Cardiovasc J*. 2006 Oct;40(5):312-7.
- [237] Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart*. 2007 Jun;93(6):749-52.
- [238] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60.
- [239] Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*. 2006 Jan-Mar;10(1):45-55.
- [240] Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A, et al. Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2008 May 1;78(2):242-9.
- [241] Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2002 Feb;13(1):29-37.
- [242] Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
- [243] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003 Mar 7;112(5):645-57.
- [244] Makino Y, Nakamura H, Ikeda E, et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6534-40.
- [245] Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, et al. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10440-5.
- [246] Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1561-7.
- [247] McMahon S, Charbonneau M, Grandmont S, et al. Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem*. 2006 Aug 25;281(34):24171-81.
- [248] Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6257-63.
- [249] Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8508-15.
- [250] Eitenmuller I, Volger O, Kluge A, et al. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 2006 Sep 15;99(6):656-62.
- [251] Pipp F, Boehm S, Cai WJ, et al. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Sep;24(9):1664-8.
- [252] Shyy JY, Li YS, Lin MC, et al. Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression. *J Biomech*. 1995 Dec;28(12):1451-7.
- [253] Arras M, Ito WD, Scholz D, et al. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):40-50.
- [254] Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):449-58.
- [255] Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, et al. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*. 2006 Oct 13;99(8):891-9.
- [256] Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res*. 2004 May 14;94(9):1179-85.
- [257] Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):881-9.
- [258] Tang G, Charo DN, Wang R, et al. CCR2-/- knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg*. 2004 Oct;40(4):786-95.
- [259] Contreras-Shannon V, Ochoa O, Reyes-Reyna SM, et al. Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2-/- mice following ischemic injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Feb;292(2):C953-67.
- [260] Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, et al. Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):576-82.

- [261] Ryu J, Lee CW, Hong KH, et al. Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res.* 2008 May 1;78(2):333-40.
- [262] Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol.* 2008 Jan 1;180(1):569-79.
- [263] Egami K, Murohara T, Aoki M, et al. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. *J Leukoc Biol.* 2006 May;79(5):971-6.
- [264] Kapadia SR, Oral H, Lee J, et al. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res.* 1997 Aug;81(2):187-95.
- [265] Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science.* 1996 Nov 1;274(5288):782-4.
- [266] Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, et al. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood.* 2004 Oct 1;104(7):2084-6.
- [267] Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004 Feb 6;94(2):230-8.
- [268] Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):261-2.
- [269] Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001 May 7;193(9):1005-14.
- [270] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002 Nov 26;106(22):2781-6.
- [271] Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, et al. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res.* 2007 Mar 2;100(4):581-9.
- [272] You D, Waeckel L, Ebrahimian TG, et al. Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy. *Circulation.* 2006 Jul 25;114(4):328-38.
- [273] Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Nov;39(5):733-42.
- [274] Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003 Mar 4;107(8):1164-9.
- [275] Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med.* 2006 May;12(5):557-67.
- [276] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):175-89.
- [277] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):288-93.
- [278] Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003 Nov 18;108(20):2511-6.
- [279] Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Dec;283(6):H2411-9.
- [280] Stabile E, Burnett MS, Watkins C, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation.* 2003 Jul 15;108(2):205-10.
- [281] Couffinhal T, Silver M, Kearney M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation.* 1999 Jun 22;99(24):3188-98.
- [282] Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, et al. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4<sup>+</sup> mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation.* 2006 Jan 3;113(1):118-24.

- [283] van Weel V, Toes RE, Seghers L, et al. Natural killer cells and CD4+ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Nov;27(11):2310-8.
- [284] Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation.* 2002 Oct 8;106(15):2019-25.
- [285] Ebrahimian TG, Heymes C, You D, et al. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol.* 2006 Aug;169(2):719-28.
- [286] Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, et al. Neutrophils are primary source of O<sub>2</sub> radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Jun;280(6):H2649-57.
- [287] Golino P, Ragni M, Cirillo P, et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med.* 1996 Jan;2(1):35-40.
- [288] Harlan JM, Killen PD, Harker LA, et al. Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro mechanisms of cell detachment. *J Clin Invest.* 1981 Dec;68(6):1394-403.
