

lek. Adrian Barzyc

*Wpływ dowieńcowego podania diphenyliodonium oraz L-argininy
w buforze o kwasowym odczynie na wielkość blizny pozawałowej
i występowanie zaburzeń rytmu serca u szczurów z niedokrwieniem
i reperfuzją mięśnia sercowego*

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Wojciechowska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Słowa kluczowe:

uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne, diphenyliodonium, L-arginina, apoptoza, nekroza

Key words:

ischemia - reperfusion injury, diphenyliodonium, L – arginine, apoptosis, necrosis

Nazwa i numer projektu badawczego:

Źródło finansowania badań: Praca powstała w ramach projektu „TIME 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020, numer umowy o dofinansowanie: POWR.03.05.00-00-Z040/18-00.

Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor pracy prof. dr hab. n. med. Agnieszce Cudnoch-Jędrzejewskiej, Promotor Pomocniczej dr. n. med. Małgorzacie Wojciechowskiej, dr. n. med. Katarzynie Czarzastej, dr. n. med. Michałowi Kowarze oraz wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, a w szczególności pracownikom laboratorium za ogromną życzliwość, wsparcie oraz udzieloną mi w trakcie przeprowadzania doświadczeń i oznaczeń pomoc.

Dziękuję także moim rodzicom, siostrze oraz Mateuszowi Weigle, za słowa otuchy oraz pomoc, kiedy tego najbardziej potrzebowałem.

Spis treści

Spis treści.....	5
Spis rycin	8
Wykaz stosowanych skrótów w języku polskim i angielskim.....	11
Streszczenie w języku polskim.....	13
Streszczenie w języku angielskim.....	18
1. Wstęp	23
1.1. Wprowadzenie	23
1.2. Zawał serca	24
1.3. Mechanizmy uszkodzenia poreperfuzyjnego.....	27
oraz farmakologiczne metody ich ograniczania.....	27
1.3.1. Przykurcz reperfuzyjny	27
1.3.2. Przeładowanie jonami wapnia.....	30
1.3.3. Przykurcz stężeniowy	32
1.3.4. Rozprzestrzenianie się przykurczu	32
1.3.5. Metody ograniczania przykurczu reperfuzyjnego.....	32
1.3.6. Przetrwale otwarcie megakanalów mitochondrialnych	34
1.3.7. Stres oksydacyjny	37
1.3.8. Zjawisko no-reflow	39
1.3.9. Stan zapalny	41
1.3.10. Podsumowanie.....	42
1.4. Modele zwierzęce zawału serca.....	43
2. Założenia i cele pracy	45
2.1. Założenia pracy	45
2.2. Cele pracy	47
3. Materiały i metody.....	48

3.1.	System Langendorffa	48
3.1.1.	Budowa systemu.....	48
3.1.2.	Działanie systemu.....	49
3.2.	Charakterystyka zwierząt laboratoryjnych	50
3.3.	Przebieg doświadczeń	51
3.3.1.	Przygotowanie buforów.....	51
3.3.2.	Znieczulenie	51
3.3.3.	Pobranie serc	51
3.3.4.	Podłączenie serca do systemu Langendorffa.....	53
3.3.5.	Etapy doświadczenia - okres stabilizacji (przygotowania), niedokrwienia i reperfuzji	53
3.3.6.	Monitorowanie czynności lewej komory serca oraz zaburzeń rytmu serca	56
3.3.7.	Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w czasie stabilizacji.....	57
3.3.8.	Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w czasie reperfuzji.....	57
3.3.9.	Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w czasie reperfuzji.....	57
3.3.10.	Epizody migotania komór	63
3.4.	Badania po zakończeniu doświadczeń.....	64
3.4.1.	Ocena obszaru zawału serca	64
3.4.2.	Ocena zawartości białka kaspazy-3 oraz kinazy 3 - fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca (Western blot)	67
3.5.	Analiza statystyczna.....	68
4.	Wyniki.....	69
4.1.	Podstawowe parametry hemodynamiczne.....	69
4.1.1.	Wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie stabilizacji	69
4.1.2.	Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca.....	70
4.1.3.	Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie reperfuzji	72

4.1.4.	Epizody migotania komórek	77
4.2.	Podstawowe parametry histologiczne	77
4.2.1.	Obszar zawału serca oceniony metodą histopatologiczną	77
4.3.	Podstawowe parametry biochemiczne	82
4.3.1.	Ocena zawartości kaspazy-3 w koniuszku serca	82
4.3.2.	Ocena zawartości kinazy 3 - fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca.....	87
4.	Dyskusja i omówienie wyników	92
5.1.	Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca oraz na deltę wartości ciśnienia rozkurczowego	92
5.2.	Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na obszar martwicy serca w modelu Langendorffa	93
5.3.	Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na poziom białka kaspazy 3 oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu w koniuszku serca	94
6.	Wnioski	96
7.	Podsumowanie i perspektywy	97
8.	Ograniczenia badania	98
8.	Piśmiennictwo	99

Spis rycin

Ryc. 1. Zmiany równowagi jonowej komórki podczas niedokrwienia.	25
Ryc. 2. Zmiana równowagi jonowej komórki w czasie reperfuzji.	26
Ryc. 3. Zmiana kształtu kardiomiocyty w czasie niedokrwienia oraz reperfuzji.....	29
Ryc. 4. Podsumowanie informacji dotyczących przykurczu reperfuzyjnego.	29
Ryc. 5. Schemat przeładowania komórki nadmiarem jonów wapnia po okresie niedokrwienia.	31
Ryc. 6. Sposób kaniulacji serca skutkujący wstecznym przepływem buforu pozwalającym na dotarcie perfuzatu do tętnic wieńcowych.	44
Ryc. 7. Wpływ badanych substancji na szlaki indukowane podczas niedokrwienia/reperfuzji. *Śmierć komórki miała miejsce głównie w mechanizmach apoptozy i nekrozy.	46
Ryc. 8. Zdjęcie systemu Langendorffa użytego w doświadczeniach.	49
Ryc. 9. Ilustracja mechanizmu działania systemu Langendorffa w warunkach stałego ciśnienia.	50
Ryc. 10. Zdjęcie serca przygotowanego do pobrania.	52
Ryc. 11. Zdjęcie usuwania serca wraz z płucami.	52
Ryc. 12. Etapy doświadczenia.	54
Ryc. 13. Podawanie zmodyfikowanych buforów w trakcie reperfuzji.....	54
Ryc. 14. Serce podłączone do systemu Langendorffa, w lewej komorze serca umieszczony jest balon umożliwiający pomiar ciśnienia (czerwona strzałka).	56
Ryc. 15. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (stabilizacja) przy użyciu programu DataTrax2.	58
Ryc. 16. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (15 minuta reperfuzji) przy użyciu programu DataTrax2.	59
Ryc. 17. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (15 minuta reperfuzji) przy użyciu programu DataTrax2.	60
Ryc. 18. Zasada wyznaczania *”Deltę” czyli różnicy między ciśnieniem rozkurczowym w określonym momencie reperfuzji (15., 30. albo 45. minucie), a ciśnieniem rozkurczowym w okresie stabilizacji.	61

Ryc. 19. Przykładowy pomiar czasu do przywrócenia rytmu serca przy użyciu programu DataTrax2. Zielona strzałka - powrót fizjologicznego rytmu serca, czerwona strzałka – pojedyncze pobudzenie niebędące dowodem na powrót fizjologicznego rytmu serca.	62
Ryc. 20. Przykładowy zapis epizodu migotania komór oraz przywrócenia fizjologicznego rytmu serca.....	63
Ryc. 21. Przykładowy skan przekrojów poprzecznych serca wybarwionych z użyciem tetrazolium.....	65
Ryc. 22. Przykładowy skan pola powierzchni krążków serca wyznaczonego za pomocą funkcji Treshold (biały obszar).	66
Ryc. 23. Przykładowy skan pola powierzchni krążków serca objętego martwicą wyznaczonego za pomocą funkcji Treshold (biały obszar).....	67
Ryc. 24. Wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie stabilizacji.	69
Ryc. 25. Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca.	71
Ryc. 26. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.	74
Ryc. 27. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.	75
Ryc. 28. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.	75
Ryc. 29. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.	76
Ryc. 30. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.....	78
Ryc. 31. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.....	79
Ryc. 32. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.....	80
Ryc. 33. Obszar martwicy serca (w procentach) – porównanie między badanymi grupami.	81
Ryc. 34. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.	82
Ryc. 35. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.	83
Ryc. 36. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.	84
Ryc. 37. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.	85
Ryc. 38. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.	86
Ryc. 39. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.	87
Ryc. 40. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.	88
Ryc. 41. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.	89

Ryc. 42. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca90

Tab. 1. Podsumowanie grup włączonych do badania.....55

Tab. 2. Wyniki.....91

Wykaz stosowanych skrótów w języku polskim i angielskim

- ATP - *Adenosine Triphosphate* - adenozyno-5'-trifosforan;
- BH4 - *Tetrahydrobiopterin* – tetrahydrobiopteryna;
- CsA - *Cyclosporine A* - cyklosporyna A;
- DAMPs - *Danger/Damage Associated Molecular Patterns* - struktury molekularne związane z zagrożeniem/uszkodzeniem;
- EDHF - *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* - czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego;
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - test immunoenzymatyczny/immunoenzymosorpcyjny;
- GJ - *Gap Junctions* - złącza szczelinowe;
- HMGB1 - *High Mobility Group Box 1 protein* - białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej 1;
- ICAM - *Intercellular Adhesion Molecule* - cząsteczka adhezji międzykomórkowej;
- IL-6 - *Interleukin 6* - interleukina – 6;
- IMM - *Inner Mitochondrial Membrane* - wewnętrzna błona mitochondrialna;
- IPC - *Ischemic Preconditioning* - hartowanie przez niedokrwienie;
- IRI - *Ischemia Reperfusion Injury* - uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne;
- KHB - *Krebs Henseleit Buffer* - bufor Krebsa – Henseleita;
- LDH - *Lactate Dehydrogenase* - dehydrogenaza mleczanowa;
- MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases* - kinazy aktywowane mitogenami;
- MCP 1 - *Monocyte Chemoattractant Protein 1* - białko chemotaktyczne monocytów 1;
- mPTP - *mitochondrial Permeability Transition Pores* – megakanały mitochondrialne;
- MyD88 - *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*;
- NCE - *2Na⁺/Ca⁺ Exchanger* - wymiennik 2Na⁺/Ca²⁺;
- NHE - *Na⁺/H⁺ Exchanger* - wymiennik Na⁺/H⁺;
- NLRP3 - *NOD - Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3*;
- NRP - *No Reflow Phenomenon* - zjawisko no - reflow;
- NO - *Nitric Oxide* – tlenek azotu;
- NOS - *Nitric Oxide Synthase* - syntaza tlenku azotu;

PCI - *Percutaneous Coronary Intervention* - przezskórna angioplastyka wieńcowa;
PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase* - kinaza 3 – fosfatydyloinozytolu;
RI - *Reperfusion Injury* - uszkodzenie poreperfuzyjne;
RISK - *Reperfusion Injury Salvage Kinase* - kinaza ratująca przed uszkodzeniem reperfuzyjnym;
TLR9 - *Toll - Like Receptor 9* - Receptor Toll-podobny 9;
TGF- β - *Transforming Growth Factor beta* - transformujący czynnik wzrostu beta;
TNF- α - *Tumor - Necrosis Factor alfa* - czynnik martwicy nowotworów alfa.

Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Przyczyną ostrych zespołów wieńcowych są najczęściej istotne zmiany miażdżycowe zawężające, a czasem wręcz zamykające naczynie wieńcowe, stąd w ich leczeniu stosuje się zabieg angioplastyki wieńcowej polegający na przywróceniu drożności takiego naczynia. Nagłe przywrócenie przepływu krwi do obszaru niedokrwionego jest przyczyną uszkodzenia poreperfuzyjnego, które odpowiada za zwiększenie ostatecznych rozmiarów zawału serca oraz wzrost ryzyka zagrażających życiu zaburzeń rytmu serca.

Założenia pracy

Podstawowymi mechanizmami patofizjologicznymi uszkodzenia poreperfuzyjnego są: przykurcz reperfuzyjny, przetrwałe otwarcie megakanalów mitochondrialnych, stres oksydacyjny, stan zapalny oraz zjawisko no-reflow. Nie można dokładnie określić, który z nich dominuje, najprawdopodobniej współwystępują one ze sobą. Hipoteza zakłada, że tylko interwencja, która jednocześnie ingeruje w różne szlaki uszkodzenia poreperfuzyjnego może okazać się skuteczna w zmniejszaniu końcowego obszaru zawału serca oraz ograniczeniu częstości występowania epizodów migotania komór serca.

Cel pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej jest zbadanie czy dowieńcowe podanie diphenyliodonium, L-argininy, buforu o kwasowym odczynie oraz ich kombinacji zmniejsza prawdopodobieństwo migotania komór serca oraz wpływa korzystnie na rozległość obszaru martwicy serca u szczurów.

Metodyka

Doświadczenia przeprowadzono na sercach szczurzych w warunkach *in vitro*.

Sześćdziesiąt siedem 12-tygodniowych samców szczurów Sprague-Dawley (SPRD/Clzd) podzielono na osiem grup. Po podłączeniu serca do systemu Langendorffa we wszystkich grupach pierwsze 10 minut doświadczenia stanowiło okres stabilizacji (przygotowania). Następnie przepływ buforu w systemie był wyłączany na czas 15 minut co skutkowało całkowitym niedokrwieniem mięśnia sercowego. W czasie pierwszych trzech minut reperfuzji bufor był podawany za pośrednictwem oddzielnego dojścia, a na kolejne 42 minuty powracano do pierwotnego źródła buforu.

W grupie pierwszej podczas reperfuzji podano bufor Krebsa-Henseleita niepoddany żadnym modyfikacjom (grupa kontrolna). Skład buforu w grupach 2, 6, 7, 8 został zmodyfikowany poprzez dodanie diphenyliodonium ($20 \mu\text{mol/l}$), w grupach 3, 5, 7, 8 użyta została L-arginina (3mmol/l), a w grupach 4, 5, 6, 8 podczas reperfuzji wykorzystano bufor o kwasowym odczynie – pH 6,8.

Ocenie podlegały następujące parametry:

- średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca podczas stabilizacji;
- czas od początku reperfuzji do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca;
- średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie reperfuzji odpowiednio w 15., 30. oraz 45. minucie jej trwania;
- liczba epizodów migotania komór;
- wyrażony w procentach stosunek powierzchni objętej zawałem do całego obszaru serca;
- zawartość białka - kaspazy-3 w koniuszku serca (Western blot);
- zawartość białka - kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca (Western blot);

Wyniki:

- Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wartościach ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca podczas stabilizacji między poszczególnymi grupami;
- Nie wykonano porównawczej analizy statystycznej liczby epizodów migotania komór serca pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi a grupą kontrolną z uwagi na zbyt małą liczbę epizodów migotania komór.
- Średni czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w grupach badawczych nie różnił się statystycznie istotnie względem grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano również statystycznie istotnych różnic dla tego parametru pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi;
- Średnie „delty”, czyli różnice między wartościami ciśnienia rozkurczowego w danym momencie reperfuzji (w 15., 30. oraz w 45. minucie) a wartością ciśnienia rozkurczowego w fazie przygotowania (stabilizacji) grup badawczych D oraz BKO + D + ARG były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej. Ponadto średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 30. i 45. reperfuzji dla grup badawczych ARG oraz BKO + ARG były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej.
- Średni procentowy obszar martwicy serca dla grup badawczych: D, BKO + ARG, ARG + D i BKO + D + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w średnim procentowym obszarze martwicy serca między poszczególnymi grupami badawczymi.
- Średni stosunek zawartości białka kaspazy-3 w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla grup badawczych: BKO i BKO + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano, że średni stosunek zawartości kaspazy-3 względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż dla pozostałych: BKO + ARG vs BKO + D, ARG + D vs BKO + D, BKO + ARG vs ARG, D vs BKO + D, BKO vs ARG, BKO vs BKO + D, BKO + ARG vs BKO + D + ARG.

- Średni stosunek zawartości białka kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla grupy badawczej BKO + ARG był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano, że średni stosunek zawartości kinazy 3-fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w pozostałych: BKO + ARG vs ARG, BKO + ARG vs BKO, BKO + ARG vs ARG + D, BKO + D + ARG vs ARG.

Wnioski:

1. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz kombinacji buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejsza parametr „delta” ciśnienia rozkurczowego (świadczący o sile przykurczu reperfuzyjnego) w 15., 30. i 45. minucie reperfuzji. Ponadto zastosowanie dodatku L-argininy oraz kombinacji L-argininy i buforu o kwasowym odczynie w tym modelu istotnie zmniejsza parametr delty ciśnienia rozkurczowego w 30. i 45. minucie reperfuzji.
2. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz następujących kombinacji: 3 substancji (buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium), 2 substancji (L-argininy i diphenyliodonium) oraz innych 2 substancji (buforu o kwasowym odczynie i L-argininy) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejsza obszar martwicy serca.
3. Zastosowanie dodatkowych substancji (bufor o kwasowym odczynie oraz kombinacji bufor o kwasowym odczynie z L-argininą) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa powoduje zmniejszenie zawartości białka kaspazy-3 (markera apoptozy) oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu p85 (czynnika protekcyjnego) w koniuszku serca.

Podsumowanie

Wyniki badań potwierdzają kardioprotekcyjny wpływ zastosowania w czasie reperfuzji buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8), L-argininy oraz diphenyliodonium. Jednoczesne dowieńcowe podanie diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem „delty” ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca oraz procentowego obszaru zawału serca względem grupy kontrolnej. Dokładne mechanizmy działania wymienionych substancji oraz możliwości ich zastosowania celem ograniczenia uszkodzenia poreperfuzyjnego wymagają dalszych badań.

Streszczenie w języku angielskim

Effect of intracoronary administration of diphenyliodonium and L-arginine in an acidic buffer on the size of the post-infarction scar and occurrence of cardiac arrhythmias in ischemic rats undergoing myocardial reperfusion.

Introduction

The principal cause of acute coronary syndrome is significant stenosis or even total occlusion of coronary artery, therefore the method of treatment of this disease is coronary angioplasty procedure (PCI). However, the sudden restoration of blood flow to the ischemic area causes reperfusion injury, which is responsible for increasing the final myocardial infarct size and the risk of life-threatening arrhythmias.

Work assumptions

The basic pathophysiological mechanisms of post-reperfusion injury are: reperfusion contracture, persistent opening of mitochondrial permeability transition pores, oxidative stress, inflammation and no-reflow phenomenon. It is impossible to determine which of them predominates, most likely they co-occur with each other. The hypothesis assumes that only an intervention that simultaneously interferes with different pathways of post-reperfusion injury may be effective in reducing the final size of myocardial infarction and reducing the incidence of life-threatening arrhythmias.

Aim of the work

The main purpose of the doctoral dissertation is to investigate whether intracoronary administration of diphenyliodonium and L-arginine in an acidic buffer reduces the likelihood

of ventricular fibrillation and has a positive effect on the size on the size of post-infarction cardiac necrosis in rats.

Methodology

The experiments were carried out on rat hearts *in vitro*.

Sixty-seven 12-week-old male Sprague-Dawley rats (SPRD/Clzd) were divided into eight groups. After connecting the heart to the Langendorff system, the first 10 minutes of the experiment constituted a stabilization period in all groups. Then, the buffer flow in the system was turned off for 15 minutes, which resulted in complete myocardial ischemia. During the first three minutes of reperfusion, the buffer was administered via separate access, for the next 42 minutes the buffer was returned to the original source.

In the first group, Krebs-Henseleit buffer was administered during reperfusion without any modifications (control group). The composition of the buffer in groups 2, 6, 7, 8 was modified by adding diphenyliodonium (20 $\mu\text{mol/l}$), in groups 3, 5, 7, 8 - L-arginine (3mmol/l) was used, and in groups 4, 5, 6, 8 - an acidic buffer, pH 6.8, was used during reperfusion.

The following parameters were assessed:

- diastolic pressure in the left ventricle of the heart during stabilization;
- time from the beginning of reperfusion to the restoration of the physiological rhythm of the heart;
- diastolic pressure in the left ventricle during reperfusion in the 15th, 30th and 45th minute of its duration, respectively;
- number of ventricular fibrillation episodes;
- the ratio of the infarcted area to the entire heart area expressed as a percentage;
- protein content - caspase-3 in the apex of the heart (Western blot);
- protein content - phosphatidylinositol 3-kinase in the apex of the heart (Western blot);

Results:

- There were no statistically significant differences in diastolic pressure in the left ventricle during stabilization between the groups.
- A comparative statistical analysis of the number of ventricular fibrillation episodes between the individual study groups and the control group was not performed due to too few ventricular fibrillation episodes.
- The mean time to recovery of physiological heart rhythm in the study groups was not statistically significantly different from the control group. There were also no statistically significant differences for this parameter between the individual study groups.
- The mean diastolic “deltas” (differences between diastolic pressures at certain moments - 15., 30. and 45. minute of reperfusion and diastolic pressures at stabilization phase) for study groups D and BKO + D + ARG were significantly lower than for the control group. In addition, the mean diastolic deltas at 30. and 45. minute of reperfusion for the ARG and BKO + ARG study groups were significantly lower than for the control group.
- The average percentage area of cardiac necrosis for the study groups: D, BKO + ARG, ARG + D and BKO + D + ARG was significantly lower than in the control group. There were no statistically significant differences in the mean percentage of cardiac necrosis between the individual study groups.
- The average ratio of caspase-3 protein content in the apex of the heart to the reference protein (β -actin) for the study groups: BKO and BKO + ARG was significantly lower than in the control group. In addition, it was shown that the average ratio of caspase-3 content to the reference protein (β -actin) for some study groups was significantly lower than in the others: BKO + ARG vs BKO + D, ARG + D vs BKO + D, BKO + ARG vs

ARG, D vs BKO + D, BKO vs ARG, BKO vs BKO + D, BKO + ARG vs BKO + D + ARG.

- The average ratio of the phosphatidylinositol 3-kinase protein content in the apex of the heart to the reference protein (β -actin) for the BKO + ARG study group was significantly lower than in the control group. In addition, it was shown that the average ratio of phosphatidylinositol 3-kinase content in the apex of the heart to the reference protein (β -actin) for some study groups was significantly lower than in the others: BKO + ARG vs ARG, BKO + ARG vs BKO, BKO + ARG vs ARG + D, BKO + D + ARG vs ARG.

Conclusions:

1. The use of additional substances - diphenyliodonium and a combination of an acidic buffer, L-arginine and diphenyliodonium in the Krebs-Henseleit buffer in the *ex vivo* myocardial infarction model using the Langendorff system significantly reduced the delta parameter of diastolic pressure (indicating the strength of reperfusion contracture) after 15., 30. and 45. minutes of reperfusion. The addition of L-arginine and the combination of L-arginine and an acidic buffer in this model significantly reduced the “delta” parameter of diastolic pressure after 30. and 45. minutes of reperfusion.
2. The use of additional substances - diphenyliodonium and the following combinations: 3 substances (acidic buffer, L-arginine and diphenyliodonium), 2 substances (L-arginine and diphenyliodonium) and other 2 substances (acidic buffer and L-arginine) in Krebs-Henseleit buffer in an *ex vivo* myocardial infarction model using the Langendorff system significantly reduces the size of cardiac necrosis.
3. The use of additional substances (an acidic buffer and a combination of an acidic buffer with L-arginine) in the Krebs-Henseleit buffer in the *ex vivo* myocardial infarction model using the Langendorff system reduces the content of caspase-3 protein (apoptosis marker) and kinase 3 -phosphatidylinositide (protective factor) at the apex of the heart.

Summary

The conducted studies confirmed the cardioprotective effect of administration of an acidic buffer (pH 6.8), L-arginine and diphenyliodonium during reperfusion. Simultaneous combination of substances, e.g., intracoronary administration of diphenyliodonium and L-arginine in an acidic buffer, was associated with a statistically significant reduction in the diastolic pressure delta in the left ventricle and the percentage of cardiac necrosis compared to the control group. The exact mechanism of action of these substances and the possibility of using these mechanisms requires further research.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Zawał serca wiąże się z nieodwracalnym uszkodzeniem kardiomiocytów z powodu ich przedłużonego niedotlenienia, a następnie martwicy. Zawał serca z uniesieniem odcinka ST to zespół kliniczny wywołany zamknięciem lub krytycznym zwężeniem naczynia wieńcowego. Prowadzi do odcinkowej martwicy mięśnia sercowego oraz uwolnienia swoistych markerów uszkodzenia komórek miokardium [1].

W leczeniu ostrych zespołów wieńcowych z uniesieniem odcinka ST stosowany jest zabieg angioplastyki wieńcowej polegający na otwarciu uprzednio niedrożnego naczynia. Zaobserwowano, że nagle przywrócenie przepływu krwi do obszaru wcześniej niedokrwionego jest przyczyną uszkodzenia poreperfuzyjnego (IRI, *Ischemia - Reperfusion Injury - uszkodzenie niedokrwienno - reperfuzyjne*), które może odpowiadać nawet za 50% ostatecznej wielkości zawału serca oraz za wzrost ryzyka groźnych zaburzeń rytmu serca [1, 2, 3].

Wielkość obszaru objętego zawałem należy do głównych czynników ryzyka zgonu oraz prawdopodobieństwa wystąpienia w przyszłości niewydolności serca [1]. W świetle aktualnych możliwości terapeutycznych najistotniejszym jest niezwłoczne wykonanie angioplastyki wieńcowej oraz maksymalne ograniczenie IRI [4]. Trwają liczne badania przedkliniczne obejmujące swoją tematyką potencjalne metody ograniczania IRI.

Podstawowymi mechanizmami patofizjologicznymi IRI są: przykurcz reperfuzyjny, przetrwałe otwarcie kanałów mPTP (*mPTP, mitochondrial Permeability Transition Pores*) bezpośrednio skutkujące śmiercią komórki w mechanizmie apoptozy, stres oksydacyjny (*ROS, Reactive Oxygen Species*), stan zapalny oraz zjawisko no-reflow (*NRP, No Reflow Phenomenon*) definiowane jako brak powrotu przepływu krwi przez naczynia mikrokrążenia po udrożnieniu poprzednio zamkniętej tętnicy wieńcowej. Na podstawie dotychczasowych badań nie można dokładnie określić, który mechanizm dominuje, gdyż najprawdopodobniej współwystępują one ze sobą [2,5].

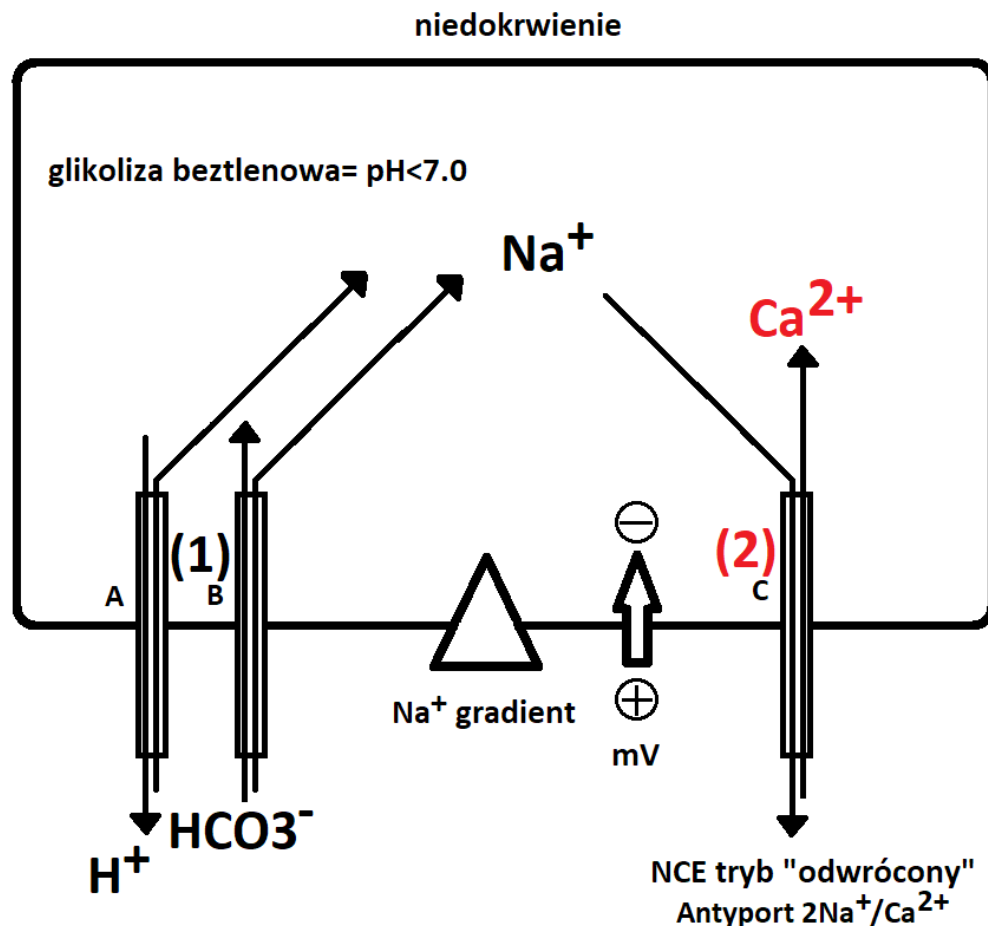
Przeprowadzono liczne badania zarówno doświadczalne, jak i kliniczne polegające na podawaniu w czasie reperfuzji różnego rodzaju substancji celem ograniczenia IRI. W większości przypadków zastosowane związki wpływały tylko na jeden z mechanizmów prowadzących do IRI. Wśród stosowanych substancji były: antagonisty kanału-wapniowego, antyoksydanty, substancje o działaniu przeciwzapalnym, cyklosporyna A (*CsA*, *Cyclosporine A*), bufor o kwasowym odczynie, L-arginina, diphenyliodonium oraz adenozyzna [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15], lecz uzyskane wyniki nie są jednoznaczne.

