

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΡΔΙΑΣ-ΑΓΓΕΙΩΝ-ΘΩΡΑΚΑ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΤΣΙΛΙΜΙΓΚΑΣ**

**ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΤΟΠΙΝ
ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΑΛΛΟΥ
ΟΡΓΑΝΟΥ**

**ΧΡΗΣΤΟΣ Γ. ΒΟΥΧΑΡΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΘΩΡΑΚΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Τσιλιμίγκας *Καθηγητής Χειρουργικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα*

Φίλιππος Τρυποσκιιάδης *Καθηγητής Καρδιολογίας*

Αντιγόνη Λάζου *Καθηγήτρια Βιολογίας*

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Νικόλαος Τσιλιμίγκας *Καθηγητής Χειρουργικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα*

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Τσιλιμίγκας *Καθηγητής Χειρουργικής Καρδιάς-Αγγείων-Θώρακα*

Φίλιππος Τρυποσκιιάδης *Καθηγητής Καρδιολογίας*

Αντιγόνη Λάζου *Καθηγήτρια Βιολογίας*

Ιωάννης Σκουλαρίγκης *Αν. Καθηγητής Καρδιολογίας*

Γεώργιος Βρετζάκης *Αν. Καθηγητής Αναισθησιολογίας*

Ισαάκ Αηδονίδης *Επίκ. Καθηγητής Φυσιολογίας*

Ζωή Νταϊλιάνα *Επίκ. Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής*

στους λατρευτούς μου γονείς

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΩΝ ΟΡΩΝ	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	14
2. ΙΣΧΑΙΜΙΑ – ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ.....	17
3. ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	18
3.1. Μηχανισμοί που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ισχαιμικής προετοιμασίας..	20
4. ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΑΛΛΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ.....	21
4.1 Κλινική εφαρμογή.....	23
4.2 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης.....	25
4.2.1 Ενδείξεις υπέρ ενός ενδεχόμενου νευρικού μηχανισμού.....	27
4.2.2. Ενδείξεις υπέρ ενός ενδεχόμενου χυμικού μηχανισμού.....	29
4.2.3. Ενδείξεις υπέρ ενδεχόμενης συστηματικής αντίδρασης.....	30
4.2.4. Ενδείξεις υπέρ ενός ιδιαίτερου μηχανισμού (ενεργοποίηση κινασών MAPKs μέσα στο απομακρυσμένο όργανο).....	31
4.2.5. Μηχανισμοί προστασίας στην αΑ-ΙΠ στο επίπεδο του μυοκαρδιακού κυττάρου.....	31
4.2.6. Συνδυασμός μηχανισμών.....	33
5. ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ.....	33
5.1. Μοντέλα πειραματόζωων για τη μελέτη του υπερτροφικού μυοκαρδίου.....	35
5.2. Υπερτροφία καρδιάς και στεφανιαία κυκλοφορία.....	37
5.3. Πειραματική ισχαιμία/επαναιμάτωση σε υπερτροφία αριστερής κοιλίας.....	37
5.4. Υπερτροφία της καρδιάς και ισχαιμική προετοιμασία.....	37
6. ΜΟΝΤΕΛΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ.....	38
6.1. In situ μοντέλο εμποτιζόμενης καρδιάς.....	38
6.2. In vitro απομονωμένη, εμποτιζόμενη καρδιά.....	38
6.2.1. Το πειραματικό μοντέλο Langendorff.....	38
6.2.2 Το πειραματικό μοντέλο της λειτουργικής καρδιάς.....	39
6.3. Απομονωμένα, εμβαπτιζόμενα σε θρεπτικό διάλυμα δείγματα καρδιακού ιστού.....	40

6.4. Καλλιέργειες καρδιακών μυοκυττάρων.....	40
6.5. Απομονωμένα καρδιακά κύτταρα.....	40
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	66
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	68
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY).....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένα ή περισσότερα σύντομα επεισόδια ισχαιμίας – επαναιμάτωσης που δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν μη αναστρέψιμες βλάβες προστατεύουν το μυοκάρδιο από τις επιπτώσεις ενός επακόλουθου παρατεταμένου ισχαιμικού επεισοδίου.

Το φαινόμενο αυτό είχε παρατηρηθεί εδώ και πολλά χρόνια, καθώς ήταν γνωστό ότι ασθενείς που έπασχαν από στεφανιαία νόσο ήταν πιο ανθεκτικοί σε εμφάνιση στηθάγχης στην κόπωση κατά την πρόοδο της ημέρας μετά από ποικίλες δραστηριότητες, παρά νωρίς το πρωί. Ο Murry και οι συνεργάτες του απέδειξαν πρώτοι πειραματικά το φαινόμενο, που αποκαλείται **ισχαιμική προετοιμασία** (ischemic preconditioning) της καρδιάς και το δημοσίευσαν το 1986. Στα ελληνικά έχει προταθεί και ο όρος **προγύμναση για την ισχαιμία** για την περιγραφή του φαινομένου. Εναλλακτικά η προετοιμασία του μυοκαρδίου μπορεί να επιτευχθεί με **πρόκληση ισχαιμίας άλλου οργάνου ή ιστού** (remote ή at a distance ischemic preconditioning), ελαττώνοντας έτσι τον κίνδυνο για βλαπτική επίδραση στην ίδια την καρδιά από την προετοιμασία της, ιδέα που προτάθηκε αρχικά από τον Przyklenk και συν. το 1993. Πιο πρόσφατη (Zhao και συν., 2003) είναι η επινόηση να διακόπτει κανείς περιοδικά και για μικρό διάστημα την επαναιμάτωση του αποφραγμένου αγγείου πετυχαίνοντας έτσι **προστασία του μυοκαρδίου μετά** την πρόκληση -και όχι προληπτικά πριν την εμφάνιση- της ισχαιμίας (ischemic postconditioning). Εάν, όσο διαρκεί η καρδιακή ισχαιμία, προκαλείται ισχαιμία άλλου οργάνου ή ιστού, τότε μιλάμε για την **προστασία του μυοκαρδίου κατά** την ισχαιμία (ischemic perconditioning) (Schmidt και συν 2007).

Οι μέθοδοι που προαναφέρθηκαν έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μοντέλα πειραματόζωων, ενώ αρχίζουν να εφαρμόζονται και σε κλινικές μελέτες στον άνθρωπο. Καθώς η στεφανιαία νόσος εξακολουθεί να παραμένει η κύρια αιτία θανάτου και νοσηρότητας στον πλανήτη μας, η ελπίδα έχει στραφεί και σε αυτές τις στρατηγικές, που έχουν σκοπό να περιορίσουν την βλαπτική επίδραση της ισχαιμίας στο μυοκάρδιο (έκταση εμφράγματος, εμφάνιση αρρυθμιών, λειτουργικότητα αριστερής κοιλίας, αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας) και να βελτιώσουν την κλινική έκβαση των στεφανιαίων ασθενών. Οι στρατηγικές αυτές έρχονται να συμπληρώσουν –αν και σε πειραματικό, δοκιμαστικό ακόμη στάδιο- την πρόληψη, την φαρμακευτική θεραπεία, την θρομβόλυση, την επεμβατική διαδερμική

αγγειοπλαστική και την χειρουργική αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου. Πλήθος άλλων καρδιολογικών προβλημάτων που χρειάζονται χειρουργική αντιμετώπιση (βαλβιδοπάθειες, συγγενείς καρδιοπάθειες, παθήσεις της αορτής) προϋποθέτουν ισχαιμική επιβάρυνση της καρδιάς κατά την καρδιοπληγική της παύση στη διάρκεια της εγχείρησης.

Η ιδέα της προστασίας της καρδιάς από την ισχαιμία/επαναιμάτωση με πρόκληση ισχαιμίας άλλου οργάνου, λιγότερο ευαίσθητου σ' αυτή τη δοκιμασία, έχει επεκταθεί και στην προστασία διάφορων οργάνων και ιστών, όπως ο εγκέφαλος, οι νεφροί, το ήπαρ, το ενδοθήλιο αγγείων, οι όρχεις, δερματικοί και μυϊκοί κρημνοί, το έντερο, το στομάχι και οι πνεύμονες. Μάλιστα η έρευνα έχει προχωρήσει στην πρόταση πιθανών μηχανισμών δράσης του φαινομένου της από απόσταση προετοιμασίας οργάνων για να ανεχθούν την ισχαιμία/επαναιμάτωση, την πρόταση ή τον αποκλεισμό πιθανών διαβιβαστικών στην διαδικασία ουσιών καθώς και τον ενδοκυττάριο τρόπο δράσης στα όργανα στόχους.

Σκοπός της δικής μας εργασίας είναι η τεκμηρίωση της αποτελεσματικότητας του φαινομένου της προετοιμασίας του μυοκαρδίου με παροδική ισχαιμία άλλου πλην της καρδιάς οργάνου (κάτω άκρο), και μάλιστα χωριστά σε φυσιολογικό και σε υπερτροφικό μυοκάρδιο, μελετώντας απομονωμένες καρδιές αρουραίων. Η μελέτη σε υπερτροφικό μυοκάρδιο γίνεται για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία (Voucharas και συν, J Cardiothorac Surg Mar 2011). Επίσης καθώς έχουν προταθεί σε διάφορες έρευνες διαφορετικές χρονικές περίοδοι και πρωτόκολλα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης έχει σημασία η προσοχή να στρέφεται σε κάθε πρωτόκολλο χωριστά. Τέλος, υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες τόσο για την αποτελεσματικότητα της ισχαιμικής προετοιμασίας από απόσταση (αΑ-ΙΠ) όσο και για την εφαρμογή της ισχαιμικής προετοιμασίας (ΙΠ) στο υπερτροφικό μυοκάρδιο.

Ο πειραματισμός σε μοντέλο καθολικής ισχαιμίας της καρδιάς προσομοιάζει με τις συνθήκες καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων στον άνθρωπο. Έτσι τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να έχουν κλινική εφαρμογή σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις στον άνθρωπο, χωρίς μάλιστα να είναι αναγκαίο να υποβληθεί η ίδια η καρδιά στον κίνδυνο παροδικής ισχαιμίας.

Για το σκοπό της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες καρδιές (μέθοδος Langendorff, εμποτισμός με διάλυμα Krebs) ενήλικων αρουραίων (επίμυων) της

φυλής Wistar, οι οποίοι χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες από 7 πειραματόζωα η κάθε μία: ζώα με φυσιολογικό και με υπερτροφικό μυοκάρδιο που υποβλήθηκαν σε προετοιμασία της καρδιάς με παροδική ισχαιμία άλλου οργάνου (αο-ΙΠ = αΑ-ΙΠ) και οι αντίστοιχες ομάδες ελέγχου χωρίς ισχαιμική προετοιμασία (ΙΠ).

Η ισχαιμία περιφερικού οργάνου (κάτω άκρο) επιτεύχθηκε με παρασκευή και αποκλεισμό της μηριαίας αρτηρίας για 20 λεπτά, ενώ του μυοκαρδίου με πλήρη διακοπή για 30 λεπτά της ροής του διαλύματος εμποτισμού προς την απομονωμένη και διασωληνωμένη από την αορτή καρδιά, η οποία έτσι στερείται των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων και του οξυγόνου, που χρειάζεται για τη φυσιολογική της λειτουργία.

Οι επιπτώσεις στο μυοκάρδιο μετά την καθολική ισχαιμία της απομονωμένης καρδιάς εκτιμήθηκε με παρακολούθηση του ηλεκτροκαρδιογραφήματος και της πίεσης (συστολικής και διαστολικής) της αριστερής κοιλίας κατά την περίοδο του επανεμποτισμού. Η πρόκληση υπερτροφίας στο μυοκάρδιο των πειραματόζωων έγινε με πρόκληση αρτηριακής υπέρτασης επί ένα μήνα, με χορήγηση αλατοκορτικοειδούς και χλωριούχου νατρίου. Η μέθοδος πρόκλησης υπερτροφίας στο μυοκάρδιο των αρουραίων αποτελεί παγκόσμια πρωτοτυπία (Voucharas και συν, έγινε δεκτό για δημοσίευση στο *Angiology* Aug 2011), καθώς έγινε για πρώτη φορά με χορήγηση από το στόμα, με δική μας τεχνική που εξασφαλίζει μέτρια υπερτροφία χωρίς καρδιακή ανεπάρκεια. Η χορηγούμενη δοσολογία δίνεται με ακρίβεια, ενώ αποφεύγονται οι επιπλοκές από την παρεντερική χορήγηση κορτικοειδούς. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από πειραματόζωα του ίδιου κλώνου.

Η προστασία της καρδιάς με πρόκληση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης άλλου οργάνου (ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση - απομακρυσμένου οργάνου) αποτελεί μέθοδο **ασφαλή** και **ανέξοδη** σε ένα πλήθος ιατρικών καταστάσεων και πράξεων. Μυοκαρδιακή βλάβη (από αναστρέψιμη ισχαιμία ή αποπληξία έως νέκρωση μεγάλου ποσοστού του καρδιακού μυός), συμβαίνει συχνά και πολλές φορές αναπόφευκτα κατά τη διάρκεια μεγάλου αριθμού καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων (για στεφανιαία νόσο, βαλβιδοπάθειες, ανευρύσματα αορτής, συγγενείς καρδιοπάθειες), σε διαδερμική αγγειοπλαστική στεφανιαίων αρτηριών, αλλά και σε επεμβάσεις γενικής χειρουργικής. Ασθενείς με διαλείπουσα χωλότητα ή με επαναλαμβανόμενα επεισόδια ισχαιμίας – στηθάγχης έχουν μεγαλύτερο παράθυρο για θρομβολυτική θεραπεία μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η παροδική ισχαιμία άλλου οργάνου, εκτός της

καρδιάς, δίνει την δυνατότητα να μην υποβληθεί η ίδια η καρδιά στον κίνδυνο παροδικής ισχαιμίας. Επιπλέον, το υπερτροφικό μυοκάρδιο συναντάται συχνά σε πολλές φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (άθληση, εγκυμοσύνη, αρτηριακή υπέρταση, βαλβιδοπάθειες ή μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου).

Η παρούσα διατριβή αποτελείται από δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Το γενικό μέρος πραγματεύεται τα κεφάλαια: Ισχαιμία μυοκαρδίου, Επίπτωση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, Ισχαιμική προετοιμασία μυοκαρδίου, Ισχαιμική προετοιμασία μυοκαρδίου με πρόκληση ισχαιμίας άλλου οργάνου (κλινική εφαρμογή, μηχανισμοί δράσης- διαβιβαστικές ουσίες, δράση μέσα στο κύτταρο), Υπερτροφικό μυοκάρδιο, Μοντέλα πειραμάτων.

Στο ειδικό μέρος εκτίθενται το Υλικό και η Μέθοδος (πρόκληση υπερτροφίας, φαρμακολογία της φθοριούδροκορτιζόνης, αναισθησία του πειραματόζωου, ισχαιμική προετοιμασία του μυοκαρδίου με παροδική ισχαιμία σκέλους, χειρουργική προετοιμασία – ανάρτηση της καρδιάς, συσκευή άρδευσης - πειραματική διάταξη Langendorff, διάλυμα άρδευσης, παρακολούθηση και καταγραφή δεδομένων, παρακολούθηση ρυθμού, κύριο μέρος του πειράματος, μέτρηση αιμοδυναμικών παραμέτρων, στατιστική ανάλυση), τα Αποτελέσματα και η Συζήτηση (η επίδραση της προετοιμασίας με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου στις φυσιολογικές καρδιές των αρουραίων, η επίδραση της προετοιμασίας με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου στις υπερτροφικές καρδιές των αρουραίων, επεισόδια αρρυθμίας), τα Συμπεράσματα, οι Προοπτικές της μελέτης, η Περίληψη, Περίληψη στην αγγλική γλώσσα και η Βιβλιογραφία.

Από τη θέση μου αυτή θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο σεβαστό δάσκαλο Καθηγητή κ. Νικόλαο Τσιλιμίγκα, Διευθυντή της Καρδιοχειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανάθεση της διατριβής, την εμπιστοσύνη και την αγάπη με την οποία με περιέβαλε, την αμέριστη συμπαράσταση και την συνεχή καθοδήγησή του τόσο στο θεωρητικό, όσο και στο πειραματικό κομμάτι της έρευνας.

Η πραγματοποίηση της εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοριστική συμβολή της Καθηγήτριας του Βιολογικού τμήματος του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κυρίας Αντιγόνης Λάζου, την οποία θερμά ευχαριστώ γιατί μας

παραχώρησε το εργαστήριο το οποίο διευθύνει και μετέδωσε την ερευνητική εμπειρία και τις γνώσεις της σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ολόψυχα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Φίλιππο Τρυποσκιάδη, διευθυντή της Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του χάρη στην μεγάλη κλινική και ερευνητική του εμπειρία.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια του βιολογικού τμήματος κα Μάρκου Θωμά, διδάκτορα του Βιολογικού τμήματος του ΑΠΘ, για την καταλυτική βοήθειά της στην οργάνωση και διεξαγωγή της μελέτης, την υπομονή και την ακούραστη συμβολή στην φροντίδα των πειραματόζωων, τον χειρισμό του τεχνικού εξοπλισμού και την οργάνωση του πειράματος.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΩΝ ΟΡΩΝ

ΠΙ = ισχαιμική προετοιμασία μυοκαρδίου

αΑ-ΠΙ = από απόσταση ισχαιμική προετοιμασία μυοκαρδίου = ισχαιμική προετοιμασία μυοκαρδίου κατόπιν ισχαιμίας άλλου οργάνου

ΙμετάΠ = ισχαιμική μετα-προστασία του μυοκαρδίου

ΥΜ = υπερτροφία μυοκαρδίου

AMP, ADP, ATP = αδενοσινουκλεοτίδια

AMP = μονοφωσφορική αδενοσίνη, αδενοσινονομοφωσφορικό οξύ

ADP = διφωσφορική αδενοσίνη, αδενοσινωδιφωσφορικό οξύ

ATP = τριφωσφορική αδενοσίνη, αδενοσινωτριφωσφορικό οξύ

CP = φωσφοκρεατίνη

Ca = ασβέστιο

in vivo = εν ζωή, μέσα στο ζωντανό οργανισμό

NO = νιτρικό οξείδιο, μονοξείδιο του αζώτου

K_{ATP} channels = δίαυλοι καλίου που εξαρτώνται από το ATP

PKC = πρωτεϊνική κινάση C

MAPK = mitogen-activated protein kinase = πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase = φωσφατυδιλοϊνσιτολική 3-κινάση

JAK1/2 = “just another” kinases = Janus kinases 1&2 = κινάσες του Ιανού (ο δικέφαλος θεός των Ρωμαίων, προστάτης των εισόδων και εξόδων, των πυλών και γεφυρών, των ενάρξεων και καταλήξεων) 1 και 2

GSK3B = glycogen synthase kinase 3 beta = το ισοένζυμο 3b της κινάσης της συνθετάσης του γλυκογόνου

iNOS = inducible nitric oxide synthase isoform = ισομορφή της προκλητής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου

eNOS = endothelial nitric oxide synthase = ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου

PKCe = ισομερές e (epsilon) της PKC

COX = cyclooxygenase = κυκλοοξυγενάση

HO = heme oxygenase = οξυγενάση της αίμης

SOD = superoxide dismutase = υπεροξειδική δισμουτάση

ecSOD = εξωκυττάρια υπεροξειδική δισμουτάση

HSP = Heat stress proteins = πρωτεΐνες θερμικού στρες
CK-MB = το ισοένζυμο MB της κρεατινοκινάσης
CRP = C reactive protein = C αντιδρώσα πρωτεΐνη
EPC = endothelial progenitor cells = προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα
CGRP = Calcitonin gene-related peptide = πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης
ROS = reactive oxygen species = ενεργές ρίζες οξυγόνου
8-SPT = 8- sulfophenyltheophylline = 8-σουλφοφαινυλοθεοφυλλίνη
HIF 1a = hypoxia-unducible factor 1a = παράγοντας που παράγεται από την ισχαιμία
CB = cannabinoids = κανναβοειδή
mPTP = mitochondrial permeability transition pore = μιτοχονδριακοί πόροι
N2 MPG = N2-mercapto-propionylglycine
in vitro = «στο δοκιμαστικό σωλήνα», έξω από το ζωντανό οργανισμό
in situ = επί τόπου, στη θέση του
ΣΠ = συστολική πίεση αριστερής κοιλίας
ΑΠ = αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας
ΔΠ = τελοδιαστολική πίεση αριστερής κοιλίας
ΑΣ = αριθμός σφύξεων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Ετυμολογικά, ισχαιμία μυοκαρδίου σημαίνει ελάττωση ή διακοπή της παροχής αίματος στο μυοκάρδιο. Ο ορισμός αυτός όμως εξαιρεί τις πειραματικές διατάξεις απομονωμένων καρδιών, όπου η άρδευση του μυοκαρδίου γίνεται με οξυγονωμένα ηλεκτρολυτικά διαλύματα και όχι με αίμα, καθώς και τις περιπτώσεις όπου έχουμε μειωμένη περιεκτικότητα του αίματος σε οξυγόνο (υποξία, ανοξία), ή αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις του μυοκαρδίου (διαταραχή του ισοζυγίου προσφερόμενου οξυγόνου και του απαιτούμενου για να διατηρήσει η καρδιά την φυσιολογική της λειτουργία) χωρίς μείωση της στεφανιαίας ροής. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις κοινός συντελεστής είναι η ανεπαρκής οξυγόνωση του μυοκαρδιακού κυττάρου, η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενώσεων υψηλής ενέργειας και η εξάντληση των αποθεμάτων ενώσεων υψηλής ενέργειας¹.

Ένας ολοκληρωμένος ορισμός της ισχαιμίας του μυοκαρδίου περιλαμβάνει τις παρακάτω περιπτώσεις^{2,3,4}:

α. **Ελάττωση ή διακοπή της στεφανιαίας ροής** με αποτέλεσμα την ελάττωση ή τη διακοπή της παροχής οξυγόνου στο μυοκάρδιο και επιπλέον τη συσσώρευση των μεταβολικών παραγόντων της αναερόβιας γλυκόλυσης.

β. Υποξία-ανοξία του μυοκαρδίου εξαιτίας **αυξημένων μεταβολικών απαιτήσεων**. Μπορεί να συνδυάζεται και με αυξημένη στεφανιαία ροή. Τα προϊόντα του αναερόβιου μεταβολισμού απομακρύνονται συνεχώς από το μυοκάρδιο.

γ. Υποξία-ανοξία του μυοκαρδίου εξαιτίας **μείωσης του μεταφερόμενου οξυγόνου**. Η στεφανιαία ροή δεν περιορίζεται και τα προϊόντα της αναερόβιας γλυκόλυσης απάγονται από το μυοκάρδιο

Σε κυτταρικό επίπεδο οι μεταβολικές και ιοντικές διαταραχές μετά την ισχαιμική προσβολή είναι περίπου ίδιες σε όλα τα πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο. Το οξυγόνο που παραμένει στον καρδιακό μυ με τη μορφή της οξυαιμοσφαιρίνης ή της οξυμυοσφαιρίνης γρήγορα καταναλώνεται από τα κύτταρα. Τα αποθέματα των φωσφορικών ενώσεων υψηλής ενέργειας (τριφωσφορική αδενοσίνη ATP και φωσφοκρεατίνη CP) είναι εξαιρετικά μικρά και μόλις επαρκούν για 3-4 συστολές. Τα κύτταρα μεταπίπτουν από τον αερόβιο μιτοχονδριακό μεταβολισμό (οξειδωτική φωσφορυλίωση) στην αναερόβια γλυκόλυση σε μια προσπάθεια να διατηρήσουν το ενεργειακό ισοζύγιο⁵.

Η ενεργοποίηση της αναερόβιας γλυκόλυσης σε συνδυασμό με τη μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων του ισχαιμικού κυττάρου, καθώς η διαδικασία της συστολής προοδευτικά καταστέλλεται, έχει ως αποτέλεσμα την προσωρινή εξοικονόμηση ενώσεων υψηλής ενέργειας. Ο ρυθμός αυτός, όμως, επιβραδύνεται σταδιακά, τα επίπεδα του ATP μηδενίζονται και η αναερόβια γλυκόλυση σταματά 60 περίπου λεπτά μετά την έναρξη του ισχαιμικού επεισοδίου^{6,7}.

Στο κυτταρόπλασμα συσσωρεύονται πολλές ενώσεις-μεταβολικά προϊόντα της γλυκόλυσης, που προκαλούν οξέωση, οίδημα (από ώσμωση) και μείωση της έντασης συστολής του ισχαιμικού κυττάρου. Η εξάντληση των αποθεματικών ενώσεων υψηλής ενέργειας και η ανεπαρκής παραγωγή νέων οδηγεί σε συσταλτική ανεπάρκεια, οξέωση, αναστολή ή τροποποίηση της δράσης πολλών μεμβρανικών αντλιών που υποστηρίζουν το ιοντικό περιβάλλον του κυττάρου, αναστολή της σύνθεσης μακρομορίων και απώλεια των αδενινονουκλεοτιδίων (AMP, ADP, ATP) του κυττάρου. Η οξέωση περαιτέρω προκαλεί διαταραχές στην συσταλτικότητα του κυττάρου (μείωση έντασης συστολής), την αρχιτεκτονική του δομή (αλλοιώσεις του πυρήνα, βλάβη των μιτοχονδρίων) και την ιοντική ομοιόσταση (αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Na^+ και απώλεια ενδοκυττάρων ιόντων K^+ , που προκαλούν μείωση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης και βράχυνση της διάρκειας του δυναμικού δράσης). Το κυτταρόπλασμα υπερφορτώνεται με ιόντα Ca^{2+} τα οποία ενεργοποιούν ποικίλα καταβολικά ένζυμα, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και των μιτοχονδρίων^{8,9,10,11,12,13}.