- [289] May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):s5-10.
- [290] Nierodzik ML, Karparkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* 2006 Nov;10(5):355-62.
- [291] De Paula EV, Nascimento MC, Ramos CD, et al. Early in vivo anticoagulation inhibits the angiogenic response following hindlimb ischemia in a rodent model. *Thromb Haemost.* 2006 Jul;96(1):68-72.
- [292] Caunt M, Hu L, Tang T, et al. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):4125-32.
- [293] Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med.* 2006 May 15;203(5):1221-33.
- [294] Langer H, May AE, Daub K, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res.* 2006 Feb 3;98(2):e2-10.
- [295] Smadja DM, Bieche I, Uzan G, et al. PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Nov;25(11):2321-7.
- [296] Ito WD, Arras M, Winkler B, et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997 Jun;80(6):829-37.
- [297] Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, et al. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther.* 1991;51(2):195-216.
- [298] Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, et al. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation.* 2005 Jun 7;111(22):2935-42.
- [299] van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):716-28.
- [300] Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, et al. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol.* 2005 May 23;169(4):681-91.
- [301] Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res.* 2000 Sep 15;87(6):448-52.
- [302] Silvestre JS, Mallat Z, Tamarat R, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res.* 2001 Aug 3;89(3):259-64.
- [303] Heymans S, Lutun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med.* 1999 Oct;5(10):1135-42.
- [304] Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, et al. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res.* 2004 Feb 6;94(2):262-8.
- [305] Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med.* 2000 Jan;6(1):49-55.
- [306] Gao Y, Lecker S, Post MJ, et al. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(3):439-48.

- [307] Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, et al. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Nov;26(11):2483-9.
- [308] Lutun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):831-40.
- [309] Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N, et al. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension.* 2002 Mar 1;39(3):830-5.
- [310] Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, et al. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest.* 2002 Jun;82(6):747-56.
- [311] Silvestre JS, Tamarat R, Senbonmatsu T, et al. Antiangiogenic effect of angiotensin II type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res.* 2002 May 31;90(10):1072-9.
- [312] Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, et al. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(5):603-11.
- [313] Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994 Feb;93(2):662-70.
- [314] Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg.* 1994 Jan-Feb;7(1):49-60.
- [315] Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation.* 1994 Nov;90(5 Pt 2):II228-34.
- [316] Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation.* 1995 Nov 1;92(9 Suppl):II365-71.
- [317] Kyriakides ZS, Petinakis P, Kaklamanis L, et al. Intramuscular administration of estrogen may promote angiogenesis and perfusion in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Cardiovasc Res.* 2001 Feb 16;49(3):626-33.
- [318] Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Karayannakos P. Estrogen stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle in rabbits. *Circulation.* 2001 May 29;103(21):E107-8.
- [319] Gowdak LH, Poliakova L, Wang X, et al. Adenovirus-mediated VEGF(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation.* 2000 Aug 1;102(5):565-71.
- [320] Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002 Dec 3;106(23):2881-3.
- [321] Qvigstad E, Sjaastad I, Brattelid T, et al. Dual serotonergic regulation of ventricular contractile force through 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors induced in the acute failing heart. *Circ Res.* 2005 Aug 5;97(3):268-76.
- [322] Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, et al. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 2):H2383-90.
- [323] Day SB, Johnson JA. The distribution of the coronary arteries of the rabbit. *Anat Rec.* 1958 Dec;132(4):633-43.
- [324] Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A<sub>2b</sub> receptor cascade. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):308-14.
- [325] Krenz M, Baines CP, Yang XM, et al. Acute ethanol exposure fails to elicit preconditioning-like protection in in situ rabbit hearts because of its continued presence during ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Feb;37(2):601-7.
- [326] Tsuchida A, Thompson R, Olsson RA, et al. The anti-infarct effect of an adenosine A<sub>1</sub>-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1994 Mar;26(3):303-11.