1.2. Zawał serca

Choroba niedokrwienna serca jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych, pomimo spadku śmiertelności w wyniku ostrego zawału serca [16, 17, 18, 19]. Podstawową przyczyną niedokrwienia kardiomiocytów jest zamknięcie lub krytyczne zwężenie naczynia wieńcowego spowodowane zakrzepem powstałym w jego świetle w wyniku pęknięcia blaszki miażdżycowej [20, 21]. Proces martwicy ma swój początek w warstwie podsierdziowej oraz postępuje wraz z czasem trwania niedokrwienia w kierunku nasierdza. W obrębie tkanki objętej zawałem można wyróżnić kardiomiocyty ulegające nekrozie (strefa centralna) oraz apoptozie (strefa brzeżna) [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

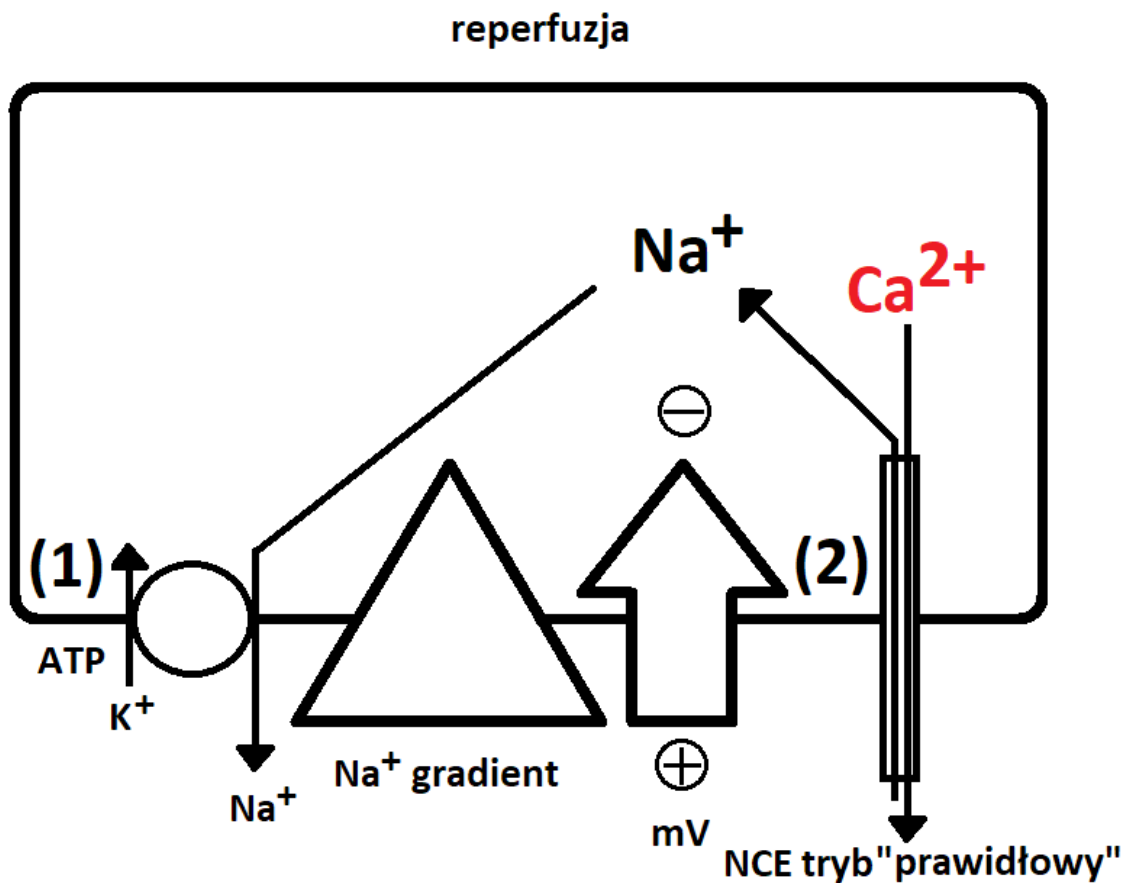
Nagle pozbawienie kardiomiocytów tlenu oraz składników odżywczych skutkuje serią zmian biochemicznych i metabolicznych w obrębie miokardium. W warunkach braku tlenu zatrzymana zostaje fosforylacja oksydacyjna, co prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej, wyczerpania zapasów adenozyjno-5'-trifosforanu (*ATP*, *Adenosine Triphosphate*) i zahamowania kurczliwości mięśnia sercowego. Rozpad pozostałego w komórce ATP dodatkowo nasila ten proces. Jest to spowodowane odwróconym działaniem ATPazy F1F0, której celem jest utrzymanie właściwego potencjału błonowego w obrębie mitochondrium. Dochodzi do hydrolizy dostępnego ATP oraz wzrostu stężenia nieorganicznego fosforanu. W warunkach niedotlenienia metabolizm komórkowy jest oparty na glikolizie beztlenowej, co skutkuje nagromadzeniem mleczanów, które obniżają wewnątrzkomórkowe pH do wartości < 7.0 . Akumulacja protonów aktywuje wymiennik Na^+/H^+ (*NHE*, *Na⁺/H⁺ Exchanger*), który usuwa z komórki protony i powoduje napływ jonów sodu do wnętrza komórki. Niedobór ATP w czasie niedokrwienia zatrzymuje działanie ATPazy $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$, a w celu przywrócenia fizjologicznego pH uaktywnia się kotransporter $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ nasilając napływ jonów sodu (oraz anionów wodorowęglanowych) do komórki. W odpowiedzi

na ten stan dochodzi do odwrócenia kierunku pracy wymiennika $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCE*, $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ *Exchanger*), co ma na celu usunięcie nadmiaru jonów sodu z komórki. Ubocznym skutkiem tych zmian jest również nagromadzenie dużej ilości jonów wapnia wewnątrz komórki (Ryc. 1). W czasie reperfuzji opisana powyżej sytuacja ulega odwróceniu [22, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35] (Ryc. 2).



Ryc. 1. Zmiany równowagi jonowej komórki podczas niedokrwienia.

Etap (1) – napływ jonów sodu do komórki, Etap (2) – napływ jonów wapnia do komórki. Elementy: A - wymiennik Na^+/H^+ , (2) B - symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, C – antyport $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Spadek gradientu sodowego, a co za tym idzie częściowa depolaryzacja błony komórkowej prowadzi do przejścia wymiennika $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) w „odwrócony” tryb pracy sprzyjający magazynowaniu wewnątrz komórki jonów wapnia.



Ryc. 2. Zmiana równowagi jonowej komórki w czasie reperfuzji.

Przywrócenie dostępu do ATP powoduje usunięciem z komórki nadmiaru jonów sodu na skutek działania (1) ATPazy $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$. Przywrócenie gradientu sodowego, a co za tym idzie częściowa repolaryzacja błony komórkowej prowadzi do nakierowania (2) wymiennika $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE) w „fizjologiczny” tryb pracy sprzyjający usuwaniu na zewnątrz komórki jonów wapnia. ATP = adenosine triphosphate; NCE = Na^+/H^+ exchanger.

1.3. Mechanizmy uszkodzenia poreperfuzyjnego oraz farmakologiczne metody ich ograniczania

Jedynym sposobem ochrony komórek miokardium przed śmiercią w wyniku niedokrwienia jest możliwie szybka reperfuzja, czyli przywrócenie przepływu krwi. Paradoksalnie gwałtowne przywrócenie przepływu w obrębie uprzednio niedrożnego naczynia wieńcowego nasila uszkodzenie niedokrwienne (*RI, Reperfusion Injury - uszkodzenie poreperfuzyjne*). Ponadto może odpowiadać nawet za 50% ostatecznej wielkości zawału oraz zwiększa ryzyko groźnych zaburzeń rytmu serca [3, 36, 37, 38]. RI skutkuje również ogłuszeniem kardiomiocytów, rozumianym jako brak kurczliwości w obrębie żywych kardiomiocytów przy utrzymaniu właściwego przepływu wieńcowego [39, 40, 41]. Ogłuszenie ma związek ze szkodliwym wpływem stresu oksydacyjnego wraz z towarzyszącym przeładowaniem komórki jonami wapnia [41, 42, 43, 44]. Powrót do prawidłowej funkcji wymaga kilku dni lub tygodni. Pod tym względem najistotniejsze są pierwsze minuty reperfuzji [45, 46, 47, 48].

Reperfuzja daje początek licznym procesom upośledzającym prawidłowe funkcjonowanie kardiomiocytów:

1.3.1. Przykurcz reperfuzyjny

W pierwszych minutach reperfuzji kardiomiocyty ulegają uszkodzeniu w głównej mierze w wyniku postępującego przykurczu [49, 50, 51]. W przypadku globalnego niedokrwienia obserwowana jest narastająca sztywność tkanki, liczne zaburzenia rytmu serca - najczęściej w postaci migotania komór oraz nasiloną nekroza komórek. Taki zestaw objawów nazywany jest przez specjalistów z zakresu kardiologii „kamiennym sercem – stone heart phenomenon” [52, 53, 54, 55].

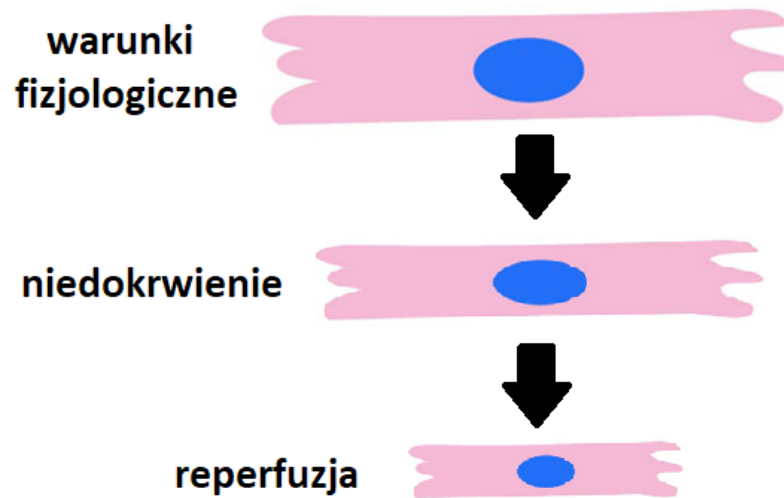
Wykazano, że jednym z mechanizmów stojących za narastaniem przykurczu jest powstawanie mostków krzyżowych w obrębie kardiomiocytów, które ma miejsce w sytuacji obniżonego, ale większego od zera poziomu ATP wewnątrz komórki [56, 57]. W czasie niedokrwienia taka sytuacja ma miejsce przez krótki czas, ponieważ rezerwy ATP zostają bardzo szybko wykorzystane. Następnie skrócenie miofibryli utrwała się ze względu na pozostanie mostków krzyżowych między włóknami aktyny i miozyny w stanie połączenia, co jest nazywane

przykurczem stężeniowym. Ten typ przykurczu nie wiąże się z uszkodzeniami strukturalnymi kardiomiocytów, ale powoduje dysfunkcję ich cytoszkieletu. Komórki stają się bardziej wrażliwe na uszkodzenia mechaniczne [58]. W momencie przywrócenia właściwego stanu energetycznego opisany powyżej przykurcz ulega zazwyczaj normalizacji [59].

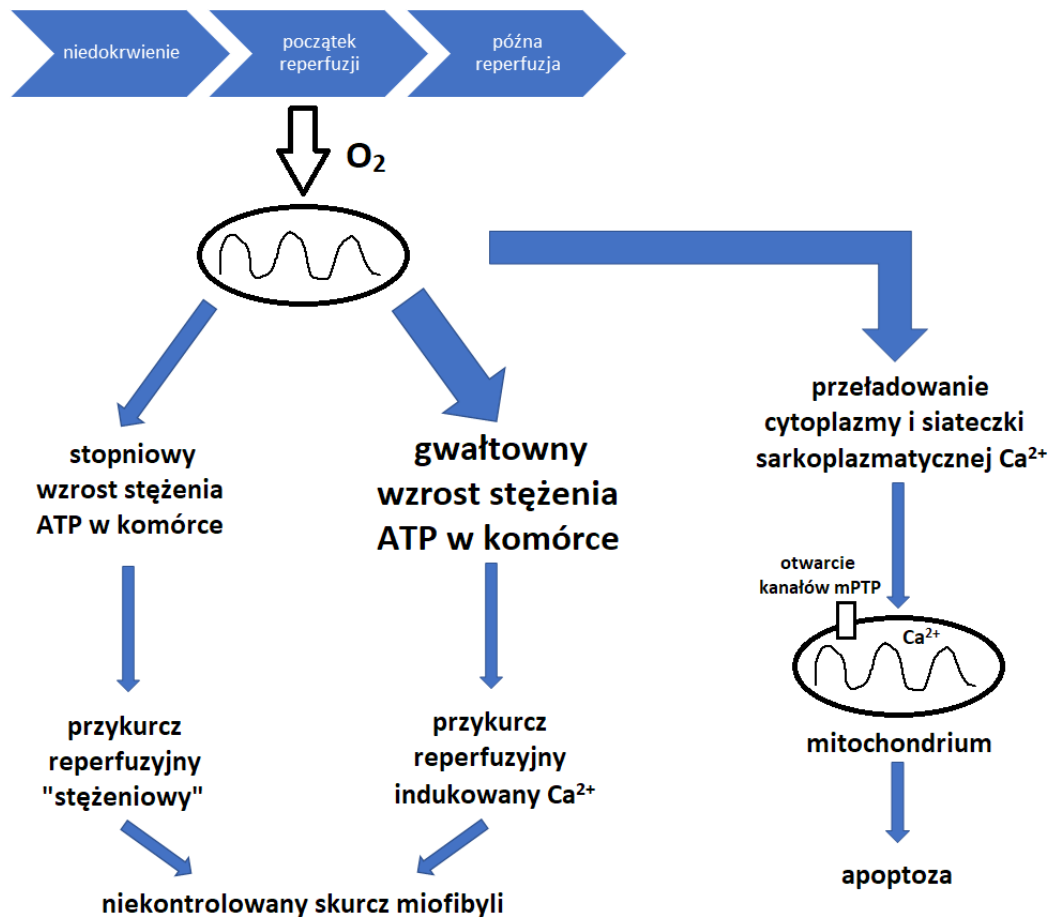
W warunkach przedłużającego się niedokrwienia kardiomiocyty mogą ulegać bardziej nasilonemu przykurczowi prowadzącemu do uszkodzenia cytoszkieletu wraz z towarzyszącym wzrostem prawdopodobieństwa ich mechanicznego uszkodzenia w czasie reperfuzji. Skutkiem tego jest narastanie ciśnienia końcoworozkurczowego oraz spadek podatności komór serca. Znaczącemu przykurczowi towarzyszy specyficzny obraz nekrozy, czyli martwica pasma skurczowego (*contraction band necrosis*) [60]. Tego typu obraz histologiczny charakteryzuje się współwystępowaniem w jednej komórce nadmiernie skurczonych sarkomerów z poszerzonymi przestrzeniami pomiędzy poszczególnymi z nich oraz rozerwaniem sarkolemy komórki. Jest to spowodowane działaniem w danym fragmencie mięśnia sercowego zbyt dużych oraz nierównomiernie rozłożonych sił [59].

Podsumowując, na poziomie komórkowym wyróżniamy dwa podstawowe podtypy przykurczu reperfuzyjnego. Pierwszy ma miejsce w czasie powolnego przywracania przepływu oraz przedłużającego się niedokrwienia obejmującego bardzo duży obszar i jest nazywany przykurczem stężeniowym. Natomiast drugi jest spowodowany przeładowaniem jonami wapnia. Można go zaobserwować w warunkach gwałtownej reoksygenacji komórki, co skutkuje wznowieniem produkcji energii zgromadzonej w ATP przy jednoczesnym wysokim stężeniu jonów wapnia w cytozolu. W takiej sytuacji dochodzi do niekontrolowanej aktywacji mechanizmów prowadzących do skurczu sarkomeru. Dominacja przykurczu stężeniowego w okresie niedokrwienia prowadzi do powolnego narastania przykurczu, natomiast przeładowanie jonami wapnia w czasie reperfuzji skutkuje znacznie bardziej wyrażonym skurczem kardiomiocytu (Ryc. 3)(Ryc. 4).

Kształt kardiomiocytu



Ryc. 3. Zmiana kształtu kardiomiocytu w czasie niedokrwienia oraz reperfuzji.

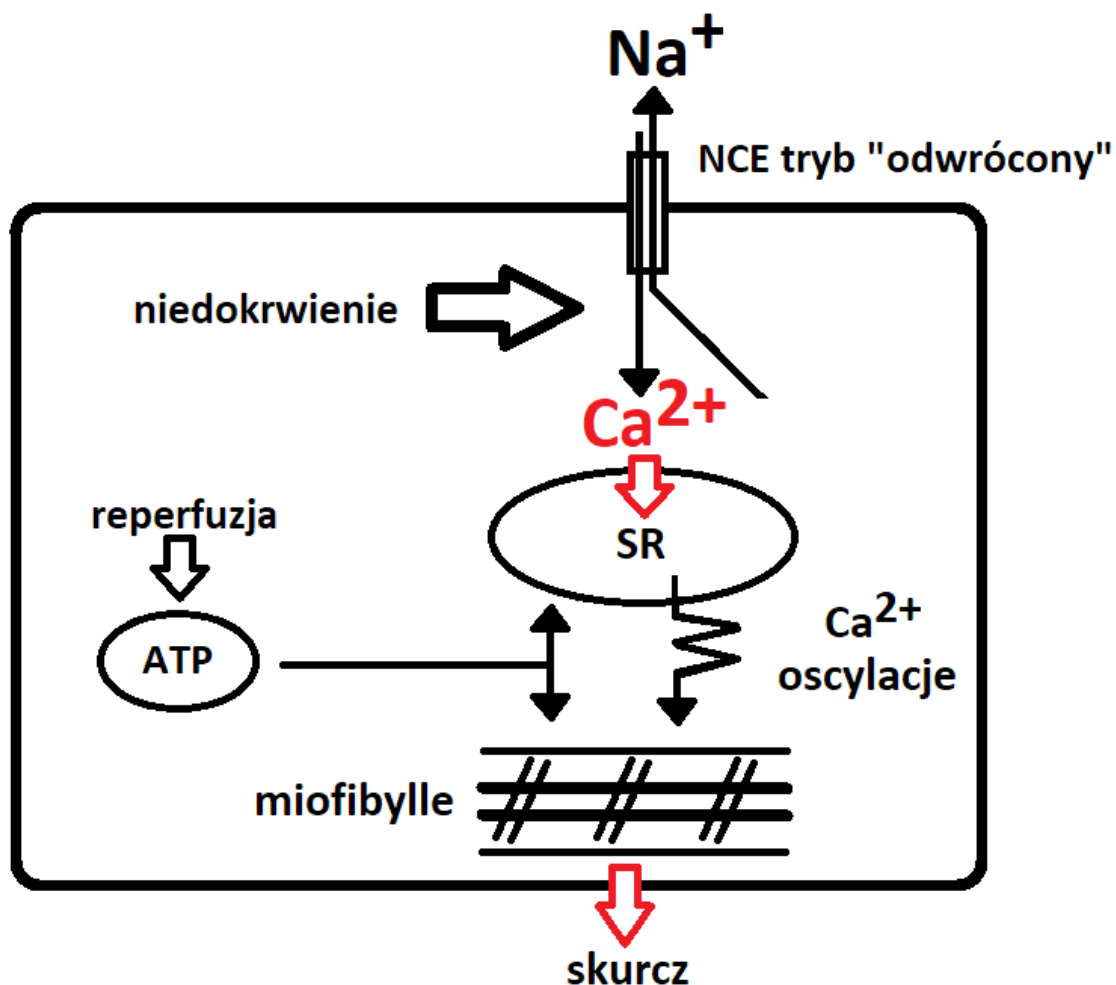


Ryc. 4. Podsumowanie informacji dotyczących przykurczu reperfuzyjnego.

1.3.2. Przeładowanie jonami wapnia

Niedotlenienie komórki skutkuje wyczerpaniem energetycznym, co wiąże się ze znacznym wzrostem poziomu jonów wapnia w jej obrębie, inaczej - przeładowaniem jonami wapnia [61]. Jak wcześniej wspomniano, jest to efekt uboczny akumulacji jonów sodu wewnątrz komórki dotkniętej niedokrwieniem. Mechanizmami przyczyniającymi się do tego stanu są: usuwanie nadmiaru protonów poprzez wymiennik Na^+/H^+ , wzmożenie działania symportu $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, obniżenie aktywności ATPazy Na^+/K^+ usuwającej w warunkach fizjologicznych nadmiar jonów sodu z komórki oraz uszkodzenie błony komórkowej prowadzące do wzrostu przepuszczalności dla jonów sodu napływających zgodnie z gradientem stężeń do komórki. Towarzyszące wzrostowi stężenia jonów sodu w komórce odwrócenie transportu w obrębie wymiennika sodowo-wapniowego oraz obniżona aktywność Ca^{2+} -ATPazy retikulum sarkoplazmatycznego prowadzi do nagromadzenia dużej ilości jonów wapnia [59, 62, 63].

Pomimo wysokiego stężenia jonów wapnia w czasie niedokrwienia przykurczowi zapobiega niskie pH wewnątrzkomórkowe [64, 65]. Jednak podczas reperfuzji w komórkach z zachowanymi prawidłowo funkcjonującymi mitochondriami wzrasta poziom ATP, co wraz z wysokim stężeniem jonów wapnia oraz przywróceniem prawidłowego pH prowadzi do niekontrolowanego skurczu miofibryli [51]. Badania na poziomie komórkowym dowiodły, że cykliczne magazynowanie oraz uwalnianie jonów wapnia przez retikulum endoplazmatyczne skutkuje przykurczem w warunkach przeładowania tymi jonami. Jony wapnia są uwalniane oscylacyjnie, co wiąże się z utrzymaniem odwrócenia transportu w obrębie wymiennika sodowo-wapniowego na początku reperfuzji [59] (Ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat przeładowania komórki nadmiarem jonów wapnia po okresie niedokrwienia.

Reperfuzja powoduje przywrócenie dostępu do ATP w obrębie retikulum sarkoplazmatycznego (*SR, Sarcoplasmic Reticulum*) oraz miofibryli. Skutkuje to oscylacyjnymi skokami stężenia jonów wapnia w obrębie cytozolu, co jest przyczyną niekontrolowanego skurczu miofibryli. ATP = adenosine triphosphate; NCE = Na⁺/H⁺ exchanger.

Śmierć komórki ma miejsce w ciągu kilku pierwszych minut reperfuzji na skutek rozerwania kardiomiocytu. Jeśli w wyniku reperfuzji zniszczeniu ulegnie tylko część kardiomiocytów obserwuje się typowy obraz histologiczny w postaci martwicy pasma skurczowego (*contraction band necrosis*) [60, 66, 67, 68, 69].

1.3.3. Przykurcz stężeniowy

Na skutek przedłużającego się niedokrwienia dochodzi do uszkodzenia mitochondriów, a tym samym - do upośledzenia produkcji ATP. W związku z tym w czasie reperfuzji stężenie ATP pozostaje na krytycznie niskim poziomie. Taki stan zapobiega przed odłączaniem miofibryli od mostków międzykomórkowych skutkując przykurczem stężeniowym. Ten typ przykurczu jest w dużej mierze niezależny od stężenia jonów wapnia, zatem najważniejszym jest przeprowadzenie reperfuzji w taki sposób, aby nie doszło do uszkodzenia mitochondriów [59].

1.3.4. Rozprzestrzenianie się przykurczu

Opisane powyżej mechanizmy są główną przyczyną śmierci komórki we wczesnej fazie reperfuzji. Za dalsze szerzenie się uszkodzeń w formie martwicy pasma skurczowego odpowiedzialne są interakcje pomiędzy sąsiadującymi komórkami prowadzące do rozprzestrzeniania się nekrozy [59, 70, 71]. Za propagację uszkodzenia odpowiadają złącza szczelinowe (GJ, *Gap Junctions*) występujące pomiędzy kardiomiocytami [72, 73]. Przepływ jonów sodu z komórek w stanie przykurczu do pozostałych skutkuje odwróceniem transportu w obrębie wymiennika sodowo-wapniowego oraz wzrostem stężenia jonów wapnia, co wywołuje przykurcz w czasie reperfuzji [74]. GJ umożliwiają natychmiastowe wyrównanie poziomu ATP w sąsiadujących komórkach podczas reperfuzji. Tym samym przyczyniają się do synchronizacji przykurczu stężeniowego. Na skutek przykurczu dochodzi do skrócenia części komórek miokardium, co w wyniku działania zbyt dużych sił powoduje rozrywanie otaczających kardiomiocytów [59].

1.3.5. Metody ograniczania przykurczu reperfuzyjnego

Jak wcześniej wspomniano niskie pH wewnątrz komórki promuje mechanizmy zapobiegające przykurczowi miofibryli [22, 64, 75, 76, 65]. Natomiast nagłe przywrócenie fizjologicznego pH w czasie reperfuzji wzmaga niepożądane skutki przeładowania jonami wapnia. Dlatego każde działanie mające na celu spowolnienie procesu przywracania fizjologicznego pH powinno zostać rozważone jako potencjalnie korzystne [22]. Farmakologiczne inhibitory NHE spowalniające neutralizację pH wewnątrzkomórkowego mogą zapobiegać śmierci komórek z

powodu RI, jednak ich skuteczność nie została udowodniona w badaniach eksperymentalnych oraz klinicznych [29]. Inną metodą ograniczania przykurczu oraz rozmiarów zawału serca jest zastosowanie buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8) in situ w czasie reperfuzji wieńcowej [77, 78]. Reperfuzja kardiomiocytów w warunkach utrzymania kwasicy komórkowej prowadzi do stopniowego przywrócenia równowagi metabolicznej oraz jonowej, co zapobiega przykurczowi związanemu z przeładowaniem jonami wapnia.

Heptanol jest jednym z przebadanych inhibitorów przekaźnictwa w obrębie GJ. W badaniach na świeżo izolowanych kardiomiocytach szczurzych udowodniono jego działanie ograniczające rozprzestrzenianie się przykurczu w czasie reperfuzji. Niestety istnieją pewne ograniczenia w użyciu heptanolu oraz innych inhibitorów GJ. Niskie dawki tych substancji nie są efektywne, a wyższe wpływają również na inne kanały sarkoplazmatyczne powodując groźne arytmie [72].

Caldaret należy do modulatorów wymiennika sodowo - wapniowego powodujących zahamowanie odwróconego transportu w jego obrębie. Tym samym zapobiega przeładowaniu jonami wapnia. W badaniach doświadczalnych wykazano zmniejszenie rozmiarów zawału serca u psów. Niemniej jednak randomizowane badania kliniczne nie potwierdziły jego skuteczności [79, 80, 81].

Kanały wapniowe typu L, nazywane receptorami dihydropirydynowymi są również uważane za istotny czynnik w rozwoju przeładowania komórki jonami wapnia. Badania nie potwierdziły skuteczności nisoldypiny, natomiast wyniki dotyczące diltiazemu okazały się obiecujące [6]. Podanie diltiazemu do wieńcowo na początku reperfuzji znacząco zmniejszyło rozmiar zawału serca w przypadku świń [7]. Zastosowanie werapamilu prowadziło do znaczącego obniżenia stężenia jonów wapnia w komórce oraz ograniczenia rozmiarów zawału nawet do 50% [8]. Dalsze badania wykazały, że w celu uzyskania działania kardioprotekcyjnego konieczne jest podanie werapamilu przed wystąpieniem zawału lub w czasie niedokrwienia, co z klinicznego punktu widzenia nie jest możliwe [82].

Ca²⁺-ATPaza retikulum sarkoplazmatycznego pozostaje pod kontrolą fosfolambanu, którego nieufosforylowana forma (dominująca w okresie niedokrwienia) powoduje ograniczenie wchłaniania jonów wapnia z cytozolu. Inhibitory kalcyneuryny takie jak CsA hamują proces defosforylacji fosfolambanu niwelując tym samym wpływ niedokrwienia. Ponadto pobudzenie

zależnej od kinazy białkowej G fosforylacji fosfolambanu może zwiększać cytozolowy wychwyty jonów wapnia ograniczając tym samym przykurcz [13]. W wieloośrodkowym, randomizowanym badaniu klinicznym obejmującym 970 pacjentów leczonych przezskórną angioplastyką wieńcową [*PCI, Percutaneous Coronary Intervention*] nie potwierdzono skuteczności inhibitorów kalcyneuryny. Dożylne podanie CsA tuż przed PCI nie skutkowało niższym ryzykiem: zgonu z jakiegokolwiek przyczyny, nasilenia niewydolności serca w trakcie pierwszej hospitalizacji, ponownej hospitalizacji w przypadku niewydolności serca czy niekorzystnego remodelingu lewej komory względem grupy kontrolnej, u której podano placebo [83]

Obiecujące wyniki badań przedklinicznych z zastosowaniem inhibitorów wymiennika Na^+/H^+ w ograniczaniu przeładowania jonami wapnia skłoniły do przeprowadzenia dwóch dużych badań klinicznych mających na celu ocenę ich efektywności w redukcji RI. W badaniu GUARDIAN zastosowano cariporide, natomiast w badaniu ESCAMI eniporide nie uzyskując pozytywnych rezultatów po zastosowaniu dowieńcowym w czasie rewaskularyzacji [29].

1.3.6. Przetrwale otwarcie megakanalów mitochondrialnych

Zgodnie z opisanymi wcześniej mechanizmami na skutek niedokrwienia dochodzi do wzrostu stężenia jonów sodu wewnątrz komórki, co prowadzi do przeładowania jonami wapnia. Ponadto ma miejsce akumulacja długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz nasilenie produkcji ROS [65, 84, 85, 86, 87]. Opisane powyżej czynniki w warunkach reperfuzji są przyczyną otwarcia kanałów mPTP [88], jednakże nie ma to miejsca podczas niedokrwienia, kiedy wewnątrzkomórkowe pH pozostaje na niskim poziomie. Badania pokazują, że przy obecności dużej zawartości protonów nie dochodzi do wiązania się jonów wapnia z miejscem aktywnym w obrębie kanałów mPTP [76, 86].

W warunkach fizjologicznych wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla większości substancji, z wyjątkiem nielicznych metabolitów oraz jonów [89, 90, 91]. W czasie reperfuzji łańcuch oddechowy narażony na działanie tlenu wytwarza dodatkowe ROS, co przy

jednoczesnym wysokim stężeniu jonów wapnia oraz neutralizacji kwasowego pH wewnątrz komórki skutkuje otwarciem kanałów mPTP [86, 92].

Kanały mPTP są dużych rozmiarów porami w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (*IMM inner mitochondrial membrane*) umożliwiającymi swobodny przepływ wszystkich cząsteczek mniejszych niż 1.5 kDa do matrix mitochondrium [89, 90, 91]. Na skutek ich otwarcia IMM staje się przepuszczalna dla protonów, co powoduje rozprężanie fosforylacji oksydacyjnej i zakłócenie wytwarzania ATP [93, 94]. Dochodzi do nagłego spadku stężenia ATP niezbędnego do utrzymania równowagi jonowo-metabolicznej i aktywacji enzymów degradacyjnych takich jak: fosfolipazy, nukleazy i proteazy. Jeżeli nie dojdzie do zamknięcia kanałów wymienione enzymy doprowadzą do nekrozy komórki [85, 89, 90, 91]. W warunkach niedoboru ATP nasileniu ulega również przykurcz stężeniowy [59, 95]. Ponadto poprzez otwarte kanały wszystkie mniejsze cząsteczki przemieszczają się poza mitochondria, natomiast białka o dużych rozmiarach pozostają wewnątrz ogranelum powodując wzrost ciśnienia osmotycznego, a tym samym obrzęk. Rozwinięcie się grzebienia mitochondrialnego pozwala na rozciągnięcie wewnętrznej błony mitochondrialnej bez jej pęknięcia. Jednakże błona zewnętrzna pęka, co skutkuje uwolnieniem białek takich jak cytochrom C pełniących krytyczną funkcję w procesie apoptozy komórki. Dochodzi do dalszego upośledzenia metabolizmu komórki oraz otwarcia kolejnych kanałów mPTP [85].

Poprzez otwarte kanały mPTP uwalniane są z mitochondriów liczne białka zaangażowane w aktywację procesu programowanej śmierci komórki [96]. Są to między innymi: Smac/DIABLO (hamujące aktywację inhibitorów kaspaz), cytochrom C aktywujący kaspazę-9, która pobudza kaspazę-3 pośredniczącą w zapoczątkowaniu działania białek odpowiedzialnych za rozpad cytoszkieletu, błony cytoplazmatycznej oraz fragmentację DNA jądra komórkowego, co jest charakterystyczne dla apoptozy. Innymi z uwalnianych cząsteczek są białka szoku cieplnego – mitochondrialne HSP60 oraz endonukleazy biorące udział we fragmentacji DNA jądra komórkowego [97, 98, 99].

Kluczowe czynniki sprzyjające otwarciu kanałów mPTP to: przeładowanie jonami wapnia, stres oksydacyjny, niedobór nukleotydów adeninowych, podwyższony poziom fosforanów oraz depolaryzacja mitochondriów [84, 85, 95]. Te same czynniki oddziałują na komórki miokardium w czasie reperfuzji, a otwarcie kanałów mPTP z racji ich wpływu na wejście komórki w szlak apoptozy bądź nekrozy ma ogromne znaczenie dla potencjalnych prób

zapobiegania IRI. W warunkach otwarcia kanałów mPTP, uwolnienia cytochromu c oraz następczego ich zamknięcia komórka ulegnie apoptozie. W sytuacji, gdy dojdzie do otwarcia wielu kanałów mPTP ma miejsce nekroza. Natomiast kiedy otwarcie kanałów jest krótkotrwałe i nie dochodzi do uwolnienia cytochromu c, komórka wraca do prawidłowego funkcjonowania. Hipotetycznie to otwarcie kanałów mPTP decyduje czy dany kardiomiocyt podlega nekrozie, apoptozie lub przetrwa IRI [85]. W takiej sytuacji wszystkie komórki w strefie centralnej zawału ulegałyby nekrozie na skutek trwałego otwarcia kanałów mPTP oraz rozerwania mitochondriów. Natomiast na obrzeżach, gdzie uszkodzenie niedokrwienne jest mniej nasilone, a otwarcie kanałów ma charakter przejściowy może dojść jedynie do apoptozy, nie nekrozy [100, 101, 102, 103, 104].

Obniżone pH cytoplazmatyczne spowodowane znaczącą akumulacją produktów glikolizy beztlenowej zachodzącej w warunkach niedotlenienia silnie hamuje otwarcie kanałów mPTP [76, 86]. Podczas reperfuzji dochodzi do nagłego wypłukania kwasu mlekowego z komórki wraz z jednoczesnym dostarczeniem do mitochondriów tlenu co prowadzi do powstawania ROS. Są to idealne warunki do nasilenia otwarcia kanałów mPTP [84, 85, 95]. W badaniach na szczurzych kardiomiocytach udowodniono, że reoksygenacja z użyciem buforu o kwasowym odczynie ma działanie kardioprotekcyjne, co może wynikać między innymi z zahamowania otwarcia kanałów mPTP [77, 78].