Λίγα δευτερόλεπτα μετά την έναρξη της ισχαιμίας επέρχεται **διαταραχή της συστολής** των μυοκαρδιακών ινών που σύντομα (2-3 min) μεταπίπτει σε πλήρη **ασυστολία**. Είναι γνωστό ότι η συστολή των μυοκαρδιακών ινών γίνεται χάρη στα νηματία ακτίνης - μυοσίνης που σχηματίζουν το σαρκομερίδιο και καθώς ολισθαίνουν το ένα πάνω στο άλλο προκαλούν την βράχυνση των σαρκομεριδίων. Πολλά σαρκομερίδια ενωμένα στη σειρά σχηματίζουν το μυοϊνίδιο. Η δέσμευση του ATP στις κεφαλές των μορίων μυοσίνης σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου ευνοεί τη χαλαρή σύνδεση των νηματίων (κατάσταση χάλασης του καρδιακού μυός), ενώ η υδρόλυση του δεσμευμένου ATP σε κατάσταση υψηλής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου οδηγεί στην ισχυρή σύνδεση των νηματίων ακτίνης – μυοσίνης (κατάσταση βράχυνσης των μυοκαρδιακών ινών)¹⁴.

Η αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία περιορίζει την προσφορά νέων ενώσεων υψηλής ενέργειας, η μείωση του ενδοκυττάρου pH, η οποία μειώνει

την ευαισθησία των νηματίων στο ασβέστιο, και η αύξηση της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου, ο οποίος αναστέλλει την ισχυρή σύνδεση των νηματίων ακτίνης – μυοσίνης, είναι οι κυριότεροι μηχανισμοί που προκαλούν την συσταλτική ανεπάρκεια των μυοκαρδιακών κυττάρων.

Μετά την ασυστολία και εφόσον η ισχαιμία συνεχίζεται επέρχεται τετανική κατάσταση, που ονομάζεται **ισχαιμική σύσπαση** του μυοκαρδίου (ischemic contracture) και που στην ακραία της μορφή οδηγεί στην κατάσταση που λέγεται καρδιά σαν πέτρα (stone heart). Το φαινόμενο αυτό δηλώνει σοβαρή ισχαιμική βλάβη και ενδεχόμενα μη αναστρέψιμη και οφείλεται στην αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου στην ασυστολική ισχαιμική καρδιά, η οποία αύξηση προκαλεί γέφυρες ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στα νημάτια ακτίνης – μυοσίνης^{15,16,17}.

Ο μέγιστος χρόνος ισχαιμίας των μυοκαρδιακών κυττάρων ώστε να επέλθουν μη αναστρέψιμες βλάβες παρά την πλήρη επαναιμάτωση, δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια γιατί εμπλέκεται ένα πλήθος διαφορετικών παραγόντων στα διάφορα πειραματικά μοντέλα ή τις κλινικές καταστάσεις (διαφορές πειραματόζωων μεταξύ τους αλλά και ανθρώπου, διαφορές στο φύλο, την ηλικία και σε συνυπάρχουσες νοσηρές καταστάσεις όπως διαβήτης, υπέρταση, υπερχοληστεριναιμία, υπερτροφία, καρδιακή ανεπάρκεια κλπ, διαφορές στο προφορτίο και το μεταφορτίο, αντιστάσεις στο στεφανιαίο αγγειακό δίκτυο, παράπλευρη αιμάτωση, μεταβολικές ανάγκες, δράση φαρμάκων και άλλα). Γενικά χρόνος περιοχικής ή καθολικής ισχαιμίας, in vivo ή σε απομονωμένες καρδιές, μεγαλύτερος των 20 λεπτών μπορεί να επιφέρει μη αναστρέψιμη βλάβη (μυοκαρδιακός θάνατος)^{18,19,20}.

Τρεις τύποι ανεπανόρθωτης βλάβης σε επίπεδο κυττάρου υπάρχουν: η **όγκωση** (μη προγραμματισμένη βλάβη – οίδημα του κυττάρου), η **απόπτωση** (προγραμματισμένη γενετικά βλάβη τύπου I – ρίκνωση του κυττάρου) και η **αυτοφαγία** (inclusion) – αυτοκτονία (προγραμματισμένη γενετικά βλάβη τύπου II του κυττάρου). Οι δύο πρώτες διαδικασίες προχωρούν παράλληλα κατά την ισχαιμία του μυοκαρδιακού κυττάρου, με το ποσοστό συμμετοχής στον μυοκαρδιακό θάνατο να αποτελεί αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος σε σύγχρονες μελέτες. Στο τελικό στάδιο της ισχαιμίας ο μηχανισμός και η μορφολογία της όγκωσης φαίνεται να κυριαρχούν. Η αυτοφαγία σε συνέργια με την όγκωση και την απόπτωση έχει ρόλο στην χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια^{21,22,23,24,25,26,27}.

2. ΙΣΧΑΙΜΙΑ – ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

Η έγκαιρη και επαρκής «αποκατάσταση» της ισχαιμίας του μυοκαρδίου (επαναφορά στεφανιαίας ροής / επαναπροσφορά οξυγόνου / επαναιμάτωση / επανεμποτισμός / επανάρδευση = reperfusion) αποτελεί την καλύτερη αντιμετώπιση για να αποφευχθούν ή να περιοριστούν οι βλάβες από την ισχαιμία²⁸.

Παραδόξως κατά την «αποκατάσταση» δεν παρατηρείται η μέγιστη ευεργετική επίδραση αλλά οι ισχαιμικές βλάβες (δομικές, μεταβολικές και λειτουργικές) επιτείνονται. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε **βλάβη από επαναιμάτωση** (reperfusion induced injury)^{29,30,31,32}.

Η βλάβη από επαναιμάτωση περιλαμβάνει^{33,34}:

Κυτταρικό θάνατο (lethal injury)

Μυοκαρδιακή αποπληξία (stunned myocardium)

Αρρυθμίες

Βλάβες του ενδοθηλίου και δυσλειτουργία των μικρών αγγείων της καρδιάς

Υπάρχουν ισχυρές αντιρρήσεις κατά πόσο το φαινόμενο (η επίταση δηλαδή της βλάβης εξαιτίας της επαναιμάτωσης) υφίσταται ξεχωριστά και δε αποτελεί απλά αποκάλυψη της βαρύτητας των βλαβών που προκάλεσε η ισχαιμία. Οι ερευνητές προσπαθούν να αποκαλύψουν ουσίες που πιθανόν να παίζουν ρόλο στο φαινόμενο της βλάβης από επαναιμάτωση και που η αναστολή των οποίων τροποποιεί την έκταση της μυοκαρδιακής βλάβης (έχουν μελετηθεί οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, τα ιόντα ασβεστίου, η ελάττωση των ιόντων καλίου και των πρωτονίων H⁺, η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το συμπλήρωμα, το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης, η ενδοθηλίνη, οι ιντερλευκίνες, το νιτρικό οξείδιο και άλλα, ενώ καθημερινά μελετώνται νέες ουσίες και μηχανισμοί)¹⁹.

Τα αποτελέσματα είναι ακόμη αντιφατικά και δεν είναι επαρκή να στηρίζουν την θεωρία της βλάβης από επαναιμάτωση. Πολύ πιθανό οι μελετώμενες ουσίες να τροποποιούν τη λειτουργικό περιβάλλον της καρδιάς και να επιφέρουν το ευεργετικό τους αποτέλεσμα μειώνοντας την ένταση της ισχαιμίας, παρά τροποποιώντας τους βλαπτικούς παράγοντες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης^{33,35}.

Αναμφισβήτητα όμως, αφού η επαναιμάτωση ακολουθεί υποχρεωτικά το στάδιο της ισχαιμίας και δεν μπορεί να υπάρξει μεμονωμένα, το φαινόμενο πρέπει να μελετάται αναπόσπαστα ως ισχαιμία/επαναιμάτωση.

3. ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Σε πειραματικό επίπεδο, η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου μπορεί να ελαττωθεί δραματικά, εάν η καρδιά εκτεθεί σε μικρά μη βλαπτικά επεισόδια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης πριν από την παρατεταμένη απόφραξη της στεφανιαίας ροής. Το φαινόμενο αυτό της ενδογενούς προστασίας της καρδιάς ονομάζεται **ισχαιμική προετοιμασία (ΙΠ)** του μυοκαρδίου και περιγράφηκε για πρώτη φορά σε σκύλους από τον Murry και συν το 1986. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι 40 min αποκλεισμού μιας στεφανιαίας αρτηρίας προκαλούσε 30 % έμφραγμα στην αντίστοιχη ισχαιμική περιοχή, ενώ μετά προετοιμασία με 4 κύκλους 5λεπτου αποκλεισμού/5λεπτης επαναιμάτωσης η έκταση του εμφράγματος μειώθηκε στο 7 %, παρόλο που ο συνολικός χρόνος ισχαιμίας ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα με προετοιμασία³⁶.

Από πολλούς ερευνητές έχει αποδειχθεί ότι μικρά επεισόδια ισχαιμίας του μυοκαρδίου, δεν προκαλούν μη αναστρέψιμες βλάβες στο μυοκάρδιο (= δεν προκαλούν νέκρωση μυοκαρδιακών κυττάρων). Ακόμη και επαναλαμβανόμενα, τα επεισόδια δεν δρουν συσσωρευτικά, καθώς δεν προκαλούν εξάντληση (κατανάλωση) των αποθεμάτων ATP περισσότερο από ότι ένα επεισόδιο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης³⁷.

Η προστασία της καρδιάς από την ισχαιμία/επαναιμάτωση με πρόκληση ισχαιμίας άλλου οργάνου ή ιστού, λιγότερο ευαίσθητου σ' αυτή τη δοκιμασία, ή άλλης μικρής περιοχής της καρδιάς, αποτελεί την **από απόσταση ισχαιμική προετοιμασία** που επινοήθηκε από τον Przyklenk και συν το 1993³⁸. Εκτενής περιγραφή γίνεται σε επόμενο κεφάλαιο.

Η κλινική εφαρμογή του φαινομένου της ΙΠ περιορίζεται μόνο στις περιπτώσεις όπου η ισχαιμία του μυοκαρδίου μπορεί έγκαιρα να προβλεφθεί, δηλαδή όταν η έκθεση στον κίνδυνο ισχαιμίας είναι προγραμματισμένη, όπως οι καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις και η επεμβατική καρδιολογία. Εάν έχει ήδη προκληθεί ισχαιμία στο μυοκάρδιο, τότε θέση έχει η **μετά-προστασία** (ischemic postconditioning) που καθιερώθηκε από τους Zhao και συν το 2003 και αποτελεί την εφαρμογή μικρών παροδικών διακοπών της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου με μεσολάβηση ισχαιμίας.

Ερευνητές υποστηρίζουν ότι στα μικρότερα είδη ζώων η ελάττωση της ζώνης του εμφράγματος μπορεί να φθάσει το 30 %, ενώ για τα μεγαλύτερα είδη το 50 % ακόμη και το 80 %^{39,40,41}.

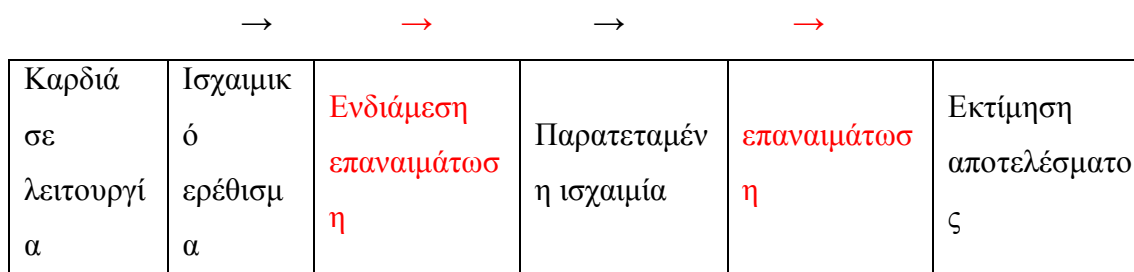
Όταν η μετά-προστασία γίνεται με πρόκληση ισχαιμίας άλλου, απομακρυσμένου οργάνου, τότε μιλούμε για ισχαιμική **μετά-προστασία από απόσταση** (remote ischemic postconditioning)⁴².

Πιο πρόσφατα (Schmidt 2007) επινοήθηκε η **κατά-προστασία** (ischemic preconditioning), σύμφωνα με την οποία προκαλείται παροδική ισχαιμία περιφερικού οργάνου ή ιστού κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, που υφίσταται το μυοκάρδιο^{43,44}.

Το καρδιοπροστατευτικό αποτέλεσμα της ΙΠ έχει αποδειχθεί σε όλα τα είδη και τα πειραματικά μοντέλα (σκύλος, κουνέλι, αρουραίος, χοίρος) και φθάνει τα επίπεδα του 50-80 % ως προς την ελάττωση της έκτασης του εμφράγματος. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η ΙΠ δεν ελαττώνει μόνο το ποσοστό νέκρωσης του μυοκαρδίου, αλλά προστατεύει από την εμφάνιση αρρυθμιών και προφυλάσσει την αριστερή κοιλία από τη δυσλειτουργία μετά την ισχαιμία (απόπληκτο βιώσιμο μυοκάρδιο) καθώς και το ενδοθήλιο των στεφανιαίων αρτηριών^{45,46,47,48,49,50,51,52,53}.

Η διαδικασία (πρωτόκολλο) της ισχαιμικής προετοιμασίας περιλαμβάνει τις παρακάτω φάσεις: Ισχαιμικό ερέθισμα, ενδιάμεση επαναιμάτωση, παρατεταμένη ισχαιμία, επαναιμάτωση, εξέταση του ποσοστού νέκρωσης του μυοκαρδίου (σχήμα 1).

Σχήμα 1. Η διαδικασία της ισχαιμικής προετοιμασίας της καρδιάς



Η διάρκεια του ισχαιμικού ερεθίσματος στις διάφορες μελέτες κυμαίνεται από 2-10 min (μέσος όρος 3-5). Ισχαιμία μικρότερη των 2 min φαίνεται να μην έχει κανένα προστατευτικό αποτέλεσμα. Ένας έως 4 κύκλοι είναι επαρκείς. Το ισχαιμικό ερέθισμα μπορεί να είναι απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας, στένωση στεφανιαίας αρτηρίας, καθολική ισχαιμία, υποξία ή ανοξία, ταχυκαρδία¹⁹.

Η ενδιάμεση επαναιμάτωση διαρκεί συνήθως 10 min. Εάν υπερβεί τις 1-2 ώρες, τότε το προστατευτικό αποτέλεσμα παύει να υφίσταται (κλασική ή **πρώιμη προστασία**). Εάν η καρδιά εκτεθεί σε σύντομα επεισόδια ισχαιμίας και μετά επαναιματωθεί για 24-72 ώρες πριν εκτεθεί στην παρατεταμένη ισχαιμία, έχει παρατηρηθεί και ένα δεύτερο παράθυρο προστασίας, λιγότερο ισχυρής από την πρώτη (second window of protection, **όψιμη ισχαιμική προετοιμασία**)^{54,55,56,57}.

Το ευεργετικό αποτέλεσμα της ισχαιμικής προετοιμασίας είναι εμφανέστερο όταν η παρατεταμένη ισχαιμία διαρκέσει από 30 - 90 min. Εάν η ισχαιμία διαρκέσει περισσότερο, τότε η ΙΠ δεν έχει κανένα προστατευτικό αποτέλεσμα, δεν αποτρέπει δηλαδή τον κυτταρικό θάνατο.

3.1. Μηχανισμοί που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ΙΠ

Τα διάφορα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η ΙΠ δεν προστατεύει το μυοκάρδιο επεμβαίνοντας απλά στη διαταραχή της παροχής και κατανάλωσης του οξυγόνου που προκαλείται από την ισχαιμία, αλλά ότι τα σύντομα ισχαιμικά επεισόδια προκαλούν την ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων τύπων υποδοχέων που βρίσκονται στην σαρκοπλασματική μεμβράνη των μυοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων της φλεγμονής (inflammatory cells). Η **διέγερση των υποδοχέων** (υποδοχείς αδενοσίνης A1 και A2β, βραδυκινίνης, νορεπινεφρίνης, οποιοειδών, μιτοχονδριακοί και μεμβρανικοί εξαρτώμενοι από ATP διάλυτοι καλίου K_{ATP} , νιτρικό οξείδιο, ρίζες οξυγόνου) έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων μονοπατιών μεταγωγής μηνυμάτων (**μεσολαβητές** - πρωτεϊνική κίνηση PKC, πρωτεϊνικές κινήσεις που ενεργοποιούνται από μιτογόνα MAPK, φωσφατυδιλοϊνοσιτολική PI 3-κίνηση, Src/Lck ισομερή των κινασών της τυροσίνης, κινήσεις του Ιανού 1&2 JAK1/2, εξαρτώμενοι από ATP μιτοχονδριακοί διάλυτοι καλίου K_{ATP} , υπεροξείδιο O_2^- , το ισοένζυμο 3β της κίνησης της συνθετάσης του γλυκογόνου GSK-3β **και δεύτερα μηνύματα** - ισομορφή της προκλητής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου iNOS, ενδοθηλιακή συνθετάση του νιτρικού οξειδίου eNOS, κυκλοοξυγενάση COX-2, οξυγενάση της αίμης HO-1, αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η

εξωκυττάρια υπεροξειδική δισμουτάση ecSOD και η οξειδάση της αλδεϋδης, πρωτεΐνες θερμικού στρες HSP), τα οποία οδηγούν στη φωσφορυλίωση μιας κατάλληλης **πρωτεΐνης στόχου**, η δράση της οποίας καθιστά το μυοκαρδιακό κύτταρο ανθεκτικό σε ένα παρατεταμένο ισχαιμικό επεισόδιο^{58,59.60.61.62.63.64.65.66.67}.

Οποιοσδήποτε παράγοντας δρα βλαπτικά στην καρδιά μπορεί να προκαλέσει ισχαιμική προετοιμασία, όταν εφαρμοστεί σε μικρή ποσότητα. Οι έρευνες των τελευταίων ετών προσπαθούν να ανακαλύψουν φαρμακευτικούς παράγοντες που να μιμούνται τη δράση της ισχαιμικής προστασίας ή της μετα-προστασίας. Οι ουσίες αυτές θα μπορούν να χορηγούνται πριν την παρατεταμένη ισχαιμία ή κατά την επαναιμάτωση, έτσι ώστε να μην χρειάζεται η έστω σύντομη έκθεση της καρδιάς σε ισχαιμία. Βέβαια η δράση των ουσιών αυτών διαρκεί όσο και η χορήγησή τους, ενώ μηχανισμοί όπως η ΙΙΙ μπορεί να διαρκέσουν πολλές ώρες (late preconditioning). Παρόμοια δράση μπορεί να έχει και η φυσική άσκηση, η ταχεία βηματοδότηση, το θερμικό στρες, η υποξία και άλλοι χειρισμοί. Το λιγότερο βλαπτικό ή ενοχλητικό ερέθισμα θα αποτελούσε ιδανικό τρόπο προετοιμασίας της καρδιάς να αντιμετωπίσει ένα παρατεταμένο ισχαιμικό επεισόδιο^{68,69}.

Ένα τέτοιο ερέθισμα, καθόλου βλαπτικό στο μυοκάρδιο, είναι η **ισχαιμική προετοιμασία του μυοκαρδίου με πρόκληση ισχαιμίας άλλου οργάνου**, που έχει αποκτήσει τεράστιο ενδιαφέρον μελέτης από την πρώτη παρουσιάσή του και έπειτα και που περιγράφεται αναλυτικά στο παρακάτω κεφάλαιο.

4. ΙΣΧΑΙΜΙΚΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΚΑΤΟΠΙΝ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΑΛΛΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

Η ισχαιμική προετοιμασία από απόσταση αΑ-ΙΙΙ (remote ischemic preconditioning), περιγράφει το φαινόμενο κατά το οποίο παροδική μη θανατηφόρα ισχαιμία και στη συνέχεια επαναιμάτωση ενός οργάνου ή ιστού εξασφαλίζει αντοχή σε παρατεταμένο δυνητικά θανατηφόρο επεισόδιο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ενός διαφορετικού οργάνου ή ιστού.

Η σύλληψη της ιδέας ανήκει στους Przyklenk και συν., οι οποίοι ανακάλυψαν ότι σύντομα επεισόδια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης της περιοχής άρδευσης της περισπωμένης στεφανιαίας αρτηρίας καρδιάς πειραματόζωου παρείχαν τη

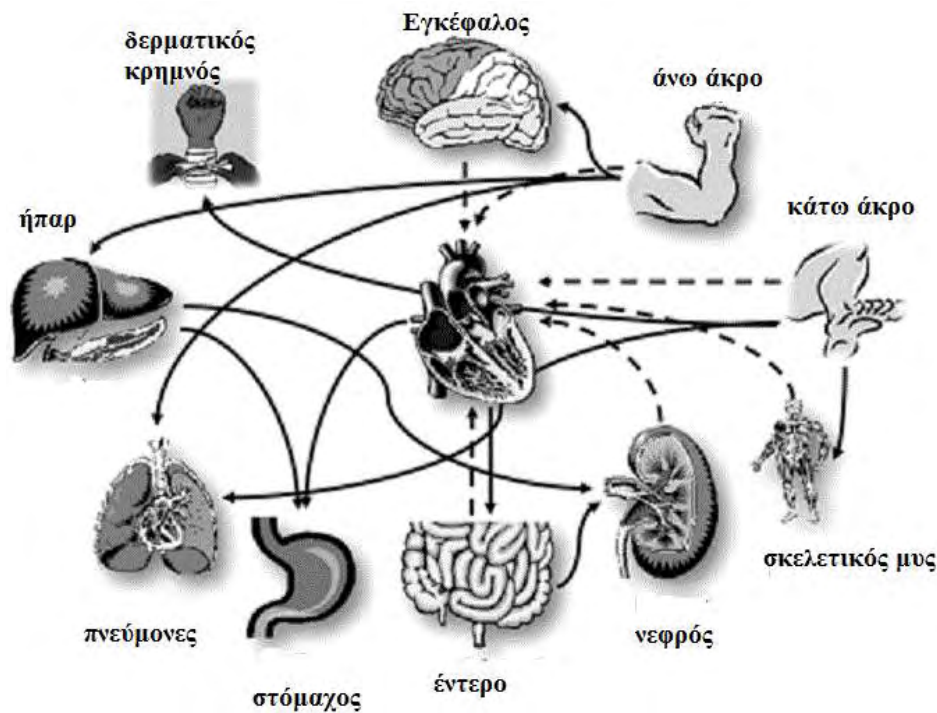
δυνατότητα να ελαττωθεί η έκταση του αντίστοιχου εμφράγματος μετά από παρατεταμένο αποκλεισμό του αριστερού πρόσθιου κατιόντα κλάδου³⁸.

Η μορφή αυτή της «ενδοκαρδιακής» προστασίας επεκτάθηκε αργότερα από άλλους ερευνητές και σε άλλα όργανα, εκτός της καρδιάς. Έτσι προηγούμενα σύντομα επεισόδια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του νεφρού ή του λεπτού εντέρου έδειξαν να ελαττώνουν την έκταση της εμφραγματικής περιοχής μετά από αποκλεισμό της στεφανιαίας αρτηρίας σε καρδιές πειραματόζωων^{70,71}.

Έχει γίνει η διάκριση από μερικούς συγγραφείς, να χρησιμοποιείται ο όρος απομακρυσμένο (**remote**) όταν το ισχαιμικό ερέθισμα εφαρμόζεται σε άλλο τμήμα – περιοχή της καρδιάς, ενώ ο όρος από απόσταση (**at a distance**) όταν το ισχαιμικό ερέθισμα αφορά σε άλλο πλην της καρδιάς όργανο ή ιστό. Οι περισσότεροι όμως δεν κάνουν διάκριση, χρησιμοποιώντας πάντα τον όρο *remote*.

Τα αποτελέσματα της αΑ-ΙΙΙ στη καρδιά έδωσαν ώθηση στην ανάπτυξη της στρατηγικής της μεταξύ τους προστασίας διαφόρων οργάνων από την βλαπτική επίδραση της ισχαιμίας /επαναιμάτωσης. (σχήμα 2)

Σχήμα 2: Η αρχική παρατήρηση ότι μικρά επεισόδια ισχαιμίας/επαναιμάτωσης απομακρυσμένου οργάνου προστατεύουν από την ισχαιμία/επαναιμάτωση την καρδιά (διακεκομμένα βέλη), επεκτάθηκε και στην προστασία διαφόρων οργάνων μεταξύ τους (συνεχόμενα βέλη)



Η ιδέα να εφαρμοστεί το ισχαιμικό ερέθισμα απομακρυσμένου οργάνου μετά την ισχαιμία της καρδιάς αλλά πριν την επαναιμάτωσή της ανήκει στον Kerendi και συν (2005) και αποτελεί την **μετά-προστασία από απόσταση** (remote postconditioning)⁷².

Οι πρώτες πειραματικές μελέτες πάνω στο φαινόμενο της αΑ-ΠΠ απαιτούσαν χειρουργική επέμβαση (αιματηρή προετοιμασία) για τον αποκλεισμό της ροής του αίματος στα απομακρυσμένα από την καρδιά όργανα (όπως ο νεφρός ή το λεπτό έντερο) και επομένως δεν μπορούσαν να έχουν πρακτική εφαρμογή στον άνθρωπο. Αντίθετα, ο προσωρινός αποκλεισμός ενός άκρου (άνω ή κάτω) είναι πιο εύκολα εφαρμόσιμος στην καθ' ημέρα πράξη.