- [327] Ελαιόπουλος Δ ΜΜ ΝΔ, Χατζηστέργος Κ, et al. Σύγκριση πέντε πειραματικών προτύπων χρονίου εμφράγματος του μυοκαρδίου σε επίμυες. *In 24ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιολογίας.* Ρόδος 2003: Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση; 2003. p. 23.
- [328] Baltogiannis GG, Tsalikakis DG, Mitsi AC, et al. Endothelin receptor--a blockade decreases ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 2005 Sep 1;67(4):647-54.

- [329] Selye H, Bajusz E, Grasso S, et al. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960 Oct;11:398-407.
- [330] Hu K, Gaudron P, Anders HJ, et al. Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor subtype blockade in rats with myocardial infarction: role of bradykinin. *Cardiovasc Res*. 1998 Aug;39(2):401-12.
- [331] Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.
- [332] Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*. 1981 May;101(5):593-600.
- [333] Nachlas MM, Shnitka TK. Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol*. 1963 Apr;42:379-405.
- [334] Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*. 1985 Dec;121(3):522-30.
- [335] Hearse DJ, Sutherland FJ. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res*. 2000 Jun;41(6):597-603.
- [336] Hill AJ, Laske TG, Coles JA, Jr., et al. In vitro studies of human hearts. *Ann Thorac Surg*. 2005 Jan;79(1):168-77.
- [337] Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*. 2000 Jun;41(6):613-27.
- [338] Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, et al. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):121-35.
- [339] Ytrehus K. The ischemic heart--experimental models. *Pharmacol Res*. 2000 Sep;42(3):193-203.
- [340] Curtis MJ. Characterisation, utilisation and clinical relevance of isolated perfused heart models of ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1998 Jul;39(1):194-215.
- [341] Rees SA, Curtis MJ. Specific IK1 blockade: a new antiarrhythmic mechanism? Effect of RP58866 on ventricular arrhythmias in rat, rabbit, and primate. *Circulation*. 1993 Jun;87(6):1979-89.
- [342] Rees SA, Curtis MJ. Selective IK blockade as an antiarrhythmic mechanism: effects of UK66,914 on ischaemia and reperfusion arrhythmias in rat and rabbit hearts. *Br J Pharmacol*. 1993 Jan;108(1):139-45.
- [343] Langendorff O. Untersuchungen am ueberlebenden Saeugertierherzen. *Pfluegers Archiv*. 1898(61):291-332.
- [344] Doring HJ, Dehnert H. The isolated perfused heart according to Langendorff. BVM-Biomesstechnik Verlag. 1987.
- [345] Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, et al. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 Nov;30(11):867-78.
- [346] Curtis MJ, Macleod BA, Tabrizchi R, et al. An improved perfusion apparatus for small animal hearts. *J Pharmacol Methods*. 1986 Feb;15(1):87-94.
- [347] Mourouzis I, Dimopoulos A, Saranteas T, et al. Ischemic preconditioning fails to confer additional protection against ischemia-reperfusion injury in the hypothyroid rat heart. *Physiol Res*. 2009;58(1):29-38.
- [348] Pantos C, Malliopoulou V, Mourouzis I, et al. Thyroxine pretreatment increases basal myocardial heat-shock protein 27 expression and accelerates translocation and phosphorylation of this protein upon ischaemia. *Eur J Pharmacol*. 2003 Sep 30;478(1):53-60.
- [349] Pantos C, Malliopoulou V, Mourouzis I, et al. Hyperthyroid hearts display a phenotype of cardioprotection against ischemic stress: a possible involvement of heat shock protein 70. *Horm Metab Res*. 2006 May;38(5):308-13.
- [350] Shattock MJ, Bray DG, Waldron CB. An electronic feed-back circuit to control a peristaltic pump for constant-pressure perfusion of isolated hearts or other organs. *J Physiol*. 1997;505:4P.
- [351] Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*. 1932;210:33-6.
- [352] Manning AS, Hearse DJ, Dennis SC, et al. Myocardial ischaemia: an isolated, globally perfused rat heart model for metabolic and pharmacological studies. *Eur J Cardiol*. 1980 Jan;11(1):1-21.