Przeprowadzono kilka badań mających na celu odkrycie białek budujących kanały mPTP, jednakże ich dokładna budowa molekularna nadal nie jest znana. Najprawdopodobniej białkami budującymi kanał są: translokaza nukleotydu adeninowego, mitochondrialny nośnik fosforanów i cyklofilina D [105, 106]. Odkrycie inhibitorów cyklofiliny D takich jak CsA, sanglifehrin - A oraz Debio-025 umożliwiło poszerzenie informacji o ich funkcji w procesie RI. W badaniach eksperymentalnych na szczurach wykazano, że wymienione wyżej związki wykazują ochronne działanie przed indukowaną przez RI śmiercią komórki [107, 108, 109, 110, 111]. Ponadto potwierdzono, że myszy z niedoborem cyklofiliny D są naturalnie chronione przed RI serca, wątroby i nerek [112, 113, 114]. Z drugiej strony w randomizowanym badaniu klinicznym z podwójnie zaślepioną próbą u 101 pacjentów z zawałem STEMI podawanie CsA przed leczeniem trombolitycznym nie powodowało zmniejszenia wielkości zawału [115]. Inne badanie, podczas którego substancję hamującą otwarcie mPTP podawano pacjentom z zawałem STEMI tuż przed pierwotną angioplastyką wieńcową również nie wykazało redukcji RI [116].

1.3.7. Stres oksydacyjny

Dostępność tlenu w mięśniu sercowym stopniowo wzrasta po przywróceniu przepływu krwi, co skutkuje wytwarzaniem dużej ilości ROS (*respiratory burst* - wybuch tlenowy) [117, 118, 119]. Wzrost produkcji ROS jest spowodowany nadmierną aktywnością oksydazy ksantynowej w komórkach śródbłonna, wzmożeniem transportu elektronów w obrębie mitochondrialnego łańcucha oddechowego kardiomiocytów oraz nasileniem działania oksydazy NADPH w komórkach zapalnych [22].

Stres oksydacyjny ma miejsce w sytuacji utraty równowagi między wytwarzaniem ROS oraz mechanizmami o działaniu antyoksydacyjnym. Przykładami ROS są nadtlenek wodoru H_2O_2 , anion rodnika nadtlenkowego, rodnik hydroksylowy i anion nadtlenoazotynowy. W czasie reperfuzji obserwuje się wzrost ich produkcji. Powodują one peroksydację lipidów, oksydację DNA oraz białek, jak również uszkadzają błonę komórkową. Dochodzi do modyfikacji przepuszczalności błony komórkowej, budowy białek, a co za tym idzie zmian w funkcjonowaniu samej komórki i postępującego uszkodzenia mięśnia sercowego [22, 39, 120].

ROS za sprawą wzmagania ekspresji genów takich jak NF- κ B i AP-1 w leukocytach oraz komórkach śródbłonna stymuluje je do sekrecji cytokin oraz chemokin aktywujących układ dopełniacza oraz zwiększających ekspresję białek ICAM-1 na komórkach endotelium [121, 122, 123]. Za sprawą tego mechanizmu ROS działają chemotaktycznie na leukocyty, aktywują płytki krwi, tym samym zwiększając odpowiedź zapalną w obrębie miokardium i nasilając NRP, co jest dodatkowym czynnikiem zwiększającym obszar dotknięty RI. Wzrost ekspresji NF- κ B promuje produkcję interleukiny - 6 (*IL-6*, *Interleukin 6*) nasilającej wytwarzanie transformującego czynnika wzrostu beta (*TGF- β* , *Transforming growth factor beta*) i czynnika martwicy nowotworów (*TNF- α* , *Tumor Necrosis Factor- α*) [124]. Wymienione substancje są odpowiedzialne za przebudowę macierzy pozakomórkowej i proces włóknienia tkanki, co skutkuje zmianą właściwości elektrofizjologicznych serca [120, 125, 126, 127, 128, 129, 130]

Udowodniono, że stres oksydacyjny w czasie reperfuzji mięśnia sercowego powoduje zmniejszenie biodostępności NO oraz poprzez zaburzenie homeostazy w zakresie stężenia jonów wapnia, promuje otwarcie kanałów mPTP, których znaczenie w szerzeniu się RI zostało opisane we wcześniejszych rozdziałach [51].

Ostatnie badania wykazały, że działanie receptora rianodynowego jest kontrolowane właśnie przez ROS [131]. Wykazano, że oksydaza NADPH i kanały rianodynowe mogą znajdować się w bliskiej odległości od siebie na obszarze kanalików T kardiomiocytów [132]. Z tego powodu wzrost produkcji ROS w czasie reperfuzji może wzmacniać działanie receptora rianodynowego, co skutkuje przeładowaniem jonami wapnia, a tym samym aktywacją szlaków prowadzących do śmierci komórki (w mechanizmie apoptozy lub nekrozy) [133].

Zaobserwowano, że podanie enzymów o działaniu antyoksydacyjnym w czasie reperfuzji, czyli np. dysmutazy ponadtlenkowej bądź katalazy zmniejsza stopień uszkodzenia serca oraz sam obszar zawału [12, 134, 135, 136]. Jest to spowodowane przede wszystkim ograniczeniem liczby komórek ulegających apoptozie [137]. W przypadku genetycznie modyfikowanych myszy z nadekspresją dysmutazy ponadtlenkowej zaobserwowano redukcję ciężkości RI w porównaniu z grupą kontrolną [138].

Kilka badań wykazało potencjalną skuteczność witaminy D jako czynnika protekcyjnego dla komórek śródbłonna narażonych na działanie H_2O_2 powstającego w czasie stresu oksydacyjnego [139]. Za inną obiecującą opcję terapeutyczną uznaje się terapię hiperbaryczną, której zastosowanie może powodować zmniejszenie rozmiarów zawału serca poprzez ograniczanie obrzęku tkanki, produkcję ROS oraz zwiększenie ekspresji syntazy NO [38].

Oksydaza NADPH jest kompleksem enzymatycznym zbudowanym z wielu podjednostek, który należy do głównych źródeł anionów ponadtlenkowych w obrębie naczyń krwionośnych, kardiomiocytów oraz leukocytów [140]. Zastosowanie apocyniny lub diphenyliodonium w czasie reperfuzji skutkuje zahamowaniem ekspresji oksydazy NADPH w komórkach śródbłonna [141]. Ponadto apocynina i diphenyliodonium mają znaczący wpływ na zmniejszenie produkcji ROS [11, 142, 143, 144, 145], niestety jak wcześniej wspomniano ich działanie protekcyjne ma swoje ograniczenia w postaci negatywnego wpływu na inne procesy zachodzące w komórce.

Wyniki badań jednoznacznie potwierdzają negatywny wpływ ROS powstałych w wyniku reperfuzji mięśnia sercowego. Niestety działania mające na celu ograniczenie stresu oksydacyjnego dotychczas nie przyniosły pozytywnych wyników w badaniach klinicznych i ostatecznie nie są stosowane w codziennej praktyce [146].

1.3.8. Zjawisko no-reflow

Zjawisko no-reflow jest definiowane jako brak powrotu przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia po przywróceniu przepływu w tętnicach nasierdziowych. Liczne badania udowodniły, że ponownemu otwarciu naczynia wieńcowego towarzyszy mikroembolizacja jego dystalnego fragmentu konglomeratami leukocytno-płytkowymi blokującymi przepływ w małych naczyniach [147, 148, 149, 150]. Aktywacja płytek i ich agregacja ma miejsce już w pierwszych sekundach reperfuzji i jest spowodowana uszkodzeniem śródbłonna naczynia. Napływ leukocytów jest wzmagany przez ROS, czynniki chemotaktyczne produkowane przez pobudzone płytki oraz białka takie jak ICAM-1, czy selektyna P pojawiające się na powierzchni śródbłonna [121, 122, 123]. Mechanizm aktywacji komórek endotelium opiera się na fosforylacji białka I κ B spowodowanej działaniem ROS. Skutkuje to odłączeniem wymienionego wcześniej białka od czynnika NF- κ B, co prowadzi do wzmożenia produkcji czynników prozapalnych, wazoaktywnych oraz prokoagulacyjnych [151]. Wystąpienie zjawiska NRP wiąże się bezpośrednio z większym rozmiarem zawału serca, niższą frakcją wyrzutową oraz niekorzystną przebudową lewej komory serca, a co za tym idzie wzrostem częstości występowania niewydolności serca i zgonów w porównaniu do pacjentów, u których nie wystąpiło NRP [152, 153, 154].

Istotnym mechanizmem wzmagającym NRP jest znaczące ograniczenie produkcji czynników o działaniu naczyniorozszerzającym takich jak: NO i czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego (*EDHF, Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*) w obrębie śródbłonna [155, 156, 157, 158, 159, 160]. NO pełni rolę inhibitora agregacji płytek krwi, adhezji leukocytów oraz zapobiega proliferacji mięśni gładkich [161]. Głównym czynnikiem powodującym spadek NO w warunkach niedokrwienia i następczej reperfuzji jest zwiększona produkcja ROS [162], która prowadzi do oksydacji i degradacji kofaktora syntazy tlenu azotu (*NOS, Nitric Oxide Synthase*), czyli tetrahydrobiopteryny (*BH4, Tetrahydrobiopterin*) [163]. W sytuacji niedoboru BH4 śródbłonkowe NOS znajdują się w stanie niesprężonym i produkuje głównie ROS w miejsce NO [164]. Ponadto jednoczesna aktywacja arginazy wywołana stresem oksydacyjnym skutkuje hydrolizą L-argininy, która jest substratem w produkcji NO [165, 166]. EDHF pełni funkcję kompensacyjną w sytuacji niedoboru NO [167, 168]. Niestety jak wykazano na modelu świńskim w warunkach hipoksji i reperfuzji aktywność EDHF jest znacząco upośledzona [159, 169, 170].

Istnieje kilka przyczyn zmniejszenia światła naczynia krwionośnego w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. Pierwszą z nich jest opisane wcześniej spowolnienie syntezy NO i EDHF, przy jednoczesnym zwiększonym uwalnianiu czynników o działaniu wazokonstrykcyjnym [163]. Inna przyczyna to spowodowany przez niedokrwienie obrzęk kardiomiocytów, komórek śródbłonna oraz innych otaczających tkanek, powodujący mechaniczny ucisk na naczynia wieńcowe [171].

Badania pokazują, że przeciwciała monoklonalne blokujące receptor CD18 czy cząsteczki ICAM - 1 hamują napływ neutrofilii do miejsca niedokrwienia [172]. Farmakologiczna blokada płytek z zastosowaniem antagonistów receptora GpIIb/IIIa w czasie reperfuzji ogranicza mikroembolizację, poprawia przepływ wieńcowy oraz zmniejsza uszkodzenie lewej komory serca [173, 174]. Podobnie użycie antagonistów selektyny-P [175] czy zahamowanie NF- κ B z wykorzystaniem wabików oligonukleotydomowych ma działanie zapobiegające RI [176].

Celem ograniczenia aktywności leukocytów i komórek śródbłonna poprzez hamowanie wytwarzania rodników hydroksylowych można zastosować manganową dysmutazę ponadtlenkową lub deferoksaminę [177].

Redukcję obszaru martwicy uzyskano poprzez zastosowanie L-argininy, której podanie skutkuje wzrostem stężenia NO oraz poprawą funkcji śródbłonna i zmniejszeniem nagromadzenia neutrofilii w miejscu dotkniętym niedokrwieniem [178]. Dodatkowym sposobem jest zastosowanie inhibitorów arginazy czy suplementacja BH4 w czasie stresu oksydacyjnego. Takie działania skutkuje wzrostem produkcji NO i ograniczeniem rozpręgnięcia śródbłonkowego NOS [163]. Kolejne metody to podanie adenozyiny lub analogów EDHF takich jak kwas 11,12-epoksyekoizatrienowy [179, 180, 181, 182].

Pomimo opisanego wielu możliwych sposobów ograniczania NRP, badania kliniczne nie potwierdziły ich skuteczności. Jednym z przykładów jest próba zastosowania adenozyiny u pacjentów z zawałem STEMI, która okazała się nieskuteczna [183, 184, 185]. Pozytywne wyniki uzyskano przy wykorzystaniu antagonistów receptora GPIIb/IIIa. Tirofiban (jeden z antagonistów GPIIb/IIIa) okazał się być bardziej skuteczny w przeciwdziałaniu NRP niż standardowe leczenie z wykorzystaniem wyłącznie przezskórnej angioplastyki wieńcowej, jednak jego zastosowanie wiązało się ze zwiększeniem ryzyka krwawienia, dlatego dodatkowe

leczenie inhibitorami GPIIb/IIIa w trakcie angioplastyki wieńcowej stosuje się jedynie w szczególnych sytuacjach [186].

1.3.9. Stan zapalny

Śmierć komórek w czasie niedokrwienia prowadzi do uwolnienia fragmentów mitochondrialnego DNA, ATP, białka o dużej ruchliwości elektroforetycznej (*HMGB1 high mobility group box 1 protein*) oraz jonów wapnia do przestrzeni pozakomórkowej [187, 188]. Wymienione czynniki działają jako struktury molekularne związane z zagrożeniem (DAMPs Danger/Damage Associated Molecular Patterns) aktywując inflamasomy NLRP3 (*NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3*) oraz TLR9 (*Toll-Like Receptor 9*), co z wykorzystaniem aktywacji genów MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) oraz NF- κ B prowadzi do uwalniania mediatorów zapalenia: białka chemotaktycznego monocytów (*MCPI, Monocyte-Chemoattractant Protein 1*), interleukiny-1 β , IL-6, TNF- α i interleukiny-18 [189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197]. W związku z tym przywrócenie przepływu krwi w uprzednio zamkniętym naczyniu skutkuje akumulacją leukocytów (głównie neutrofilii oraz monocytów) [198]. Taki proces określa się „sterylnym zapaleniem” [188]. Akumulacja leukocytów w miejscu dotkniętym niedokrwieniem jest spowodowana zwiększeniem ekspresji molekuł adhezyjnych między innymi selektyny P oraz białka ICAM-1 na powierzchni niedokrwionych komórek śródbłonna i kardiomiocytów [141, 199]. Interakcje pomiędzy wymienionymi molekułami oraz prezentowanymi na powierzchni neutrofilii integrynami takimi jak CD11b/CD18 promują migrację oraz aktywację leukocytów w przestrzeni pozanaczyniowej [200]. Pobudzone leukocyty wytwarzają ROS z wykorzystaniem układu oksydazy ksantynowej. Ponadto produkują one enzymy proteolityczne (elastazy, kolagenazy) [201], czynniki prozapalne oraz przyczyniają się do aktywacji układu dopełniacza. Uważa się, że uwalniane przez leukocyty substancje poprzez destrukcyjny wpływ na otaczające tkanki powodują poszerzenie strefy RI [9].

Uszkodzenie miokardium ulega nasileniu również w wyniku akumulacji leukocytów w obrębie małych naczyń krwionośnych, prowadzącej do embolizacji tych naczyń. Powyższa hipoteza została potwierdzona w sposób pośredni w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach. Genetycznie zmodyfikowane myszy pozbawione ekspresji białek budujących P-selektynę, integrynę CD18 oraz cząsteczkę ICAM-1 są bardziej odporne na RI [202]. Zaobserwowano

również zmniejszenie obszaru zawału u psów z niedokrwieniem oraz następczą reperfuzją u których w czasie doświadczeń zastosowano pozbawioną leukocytów krew [203]. Modele zwierzęce wykazały, że podanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz przeciwciał anty CD11b i CD18 zmniejsza RI nawet o 50% [204, 205].

W celu farmakologicznego ograniczenia produkcji ROS przez oksydazę ksantynową, a tym samym zmniejszenia samego zapalenia stosowano allopurynol lub oxypurynol [9, 10, 206, 207, 208, 209]. Innymi inhibitorami oksydazy ksantynowej są apocyna oraz diphenyliodonium [11, 142, 143, 144, 145]. Co istotne, diphenyliodonium jest również inhibitorem produkcji selektyny E oraz białka ICAM-1 [141]. Istnieją jednak badania wskazujące na brak skuteczności zastosowania procedur mających na celu zmniejszenie nacieku leukocytów w miejscu zawału w tym leków przeciwzapalnych czy przeciwciał przeciw cząsteczkom adhezji [210, 211, 212, 213]. W przypadku ludzi nie zaobserwowano zmniejszenia obszaru zawału w wyniku zastosowania w czasie niedokrwienia osocza z obniżoną liczbą leukocytów, zarówno w czasie przezskórnej angioplastyki wieńcowej jak i operacji kardiochirurgicznych [214, 215].

Wyniki badań nad skutecznością inhibitorów oksydazy ksantynowej takich jak allopurynol czy oxypurynol są bardzo zróżnicowane i zależą w znacznej mierze od właściwego doboru dawki [9, 10, 206, 207, 208, 209]. Problemem w przypadku zastosowania apocyniny oraz diphenyliodonium jest ich negatywny wpływ na inne procesy takie jak wytwarzanie NO czy enzymów mitochondrialnych [216, 217, 218, 219, 220, 221].

1.3.10. Podsumowanie

Podstawowymi mechanizmami patofizjologicznymi RI są: przykurcz reperfuzyjny, przetrwałe otwarcie kanałów mPTP, stres oksydacyjny, stan zapalny oraz NRP [5]. W każdym przypadku RI poszczególne mechanizmy wewnątrzkomórkowe są aktywowane w różnym stopniu. Jest to zależne między innymi od czasu trwania niedokrwienia, liczby wcześniej przebytych epizodów niedokrwienia, stopnia zwężenia naczynia oraz tego czy postępuje ono stopniowo, czy nagle. Istotną rolę pełnią czynniki takie jak: płeć, wiek, predyspozycje genetyczne oraz choroby współistniejące np. cukrzyca. Biorąc to pod uwagę nie dziwi fakt, że wiele badań wskazuje na wyższą skuteczność redukcji RI w wyniku zastosowania strategii hamujących więcej niż jeden mechanizm. W związku z powyższym racjonalne wydaje się zastosowanie substancji

hamujących wszystkie bądź większość mechanizmów prowadzących do RI, co wiąże się z wykorzystaniem mieszaniny różnych substancji [222, 223, 224].

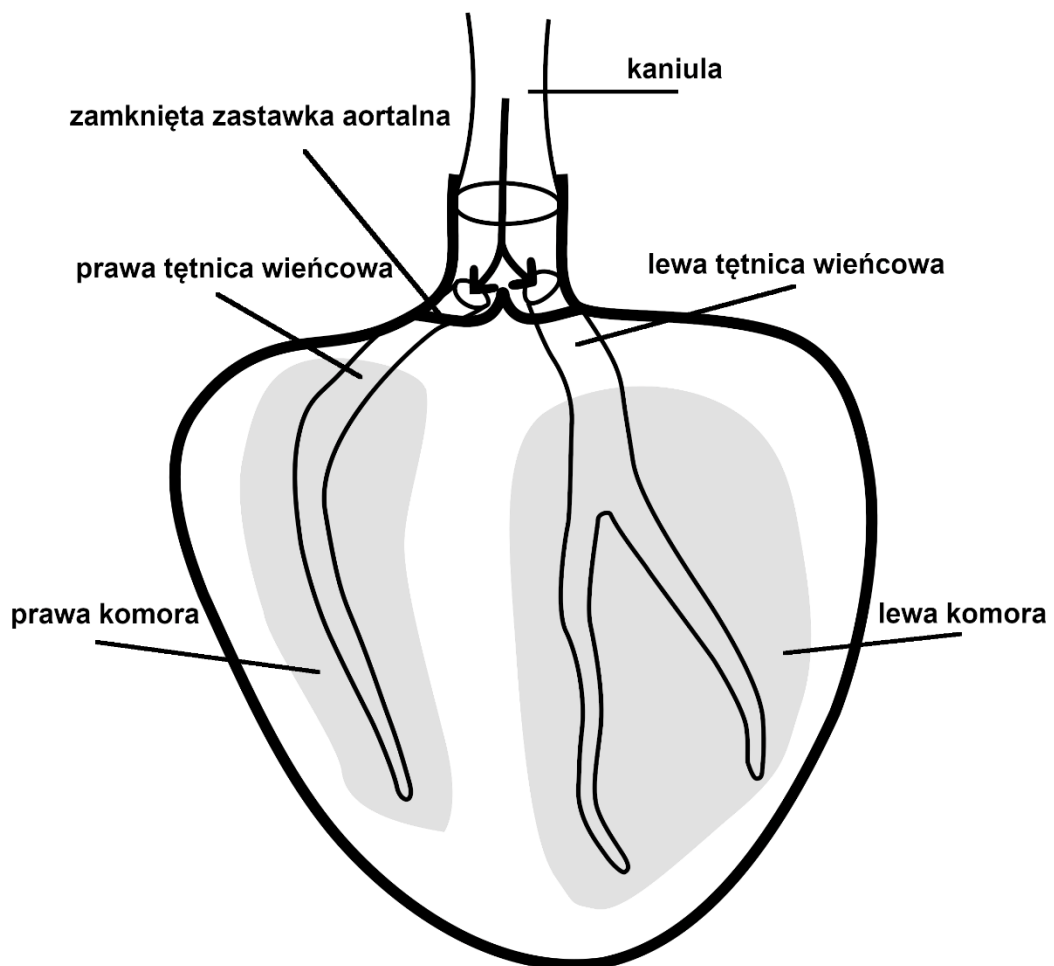
1.4. Modele zwierzęce zawału serca

Od ponad wieku szczurzy model badawczy jest uznawany za podstawę badań w zakresie układu sercowo naczyniowego [225]. Za sprawą różnych modyfikacji jest on wykorzystywany w licznych badaniach z zakresu: nadciśnienia tętniczego, nadciśnienia płucnego, niewydolności serca, udaru mózgu oraz zawału mięśnia sercowego [226]. Obecność takiego modelu pozwala na przeprowadzenie badań przedklinicznych mających na celu zbadanie wpływu zastosowanego leczenia na przebieg chorób układu sercowo naczyniowego oraz określenie ewentualnych mechanizmów stojących za uzyskanymi wynikami. Organizm szczura pod względem budowy oraz regulacji układu sercowo-naczyniowego jest bardzo zbliżony do ludzkiego, a podstawową różnicą są rozmiary poszczególnych narządów.

Najbliższym warunkom klinicznym modelem zawału serca jest model, w którym zawał wywołano podwiązaniem lewej tętnicy zstępującej przedniej, zwłaszcza w sytuacji przeprowadzenia następczej reperfuzji [227, 228, 229]. Z racji specyfiki zaplanowanych doświadczeń, czyli dowieńcowego podania wybranych substancji tylko podczas pierwszych trzech minut reperfuzji, wykorzystanie opisanego wyżej modelu nie było możliwe. Podwiązanie lewej tętnicy zstępującej przedniej i następująca po nim reperfuzja z podaniem dodatkowych substancji do tętnic obwodowych (dowieńcowe podanie ze względu na brak możliwości technicznych nie jest możliwe) wiązałaby się z ich uwolnieniem do krwioobiegu oraz brakiem ograniczenia wpływu leków do pierwszych trzech minut reperfuzji, tym samym działaniem na cały organizm, a nie tylko w miejscu objętym zawałem.

Jedynym modelem badawczym umożliwiającym dowieńcowe podanie wybranych substancji tylko podczas pierwszych trzech minut reperfuzji jest system Langendorffa. Model perfuzji serca *in vitro* zwany metodą Langendorffa został opracowany pod koniec XIX wieku przez niemieckiego fizjologa Oskara Langendorffa. Od tamtego czasu jest jedną z podstawowych metod eksperymentalnych w tematyce niedokrwienia oraz reperfuzji [230, 231, 232, 233, 234, 235]. Najważniejszym założeniem jest dostarczenie do naczyń wieńcowych wstecznie poprzez aortę (przy jednocześnie zamkniętej zastawce aortalnej) buforu Krebsa-Henseleita (*KHB*, *Krebs Henseleit Buffer*), który swoim składem jest maksymalnie zbliżony do krwi (Ryc. 6).

Umożliwia to utrzymanie serca przy życiu w warunkach *in vitro* [236]. Model zawału serca w tym przypadku opiera się na wyłączeniu przepływu w systemie, co skutkuje całkowitym niedokrwieniem mięśnia sercowego, po którym następuje reperfuzja polegająca na przywróceniu przepływu KHB. Modyfikacja buforu w czasie reperfuzji jest możliwa dzięki zastosowaniu oddzielnego źródła KHB o składzie wzbogaconym dodaniem określonych dla danej grupy badawczej substancji. W kolejnych minutach reperfuzji wracano do pierwotnego „niezmienionego” dodatkowymi czynnikami KHB.



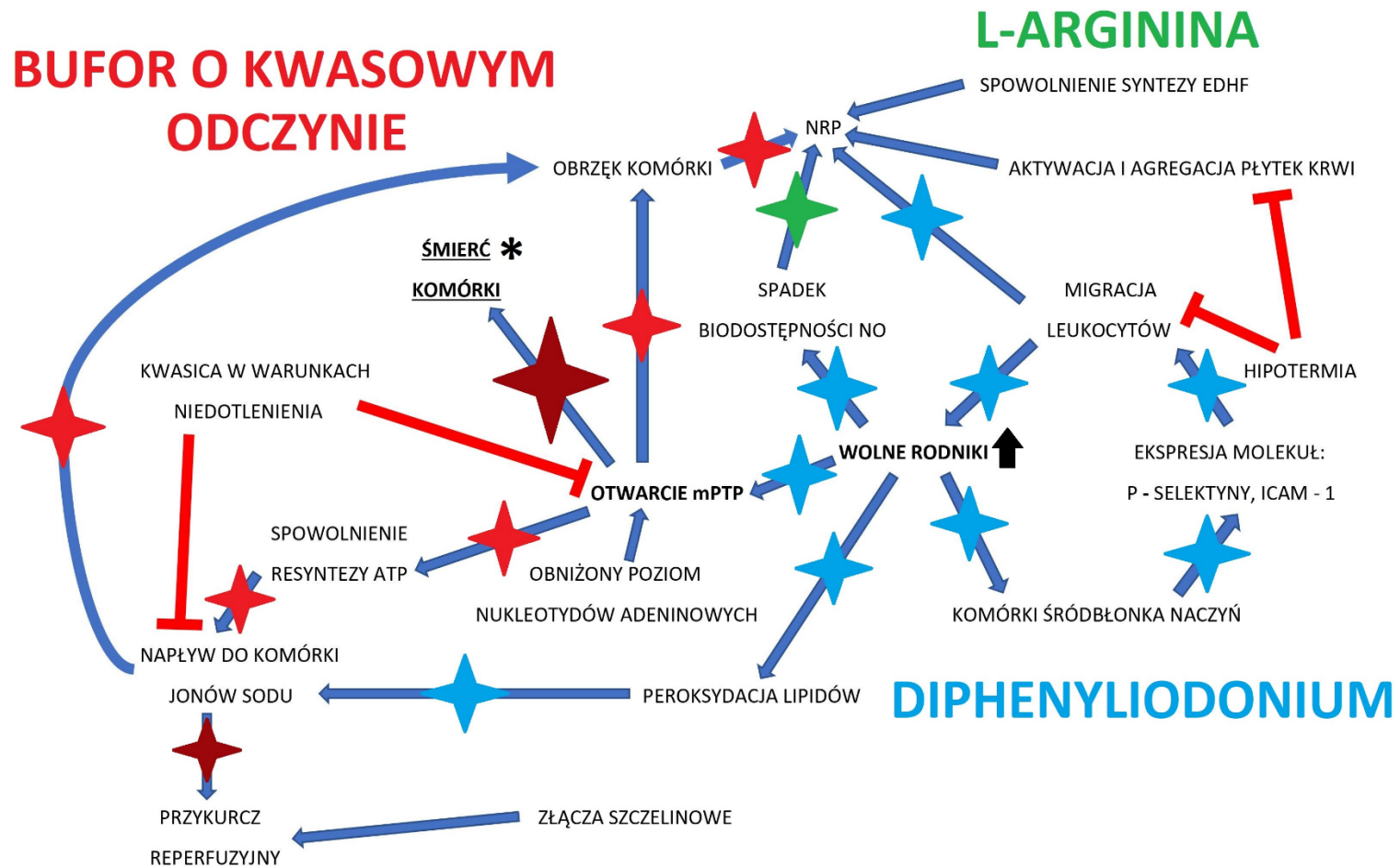
Ryc. 6. Sposób kaniulacji serca skutkujący wstecznym przepływem buforu pozwalającym na dotarcie perfuzatu do tętnic wieńcowych.

2. Założenia i cele pracy

2.1. Założenia pracy

Nagle przywrócenie przepływu krwi do obszaru niedokrwionego jest przyczyną RI, które odpowiada za zwiększenie obszaru zawału serca oraz wzrost ryzyka migotania komór [1, 2, 3].

Na podstawie opisanych we wstępie mechanizmów można wyróżnić dwa kluczowe ogniwa w procesie RI. Pierwszym jest powstawanie ROS i ich plejotropowy bezpośredni lub pośredni wpływ promujący wszystkie inne mechanizmy RI, drugi to przetrwałe otwarcie mPTP. Jednoczesny wpływ na oba procesy może znacznie ograniczyć ostateczny obszar zawału. W przypadku zahamowania przetrwałego otwarcia mPTP najlepszym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie buforu o kwasowym odczynie podczas reperfuzji [22, 64, 75, 76]. Takie działanie powinno również przyczynić się do zmniejszenia napływu jonów sodu do komórki, ograniczając inny mechanizm RI, mianowicie przykurcz reperfuzyjny [64, 237]. W celu zahamowania produkcji wolnych rodników celowym wydaje się zastosowanie diphenyliodonium jako inhibitora układu oksydazy ksantynowej [11, 142, 143, 144, 145]. Diphenyliodonium hamuje również produkcję selektyny E i ICAM-1 [141]. Według niektórych badań diphenyliodonium jest ponadto inhibitorem produkcji ROS w mitochondriach [11, 142, 143, 144, 237]. Aby zminimalizować negatywny wpływ diphenyliodonium na syntezę NO równocześnie zostanie podana L-arginina - substrat w syntezie NO [216, 217, 218, 219, 220, 221, 238]. Takie działanie zwiększy stężenie NO wewnątrz komórek śródbłonna ograniczając NRP. Addytywne działanie wymienionych substancji podanych w jednej mieszaninie podczas reperfuzji wieńcowej powinno zahamować wszystkie kluczowe mechanizmy prowadzące do RI znacząco ograniczając jego rozmiary (Ryc. 7).



Ryc. 7. Wpływ badanych substancji na szlaki indukowane podczas niedokrwienia/reperfuzji. *Śmierć komórki miała miejsce głównie w mechanizmach apoptozy i nekrozy.

2.2. Cele pracy

Głównym celem rozprawy doktorskiej jest zbadanie czy dowieńcowe podanie diphenyliodonium, L-argininy, buforu o kwasowym odczynie oraz ich kombinacji zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia zatrzymania akcji serca w mechanizmie migotania komór serca oraz wpływa korzystnie na obszar martwicy pozawałowej u szczurów.