Οι Birnbaum και συν το 1997 πρότειναν περιορισμό της αιματικής ροής (55-65 % στένωση της μηριαίας αρτηρίας) στους μυς του κάτω άκρου κουνελιών και ταυτόχρονα ηλεκτρική διέγερση του γαστροκνημίου μυ, ως ερέθισμα ισχαιμικής προετοιμασίας (ischemic preconditioning stimulus) και πέτυχαν ελάττωση της περιοχής του εμφράγματος της καρδιάς κατά 65 %, μετά από οξεία απόφραξη στεφανιαίας αρτηρίας⁷³.

Η τακτική της περιίδεσης ενός άκρου και στη συνέχεια πλήρης επαναιμάτωσή του ως ερέθισμα για ισχαιμική προετοιμασία είναι μια μη αιματηρή μέθοδος. Οι Oxman και συν εφάρμοσαν την μέθοδο με περιίδεση του κάτω άκρου σε αρουραίους, πετυχαίνοντας ελάττωση εμφάνισης καρδιακών αρρυθμιών μετά από δυνητικά βλαπτική ισχαιμία του μυοκαρδίου⁷⁴.

Ο δρόμος άνοιξε στη συνέχεια για εφαρμογή της ισχαιμικής προετοιμασίας από απόσταση στον άνθρωπο με εφαρμογή περιοδικής ισχαιμίου περιίδεσης ενός άκρου πριν από ιατρικές επεμβατικές πράξεις, που συνήθως προκαλούν ισχαιμία του μυοκαρδίου (εγχειρήσεις καρδιάς, αγγειοπλαστικές στεφανιαίων αρτηριών).

4.1 Κλινική εφαρμογή της αΑ-III

Η πρώτη προσπάθεια έγινε από τον Gunaydin και συν (2000) σε 8 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη καρδιοχειρουργική επέμβαση, στους οποίους προηγήθηκαν 2 κύκλοι 3λεπτης περιίδεσης του άνω άκρου με 2λεπτη επαναιμάτωση, και στους οποίους μετρήθηκε η CK-MB 5 λεπτά μετά την άρση του αποκλεισμού της αορτής. Η μελέτη αυτή απέτυχε να δείξει πλεονέκτημα της αΑ-III⁷⁵.

Η πρώτη επιτυχής κλινική εφαρμογή της αΑ-III έγινε από τον Cheung και συν (2006) σε 17 παιδιά τα οποία υποβλήθηκαν σε διόρθωση συγγενούς καρδιοπάθειας. Τέσσερεις κύκλοι 5λεπτης ισχαιμίας του κάτω άκρου ήταν ικανά για να μειώσουν την μυοκαρδιακή βλάβη, να βελτιώσουν τις αντιστάσεις στους αεραγωγούς και να ελαττώσουν σημαντικά την χορήγηση ινóτροπων φαρμάκων μετεγχειρητικά⁷⁶.

Ο Ali και συν (2007) βρήκε ότι 2 κύκλοι άμεσου (με ανοικτή μέθοδο) αποκλεισμού της λαγόνιας αρτηρίας επί 10 λεπτά, κρίνεται ικανή να ελαττώσει την μυοκαρδιακή βλάβη και να προστατέψει την νεφρική λειτουργία σε εκλεκτικές εγχειρήσεις ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής⁷⁷.

Ο Hausenloy και συν (2007) πέτυχε να ελαττώσει κατά 43% την απελευθέρωση τροπονίνης-T 72 ώρες μετά αορτοστεφανιαία παράκαμψη σε ενήλικες ασθενείς χρησιμοποιώντας 3 κύκλους 5λεπτης ισχαιμίας στο άνω άκρο⁷⁸.

Ο Hoole και συν (2009) σε μια τυχαίοποιημένη διπλή προοπτική μελέτη 242 ασθενών, που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη διαδερμική αγγειοπλαστική στεφανιαίων αρτηριών (PTCA), εφάρμοσε περιοδική ισχαιμίου περιίδεση (3 κύκλοι των 5 λεπτών περιίδεση και 5 λεπτά επαναιμάτωση) του άνω άκρου και το σύγκρινε με την ομάδα έλεγχου. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αΑ-III ελάττωσε σημαντικά το

ποσοστό νέκρωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων (μέτρηση τροπονίνης I μετά 24 ώρες). Επίσης μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης νεφρικής δυσλειτουργίας καθώς και τα καρδιακά και εγκεφαλικά επεισόδια σε μια περίοδο παρακολούθησης 6 μηνών⁷⁹.

Ο Zhou και συν έδειξαν οριακή αύξηση στη στεφανιαία ροή σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαδερμική αγγειοπλαστική και είχαν προετοιμαστεί με ισχαιμία του άνω άκρου⁸⁰.

Αντίθετα ο Piodromitis και συν (2006) αμφισβήτησαν την αποτελεσματικότητα της αΑ-ΙΙΙ, καθώς βρήκαν ότι αμφοτερόπλευρη περιοδική ισχαιμία των 2 άνω άκρων πριν από χαμηλού κινδύνου αγγειοπλαστική ενός αγγείου, αύξησε τα επίπεδα της CK-MB και της τροπονίνης-I ένα 24ωρο μετά τη διαδικασία⁸¹.

Πολλές μελέτες έχουν εφαρμοστεί έκτοτε σε υγιείς εθελοντές ή σε ασθενείς με 3λεπτη έως 5λεπτη ισχαιμική περιόδωση του βραχίονα ή του μηρού σε 200 – 300 mmHg πίεση και στη συνέχεια 3λεπτη έως 5λεπτη αποκατάσταση της κυκλοφορίας, που μπορεί να επαναληφθεί σε περισσότερους κύκλους⁸².

Σε εξέλιξη βρίσκονται προοπτικές τυχαίοποιημένες μελέτες σε χιλιάδες ασθενείς που υποβάλλονται σε διαδερμική αγγειοπλαστική των στεφανιαίων, στους οποίους εφαρμόζεται παροδική ισχαιμική περιόδωση του βραχίονα και στη συνέχεια μελετάται η απελευθέρωση δεικτών ισχαιμίας (CK-MB, Τροπονίνη I), ευρήματα στο καρδιογράφημα, η φλεγμονώδης αντίδραση (CRP), μέτρηση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial progenitor cells = EPC), η μέτρηση της στεφανιαίας ροής (coronary perfusion measured as coronary flow reserve derived from TIMI frame counts)⁸³.

Ο Takagi (2008) σε ανασκόπηση και μετά-ανάλυση 4 καρδιοχειρουργικών σειρών υποστήριξε την αποτελεσματικότητα της αΑ-ΙΙΙ⁸⁴.

Πολύ πρόσφατα έγκυροι ερευνητές αμφισβήτησαν την ευρεία κλινική εφαρμογή της αΑ-ΙΙΙ, όπως ο Hoole το 2009 (μελετώντας την λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας σε νόσο ενός αγγείου) και ο Rahman το 2010 (περίδωση μέλους πριν από στεφανιαίες χειρουργικές επεμβάσεις με πάλλουσα καρδιά). Συχνά, οι ίδιοι ερευνητές παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σε άλλες δικές τους μελέτες με διαφορετικό πρωτόκολλο^{85,86}.

4.2 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης στην από απόσταση προετοιμασία του μυοκαρδίου

Ο πραγματικός μηχανισμός, δια του οποίου ένα σύντομο επεισόδιο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης ενός οργάνου ή ιστού παρέχει προστασία σε ένα επακόλουθο παρατεταμένο επεισόδιο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ενός διαφορετικού απομακρυσμένου οργάνου ή ιστού, είναι ακόμη ασαφής. Υπάρχουν ενδείξεις σε πολλές μελέτες ότι οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι παρόμοιοι με αυτούς που σχετίζονται με την κλασική ισχαιμική προετοιμασία και με την μετά-ετοιμασία (διέγερση υποδοχέων και μονοπάτια μεταγωγής μηνυμάτων)⁸⁷.

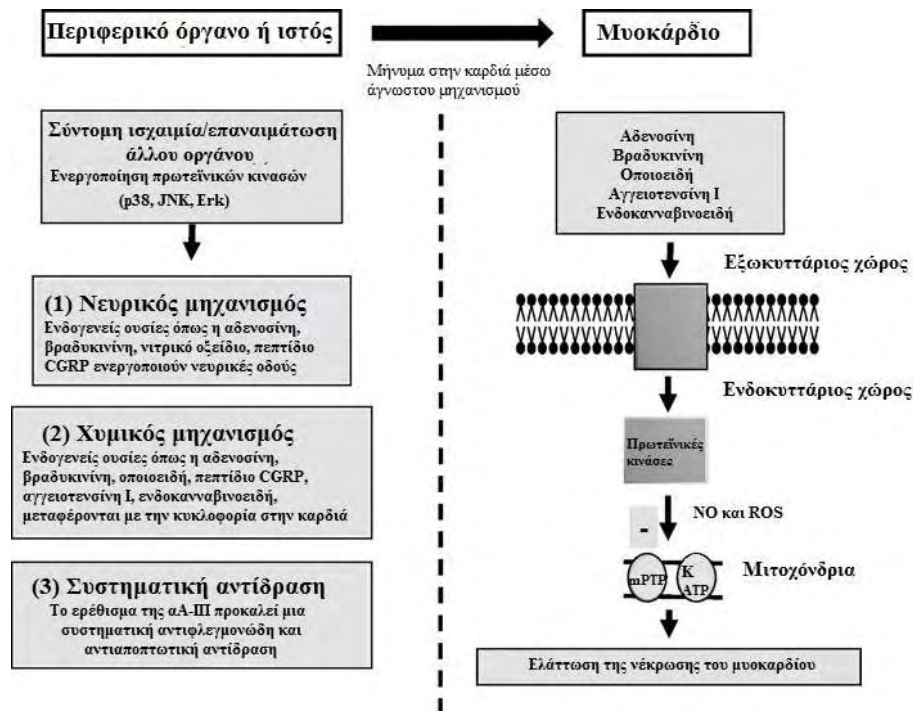
Η αΑ-III παρουσιάζει δύο φάσεις προστασίας, μία **πρώιμη** που διαρκεί λιγότερο από 4 ώρες από την έναρξη του ισχαιμικού ερεθίσματος και μία **όψιμη** που εμφανίζεται 24-48 αργότερα, όπως ακριβώς και συμβαίνει με την κλασική ισχαιμική προστασία⁸⁸.

Τρεις τουλάχιστον μηχανισμοί, που δρουν ίσως μεμονωμένα ή ταυτόχρονα ή σε συνδυασμό σαν μέρος μιας ενιαίας οδού, έχουν προταθεί και αποτελούν αντικείμενο εντατικής συνεχιζόμενης έρευνας, σχετικά με την καρδιοπροστασία που παρέχει η παροδική ισχαιμία και επαναιμάτωση άλλου, πλην της καρδιάς, οργάνου^{89,90,91}.

- **Νευρικός μηχανισμός.** Το απομακρυσμένο όργανο ή ιστός που υφίσταται την αρχική ισχαιμία/επαναιμάτωση παράγει μια ενδογενή ουσία (όπως η αδενοσίνη, η βραδυκίνη, το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης CGRP), η οποία διεγείρει έναν τοπικό προσαγωγό (κεντρομόλο) νευρικό μηχανισμό (afferent neural pathway), ο οποίος με τη σειρά του διεγείρει έναν απαγωγό (φυγόκεντρο) νευρικό μηχανισμό (efferent neural pathway), ο οποίος στη συνέχεια τερματίζει στην καρδιά και μεσολαβεί στην προστασία των μυοκαρδιακών κυττάρων.
- **Χυμικός μηχανισμός.** Κάποια ουσία (= χυμός), όπως η αδενοσίνη, η βραδυκίνη, τα οποιοειδή, το πεπτίδιο CGRP, τα ενδοκανναβοειδή, η αγγειοτενσίνη I, παράγεται στο απομακρυσμένο όργανο ως αποτέλεσμα της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και φθάνοντας στην καρδιά ενεργοποιεί τον αντίστοιχο υποδοχέα, ώστε να παραχθεί το φαινόμενο της ισχαιμικής προστασίας του μυοκαρδίου.
- **Συστηματική προστατευτική αντίδραση του οργανισμού.** Η διαδικασία της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης ενός οργάνου ή ιστού ενεργοποιεί μια συστηματική

αντίδραση του οργανισμού, η οποία καταστέλλει την φλεγμονή και την απόπτωση των κυττάρων.

Σχήμα 3. Οι προτεινόμενοι σήμερα μηχανισμοί δράσης στην αΑ-III, σχηματικά. Σε ποιο βαθμό μετέχει ο κάθε μηχανισμός και αν υπάρχει συνέργεια μεταξύ τους δεν είναι ακόμη γνωστό. CGRP = πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης, NO = νιτρικό οξείδιο, ROS = ενεργές ρίζες οξυγόνου, mPTP = μιτοχονδριακοί πόροι, K_{ATP} = διάλυτοι καλίου ενεργοποιούμενοι από ATP



4.2.1. Ενδείξεις υπέρ ενός ενδεχόμενου νευρικού μηχανισμού

Μια από τις πρώτες μελέτες για την αΑ-III ανέδειξε έναν πιθανό νευρικό μηχανισμό. Ο Gho και συν (1996) έδειξαν ότι η μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου που προκλήθηκε από την σύντομη ισχαιμία επαναιμάτωση της άνω μεσεντέριας αρτηρίας μπορούσε να αντιστραφεί από την δράση του εξαμεθόνιου, ενός γαγγλιακού αποκλειστή (ganglion blocker)⁷¹.

Η θεωρία του νευρικού μηχανισμού αναπτύχθηκε περαιτέρω με την υπόθεση ότι ενδογενείς ουσίες όπως η αδενosίνη, η βραδυκινίνη και οι πρωτεΐνη CGRP, που απελευθερώνονται από το απομακρυσμένο όργανο, διεγείρουν κεντρομόλες νευρικές ίνες, αυτές μεταβιβάζουν το ερέθισμα σε προσαγωγές νευρικές ίνες, που καταλήγουν στην καρδιά και προσφέρουν προστασία από την ισχαιμία/επαναιμάτωση^{92,93,94}.

4.2.1.1 Αδενosίνη και νευρικός μηχανισμός

Ο Pell και συν χορηγώντας πριν το αρχικό ερέθισμα έναν μη ειδικό ανταγωνιστή των υποδοχέων της αδενosίνης, την 8-σουλφοφαινυλοθεοφυλλίνη (8-SPT), πέτυχε να εξαλείψει την ελάττωση της εμφραγματικής περιοχής σε κουνέλια, όπου η απόσταση προετοιμασία έγινε με ισχαιμία του νεφρού⁹².

Σε μια παρόμοια μελέτη ο Takaoka και συν χορήγησαν την 8-σουλφοφαινυλοθεοφυλλίνη μετά το ισχαιμικό ερέθισμα στο νεφρό. Η καρδιοπροστασία τότε αναστάλη. Τα επίπεδα αδενosίνης στο πλάσμα των πειραματόζων που υπέστησαν αΑ-ΙΙΙ βρέθηκαν ανεβασμένα σε σχέση με αυτά που υπέστησαν κλασσική ΙΙΙ. Έτσι, συμπεράναν ότι η δέσμευση των υποδοχέων της αδενosίνης στο μυοκάρδιο ήταν απαραίτητη για την προστατευτική δράση (χυμικός μηχανισμός με μεσολαβητική ουσία την αδενosίνη)⁹⁵.

Ο Ding και συν αργότερα απέδειξε, ότι η διατομή του νεφρικού συμπαθητικού πλέγματος (renal nerve) κατήργησε την προστατευτική δράση της αΑ-ΙΙΙ στην καρδιά με αρχικό ισχαιμικό ερέθισμα στον νεφρό κουνελιών. Παρατήρησε, ακόμη, ότι κατά τη διάρκεια του αρχικού ερεθίσματος στο νεφρό αυξήθηκε η εκπόλωση του νεφρικού νευρικού πλέγματος, ενώ η χορήγηση 8-STP ανέστειλε την νευρική δραστηριότητα⁹⁶.

Μια πρόσθετη μαρτυρία για το ρόλο της αδενosίνης στον νευρικό μηχανισμό πρόσφερε ο Liem και συν. Η αρχική χορήγηση 8-STP ή εξαμεθόνιου εξάλειψε το ευεργετικό αποτέλεσμα της αΑ-ΙΙΙ στην καρδιά με αρχικό ισχαιμικό ερέθισμα την απόφραξη της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Επιπλέον η χορήγηση αδενosίνης στην μεσεντέρια αρτηρία παρείχε καρδιοπροστασία αναστελλόμενη από το εξαμεθόνιο. Το συμπέρασμα, που εξάγεται, είναι ότι σύντομα επεισόδια ισχαιμίας του λεπτού εντέρου παράγουν αδενosίνη, η οποία ενεργοποιεί κεντρομόλα αισθητικά νεύρα του νεφρού. Οι ερευνητές προχώρησαν περισσότερο δείχνοντας ότι η χορήγηση 8-STP μετά το ισχαιμικό ερέθισμα μπορούσε εξίσου να καταργήσει την καρδιοπροστασία, συνάγοντας έτσι ότι είναι επίσης πιθανό να χρειάζεται η δέσμευση των υποδοχέων της αδενosίνης (συνδυασμός νευρικής και χυμικής οδού)⁹⁷.

Δύο χρόνια αργότερα, η εργασία του Dong και συν ισχυροποίησε την θεωρία της δράσης νευρικού μηχανισμού με μεσολαβητή την αδενosίνη. Διατομή του μηριαίου νεύρου εξάλειψε την καρδιοπροστασία με αρχικό ερέθισμα την ισχαιμία/επαναιμάτωση του κάτω άκρου. Η χορήγηση όμως αδενosίνης στην μηριαία αρτηρία επανέφερε το προστατευτικό αποτέλεσμα⁹⁸.

4.2.1.2 Βραδυκινίνη και νευρικός μηχανισμός

Ο Schoemaker και συν απέδειξε ότι η χορήγηση ενός ανταγωνιστή των υποδοχέων της βραδυκινίνης B₂, του HOE140, καταργούσε την αΑ-ΙΙΙ της καρδιάς με παροδική απόφραξη της μεσεντέριας αρτηρίας. Η χορήγηση βραδυκινίνης στην μεσεντέρια αρτηρία ξεχωριστά, πρόσφερε προστασία ευαίσθητη στον γαγγλιακό αποκλεισμό από το εξαμεθόνιο⁹³.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και ο Wolfrum και συν. Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (συγκεκριμένα του ισομερούς PKCε - μιας ουσίας μεσολαβητή γνωστής από τη κλασσική ΙΙΙ του μυοκαρδίου κατόπιν παροδικής ισχαιμίας του λεπτού εντέρου) πρόσφερε αΑ-ΙΙΙ. Σε ξεχωριστές ομάδες πειραματόζωων, η ενεργοποίηση της PKCε και μαζί η καρδιοπροστασία αποκλείστηκε από τη χορήγηση HOE10 και εξαμεθονίου, που αναστέλλουν την βραδυκινίνη και την νευρική οδό. Συμπερασματικά, η από απόσταση προετοιμασία ενεργοποιεί την PKCε μέσω της βραδυκινίνης και του νευρικού μηχανισμού⁹⁹.

4.2.1.3 Πεπτίδιο σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) και νευρικός μηχανισμός

Σύμφωνα με πειραματικά ευρήματα η αΑ-ΙΙΙ με απομακρυσμένο όργανο το λεπτό έντερο (άρδευση από άνω μεσεντέρια αρτηρία) παράγει νιτρικό οξείδιο NO, το οποίο διεγείρει αισθητικά νεύρα ευαίσθητα στη καψαϊσίνη (capsaicin) μέσα στα αγγεία του εντέρου. Τα νεύρα αυτά παράγουν και ελευθερώνουν στην κυκλοφορία το πεπτίδιο CGRP, που είναι ένας γνωστός νευροδιαβιβαστής από το ρόλο του στην κλασσική ΙΙΙ. Το πεπτίδιο μεταφέρεται στην καρδιά, όπου ενεργοποιεί την μυοκαρδιακή πρωτεϊνική κινάση PKCε, με τελικό αποτέλεσμα την μείωση της εμφραγματικής περιοχής^{94,100,101,102}.

4.2.2. Ενδείξεις υπέρ ενός ενδεχόμενου χυμικού μηχανισμού

Η παρατήρηση ότι είναι απαραίτητη η επαναιμάτωση του απομακρυσμένου οργάνου μετά την σύντομη ισχαιμία για να φανεί το ευεργετικό αποτέλεσμα της αΑ-ΙΠ, οδήγησε στη σκέψη ότι κατά την αρχική επαναιμάτωση κάποια ουσία «ξεπλένεται» και εισέρχεται στην κυκλοφορία για να μεταφερθεί στην καρδιά^{70,71}.

Τη θεωρία αυτή ενίσχυσαν οι μελέτες του Dickson και συν. Αίμα, που πάρθηκε από κουνέλια που είχαν υποστεί προετοιμασία ταυτόχρονα της καρδιάς και των νεφρών, ελάττωσε την έκταση του εμφράγματος κατά 77 % όταν χορηγήθηκε σε πειραματόζωα χωρίς ΙΠ. Επίσης το έκπλυμα (η φλεβική παροχέτευση) από τον εμποτισμό απομονωμένων καρδιών κουνελιών, που υπέστησαν ισχαιμική προετοιμασία, όταν χορηγήθηκε σε απομονωμένες καρδιές που δεν υποβλήθηκαν σε προετοιμασία, ελάττωσε την περιοχή του εμφράγματος κατά 69 % και βελτίωσε τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Στο έκπλυμα η συγκέντρωση της αδενοσίνης ή της νοραδρεναλίνης δεν διέφερε από τις ομάδες ελέγχου. Επομένως, κάποια άλλη ή άλλες ουσίες παράχθηκαν και εισήλθαν στην κυκλοφορία για να δράσουν προστατευτικά στην καρδιά^{103,104,105}.

Ισχυρή ένδειξη για την ύπαρξη χυμικού μηχανισμού στην αΑ-ΙΠ παρείχε η πρωτοπόρα μελέτη του Konstantinof και συν. Η προετοιμασία με ισχαιμία του άκρου ενός χοίρου, που είχε δεχθεί μεταμόσχευση καρδιάς, ελάττωσε την εμφραγματική περιοχή στην απονευρωμένη μεταμοσχευθείσα καρδιά. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και ο Kristiansen και συν, που χρησιμοποίησε απομονωμένες καρδιές αρουραίων, οι οποίες είχαν προηγουμένως υποστεί προετοιμασία in vivo με παροδική ισχαιμία σκέλους^{106,107}.

Όπως είναι φυσικό, η έρευνα στο επόμενο στάδιο στράφηκε στην προσπάθεια εντοπισμού των ουσιών, που εμπλέκονται στον χυμικό μηχανισμό.

Μελετήθηκε, εάν ενδογενείς παράγοντες (όπως η αδενοσίνη, η βραδυκινίνη, τα οπιοειδή, τα ενδοκανναβοειδή, το πεπτιδίο CGRP, ο παράγοντας που παράγεται στην ισχαιμία HIF 1a, η αγγειοτενσίνη 1, η νοραδρεναλίνη) ελευθερώνονται από το απομακρυσμένο όργανο και στη συνέχεια μεταφέρονται με την κυκλοφορία στην καρδιά, όπου ενεργοποιούν ενδοκυττάριους δρόμους προστασίας των μυοκυττάρων. Χορηγήθηκαν στις ομάδες ελέγχου των πειραματόζωων ουσίες που αναστέλλουν την δράση των ενδογενών παραγόντων, όπως ναλοξόνη για τα οπιοειδή, η λοσαρτάνη για την αγγειοτενσίνη, ο ανταγωνιστής των CB2 για τα κανναβοειδή. Έτσι αποδείχθηκε η δράση των οπιοειδών «δ1» και «κ», του ενδογενούς κανναβοειδούς CB2 και της αγγειοτενσίνης 1, ενώ για την νοραδρεναλίνη τα αποτελέσματα είναι

αντιφατικά. Εναλλακτικά, κάποιιοι παράγοντες του χυμικού μηχανισμού (όπως η αδενοσίνη και η βραδυκινίνη) μπορεί να ενεργοποιούν μια κεντρομόλα νευρική οδό και αυτή στη συνέχεια τον προστατευτικό μηχανισμό (συνδυασμός χυμικού και νευρικού μηχανισμού), ή να δρουν ανεξάρτητα αλλά ταυτόχρονα και με τους δύο μηχανισμούς, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο^{74,92-94, 108-112}.

4.2.3. Ενδείξεις υπέρ ενδεχόμενης συστηματικής αντίδρασης στην απόσταση ισχαιμική προστασία

Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η ισχαιμία/επαναιμάτωση του απομακρυσμένου οργάνου καταστέλλει την φλεγμονώδη αντίδραση και προκαλεί μεταγραφή (τροποποίηση στην «έκφραση» = transcription) γονιδίων του κυτταροπλάσματος του προστατευόμενου οργάνου (καρδιά). Τα γονίδια αυτά έχουν δράση ενάντια στη φλεγμονή και την απόπτωση¹¹³⁻¹¹⁵.