- [353] Valentin JP, Hoffmann P, De Clerck F, et al. Review of the predictive value of the Langendorff heart model (Screenit system) in assessing the proarrhythmic potential of drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004 May-Jun;49(3):171-81.
- [354] Stern MD, Chien AM, Capogrossi MC, et al. Direct observation of the "oxygen paradox" in single rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1985 Jun;56(6):899-903.
- [355] Tani M, Hasegawa H, Suganuma Y, et al. Protection of ischemic myocardium by inhibition of contracture in isolated rat heart. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2515-9.
- [356] Torrance SM, Belanger MP, Wallen WJ, et al. Metabolic and functional response of neonatal pig hearts to the development of ischemic contracture: is recovery possible? *Pediatr Res*. 2000 Aug;48(2):191-9.
- [357] Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, et al. Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*. 1987 Jun 1;244(2):381-5.
- [358] Lipasti JA, Alanen KA, Eskola JU, et al. Ischaemic contracture in isolated rat heart: reversible or irreversible myocardial injury? *Exp Pathol*. 1985;28(2):89-95.
- [359] Ely SW, Mentzer RM, Jr., Lasley RD, et al. Functional and metabolic evidence of enhanced myocardial tolerance to ischemia and reperfusion with adenosine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985 Oct;90(4):549-56.
- [360] Lasley RD, Rhee JW, Van Wylen DG, et al. Adenosine A1 receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1990 Jan;22(1):39-47.
- [361] Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RM, Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res*. 1993 Apr;27(4):565-70.
- [362] Lasley RD, Mentzer RM, Jr. Pertussis toxin blocks adenosine A1 receptor mediated protection of the ischemic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1993 Jul;25(7):815-21.
- [363] Fralix TA, Murphy E, London RE, et al. Protective effects of adenosine in the perfused rat heart: changes in metabolism and intracellular ion homeostasis. *Am J Physiol*. 1993 Apr;264(4 Pt 1):C986-94.
- [364] Finegan BA, Lopaschuk GD, Gandhi M, et al. Inhibition of glycolysis and enhanced mechanical function of working rat hearts as a result of adenosine A1 receptor stimulation during reperfusion following ischaemia. *Br J Pharmacol*. 1996 May;118(2):355-63.
- [365] Janier MF, Vanoverschelde JL, Bergmann SR. Adenosine protects ischemic and reperfused myocardium by receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol*. 1993 Jan;264(1 Pt 2):H163-70.
- [366] Matherne GP, Linden J, Byford AM, et al. Transgenic A1 adenosine receptor overexpression increases myocardial resistance to ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6541-6.
- [367] Cross HR, Opie LH, Radda GK, et al. Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved. *Circ Res*. 1996 Mar;78(3):482-91.
- [368] Kolocassides KG, Seymour AM, Galinanes M, et al. Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 May;28(5):1045-57.
- [369] Avkiran M, Curtis MJ. Independent dual perfusion of left and right coronary arteries in isolated rat hearts. *Am J Physiol*. 1991 Dec;261(6 Pt 2):H2082-90.
- [370] Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, et al. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res*. 2000 Aug 4;87(3):207-13.
- [371] Reichelt ME, Willems L, Peart JN, et al. Modulation of ischaemic contracture in mouse hearts: a 'supraphysiological' response to adenosine. *Exp Physiol*. 2007 Jan;92(1):175-85.
- [372] Varnavas VC, Paraskevas KI, Iliodromitis EK, et al. Chronic hind limb ischemia reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in the rabbit heart by promoting coronary angiogenesis/arteriogenesis. *In Vivo*. 2010 Mar-Apr;24(2):147-52.
- [373] Tsovolas K, Iliodromitis EK, Andreadou I, et al. Acute administration of vitamin C abrogates protection from ischemic preconditioning in rabbits. *Pharmacol Res*. 2008 Apr;57(4):283-9.
- [374] Iliodromitis EK, Andreadou I, Prokavas E, et al. Simvastatin in contrast to postconditioning reduces infarct size in hyperlipidemic rabbits: possible role of oxidative/nitrosative stress attenuation. *Basic Res Cardiol*. 2010 Mar;105(2):193-203.