Cele szczegółowe:

1. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca;
2. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na średnią wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca odpowiednio w 15., 30. i 45. minucie reperfuzji;
3. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na liczbę epizodów migotania komór podczas reperfuzji;
4. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na wielkość obszaru serca objętego martwicą dla poszczególnych grup;
5. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na średnią zawartość białka kaspazy-3 (markera apoptozy) w koniuszku serca;
6. zbadanie wpływu dowieńcowego podania w czasie reperfuzji diphenyliodonium i L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na średnią zawartość w koniuszku serca kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, *Phosphatidylinositol 3-kinase*), która jest markerem aktywności kardioprotekcyjnej;

3. Materiały i metody

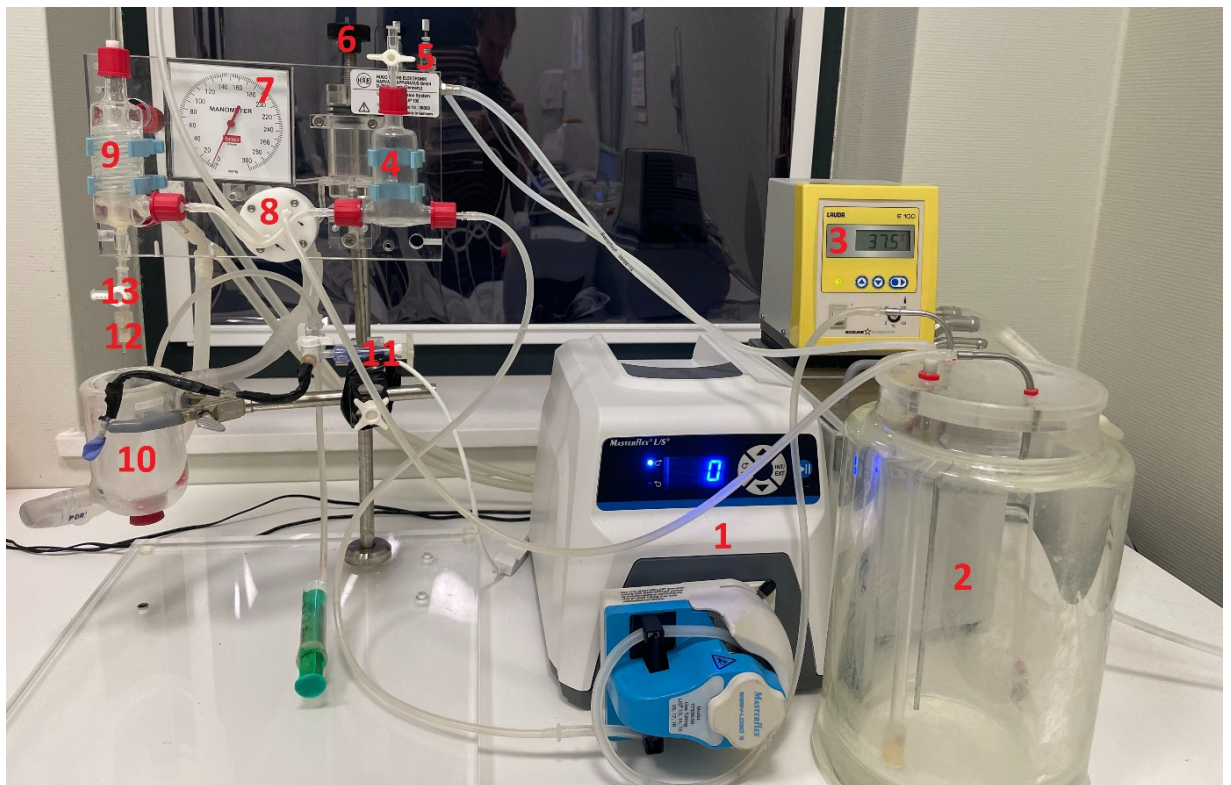
3.1. System Langendorffa

3.1.1. Budowa systemu

Budowa wykorzystywanego systemu Langendorffa – HSE UNIPER UP-100 Type 834 (Ryc. 8):

1. pompa perystaltyczna – dla każdego z doświadczeń szybkość przepływu została ustawiona na 6 ml/min [234];
2. zbiornik perfuzatu – za pośrednictwem płaszcza wodnego otaczającego zbiornik utrzymywano temperaturę buforu na poziomie 37.5 °C. Dodatkowo podczas całego doświadczenia perfuzat był karbogeniczowany (95% O₂ + 5% CO₂) [234, 270];
3. termocykulator - utrzymanie stałej temperatury buforu w obrębie płaszczy wodnych systemu: 37.5 °C;
4. windkessel – zmniejszenie pulsacji generowanej przez pompę perystaltyczną, pełni funkcję „pułapki powietrznej” zapobiegającej dostaniu się do krążenia wieńcowego pęcherzyków gazu;
5. zawory igłowe umożliwiające regulację objętości karbogenu dostarczanej do buforu, wartość ciśnienia karbogenu ustawiono zgodnie z zaleceniami producenta na 1 bar;
6. mechanizm kontroli ciśnienia pod jakim dostarczany jest do serca bufor, aktualnie ustawione ciśnienie pokazywane jest przez manometr;
7. manometr – ciśnienie w każdym z doświadczeń ustawiono na poziomie 45 mmHg;
8. membrana odpowiadająca za generowanie prawidłowego oporu dla powracającego do zbiornika buforu oraz utrzymanie właściwego stałego ciśnienia cieczy w systemie;
9. wymiennik ciepła z wbudowaną pułapką powietrzną - dodatkowo ogrzewa bufor (uzupełnienie strat ciepła w czasie przepływu przez rurki), ostatnia „pułapka powietrzna” przed dopłynięciem buforu do serca;
10. dodatkowy płaszcz wodny odpowiadający za utrzymanie odpowiedniej temperatury serca w warunkach *in vitro*;

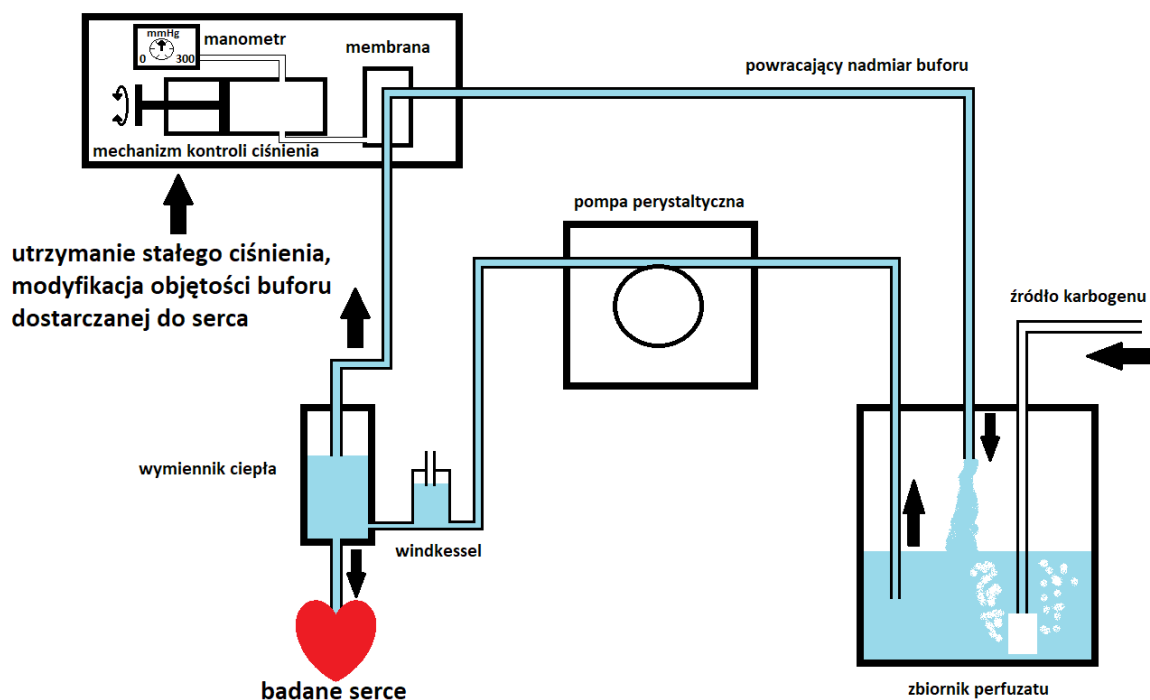
11. przetwornik ciśnienia wraz z podłączonym do niego balonem umożliwiającym pomiar ciśnienia w lewej komorze serca oraz strzykawka regulująca obciążenie wstępne;
12. kaniula, do której poprzez aortę podwiązywano serca;
13. zawór trójdrożny umożliwiający podawanie w czasie pierwszych trzech minut reperfuzji zmodyfikowanych buforów.



Ryc. 8. Zdjęcie systemu Langendorffa użytego w doświadczeniach.

3.1.2. Działanie systemu

Badania zostały przeprowadzone w warunkach stałego ciśnienia perfuzji wynoszącego 45 mmHg [234]. W związku z tym w zależności od zachodzących na skutek niedokrwienia zmian w obrębie krążenia wieńcowego dochodziło do regulacji objętości przepływu buforu dostarczanego do serca [234] (Ryc. 9).



Ryc. 9. Ilustracja mechanizmu działania systemu Langendorffa w warunkach stałego ciśnienia.

3.2. Charakterystyka zwierząt laboratoryjnych

Doświadczenia przeprowadzone zostały na szczurach pochodzących z Centralnego Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Do badań użyto sześćdziesięciu siedmiu 12-tygodniowych samców szczurów szczepu Sprague-Dawley (SPRD/Clzd), o masach ciała w zakresie między 280-360 g. Zwierzęta przydzielono losowo do ośmiu grup. Trzy pozostałe zwierzęta zostały dołączone do grup, w których miały miejsce niepowodzenia w czasie przeprowadzania doświadczeń, czyli śmierć zwierzęcia przed pobraniem serca lub epizody migotania komórek serca w okresie stabilizacji niepoddające się interwencji w celu umiarowienia.

Zwierzęta przebywały w kontrolowanych warunkach otoczenia w pomieszczeniu z wentylacją mechaniczną, regulowaną dobą świetlną (12h/12h) temperaturą 22-24° C, miały swobodny dostęp do wody oraz przemysłowej paszy granulowanej Rodentia Breeding (Wytwórnia Koncentratów i Mieszanek Paszowych AGROPOL S.J.).

3.3. Przebieg doświadczeń

3.3.1. Przygotowanie buforów

Każdego dnia przed przeprowadzaniem doświadczeń sporządzany był świeży KHB. Wykorzystywano wodę filtrowaną przez system Milli-Q., stężenie poszczególnych soli w roztworze wynosiło odpowiednio: NaCl - 112 mM/l, KCl - 5 mM/l, MgSO₄ x 7H₂O - 1.2 mM/l, K₂HPO₄ - 1 mM/l, CaCl₂ - 1.25 mM/l, NaHCO₃ - 25 mM/l, D-glukozy - 11 mM/l. Kwasem solnym modyfikowano pH buforu uzyskując wartość 7.2, co po 30 minutowej karbogenizacji i ogrzaniu stabilizowało pH na poziomie 7.4, natomiast temperaturę buforu utrzymywano w granicach 37°C [270, 239]. Bufory podawane przez pierwsze 3 minuty reperfuzji były przygotowywane tuż przed przeprowadzeniem każdego doświadczenia tak, aby charakteryzowały się właściwym stężeniem substancji, pH oraz temperaturą.

3.3.2. Znieczulenie

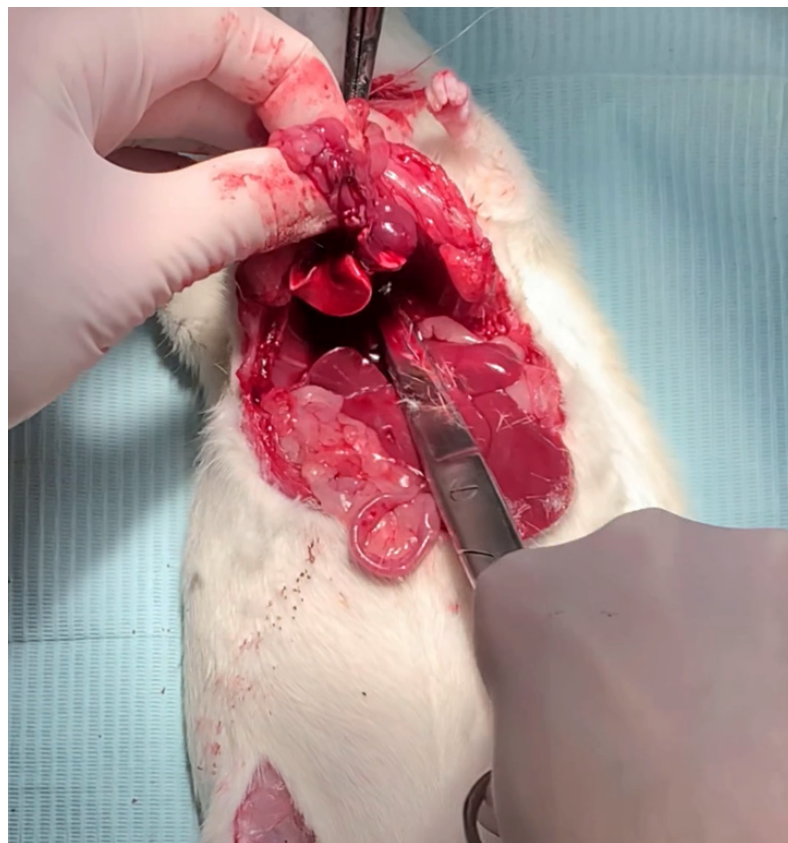
Po zważeniu szczury były znieczulane poprzez dootrzewnowe podanie mieszanki ketaminy i ksylazyny w dawkach odpowiednio: 85mg/1kg i 15mg/1kg masy ciała [239].

3.3.3. Pobranie serc

Znieczulone zwierzę unieruchamiano do stołu operacyjnego w pozycji na grzbiecie. Cięciem poprzecznym, ok 2 cm poniżej łuku żebrowego, przecinano skórę i tkankę podskórną na odcinku około 6 cm. Następnie za pomocą igły 27 G, wstrzykiwano do żyły głównej dolnej 1000 U/kg heparyny niefrakcjonowanej celem zapobiegnięcia utworzeniu się zakrzepów. Po 30 sekundach od podania heparyny przecinano przeponę na całej jej długości, odsłaniając tym samym serce oraz płuca (Ryc. 10). W czasie krótszym niż 10 sekund cięciem prowadzonym po tylnej ścianie klatki piersiowej wycinano serce wraz z płucami (Ryc. 11). Każde z serc natychmiast po pobraniu umieszczane było w KHB o temperaturze 4 °C do czasu pełnego zatrzymania czynności serca [239].



Ryc. 10. Zdjęcie serca przygotowanego do pobrania.



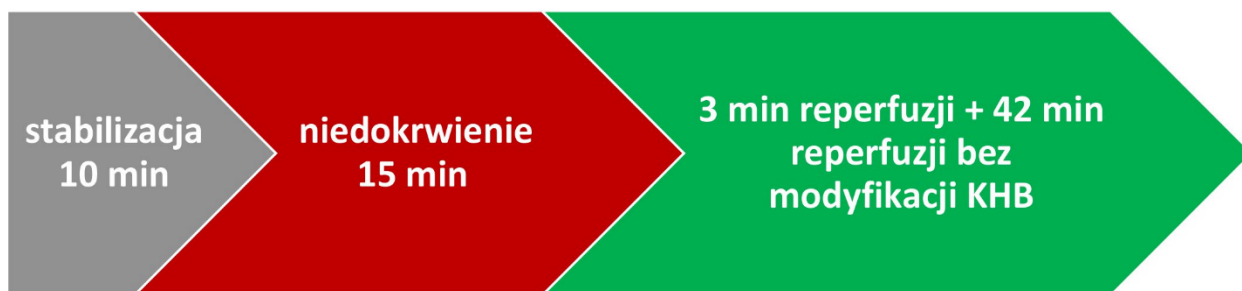
Ryc. 11. Zdjęcie usuwania serca wraz z płucami.

3.3.4. Podłączenie serca do systemu Langendorffa

Po zatrzymaniu czynności serca preparowano łuk aorty, co umożliwiało późniejsze podłączenie do systemu Langendorffa. W czasie preparowania aorty organ był umieszczony w KHB o temperaturze 4 °C. Następnie każde z serc podłączano do kaniuli włączonego systemu Langendorffa zabezpieczając aortę dwoma węzłami - pierwszym powyżej odejścia naczyń łuku aorty oraz drugim poniżej. Czynności od momentu wycięcia narządu do momentu podłączenia były wykonywane niezwłocznie i trwały krócej niż 60 sekund. Następnie odcinano płuca, pień płucny (ułatwiając odpływ buforu z krążenia wieńcowego), uszko lewego przedsionka oraz inne zbędne tkanki. Do lewej komory serca wprowadzano balon umożliwiający monitorowanie jej ciśnienia oraz stanowiący obciążenie wstępne (8-10 mmHg). Następnie serce umieszczano w szklanym naczyniu utrzymującym temperaturę 37,5 °C zapewniając właściwe warunki termiczne [239].

3.3.5. Etapy doświadczenia - okres stabilizacji (przygotowania), niedokrwienia i reperfuzji

Po podłączeniu serca do systemu Langendorffa we wszystkich grupach pierwsze 10 minut doświadczenia pełniło rolę okresu przygotowania i ustabilizowania czynności serca [240]. Właściwa faza eksperymentu, czyli niedokrwienie i następcza reperfuzja rozpoczynała się po 10 minutach. W tej fazie początkowo przepływ buforu w systemie był wyłączany na czas 15 minut, co wywoływało całkowite niedokrwienie mięśnia sercowego [241, 242]. Kurczliwość stopniowo zmniejszała się, aż do całkowitego zatrzymania czynności serca. Po 15 minutach niedokrwienia rozpoczynał się okres reperfuzji – w czasie początkowych trzech minut reperfuzji podawano bufor wzbogacony o badane w eksperymencie substancje. Po zakończeniu tego okresu wymieniano dostęp do układu, a następnie przez okres kolejnych 42 minut podawano wyłącznie bufor KHB (przez nowy dostęp naczyniowy) (Ryc. 12) [241, 242]. W ten sposób zmodyfikowane bufory były podawane przez oddzielny dostęp naczyniowy do serca [77, 78] (Ryc. 13).



Ryc. 12. Etapy doświadczenia.



Ryc. 13. Podawanie zmodyfikowanych buforów w trakcie reperfuzji.

Funkcję grupy kontrolnej spełniała grupa, której przez cały okres reperfuzji (tzn, 45 minut) podawano wyłącznie KHB. Skład buforu w grupach 2, 6, 7, 8 uległ został zmodyfikowany poprzez dodanie diphenyliodonium ($20 \mu\text{mol/l}$) [243, 244], w grupach 3, 5, 7, 8 użyta została L-arginina (3mmol/l) [245], a w grupach 4, 5, 6, 8 podczas reperfuzji wykorzystano bufor o kwasowym odczynie – pH 6,8 [77, 78] (Tab. 1).

Tab. 1. Podsumowanie grup włączonych do badania.

K - kontrola; D - diphenyliodonium; ARG - L-arginina;

BKO - bufor o kwasowym odczynie;

BKO + ARG - bufor o kwasowym odczynie + L-arginina;

BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium;

ARG + D - L-arginina + diphenyliodonium;

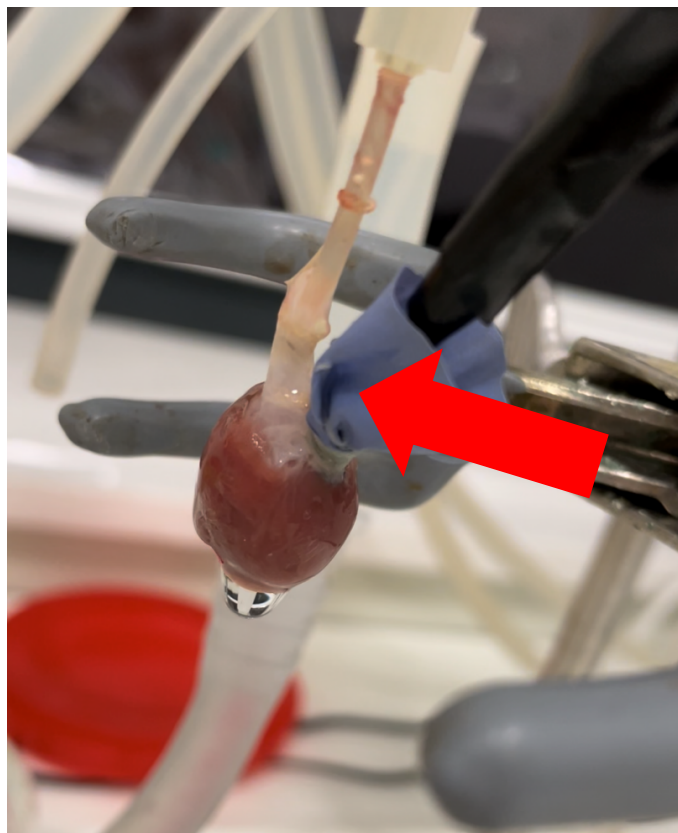
BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

	Dodatkowe substancje zastosowane w czasie pierwszych trzech minut reperfuzji	Liczba szczurów
Grupa 1 K	Brak	n=8
Grupa 2 D	Diphenyliodonium	n=8
Grupa 3 ARG	L-arginina	n=8
Grupa 4 BKO	Bufor o kwasowym odczynie (pH 6.8)	n=8
Grupa 5 BKO + ARG	L – arginina w buforze o kwasowym odczynie (pH 6.8)	n=8
Grupa 6 BKO + D	Diphenyliodonium w buforze o kwasowym odczynie (pH 6.8)	n=8
Grupa 7 ARG + D	L-arginina i diphenyliodonium	n=8
Grupa 8 BKO + D + ARG	Diphenyliodonium i L-arginina w buforze o kwasowym odczynie (pH 6.8)	n=9
Łączna liczba zwierząt		n = 65

Po zakończeniu reperfuzji pobierano tkankę serca, którą zawijano szczelnie w folię aluminiową oraz umieszczano w zamrażarce o temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na około 10 minut. W dalszej kolejności przy pomocy skalpela, po wcześniejszym usunięciu przedsionków wykonywano przekroje poprzeczne komór o grubości około 1 mm [246]. Następnie fragmenty tkanki umieszczano w uprzednio przygotowanym roztworze tetrazolium o pH 7.4 i inkubowano w łaźni o temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 20 minut [239].

3.3.6. Monitorowanie czynności lewej komory serca oraz zaburzeń rytmu serca

Od początku okresu stabilizacji w lewej komorze serca znajdował się wypełniony wodą balon połączony z przetwornikiem ciśnienia i systemem zbierającym dane. Balon generował obciążenie wstępne (8-10 mmHg) oraz umożliwiał monitorowanie czynności serca [239] (Ryc. 14).



Ryc. 14. Serce podłączone do systemu Langendorffa, w lewej komorze serca umieszczony jest balon umożliwiający pomiar ciśnienia (czerwona strzałka).

3.3.7. Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w czasie stabilizacji

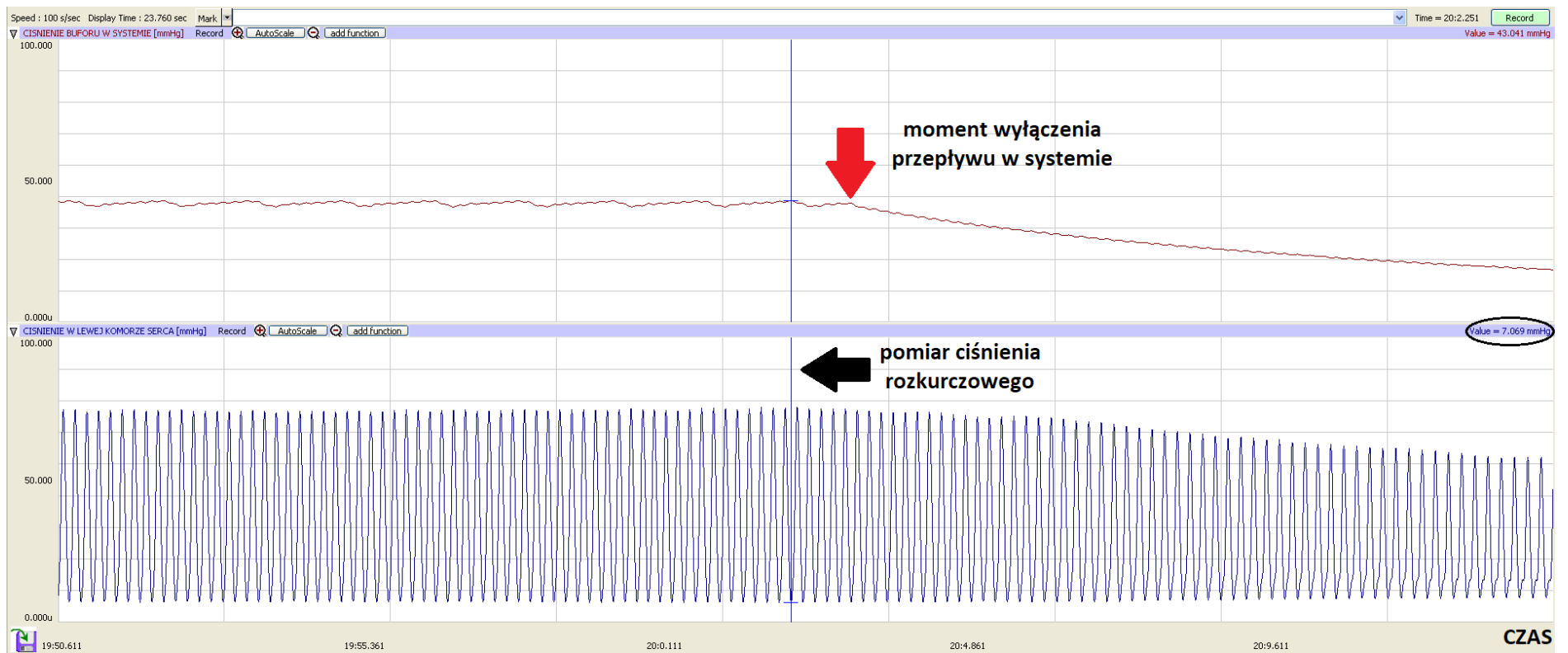
W każdym doświadczeniu zakres wartości ciśnienia rozkurczowego w czasie stabilizacji wynosił między 8-10 mmHg, a dane do analizy statystycznej pochodziły z ostatniej minuty okresu stabilizacji. Uzyskane informacje były podstawą do określenia zmiany wartości ciśnienia rozkurczowego w czasie reperfuzji będącej pośrednim wskaźnikiem nasilenia przykurczu poreperfuzyjnego, silnie skorelowanego z rozmiarami martwicy miokardium oraz dalszym rokowaniem (Ryc. 15)

3.3.8. Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w czasie reperfuzji

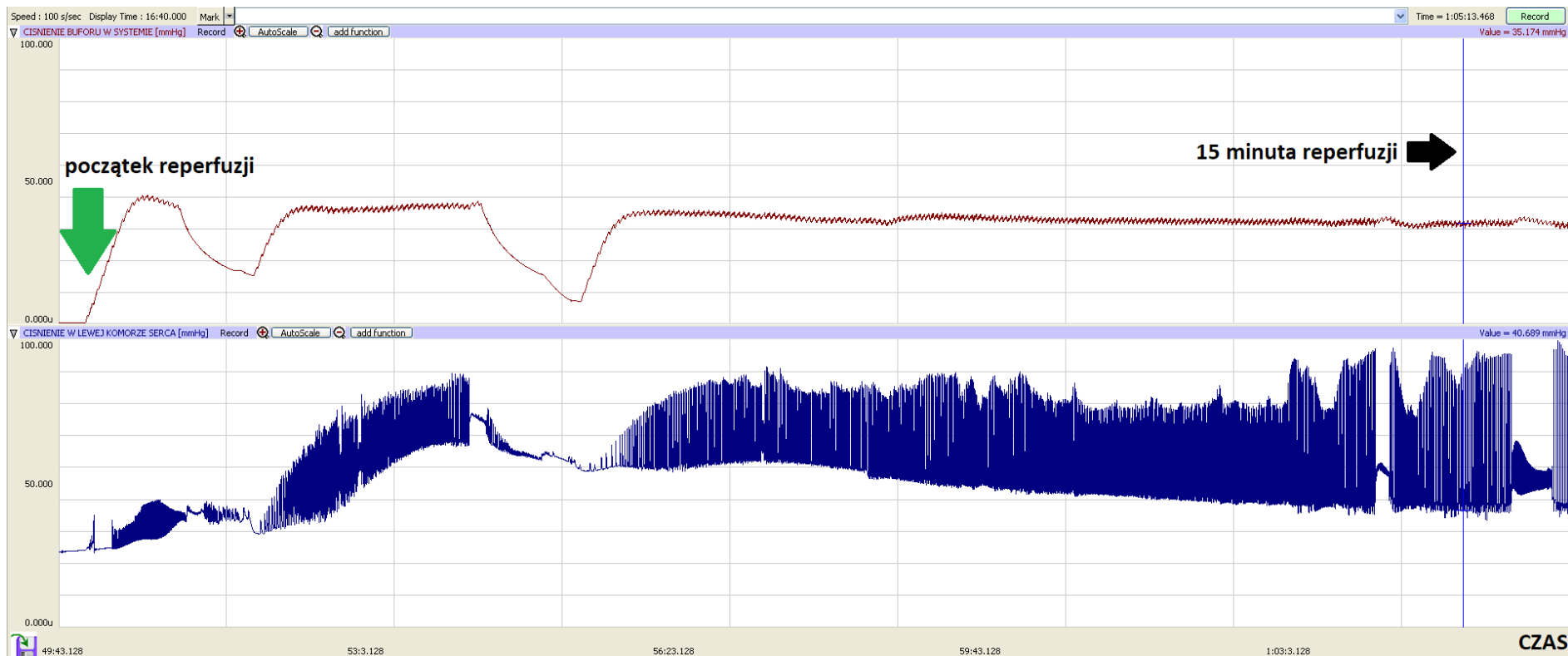
Pomiarów dokonywano w trzech momentach reperfuzji, odpowiednio w 15., 30. i 45. minucie jej trwania [241] (Ryc. 16)(Ryc. 17). Uzyskane wyniki przedstawiono jako deltę średniej wartości ciśnienia rozkurczowego, która była różnicą między średnią wartością ciśnienia rozkurczowego w czasie reperfuzji, odpowiednio w 15., 30. i 45. minucie jej trwania, a średnią wartością ciśnienia rozkurczowego w czasie stabilizacji (Ryc. 18).

3.3.9. Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w czasie reperfuzji

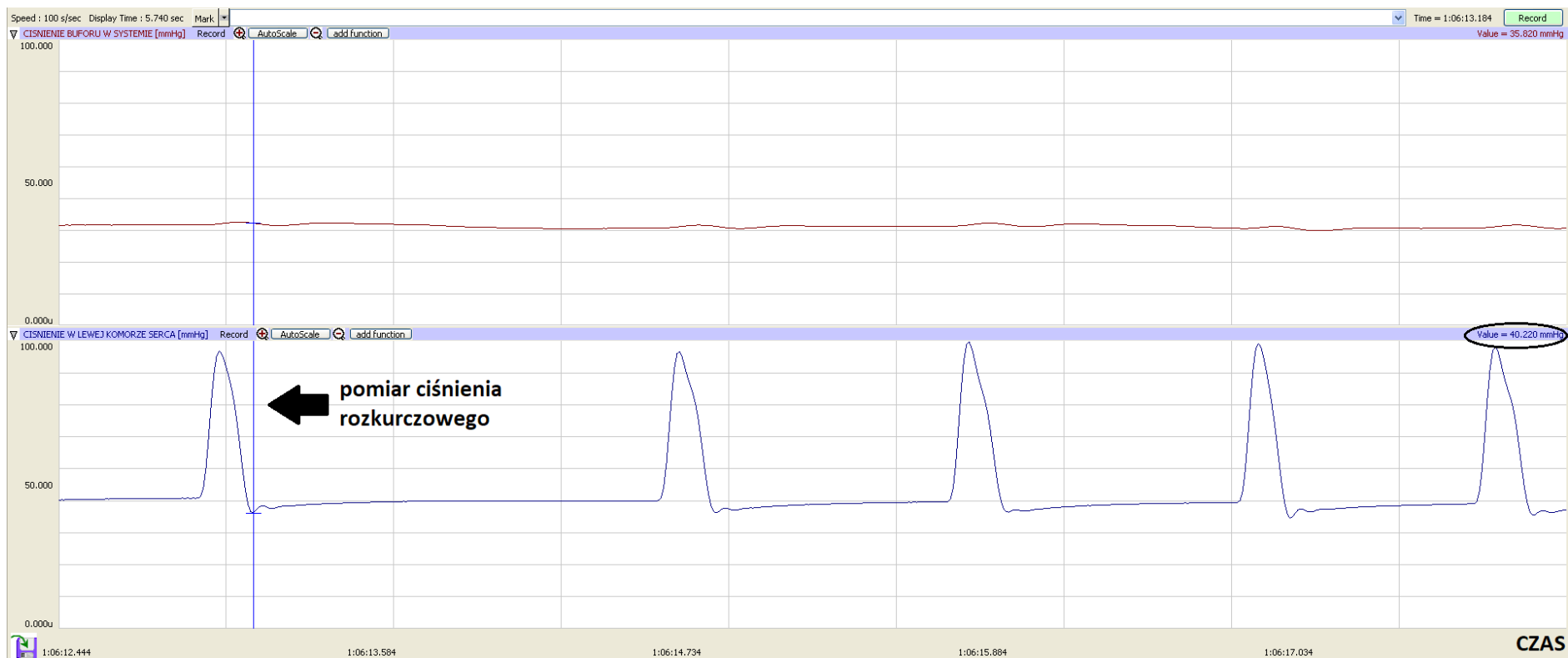
Moment przywrócenia rytmu serca był początkiem zapisu fizjologicznego (zatokowego). Pojedyncze izolowane skurcze lub nawet ich salwy bez następującej po nich odpowiedniej czynności serca nie były liczone jako przywrócenie rytmu serca (Ryc. 19).