4.2.4. Ενδείξεις υπέρ ενός ιδιαίτερου μηχανισμού (ενεργοποίηση κινασών MAPKs μέσα στο απομακρυσμένο όργανο)

Είναι γνωστός ο ρόλος των MAPKs (πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα), που ενεργοποιούνται μέσα στο καρδιακό κύτταρο, μετά την μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό των μυοκαρδιακών κυττάρων κατά την κλασσική ΙΙΙ. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι μια πρόσφατη μελέτη από τον Heidbreder και συν (2008), που παρατήρησε ότι έγινε ενεργοποίηση των MAPKs JNK1/2, p38 και Erk1/2, μέσα στο απομακρυσμένο όργανο (που ήταν λεπτό έντερο αρουραίων) αλλά όχι μέσα στο μυοκάρδιο. Αποτέλεσμα ήταν η ευεργετική δράση της αΑ-ΙΙΙ στο μυοκάρδιο ελαττώνοντας την εμφραγματική περιοχή. Όμως φαρμακευτική εξουδετέρωση των MAPKs (ουσία SB203580 για την p38, PD98059 για Erk1/2 και SP600125 για JNK1/2) είχε ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της αΑ-ΙΙΙ. Ίσως περαιτέρω έρευνες αποδείξουν τον μηχανισμό αυτό ως ένα ιδιαίτερο δρόμο στο φαινόμενο της αΑ-ΙΙΙ¹¹⁶.

4.2.5. Μηχανισμοί προστασίας στην αΑ-ΙΙΙ στο επίπεδο του μυοκαρδιακού κυττάρου

Μόλις το καρδιοπροστατευτικό μήνυμα (σήμα) μεταβιβαστεί από το απομακρυσμένο όργανο στην καρδιά, επιστρατεύονται (κινητοποιούνται) στο εσωτερικό των μυοκαρδιακών κυττάρων ενδοκυττάριοι μηχανισμοί μεταγωγής του σήματος (transduction). Οι μηχανισμοί, τουλάχιστον αυτοί που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, είναι όμοιοι με αυτούς που μετέχουν στην ΙΙΙ και την ΙμεταΠ και έχουν σχέση με

υποδοχείς (G protein-coupled receptors) που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και είναι συζευγμένοι με τις G πρωτεΐνες (είναι οικογένεια πρωτεϊνών που μεταφέρουν χημικά σήματα από το εξωτερικό του κυττάρου προκαλώντας μεταβολές στο εσωτερικό του). Τέτοιοι υποδοχείς, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της ΙΙΙ, είναι της αδενοσίνης, της βραδυκινίνης, των οπιοειδών, των κανναβοειδών και της αγγειοτενσίνης. Την σύζευξη στους υποδοχείς ακολουθεί η ενεργοποίηση μηχανισμών μέσα στο κύτταρο: ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών (PKCε), ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), οξειδίου του αζώτου (NO) και των μιτοχονδριακών διαύλων K_{ATP} ^{40,89,117,118}.

4.2.5.1 Διάλυλοι K_{ATP} και αΑ-ΙΙΙ

Οι διάλυλοι καλίου ενεργοποιούνται από το ATP, τόσο των μιτοχονδρίων όσο και της κυτταρικής μεμβράνης, έχουν κριτικό ρόλο είτε ως διεγέρτες υποδοχέων είτε ως μεσολαβητές στο φαινόμενο της κλασσικής ΙΙΙ. Η διέγερση των υποδοχέων της μεμβράνης ενεργοποιεί δρόμους μεταγωγής σημάτων μέσα στο κύτταρο και τελικά προκαλείται άνοιγμα των μιτοχονδριακών διαύλων K_{ATP} . Αυτό προκαλεί την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, οι οποίες μεσολαβούν στην καρδιοπροστασία, είτε ενεργοποιώντας τις προ-αποπτωτικές κινάσες (pro-survival kinases) είτε αναστέλλοντας το άνοιγμα των μιτοχονδριακών πόρων (mPTP)^{118,119}.

Εάν ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται στην αΑ-ΙΙΙ δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Ενδείξεις για σχέση ανάμεσα στο άνοιγμα των διαύλων K με την αΑ-ΙΙΙ δείχνουν μελέτες, στις οποίες φαρμακευτικοί ανταγωνιστές των διαύλων K, όπως η γλυβενκλαμίδη και η ουσία 5-hydroxydecanoate, ανέστειλαν το άνοιγμα των διαύλων^{106,107}.

4.2.5.2 Νιτρικό οξείδιο και αΑ-ΙΙΙ

Ο Petrishchev και συν συμπέρανε ότι το νιτρικό οξείδιο (NO) δεν σχετίζεται με την αΑ-ΙΙΙ, αναστέλλοντας την συνθετάση του NO σε αρουραίους όπου το απομακρυσμένο όργανο ήταν το λεπτό έντερο¹²⁰.

Όμως, ο Tokuno και συν απέδειξε ότι θανατηφόρα ισχαιμία του εγκεφάλου προκάλεσε όψιμη προστασία της καρδιάς ποντικών 24 ώρες αργότερα. Η δράση αυτή, όμως, δεν ήταν δυνατή σε ποντικούς με εξουδετερωμένο το γονίδιο της

συνθετάσης του NO. Η εργασία αυτή είναι από τις ελάχιστες χωρίς επαναιμάτωση, που ακολουθεί την ισχαιμία του απομακρυσμένου οργάνου¹²¹.

4.2.5.3 Πρωτεϊνική κινάση C και αΑ-ΙΠ

Η πρωτεϊνική κινάση C (με πιο έντονη καρδιοπροστατευτική δράση το ισομερές PKCε) παίζει κριτικό ρόλο στην κλασσική ΙΠ ως μεσολαβητής. Στην αΑ-ΙΠ ο Weinbrenner και συν (με αποκλεισμό της αορτής ως απομακρυσμένο ισχαιμικό ερέθισμα) και ο Wolfrum και συν (με αποκλεισμό της άνω μεσεντέριας αρτηρίας) διαπίστωσαν ότι ένας μη ειδικός αποκλειστής της PKC (η ουσία chelerythrine) μπορεί να αναστείλει την προστασία του μυοκαρδίου, συμπεραίνοντας έτσι ότι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) διαδραματίζει κύριο ρόλο και στην αΑ-ΙΠ^{99,117}.

4.2.5.4 Διαπερατότητα του μιτοχονδριακού πόρου και αΑ-ΙΠ

Ο μιτοχονδριακός πόρος (mitochondrial permeability transition pore = mPTP) είναι ένας μη ειδικός διάυλος στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου. Η διάνοιξη αυτού του διαύλου στα πρώτα λεπτά μετά την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου μεσολαβεί στον κυτταρικό θάνατο, αναστέλλοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση (με συνέπεια την εξάντληση του ATP) και προκαλώντας εξοίδηση του μιτοχονδρίου. Η κλασσική ΙΠ και η ΙμεταΠ αποτρέπουν την διάνοιξη των διαύλων αυτών^{122,123}.

Ο Zhang και συν σύνδεσε την λειτουργία του mPTP με την αΑ-ΙΠ. Απέδειξε με παροδική ισχαιμική προετοιμασία σκέλους σε αρουραίους, ότι αποκλειστής των κ-οπιουριδίων ανέστειλε την καρδιοπροστασία και ότι τα κ-οπιουριδή προκαλούν διάνοιξη των πόρων mPTP¹²⁴.

4.2.5.5 Ένεργές ρίζες οξυγόνου και αΑ-ΙΠ

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) παίζουν διπλό ρόλο στην βλάβη του μυοκαρδίου από την ισχαιμία/επαναιμάτωση. Έχουν επιβλαβή ρόλο ως μεσολαβητές στην θανατηφόρο βλάβη από επαναιμάτωση και αντίθετα ωφέλιμο ρόλο στην ΙΠ και την ΙμεταΠ¹²⁵⁻¹²⁸.

Ο Weinbrenner και συν απέδειξε τον θετικό ρόλο των ελεύθερων ριζών (ROS) στην αΑ-ΙΠ, καθώς ο αναστολέας των ROS, η ουσία N2-MPG, κατάργησε το προστατευτικό αποτέλεσμα της αΑ-ΙΠ σε αρουραίους με παροδικό αποκλεισμό της κατιούσας αορτής¹²⁹.

4.2.6. Συνδυασμός μηχανισμών

Ο Lim και συν (2010) με πειράματα σε ποντικούς (με προσωρινή ισχαιμία του κάτω άκρου) απέδειξε ότι και οι δυο παράγοντες, ο χυμικός (έλεγχος με αποκλεισμό της σύστοιχης μηριαίας φλέβας) μαζί με τον νευρικό (έλεγχος με διατομή του σύστοιχου μηριαίου νεύρου) είναι απαραίτητοι για την εμφάνιση της αΑ-ΙΠ, ενώ ξεχωριστά οι δύο παράγοντες είχαν θετική αλλά ασθενέστερη δράση¹³⁰.

5. ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Το μυοκάρδιο, μετά την εμβρυική ζωή, έχει έμφυτη ικανότητα να μεταβάλλει το μέγεθος και το σχήμα του με την επίδραση ποικίλων ερεθισμάτων (αιμοδυναμικοί, νευρικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες). Η «πλαστικότητα» αυτή της καρδιάς περιγράφεται με τον όρο **αναδιαμόρφωση** (remodeling), και δεν περιορίζεται μόνο στις μεταβολές από νοσηρές καταστάσεις, αλλά περιλαμβάνει την φυσιολογική ανάπτυξη του οργάνου από τη γέννηση και μετά, καθώς και την υπερτροφία μετά από μακροχρόνια άσκηση ή στην εγκυμοσύνη¹³¹.

Η **υπερτροφία** της καρδιάς αποτελεί μια μορφή αναδιαμόρφωσης. Η εμμένουσα αρτηριακή υπέρταση είναι η συχνότερη αιτία της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Άλλες αιτίες μπορεί να είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η αναιμία, η βαλβιδοπάθεια της αορτής, ο υπερθυρεοειδισμός, η παχυσαρκία και η νεφρική ανεπάρκεια, αλλά και φυσιολογικές καταστάσεις όπως η μακροχρόνια άσκηση και η εγκυμοσύνη^{132,133}.

Όταν η υπερτροφική καρδιά υπερβεί το στάδιο της αντιρρόπησης, επέρχεται η **καρδιακή ανεπάρκεια**. Υπερηχογραφικές μελέτες δείχνουν ότι το 20 % τυχαίου δείγματος υπερτασικών ασθενών έχει αναπτύξει υπερτροφία της αριστερής κοιλίας. Το 15 % του γενικού πληθυσμού έχει υπερτροφία του μυοκαρδίου (ΥΜ) οιασδήποτε αιτιολογίας. Η ΥΜ αποδεδειγμένα αυξάνει τη θνητότητα (κατά 8 φορές) και τη νοσηρότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις (κατά 6-8 φορές), όπως είναι ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, η καρδιακή ανεπάρκεια και το εγκεφαλικό επεισόδιο, στο γενικό πληθυσμό (μελέτη Framingham, αλλά και πολλές άλλες μικρότερες μελέτες). Οι μηχανισμοί που διέπουν τη στενή αυτή σχέση αρτηριακής πίεσης, υπερτροφίας της καρδιάς και ισχαιμικής καρδιακής νόσου είναι σίγουρα σύνθετοι και δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί πλήρως^{132,134}.

Τα παραπάνω δεδομένα δίνουν ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη των μηχανισμών κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση του υπερτροφικού μυοκαρδίου, καθώς και στην προοπτική προστασίας του με ΙΠ και αΑ-ΙΠ. Υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία και συχνά αντικρουόμενες σχετικά με την ΙΠ υπερτροφικού μυοκαρδίου, ενώ η δική μας μελέτη (Voucharas και συν, Μάρτιος 2011) αποτελεί την πρώτη παγκοσμίως που αφορά στην προστασία του υπερτροφικού μυοκαρδίου από την ισχαιμία/επαναιμάτωση κατόπιν πρόκλησης ισχαιμίας άλλου οργάνου (αΑ-ΙΠ)¹³⁵. Ο Moolman 1997 (σε γενετικά υπερτασικούς αρουραίους) και ο Ebrahim 2007 (σε γερασμένους γενετικά υπερτασικούς αρουραίους) δεν διαπίστωσαν θετική επίδραση της κλασσικής ισχαιμικής προετοιμασίας σε υπερτροφικό μυοκάρδιο, ενώ άλλες 7 μελέτες, όλες σε αρουραίους (Speechly-Dick 1994, Pantos 1996, Butler 1999, Rajesh 2004, Butler 2006, Ebrahim 2007 σε άλλη μελέτη του ίδιου με πρόκληση υπερτροφίας με κορτιζόνη, Die 2009), υποστηρίζουν την επιτυχή προστασία του υπερτροφικού μυοκαρδίου¹³⁶⁻¹⁴⁵.

5.1. Μοντέλα πειραματόζωων για τη μελέτη του υπερτροφικού μυοκαρδίου

Η αρτηριακή υπέρταση οδηγεί μαθηματικά στην υπερτροφία της καρδιάς σε όλα τα είδη πειραματόζωων αλλά και στον άνθρωπο και επιλέγεται ως μέθοδος πρόκλησης υπερτροφίας του μυοκαρδίου σε πειραματικά πρωτόκολλα. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα είναι¹⁴⁶⁻¹⁵¹:

- α. Χορήγηση φαρμάκων (αλατοκορτικοειδές, κατεχολαμίνη = ισοπρεναλίνη, θυρεοειδική ορμόνη, χορήγηση του μεθυλικού εστέρα της νιτρο-L-αργινίνης => χρόνια αναστολή της NO συνθετάσης)
- β. Στένωση της αορτής (ανιούσας ή κατιούσας) ή της πνευμονικής αρτηρίας
- γ. Ισχαιμία του νεφρού (στένωση νεφρικής αρτηρίας σε αρουραίους, απόφραξη του ενός νεφρού σε σκύλους και αρουραίους = μοντέλο Goldblatt, two-kidney one clip model)
- δ. Χρόνια άσκηση
- ε. Χρόνια βηματοδότηση της καρδιάς
- στ. Αρτηριοφλεβική αναστόμωση
- ζ. Παχυσαρκία
- η. Αρουραίοι που γίνονται υπερτασικοί με κατανάλωση αλατιού (Dahl 1962, salt sensitive, “s” strain) (αποτέλεσμα επιλεκτικών διασταυρώσεων αρουραίων της φυλής

Sprague-Dawley). Οι αρουραίοι Dahl “r” (Dahl salt resistant rats) από τον ίδιο κλώνο χρησιμοποιούνται για σύγκριση, ως ομάδα ελέγχου.

θ. Γενετικά (αυτόματα) υπερτασικά πειραματόζωα, κυρίως τρωκτικά (spontaneous hypertensive rats = SHR): από αιμομικτική διασταύρωση Wistar-Kyoto η γιαπωνέζικη αλυσίδα αρουραίων των Okamoto and Aoki 1963, η αυστραλέζικη αλυσίδα New Zealand των Smirk and Hall 1958, η ιταλική αλυσίδα Milan strain του Bianchi 1973, η ισραηλινή αλυσίδα Sabra strain του Zamir 1978, η γαλλική αλυσίδα Lyon strain του Vincent 1978. Οι αρουραίοι Wistar-Kyoto με φυσιολογική πίεση χρησιμοποιούνται ως ομάδα ελέγχου.

Οι **αρουραίοι** (επίμυες) **Wistar** (εικόνα 1) χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως πειραματόζωα για τη μελέτη καρδιαγγειακών παθήσεων. Εκτρέφονται εύκολα και οικονομικά, είναι ανθεκτικοί σε ασθένειες και σε διάφορες συνθήκες διαβίωσης, δεν εμφανίζουν αυτόματα νεοπλάσματα, δείχνουν καλή ανοχή στην αναισθησία, έχουν μικρό κύκλο ζωής και αναπαράγονται εύκολα, ενώ η καρδιά τους είναι ιδανική από άποψη χειρισμών και ανατομίας για πειράματα αναρτημένης καρδιάς. Είναι λευκοί αρουραίοι με αλφισμό που ανήκουν στο είδος *Rattus norvegicus*. Αναπτύχθηκαν το 1906 στο Ινστιτούτο Wistar του πανεπιστημίου της Πεννσυλβάνια των Ενωμένων Πολιτειών της Αμερικής από τον φυσιολόγο H. Donaldson, τον επιστημονικό διευθυντή M.J. Greenman, και την ερευνήτρια Helen Dean King. Οι αρουραίοι Wistar είναι το πρώτο στην ιστορία πειραματόζωο με σταθερά χαρακτηριστικά, ενώ στις μέρες μας τουλάχιστον τα μισά ζώα εργαστηρίου, που χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο, είναι απόγονοι της σειράς αυτής¹⁵².



Εικόνα 1. Επίμυς (αρουραίος) της φυλής Wistar

Στη δική μας μελέτη η πρόκληση υπερτροφίας του μυοκαρδίου έγινε με χορήγηση αλατιού και αλατοκορτικοειδούς (φθοριοϋδροκορτιζόνης) από το στόμα (λεπτομέρειες περιγράφονται στο ειδικό μέρος)¹⁵³.

Σε όλα τα μοντέλα η αύξηση της μάζας της αριστερής κοιλίας σχετίζεται με το ύψος της αρτηριακής πίεσης (αυξημένο μεταφορτίο), αν και υπάρχουν κάποιες διαφορές ως προς το χρόνο έναρξης της διάτασης της αριστερής κοιλίας και της εμφάνισης καρδιακής ανεπάρκειας.

Υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν την ανάπτυξη υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας από κατανάλωση αλατιού, χωρίς απαραίτητα να υπάρχει αρτηριακή υπέρταση, μέσω του μηχανισμού της αγγειοτενσίνης II που σχετίζεται με την δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

5.2. Υπερτροφία καρδιάς και στεφανιαία κυκλοφορία

Πειραματικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι η υπερτροφία της καρδιάς επιταχύνει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης στα στεφανιαία αγγεία. Ακόμα, σχετίζεται με μεταβολές στην πυκνότητα, τη δομή και την αγγειοδιασταλτική ικανότητα των στεφανιαίων αγγείων, έτσι ώστε, παρόλο που η απόλυτη στεφανιαία ροή αυξάνεται, ελαττώνεται η πυκνότητα των ενδομυοκαρδιακών τριχοειδών και οι εφεδρείες της στεφανιαίας κυκλοφορίας, ακόμα και σε απουσία αθηροσκλήρωσης.

5.3. Πειραματική ισχαιμία/επαναιμάτωση σε υπερτροφία αριστερής κοιλίας

Σε ολική ισχαιμία της καρδιάς η ισχαιμική σύσπαση (stone heart) επέρχεται συντομότερα και είναι πιο έντονη σε υπερτροφικές καρδιές αρουραίων^{159,160}.

Κατά τη φάση της επαναιμάτωσης η επαναφορά της συσταλτικής ικανότητας καταστέλλεται, ενώ η απελευθέρωση LDH και CK είναι μεγαλύτερη σε υπερτροφικές καρδιές που υποβάλλονται σε καθολική ισχαιμία σε σύγκριση με φυσιολογικές καρδιές^{161,162}.

Πιστεύεται, ότι η ευαισθησία αυτή του υπερτροφικού μυοκαρδίου οφείλεται σε μεταβολές στην παραγωγή ATP, στον μεταβολισμό των μιτοχονδρίων, την συγκέντρωση γαλακτικών και την αυξημένη παραγωγή ROS¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Πάντως, δεν έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η έκταση του εμφράγματος σε υπερτροφικές καρδιές που εκτίθενται σε ισχαιμία/επαναιμάτωση σε σχέση με φυσιολογικές καρδιές, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*^{137,138}.

Έχει, επίσης, βρεθεί ότι το υπερτροφικό μυοκάρδιο αρουραίων (με χορήγηση αλατοκορτικοειδούς ή με στένωση της αορτής ή γενετικά υπερτροφικοί επίμυες) είναι πιο ανθεκτικό στην εξωσωματική κυκλοφορία από το φυσιολογικό μυοκάρδιο¹⁶⁶.

5.4. Υπερτροφία της καρδιάς και ισχαιμική προετοιμασία

Σε πολλές μελέτες σε διάφορα μοντέλα πειραματόζωων έχει αποδειχθεί προστασία του υπερτροφικού μυοκαρδίου με ισχαιμική προετοιμασία, όπως ακριβώς και στην ισχαιμική προετοιμασία φυσιολογικού μυοκαρδίου (ίδια μορφή προστασίας, ίδιοι μηχανισμοί). Περιορισμός των μελετών αυτών είναι η απουσία υπερτροφίας για μακρό χρονικό διάστημα και η απουσία καρδιακής ανεπάρκειας^{20,137}.

6. ΜΟΝΤΕΛΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Προκειμένου να μελετηθούν οι ευεργετικές επιδράσεις του φαινομένου της ισχαιμικής προστασίας, χρησιμοποιούνται από τους ερευνητές διάφορα μοντέλα και πειραματόζωα^{1,3,4}.

6.1. In situ μοντέλο εμποτιζόμενης καρδιάς

Η καρδιά αιματώνεται φυσιολογικά μέσω της στεφανιαίας κυκλοφορίας. Η ισχαιμία προκαλείται με τη χρήση αιμοστατικής λαβίδας με την οποία διακόπτεται η ροή του αίματος (ολική ή περιοχική). Η επαναιμάτωση εξασφαλίζεται με το άνοιγμα της αιμοστατικής λαβίδας.

6.2. In vitro απομονωμένη, εμποτιζόμενη καρδιά

Δύο είναι κυρίως τα μοντέλα απομονωμένων καρδιών που χρησιμοποιούνται σήμερα. Πρόκειται για το **σύστημα αντίστροφης άρδευσης** που περιγράφηκε από τον Langendorff το 1895 και το **μοντέλο της λειτουργικής καρδιάς** που ανέπτυξαν ο Neely και συν (1967) και ο Taegmeyer και συν (1980)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Πλεονέκτημα θεωρείται το γεγονός ότι στην απομονωμένη καρδιά απουσιάζουν οι νευροορμονικοί

παράγοντες, που υπάρχουν σε *in vivo* καταστάσεις και επηρεάζουν την λειτουργική συμπεριφορά του μυοκαρδίου. Και τα δύο μοντέλα επιτρέπουν την άσκηση όλων των τύπων ισχαιμίας-υποξίας και την επιλεγμένη τροποποίηση του μέσου άρδευσης. Επιτρέπουν, ακόμη, την προσθήκη ουσιών και την αξιολόγηση της δράσης τους. Οι ισχαιμικές δομικές μεταβολές μπορούν να μελετηθούν με ιστοχημικές τεχνικές (χρώσεις) ή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

6.2.1. Το πειραματικό μοντέλο *Langendorff*

Σ' αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως καρδιές μικρών ζώων, όπως αρουραίων και κουνελιών. Η καρδιά αφαιρείται από το θώρακα του ζώου και στη συνέχεια διασωληνώνεται η αορτή, μέσω της οποίας γίνεται η άρδευση των στεφανιαίων αρτηριών. Το διάλυμα άρδευσης ρέει στα στεφανιαία αγγεία, καθώς η αορτική βαλβίδα κλείνει από την πίεση που ασκεί σε αυτή το υγρό, που διέρχεται από την αορτική κάνουλα. Η φλεβική παροχέτευση καταλήγει στο δεξιό κόλπο μέσω του στεφανιαίου κόλπου και εξέρχεται από τις ανοικτές κοίλες φλέβες και την πνευμονική αρτηρία. Η αριστερή κοιλία είναι κενή ή δέχεται ελάχιστη ποσότητα διαλύματος άρδευσης μέσω των θηβεσιανών φλεβών. Γι' αυτό και το παρασκεύασμα εμφανίζει ελάχιστο εξωτερικό έργο.

Το διάλυμα άρδευσης συνήθως πέφτει από στήλη με σταθερή υδροστατική πίεση (παρασκεύασμα σταθερής πίεσης άρδευσης). Η στεφανιαία ροή μεταβάλλεται ανάλογα με τις διακυμάνσεις της διατοχωματικής τάσης της αριστερής κοιλίας και του τόνου των αγγείων. Εναλλακτικά η καρδιά μπορεί να αρδεύεται με σύστημα ελέγχου της ροής μέσω αντλίας (παρασκεύασμα σταθερής ροής). Σ' αυτή την περίπτωση επιτρέπονται ρυθμίσεις και μεταβολές του ρυθμού ροής και γι' αυτό μπορούν να εφαρμοστούν καταστάσεις ισχαιμίας χαμηλής ροής, όταν το περιεχόμενο οξυγόνο και το μέγεθος της ροής άρδευσης δεν επαρκούν για να διατηρήσουν επαρκή συσταλτική δραστηριότητα.

Το μέσο άρδευσης των στεφανιαίων αγγείων μπορεί να είναι οξυγονωμένο ηλεκτρολυτικό διάλυμα ή αίμα, το οποίο προέρχεται από ζώο-δότη συνδεδεμένο σε παράλληλη διάταξη με την απομονωμένη καρδιά. Η χρήση αίματος παρόλο που προσομοιάζει καλύτερα με τις *in vivo* καταστάσεις ενέχει τον κίνδυνο απόφραξης των αρτηριών από το σχηματισμό αφρού και θρόμβων και τον κίνδυνο αιμόλυσης, περιορίζοντας έτσι το χρόνο στον οποίο το παρασκεύασμα λειτουργεί κάτω από σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες. Η χρήση ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων επιτρέπει

υψηλότερη στεφανιαία ροή λόγω μικρότερης γλοιότητας, όμως προκαλεί μεγαλύτερο οίδημα λόγω μικρότερης ωσμωτικότητας.

Στο μοντέλο αυτό καθολική ισχαιμία προκαλείται με τον ολικό αποκλεισμό της αορτής (ή τη διακοπή χορήγησης του διαλύματος άρδευσης), περιοχική ισχαιμία με την απολίνωση στεφανιαίας αρτηρίας, και υποξία με τη μείωση του περιεχόμενου οξυγόνου του διαλύματος άρδευσης. Οι πειραματικές διατάξεις τύπου Langendorff επιτρέπουν την εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης της καρδιάς ανεξάρτητα από μεταβολές του προφορτίου και του μεταφορτίου. Η φλεβική παροχέτευση μπορεί εύκολα να συλλέγεται και να αναλύεται βιοχημικά.