- [375] Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(5):629-37.



- [376] Iliodromitis EK, Downey JM, Heusch G, et al. What is the optimal postconditioning algorithm? *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2009 Dec;14(4):269-73.
- [377] Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK, et al. Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol.* 2009 Sep;104(5):469-83.
- [378] Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci.* 1999 Jun;14:121-5.
- [379] Faintuch BL, Teodoro R, Oliveira EA, et al. Neovascularization after ischemic injury: evaluation with (m)Tc-HYNIC-RGD. *Acta Cir Bras.* Feb;26(1):58-63.
- [380] Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension.* 1999 Jun;33(6):1379-84.
- [381] Takeshita S, Isner JM. Peripheral Angiogenesis: Therapeutic Angiogenesis for Peripheral Vascular Occlusive Disease. *Curr Interv Cardiol Rep.* 1999 Jul;1(2):147-56.
- [382] Takeshita S, Isshiki T, Mori H, et al. Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc Res.* 1997 Sep;35(3):547-52.
- [383] Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol.* 1995 Dec;147(6):1649-60.
- [384] Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Oct 14;227(2):628-35.
- [385] Ueno H, Li JJ, Masuda S, et al. Adenovirus-mediated expression of the secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF-2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):2453-60.
- [386] Kyriakides ZS, Petinakis P, Kaklamanis L, et al. Gender does not influence angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. *Int J Cardiol.* 2003 Nov;92(1):83-91.
- [387] Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet.* 2010 Feb 27;375(9716):727-34.
- [388] Chen YS, Chien CT, Ma MC, et al. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res.* 2005 Jun 1;126(1):92-101.
- [389] Li G, Labruto F, Sirsjo A, et al. Myocardial protection by remote preconditioning: the role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 Nov;26(5):968-73.
- [390] Li L, Luo W, Huang L, et al. Remote preconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: a randomized controlled trial. *J Surg Res.* 2010 Nov;164(1):e21-6.
- [391] Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol.* 2010 Sep;105(5):657-64.
- [392] Verdouw PD, Gho BC, Koning MM, et al. Cardioprotection by ischemic and nonischemic myocardial stress and ischemia in remote organs. Implications for the concept of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Sep 30;793:27-42.
- [393] Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jul;283(1):H284-95.
- [394] Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, et al. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Sep 30;1606(1-3):1-21.
- [395] Garlid KD, Puddu PE, Pasdois P, et al. Inhibition of cardiac contractility by 5-hydroxydecanoate and tetraphenylphosphonium ion: a possible role of mitoKATP in response to inotropic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jul;291(1):H152-60.
- [396] Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 May;33(5):947-56.

- [397] Quinlan CL, Costa AD, Costa CL, et al. Conditioning the heart induces formation of signalosomes that interact with mitochondria to open mitoKATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Sep;295(3):H953-H61.
- [398] Baines CP, Cohen MV, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999 May;10(5):741-54.
- [399] Cao Z, Liu L, Van Winkle DM. Activation of delta- and kappa-opioid receptors by opioid peptides protects cardiomyocytes via KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H1032-9.
- [400] Crestanello JA, Doliba NM, Babsky AM, et al. Opening of potassium channels protects mitochondrial function from calcium overload. *J Surg Res*. 2000 Dec;94(2):116-23.
- [401] da Silva MM, Sartori A, Belisle E, et al. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, and enhances K<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jul;285(1):H154-62.
- [402] Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, et al. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jan;278(1):H305-12.
- [403] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):372-85.
- [404] Hassouna A, Matata BM, Galinanes M. PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Nov;287(5):C1418-25.
- [405] Huh J, Gross GJ, Nagase H, et al. Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jan;280(1):H377-83.
- [406] Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*. 1998 Jun 23;97(24):2463-9.
- [407] Maack C, Dabew ER, Hohl M, et al. Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning. *Circ Res*. 2009 Oct 9;105(8):811-7.
- [408] Nozawa Y, Miura T, Miki T, et al. Mitochondrial KATP channel-dependent and -independent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat. *Basic Res Cardiol*. 2003 Feb;98(1):50-8.