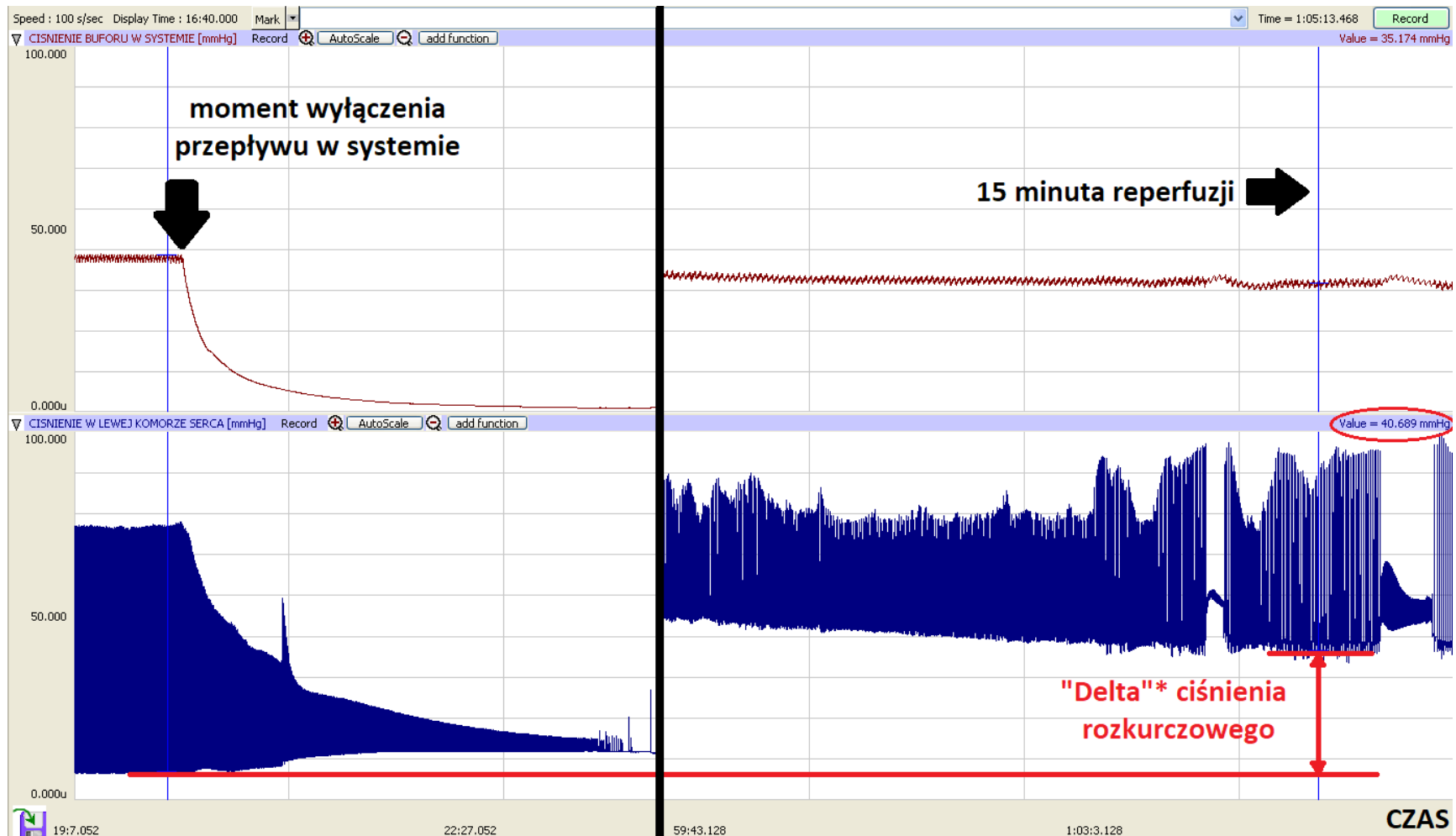
Ryc. 15. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (stabilizacja) przy użyciu programu DataTrax2.



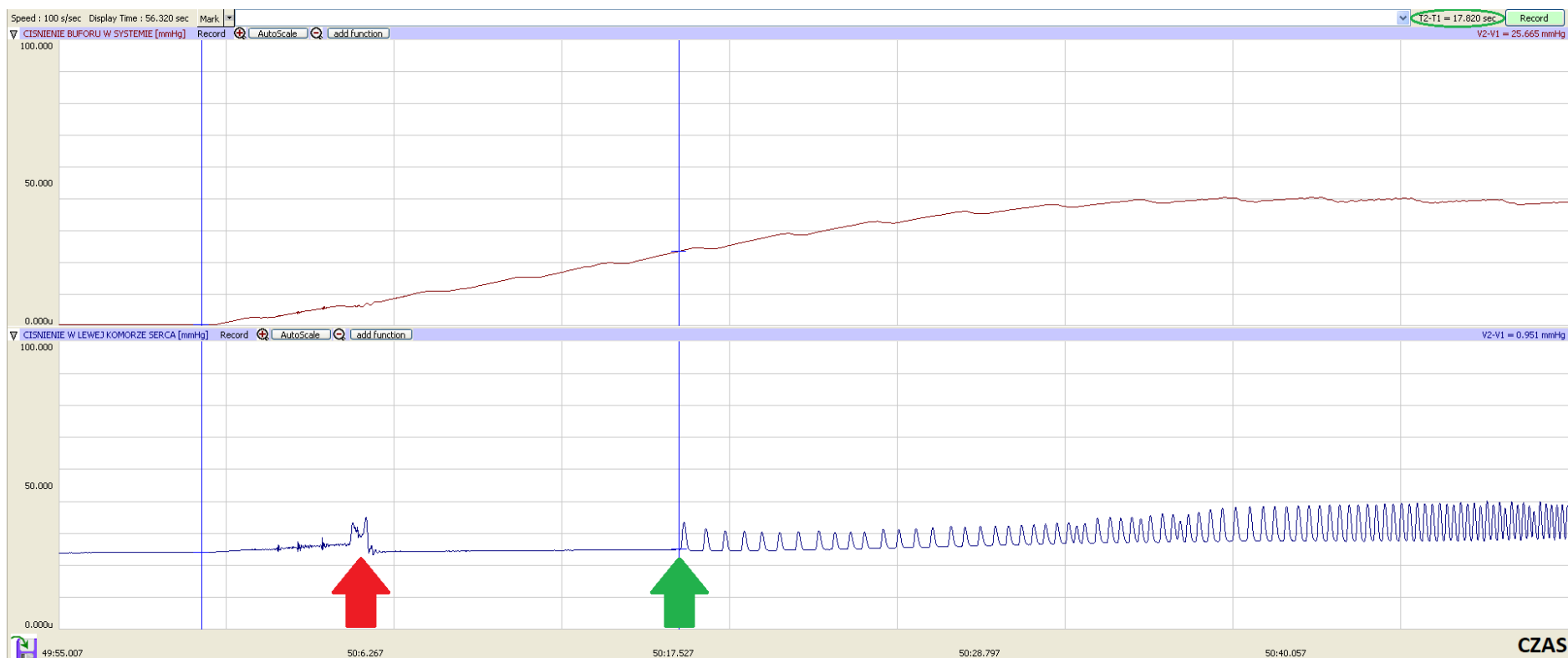
Ryc. 16. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (15 minuta reperfuzji) przy użyciu programu DataTrax2.



Ryc. 17. Przykładowy pomiar ciśnienia rozkurczowego lewej komory serca (15 minuta reperfuzji) przy użyciu programu DataTrax2.



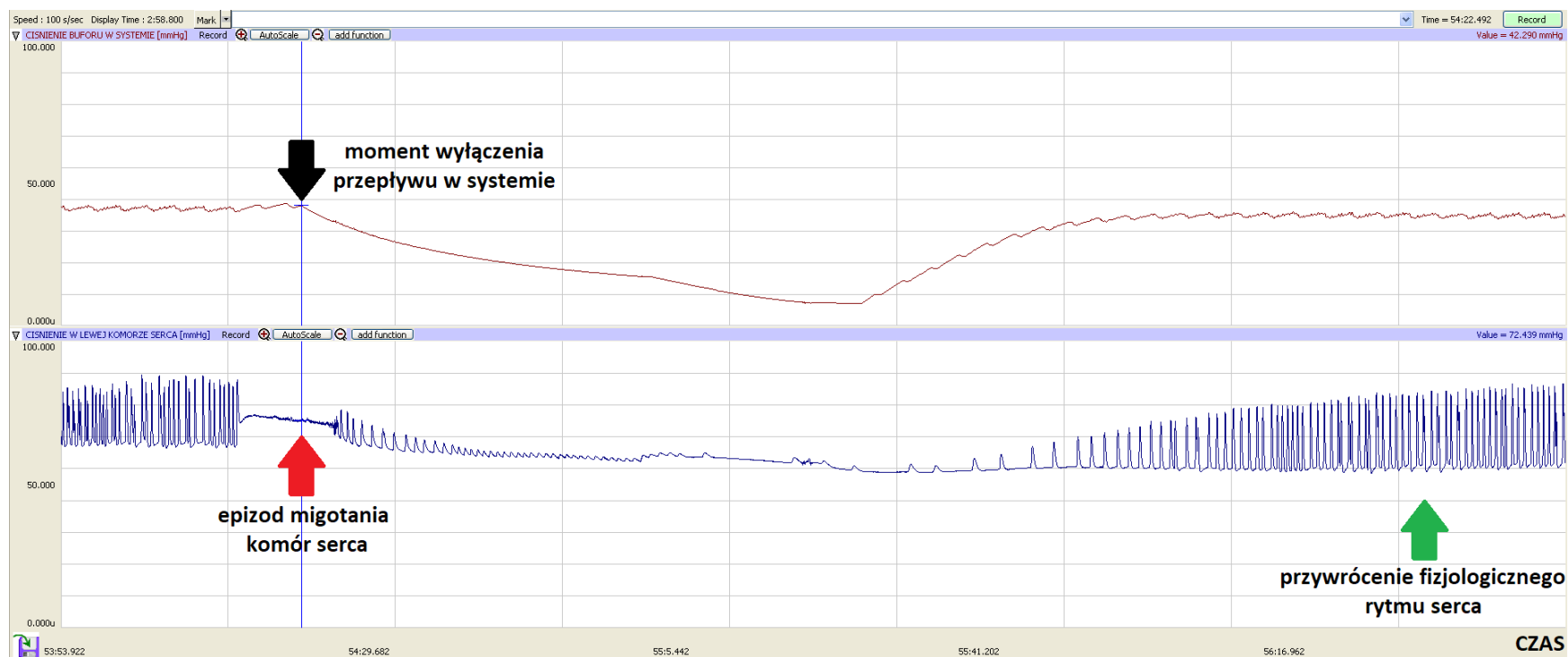
Ryc. 18. Zasada wyznaczania *”Deltę” czyli różnicy między ciśnieniem rozkurczowym w określonym momencie reperfuzji (15., 30. albo 45. minucie), a ciśnieniem rozkurczowym w okresie stabilizacji.



Ryc. 19. Przykładowy pomiar czasu do przywrócenia rytmu serca przy użyciu programu DataTrax2. Zielona strzałka - powrót fizjologicznego rytmu serca, czerwona strzałka – pojedyncze pobudzenie niebędące dowodem na powrót fizjologicznego rytmu serca.

3.3.10. Epizody migotania komór

Za epizody migotania komór uznawano tylko sytuacje, w których serce wymagało interwencji w postaci chwilowego wyłączenia przepływu w systemie wraz z jednoczesnym umieszczeniem serca w KHB o temperaturze 4°C, co powodowało przywrócenie właściwego rytmu (Ryc. 20).



Ryc. 20. Przykładowy zapis epizodu migotania komór oraz przywrócenia fizjologicznego rytmu serca.

3.4. Badania po zakończeniu doświadczeń

3.4.1. Ocena obszaru zawału serca

Z powodu różnych rozmiarów serc w celu porównania obszaru zawału mięśnia sercowego między poszczególnymi zwierzętami, dla każdego narządu obliczono stosunek obszaru martwicy do wielkości całego serca, a wynik wyrażano w procentach.

Wielkości obszaru martwicy oznaczono z wykorzystaniem metody barwienia miokardium za pomocą tetrazolium.

Po 45-minutowym okresie reperfuzji serca odłączano od systemu Langendorffa, zawijano szczelnie w folię aluminiową oraz umieszczano w zamrażarce o temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na około 10 minut. W dalszej kolejności przy pomocy skalpela, po uprzednim usunięciu koniuszka oraz przedsionków wykonywano trzy przekroje poprzeczne komór o grubości około 1 mm otrzymując 3 krążki. Następnie fragmenty tkanki umieszczano w roztworze tetrazolium o pH 7.4 i inkubowano w łaźni o temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 20 minut [239, 247].

Zawarte w komórkach żywych dehydrogenazy powodowały przejście soli tetrazolium w formazany, co skutkowało wybarwieniem tkanek żywych na czerwono. Obszary mięśnia sercowego dotknięte martwicą pozostawały natomiast białe (Ryc. 21).



Ryc. 21. Przykładowy skan przekrojów poprzecznych serca wybarwionych z użyciem tetrazolium.

Wybarwione tkanki umieszczano na 10-20 minut w formalinie w celu wyostrenia oraz utrwalenia kolorów, a następnie obustronnie skanowano. Jednakową grubość krążków uzyskano poprzez umieszczenie ich pod wcześniej przygotowaną płytką z plexiglasu, zaopatrzoną w 1-mm „nóżki”.

Skanowane krążki jako bryła geometryczna są walcem. Zatem do obliczania ich objętości, a tym samym objętości miokardium stosuje się wzór na objętość walca: $V = S \times h$, dla którego V – objętość, S – pole podstawy, h – wysokość. Pole podstawy walca (S) jest równe $\frac{1}{2}$ sumarycznej powierzchni martwicy wyliczonej z obu stron tkanki. Natomiast wysokość walca (h), jest tożsama z grubością krążka, która wynosi 1 mm i jest niezmienna dla każdego z pomiarów, ponieważ jest identyczna jak wysokość „nóżek” płytki z plexiglasu.

Dla przykładu posługując się jednym z uzyskanych wyników możemy przyjąć, że S_N – oznaczające pole powierzchni objętej niedokrwieniem jest tożsame z polem powierzchni serca. Natomiast S_M będące polem powierzchni objętej martwicą dla danego krążka jest obszarem zaznaczonym na obrazie na biało i wyliczonym przez program – ImageJ.

S_N = pole powierzchni krążków

S_M = sumaryczne pole powierzchni krążków - z górnej i dolnej krążka objętych martwicą wyliczone przez program ImageJ

Zgodnie z wcześniejszymi założeniami wzór na objętość miokardium przyjmie postać:

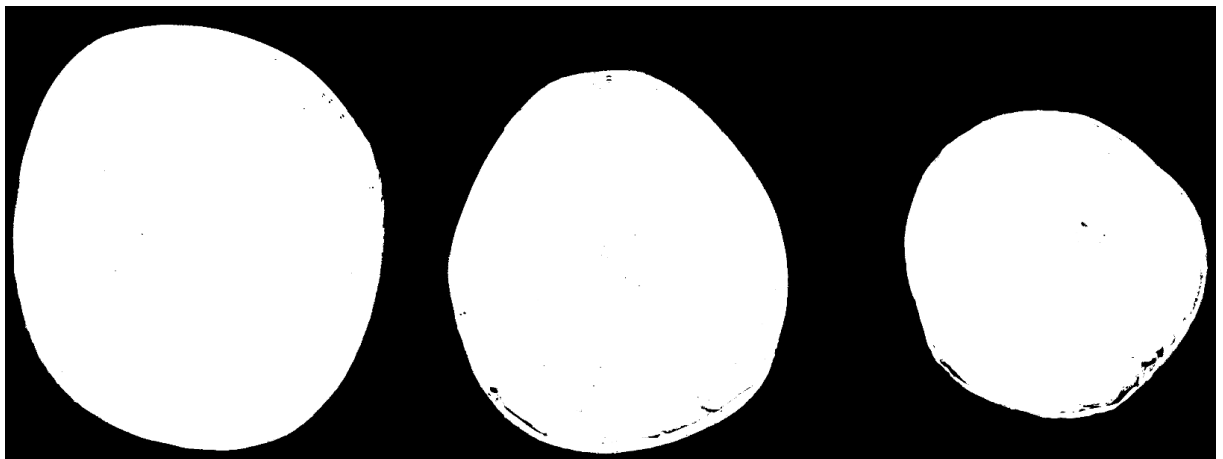
$VM = \frac{SM}{2} \times h = (\text{sumaryczne pole powierzchni krążków (górnej i dolnej części krążka) objętych martwicą wyliczone przez program ImageJ})/2 \times 1 = \text{pole powierzchni krążków objętych martwicą wyliczone przez program ImageJ}/2 = S_M/2$

$VN = \frac{SN}{2} \times h = (\text{pole powierzchni krążków})/2 \times 1 = \text{pole powierzchni krążków}/2 = S_N/2$

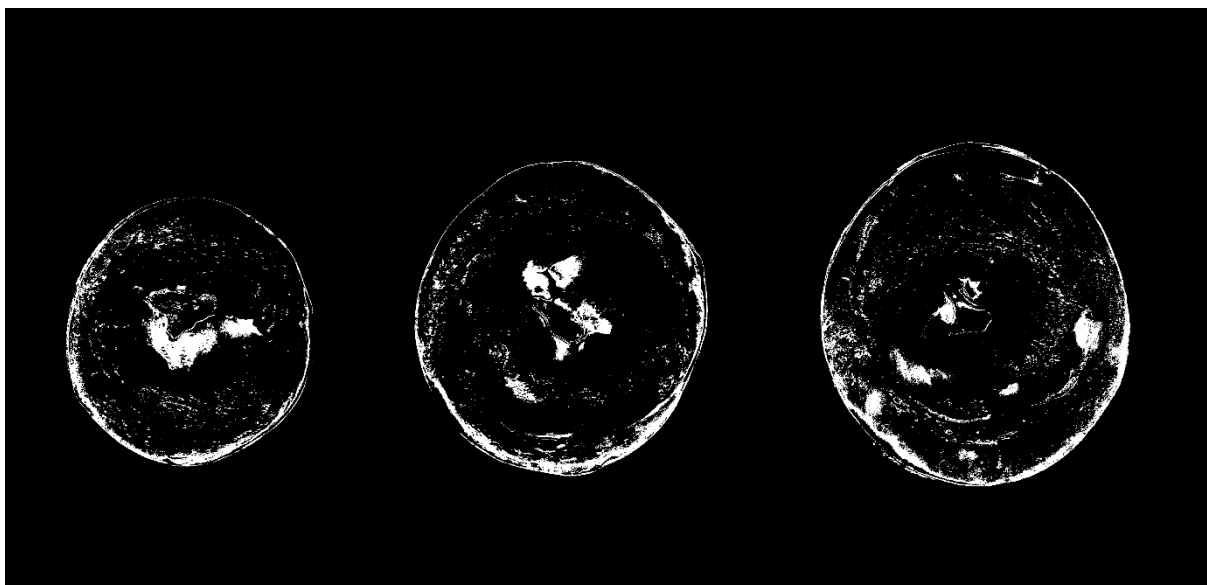
Dla których: V_M – to objętość obszaru martwicy dla jednego serca, a V_N – objętość obszaru objętego niedokrwieniem dla jednego serca.

Z powyższych równań wynika, że obszary martwicy oraz niedokrwienia są dodanymi z obu stron połami właściwych im powierzchni podzielonymi przez dwa.

Zeskanowane obrazy oceniano z wykorzystaniem programu komputerowego – *ImageJ*. W pierwszej kolejności z wykorzystaniem funkcji Treshold określano pole powierzchni krążków w pixelach (Ryc. 22). Następnie przy użyciu tego samego narzędzia uzyskiwano objęte martwicą pole powierzchni krążków (Ryc. 23).



Ryc. 22. Przykładowy skan pola powierzchni krążków serca wyznaczonego za pomocą funkcji Treshold (biały obszar).



Ryc. 23. Przykładowy skan pola powierzchni krążków serca objętego martwicą wyznaczonego za pomocą funkcji Treshold (biały obszar).

Wyniki zostały przedstawione jako procentowy stosunek obszaru martwicy do obszaru całego serca.

$$\frac{V_M}{V_N} \times 100\% = \frac{\sum_{i=1}^n S_{Mi}}{\sum_{i=1}^n S_{Ni}} \times 100\%$$

gdzie: n – liczba krążków, S_M – pole powierzchni martwicy skanu, S_N – pole powierzchni o skanu.

3.4.2. Ocena zawartości białka kaspazy-3 oraz kinazy 3 - fosfatydyloinozytolu w koniuszku serca (Western blot)

Koniuszki serc zostały zhomogenizowane w buforze lizującym RIPA zawierającym: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% Triton X-100; 10% glicerol; 0.1% SDS; 1mM PMSF oraz inhibitory peptydaz (cOmplete™, Protease Inhibitor Cocktail tablets, EDTA-free, Roche). Próbkę zawierającą 10 µg/µl białka całkowitego zostały rozdzielone na 8% żelu SDS-poliakryamidowym. Następnie przeprowadzono transfer rozdzielonego białka na błonę PVDF (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit; Bio-Rad) za pomocą Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad), po czym błony PVDF

inkubowano przez 1 godzinę z króliczymi pierwszorzędowymi poliklonalnymi, przeciwciałami przeciwko kaspazie-3 (1:1000, Caspase-3 Antibody - (Pro and Active); Bio-Techne) lub z króliczymi pierwszorzędowymi monoklonalnymi, przeciwciałami przeciwko Kinazie 3-fosfatydyloinozytolu p85 (1:1000, PI 3-Kinase p85 alpha Antibody (SU04-07); Bio-Techne). Następnie prowadzono całonocną inkubację z mysimi anty-króliczymi monoklonalnymi, drugorzędowymi przeciwciałami skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (HRP) (1:2000, mouse anti-rabbit sc-2357; Santa Cruz Biotechnology) Jako białka referencyjnego użyto króliczych poliklonalnych przeciwciał przeciwko β -aktynie (1:1000 dilution, anti-beta Actin antibody ab8227; Abcam) oraz mysich anty-króliczych monoklonalnych drugorzędowych przeciwciał, skoniugowanych z HRP (1:2000, mouse anti-rabbit sc-2357; Santa Cruz Biotechnology). Uzyskane prążki uwidoczniono za pomocą metody kolorymetrycznej za pomocą Amplified Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad) i oceniano ilościowo za pomocą metody densytometrii przy użyciu systemów obrazowania ChemiDoc (ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad). Poziom badanych białek został wyrażony jako stosunek względny w odniesieniu do białka referencyjnego β -aktyny [248].

3.5. Analiza statystyczna

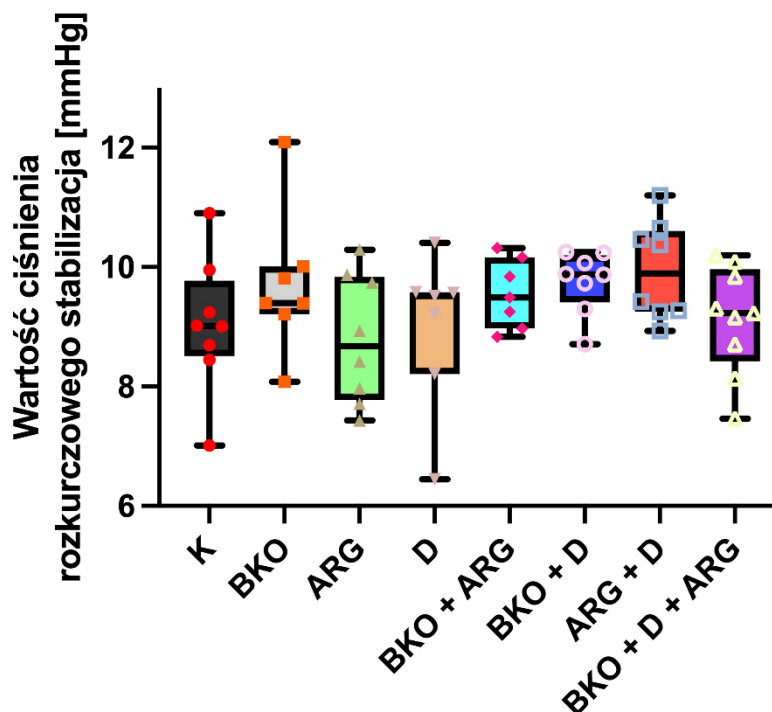
Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13.3. W celu sprawdzenia rozkładu normalnego użyto testu Shapiro-Wilka. Do oceny homogenności wariancji zastosowano test Levene'a. W przypadku danych, które cechował rozkład normalny we wszystkich porównywanych grupach, wartości w tekście i rycinach zostały przedstawione jako średnie analizowanych parametrów oraz ich błędy standardowe (\pm SE). Gdy rozkład danych przynajmniej jednej z porównywanych grup nie spełniał warunków rozkładu normalnego wyniki przedstawiano w postaci mediany z rozstępami międzykwartylowymi i rozpiętościami. Celem porównania średnich wartości poszczególnych wskaźników pomiędzy grupami zastosowano jedno- i dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Dla rozkładów innych niż normalne zastosowano odpowiednie testy nieparametryczne (ANOVA Kruskala-Wallisa z wielokrotnym porównaniem średnich rang, test U Manna-Whitney'a dla porównania prób niezależnych oraz ANOVA Friedmana dla prób zależnych). Za wartość poziomu istotności statystycznej przyjęto $P < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Podstawowe parametry hemodynamiczne

4.1.1. Wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie stabilizacji

Mediany wartości ciśnienia rozkurczowego w czasie stabilizacji dla poszczególnych grup wynosiły odpowiednio: K (n=8) 9,0 mmHg, BKO (n=7) 9,4 mmHg, ARG (n=8) 8,7 mmHg, D (n=7) 9,5 mmHg, BKO + ARG (n=7) 9,5 mmHg, BKO + D (n=8) 9,9 mmHg, ARG + D (n=8) 9,9 mmHg, BKO + D + ARG (n=9) 9,2 mmHg. Wartość ciśnienia rozkurczowego podczas stabilizacji w grupach badawczych nie różniła się statystycznie istotnie względem grupy kontrolnej. Ponadto nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w tym parametrze między poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 24).

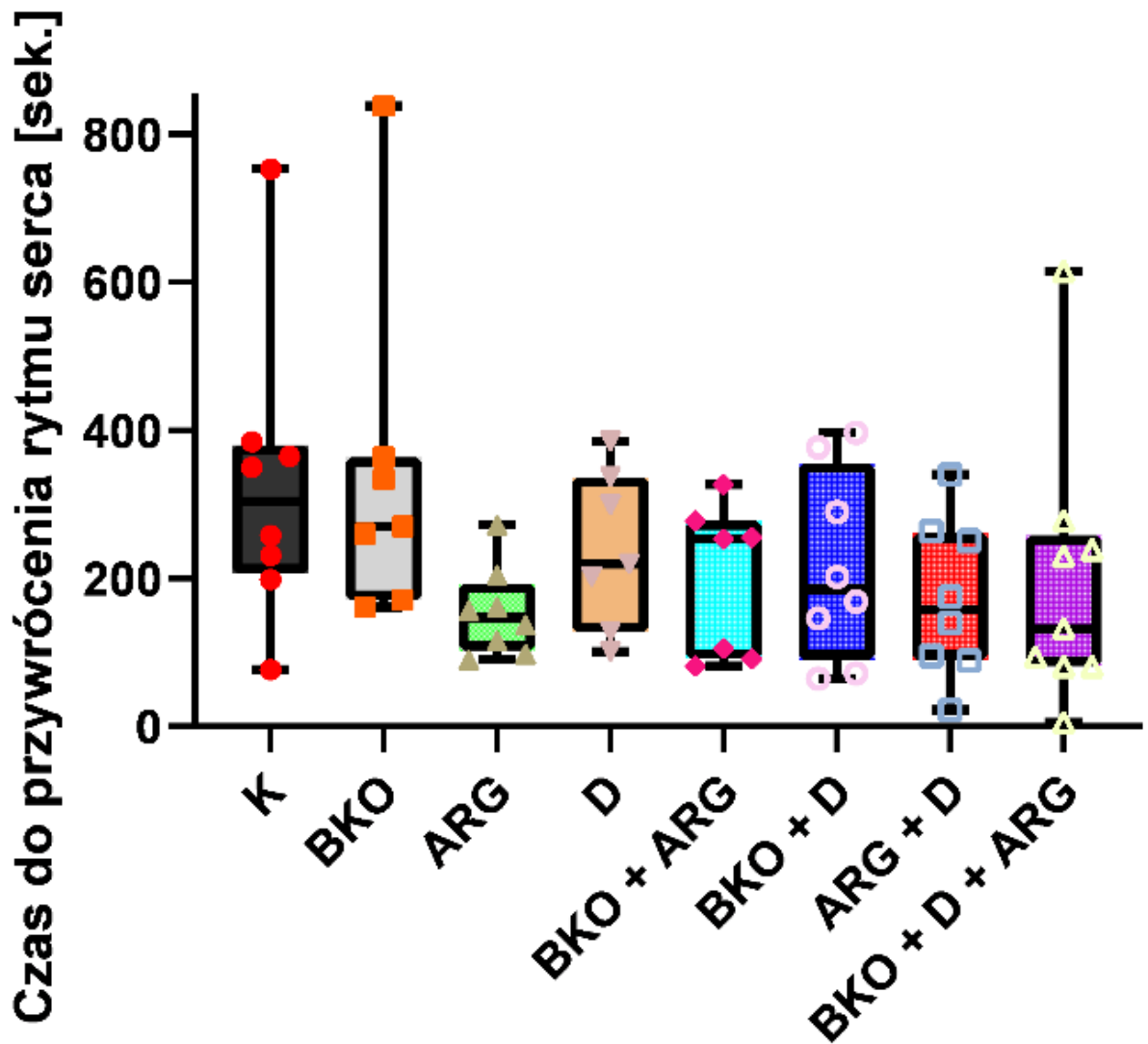


Ryc. 24. Wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie stabilizacji.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D – bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

4.1.2. Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca

Mediana czasu do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca podczas reperfuzji w poszczególnych grupach wynosiła odpowiednio: K (n=8) 304 sekund, BKO (n=7) 270 sekund, ARG (n=8) 147 sekund, D (n=7) 219 sekund, BKO + ARG (n=7) 253 sekund, BKO + D (n=8) 186 sekund, ARG + D (n=8) 158 sekund, BKO + D + ARG (n=9) 132 sekund. Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca w grupach badawczych nie różnił się statystycznie istotnie względem grupy kontrolnej. Ponadto nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w tym parametrze między poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 25).



Ryc. 25. Czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D – bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

4.1.3. Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie reperfuzji

15. minuta reperfuzji

Średnia delta wartości ciśnienia rozkurczowego dla poszczególnych grup w 15. minucie reperfuzji wynosiła odpowiednio: K (n=8) $13 \pm 3,9$ mmHg, BKO (n=7) $10 \pm 2,2$ mmHg, ARG (n=8) $3,6 \pm 2,2$ mmHg, D (n=7) $7,0 \pm 2,7$ mmHg, BKO + ARG (n=7) $2,4 \pm 1,8$ mmHg, BKO + D (n=8) $9,2 \pm 1,7$ mmHg, ARG + D (n=8) $12 \pm 2,5$ mmHg, BKO + D + ARG (n=9) $5,6 \pm 2,8$ mmHg.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 15. minucie dla grup badawczych D oraz BKO + D + ARG były niższe niż w K (n=8) $13 \pm 3,9$ mmHg. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: D (n=7) $7,0 \pm 2,7$ mmHg i BKO + D + ARG (n=9) $5,6 \pm 2,8$ mmHg ($p < 0,01$). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w tym parametrze między poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 26).

30. minuta reperfuzji

Średnia delta wartości ciśnienia rozkurczowego dla poszczególnych grup w 30. minucie reperfuzji wynosiła odpowiednio: K (n=8) $14 \pm 3,5$ mmHg, BKO (n=7) $11 \pm 2,9$ mmHg, ARG (n=8) $2,2 \pm 2,3$ mmHg, D (n=7) $4,0 \pm 2,2$ mmHg, BKO + ARG (n=7) $1,7 \pm 2,2$ mmHg, BKO + D (n=8) $8,7 \pm 2,2$ mmHg, ARG + D (n=8) $10 \pm 2,3$ mmHg, BKO + D + ARG (n=9) $2,7 \pm 2,6$ mmHg.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 30. minucie dla grup badawczych D oraz BKO + D + ARG były niższe niż w K (n=8) $14 \pm 3,5$ mmHg. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: D (n=7) $4,0 \pm 2,2$ mmHg i BKO + D + ARG (n=9) $2,7 \pm 2,6$ mmHg ($p < 0,01$) (Ryc. 26).