6.2.2 Το πειραματικό μοντέλο της λειτουργικής καρδιάς

Στο μοντέλο αυτό η καρδιά μετά την αφαίρεσή της αρδεύεται αντίστροφα μέσω της αορτής, μέχρι την σταθεροποίησή της. Στη συνέχεια διασωληνώνεται ο αριστερός κόλπος, έτσι ώστε η αριστερή κοιλία να πληρούται «φυσιολογικά» όπως *in vivo*. Η αριστερή κοιλία αρχίζει να εξωθεί προς την αορτή ενάντια σε μεταβαλλόμενο, κατά βούληση, μεταφορτίο. Το διάλυμα άρδευσης ανακυκλώνεται συνεχώς διαμέσου του αριστερού κόλπου. Το μοντέλο αυτό προσφέρει το πλεονέκτημα της μεταβολής και ρύθμισης του προφορτίου και μεταφορτίου της αριστερής κοιλίας, δηλαδή του όγκου πλήρωσης του αριστερού κόλπου και της στήλης εναντίον της οποίας εξωθεί η αριστερή κοιλία. Σε αντίθεση με το μοντέλο *Langendorff* δεν επιτρέπει την άσκηση ισχαιμίας χαμηλής ροής.

6.3. Απομονωμένα, εμβαπτιζόμενα σε θεραπευτικό διάλυμα δείγματα καρδιακού ιστού

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί θηλοειδής μυς που εκτέμνεται από τη δεξιά κοιλία και εμβαπτιζεται σε κατάλληλο διάλυμα εμποτισμού. Η ισχαιμία συνίσταται σε ταχεία βηματοδότηση σε συνδυασμό με υποξικό διάλυμα εμποτισμού που δεν περιέχει θεραπευτικό υπόστρωμα. Η δύναμη της σύσπασης των μυοκαρδιακών ινών κατά την διάρκεια της επαναιμάτωσης χρησιμοποιείται ως παράμετρος αξιολόγησης του φαινομένου.

6.4. Καλλιέργειες καρδιακών μυοκυττάρων

Πρόκειται για καλλιέργειες εμβρυικών ή ενήλικων κυττάρων (πχ ενήλικοι αρουραίοι και κουνέλια ή έμβρυα κότας). Το ισχαιμικό επεισόδιο μπορεί να είναι η υποξία ή η αναστολή του μεταβολισμού (πχ με κυάνιο). Η εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου και η ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών μπορεί να εκτιμηθεί με ανίχνευση

παραγωγής ουσιών (πχ CK), διαπερατότητα σε χρωστικές (Trypan bleu), μεταβολή του σχήματος των κυττάρων ή την απώλεια της γράμμωσης τους.

6.5. Απομονωμένα καρδιακά κύτταρα

Τα μυοκύτταρα αμέσως μετά την απομόνωσή τους καθίστανται ισχαιμικά με φυγοκέντρηση, συσσωμάτωσή τους σε ίζημα και επικάλυψή τους με ορυκτέλαιο.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 28 αρσενικοί αρουραίοι (επίμυες) τη φυλής Wistar, που χωρίστηκαν σε 4 ομάδες από 7 πειραματόζωα η κάθε μία:

ομάδα ελέγχου με φυσιολογικό μυοκάρδιο	Ομάδα Α
ομάδα με ισχαιμική προετοιμασία-φυσιολογικό μυοκάρδιο	Ομάδα Β
ομάδα ελέγχου με υπερτροφικό μυοκάρδιο	Ομάδα Γ
ομάδα με ισχαιμική προετοιμασία-υπερτροφικό μυοκάρδιο	Ομάδα Δ

Η εκτροφή των πειραματόζωων και η διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε σύμφωνα με τις «Οδηγίες για τη φροντίδα και χρήση των πειραματόζωων» (Ελληνική νομοθεσία 160/1991), βασισμένες στη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Οδηγία 86/609).

Πρόκληση υπερτροφίας

Σε 14 από τους 28 αρουραιούς που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά, με τυχαία επιλογή, εγκαταστάθηκε υπερτροφία της καρδιάς με πρόκληση υπέρτασης χορηγώντας από το στόμα ένα συνθετικό αλατοκορτικοειδές (φθοριοϋδροκορτιζόνη) και φυσιολογικό ορό (αλάτι NaCl 0.9 %) για 30 ημέρες^{170,171}.

Τα πειραματόζωα ήταν αρχικά 2 μηνών και ζύγιζαν 150 – 200 γραμμάρια. Το μοντέλο υπερτροφίας με χορήγηση κορτιζόνης και αλατιού προκαλεί υπερφόρτωση της κυκλοφορίας (pressure overload induced cardiac hypertrophy model) με αποτέλεσμα την υπέρταση, που οδηγεί με μαθηματική ακρίβεια στην υπερτροφία του μυοκαρδίου¹⁷².

Δική μας τεχνική με παγκόσμια πρωτοτυπία και εφαρμογή αποτελεί η πρόκληση υπερτροφίας με χορήγηση αλατοκορτικοειδούς από το στόμα σε πειραματόζωα (Voucharas και συν 2011), αποφεύγοντας την χορήγηση κορτικοειδούς με υποδόρια ένεση ή με συσκευή ελεγχόμενης υποδόριας έγχυσης¹⁵³. Οι τελευταίες τεχνικές προκαλούν στα πειραματόζωα πόνο και στρες και συνεπακόλουθη ταχυκαρδία κατά την εφαρμογή τους (που θα μπορούσε να θεωρηθεί ακόμη και προετοιμασία του μυοκαρδίου) αλλά και έχουν την πιθανότητα τοπικής λοίμωξης. Εξάλλου οι άλλες τεχνικές πρόκλησης υπερτροφίας της καρδιάς, όπως αναφέρθηκαν στο γενικό μέρος, σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνητότητας των ζώων (έως 20 %), ενώ δεν είναι εύκολη και με χαμηλό κόστος η προμήθεια και διατήρηση από όλα τα εργαστήρια σειρών με συγγενή υπέρταση και υπερτροφία της καρδιάς. Επιπλέον η σύγκριση

γενετικά υπερτασικών αρουραίων με άλλους γενετικά νορμοτενσικούς, ουσιαστικά είναι σύγκριση διαφορετικών κλώνων πειραματόζωων μεταξύ τους. Η δική μας τεχνική εξασφαλίζει τη βέβαιη και σταθερή δόση κορτικοειδούς και αλατιού απ' όλα τα πειραματόζωα καθώς και την αντιπαραβολή ζώων από τον ίδιο κλώνο¹⁵³.

Παράλληλα με τους 14 αυτούς αρουραίους με υπερτροφικό μυοκάρδιο, άλλοι 14 λευκοί αρουραίοι ηλικίας 2 μηνών και βάρους 150-200 γραμμαρίων εκτράφηκαν με την ίδια στερεή τροφή πίνοντας νερό της βρύσης για 30 ημέρες. Σε ηλικία 3 μηνών όλα τα πειραματόζωα (τόσο με υπερτροφικό όσο και με φυσιολογικό μυοκάρδιο) ζύγιζαν 200-250 γραμμάρια και ήταν έτοιμα για τη διεξαγωγή του πειράματος. Η στερεή τροφή (τυποποιημένη τροφή για πειραματόζωα) παρείχε όλα τα θρεπτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία και ήταν η ίδια για όλα τα ζώα.

Στα 14 ζώα που σχεδιάστηκαν να αποτελέσουν τις δύο ομάδες με υπερτροφική καρδιά, χορηγούνταν καθημερινά να πιουν 12.5 κυβικά εκατοστά φυσιολογικού ορού με φθοριούδροκορτιζόνη (σύνθεση του διαλύματος 0.9 % NaCl, 0.2 % KCl, 2.54 mEq % Mg⁺⁺, 0.002 mg % φθοριούδροκορτιζόνη) αντί για νερό της βρύσης, για το πρώτο μισό κάθε ημέρας. Την υπόλοιπη ημέρα ήταν ελεύθερα να πιουν όση ποσότητα ήθελαν φυσιολογικού ορού (σύνθεση 0.9 % NaCl, 0.2 % KCl, 2.54 mEq % Mg⁺⁺). Έχοντας κάνει την παρατήρηση από τη χρόνια εκτροφή λευκών αρουραίων ότι χρειάζονται περίπου 25 κυβικά εκατοστά πόσιμου ύδατος ημερησίως, εξασφαλίζαμε με αυτήν την τεχνική την σταθερή πρόσληψη 0.00025 χιλιοστών του γραμμαρίου φθοριούδροκορτιζόνης από κάθε ζώο κάθε ημέρα. Η ταυτόχρονη χορήγηση καλίου και μαγνησίου είχε σκοπό να αντισταθμίσει τις απώλειες των ιόντων που οφείλονται στη δράση του αλατοκορτικοειδούς.

Το πηλίκο του βάρους της καρδιάς προς το βάρος σώματος (BK/ΒΣ) χρησιμοποιήθηκε ως **δείκτης της μυοκαρδιακής μάζας**. Η μέση τιμή του βάρους σώματος ήταν η ίδια στατιστικά ανάμεσα στους αρουραίους με υπερτροφικό και φυσιολογικό μυοκάρδιο (πίνακας). Η σχέση, όμως, βάρος της καρδιάς προς το βάρος σώματος (BK/ΒΣ) διέφερε κατά πολύ (υπέρβαση περίπου κατά 46 % στις υπερτροφικές καρδιές) (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Η σχέση βάρους σώματος προς βάρους καρδιάς στους αρουραίους με φυσιολογικό και υπερτροφικό μυοκάρδιο.

	Αρουραίοι με φυσιολογική καρδιά n=14	Αρουραίοι με υπερτροφική καρδιά n=14	p
Βάρος σώματος	219.8 ± 3.079 γραμμάρια	222.9 ± 2.548 γραμμάρια	0.444
βάρους της καρδιάς προς το βάρος σώματος	0.004301±0.0001466	0.006289 ± 0.0002148	<0.0001*

Το βάρος σώματος δεν διέφερε ανάμεσα στους αρουραίους με φυσιολογικό και υπερτροφικό μυοκάρδιο, ενώ η σχέση βάρους της καρδιάς προς το βάρος σώματος ήταν σημαντικά διαφορετική. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Με αστερίσκο (*) επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά.

Το βάρος σώματος καθώς και το πηλίκο ΒΚ/ΒΣ δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις προς σύγκριση ομάδες (ομάδα 1 με ομάδα 2 και αντίστοιχα ομάδα 3 με ομάδα 4) (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Μέση τιμή του βάρους σώματος καθώς και της σχέσης βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος στις τέσσερις ομάδες.

	Φυσιολογική καρδιά – ομάδα ελέγχου	Φυσιολογική καρδιά με προετοιμασία	p	Υπερτροφική καρδιά – ομάδα ελέγχου	Υπερτροφική καρδιά με προετοιμασία	p
ΒΣ	217.4 ± 3.00 γραμμάρια	222.2 ± 5.48 γραμμάρια	0.4572	221.4 ± 4.43 γραμμάρια	224.5 ± 2.78 γραμμάρια	0.5644
ΒΚ/ΒΣ	0.00442 ± 0.00019	0.00418 ± 0.00022	0.4251	0.00596 ± 0.00033	0.00632 ± 0.00023	0.3884

Τα ζεύγη των ομάδων που συγκρίθηκαν μεταξύ τους δεν διέφεραν σημαντικά. ΒΚ = βάρος καρδιάς, ΒΣ = βάρος σώματος. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

Δεν υπήρχε καμία ένδειξη για ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας στις ομάδες με υπερτροφικό μυοκάρδιο. Τα κριτήρια ήταν η ύπαρξη συλλογών στο περικάρδιο, την υπεζωκοτική και την περιτοναϊκή κοιλότητα καθώς και το πηλίκο βάρους πνευμόνων/βάρος σώματος και βάρους ήπατος/βάρος σώματος μεταξύ των αρουραίων

με υπερτροφικό και φυσιολογικό μυοκάρδιο (πίνακας 3). Η μελέτη των κοιλοτήτων καθώς και η λήψη του ήπατος και των πνευμόνων για υπολογισμό του βάρους τους έγινε αμέσως μετά τη θυσία του ζώου, παράλληλα με τη λήψη της καρδιάς.

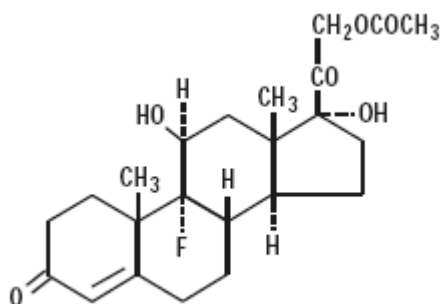
Πίνακας 3. Η σχέση βάρους πνευμόνων/βάρους σώματος (ΒΠ/ΒΣ) και βάρους ήπατος/βάρους σώματος (ΒΗ/ΒΣ) μεταξύ των αρουραίων με υπερτροφικό και φυσιολογικό μυοκάρδιο που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

	Φυσιολογικό μυοκάρδιο n=14	Υπερτροφικό μυοκάρδιο n=14	p
ΒΠ/ΒΣ (x 1000)	5.534±0.08274	5.396±0.04775	0.190
ΒΗ/ΒΣ (x 1000)	44.13±0.3586	44.02±0.3085	0.8272

Τα όργανα που δυνητικά επηρεάζονται από την καρδιακή ανεπάρκεια είχαν την ίδια ανάπτυξη στους αρουραίους με φυσιολογική και υπερτροφική καρδιά. ΒΣ = βάρους σώματος, ΒΠ = βάρους πνευμόνων. ΒΗ = βάρους ήπατος. Οι τιμές εκφράζονται ως η μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

Φαρμακολογία της φθοριοϋδροκορτιζόνης

Η φθοριοϋδροκορτιζόνη είναι ένα συνθετικό αδρενοκορτικοστεροειδές με πολύ ισχυρές αλατοκορτικοειδείς ιδιότητες και μέτρια γλυκοκορτικοειδή δράση. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται μόνο για τις αλατοκορτικοειδείς ιδιότητες. Η χημική ονομασία είναι 9-fluoro-11β,17,21-trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione 21-acetate και η χημική της δομή φαίνεται στο σχήμα 4.



Σχήμα 4. Η χημική δομή της φθοριοϋδροκορτιζόνης

Η φθοριοϋδροκορτιζόνη διατίθεται στο εμπόριο (fludrocortisone acetateTM, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας, ΙΦΕΤ, Παλλήνη Αττικής, Ελλάδα) ως χάπια για λήψη από το στόμα. Κάθε ταμπλέτα περιέχει 0.1 mg της δραστικής ουσίας. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται ως μέρος της θεραπείας αποκατάστασης στην νόσο του Addison (πρωτοπαθής και δευτεροπαθής αδρενοκορτικοειδής ανεπάρκεια), στο αδρενογενετικό σύνδρομο με απώλεια αλατιού, και στη χρόνια ορθοστατική υπόταση. Οι κυριότερες παρενέργειες του φαρμάκου περιλαμβάνουν: Κατακράτηση νερού και αλατιού, υπέρταση, υποκαλιαιμία, κεφαλαλγία, μυϊκή αδυναμία, κόπωση, ευπάθεια στις λοιμώξεις, καθυστερημένη επούλωση τραυμάτων, αυξημένη εφίδρωση, υπερτρίχωση, δυσπεψία, πεπτικό έλκος, οστεοπόρωση, αϋπνία, κατάθλιψη, πρόσληψη βάρους, ελαττωμένη ανοχή στους υδατάνθρακες, μεταβολές στον καταμήνιο κύκλο, καταρράκτη, γλαύκωμα, αυξημένη ενδοκράνια πίεση¹⁷³⁻¹⁷⁶.

Η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική του φαρμάκου έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο, το σκύλο, τον πίθηκο, τους αρουραίους και στο χοίρο, ύστερα από παρεντερική ή εντερική χορήγηση.

Η φυσιολογική του δράση μοιάζει ποιοτικά με αυτή της υδροκορτιζόνης. Όμως οι επιδράσεις του φαρμάκου, κυρίως στην ηλεκτρολυτική ισορροπία και στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, είναι σημαντικά μεγαλύτερες ποσοτικά και χρονικά. Τα αλατοκορτικοειδή δρουν στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο του νεφρού, προάγοντας την επαναρρόφηση του νατρίου και την αποβολή του καλίου. Έτσι σε μικρές δόση από το στόμα η φθοριοϋδροκορτιζόνη προκαλεί σημαντική κατακράτηση νατρίου και αυξημένη απέκκριση καλίου. Ακόμη αυξάνει την αρτηριακή πίεση, προφανώς από την δράση της στα επίπεδα των ηλεκτρολυτών. Σε μεγαλύτερες δόσεις αναστέλλει την ενδογενή έκκριση των αδρενοκορτικοειδών, την λειτουργία του θύμου και την έκκριση κορτικοτροπίνης από την υπόφυση. Επίσης αυξάνει την αποδόμηση του γλυκογόνου του ήπατος και εάν η λήψη πρωτεϊνών είναι ανεπαρκής, προκαλεί αρνητικό ισοζύγιο αζώτου. Η φθοριοϋδροκορτιζόνη απορροφάται ταχέως και πλήρως από το έντερο. Η ημίσεια ζωή της στο πλάσμα είναι περίπου 3.5 ώρες και η δράση της (βιολογική ημίσεια ζωή) περίπου 18-36 ώρες. Στους αρουραίους το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου απεκκρίνεται από τη χολή. Ένα μέρος της απορροφάται ξανά από το έντερο και το υπόλοιπο απομακρύνεται με τα κόπρανα^{177,178}.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Αναισθησία του πειραματόζωου

Η νάρκωση των πειραματόζωων έγινε στο κλουβί τους με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση νατριούχου πεντοθάλης, με εφάπαξ δόση 100 mgr/Kgr (Pentothal™, Abbott Laboratories, Italy) ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης και ανώδυνη αναισθησία κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας του σκέλους (ομάδες με προετοιμασία της καρδιάς) και στη συνέχεια η ευθανασία του ζώου (όλες οι ομάδες) για να χρησιμοποιηθεί η καρδιά για το πείραμα (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πεντοθάλης

Αμέσως μετά την αναισθητοποίηση του ζώου αποκαλύφθηκε η μηριαία φλέβα απ' όπου και χορηγήθηκε ηπαρίνη (300 IU/Kgr) (εικόνα 3).

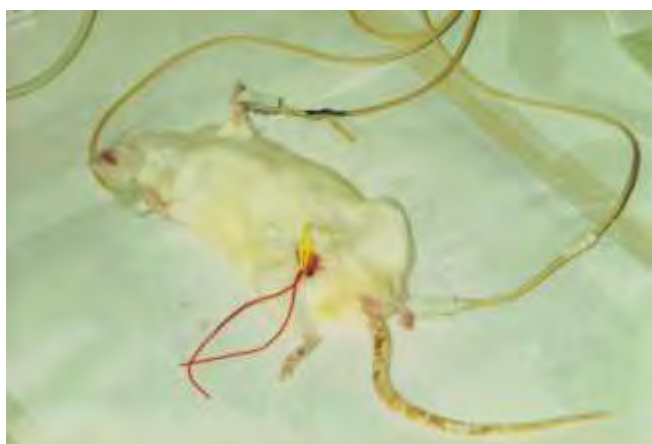


Εικόνα 3. Χορήγηση ηπαρίνης από τη μηριαία φλέβα.

Ισχαιμική προετοιμασία του μυοκαρδίου με παροδική ισχαιμία σκέλους

Σε όλα τα ζώα, τα οποία προγραμματίστηκαν για προετοιμασία της καρδιάς μέσω ισχαιμίας απομακρυσμένου οργάνου, παρασκευάστηκε η δεξιά κοινή μηριαία αρτηρία (αμέσως κάτω από το βουβωνικό σύνδεσμο). Η μηριαία αρτηρία αποκλείστηκε για 20 λεπτά με ατραυματικό βρόγχο από σιλικόνη (εικόνα 1). Στη συνέχεια η κυκλοφορία του σκέλους αποκαταστάθηκε για 10 λεπτά.

Τα επόμενα βήματα του πειράματος ήταν τα ίδια για όλες τις ομάδες.



Εικόνα 1. Στο αναισθητοποιημένο ζώο έχει αποκαλυφθεί και αποκλειστεί προσωρινά η μηριαία αρτηρία, με αποτέλεσμα την ισχαιμία του σκέλους.

Χειρουργική προετοιμασία – ανάρτηση καρδιάς

Γίνεται σε κάθε ζώο, χωρίς καθυστέρηση, μέση άνω πρόσθια κοιλιακή τομή και διατέμνεται προσεκτικά το διάφραγμα. Η τομή επεκτείνεται αμφοτερόπλευρα στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, δεξιά και αριστερά, κατά μήκος των μαστικών γραμμών, από το πλευρικό τόξο έως την κλείδα. Ανασηκώνεται το πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα και αποκαλύπτονται οι πνεύμονες και τα όργανα του μεσοθωρακίου (εικόνα 4). Διατέμνονται η κατιούσα θωρακική αορτή, η τραχεία, οι κοίλες φλέβες και αφαιρούνται συνολικά (en block) η καρδιά, οι πνεύμονες και τα υπόλοιπα όργανα της θωρακικής κοιλότητας (οισοφάγος, θύμος, τραχεία). Όλο το παρασκεύασμα τοποθετείται αμέσως σε παγωμένο διάλυμα άρδευσης (καρδιοπληγικό διάλυμα – θερμοκρασία 0° - 4° C). Η γρήγορη αφαίρεση της καρδιάς και η τοποθέτηση σε

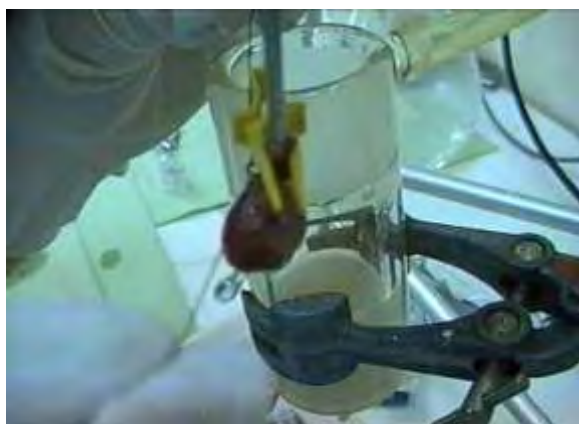
κρυοπληγικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα η καρδιά να πάψει να συσπάται και να ελαττώνεται ο μεταβολισμός της, ώστε να περιορίζονται οι συνέπειες της ισχαιμίας. Παράλληλα, με τη βοήθεια δεύτερου παρασκευαστή στο εργαστήριο, ελευθερώνεται το ήπαρ κόβοντας τους συνδέσμους και τα αγγεία του και αφού το όργανο σκουπιστεί με διηθητικό χαρτί ζυγίζεται σε ζυγαριά ακριβείας. Όσο η καρδιά παραμένει στο κρυοπληγικό διάλυμα, αφαιρείται ο θύμος αδένας, οι πνεύμονες, ο οισοφάγος και η τραχεία και παρασκευάζεται το αορτικό τόξο, το οποίο διατέμνεται στο ύψος της έκφυσης της αριστερής υποκλειδίας αρτηρίας.



Εικόνα 4. Διάνοιξη του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος. Αποκαλύπτονται η καρδιά, οι πνεύμονες και το ήπαρ.

Η καρδιά διασωληνώνεται και αναρτάται στη συσκευή άρδευσης. Η μεταλλική ακίδα της συσκευής άρδευσης (αορτική κάνουλα) προωθείται ελαφρά στην ανιούσα αορτή, προσέχοντας να μην προκληθεί ανεπάρκεια της αορτικής βαλβίδας ή απόφραξη των στομίων των στεφανιαίων αρτηριών. Η αορτή στερεώνεται στη θέση αυτή με ράμμα μεταξύ 4/0 σε εγκοπή που φέρει η κάνουλα (εικόνα 5). Κατά τη διασωλήνωση της αορτής από την κάνουλα ρέει συνεχώς διάλυμα άρδευσης, ώστε να εξαερώνεται η αορτή και να αποφευχθεί εμβολή των στεφανιαίων από φυσαλίδες αέρα. Ο χρόνος, που μεσολαβεί από την αφαίρεση της καρδιάς μέχρι την ανάρτησή της, δεν ξεπερνά το ένα λεπτό της ώρας. Μια μικρή τομή γίνεται στη βάση της πνευμονικής αρτηρίας, ώστε το διάλυμα άρδευσης να ρέει ανεμπόδιστα (ρίζα της αορτής, όστια, στεφανιαίος κόλπος, κοίλες φλέβες και δεξιά κοιλία, πνευμονική αρτηρία).

Η καρδιά αρχίζει να συσπάται αμέσως μετά την ανάρτηση στη συσκευή άρδευσης και τη ροή του διαλύματος στα στεφανιαία αγγεία και βρίσκεται πλέον στη φάση της σταθεροποίησης.



Εικόνα 5. Η καρδιά αναρτάται στη συσκευή άρδευσης. Προετοιμάζεται ο βρόγχος του ράμματος που θα στερεώσει την αορτή στην αορτική κάνουλα. Ήδη το έκπλυμα ρέει από τον δεξιό κόλπο και «στάζει» από την καρδιά.

Οι πνεύμονες στεγνώνονται ελαφρά με διηθητικό χαρτί και ζυγίζονται, ώστε η σχέση βάρους τους με το σωματικό βάρος του ζώου, όπως και του ήπατος, να χρησιμοποιηθεί για τον αποκλεισμό καρδιακής ανεπάρκειας στα πειραματόζωα με υπερτροφική καρδιά.