- [409] O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*. 2004 Mar 5;94(4):420-32.
- [410] Patel HH, Gross ER, Peart JN, et al. Sarcolemmal KATP channel triggers delayed ischemic preconditioning in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jan;288(1):H445-7.
- [411] Peart JN, Gross GJ. Sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels and myocardial ischemic preconditioning. *J Cell Mol Med*. 2002 Oct-Dec;6(4):453-64.
- [412] Shinmura K, Tamaki K, Sato T, et al. Prostacyclin attenuates oxidative damage of myocytes by opening mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels via the EP3 receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 May;288(5):H2093-101.
- [413] Shinohara T, Takahashi N, Kohno H, et al. Mitochondria are targets for geranylgeranylacetone-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1892-9.
- [414] Tani M, Honma Y, Hasegawa H, et al. Direct activation of mitochondrial K(ATP) channels mimics preconditioning but protein kinase C activation is less effective in middle-aged rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2001 Jan;49(1):56-68.
- [415] Tsuchida A, Miura T, Tanno M, et al. Infarct size limitation by nicorandil: roles of mitochondrial K(ATP) channels, sarcolemmal K(ATP) channels, and protein kinase C. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 16;40(8):1523-30.
- [416] Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 May;280(5):H2321-8.
- [417] Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res*. 1999 Oct 15;85(8):731-41.

- [418] Wang Y, Takashi E, Xu M, et al. Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K(ATP) channels by diazoxide. *Circulation*. 2001 Jul 3;104(1):85-90.
- [419] Wang YP, Maeta H, Mizoguchi K, et al. Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K(ATP) channel. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 15;55(3):576-82.
- [420] Xu M, Wang Y, Ayub A, et al. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H1295-303.
- [421] Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel subunits on the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. *J Histochem Cytochem*. 2005 Dec;53(12):1491-500.
- [422] Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999 Apr 2;84(6):695-703.
- [423] Baker CS, Dutka DP, Pagano D, et al. Immunocytochemical evidence for inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression with nitrotyrosine formation in human hibernating myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2002 Sep;97(5):409-15.
- [424] Akita Y, Otani H, Matsuhisa S, et al. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2051-9.
- [425] Baker CS, Rimoldi O, Camici PG, et al. Repetitive myocardial stunning in pigs is associated with the increased expression of inducible and constitutive nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):685-97.
- [426] Bulhak AA, Sjoquist PO, Xu CB, et al. Protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury by PPAR-alpha activation is related to production of nitric oxide and endothelin-1. *Basic Res Cardiol*. 2006 May;101(3):244-52.
- [427] Chen CH, Chuang JH, Liu K, et al. Nitric oxide triggers delayed anesthetic preconditioning-induced cardiac protection via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of inducible nitric oxide synthase. *Shock*. 2008 Sep;30(3):241-9.
- [428] Cuong DV, Kim N, Youm JB, et al. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 May;290(5):H1808-17.
- [429] Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*. 2008 Apr;60(4):199-203.
- [430] Gok S, Vatansever S, Vural K, et al. The role of ATP sensitive K<sup>+</sup> channels and of nitric oxide synthase on myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis. *Acta Histochem*. 2006;108(2):95-104.
- [431] Guo Y, Stein AB, Wu WJ, et al. Late preconditioning induced by NO donors, adenosine A1 receptor agonists, and delta1-opioid receptor agonists is mediated by iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Nov;289(5):H2251-7.
- [432] Heinzl FR, Gres P, Boengler K, et al. Inducible nitric oxide synthase expression and cardiomyocyte dysfunction during sustained moderate ischemia in pigs. *Circ Res*. 2008 Nov 7;103(10):1120-7.
- [433] Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun;282(6):H1996-2003.
- [434] Jones WK, Flaherty MP, Tang XL, et al. Ischemic preconditioning increases iNOS transcript levels in conscious rabbits via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Aug;31(8):1469-81.
- [435] Kanno S, Lee PC, Zhang Y, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000 Jun 13;101(23):2742-8.