Ponadto wykazano, że średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 30. minucie dla grupy badawczych ARG oraz BKO + ARG były niższe niż w K (n=8) $14 \pm 3,5$ mmHg. Różnica

osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: ARG (n=8) $2,2 \pm 2,3$ mmHg i BKO + ARG (n=7) $1,7 \pm 2,2$ mmHg ($p < 0,05$) (Ryc. 27) (Ryc. 28).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w 30. minucie pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 29).

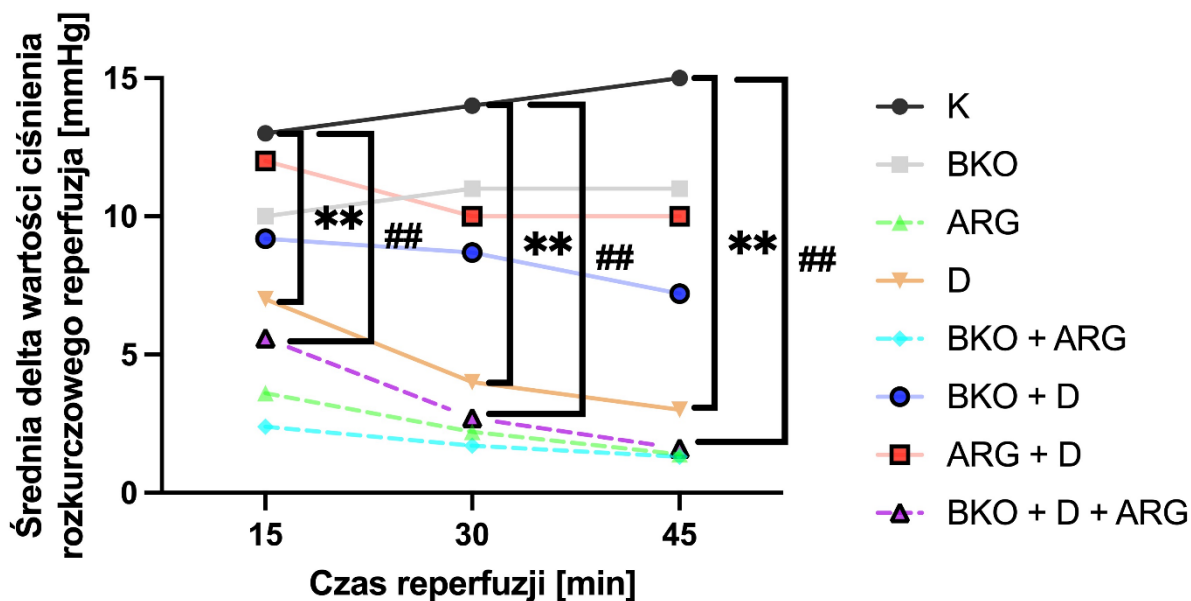
45. minuta reperfuzji

Średnia delta wartości ciśnienia rozkurczowego dla poszczególnych grup w 45. minucie reperfuzji wynosiła odpowiednio: K (n=8) $15 \pm 4,5$ mmHg, BKO (n=7) $11 \pm 2,9$ mmHg, ARG (n=8) $8,0 \pm 1,4$ mmHg, D (n=7) $3,0 \pm 2,3$ mmHg, BKO + ARG (n=7) $1,3 \pm 2,7$ mmHg, BKO + D (n=8) $7,2 \pm 2,1$ mmHg, ARG + D (n=8) $10 \pm 2,4$ mmHg, BKO + D + ARG (n=9) $1,6 \pm 2,7$ mmHg.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 45. minucie dla grup badawczych D oraz BKO + D + ARG były niższe niż w K (n=8) $15 \pm 4,5$ mmHg. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: D (n=7) $3,0 \pm 2,3$ mmHg i BKO + D + ARG (n=9) $1,6 \pm 2,7$ mmHg ($p < 0,01$) (Ryc. 26).

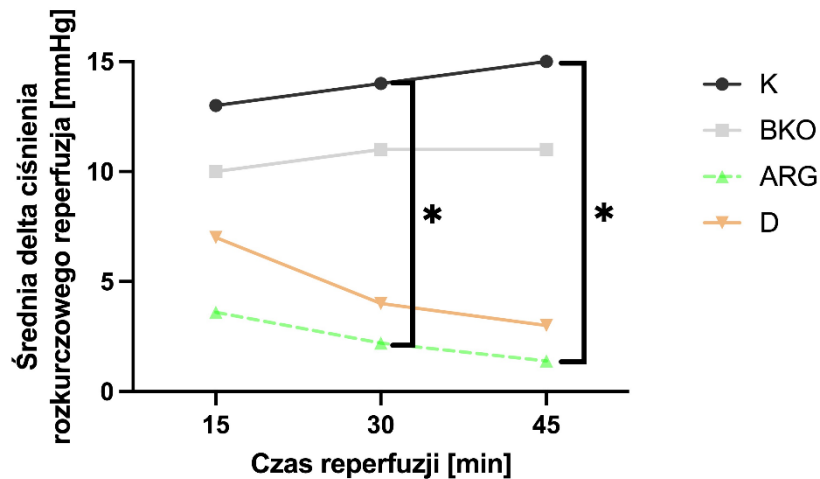
Ponadto wykazano, że średnie delty wartości ciśnienia rozkurczowego w 45. minucie dla grupy badawczych ARG oraz BKO + ARG były niższe niż w K (n=8) $15 \pm 4,5$ mmHg. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: ARG (n=8) $8,0 \pm 1,4$ mmHg i BKO + ARG (n=7) $1,3 \pm 2,4$ mmHg ($p < 0,05$) (Ryc. 27) (Ryc. 28).

Nie zaobserwowano natomiast statystycznie istotnych różnic średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w 45. minucie pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 29).



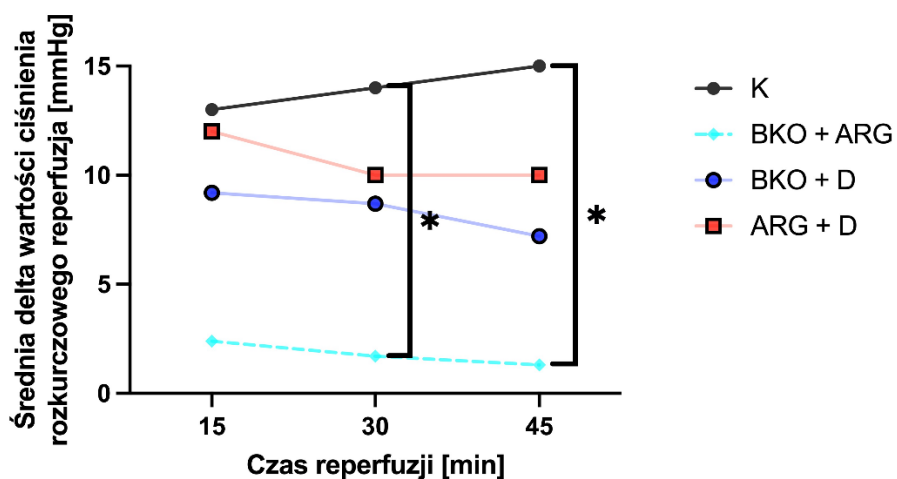
Ryc. 26. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.

K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina. ** istotna różnica między średnią deltą wartości ciśnienia rozkurczowego podczas podawania w trakcie reperfuzji D względem K, $**P < 0,01$; ## - istotna różnica między średnią deltą wartości ciśnienia rozkurczowego podczas jednoczesnego podawania w 15, 30 i 45 minucie reperfuzji BKO + D + ARG względem K, $##P < 0,01$.



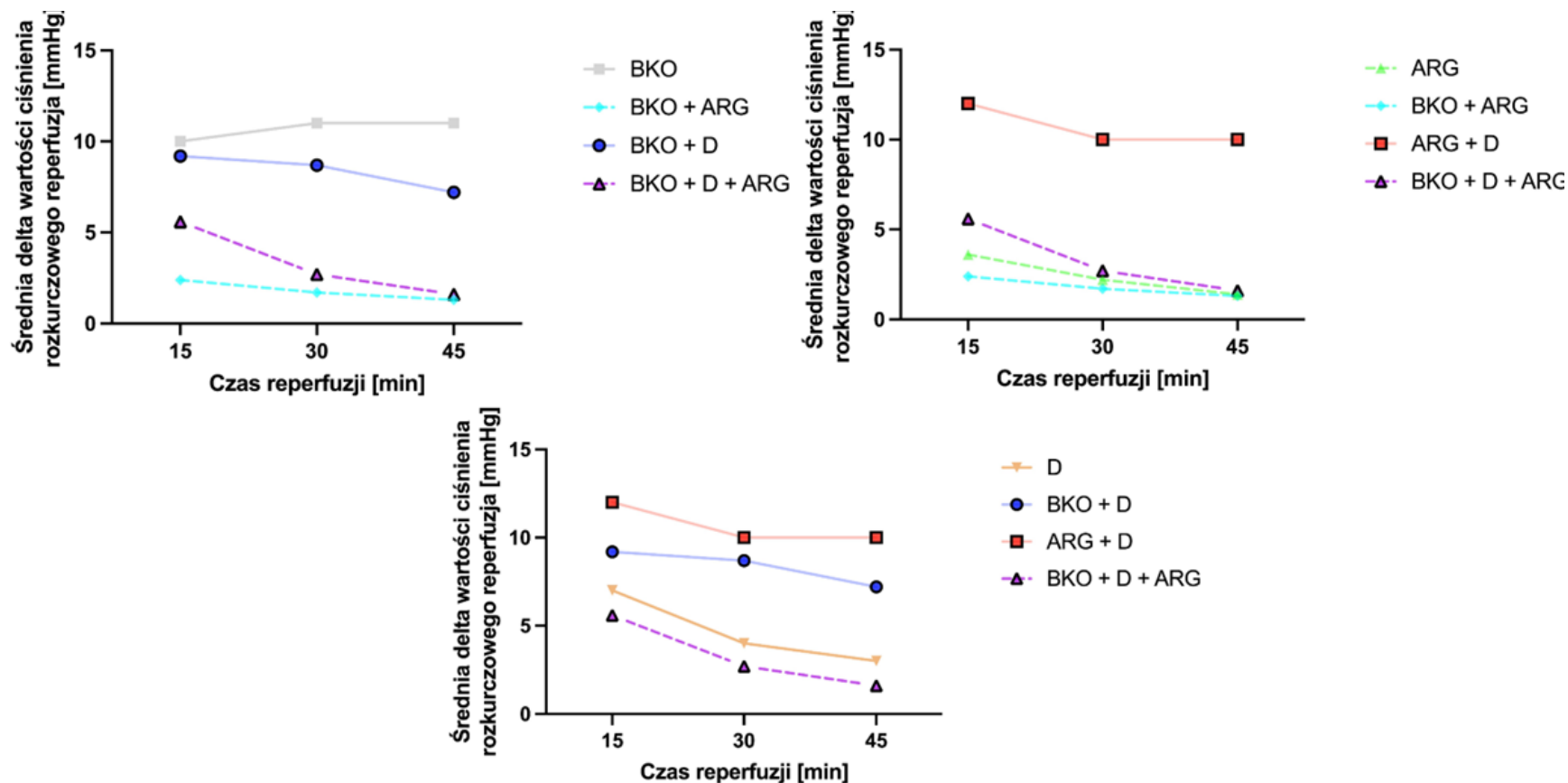
Ryc. 27. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzy.

K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie. * istotna różnica między średnią deltą wartości ciśnienia rozkurczowego podczas podawania w trakcie reperfuzy ARG względem K, * $P < 0,05$.



Ryc. 28. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzy.

K – kontrola; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium. * istotna różnica między średnią deltą wartości ciśnienia rozkurczowego podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzy BKO + ARG względem K, * $P < 0,05$.



Ryc. 29. Zmiany średnich delt wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w 15., 30. oraz 45. minucie reperfuzji.

BKO – bufor o kwasowym odczynie; ARG – L-arginina; D – diphenyliodonium; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

4.1.4. Epizody migotania komór

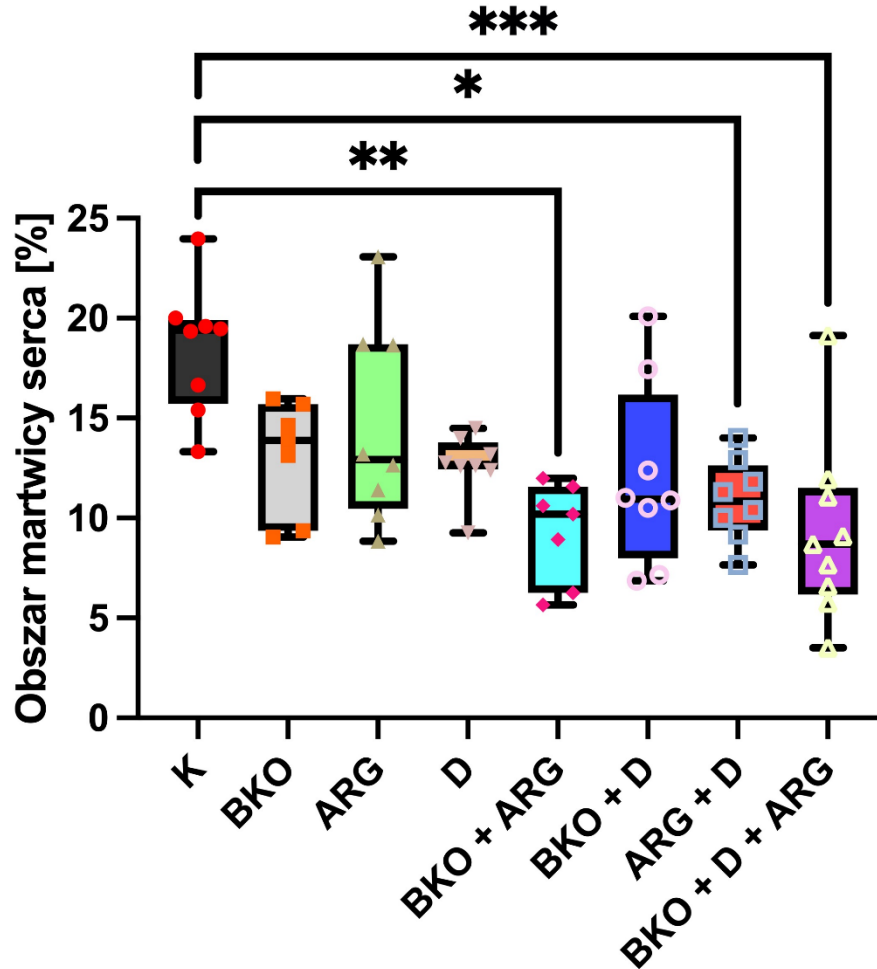
Liczba epizodów migotania komór w poszczególnych grupach wynosiła odpowiednio: K (n=8) 7, BKO (n=7) 0, ARG (n=8) 0, D (n=8) 0, BKO + ARG (n=7) 1, BKO + D (n=8) 0, ARG + D (n=8) 0, BKO + D + ARG (n=9) 0. W związku z niewielką liczbą epizodów nie była możliwa analiza statystyczna uzyskanych wyników.

4.2. Podstawowe parametry histologiczne

4.2.1. Obszar zawału serca oceniony metodą histopatologiczną

Mediana średniego procentowego obszaru zawału serca dla poszczególnych grup wynosiła odpowiednio: K (n=8) 19 %, BKO (n=7) 14 %, ARG (n=8) 13 %, D (n=8) 13 %, BKO + ARG (n=7) 10 %, BKO + D (n=8) 11 %, ARG + D (n=8) 11 %, BKO + D + ARG (n=9) 8,7 %.

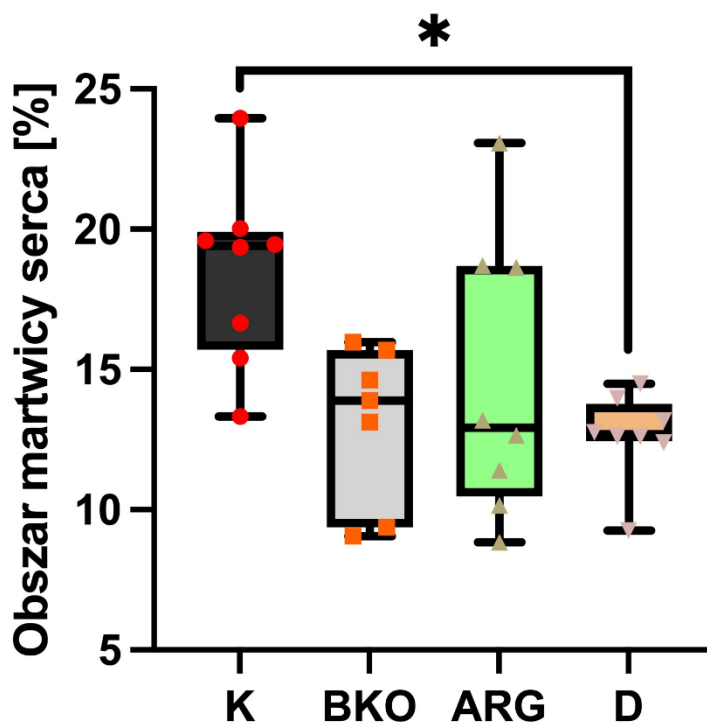
Analiza otrzymanych wyników wykazała, że procentowy obszar martwicy serca dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: BKO + D + ARG (n=9) 8,7 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,001$), BKO + ARG (n=7) 10 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,01$), ARG + D (n=8) 11 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,01$) (Ryc. 30).



Ryc. 30. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.

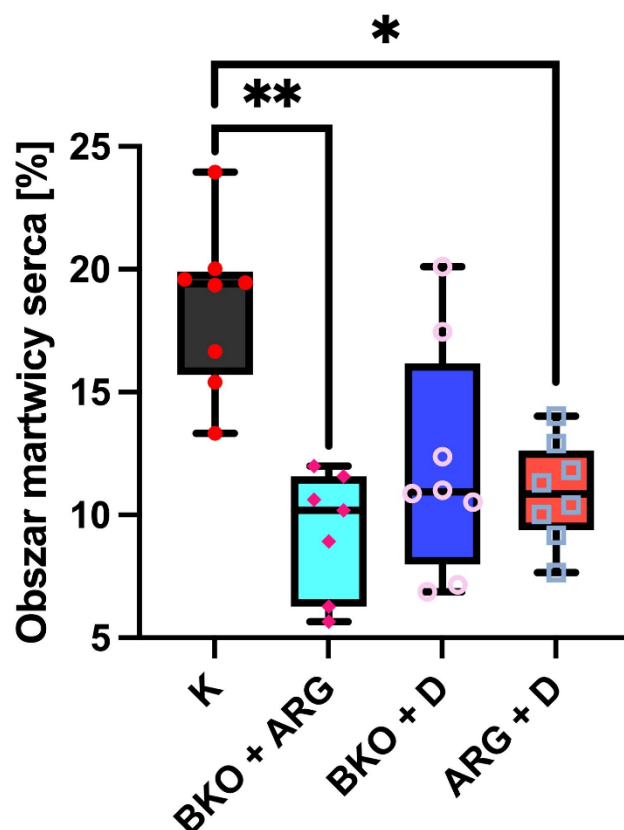
Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartylowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina. *** - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzji BKO + D + ARG względem K, *** $P < 0,001$; ** - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem K, ** $P < 0,01$; * - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzji ARG + D względem K, * $P < 0,05$.

Dodatkowa analiza statystyczna otrzymanych wyników potwierdziła, że procentowy obszar martwicy serca dla grup badawczych: BKO + ARG, ARG + D oraz D był istotnie niższy niż w K. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: BKO + ARG (n=7) 10 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,01$), ARG + D (n=8) 11 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,05$), D (n=8) 13 % vs K (n=8) 19 % ($p < 0,05$) (Ryc. 31)(Ryc. 32).



Ryc. 31. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.

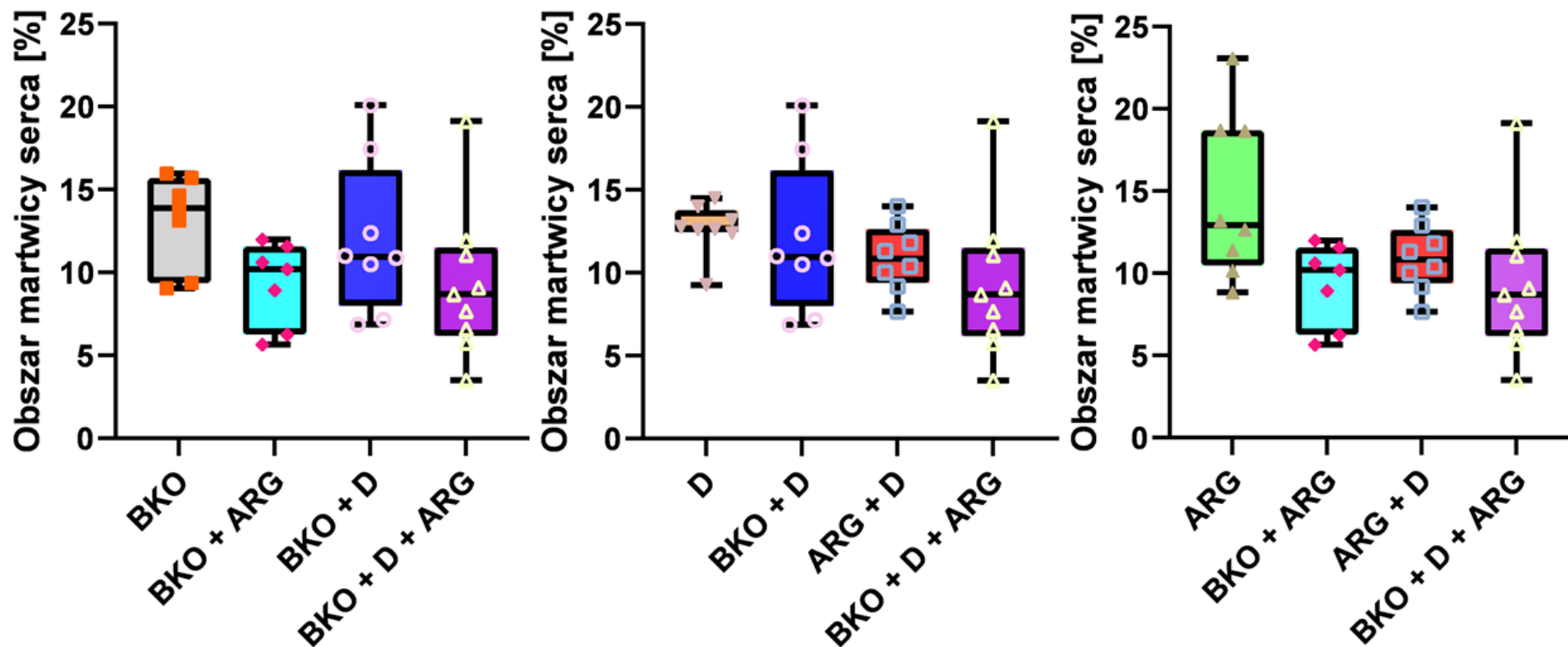
Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; * - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas podawaniu w trakcie reperfuzji diphenyliodonium, $*P < 0,05$.



Ryc. 32. Obszar martwicy serca (w procentach) dla poszczególnych grup.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium. ** - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem K, $**P < 0,01$; * - istotna różnica między procentowym obszarem martwicy serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie reperfuzji ARG + D względem K, $*P < 0,05$.

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w procentowym obszarze martwicy serca między poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 33).



Ryc. 33. Obszar martwicy serca (w procentach) – porównanie między badanymi grupami.

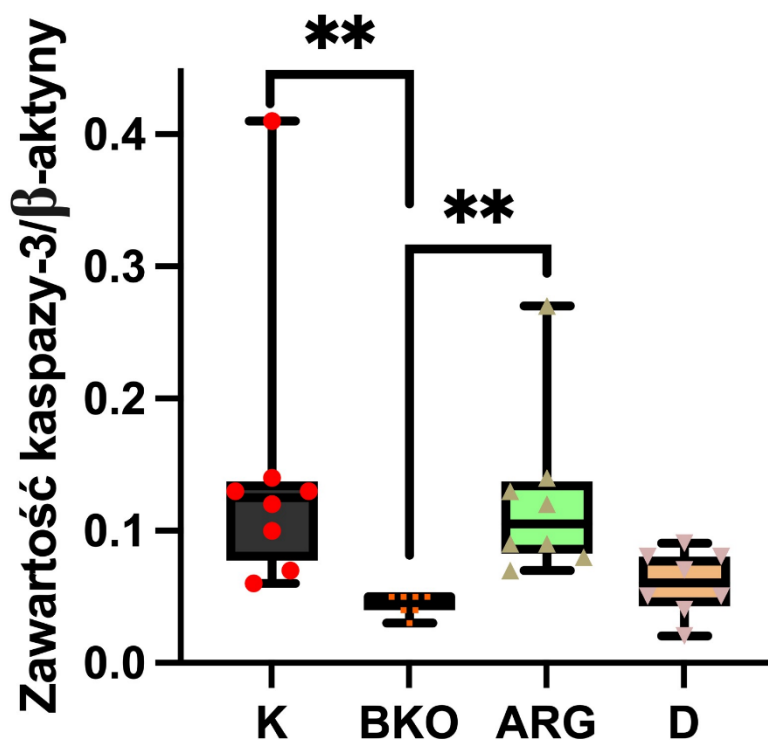
BKO – bufor o kwasowym odczynie; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina;
 BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o
 kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

4.3. Podstawowe parametry biochemiczne

4.3.1. Ocena zawartości kaspazy-3 w koniuszku serca

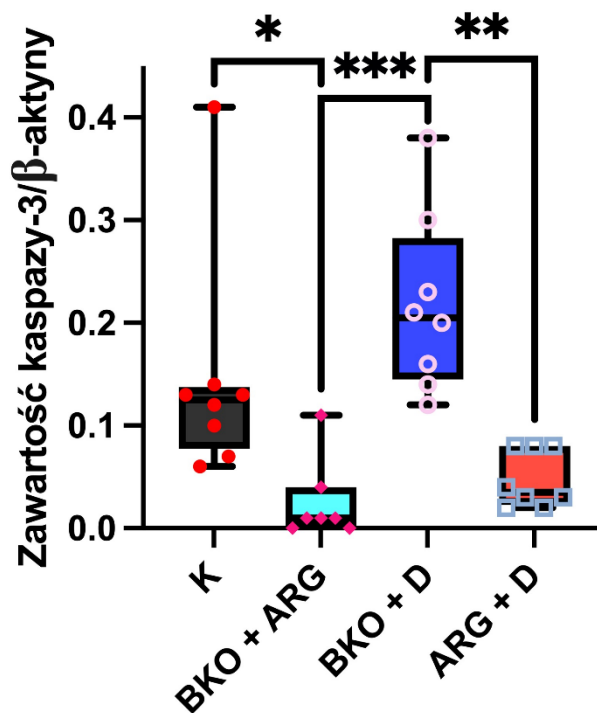
Mediana stosunku zawartości kaspazy-3 względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla poszczególnych grup wynosiła odpowiednio: K (n=8) 0,125, BKO (n=7) 0,05, ARG (n=8) 0,105, D (n=8) 0,06, BKO + ARG (n=7) 0,01, BKO + D (n=8) 0,205, ARG + D (n=8) 0,035, BKO + D + ARG (n=8) 0,105.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że stosunek zawartości kaspazy-3 względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: BKO (n=7) 0,05 vs K (n=8) 0,125 ($p < 0,01$), BKO + ARG (n=7) 0,01 vs K (n=8) 0,125 ($p < 0,05$) (Ryc. 34)(Ryc. 35).



Ryc. 34. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.

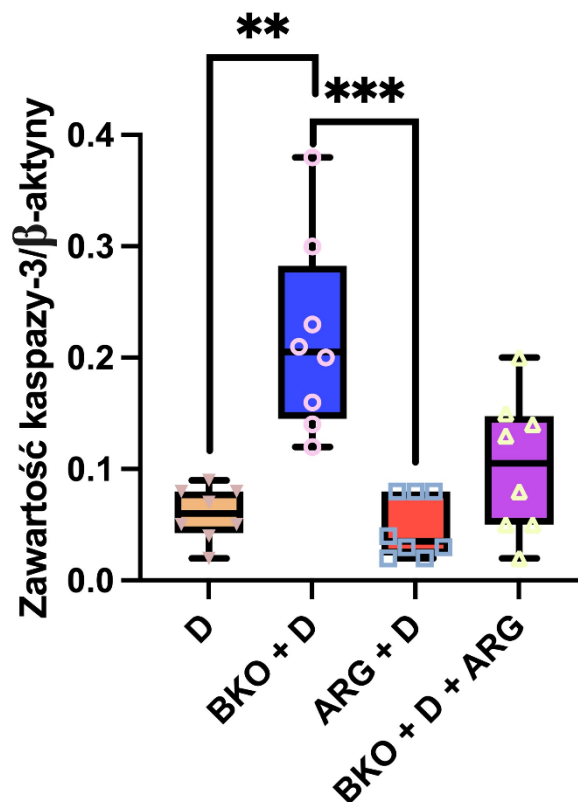
Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L-arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; ** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO względem K lub ARG, $**P<0,01$.



Ryc. 35. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium. *** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem BKO + D, $***P<0,001$; ** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji ARG + D względem BKO + D, $**P<0,01$; * - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem K, $*P<0,05$.

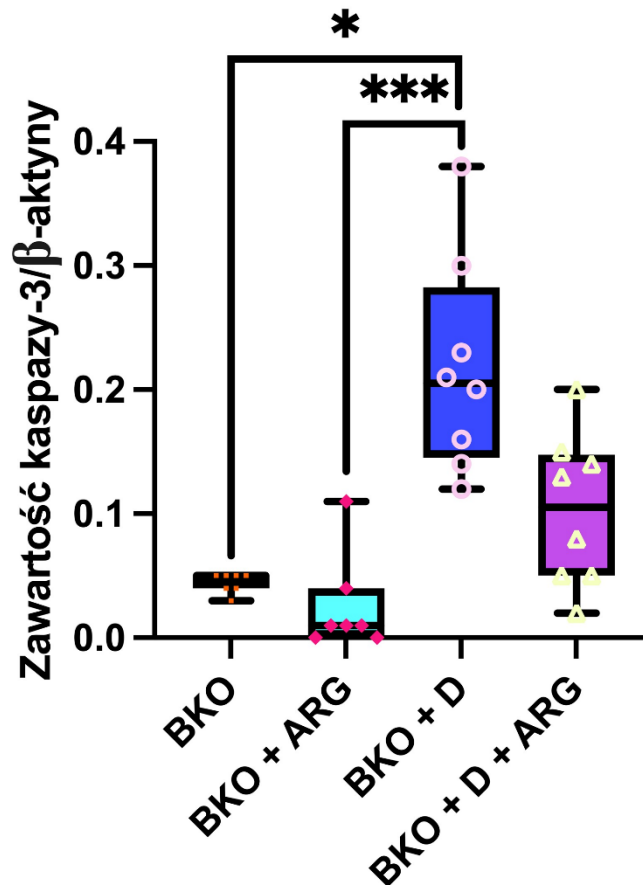
Ponadto wykazano, że stosunek zawartości kaspazy-3 względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w pozostałych. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: BKO + ARG (n=7) 0,01 vs BKO + D (n=8) 0,205 ($p < 0,001$), ARG + D (n=8) 0,035 vs BKO + D (n=8) 0,205 ($p < 0,001$), BKO + ARG (n=7) 0,01 vs ARG (n=8) 0,105 ($p < 0,001$), D (n=8) 0,06 vs BKO + D (n=8) 0,205 ($p < 0,01$), BKO (n=7) 0,05 vs ARG (n=8) 0,105 ($p < 0,01$), BKO (n=7) 0,05 vs BKO + D (n=8) 0,205 ($p < 0,05$), BKO + ARG (n=7) 0,01 vs BKO + D + ARG (n=8) 0,105 ($p < 0,05$) (Ryc. 34)(Ryc. 35)(Ryc. 36)(Ryc. 38).



Ryc. 36. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.