Συσκευή άρδευσης- πειραματική διάταξη Langendorff

Για το κύριο μέρος του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη Langendorff, σταθερής πίεσης άρδευσης¹⁶⁷. Η συσκευή με την οποία επιτυγχάνεται η άρδευση των απομονωμένων καρδιών αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

- α. ένα γυάλινο δοχείο (στην πραγματικότητα 3 όμοια δοχεία που επικοινωνούν μεταξύ τους) με διπλό τοίχωμα, όπου αποθηκεύεται το διάλυμα άρδευσης
- β. ένα γυάλινος σωλήνας με διπλό τοίχωμα, μέσω του οποίου ρέει το διάλυμα άρδευσης από το δοχείο αποθήκευσης προς την καρδιά
- γ. ένα γυάλινο δοχείο με διπλό τοίχωμα, όπου προφυλάσσεται η καρδιά και διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (εικόνα 6)

δ. μια περιστροφική αντλία ροής, με την οποία εξασφαλίζεται η συνεχής και σταθερή πλήρωση του δοχείου αποθήκευσης, από τη δεξαμενή που περιέχει το προετοιμασμένο διάλυμα άρδευσης

ε. μια φιάλη μείγματος αερίων O₂ 95 % και CO₂ 5 %

στ. ένα αγωγό συνδεδεμένο με τη φιάλη αερίων και σταθερά εμβαπτισμένο στο δοχείο αποθήκευσης του διαλύματος άρδευσης

ζ. μια μεταλλική ακίδα με αυλό (αορτική κάνουλα) διαμέτρου 3 mm

η. μια βαλβίδα ροής, ώστε να ρυθμίζεται η ροή του διαλύματος άρδευσης (από μηδενική κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας έως τη φυσιολογική ροή στα στεφανιαία κατά την σταθεροποίηση ή τον επανεμποτισμό)

θ. ένας κυκλοφορητή νερού σταθερής θερμοκρασίας 37 °C

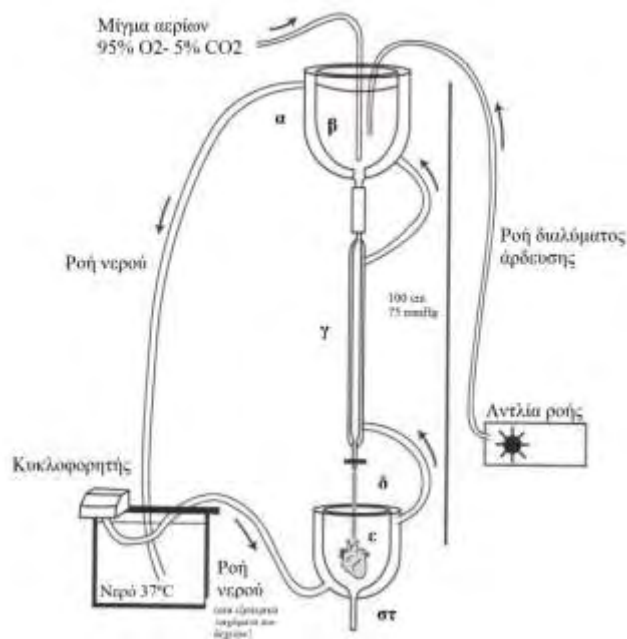
Οι κοιλότητες που περικλείονται ανάμεσα στα διπλά τοιχώματα των δοχείων ενώνονται μεταξύ τους με σωλήνες σιλικόνης. Στην εξωτερική κοιλότητα ρέει συνεχώς νερό σταθερής θερμοκρασίας (37 °C), διατηρώντας έτσι το διάλυμα άρδευσης στο κλειστό κύκλωμα της εσωτερικής κοιλότητας αλλά και την καρδιά στην ίδια σταθερή θερμοκρασία, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το δοχείο αποθήκευσης του διαλύματος άρδευσης βρίσκεται σε απόσταση ύψους 1 μέτρου από την αορτική κάνουλα, ώστε η καρδιά να αρδεύεται με σταθερή πίεση 75 mmHg.

Τα δοχεία και οι σωλήνες στερεώνονται με μεταλλικούς βραχίονες, που σχηματίζουν μεταλλικό πλέγμα. Έτσι εξασφαλίζεται η σταθερότητα της συσκευής.

Τα μέρη της συσκευής φαίνονται στο σχήμα 5 και η συσκευή του εργαστηρίου μας στην εικόνα 7.



Εικόνα 6. Δοχείο με διπλά τοιχώματα για να προστατεύει και να κρατά σταθερή τη θερμοκρασία της καρδιάς



Σχήμα 5. Συσκευή άρδευσης. α= δοχείο αποθήκευσης διαλύματος άρδευσης, β= αγωγός συνδεδεμένος με τη φιάλη αερίων, γ= σωλήνας ροής του διαλύματος άρδευσης από το δοχείο αποθήκευσης προς την καρδιά, δ= βαλβίδα για τη ρύθμιση της ροής του διαλύματος άρδευσης, ε= ακίδα με αυλό για την ανάρτηση της καρδιάς, στ= δοχείο προφύλαξης της καρδιάς



Εικόνα 7. Η συσκευή άρδευσης του εργαστηρίου μας

Διάλυμα άρδευσης

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την άρδευση των καρδιών ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα των Krebs και Henseleit. Το διάλυμα έχει pH 7.4 στους 37 °C και η χημική του σύσταση είναι σε mmol/L: 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 118.5 NaCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂ PO₄, 2.5 CaCl₂ και 10 γλυκόζη, σε απιονισμένο νερό¹⁷⁹.

Το διάλυμα εξασφαλίζει στην καρδιά τα απαραίτητα ιόντα που περιέχει το αίμα ή το πλάσμα και επαρκή ποσότητα ενέργειας.

Το διάλυμα πριν τη χρήση του φιλτράρεται σε φίλτρο μικροπόρων 5μM (καθώς ακόμη και τα πιο καθαρά χημικά του εμπορίου περιέχουν μικροπροσμίξεις), ενώ στη διάρκεια της άρδευσης οξυγονώνεται συνεχώς από το μίγμα αερίων O₂ 95 % και CO₂ 5 %. Το CO₂ είναι απαραίτητο για τη διόρθωση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος, που βασίζεται στα διττανθρακικά ιόντα¹⁸⁰.

Παρακολούθηση και καταγραφή δεδομένων

Στην πειραματική διάταξη απομονωμένης καρδιάς με τη μέθοδο Langerdorff, η αριστερή κοιλία είναι κενή περιεχομένου. Το σύστημα λειτουργεί χωρίς να επηρεάζεται από το προφορτίο και το μεταφορτίο.

Για να μετρήσουμε τις πιέσεις στην αριστερή κοιλία και να μελετήσουμε τις συστολικές και διαστολικές ιδιότητες του μυοκαρδίου, είναι απαραίτητη η εισαγωγή στην αριστερή κοιλία ενός μπαλονιού με υγρό, ο όγκος του οποίου να παραμένει σταθερός σε όλες τις φάσεις του καρδιακού κύκλου. Έτσι θα παρακολουθούνται και θα καταγράφονται οι πιέσεις που αναπτύσσονται σε σταθερό όγκο.

Ο καθετήρας που χρησιμοποιείται είναι αυτοσχέδιος και παρασκευάζεται στο εργαστήριό μας. Ο σωλήνας του αποτελείται από άκαμπτο υλικό (πολυαιθυλένιο, που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αρτηριακής πίεσης στον άνθρωπο – αρτηριακή προέκταση). Το ένα άκρο του αγωγού κλείνεται με σιλικόνη. Κοντά στο άκρο, στην πλάγια επιφάνεια δημιουργείται οπή. Στο άκρο αυτό, με τρόπο ώστε να περικλείει υδατοστεγώς την οπή, προσαρμόζεται μπαλόνι φτιαγμένο από ελαστική μεμβράνη (latex). Η μεμβράνη στερεώνεται στο σωλήνα με ράμμα μεταξύ 4/0. (σχήμα 6).



Σχήμα 6. Καθετήρας μέτρησης των πιέσεων. α= άκαμπτος αγωγός, β= μπαλόνι, γ= άκρο κλειστό με σιλικόνη, δ= οπή στην πλάγια επιφάνεια

Καθετήρας και μπαλόνι γεμίζουν με νερό ενώ αφαιρείται κάθε φυσαλίδα αέρα, ώστε να μην αλλοιώνεται το αποτέλεσμα των μετρήσεων. Το μπαλόνι εισάγεται στην αριστερή κοιλία, χωρίς να είναι διατεταμένο, από το ωτίο του αριστερού κόλπου μέσω της μιτροειδούς βαλβίδας. Μετά την εισαγωγή του διατείνεται με τόσο όγκο νερού, ώστε στη φάση της διαστολής να έχει πίεση 6-10 mmHg. Το συγκεκριμένο εύρος πιέσεων επιλέγεται διεθνώς για το μοντέλο των απομονωμένων καρδιών αρουραίου γιατί προσομοιάζει τις φυσιολογικές τιμές τελοδιαστολικής πίεσης

καρδιάς ζωντανού αρουραίου και δεν επηρεάζει την επαρκή άρδευση του υπενδοκαρδίου.

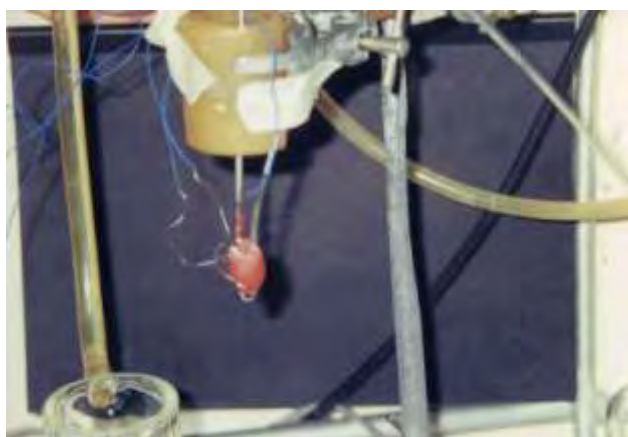
Το άλλο άκρο του καθετήρα συνδέεται με ένα μετατροπέα (transducer) πίεσης, ο οποίος είναι με τη σειρά του συνδεδεμένος με οθόνη φθορισμού (monitor). Το αναλογικό σήμα στην οθόνη μετατρέπεται σε ψηφιακό μέσω ενός παλμογράφου και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε ατομικό ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας (Hameg) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Πανοραμική άποψη του εργαστηρίου μας. Διακρίνεται η συσκευή άρδευσης, ο παλμογράφος και η οθόνη φθορισμού, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής και το πειραματόζωο στη φάση της ισχαιμίας του σκέλους.

Παρακολούθηση του ρυθμού

Τρία καρδιακά ηλεκτρόδια στερεώνονται στην αναρτημένη καρδιά (στο επικάρδιο του αριστερού και δεξιού κόλπου και της δεξιάς κοιλίας) κατά τη φάση της σταθεροποίησης για την καταγραφή του καρδιακού ρυθμού (εικόνα 9). Το ηλεκτρικό σήμα του καρδιογραφήματος καταγράφεται σε φθορίζουσα οθόνη και μετατρέπεται σε ψηφιακό, ώστε να αποθηκευτεί και αυτό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.



Εικόνα 9. Καρδιακά ηλεκτρόδια στην αναρτημένη καρδιά.

Κύριο μέρος του πειράματος

Όλες οι καρδιές, και στις τέσσερις ομάδες, μετά την ανάρτησή τους στη συσκευή αρδεύονται για 10 λεπτά, ώστε να σταθεροποιηθούν αιμοδυναμικά. Στο τέλος της σταθεροποίησης μετρούνται η αρτηριακή πίεση (μέγιστη συστολική και τελοδιαστολική) και ο αριθμός των σφύξεων. Μετά την περίοδο σταθεροποίησης γίνεται ολικός αποκλεισμός της αορτής, με την καρδιά να περικλείεται από ισοθερμικό δοχείο, οπότε προκαλείται καθολική ισοθερμική ισχαιμία στους 37 °C. Η ισχαιμία διαρκεί 30 λεπτά. Στη συνέχεια αίρεται ο αποκλεισμός της αορτής.

Τα πειραματικά πρωτόκολλα άρδευσης για τις ομάδες με προετοιμασία ή χωρίς, απεικονίζονται στο σχήμα 7.

Ομάδες ελέγχου			Απομονωμένη καρδιά, περίοδος σταθεροποίησης 10 λεπτά →	Καθολική ισχαιμία 30 λεπτά →	Περίοδος «επαναιμάτωσης» 60 λεπτά
Ομάδες με προετοιμασία	Ισχαιμία σκέλους 20 λεπτά →	Επαναιμάτωση σκέλους 10 λεπτά →	Απομονωμένη καρδιά, περίοδος σταθεροποίησης 10 λεπτά →	Καθολική ισχαιμία 30 λεπτά →	Περίοδος «επαναιμάτωσης» 60 λεπτά

Σχήμα 7. Πρωτόκολλο άρδευσης

Η επανάρδευση της καρδιάς διαρκεί 60 λεπτά, ενώ κάθε 5^ο λεπτό (12 μετρήσεις) γίνεται καταγραφή της αρτηριακής πίεσης (μέγιστης συστολικής και τελοδιαστολικής) και του καρδιακού ρυθμού (συχνότητα και είδος ρυθμού).

Οι καρδιές δεν βηματοδοτούνται αλλά αφήνονται να χτυπούν αυτόματα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τυχόν κοιλιακές αρρυθμίες (κοιλιακή ταχυκαρδία ή μαρμαρυγή, διδυμία) που δεν ανατάσσονται μόνες τους μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, ανατάσσονται με μηχανικό τρόπο (ελαφρό χτύπημα της καρδιάς).

Μετά το πέρας του επανεμποτισμού οι καρδιές σκουπίζονται με απορροφητικό χαρτί και ζυγίζονται (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Αναρτημένη καρδιά μετά το τέλος του πειράματος (1= αορτή, 2= πνευμονική αρτηρία, 3= ωτίο δεξιού κόλπου, 4= ωτίο αριστερού κόλπου).

Μέτρηση αιμοδυναμικών παραμέτρων

Σε κάθε καρδιά, στις διάφορες φάσεις του πειράματος, μετρήθηκε η μέγιστη συστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (ΣΠ), η τελοδιαστολική πίεση (ΔΠ) και ο αριθμός των σφύξεων. Η διαστολική πίεση εκφράζει τις μεταβολές της ευενδοτότητας της καρδιάς. Η συστολική πίεση εξαρτάται κυρίως από την ενδογενή συσταλτικότητα του μυοκαρδίου αλλά και από την τιμή της τελοδιαστολικής πίεσης. Έτσι ως μέτρο της συσταλτικής ικανότητας της αριστερής κοιλίας ορίζεται διεθνώς μια νέα παράμετρος, η **αναπτυσσόμενη πίεση** της αριστερής κοιλίας (ΑΠ), η οποία υπολογίζεται από τη διαφορά της μέγιστης συστολικής και της τελοδιαστολικής πίεσης: $ΑΠ = ΣΠ - ΔΠ$.

Η ΑΠ αντικατοπτρίζει τη συσταλτική ικανότητα της καρδιάς, που δεν επηρεάζεται από το προφορτίο (ισοογκική συστολή, σταθερό προφορτίο, όσο η πίεση στο μπαλόνι του μετρητή) ή το μεταφορτίο (πρακτικά μηδενικό).

Καταγράφηκε επίσης ο αριθμός των σφίξεων ανά 5λεπτο και όλα τα επεισόδια κοιλιακής αρρυθμίας στη διάρκεια του πειράματος.

Από τη ΑΠ και τον αριθμό των σφύξεων (ΑΣ) υπολογίστηκε το παράγωγο ΑΠ × ΑΣ (ισοδύναμο της καρδιακής παροχής).

Στατιστική ανάλυση

Η ομάδα ελέγχου με φυσιολογικό μυοκάρδιο (ομάδα Α) συγκρίθηκε με την ομάδα με φυσιολογικό μυοκάρδιο και προετοιμασία της καρδιάς (ομάδα Β), ενώ η ομάδα ελέγχου με υπερτροφικό μυοκάρδιο (ομάδα Γ) συγκρίθηκε με την ομάδα με υπερτροφικό μυοκάρδιο και προετοιμασία της καρδιάς (ομάδα Δ). Οι τιμές εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου (mean ± SEM).

Για τη σύγκριση του βάρους σώματος, των πηλίκων βάρους καρδιάς/βάρους σώματος, βάρους πνευμόνων/βάρους σώματος, βάρους ήπατος/βάρους σώματος, των επεισοδίων αρρυθμίας και των αιμοδυναμικών παραμέτρων στην περίοδο σταθεροποίησης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία σημαντικότητας του Student (two tailed unpaired t test).

Η κανονική ανάλυση διακύμανσης κατά δυο παράγοντες (regular/not matching two way ANOVA) επιλέχθηκε για να ελέγξει τις διαφορές ανάμεσα στις τιμές των αιμοδυναμικών παραμέτρων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές και να εξετάσει εάν η πάροδος του χρόνου κατά την «επαναιμάτωση» επηρέασε το αποτέλεσμα.

Τα αναλυτικά δεδομένα (raw data) πέρασαν την δοκιμασία ομαλότητας (προέρχονταν από ομαλή κατανομή), ενώ οι διαφορές στο τυπικό σφάλμα του μέσου ανάμεσα στις συγκρινόμενες ομάδες ήταν τυχαίες.

Η διαφορά θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική εάν ο κίνδυνος σφάλματος ήταν μικρότερος του 5 % ($p < 0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βασικές τιμές (τιμές κατά την περίοδο της σταθεροποίησης) των αιμοδυναμικών παραμέτρων ΑΠ, ΔΠ και ΑΠ x ΑΣ δεν διέφεραν ανάμεσα στις ομάδες με φυσιολογικό και υπερτροφικό μυοκάρδιο. (πίνακας 4, εικόνα 11).

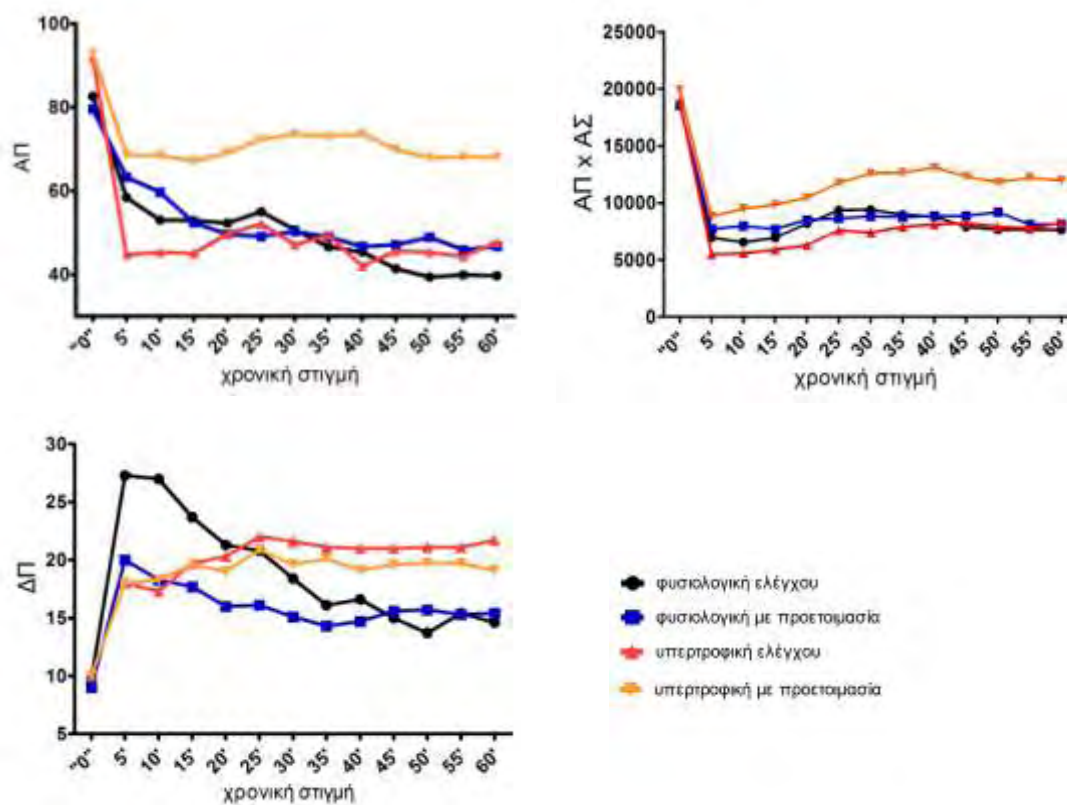
Πίνακας 4. Τιμές αιμοδυναμικών παραμέτρων κατά την περίοδο της σταθεροποίησης

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	p	Ομάδα Γ	Ομάδα Δ	p
ΑΠ	82.6± 4.23	79.6±2.48	0.5521	91.9±8.36	92.9±6.11	0.9247
ΔΠ	9.7±0.74	9.0±0.81	0.8319	10.0±0.38	10.0±0.95	1.0000
ΑΠxΑΣ	18664±942	18556±543	0.9225	18944±2216	19918±973	0.6944

Οι βασικές αιμοδυναμικές τιμές δεν διέφεραν ανάμεσα στις συγκρινόμενες ομάδες.

ΑΠ= αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας, ΔΠ= τελοδιαστολική πίεση αριστερής κοιλίας, ΑΣ= αριθμός σφύξεων

Οι ΑΠ και ΔΠ μετριοούνται σε mmHg. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 11. Αιμοδυναμικές παράμετροι στη φάση σταθεροποίησης (χρονική στιγμή «0») και του επανεμοτισμού (χρονικές στιγμές 5' έως 60'). ΑΠ= αναπτυσσόμενη

πίεση αριστερής κοιλίας, ΔΠ= τελοδιαστολική πίεση αριστερής κοιλίας, ΑΣ= αριθμός σφύξεων. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος. Η ΑΠ και ΔΠ σε mmHg. Η χρονική στιγμή σε λεπτά της ώρας.

Φαίνεται από τη σύγκριση των ομάδων ότι, πριν τη μεσολάβηση της παρατεταμένης ισχαιμίας (περίοδος σταθεροποίησης – χρονική στιγμή «0») η λειτουργικότητα της καρδιάς παρέμεινε η ίδια, ανεξάρτητα από το αν έγινε προετοιμασία με ισχαιμία του σκέλους. Χωρίς να αποτελεί σκοπό προς εξαγωγή συμπερασμάτων, από τη σύγκριση φαίνεται ακόμη ότι οι ομάδες με υπερτροφικό μυοκάρδιο έδειξαν σαφώς υψηλότερη συσταλτική ικανότητα της καρδιάς. (παρόλο που οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές – τα αναλυτικά δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η ευενδοτότητα της καρδιάς καθώς και η καρδιακή παροχή δεν είχαν διαφορές (εικόνα 6).

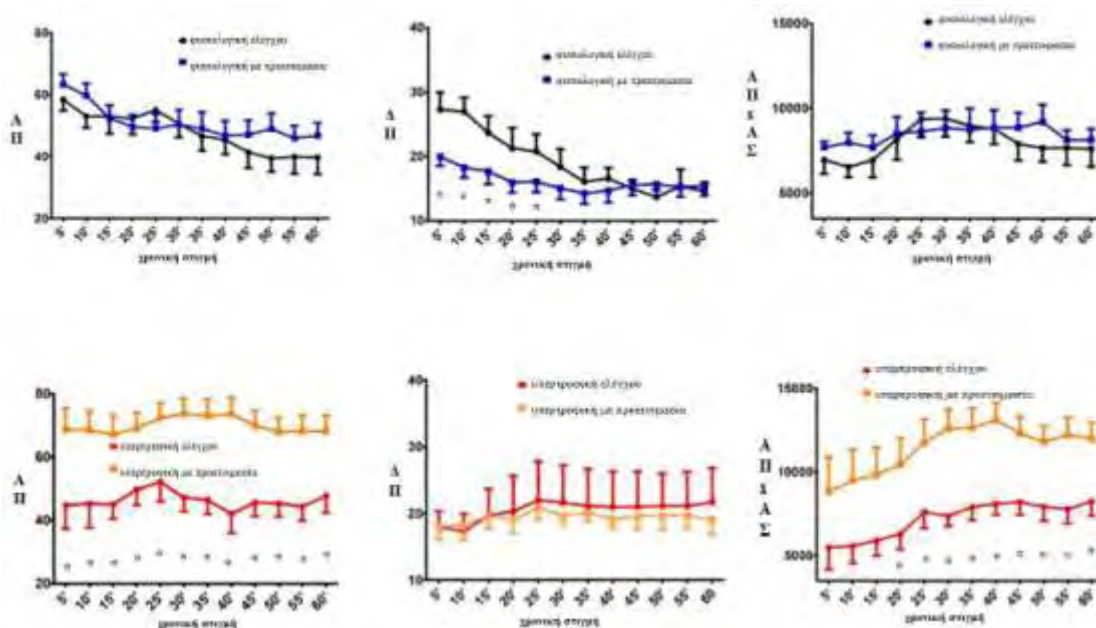
Η ηλεκτρική δραστηριότητα σε όλες τις καρδιές ξεκίνησε μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από την έναρξη του επανεμποτισμού μετά την περίοδο της παρατεταμένης ισχαιμίας των 30 λεπτών. Οι αιμοδυναμικές παράμετροι ήταν σαφώς επηρεασμένες κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης: η ΑΠ ελαττώθηκε, η ΔΠ αυξήθηκε, όπως ελαττώθηκε και το παράγωγο ΑΠ x ΑΣ, σε κάθε ομάδα και σε κάθε χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης, συγκριτικά με τις τιμές στην περίοδο σταθεροποίησης. Οι διαφορές φαίνονται στα διαγράμματα της εικόνας 11 και αντανακλούν την μυοκαρδιακή βλάβη μετά την ισχαιμία.