- [436] Laude K, Favre J, Thuillez C, et al. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jun;284(6):H2053-60.
- [437] Obasanjo-Blackshire K, Mesquita R, Jabr RI, et al. Calcineurin regulates NFAT-dependent iNOS expression and protection of cardiomyocytes: co-operation with Src tyrosine kinase. *Cardiovasc Res*. 2006 Sep 1;71(4):672-83.
- [438] Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Aug;11(8):1913-28.

- [439] Paz Y, Frolkis I, Pevni D, et al. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on endothelial and inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression and nitric oxide synthesis in ischemic and nonischemic isolated rat heart. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Oct 1;42(7):1299-305.
- [440] Rui T, Cepinskas G, Feng Q, et al. Delayed preconditioning in cardiac myocytes with respect to development of a proinflammatory phenotype: role of SOD and NOS. *Cardiovasc Res*. 2003 Oct 1;59(4):901-11.
- [441] Wang XL, Liu HR, Tao L, et al. Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis*. 2007 Jul;12(7):1209-17.
- [442] Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, et al. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):698-711.
- [443] Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, et al. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF- $\kappa$ B and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *Faseb J*. 2002 Mar;16(3):327-42.
- [444] Pasdois P, Quinlan CL, Rissa A, et al. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1470-8.
- [445] Arad M, de Jong JW, de Jonge R, et al. Preconditioning in globally ischemic isolated rat hearts: effect on function and metabolic indices of myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Dec;28(12):2479-90.
- [446] Armstrong S, Ganote CE. In vitro ischaemic preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of selective adenosine receptor blockade and calphostin C. *Cardiovasc Res*. 1995 May;29(5):647-52.
- [447] Cerniway RJ, Morrison RR, Byford AM, et al. A1 adenosine receptor overexpression decreases stunning from anoxia-reoxygenation: role of the mitochondrial K(ATP) channel. *Basic Res Cardiol*. 2002 May;97(3):232-8.
- [448] Ganote CE, Armstrong S, Downey JM. Adenosine and A1 selective agonists offer minimal protection against ischaemic injury to isolated rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 1993 Sep;27(9):1670-6.
- [449] Hwang H, Arcidi JM, Jr., Hale SL, et al. Ranolazine as an adjunct to cardioplegia: a potential new therapeutic application. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2009 Jun;14(2):125-33.
- [450] King LM, Boucher F, Opie LH. Coronary flow and glucose delivery as determinants of contracture in the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Jan;27(1):701-20.
- [451] King LM, Opie LH. Does preconditioning act by glycogen depletion in the isolated rat heart? *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Dec;28(12):2305-21.
- [452] Kolocassides KG, Galinanes M, Hearse DJ. Dichotomy of ischemic preconditioning: improved postischemic contractile function despite intensification of ischemic contracture. *Circulation*. 1996 May 1;93(9):1725-33.
- [453] Peart J, Flood A, Linden J, et al. Adenosine-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002 Jan;39(1):117-29.
- [454] Peart J, Matherne GP, Cerniway RJ, et al. Cardioprotection with adenosine metabolism inhibitors in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovasc Res*. 2001 Oct;52(1):120-9.
- [455] Garlid KD. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart—what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol*. 2000 Aug;95(4):275-9.
- [456] Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, et al. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Feb;280(2):H649-57.
- [457] Piper HM, Siegmund B, Ladilov Yu V, et al. Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*. 1993 Sep-Oct;88(5):471-82.
- [458] Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):334-41.
- [459] Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, et al. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res*. 2007 Dec 7;101(12):1310-8.
- [460] Ouchi N, Asami Y, Ohashi K, et al. DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *J Biol Chem*. 2010 Mar 5;285(10):7127-34.

- [461] Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, et al. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2008 Nov 21;283(47):32802-11.
- [462] Oshima Y, Ouchi N, Sato K, et al. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation*. 2008 Jun 17;117(24):3099-108.
- [463] Pedersen BK, Akerstrom TC, Nielsen AR, et al. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*. 2007 Sep;103(3):1093-8.