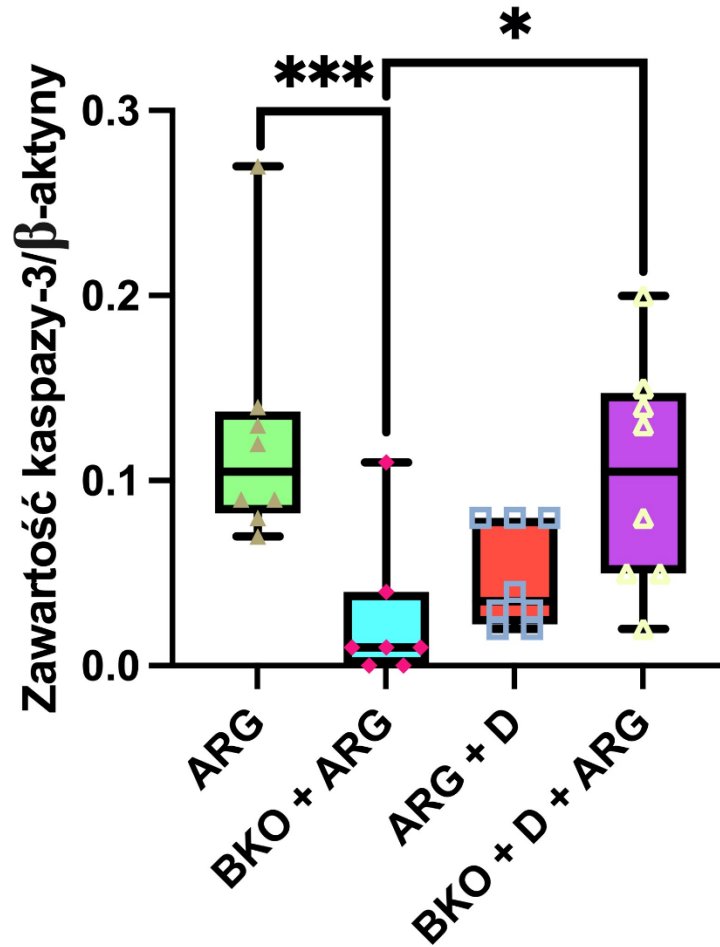
Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. D – diphenyliodonium; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina. *** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji ARG + D względem BKO + D, *** $P < 0,001$; ** -

istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji D względem BKO + D, $**P<0,01$.



Ryc. 37. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina. *** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem BKO + D, $*** P<0,001$; * - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO względem BKO + D, $* P<0,05$.



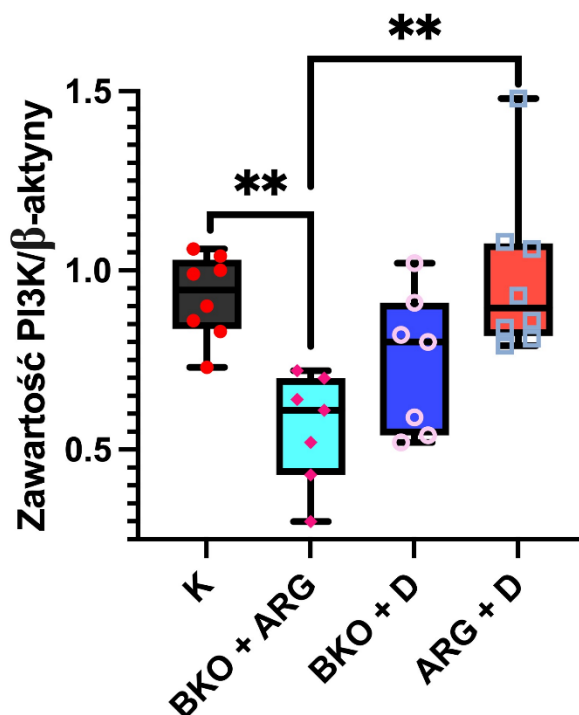
Ryc. 38. Zawartość kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. ARG – L-arginina; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina. *** - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG, *** $P < 0,001$; * - istotna różnica między zawartością kaspazy-3/ β -aktyny w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem BKO + D + ARG, * $P < 0,05$.

4.3.2. Ocena zawartości kinazy 3 - fosfatydoinozytolu w koniuszku serca

Mediana stosunku zawartości PI3K w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla poszczególnych grup wynosił odpowiednio: K (n=8) 0,95, BKO (n=7) 1,17, ARG (n=8) 1,16, D (n=8) 1,0, BKO + ARG (n=7) 0,61, BKO + D (n=7) 0,80, ARG + D (n=8) 0,9, BKO + D + ARG (n=8) 0,72.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że stosunek zawartości PI3K w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla grupy badawczej BKO + ARG (n=7) 0,61 był istotnie niższy niż w K (n=8) 0,95, a różnica osiągnęła moc statystyczną ($p < 0,01$) (Ryc. 39).

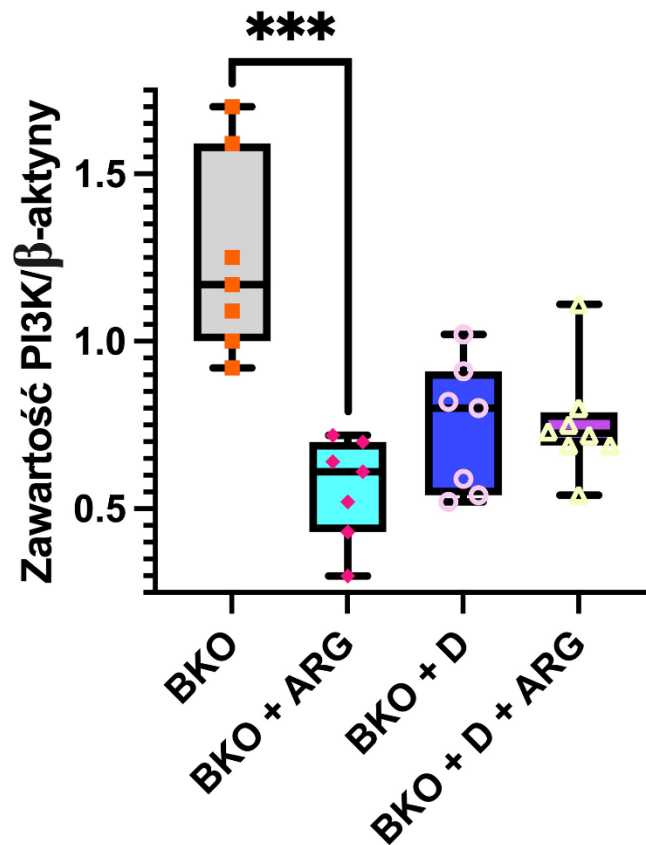


Ryc. 39. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartylowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie +

diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; ** - istotna różnica między zawartością PI3K w koniuszku serca podczas podawania w trakcie reperfuzji BKO + ARG względem K lub ARG + D, ** $P < 0,01$.

Ponadto wykazano, że stosunek zawartości PI3K w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) dla niektórych grup badawczych był istotnie niższy niż w pozostałych. Różnica osiągnęła moc statystyczną wynosząc odpowiednio: BKO (n=7) 1,17 vs BKO + ARG (n=7) 0,61 ($p < 0,001$), BKO + ARG (n=7) 0,61 vs ARG (n=8) 1,16 ($p < 0,001$), BKO + ARG (n=7) 0,61 vs ARG + D (n=8) 0,9 ($p < 0,01$), BKO + D + ARG (n=8) 0,72 vs ARG (n=8) 1,16 ($p < 0,05$) (Ryc. 39)(Ryc. 40)(Ryc. 41).

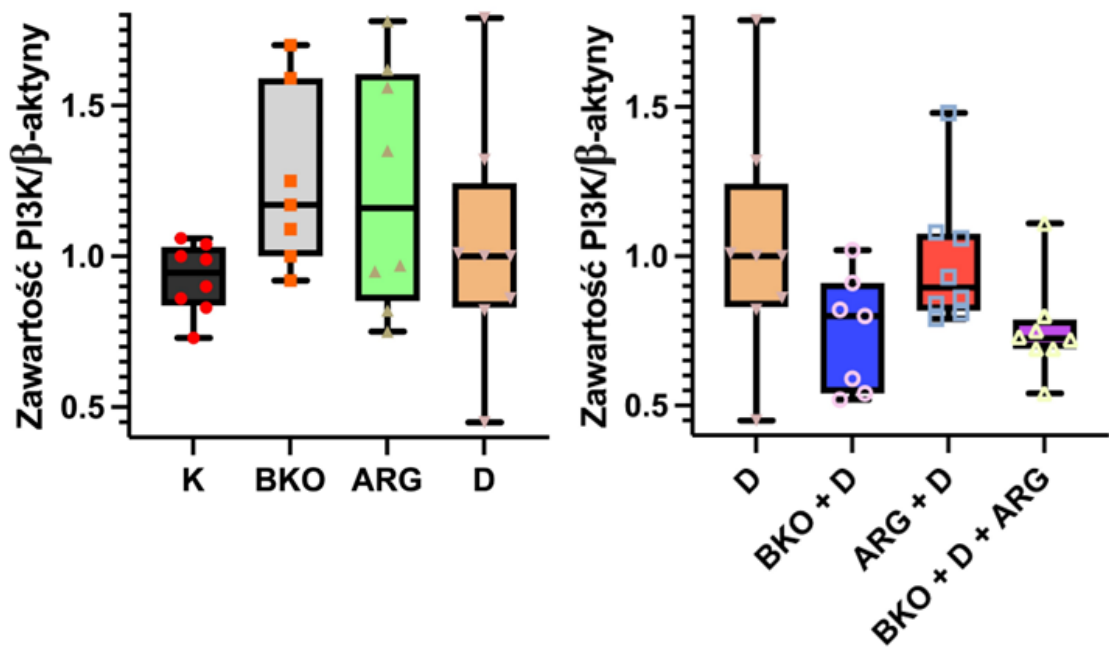


Ryc. 40. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L-arginina; BKO + D - bufor o

jednoczesnego podawania w trakcie BKO + ARG względem ARG + D, ** $P < 0,01$; * - istotna różnica między zawartością PI3K w koniuszku serca podczas jednoczesnego podawania w trakcie BKO + D + ARG względem ARG, * $P < 0,05$.

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stosunku zawartości PI3K w koniuszku serca względem białka referencyjnego (β -aktyny) między poszczególnymi grupami badawczymi (Ryc. 42).



Ryc. 42. Zawartość PI3K/ β -aktyny w koniuszku serca.

Wykres pudełkowy przedstawia medianę (linia pozioma), pudełko obejmuje zakres międzykwartyłowy oraz rozpiętość wąsów od kwartyli do wartości minimalnej i maksymalnej z zaznaczonymi poszczególnymi pomiarami. K – kontrola; BKO – bufor o kwasowym odczynie; ARG – L-arginina; D – diphenyliodonium; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L-arginina.

Tab. 2. Wyniki.

Legenda: K – kontrola; D – diphenyliodonium; ARG – L–arginina; BKO – bufor o kwasowym odczynie; BKO + ARG – bufor o kwasowym odczynie + L–arginina; BKO + D - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium; ARG + D – L-arginina + diphenyliodonium; BKO + D + ARG - bufor o kwasowym odczynie + diphenyliodonium + L–arginina; CS – mediana wartości ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca w czasie stabilizacji; TR – mediana czasu do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca; CR15min/30min/45min - średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca odpowiednio w 15., 30. i 45. minucie reperfuzji; M – mediana obszaru zawału serca ocenionej metodą histopatologiczną; MK – epizody migotania komór; K/β – mediana zawartości kaspazy-3/β-aktyny w koniuszku serca; PI3K/β – mediana zawartości PI3K/β-aktyny w koniuszku serca.

	CS/[mmHg]	TR/[sek.]	CR15min/[mmHg]	CR30min/[mmHg]	CR45min/[mmHg]	MK	M/[%]	K/β	PI3K/β
K	9,0	304	13	14	15	7	19	0,125	0,95
BKO	9,4	270	10	11	11	0	14	0,05	1,17
ARG	8,7	147	3,6	2,2	1,4	0	13	0,105	1,16
D	9,5	219	7,0	4,0	3	0	13	0,06	1,0
BKO + ARG	9,5	253	2,4	1,7	1,3	1	10	0,01	0,61
BKO + D	9,9	186	9,2	8,7	7,2	0	11	0,205	0,8
ARG + D	9,9	158	12	10	10	0	11	0,035	0,9
BKO + D + ARG	9,2	132	5,6	2,7	1,6	0	8,7	0,105	0,72

4. Dyskusja i omówienie wyników

5.1. Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na czas do przywrócenia fizjologicznego rytmu serca oraz na deltę wartości ciśnienia rozkurczowego

Dowieńcowe podanie substancji, które w założeniu mają działać kardioprotekcyjnie, czyli L-argininy, diphenyliodonium, buforu o kwasowym odczynie (BKO) oraz ich kombinacji nie miało istotnego wpływu na skrócenie czasu do powrotu fizjologicznego rytmu serca (Ryc. 25), niemniej jednak niektóre z tych substancji – diphenyliodonium, kombinacja BKO, L-argininy i diphenyliodonium (3 substancje), L-arginina oraz kombinacja L-argininy z BKO (2 substancje) zmniejszały „deltę” wartości ciśnienia rozkurczowego w czasie reperfuzji (w 30. minucie oraz w 45. minucie zależność była istotna statystycznie dla wszystkich wspomnianych wyżej substancji oraz ich kombinacji (Ryc. 26, Ryc. 27, Ryc. 28), natomiast w 15. minucie reperfuzji zależność była istotna statystycznie jedynie dla diphenyliodonium oraz kombinacji BKO, L-argininy i diphenyliodonium) (Ryc. 26). Redukcja parametru „deltę” wartości ciśnienia rozkurczowego pośrednio świadczy o zmniejszeniu zjawiska przykurczu poreperfuzyjnego (omawianego szerzej w rozdziale 1.3.1.), co świadczyłoby o potencjalnie korzystnym wpływie wspomnianych substancji na serce podczas zawału. Powyższy korzystny wpływ można wyjaśnić w ten sposób, że BKO zmniejsza pH wewnątrz komórki, a kwaśny odczyn w cytozolu kardiomiocytów promuje mechanizmy zapobiegające przykurczowi miofibryli [22, 64, 65, 249, 250]. Diphenyliodonium z kolei hamuje produkcję wolnych rodników tlenowych (ROS), które działają niekorzystnie również indukując wzrost aktywności receptora rianodynowego prowadzący do przeładowania kardiomiocytów jonami wapnia podczas reperfuzji, a w konsekwencji – wzmożenia przykurczu poreperfuzyjnego [251]. L-arginina promuje powstawanie tlenku azotu (NO), który zwiększa przepływ krwi przez kardiomiocyty i stabilizuje ich środowisko, ograniczając m.in. obrzęk tkankowy oraz opór w krążeniu wieńcowym [216, 217, 218, 219, 220, 221, 238].

5.2. Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na obszar martwicy serca w modelu Langendorffa

Wykazano, że dowieńcowe podanie diphenyliodonium, kombinacji diphenyliodonium i L-argininy, kombinacji BKO i argininy oraz kombinacji trzech substancji – diphenyliodoniu, BKO i L-argininy zmniejszało obszar martwicy serca w modelu Langendorffa co najmniej o jedną trzecią (Ryc. 30, Ryc. 31, Ryc. 32). Zmniejszenie obszaru martwicy jest w pewnym stopniu konsekwencją zmniejszenia „delty” wartości ciśnienia rozkurczowego, czyli zjawiska przykurczu poreperfuzyjnego, jednak nie jest to jedyne wyjaśnienie. Tlenek azotu (NO), którego donorem jest L-arginina w sposób plejotropowy przyczynia się do ochrony kardiomiocytów – z jednej strony ogranicza opór naczyń wieńcowych oraz obrzęk tkankowy (o czym wyżej wspomniano), z drugiej strony zmniejsza niekorzystne zjawisko no-reflow poprzez hamowanie agregacji płytek krwi, adhezji leukocytów oraz zahamowanie proliferacji mięśni gładkich [252]. Z kolei wolne rodniki tlenowe (których produkcja jest hamowana przez diphenyliodonium) prowadzą do postępującego uszkodzenia mięśnia sercowego w różnych mechanizmach (modyfikacja przepuszczalności błony komórkowej, modyfikacja białek, zwiększenie przeładowania wapniem w cytozolu oraz uruchomienie szlaków śmierci komórki) [22, 39, 253]. Ważną kwestią objaśniającą protekcyjny wpływ różnych substancji (również substancji wykorzystanych w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy) jest ich interferencja z mechanizmami śmierci komórki – przede wszystkim apoptozy oraz nekrozy. W mechanizmie nekrozy istotną rolę odgrywa zjawisko otwarcia mitochondrialnych kanałów mPTP (opisanych we Wstępie, w podrozdziale 1.3.6), a zarówno przeładowanie jonami wapnia oraz wzrost produkcji ROS sprzyjają otwarciu tych kanałów [254]. W mechanizmie apoptozy kluczową rolę odgrywają białka kaspazy, w tym kaspaza 3, badana w niniejszej pracy.

5.3. Wpływ substancji dodanych do buforu Krebsa-Henseleita (oraz ich kombinacji) na poziom białka kaspazy 3 oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu w koniuszku serca

Wykazano, że dodanie BKO oraz kombinacji BKO i L-argininy do roztworu Krebsa-Henseleita spowodowało spadek poziomu białka kaspazy-3 oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu p85 w koniuszku serca (badania wykonano metodą Western blot, wyniki zilustrowano na Ryc. 34, Ryc. 35, Ryc. 36, Ryc. 37, Ryc. 38, Ryc. 39, Ryc. 40, Ryc. 41, Ryc. 42. Zastosowanie dodatkowych substancji (BKO oraz kombinacji buforu o kwaśnym odczynie z L-argininą) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa powoduje zmniejszenie zawartości białka kaspazy-3 (markera apoptozy), natomiast istotną zmianę (zmniejszenie) poziomu podjednostki p85 kinazy 3-fosfatydyloinozytydu (PI3K, będącego czynnikiem protekcyjnym) w koniuszku serca względem kontroli wywołało jedynie podanie kombinacji BKO oraz L-argininy. Kaspaza-3 odpowiada za pobudzenie działania białek prowadzących do rozpadu cytoszkieletu, błony cytoplazmatycznej oraz fragmentację DNA jądra komórkowego, co jest charakterystyczne dla apoptozy [97, 98, 99]. O ile spadek zawartości białka kaspazy-3 nie jest zaskakujący i świadczy o zmniejszeniu procesów apoptotycznych po podaniu wspomnianych substancji działających protekcyjnie, o tyle zmiany w poziomie białka PI3K między różnymi grupami zwierząt są bardziej intrygujące. PI3K wraz z kinazami aktywowanymi mitogenami (*MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase*) jest składową szlaku kinaz ratujących przed uszkodzeniem reperfuzyjnym (*RISK, Reperfusion Injury Salvage Kinase*) jednego z głównych szlaków o działaniu kardioprotekcyjnym w przypadku hartowania przez niedokrwienie (*IPC, Ischemic Preconditioning*) [255, 256, 257]. IPC to krótkie cykle naprzemiennej reperfuzji oraz ponownej okluzji naczyń podczas przywracania ukrwienia uprzednio niedokrwionego narządu [258, 259]. Protekcyjny wpływ takiego postępowania nie tylko na serce, ale też na inne organy został szeroko przebadany i udowodniony, zarówno na modelach zwierzęcych jak i w przypadku organizmu człowieka [260, 261, 262, 263, 264, 265, 266]. Aktywacja PI3K oraz MAPK jest również odpowiedzialna za przeżywalność w innych sytuacjach np. podawania leków o działaniu kardioprotekcyjnym. Pełni rolę uniwersalnego przekaźnika w zakresie zapobiegania IRI w czasie pierwszych kilku minut reperfuzji [51, 260, 267]. Udowodniono, że kwaśne mikrośrodowisko może aktywować szlak sygnałowy PI3K/Akt i znacznie zwiększać fosforylację Akt [268]. Po stymulacji czynnikami takimi jak niedotlenienie i kwaśne

środowisko, podjednostka regulatorowa p85 PI3K zwalnia hamowanie katalitycznej podjednostki p110, a konformacja przestrzenna dimeru PI3K ulega zmianie, co prowadzi do jej aktywacji sprzyjając tym samym powstawaniu 3,4,5 -trifosforanu fosfatydyloinozytolu na błonie PI3K. Białka sygnalizacyjne są następnie rekrutowane do regulowania różnych aktywności wewnątrzkomórkowych, takich jak przeżycie komórek, proliferacja i różnicowanie [269]. Warto w tym momencie zaznaczyć, że poziom podjednostki p85 białka PI3K okazał się być istotnie wyższy w grupie zwierząt, którym do KHB podano BKO albo L-argininę (choć różnica nie była istotna statystycznie). Może to świadczyć o tym, że wspomniane substancje również zwiększają poziom kardioprotekcyjnego szlaku PI3K. Z drugiej strony zastosowanie kombinacji tych substancji powodowało spadek poziomu podjednostki p85 białka PI3K w stosunku do kontroli, zmiana ta była istotna statystycznie. Analogicznie, zastosowanie kombinacji L-argininy z BKO powoduje istotny spadek poziomu p85 PI3K w tkance serca w porównaniu z dodatkiem samego BKO lub samej L-argininy do buforu Krebsa Henseleita (Ryc. 42). Powyższe wyniki mogą świadczyć o antagonistycznym wpływie L-argininy oraz BKO, gdyż tlenek azotu uwalniany z L-argininy, powodując rozszerzenie naczyń krwionośnych i wzrost przepływu niweluje protekcyjne działanie BKO na kardiomiocyt [216, 217, 218, 219, 220, 221, 238]. Mechanizm ten nie tłumaczy jednak, dlaczego zastosowanie kombinacji L-argininy oraz BKO nie tylko niweluje, ale wręcz istotnie obniża poziom PI3K. Kwestia ta wymaga dalszych inwestygacji.

6. Wnioski

1. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz kombinacji buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejszało parametr delty ciśnienia rozkurczowego (świadczący o sile przykurczu reperfuzyjnego) w 15., 30. i 45. minucie reperfuzji. Ponadto zastosowanie dodatku L-argininy oraz kombinacji L-argininy i buforu o kwasowym odczynie w tym modelu istotnie zmniejszało parametr delty ciśnienia rozkurczowego w 30. i 45. minucie reperfuzji.
2. Zastosowanie dodatkowych substancji – diphenyliodonium oraz następujących kombinacji: 3 substancji (buforu o kwasowym odczynie, L-argininy i diphenyliodonium), 2 substancji (L-argininy i diphenyliodonium) oraz innych 2 substancji (buforu o kwasowym odczynie i L-argininy) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa istotnie zmniejsza obszar martwicy serca.
3. Zastosowanie dodatkowych substancji (bufor o kwasowym odczynie oraz kombinacji bufor o kwasowym odczynie z L-argininą) w buforze Krebsa-Henseleita w modelu zawału serca *ex vivo* z wykorzystaniem systemu Langendorffa powoduje zmniejszenie zawartości białka kaspazy-3 (markera apoptozy) oraz kinazy 3-fosfatydyloinozytydu p85 (czynnika protekcyjnego) w koniuszku serca.

7. Podsumowanie i perspektywy

Przeprowadzone badania potwierdziły kardioprotekcyjny wpływ podania w czasie reperfuzji buforu o kwasowym odczynie (pH 6.8), L-argininy oraz diphenyliodonium. Jednoczesne łącznie substancji np. dowieńcowe podanie diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie wiązało się z istotnym statystycznie obniżeniem delty ciśnienia rozkurczowego w lewej komorze serca oraz procentowego obszaru zawału serca względem grupy kontrolnej. Dokładny mechanizm działania tych substancji oraz możliwość wykorzystania tych mechanizmów wymaga dalszych badań.

8. Ograniczenia badania

Podstawowym ograniczeniem przeprowadzonego badania było zastosowanie systemu Langendorffa utrzymującego serce przy życiu w warunkach *in vitro*. W związku ze specyfiką doświadczeń nie było możliwe wykorzystanie zbliżonego do warunków klinicznych modelu zawału serca opartego na podwiązaniu lewej tętnicy zstępującej przedniej *in vivo*. Użycie modelu Langendorffa wiązało się z brakiem wpływu układów współtworzących organizm zwierzęcia w warunkach fizjologicznych na czynność serca, a więc układu autonomicznego, hormonalnego, elementów morfotycznych oraz stanu zapalnego [233, 270]. Tym samym efekt działania niektórych mechanizmów IRI, które w warunkach klinicznych pełnią istotną rolę był ograniczony. Nie było również możliwości, aby obserwować czynność serca przez dłuższy czas po zakończeniu reperfuzji, co uniemożliwiało ocenę długofalowych skutków działania podawanych w eksperymencie substancji – taka obserwacja możliwa jest jedynie w modelach *in vivo* [227, 228].

Niewielka liczba epizodów migotania komór w poszczególnych grupach spowodowała, że nie była możliwa analiza statystyczna uzyskanych wyników.

8. Piśmiennictwo

-
- ¹ Mayo Clinic Staff „Heart attack” <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/heart-attack/symptoms-causes/syc-20373106> MAYO CLINIC, May 2022.
- ² Barzyc A, Łysik W, Słyk J, et al. Reperfusion injury as a target for diminishing infarct size. *Med Hypotheses* 2020; 137: 109558.
- ³ Frank A, Bonney M, Bonney S, Weitzel L, Koeppen M, Eckle T. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012 Sep;16(3):123-32.
- ⁴ Lawton JS, Tamis-Holland JE, Bangalore S, Bates ER, Beckie TM, Bischoff JM, Bittl JA, Cohen MG, DiMaio JM, Don CW, Fremes SE, Gaudino MF, Goldberger ZD, Grant MC, Jaswal JB, Kurlansky PA, Mehran R, Metkus TS Jr, Nnacheta LC, Rao SV, Sellke FW, Sharma G, Yong CM, Zwischenberger BA. 2021 ACC/AHA/SCAI Guideline for Coronary Artery Revascularization: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2022 Jan 18;145(3):e4-e17
- ⁵ Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J. Protection Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Clinical Practice. *Rev Esp Cardiol* 2014;67:394–404
- ⁶ Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012;94(2):168–80
- ⁷ Herzog WR, Vogel RA, Schlossberg ML, Edenbaum LR, Scott HJ, Serebruany VL. Short-term low dose intracoronary diltiazem administered at the onset of reperfusion reduces myocardial infarct size. *Int J Cardiol* 1997;59(1):21–7
- ⁸ Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991;213(2):137
- ⁹ Lee MC, Velayutham M, Komatsu T, Hille R, Zweier JL. Measurement and characterization of superoxide generation from xanthine dehydrogenase: a redox regulated pathway of radical generation in ischemic tissues. *Biochemistry* 2014;53(41):6615–23

-
- ¹⁰ De Pascali F, Hemann C, Samons K, Chen CA, Zweier JL. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry* 2014;53(22):3679–88
- ¹¹ Braunersreuther V, Montecucco F, Asrih M, et al. Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2013;64:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.007>
- ¹² Zweier JL, Rayburn BK, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentration in reperfused myocardium. *J Clin Invest* 1987;80(6):1728–34
- ¹³ Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2005;66(1):123–31
- ¹⁴ Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;16;179(2):798–803
- ¹⁵ Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1775–80
- ¹⁶ Kochanek KD, Murphy S, Xu J, Arias E. Mortality in the United States, 2016. *NCHS Data Brief*. 2017 Dec;(293):1-8. PMID: 29319473.
- ¹⁷ Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Mar 7;135(10):e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485. Epub 2017 Jan 25. Erratum in: *Circulation*. 2017 Mar 7;135(10):e646. Erratum in: *Circulation*. 2017 Sep 5;136(10):e196. PMID: 28122885;
- ¹⁸ OECD iLibrary „Health at a Glance: Europe 2020 : State of Health in the EU Cycle, Main causes of mortality” [https://www.oecd-ilibrary.org/sites/82129230-en/1/3/2/1/4/index.html?itemId=/content/publication/82129230-](https://www.oecd-ilibrary.org/sites/82129230/en/1/3/2/1/4/index.html?itemId=/content/publication/82129230-)

en&_csp_=e7f5d56a7f4dd03271a59acda6e2be1b&itemIGO=occd&itemContentType=book
OECD, 2020.

¹⁹ Eurostat (2020), Causes of death statistics, Statistics Explained, September 2020.

²⁰ NHS „Overview - Heart attack” <https://www.nhs.uk/conditions/heart-attack/>, November 2019

²¹ Mayo Clinic Staff „, Arteriosclerosis / atherosclerosis” <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/arteriosclerosis-atherosclerosis/symptoms-causes/syc-20350569> MAYO CLINIC, July 2022.

²² Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013;123(1):92–100.

²³ Reimer KA, Jennings RB. The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 40: 633-644, 1979.

²⁴ Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56: 786-794, 1977. doi: 10.1161/01.CIR.56.5.786.

²⁵ Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977 Nov;56(5):786-94. doi: 10.1161/01.cir.56.5.786. PMID: 912839.

²⁶ Bennett MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*. 2002 May;87(5):480-7. doi: 10.1136/heart.87.5.480. PMID: 11997428; PMCID: PMC1767116.

²⁷ Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320–3.

²⁸ Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86–107.

²⁹ Avkiran M, Marber MS. Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Mar 6;39(5):747-53. doi: 10.1016/s0735-1097(02)01693-5. PMID: 11869836.

³⁰ Allen DG , Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 60: 153–168, 1987.

³¹ Marban E , Koretsune Y , Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca²⁺ homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann NY Acad Sci* 723: 38–50, 1994.

-
- ³² Pike MM , Luo CS , Clark MD , Kirk KA , Kitakaze M , Madden MC , Cragoe EJ , Pohost GM. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in the ischemic rat heart: role of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265: H2017–H2026, 1993.
- ³³ Marban E , Kitakaze M , Kusuoka H , Porterfield JP , Yue DT , Chacko VP. Intracellular free calcium concentration measured with ¹⁹F NMR spectroscopy in intact ferret hearts containing the Ca²⁺-indicator 5,5'-F2-BAPTA. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6005–6009, 1987.
- ³⁴ Inserte J , Barba I , Poncelas-Nozal M , Hernando V , Agulló L , Ruiz-Meana M , Garcia-Dorado D. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50: 903–909, 2011.
- ³⁵ Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1723-41. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2011. Epub 2011 Aug 19. PMID: 21856909.
- ³⁶ Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497–518.
- ³⁷ Kukreja RC, Janin Y. Reperfusion injury: basic concepts and protection strategies. *J Thromb Thrombolysis* 1997;4:7–24.
- ³⁸ Georg M. Fröhlich, Pascal Meier, Steven K. White, Derek M. Yellon, Derek J. Hausenloy, Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI, *European Heart Journal*, Volume 34, Issue 23, 14 June 2013, Pages 1714–1722, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh090>
- ³⁹ Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*. 1998 May 12;97(18):1848-67. doi: 10.1161/01.cir.97.18.1848. PMID: 9603540.
- ⁴⁰ Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66:1146–1149.
- ⁴¹ Bolli R. Mechanism of myocardial ‘stunning.’ *Circulation*. 1990;82: 723–738.
- ⁴² Bolli R. Oxyradicals in the pathogenesis of myocardial stunning. In: Heyndrickx GR, Vatner SF, Wijns W, eds. *Stunning, Hibernation, and Preconditioning: Clinical Pathophysiology of Myocardial Ischemia*. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Press; 1997:205–228.
- ⁴³ Kusuoka H, Marban E. Cellular mechanism of myocardial stunning. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:243–256.

-
- ⁴⁴ Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusoka H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1989;80(suppl IV):IV-17–IV-22.
- ⁴⁵ Touchstone DA, Beller GA, Nygaard TW, Tedesco C, Karl S. Effects of successful intravenous reperfusion therapy on regional myocardial function and geometry in humans: a tomographic assessment using two-dimension echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13:1506–1513.
- ⁴⁶ Stack RS, Phillips HR, Grierson D, Behar VS, Kong Y, Peter RH, Swain JL, Greenfield JC. Functional improvement of jeopardized myocardium Kloner et al May 12, 1998 1863 following intracoronary streptokinase infusion in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1983;72:84–95.
- ⁴⁷ Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, Bolson EI, Uebis R, Von Essen R, Effert S, Dodge HT. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: an important determinant of survival. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:289–300.
- ⁴⁸ Reduto LA, Freund GC, Gaeta JM, Smalling RW, Lewis B, Gould KL. Coronary artery reperfusion in acute myocardial infarction: beneficial effects of intracoronary streptokinase on left ventricular salvage and performance. *Am Heart J*. 1981;102:1168–1177.
- ⁴⁹ Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*. 1985; 76(5):1713–1719.
- ⁵⁰ Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1998; 38(2):291–300.
- ⁵¹ Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121–1135.
- ⁵² Cooley DA, Reul GJ Jr, Wukasch DC. Ischemic myocardial contracture ("stone heart"). A complication of cardiac surgery. *Isr J Med Sci*. 1975 Feb-Mar;11(2-3):203-10. PMID: 1112706.
- ⁵³ Hutchins GM, Silverman KJ. Pathology of the stone heart syndrome. Massive myocardial contraction band necrosis and widely patent coronary arteries. *Am J Pathol* 1979;95:745-52.
- ⁵⁴ Opie JC, Taylor G, Ashmore PG, et al. "Stone heart" in a neonate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;81:459-63.
- ⁵⁵ Reul GJ Jr, Wukasch DC, Romagnoli A, et al. Ischemic myocardial contraction ("stone heart"): prevention by induced hypothermia and propranolol. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1973;Spec No:740-4.