Η μυοκαρδιακή ισχαιμία και το έμφραγμα δεν τροποποιούν μόνο τη συστολική ικανότητα της καρδιάς αλλά και τη διαστολική. Η αύξηση της ΔΠ όταν το προφορτίο διατηρείται σταθερό, όπως στις συνθήκες του πειράματός μας, είναι δείγμα της μειωμένης ευενδοτότητας της καρδιάς. Έχει βρεθεί στις αρδευόμενες αναρτημένες καρδιές ότι η ελάττωση της ευενδοτότητας οφείλεται στην αύξηση του τόνου των μυοϊνιδίων, το μέγεθος της οποίας αύξησης εξαρτάται από το βαθμό της μυοκαρδιακής βλάβης από την ισχαιμία (στυτικό αποτέλεσμα ή σαν τους σωλήνες ποτίσματος του κήπου = erectile or garden hose effect)^{181,182}.

Η επίδραση της προετοιμασίας με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου στις φυσιολογικές καρδιές (χωρίς υπερτροφία) των αρουραίων (ομάδες Α και Β).

Η ΑΠ δεν διέφερε σημαντικά στις ομάδες με φυσιολογικό μυοκάρδιο ($p=0.1314$). Η πάροδος του χρόνου όμως επηρέασε σημαντικά τις τιμές που μετρήθηκαν ($p=0.0011$).

Κατά την εξέλιξη της επαναιμάτωσης η ομάδα με προετοιμασία ανέκαμψε από χαμηλότερες τιμές της ΑΠ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μετά τη χρονική στιγμή 45' (εικόνα 11 και 12). Αυτό αντικατοπτρίζει τη δυσανάλογη μεταβολή της ΔΠ ανάμεσα στις δύο ομάδες στην αρχή της επαναιμάτωσης (να θυμίσουμε ότι $ΑΠ = ΣΠ - ΔΠ$) (εικόνες 11,12). Σε κάθε χρονική στιγμή όμως οι τιμές της ΑΠ ήταν συγκρίσιμες ανάμεσα στις δύο ομάδες, με προετοιμασία ή χωρίς (η αλληλεπίδραση δεν ήταν σημαντική, $p = 0.9006$).



Εικόνα 12. Αναλυτική σύγκριση των αιμοδυναμικών παραμέτρων στις ομάδες με φυσιολογικό και υπερτροφικό μυοκάρδιο κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης. ΑΠ= αναπτυσσόμενη πίεση αριστερής κοιλίας, ΔΠ= τελοδιαστολική πίεση αριστερής κοιλίας, ΑΣ= αριθμός σφύξεων. Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η ΑΠ και ΔΠ μετριέται σε mmHg. Η χρονική στιγμή σε λεπτά της ώρας. Με αστερίσκο (*) επισημαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η ΔΠ ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0.0004$), και επιπλέον η πάροδος του χρόνου επέδρασε στο αποτέλεσμα ($p<0.0001$). Το μυοκάρδιο που δεν προετοιμάστηκε είχε σαφώς μικρότερη ευενδοτότητα στην αρχική φάση της επαναιμάτωσης (στα πρώτα 25 λεπτά). Μετά το 30^ο λεπτό όμως και μέχρι το τέλος της επανάρδευσης και οι δύο ομάδες έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά (εικόνα 12). Προφανώς ένα μέρος της μυοκαρδιακής βλάβης ήταν αναστρέψιμο.

Οι τιμές του παραγώγου ΑΠ x ΑΣ ήταν σχεδόν ίδιες ($p=0.2464$) σε κάθε χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης ($p=0.3931$) και στις δύο ομάδες με φυσιολογικό μυοκάρδιο (εικόνα 12). Αυτό οφειλόταν εξίσου στις τιμές της αναπτυσσόμενης αρτηριακής πίεσης και του αριθμού των σφύξεων.

Ως γενική εκτίμηση οι αιμοδυναμικές παράμετροι δεν διέφεραν ανάμεσα στις προετοιμασμένες και μη, φυσιολογικές (χωρίς υπερτροφία) καρδιές στη δική μας μελέτη.

Πολλές μελέτες άλλων ερευνητών έχουν αποδείξει ότι προσωρινή μικρής διάρκειας ισχαιμία απομακρυσμένων οργάνων (όπως οι νεφροί, το ήπαρ, το λεπτό έντερο ή σκελετικοί μύες) ελάττωσαν το μέγεθος του εμφράγματος της καρδιάς μετά από παρατεταμένη ισχαιμία και επαναιμάτωσή της^{70,73, 182}.

Η απουσία στη δική μας μελέτη διαφοράς ανάμεσα στις προετοιμασμένες και μη καρδιές μπορεί να οφείλεται στη μικρή σχετικά χρονική διάρκεια της ισχαιμίας της καρδιάς, η οποία δεν είναι ικανή να προκαλέσει εκτεταμένη και μη ανατρέψιμη βλάβη στο μυοκάρδιο. Βέβαια δεν πρέπει να παραβλέπει κανείς ότι υπάρχουν μελέτες όπου τα αποτελέσματα είναι υπέρ του δέοντος αισιόδοξα ή υποστηρίζουν την δική τους προτεινόμενη μέθοδο. Στην πραγματικότητα, η προετοιμασία με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου στο φυσιολογικό μυοκάρδιο δεν έχει βρει ευρεία κλινική εφαρμογή και η αρχική ενθουσιώδης αποδοχή αντιμετωπίζεται πλέον με μεγάλο σκεπτικισμό⁴⁴.

Στον αντίποδα, κατά τα τελευταία 5 χρόνια η από απόσταση ΙΙΙ έδειξε κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μικρές τυχαιοποιημένες μελέτες για την προστασία της καρδιάς στην χειρουργική της καρδιάς των παιδιών και των ενηλίκων αλλά και στην επεμβατική καρδιολογία¹⁸³.

Παρόλα αυτά εξακολουθεί να υπάρχει διχογνωμία τόσο σε εργαστηριακές όσο και σε κλινικές έρευνες για την αποτελεσματικότητα της αΑ-ΙΙΙ^{44,86}.

Η επίδραση της προετοιμασίας με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου στις υπερτροφικές καρδιές των αρουραίων (ομάδες Γ και Δ).

Η ΑΠ μετά την περίοδο ισχαιμίας ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα με προετοιμασία ($p<0.0001$) σε όλη τη διάρκεια της επαναιμάτωσης (η επίδραση του χρόνου δεν ήταν σημαντική, $p=0.9928$) (εικόνα 12). Η ομάδα με προετοιμασία (ομάδα Δ) είχε συνεχώς χαμηλότερη ΔΠ (επίδραση της παρόδου του χρόνου ασήμαντη, $p=0.9989$), αλλά η διαφορά δεν ήταν σημαντική ($p=0.4666$) (εικόνα 12).

Το παράγωγο ΑΠxΑΣ ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στην ομάδα με προετοιμασία ($p < 0.0001$), πράγμα που οφειλόταν κυρίως στην ΑΠ (ο ΑΣ ήταν σχεδόν ο ίδιος στις δύο ομάδες – τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Παρόλα αυτά, κατά τα πρώτα 15 λεπτά της επαναιμάτωσης η διαφορά δεν ήταν σημαντική ($p = 0.1969, 0.0873$ και 0.0561 για τη χρονική στιγμή 5', 10' και 15' αντίστοιχα) αν και η ομάδα Δ υπερέιχε συνεχώς (επίδραση χρόνου $p = 0.01680$) (εικόνα 12).

Συνοψίζοντας η μελέτη μας έδειξε ότι η από απόσταση ισχαιμική προετοιμασία (αΑ-III) βελτίωσε την συσταλτικότητα της υπερτροφικής καρδιάς μετά την παρατεταμένη ισχαιμία, ενώ δεν επηρέασε σημαντικά την διαστολική της λειτουργία.

Σε εργαστηριακές μελέτες, έχει δειχθεί ότι η υπερτροφία της καρδιάς που οφείλεται σε αύξηση του κυκλοφορούντος όγκου σχετίζεται με μεγαλύτερη ευαισθησία στο τραύμα ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε σχέση με τις φυσιολογικές καρδιές. Μια σειρά από μορφολογικές, μεταβολικές και φυσιολογικές εναρμονιστικές μεταβολές συμβάλουν σ' αυτό το φαινόμενο (ελαττωμένη άρδευση υπενδοκαρδιακά, βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης, προαγωγή της αναερόβιας γλυκόλυσης, οίδημα των στεφανιαίων αγγείων)^{162,184-186}.

Η παρατήρηση αυτή κάνει την προσπάθεια για προστασία του υπερτροφικού μυοκαρδίου με ισχαιμική προετοιμασία μεγαλύτερη πρόκληση. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μελέτη μας δείχνει πως η αΑ-III έχει θετικό αποτέλεσμα στο υπερτροφικό μυοκάρδιο όχι όμως και στη φυσιολογική καρδιά των αρουραίων. Προφανώς το ερέθισμα της ισχαιμίας /επαναιμάτωσης του απομακρυσμένου οργάνου δεν είναι αρκετά ισχυρό ώστε να προετοιμάσει και να προστατέψει το φυσιολογικό μυοκάρδιο. Είναι αρκετό, όμως, για το ευαίσθητο υπερτροφικό μυοκάρδιο. Ακόμη μπορεί το υπερτροφικό μυοκάρδιο, ως πιο ευαίσθητο στην ισχαιμία/επαναιμάτωση, να ωφελείται περισσότερο από την ισχαιμική προετοιμασία.

Η ισχαιμική προστασία υπερτροφικής καρδιάς δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτεταμένα παγκοσμίως, όσο η προετοιμασία της φυσιολογικής καρδιάς. Η δυσκολία στην προετοιμασία υπερτροφικών καρδιών ίσως να αποτελεί ένα αιτιολογικό παράγοντα γι' αυτό. Από τις 9 συνολικά μελέτες ισχαιμικής προετοιμασίας της υπερτροφικής καρδιάς διεθνώς (όλες σε αρουραίους, με τον έλεγχο αιμοδυναμικών παραμέτρων ή το βαθμό νέκρωσης του μυοκαρδίου), ο Moolman 1997 (σε γενετικά υπερτασικούς αρουραίους) και ο Ebrahim 2007 (σε γερασμένους γενετικά υπερτασικούς αρουραίους) δεν βρήκαν θετική επίδραση της προετοιμασίας^{136-143,145}.

Η ανομοιομορφία των αποτελεσμάτων που ανακοινώνεται στις διάφορες εργαστηριακές μελέτες (προστασία ή μη, βαθμός προστασίας) μπορεί να σχετίζεται και με τα διαφορετικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται (είδος πειραματόζωων, χρόνος ισχαιμίας, σφαιρική ισχαιμία ή τμήματος της καρδιάς, κλπ)^{20,187,188}.

Επεισόδια αρρυθμίας

Τα επεισόδια κοιλιακής αρρυθμίας ήταν σπάνια για όλες τις ομάδες. Η επαναφορά στο φυσιολογικό ρυθμό γινόταν αυτόματα ή μηχανικά. Οι διαφορές ανάμεσα στις συγκρινόμενες ομάδες ήταν μόνον τυχαίο αποτέλεσμα (πίνακας 5).

Πίνακας 5. Επεισόδια αρρυθμίας κατά την επαναιμάτωση

	Ομάδα Α	Ομάδα Β	p	Ομάδα Γ	Ομάδα Δ	p
Αριθμός επεισοδίων αρρυθμίας	0.54±0.29	1.14±0.63	0.4039	1.57±0.65	0.43±0.30	0.1373

Δεν υπήρχε στατιστική διαφορά ανάμεσα στις συγκρινόμενες ομάδες. Οι τιμές εκφράζονται σε μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσου

Η ανεπαρκούσα καρδιά προδιαθέτει πραγματικά σε αρρυθμίες, αυτό όμως δεν έχει αποδειχθεί για το υπερτροφικό μυοκάρδιο (μετρίου βαθμού υπερτροφία, χωρίς ανεπάρκεια). Πολύ λίγες μελέτες ασχολούνται διεθνώς με την εκδήλωση αρρυθμιών προετοιμασμένης φυσιολογικής καρδιάς και καμία (πλην της δικής μας εργασίας) υπερτροφικής καρδιάς, και έτσι δεν είναι ασφαλής η εξαγωγή συμπερασμάτων από τη βιβλιογραφία^{74,110}.

Η επιλογή των 30 λεπτών ισχαιμίας έγινε γιατί δεν προκαλεί μεγάλης έκτασης νέκρωση του μυοκαρδίου και έτσι η μελέτη της καρδιοπροστασίας με την αΑ-ΙΙΙ γίνεται σε οριακή κατάσταση αναστρέψιμης ή μη ισχαιμίας. Η παρακολούθηση των αιμοδυναμικών παραμέτρων σε όλη τη διάρκεια της επαναιμάτωσης και όχι μόνο μετά την πάροδο συγκεκριμένου χρόνου (παράδειγμα στο τέλος του πειράματος), είχε σκοπό να αποκαλύψει τυχόν μόνιμες αλλά και παροδικές βλάβες από την ισχαιμία/

επαναιμάτωση. Οι ελάχιστες μελέτες διεθνώς σχετικά με την ισχαιμική προετοιμασία υπερτροφικού μυοκαρδίου αλλά και το ότι για πρώτη φορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία μελετάται η προστασία υπερτροφικού μυοκαρδίου με παροδική ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου μας στερεί από την σύγκριση παρόμοιων πειραμάτων. Δίνει όμως η δική μας έρευνα το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο αρχικός ενθουσιασμός για τα ευεργετικά αποτελέσματα της ισχαιμικής προετοιμασίας της καρδιάς στον άνθρωπο ή σε πειραματόζωα, έχει δώσει τη θέση του σε σκεπτικισμό καθώς η μέθοδος δεν έχει βρει ευρεία κλινική εφαρμογή.

Η από απόσταση ισχαιμική προετοιμασία (ιδίως σκελετικών μυών ή μελών του σώματος) θεωρείται ιδανική για την κλινική πράξη, γιατί δεν επιβουλεύεται με ισχαιμία/επαναιμάτωση την ίδια την καρδιά^{44,189,190}.

Υπάρχει διχογνωμία κατά πόσον η ισχαιμική προστασία απομακρυσμένου οργάνου έχει αξία σε φυσιολογικές καρδιές (με την πλειοψηφία να υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα του φαινομένου – χωρίς όμως κλινική εφαρμογή), αλλά και κατά πόσον η ισχαιμική προστασία είναι αποτελεσματική στο υπερτροφικό μυοκάρδιο. Εκτεταμένη αναφορά στο πλήθος των εργασιών που έχουν δημοσιευτεί γίνεται στο γενικό μέρος, στο κεφάλαιο της ισχαιμικής προστασίας από απόσταση. Έτσι, παρόλο που δεκάδες ερευνητές προτείνουν ή αποδεικνύουν μηχανισμούς που υποκρύπτονται (Hausenloy και Yellon 2008, ανασκόπηση 33 πειραματικών εργασιών), κάποιοι εξίσου έγκυροι ερευνητές μεγάλων κέντρων με κλινικές μελέτες (Gunaydin 2000, Iliodromitis 2006, Hoole 2009, Rahman 2010) αμφισβητούν την αποτελεσματικότητα του φαινομένου^{41,75,85,86,89}.

Έχουν μέχρι σήμερα σχεδιαστεί πάρα πολλές στρατηγικές προστασίας του μυοκαρδίου από την ισχαιμία/επαναιμάτωση με ισχαιμική προετοιμασία. Έχει δοκιμαστεί μια μεγάλη ποικιλία πειραματόζωων, διαφορετική διάρκεια ισχαιμίας και νέα μοντέλα προηγούμενης σύντομης ισχαιμίας (καρδιακής ή άλλου οργάνου, προετοιμασία, κατά-ετοιμασία και μετά-ετοιμασία, πρόιμη ή όψιμη προστασία). Ο τελικός σκοπός όλων αυτών των ερευνών είναι η εφαρμογή στον άνθρωπο και η αποφυγή ή ο περιορισμός της βλάβης που προκαλείται στο μυοκάρδιο από την ισχαιμία/επαναιμάτωση. Η προετοιμασία με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου, σε

αντίθεση με την κλασική ισχαιμική προετοιμασία, δεν εκθέτει σε κίνδυνο την ίδια την καρδιά. Ακόμη, όπως έχει αναφερθεί, η υπερτροφία του μυοκαρδίου είναι πολύ συχνή στην καθημερινή κλινική πράξη. Είναι γι' αυτό σημαντικό να είμαστε βέβαιοι για την αποτελεσματικότητα της ισχαιμικής προετοιμασίας από απόσταση, είτε αυτή αφορά φυσιολογικό μυοκάρδιο είτε υπερτροφική καρδιά. Σίγουρα χρειάζονται περισσότερες μελέτες, εργαστηριακές αλλά και κλινικές, νέες μέθοδοι ανίχνευσης της ισχαιμίας, της προστασίας αλλά και των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από αυτές (Przyklenk και Whittaker, 2011)¹⁹¹.

Η συμβολή της δικής μας μελέτης (Voucharas et al, Mar 2011) είναι ότι η προετοιμασία της καρδιάς με παροδική ισχαιμία ενός σκέλους μπορεί να εφαρμοστεί με σαφή πλεονεκτήματα στο υπερτροφικό μυοκάρδιο, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει τις φυσιολογικές καρδιές των αρουραίων¹³⁵.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Μεγάλη σημασία μετά από κάθε πειραματική έρευνα έχει η εφαρμογή της στην κλινική πράξη και η πεμπτουσία της είναι το όφελος στον άνθρωπο. Έχοντας την ένδειξη ότι η αΑ-III έχει αποτέλεσμα στο υπερτροφικό μυοκάρδιο και όχι στο φυσιολογικό σε μικρού βαθμού ισχαιμία της καρδιάς και επειδή η πλειοψηφία των ασθενών με στένωση της αορτικής βαλβίδας παρουσιάζει μέτρια έως σοβαρή υπερτροφία της καρδιάς, η έρευνά μας μελλοντικά στρέφεται σε τυχαιοποιημένη προοπτική μελέτη στον άνθρωπο: ασθενείς με συνυπάρχουσα στεφανιαία νόσο και αορτική στένωση υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη χωρίς εξωσωματική κυκλοφορία (η καθετοποίηση της καρδιάς και η ελάττωση της καρδιακής παροχής κατά τη διάρκεια της στεφανιαίας χειρουργικής, αλλά και η διάνοιξη των στεφανιαίων αγγείων με πάλλουσα καρδιά, δρουν ως ισχαιμική προετοιμασία για την επακόλουθη ισχαιμία της καρδιάς κατά τη διάρκεια της καρδιοπληγικής παύσης της για την αντικατάσταση της αορτικής βαλβίδας) και με εξωσωματική κυκλοφορία στην αντικατάσταση της βαλβίδας. Βιοχημικοί καρδιακοί δείκτες ισχαιμίας μετρώνται κατευθείαν από το στεφανιαία κόλπο σε διάφορες φάσης της επέμβασης. Έτσι η στρατηγική της «συνδυασμένης επέμβασης» σε υπερτροφικό μυοκάρδιο μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη στην προστασία της καρδιάς (Voucharas C, Lazou A, Triposkiadis F, Tsilimingas N. Myocardial injury markers in combined coronary and

aortic valve operations. Comparison between “completely on” and “mixed off and on” procedures. Κλινική μελέτη σε εξέλιξη).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί κατά πόσον η προετοιμασία του μυοκαρδίου με παροδική ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου βελτιώνει την λειτουργικότητα της καρδιάς μετά από παρατεταμένη ισχαιμία/επαναιμάτωση σε φυσιολογικές ή υπερτροφικές απομονωμένες καρδιές αρουραίων. Είναι η πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία που μελετάται η προστασία της καρδιάς με απόσταση προετοιμασία υπερτροφικού μυοκαρδίου.

Υλικό και μέθοδος. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ομάδες από 7 αρουραίους η κάθε μία: ομάδα ελέγχου με φυσιολογικό μυοκάρδιο, ομάδα με ισχαιμική προετοιμασία-φυσιολογικό μυοκάρδιο, ομάδα ελέγχου με υπερτροφικό μυοκάρδιο και ομάδα με ισχαιμική προετοιμασία-υπερτροφικό μυοκάρδιο. Στα πειραματόζωα με μέτρια υπερτροφία της καρδιάς, αυτή προκλήθηκε με τη χορήγηση φθοριούδροκορτιζόνης και αλατιού από το στόμα για 30 ημέρες. Η προετοιμασία της καρδιάς με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου επιτεύχθηκε με παροδική ισχαιμία του δεξιού κάτω άκρου του πειραματόζωου. Η αναισθητοποίηση των ζώων έγινε με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση πεντοθάλης. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της απομονωμένης αναρτημένης καρδιάς που αρδεύεται κατά Langendorff. Οι καρδιές υποβλήθηκαν σε 30λεπτη καθολική ισχαιμία και στη συνέχεια σε επαναιμάτωση για 60 λεπτά. Μετρήθηκε η συσταλτική ικανότητα της καρδιάς (η αναπτυσσόμενη πίεση της αριστερής κοιλίας ΑΠ, η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας ΔΠ και το παράγωγο ΑΠ επί τον αριθμό των σφύξεων ΑΣ) και παρακολούθηθηκε ο καρδιακός ρυθμός. Η σύγκριση έγινε μεταξύ των ομάδων με προετοιμασία και αυτών χωρίς προετοιμασία (χωριστά για τις φυσιολογικές και τις υπερτροφικές καρδιές).

Αποτελέσματα. Η αναπτυσσόμενη πίεση της αριστερής κοιλίας (ΑΠ) και το παράγωγο ΑΠxΑΣ ήταν σημαντικά μεγαλύτερα στην ομάδα με υπερτροφία και προστασία της καρδιάς, ενώ η τελοδιαστολική πίεση και τα επεισόδια αρρυθμίας δεν διέφεραν. Στις ομάδες με φυσιολογικό μυοκάρδιο δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, εκτός από τις τιμές της τελοδιαστολικής πίεσης στην αρχή της επαναιμάτωσης.

Συμπεράσματα. Η προετοιμασία της καρδιάς με ισχαιμία άλλου πλιν της καρδιάς οργάνου προστατεύει τη συσταλτική ικανότητα της υπερτροφικής καρδιάς, ενώ δεν

πλεονεκτεί όταν το μυοκάρδιο είναι φυσιολογικό. Τα επεισόδια κοιλιακής αρρυθμίας είναι ελάχιστα και δεν διαφέρουν σε όλες τις ομάδες. Το αποτέλεσμα της έρευνας μπορεί να βρει εφαρμογή στον άνθρωπο καθώς το υπερτροφικό μυοκάρδιο απαντά σε πολλές παθολογικές κλινικές καταστάσεις, ενώ η προετοιμασία με ισχαιμία απομακρυσμένου οργάνου δεν επιβουλεύεται την ίδια την καρδιά.

SUMMARY

Background. The aim of our study was to investigate whether remote preconditioning (RPC) improves myocardial function after ischemia/reperfusion injury in both normal and hypertrophic isolated rat hearts. This is the first time in world literature that cardioprotection by remote preconditioning in hypertrophic myocardium is investigated.

Methods. Four groups of 7 male Wistar rats each, were used: Normal control, normal preconditioned, hypertrophic control and hypertrophic preconditioned groups. Moderate cardiac hypertrophy was induced by fludrocortisone acetate and salt administration for 30 days. Remote preconditioning of the rat heart was achieved by 10 minutes transient right hind limb ischemia of the anaesthetized animal. Isolated Langendorff-perfused animal hearts were then subjected to 30 minutes of global ischemia and reperfusion for 60 minutes. Contractile function and heart rhythm were monitored. Preconditioned groups were compared to control groups.

Results. Left ventricular developed pressure (LVDP) and the product LVDP x heart rate (HR) were significantly higher in the hypertrophic preconditioned group than the hypertrophic control group while left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) and severe arrhythmia episodes did not differ. Variances between the normal heart groups were not significantly different except for the values of the LVEDP in the beginning of reperfusion.

Conclusions. Remote preconditioning seems to protect myocardial contractile function in hypertrophic myocardium, while it has no beneficial effect in normal myocardium in rats.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Verdouw PD, van den Doel MA, De Zeeuw S, Duncker DJ. **Animal models in the study of myocardial and ischaemic syndromes.** Cardiovasc Res 1998;39:121-135.
2. Hearse DI. **Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century?** Cardiovasc Res 1994;28:1737-1744.
3. Hearse DI, Sutherland FJ. **Experimental models for the study of cardiovascular function and disease.** Pharm Res 2000;41(6):598-603.
4. Utrehus K. **The ischemic heart. Experimental models.** Pharm Res 2000;42(3):193-203.
5. Jennings RB, Murray CE, Steenbergen CJ, Reimer KA. **Development of cell injury in sustained acute ischemia.** Circulation 1990;82(suppl II):2-12.
6. Jennings RB, Reimer KA. **Lethal myocardial ischemic injury.** Am J Pathol 1981;102:241-255.
7. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. **Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode.** Circ Res 1990;66:913-931.
8. Weiss J, Couper GS, Hiltbrand B, Shine KI. **Role of acidosis in early contractile dysfunction during ischemia: evidence from pH measurements.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 1984;247:760-767.
9. Kusuoka H, Weisfeldt ML, Zweier JL, Jacobus WE, Marban E. **Mechanism of early contractile failure during hypoxia in intact ferret heart: evidence for modulation of maximal Ca²⁺-activated force by inorganic phosphate.** Circ Res 1986;59:270-282.
10. Tani M, Neely JR. **Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange.** Circ Res 1989;65:1045-1056.
11. Dennis SC, Gevers W, Opie LH. **Protons in ischemia: where do they come: where do they go?** J Mol Cell Cardiol 1991;23:1077-1086.
12. Bourdillon PDV, Poole-Wilson PA. **Effects of ischaemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium.** Cardiovasc Res 1981;15(3):121-130.

13. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. **Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart.** *Circ Res* 1987;60:700-707.
14. Guyton AC, Hall JE. **Contraction of skeletal muscle.** In *Textbook of Medical Physiology*. 11th edition, WB Saunders, Philadelphia 2006;67-73
15. Hearse DJ, Garlick PB, Humphrey SM. **Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention.** *Am J Cardiol* 1977;39:986-993.
16. Katz AM, Tada M. **The 'stone heart': a challenge to the biochemist.** *Am J Cardiol.* 1972;29:578-580
17. Kolocassides KC, Galiñanes M, Hearse DJ. **Dichotomy of ischemic preconditioning: Improved postischemic contractile function despite intensification of ischemic contracture.** *Circulation* 1996;93:1725-1733.
18. Yellon DM, Baxter GF. **Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?** *Heart* 2000;83:381-387
19. Pillay L. **Myocardial reperfusion injury.** Clinical lessons. University of Kwazulu –Natal, Durban, South Africa 2007;1-32.
20. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. **Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning.** *Pharmacological Reviews* 2007; 59 (4): 418-458.
21. Buja LM, Entman ML. **Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease.** *Circulation* 1998;98:1355-1357.
22. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP et al. **Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion.** *Apoptosis* 2001;6:279-290.
23. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N et al. **Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury.** *Circulation.* 2001;104:253-256.
24. Kostin S, Pool L, Elsaesser A, et al. **Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts.** *Circ Res* 2003;92:715-724.
25. Jugdutt BL, Idikio HA. **Apoptosis and oncosis in acute coronary syndromes: assessment and implications.** *Mol Cell Biochem* 2005;270:177-200.
26. Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. **How do cardiomyocytes die?" Apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes.** *J Card Fail* 2006;12:381-391.

27. Kajstura J, Bolli R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A. **Cause of death: suicide.** *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:10:56-75.
28. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. **The wavefront phenomenon of ischemic cell death. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs.** *Circulation* 1977;56: 786–794.
29. Braunwald E, Kloner RA. **Myocardial reperfusion: a double-edged sword?** *J Clin Invest* 1985 Nov;76(5):1713–1719.
30. Hearse DJ, Bolli R. **Reperfusion-induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance.** *Cardiovasc Res* 1992; 26:101-108.
31. Maxwell SR, Lip GY. **Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options.** *Int J Cardiol* 1997 Jan;58(2):95-117.
32. Basso C, Thiene G. **The pathophysiology of myocardial reperfusion: a pathologist's perspective.** *Heart* 2006;92:1559-1562.
33. Kloner RA. **Does reperfusion injury exist in humans?** *J Am Coll Cardiol* 1993;21:537-545.
34. Yellon DM, Hausenloy DJ. **Myocardial Reperfusion Injury.** *N Engl J Med* 2007; 357:2408-2410.
35. Werns SW. **Lethal myocardial reperfusion injury: Fact or fiction?** *J Thrombosis and thrombolysis* 1997;4:47-49.
36. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986;74:1124–1136.
37. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. **Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1986;251: 1306-1315.
38. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. **Regional ischemic ‘preconditioning’ protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion.** *Circulation* (1993) 87:893–899.
39. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. **Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:579–588.

40. Vinten-Johansen J. **Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion.** Heart Fail Rev 2007;12: 235–244.
41. Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E, Kremastinos DT. **Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs.** Basic Res Cardiol 2006;101:502–507.
42. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, 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;100:404–412.
43. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, White PA, et al. **Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a K_{ATP} -dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292, H1883-H1890.
44. Ludman AJ, Yellon DM, Hausenloy DJ. **Cardiac preconditioning for ischaemia: lost in translation.** Dis Model Mech. 2010 Jan-Feb;3(1-2):35-8.
45. Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM. **Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;290: H441–H449.
46. Shiki K, Hearse DJ. **Preconditioning of ischemic myocardium. Reperfusion-induced arrhythmias.** Am J Physiol 1987;253:1470-1476.
47. Lawson CS, Aukiran M, Shattack MJ, Coltart DJ, Hearse DJ. **Preconditioning and reperfusion arrhythmias in the isolated rat heart: the protection or temporal shift in vulnerability.** Cardiovasc Res 1993;27:2274-2281.
48. Pasceri V, Lanza GA, Patti G, Pedrotti P, Crea F, Maseri A. **Preconditioning by transient myocardial ischemia confers protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias in variant angina.** Circulation 1996;94:1850-1856.
49. Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR. **Arrhythmias in off-pump coronary artery bypass grafting and the antiarrhythmic effect of regional ischemic preconditioning.** J Cardiothorac Vasc Anesth 2003;17(4):459-64.
50. Cave AC. **Preconditioning induced protection against post-ischemic contractile dysfunction. Characteristics and mechanisms.** J Mol Cell Cardiol 1995;27:969-979.

51. Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. **Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion.** *Circulation* 1994;89:1254-1261.
52. Xi L, Hess ML, Kukreja RC. **Ischaemic preconditioning in isolated perfused mouse heart: reduction in infarct size without improvement of post-ischemic ventricular function.** *Mol Cell Biochem* 1998;186(1-2):69-77.
53. Rinaldi CA, Masani ND, Linka AZ, Hall RJ. **Effect of repetitive episodes of exercise induced myocardial ischaemia on left ventricular function in patients with chronic stable angina: evidence for cumulative stunning or ischaemic preconditioning?** *Heart* 1999;81(4):404-11.
54. Murray CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. **Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning.** *Am J Physiol* 1991;260:796-804.
55. Sack S, Mohri M, Arras M, Schwarz ER, Schaper W. **Ischemic preconditioning--time course of renewal in the pig.** *Cardiovasc Res* 1993;27:551-554.
56. Marber M, Latchman D, Walker J, Yellon D. **Cardiac stress protein elevation 24 hours following brief ischaemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction.** *Circulation* 1993;88:1264-72.
57. Yellon D, Baxter G. **A 'second window of protection' or delayed preconditioning phenomenon: Future horizons for myocardial protection?** *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1023-34
58. Zhao TC, Hines DS, Kukreja RC. **Adenosine-induced late preconditioning in mouse hearts: role of p38 MAP kinase and mitochondrial K (ATP) channels.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(3): H1278-85.
59. Kudo M, Wang Y, Xu M, Ayub A, Ashraf M. **Adenosine A (1) receptor mediates late preconditioning via activation of PKC-delta signaling pathway.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(1): H296-301.
60. Laude K, Favre J, Thuillez C, Richard V. **NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284 (6): H2053-60.
61. Hampton CR, Shimamoto A, Rothnie CL, et al. **HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2): H866-74.

62. Zhang J, Ping P, Vondriska TM, et al. **Cardioprotection involves activation of NF-kappa B via PKC-dependent tyrosine and serine phosphorylation of I kappa B-alpha.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4): H1753-8.
63. Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. **Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning.** *Anesthesiology* 2004;100(1):59-69.
64. Ohnuma Y, Miura T, Miki T, et al. **Opening of mitochondrial K(ATP) channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(1): H440-7.
65. Skyschally A, Schulz R, Gres P, Korth HG, Heusch G. **Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284 (2): H698-703.
66. Rakhit RD, Edwards RJ, Mockridge JW, et al. **Nitric oxide-induced cardioprotection in cultured rat ventricular myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(4): H1211-7.
67. Uchiyama Y, Otani H, Okada T, et al. **Integrated pharmacological preconditioning in combination with adenosine, a mitochondrial K_{ATP} channel opener and a nitric oxide donor.** *J Thorac CardioVasc Surg* 2003;126(1): 148-59.
68. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ, Dobson GP. **Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury.** *J Appl Physiol* 2007;103:1441–1448.
69. Bolli R. **Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292: H19-H27.
70. McClanahan T, Nao B, Wolke L, Martin BJ, Mezt TE. **Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits.** *FASEB J* 1993;7:A18.
71. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. **Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue.** *Circulation* 1996;94:2193–2200.
72. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, 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;100:404–412.
73. 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;96:1641–1646.

74. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 1997;273:1707–1712.

75. Gunaydin B, Cakici I, Soncul H, et al. Does remote organ ischaemia trigger cardiac preconditioning during coronary artery surgery? *Pharmacol Res* 2000;41:493–496.

76. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2277–2282.

77. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007;116:1098–1105.

78. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:575–579.

79. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, et al. Cardiac remote ischemic preconditioning in coronary stenting (CRISP Stent) study. A prospective, randomized control trial. *Circulation* 2009;119:820–827.

80. Zhou K, Yang B, Zhou XM, Tan CM, Zhao Y, Huang C, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on the flow pattern of the left anterior descending coronary artery in normal subjects. *Int J Cardiol* 2007;122:250–251.

81. Iliodromitis EK, Kyrzopoulos S, Paraskevaïdis IA et al. Increased C reactive protein and cardiac enzyme levels after coronary stent implantation. Is there protection by remote ischaemic preconditioning? *Heart* 2006;92:1821–1826.

82. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, et al. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation* 2007;116:1386–1395.

83. Mayo Clinic investigators. **Remote Myocardial Ischemic Preconditioning in Humans.** Mayo Clinic investigation (σε εξέλιξη από 2007 έως σήμερα 2011).
84. Takagi H, Manabe H, Kawai N, Goto SN, Umemoto T. **Review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials of remote ischemic preconditioning in cardiovascular surgery.** Am J Cardiol 2008;102(11):1487-1488.
85. Hoole SP, Khan SN, White PA, Heck PM, Kharbanda RK, Densem CG, Clarke SC, Shapiro LM, Schofield PM, O'Sullivan M, Dutka DP. **Remote ischaemic preconditioning does not attenuate ischaemic left ventricular dysfunction in humans.** Eur J Heart Fail 2009;11(5):497-505.
86. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, Frenneaux MP, Nightingale P, Gosling P, Townsend P, Townend JN, Green D, Bonser RS. **Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment?** Circulation 2010;122(11 Suppl):S53-59.
87. Hausenloy DJ, Yellon DM. **Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion.** Pharmacol Ther 2007;116:173–191.
88. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead, MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RA. **Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans.** J Am Coll Cardiol 2005;46:450-456.
89. Hausenloy DJ, Yellon DM. **Remote ischemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application.** Cardiovasc Res 2008;79:377-386.
90. Walsh SR, Tang TY, Sadat U, Gaunt ME. **Remote ischemic preconditioning in major vascular surgery.** J Vasc Surg 2008;49:240-243.
91. Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. **Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning.** Cardiovasc Res 2009;83: 234–246.
92. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. **Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels.** Am J Physiol 1998;275:H1542–H1547.
93. Schoemaker RG, van Heijningen CL. **Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;278:H1571–H1576.
94. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. **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;359:243–247.

95. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, 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;33:556–564.
96. 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;53:7–12.
97. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ. **Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H29–H37.
98. Dong JH, Liu YX, Ji ES, He RR. **Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats.** *Sheng Li Xue Bao* 2004;56:41–46.
99. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. **Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform.** *Cardiovasc Res* 2002;55:583–589.
100. Li YJ, Xiao ZS, Peng CF, Deng HW. **Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts.** *Eur J Pharmacol* 1996;311:163–167.
101. Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ. **Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide.** *Eur J Pharmacol* 2001;427:131–135.
102. Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, Schneider K, Dominiak P, Dendorfer A. **Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning.** *Regul Pept* 2005;127:217–224.
103. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. **Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence.** *J Thrombolysis* 1999;8:123–129.
104. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, et al. **Rabbit heart can be 'preconditioned' via transfer of coronary effluent.** *Am J Physiol* 1999;277:H2451–H2457.
105. Dickson EW, Porcaro WA, Fenton RA, Heard SO, Reinhardt CP, Renzi FP, et al. **'Preconditioning at a distance' in the isolated rabbit heart.** *Acad Emerg Med* 2000;7:311–317.

106. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, et al. **Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a K_{ATP} channel-dependent mechanism.** *Transplantation* 2005;79:1691–1695.
107. Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, Redington AN, et al. **Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a K_{ATP} channel-dependent mechanism.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1252–H1256.
108. Heusch G, Schulz R. **Remote preconditioning.** *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1279–1281.
109. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. **Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism.** *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:1317–1323.
110. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabejdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, et al. **Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB(2) receptors in the rat heart.** *Eur J Pharmacol* 2008;579:246–52.
111. Kant R, Diwan V, Jaggi AS, Singh N, Singh D. **Remote renal preconditioning-induced cardioprotection: a key role of hypoxia inducible factor-prolyl 4-hydroxylases.** *Mol Cell Biochem* 2008;312:25–31.
112. Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, D'Amico M. **Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN.** *J Leukoc Biol* 2004;75:453–459.
113. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, et al. **The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans.** *Physiol Genomics* 2004;19:143–150.
114. Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, et al. **The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1326–1332.
115. Peralta C, Fernandez L, Panes J, Prats N, Sans M, Pique JM, 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;33:100–113.

116. Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A. **Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways.** *Cardiovasc Res* 2008;78(1):108-115.
117. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. **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;55:590–601.
118. Yellon DM, Downey JM. **Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology.** *Physiol Rev* 2003;83:1113–1151.
119. Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. **The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition.** *J Biol Chem* 2006;281:20801–20808.
120. Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, Kurapeev DI, Galagudza MM. **Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning?** *Pathophysiology* 2001;7:271–274.
121. Tokuno S, Hinokiyama K, Tokuno K, Lowbeer C, Hansson LO, Valen G. **Spontaneous ischemic events in the brain and heart adapt the hearts of severely atherosclerotic mice to ischemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:995–1001.
122. 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;35:339–341.
123. Lim S, Davidson MS, Hausenloy DJ, Yellon DM. **Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore.** *Cardiovasc Res* 2007;75:530–535.
124. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, Bruce IC, et al. **kappa-Opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning.** *Anesthesiology* 2006;105:550–556.
125. Sharma A, Singh M. **Protein kinase C activation and cardioprotective effect of preconditioning with oxidative stress in isolated rat heart.** *Mol Cell Biochem* 2001;219:1–6.

- 126.** Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. **Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes.** *Am J Physiol* 2002;282:L1324– 1329.
- 127.** Skyschally A, Schulz R, Gres P, Korth H-G, Heusch G. **Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid.** *Am J Physiol* 2003;284:H698– 703.
- 128.** Baines CP, Goto M, Downey JM. **Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium.** *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:207–16.
- 129.** Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, Strasser RH. **Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart.** *Cardiovasc Res* 2004;61:591–599.
- 130.** Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. **The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning.** *Basic Res Cardiol.* 2010 Sep;105(5):651-5.
- 131.** Swynghedauw B. **Molecular mechanisms of myocardial remodeling.** *Physiol Rev* 1999;70:215–262.
- 132.** Diamond JA, Phillips RA. **Hypertensive heart disease.** *Hypertens Res* 2005;28:191–202.
- 133.** Prisant LM. Hypertensive heart disease. *J Clin Hypertens* 2005;7:231–238.
- 134.** Massie BM, Tubau JF, Szlachcic J, O’Kelly BF. **Hypertensive heart disease: the critical role of left ventricular hypertrophy.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13 (suppl I):s18–s24.
- 135.** Voucharas C, Lazou A, Triposkiadis F, Tsilimingas N. **Remote preconditioning in normal and hypertrophic rat hearts.** *J Cardiothorac Surg* 2011 Mar;6(1):34.
- 136.** Moolman JA, Genade S, Tromp E, Opie LH, Lochner A. **Ischaemic preconditioning does not protect hypertrophied myocardium against ischaemia.** *S Afr Med J* 1997 Jun;87 (Suppl 3):C151-156.
- 137.** Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. **Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: independent effects of aging and longstanding hypertension.** *Exp Gerontol* 2007;42(8):807-814.
- 138.** Speechly-Dick ME, Baxter GF, Yellon DM. **Ischaemic preconditioning protects hypertrophied myocardium.** *Cardiovasc Res* 1994 Jul;28(7):1025-1029.

- 139.** Pantos CI, Davos CH, Carageorgiou HC, Varonos DV, Cokkinos DV. **Ischaemic preconditioning protects against myocardial dysfunction caused by ischaemia in isolated hypertrophied rat hearts.** *Basic Res Cardiol* 1996 Nov-Dec;91(6):444-449.
- 140.** Butler KL, Huang AH, Gwathmey JK. **AT1-receptor blockade enhances ischemic preconditioning in hypertrophied rat myocardium.** *Am J Physiol* 1999 Dec;277(6 Pt 2):H2482-2487.
- 141.** Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Xing Y, Maeda H. **Ischemic preconditioning prevents reperfusion heart injury in cardiac hypertrophy by activation of mitochondrial K_{ATP} channels.** *Int J Cardiol* 2004 Jul;96(1):41-49.
- 142.** Butler KL, Huffman LC, Koch SE, Hahn HS, Gwathmey JK. **STAT-3 activation is necessary for ischemic preconditioning in hypertrophied myocardium.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Aug;291(2):H797-803.
- 143.** Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. **Attenuated cardioprotective response to bradykinin, but not classical ischaemic preconditioning, in DOCA-salt hypertensive left ventricular hypertrophy.** *Pharmacol Res* 2007 Jan;55(1):42-8.
- 144.** Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV. **Protection of the abnormal heart.** *Heart Fail Rev* 2007 Dec;12(3-4):319-30.
- 145.** Dai W, Simkhovich BZ, Kloner RA. **Ischemic preconditioning maintains cardioprotection in aging normotensive and spontaneously hypertensive rats.** *Exp Gerontol* 2009;44(5):344-349.
- 146.** Trippodo NC, Frohlich ED. **Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. Man and Rat.** *Circ Res* 1981;48(3):309-319.
- 147.** Doggrell SA, Brown L. **Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.** *Cardiovasc Res* 1998;39:89-105.
- 148.** Hasenfuss G. **Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.** *Cardiovasc Res* 1998;39: 60-76.
- 149.** Martins AS, Aguilera NW, Matsubara BB, Bregagnollo EA. **Experimental myocardial hypertrophy induced by a minimally invasive ascending aorta coarctation.** *Braz J Med Biol Res* 2001;34: 413-415.
- 150.** Aiello E, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Perez NG, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. **Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286: H1229-H1235.
- 151.** Fang CX, Dong F, Paul Thomas D, Ma H, He L, Ren J. **Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead**

transcription factor and atrophy gene transcription. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008;295: H1206–H1215.

152. http://www.wistar.org/about_wistar. Επίσημη ιστοσελίδα Ινστιτούτου Wistar.

153. Voucharas C, Tagarakis G, Lazou A, Triposkiadis F, Tsilimingas N. **Experimental cardiac hypertrophy induced by oral administration of mineralocorticoid in rats.** Angiology, έγινε δεκτή για δημοσίευση Αύγουστος 2011.

154. Lindpaintner K, Sen S. **Role of sodium in hypertensive cardiac hypertrophy.** Circ Res 1985;57:610-617.

155. Meggs LG, Ben-Ari J, Gammon D, Goodman AI. **Myocardial hypertrophy: the effect of sodium and the role of sympathetic nervous system activity.** Am J Hypertens 1988;1:11-15.

156. Fields NG, Yuan BX, Leenen FH. **Sodium-induced cardiac hypertrophy: cardiac sympathetic activity versus volume load.** Circ Res 1991;68:745-755.

157. Porrello ME, Huggins CE, Curl CL, Domenighetti AA, Pedrazzini T, Delbridge L, Morgan TO. **Elevated dietary sodium intake exacerbates myocardial hypertrophy associated with cardiac-specific overproduction of angiotensin II.** J Ren-Ang-Ald System 2004;5:169.

158. Frohlich ED, Varagic J. The role of sodium in hypertension is more complex than simply elevating arterial pressure. Nat Rev Cardiol 2004 Nov;1:24-30.

159. Attarian DE, Jones RN, Currie WD, et al. **Characteristics of chronic left ventricular hypertrophy induced by subcoronary valvular aortic stenosis. Response to ischemia.** J Thorac Cardiovasc Surg 1981;81:389–395.

160. Peyton RB, Trigt PV, Pellom GL. **Improved tolerance to ischemia in hypertrophied myocardium by pre-ischemic enhancement of adenosine triphosphate.** J Thorac Cardiovasc Surg 1982;84:11–15.

161. Anderson PG, Allard MF, Thomas GD, Bishop SP, Dignerness SB. **Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts.** Circ Res 1990;67:948–959.

162. Anderson PG, Bishop SP, Dignerness SB. **Transmural progression of morphologic changes during ischemia and reperfusion in the normal and hypertrophied heart.** Am J Pathol 1987;129:152–167.

163. Osbakken M, Douglas PS, Ivanics T, Zhang DN, Van Winkle T. **Creatinine kinase kinetics studied by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in a canine**

model of chronic hypertension-induced cardiac hypertrophy. *J Am Col Cardiol* 1992;19:223–228.

164. Obata H, Tanaka H, Taneda T. **Response of isolated perfused heart to ischemia after long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with diltiazem.** *Jpn Circ J* 1990;54:89–99.

165. Batist G, Mersereau W, Malashenko BA, Chiu RC. **Responses to ischemia-reperfusion injury in hypertrophic heart: role of free-radical metabolic pathways.** *Circulation* 1989;80(Suppl III):10–13.

166. Blank SD, Lahorra JA, McDonald RS, Denenberg AG, Titus JS, Torchiana DF, Daggett WM, Geffin GA. **Superior recovery of hypertrophied rat myocardium after cardioplegic arrest.** *Ann Thorac Surg* 1998;65:390-396.

167. Langendorff O. **Untersuchungen und berlebenden sagetierherzen pflugers.** *Arch Gen Physiol* 1985;61:291-232.

168. Neely JR, Liebermeister H, Morgan HE. **Effect of pressure development on membrane transport of glucose in isolated rat heart.** *Am J Physiol* 1967;212:804-814.

169. Taegtmeyer H, Hems R, Krebs HA. **Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart.** *Biochem J* 1980;186:701–711.

170. Baxter GF, Yellon DM. **Changes in myocardial collagen content after chronic DOCA-salt hypertension in the rat.** *Med Sci Res* 1992;20:527-529.

171. Yoshida K, Kim-Mitsuyama S, Wake R, Izumiya Y, Izumi Y, Yukimura T, Ueda M, Yoshiyama M, Iwao H. **Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress.** *Hypertension Research* 2005;28:447–455.

172. Friberg P, Folkow B, Nordlander M. **Structural adaptation of the rat left ventricle in response to changes in pressure and volume loads.** *Acta Physiol Scand* 1985, 125:67-79.

173. Rayner B. **Primary aldosteronism and aldosterone-associated hypertension.** *J Clin Pathol* 2008;61(7):825-831.

174. Oki K, Yamane K. **Therapies for adrenal insufficiency.** *Expert Opin Pharmacother* 2007;8(9):1283-1291.

175. Hahner S, Allolio B. **Management of adrenal insufficiency in different clinical settings.** *Expert Opin Pharmacother* 2005;6(14):2407-2417.

176. Freeman R. **Current pharmacologic treatment for orthostatic hypotension.** Clin Auton Res 2008;18 Suppl 1:14-18.
177. Genard P, Palem-Vliers M. **Effect of 6-dehydro-DOCA and 6-dehydro-9 alpha-fluorocortisol acetate on the excretion of sodium and potassium in the rat.** J Steroid Biochem 1985;23(5A):673-675.
178. Igarashi Y. **Synthetic mineralocorticoid, clinical application of fludrocortisone acetate (Florinef).** Nippon Rinsho 1994;52(3):779-786.
179. Krebs HA, Henseleit K. **Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für.** Physiol Chemie 1932;210:33-66.
180. Sytherland FJ, Hearse DJ. **The isolated blood and perfusion fluid perfused heart.** Pharmacol Res 2000;41:613-627.
181. Visner MS, Arentzen CE, Parrish DG, Larson EV, O'Connor MJ, Crumbley 3rd AJ, Bache RJ, Anderson RW. **Effects of global ischemia on the diastolic properties of the left ventricle in the conscious dog.** Circulation 1985;71:610-619.
182. Vogel WM, Briggs LL, Apstein CS. **Separation of inherent diastolic myocardial fiber tension and coronary vascular erectile contributions to wall stiffness of rabbit hearts damaged by ischemia, hypoxia, calcium paradox and reperfusion.** J Mol Cell Cardiol 1985;17:57-70.
183. Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. **Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice.** Lancet 2009;374:1557-1565.
184. Friehs I, del Nido PJ. **Pathophysiology of ischemic-reperfusion injury. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury.** Ann Thorac Surg 2003;75:S678-S684.
185. Baxter GF, Yellon DM. **Attenuation of reperfusion-induced ventricular fibrillation in the rat isolated hypertrophied heart by preischemic diltiazem treatment.** Cardiovasc Drugs Ther 1993;7:225-231.
186. Snoeckx LH, van der Vusse GJ, Coumans WA, Willemsen PH, Reneman RS. **Differences in ischaemia tolerance between hypertrophied hearts of adult and aged spontaneously hypertensive rats.** Cardiovasc Res 1993;27(5):874-881.
187. Balakumar P, Singh H, Singh M, Anand-Srivastava MB. **The impairment of preconditioning-mediated cardioprotection in pathological conditions.** Pharmacol Res 2009;60(1):18-23.

- 188.** Margonato V, Milano G, Allibardi S, Merati G, de Jonge R, Samaja M. **Swim training improves myocardial resistance to ischemia in rats.** *Int J Sports Med* 2000;21(3):163-167.
- 189.** Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer R, Jr Balshaw D, Lathrop DA. **Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy.** *Circ Res* 2004; 95:125-134.
- 190.** Kloner RA, Rezkalla SH. **Cardiac protection during acute myocardial infarction: where do we stand in 2004?** *J Am Coll Cardiol* 2004;44:276-286.
- 191.** Przyklenk K, Whittaker P. **Cardioprotection via adaptation to hypoxia: expanding the timeline and targets?** *Basic Res Cardiol* 2011;106:325–328