-
- ⁵⁶ Altschuld RA, Wenger WC, Lamka KG, et al. Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin. *J Biol Chem* 1985;260:14325–34.
- ⁵⁷ Nichols CG, Lederer WJ. The role of ATP in energy deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:183–94.
- ⁵⁸ Schluter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcí'a-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by NO donors. *Am J Physiol* 1996; 271:H428–34.
- ⁵⁹ Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S644-8. doi: 10.1016/s0003-4975(02)04686-6. PMID: 12607706.
- ⁶⁰ Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1983 Feb;15(2):67-73. doi: 10.1016/0022-2828(83)90283-3. PMID: 6854659.
- ⁶¹ Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol*. 1972 Jun;67(3):417-40. PMID: 5033257; PMCID: PMC2032743.
- ⁶² Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997 Dec 16;96(12):4372-9. doi: 10.1161/01.cir.96.12.4372. PMID: 9416906.
- ⁶³ Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*. 2001 Aug 1;51(2):241-50. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00282-6. PMID: 11470463.
- ⁶⁴ Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS*. 1996;76:99-114
- ⁶⁵ Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*. 2015 Apr;172(8):2074-84. doi: 10.1111/bph.13013. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25393318; PMCID: PMC4386982.
- ⁶⁶ Basso C, Thiene G. The pathophysiology of myocardial reperfusion: a pathologist's perspective. *Heart*. 2006 Nov;92(11):1559-62. doi: 10.1136/hrt.2005.086959. Epub 2006 Mar 17. PMID: 16547203; PMCID: PMC1861239.
- ⁶⁷ Baroldi G. Different types of myocardial necrosis in coronary heart disease: a pathophysiologic review of their functional significance. *Am Heart J* 197589742–752.
- ⁶⁸ Buja L M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 200514170–175.
- ⁶⁹ Corrado D, Basso C, Poletti A. et al Sudden death in the young. Is acute coronary thrombosis the major precipitating factor? *Circulation* 1994902315–2323.

-
- ⁷⁰ García-Dorado D, Thérooux P, Desco M, Solares J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, Alonso J, Soriano J. Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am J Physiol.* 1989 May;256(5 Pt 2):H1266-73. doi: 10.1152/ajpheart.1989.256.5.H1266. PMID: 2719127.
- ⁷¹ Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* 1979 Jun;40(6):633-44. PMID: 449273.
- ⁷² Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA, Soler-Soler J. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation.* 1997 Nov 18;96(10):3579-86. doi: 10.1161/01.cir.96.10.3579. PMID: 9396458.
- ⁷³ García-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):386-401. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.039. PMID: 14962471.
- ⁷⁴ Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res.* 1999 Aug 6;85(3):280-7. doi: 10.1161/01.res.85.3.280. PMID: 10436171.
- ⁷⁵ Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179(2):798–803
- ⁷⁶ Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Jul;195(2):460-7. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2. PMID: 38751.
- ⁷⁷ Ohashi T, Yamamoto F, Yamamoto H, Ichikawa H, Shibata T, Kawashima Y. Transient reperfusion with acidic solution affects postischemic functional recovery: studies in the isolated working rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Mar;111(3):613-20. doi: 10.1016/s0022-5223(96)70313-6. PMID: 8601976.
- ⁷⁸ Duan X, Ji B, Yu K, Hei F, Liu J, Long C. Acidic buffer or plus cyclosporine A post-conditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Perfusion.* 2011 May;26(3):245-52. doi: 10.1177/0267659110398733. PMID: 21490080.
- ⁷⁹ Kawasumi H, Satoh N, Kitada Y. Caldaret, an intracellular Ca²⁺ handling modulator, limits infarct size of reperfused canine heart. *J Pharmacol Sci.* 2007 Feb;103(2):222-33. doi: 10.1254/jphs.fp0060765. Epub 2007 Feb 14. PMID: 17299242.
- ⁸⁰ Bär FW, Tzivoni D, Dirksen MT, Fernández-Ortiz A, Heyndrickx GR, Brachmann J, Reiber JH, Avasthy N, Tatsuno J, Davies M, Hibberd MG, Krucoff MW; CASTEMI Study Group.

Results of the first clinical study of adjunctive CALdaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study. *Eur Heart J*. 2006 Nov;27(21):2516-23. doi: 10.1093/eurheartj/ehl304. Epub 2006 Oct 9. PMID: 17030521.

⁸¹ Jang IK, Weissman NJ, Picard MH, Zile MR, Pettigrew V, Shen S, Tatsuno J, Hibberd MG, Tzivoni D, Wackers FJ; EVOLVE Investigators. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of intravenous MCC-135 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction: Evaluation of MCC-135 for left ventricular salvage in acute myocardial infarction (EVOLVE). *Am Heart J*. 2008 Jan;155(1):113.e1-8. doi: 10.1016/j.ahj.2007.08.020. Epub 2007 Nov 1. PMID: 18082500.

⁸² Coetzee A, Conradie S. Calcium antagonist verapamil and reperfusion injury of the heart. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2007 Jun;21(3):337-43. doi: 10.1053/j.jvca.2006.11.019. Epub 2007 Mar 2. PMID: 17544883.

⁸³ Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit JF, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque JN, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice MC, Ider O, Dubois-Randé JL, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015 Sep 10;373(11):1021-31. doi: 10.1056/NEJMoa1505489. Epub 2015 Aug 30. PMID: 26321103.

⁸⁴ Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):79-94. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00122-4. PMID: 9714750.

⁸⁵ Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):372-85. doi: 10.1016/S0008-6363(03)00533-9. PMID: 14962470.

⁸⁶ Morciano G, Bonora M, Campo G, Aquila G, Rizzo P, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*. 2017;982:169-189. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_9. PMID: 28551787.

⁸⁷ Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*. 1987 Aug 1;245(3):915-8. PMID: 28551787.

doi: 10.1042/bj2450915. Erratum in: *Biochem J* 1987 Sep 15;246(3):following 806. PMID: 3117053; PMCID: PMC1148218.

⁸⁸ Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 (Pt 1)(Pt 1):93-8. doi: 10.1042/bj3070093. PMID: 7717999; PMCID: PMC1136749.

⁸⁹ Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999 Jul 15;341 (Pt 2)(Pt 2):233-49. PMID: 10393078; PMCID: PMC1220352.

⁹⁰ Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp*. 1999;66:181-203. doi: 10.1042/bss0660181. PMID: 10989667.

⁹¹ Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 2002 Feb-Mar;84(2-3):153-66. doi: 10.1016/s0300-9084(02)01375-5. PMID: 12022946.

⁹² Murphy E, Steenbergen C. What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive? *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jul;1813(7):1302-8. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.09.003. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20837069; PMCID: PMC3398608.

⁹³ Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Apr;35(4):339-41. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00043-9. PMID: 12689812.

⁹⁴ Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2010 Mar;105(2):151-4. doi: 10.1007/s00395-009-0080-9. PMID: 20066536.

⁹⁵ Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res*. 1994 May;28(5):581-97. doi: 10.1093/cvr/28.5.581. PMID: 8025901.

⁹⁶ Hirsch T, Marzo I, Kroemer G. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep*. 1997 Feb;17(1):67-76. doi: 10.1023/a:1027339418683. PMID: 9171922.

⁹⁷ Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig Med Doś* 2006;60:439-46.

⁹⁸ Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2(1):63-7. doi: 10.1038/35048069. PMID: 11413467.

⁹⁹ Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Oct;108(4 Suppl):S99-103. doi: 10.1067/mai.2001.117819. PMID: 11586274.

-
- ¹⁰⁰ Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996 Nov;79(5):949-56. doi: 10.1161/01.res.79.5.949. PMID: 8888687.
- ¹⁰¹ Anversa, P., Cheng, W., Liu, Y. et al. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93 (Suppl 3), s008–s012 (1998). <https://doi.org/10.1007/s003950050195>
- ¹⁰² Dumont EA, Hofstra L, van Heerde WL, van den Eijnde S, Doevendans PA, DeMuinck E, Daemen MA, Smits JF, Frederik P, Wellens HJ, Daemen MJ, Reutelingsperger CP. Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation.* 2000 Sep 26;102(13):1564-8. doi: 10.1161/01.cir.102.13.1564. PMID: 11004148.
- ¹⁰³ Dumont EA, Reutelingsperger CP, Smits JF, Daemen MJ, Doevendans PA, Wellens HJ, Hofstra L. Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1352-5. doi: 10.1038/nm1201-1352. Erratum in: *Nat Med* 2002 Jan;8(1):87. PMID: 11726977.
- ¹⁰⁴ Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994 Oct;94(4):1621-8. doi: 10.1172/JCI117504. PMID: 7929838; PMCID: PMC295322.
- ¹⁰⁵ Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2009 Mar;104(2):181-8. doi: 10.1007/s00395-009-0004-8. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19242640; PMCID: PMC2671061.
- ¹⁰⁶ Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jun;46(6):821-31. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021. Epub 2009 Mar 3. PMID: 19265700.
- ¹⁰⁷ Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):34793-9. doi: 10.1074/jbc.M202191200. Epub 2002 Jul 2. PMID: 12095984.
- ¹⁰⁸ Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabò R, Giorgio M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol.* 2009 Mar;104(2):131-9. doi: 10.1007/s00395-009-0008-4. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19242637.
- ¹⁰⁹ Muramatsu Y, Furuichi Y, Tojo N, Moriguchi A, Maemoto T, Nakada H, Hino M, Matsuoka N. Neuroprotective efficacy of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, in in vitro mitochondrial damage and in vivo transient cerebral ischemia models. *Brain Res.* 2007 May 29;1149:181-90. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.036. Epub 2007 Feb 24. PMID: 17391653.

-
- ¹¹⁰ Saxton NE, Barclay JL, Clouston AD, Fawcett J. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *J Hepatol.* 2002 Feb;36(2):241-7. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00248-3. PMID: 11830336.
- ¹¹¹ Saxton NE, Barclay JL, Clouston AD, Fawcett J. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *J Hepatol.* 2002 Feb;36(2):241-7. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00248-3. PMID: 11830336.
- ¹¹² Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005 Mar 31;434(7033):658-62. doi: 10.1038/nature03434. PMID: 15800627.
- ¹¹³ Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Sep;297(3):F749-59. doi: 10.1152/ajprenal.00239.2009. Epub 2009 Jun 24. PMID: 19553348.
- ¹¹⁴ Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):12005-10. doi: 10.1073/pnas.0505294102. Epub 2005 Aug 15. PMID: 16103352; PMCID: PMC1189333.
- ¹¹⁵ Ghaffari S, Kazemi B, Toluey M, Sepehrvand N. The effect of prethrombolytic cyclosporine-A injection on clinical outcome of acute anterior ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Ther* 2013;31(4):e34–9
- ¹¹⁶ Atar D, Arheden H, Berdeaux A, et al. Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur Heart J* 2015;36(2):11
- ¹¹⁷ Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol.* 1973 Aug;5(4):395-407. doi: 10.1016/0022-2828(73)90030-8. PMID: 4355339.
- ¹¹⁸ Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Mar;84(5):1404-7. doi: 10.1073/pnas.84.5.1404. PMID: 3029779; PMCID: PMC304438.
- ¹¹⁹ Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem.* 1988 Jan 25;263(3):1353-7. PMID: 2826476.

-
- ¹²⁰ Morgan, M., Liu, Zg. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 21, 103–115 (2011). <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- ¹²¹ Kim YH, Lim DS, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med*. 2003 Oct 31;35(5):336-49. doi: 10.1038/emm.2003.45. PMID: 14646586.
- ¹²² Xue J, Thippogowda PB, Hu G, Bachmaier K, Christman JW, Malik AB, Tirupathi C. NF-kappaB regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in cooperation with NFAT by binding to the intronic NF-kappaB site in the ICAM-1 gene. *Physiol Genomics*. 2009 Jun 10;38(1):42-53. doi: 10.1152/physiolgenomics.00012.2009. Epub 2009 Apr 7. PMID: 19351910; PMCID: PMC2696150.
- ¹²³ Sun B, Fan H, Honda T, Fujimaki R, Lafond-Walker A, Masui Y, Lowenstein CJ, Becker LC. Activation of NF kappa B and expression of ICAM-1 in ischemic-reperfused canine myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Jan;33(1):109-19. doi: 10.1006/jmcc.2000.1280. PMID: 11133227.
- ¹²⁴ Liakopoulos OJ, Schmitto JD, Kazmaier S, Bräuer A, Quintel M, Schoendube FA, Dörge H. Cardiopulmonary and systemic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 2007;84:110–8; discussion 118-9.
- ¹²⁵ Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):356-67. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68074-4. PMID: 16443044.
- ¹²⁶ Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:13–23.
- ¹²⁷ Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):323-33. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00302-6. PMID: 11035261.
- ¹²⁸ Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015 Dec;6:524-551. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26484802; PMCID: PMC4625011.
- ¹²⁹ Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenius O, Francis J. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res*. 2010 Feb 1;85(3):473-83. doi: 10.1093/cvr/cvp305. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19729361; PMCID: PMC2860708.
- ¹³⁰ Lingappan K. NF- κ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol*. 2018 Feb;7:81-86. doi: 10.1016/j.cotox.2017.11.002. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29862377; PMCID: PMC5978768.

-
- ¹³¹ Donoso P, Sanchez G, Bull R, Hidalgo C. Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jan 1;16(2):553-67. doi: 10.2741/3705. PMID: 21196188.
- ¹³² Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science*. 2011 Sep 9;333(6048):1440-5. doi: 10.1126/science.1202768. PMID: 21903813.
- ¹³³ González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World J Cardiol*. 2018 Sep 26;10(9):74-86. doi: 10.4330/wjc.v10.i9.74. PMID: 30344955; PMCID: PMC6189069.
- ¹³⁴ Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*. 1984 Mar;54(3):277-85. doi: 10.1161/01.res.54.3.277. PMID: 6697450.
- ¹³⁵ Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM. Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1982 Jun;83(6):830-9. PMID: 7087509.
- ¹³⁶ Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT. Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation*. 1987 Jan;75(1):282-91. doi: 10.1161/01.cir.75.1.282. PMID: 3791610.
- ¹³⁷ Galang N, Sasaki H, Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. *Toxicology*. 2000 Aug 7;148(2-3):111-8. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00201-8. PMID: 10962129.
- ¹³⁸ Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4556-60. doi: 10.1073/pnas.95.8.4556. PMID: 9539776; PMCID: PMC22528.
- ¹³⁹ Polidoro L, Properzi G, Marampon F, Gravina GL, Festuccia C, Di Cesare E, Scarsella L, Ciccarelli C, Zani BM, Ferri C. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk-Sirt1 axis activation. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013 Apr;6(2):221-31. doi: 10.1007/s12265-012-9436-x. Epub 2012 Dec 18. PMID: 23247634.
- ¹⁴⁰ Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501. doi: 10.1161/01.res.86.5.494. PMID: 10720409.

-
- ¹⁴¹ Paysant JR, Rupin A, Verbeuren TJ. Effect of NADPH oxidase inhibition on E-selectin expression induced by concomitant anoxia/reoxygenation and TNF- α . *Endothelium* 2002;9:263–71
- ¹⁴² Donoso P, Finkelstein JP, Montecinos L, et al. Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 2014;68:38–46
- ¹⁴³ Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 2010;8(9)
- ¹⁴⁴ McCann SK, Dusting GJ, Roulston CL. Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *J Neurosci Res* 2008;86(11):2524–34
- ¹⁴⁵ Vallet P, Charnay Y, Steger K, et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 2005;132(2):233–8
- ¹⁴⁶ Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, George BS, Kereiakes DJ, Deitchman D, Gustafson N, et al. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1994 May;89(5):1982-91. doi: 10.1161/01.cir.89.5.1982. PMID: 8181121.
- ¹⁴⁷ Smolka G, Gołba KS, Malinowski M, Deja M, Biernat J, Reszka B, Dalecka AM, Woś S. Nowe oblicze modyfikowanej reperfuzji: postconditioning [New face of modified reperfusion: postconditioning]. *Kardiol Pol*. 2005 Oct;63(4 Suppl 2):S450-6. Polish. PMID: 20527400.
- ¹⁴⁸ Henriques JP, Zijlstra F, Ottervanger JP, de Boer MJ, van 't Hof AW, Hoorntje JC, Suryapranata H. Incidence and clinical significance of distal embolization during primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2002 Jul;23(14):1112-7. doi: 10.1053/euhj.2001.3035. PMID: 12090749.
- ¹⁴⁹ Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974 Dec;54(6):1496-508. doi: 10.1172/JCI107898. PMID: 4140198; PMCID: PMC301706.
- ¹⁵⁰ Piana RN, Paik GY, Moscucci M, Cohen DJ, Gibson CM, Kugelmass AD, Carrozza JP Jr, Kuntz RE, Baim DS. Incidence and treatment of 'no-reflow' after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 1994 Jun;89(6):2514-8. doi: 10.1161/01.cir.89.6.2514. PMID: 8205658.

-
- ¹⁵¹ Boyle EM Jr, Canty TG Jr, Morgan EN, Yun W, Pohlman TH, Verrier ED. Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. *Ann Thorac Surg.* 1999 Nov;68(5):1949-53. doi: 10.1016/s0003-4975(99)01033-4. PMID: 10585109.
- ¹⁵² Ito H, Maruyama A, Iwakura K, Takiuchi S, Masuyama T, Hori M, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Clinical implications of the 'no reflow' phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction. *Circulation.* 1996 Jan 15;93(2):223-8. doi: 10.1161/01.cir.93.2.223. PMID: 8548892.
- ¹⁵³ Wu KC, Zerhouni EA, Judd RM, Lugo-Olivieri CH, Barouch LA, Schulman SP, Blumenthal RS, Lima JA. Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 1998 Mar 3;97(8):765-72. doi: 10.1161/01.cir.97.8.765. PMID: 9498540.
- ¹⁵⁴ Hombach V, Grebe O, Merkle N, Waldenmaier S, Höher M, Kochs M, Wöhrle J, Kestler HA. Sequelae of acute myocardial infarction regarding cardiac structure and function and their prognostic significance as assessed by magnetic resonance imaging. *Eur Heart J.* 2005 Mar;26(6):549-57. doi: 10.1093/eurheartj/ehi147. Epub 2005 Feb 15. PMID: 15713695.
- ¹⁵⁵ Hashimoto K, Pearson PJ, Schaff HV, Cartier R. Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion: a possible mechanism of myocardial injury during reflow. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991 Nov;102(5):688-94. PMID: 1943187.
- ¹⁵⁶ Qi XL, Nguyen TL, Andries L, Sys SU, Rouleau JL. Vascular endothelial dysfunction contributes to myocardial depression in ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998 Jan;76(1):35-45. PMID: 9564547.
- ¹⁵⁷ Jorge PA, Osaki MR, de Almeida E, Dalva M, Credidio Neto L. Endothelium-dependent coronary flow in ischemia reperfusion. *Exp Toxicol Pathol.* 1997 Feb;49(1-2):147-51. doi: 10.1016/S0940-2993(97)80088-7. PMID: 9085090.
- ¹⁵⁸ Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Das DK. Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Oct;110(4 Pt 1):1047-53. doi: 10.1016/s0022-5223(05)80173-4. PMID: 7475133.
- ¹⁵⁹ Dong YY, Wu M, Yim AP, He GW. Hypoxia-reoxygenation, St. Thomas cardioplegic solution, and nicorandil on endothelium-derived hyperpolarizing factor in coronary microarteries. *Ann Thorac Surg.* 2005 Nov;80(5):1803-11. doi: 10.1016/j.athoracsur.2005.04.047. PMID: 16242459.

-
- ¹⁶⁰ Dong YY, Wu M, Yim AP, He GW. Effect of hypoxia-reoxygenation on endothelial function in porcine cardiac microveins. *Ann Thorac Surg*. 2006 May;81(5):1708-14. doi: 10.1016/j.athoracsur.2005.12.002. PMID: 16631660.
- ¹⁶¹ Förstermann U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung*. 1994 Mar;44(3A):402-7. PMID: 7514413.
- ¹⁶² Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*. 2004 Sep;23(3):265-95. PMID: 15638116.
- ¹⁶³ Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22546-54. doi: 10.1074/jbc.M302227200. Epub 2003 Apr 10. PMID: 12692136.
- ¹⁶⁴ Griendling KK. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(2):272-3.
- ¹⁶⁵ Tratsiakovich Y, Gonon AT, Krook A, Yang J, Shemyakin A, Sjöquist PO, Pernow J. Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jul 15;712(1-3):16-21. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.044. Epub 2013 May 9. PMID: 23665492.
- ¹⁶⁶ Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J*. 2003 Dec;17(15):2328-30. doi: 10.1096/fj.03-0115fje. Epub 2003 Oct 16. PMID: 14563685.
- ¹⁶⁷ Chan EC, Woodman OL. Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 1999 Feb;126(4):925-32. doi: 10.1038/sj.bjp.0702376. PMID: 10193772; PMCID: PMC1571206.
- ¹⁶⁸ Marrelli SP, Childres WF, Goddard-Finegold J, Bryan RM. Potentiated EDHF-mediated dilations in the rat middle cerebral artery following ischemia/reperfusion. In: Vanhoutte PM, editor. *EDHF 2000*. London, England: Taylor & Francis; 2001.
- ¹⁶⁹ Ziberna L, Lunder M, Kuzner J, Drevensek G. Normothermic and hypothermic models for studying the deleterious effects of hypoxia-reoxygenation on EDHF-mediated relaxation in isolated porcine coronary arteries. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009 Jan-Feb;59(1):1-6. doi: 10.1016/j.vascn.2008.09.003. Epub 2008 Sep 21. PMID: 18835583.

-
- ¹⁷⁰ Ren Z, Yang Q, Floten HS, Furnary AP, Yim AP, He GW. ATP-sensitive potassium channel openers may mimic the effects of hypoxic preconditioning on the coronary artery. *Ann Thorac Surg*. 2001 Feb;71(2):642-7. doi: 10.1016/s0003-4975(00)02392-4. PMID: 11235721.
- ¹⁷¹ Dobrzycki S, Nowak K, Kożuch M, Bachórzewska-Gajewska H, Poniowski B, Żuk J. Angiogram of the monthNo-reflow phenomenon occurring during elective angioplasty performed due to in-stent restenosis – a case report. *Polish Heart Journal* 2006;64:437–40.
- ¹⁷² Kawata H, Aoki M, Hickey PR, Mayer JE Jr. Effect of antibody to leukocyte adhesion molecule CD18 on recovery of neonatal lamb hearts after 2 hours of cold ischemia. *Circulation*. 1992 Nov;86(5 Suppl):II364-70. PMID: 1358476.
- ¹⁷³ Kunichika H, Ben-Yehuda O, Lafitte S, Kunichika N, Peters B, DeMaria AN. Effects of glycoprotein Iib/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion. A quantitative myocardial contrast echocardiography study. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(2):276–83.
- ¹⁷⁴ de Lemos JA, Antman EM, Gibson CM, McCabe CH, Giugliano RP, Murphy SA, Coulter SA, Anderson K, Scherer J, Frey MJ, Van Der Wieken R, Van De Werf F, Braunwald E. Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction. Observations from the TIMI 14 trial. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):239-43. doi: 10.1161/01.cir.101.3.239. PMID: 10645918.
- ¹⁷⁵ Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of Pselectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91(6):2620–9.
- ¹⁷⁶ Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res*. 1999 Mar 5;84(4):392-400. doi: 10.1161/01.res.84.4.392. PMID: 10066673.
- ¹⁷⁷ Sellke FW, Shafique T, Ely DL, Weintraub RM. Coronary endothelial injury after cardiopulmonary bypass and ischemic cardioplegia is mediated by oxygen-derived free radicals. *Circulation*. 1993 Nov;88(5 Pt 2):II395-400. PMID: 8222185.
- ¹⁷⁸ Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*. 1992 Jul;86(1):279-88. doi: 10.1161/01.cir.86.1.279. PMID: 1319855.
- ¹⁷⁹ Lang J, Li W, Meng Z, Liu Y, Patel R: The protective effect of nitrite on liver ischemia reperfusion injury during transplantation; 2009.

-
- ¹⁸⁰ Yang Q, Zhang RZ, Yim AP, He GW. Effect of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid as an additive to St. Thomas' cardioplegia and University of Wisconsin solutions on endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function in coronary microarteries: influence of temperature and time. *Ann Thorac Surg.* 2003 Nov;76(5):1623-30. doi: 10.1016/s0003-4975(03)00735-5. PMID: 14602298.
- ¹⁸¹ Zou W, Yang Q, Yim AP, He GW. Epoxyeicosatrienoic acids (EET(11,12)) may partially restore endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function in coronary microarteries. *Ann Thorac Surg.* 2001 Dec;72(6):1970-6. doi: 10.1016/s0003-4975(01)03095-8. PMID: 11789779.
- ¹⁸² Gross GJ, Hsu A, Pfeiffer AW, Nithipatikom K. Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Jun;59:20-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.003. Epub 2013 Feb 16. PMID: 23419451; PMCID: PMC3647061.
- ¹⁸³ Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW; AMISTAD-II Investigators. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol.* 2005 Jun 7;45(11):1775-80. doi: 10.1016/j.jacc.2005.02.061. PMID: 15936605.
- ¹⁸⁴ APEX AMI Investigators; Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D Jr, O'Neill WW, Todaro TG, Vahanian A, Van de Werf F. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007 Jan 3;297(1):43-51. doi: 10.1001/jama.297.1.43. PMID: 17200474.
- ¹⁸⁵ Atar D, Petzelbauer P, Schwitter J, Huber K, Rensing B, Kasprzak JD, Butter C, Grip L, Hansen PR, Süselbeck T, Clemmensen PM, Marin-Galiano M, Geudelin B, Buser PT; F.I.R.E. Investigators. Effect of intravenous FX06 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction results of the F.I.R.E. (Efficacy of FX06 in the Prevention of Myocardial Reperfusion Injury) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Feb 24;53(8):720-9. doi: 10.1016/j.jacc.2008.12.017. PMID: 19232907.
- ¹⁸⁶ Qin T, Xie L, Chen MH. Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy and safety of intracoronary administration of tirofiban for no-reflow phenomenon. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013 Sep 10;13:68. doi: 10.1186/1471-2261-13-68. PMID: 24016038; PMCID: PMC3847195.

-
- ¹⁸⁷ Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, Gsell W, Pusovnik M, Van den Eynde J, Oosterlinck W. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2022 Feb 16;S1050-1738(22)00029-9. doi: 10.1016/j.tcm.2022.02.005. Epub ahead of print. PMID: 35181472.
- ¹⁸⁸ Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826-37. doi: 10.1038/nri2873. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21088683; PMCID: PMC3114424.
- ¹⁸⁹ Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2015 Feb;15(1):e9-e21. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25685392; PMCID: PMC4318613.
- ¹⁹⁰ Land W. Allograft injury mediated by reactive oxygen species: From conserved proteins of *Drosophila* to acute and chronic rejection of human transplants - Part III: Interaction of (oxidative) stress-induced heat shock proteins with Toll-like receptor-bearing cells of innate immunity and its consequences for the development of acute and chronic allograft rejection. *Transplant Rev*. 2003;17:67–86. doi: 10.1016/S0955-470X(02)00009-5.
- ¹⁹¹ Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jun;4(6):469-78. doi: 10.1038/nri1372. PMID: 15173835.
- ¹⁹² Land WG. Oxidative injury-induced, damage-associated molecular pattern molecules and their pattern recognition receptors. In: Land WG, editor. *Innate Alloimmunity: Part II - Innate immunity and rejection*. Lengerich, Germany: Baskent University-Pabst Science Publishers; 2011. pp. 229–337.
- ¹⁹³ Land WG. Emerging role of innate immunity in organ transplantation part II: potential of damage-associated molecular patterns to generate immunostimulatory dendritic cells. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012 Apr;26(2):73-87. doi: 10.1016/j.trre.2011.02.003. Epub 2011 Nov 8. PMID: 22074784.
- ¹⁹⁴ Gallo PM, Gallucci S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol*. 2013 Jun 10;4:138. doi: 10.3389/fimmu.2013.00138. PMID: 23772226; PMCID: PMC3677085.
- ¹⁹⁵ Wenceslau CF, McCarthy CG, Szasz T, Spitler K, Goulopoulou S, Webb RC; Working Group on DAMPs in Cardiovascular Disease. Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. *Eur Heart J*. 2014 May;35(18):1172-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehu047. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24569027; PMCID: PMC4012709.

-
- ¹⁹⁶ Uchida K. Natural antibodies as a sensor of electronegative damage-associated molecular patterns (DAMPs). *Free Radic Biol Med*. 2014 Jul;72:156-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.016. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24657731.
- ¹⁹⁷ Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2007 May;97(5):738-47. PMID: 17479184.
- ¹⁹⁸ Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):173-82. doi: 10.1038/nri1785. PMID: 16498448.
- ¹⁹⁹ Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol*. 2002 Jul;97(4):268-75. doi: 10.1007/s00395-002-0366-7. PMID: 12111036.
- ²⁰⁰ Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1335-45. doi: 10.1172/JCI115999. PMID: 1357003; PMCID: PMC443178.
- ²⁰¹ Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-1667. doi: 10.1159/000489241. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29694958.
- ²⁰² Jones SP, Lefer DJ. Myocardial Reperfusion Injury: Insights Gained from Gene-Targeted Mice. *News Physiol Sci*. 2000 Dec;15:303-308. doi: 10.1152/physiologyonline.2000.15.6.303. PMID: 11390931.
- ²⁰³ Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983 May;67(5):1016-23. doi: 10.1161/01.cir.67.5.1016. PMID: 6831665.
- ²⁰⁴ Romson JL, Hook BG, Rigot VH, Schork MA, Swanson DP, Lucchesi BR. The effect of ibuprofen on accumulation of indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation*. 1982 Nov;66(5):1002-11. doi: 10.1161/01.cir.66.5.1002. PMID: 7127687.
- ²⁰⁵ Simpson PJ, Todd RF 3rd, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest*. 1988 Feb;81(2):624-9. doi: 10.1172/JCI113364. PMID: 3339135; PMCID: PMC329614.
- ²⁰⁶ Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)*. 1997 Jul;20(3):127-40. doi: 10.1007/s11357-997-0012-2. PMID: 23604305; PMCID: PMC3455892.

-
- ²⁰⁷ Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004 Mar 16;555(Pt 3):589-606. doi: 10.1113/jphysiol.2003.055913. Epub 2003 Dec 23. PMID: 14694147; PMCID: PMC1664875.
- ²⁰⁸ Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 2013 Jun 10;1(1):353-8. doi: 10.1016/j.redox.2013.05.002. PMID: 24024171; PMCID: PMC3757702.
- ²⁰⁹ Das DK, Engelman RM, Clement R, Otani H, Prasad MR, Rao PS. Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Oct 14;148(1):314-9. doi: 10.1016/0006-291x(87)91112-0. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 1987 Nov 13;148(3):1550. PMID: 2823807.
- ²¹⁰ Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD, Read NG, Parke AJ. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct--the effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985 Nov-Dec;7(6):1154-60. doi: 10.1097/00005344-198511000-00022. PMID: 2418303.
- ²¹¹ de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour JG. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J.* 1989 Mar;117(3):523-32. doi: 10.1016/0002-8703(89)90724-2. PMID: 2919531.
- ²¹² Tanaka M, Brooks SE, Richard VJ, FitzHarris GP, Stoler RC, Jennings RB, Arfors KE, Reimer KA. Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation.* 1993 Feb;87(2):526-35. doi: 10.1161/01.cir.87.2.526. PMID: 8093866.
- ²¹³ Bolli R. Role of neutrophils in myocardial stunning after brief ischaemia: the end of a six year old controversy (1987-1993). *Cardiovasc Res.* 1993 May;27(5):728-30. doi: 10.1093/cvr/27.5.728. PMID: 8348570.
- ²¹⁴ Patel MB, Kilgore KS, Ortolano GA, Gryboski CL, Qureshi MA, Marcovitz P, Naylor KB, Park JL, Wenz B, Gikakis N, Freedman RJ Jr, Lucchesi BR, O'Neill WW. Conditioned blood reperfusion during angioplasty (CoBRA) treatment of acute myocardial infarction. *Perfusion.* 2001 Mar;16 Suppl:39-49. doi: 10.1177/026765910101600i106. PMID: 11334205.

-
- ²¹⁵ Sawa Y, Matsuda H. Myocardial protection with leukocyte depletion in cardiac surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Jan;13(1):73-81. doi: 10.1053/stcs.2001.22740. PMID: 11309729.
- ²¹⁶ Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases in mechano-transduction: mechanisms and consequences. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(6):887–98
- ²¹⁷ Gianni D, Taulet N, Zhang H, et al. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS Chem Biol* 2010;5(10):981–93
- ²¹⁸ Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 2008;51(2):211–7.
- ²¹⁹ Li Y, Trush MA. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(2):295–9.
- ²²⁰ McCann SK, Roulston CL. NADPH oxidase as a therapeutic target for neuroprotection against ischaemic stroke: future perspectives. *Brain Sci* 2013;3(2):561–98.
- ²²¹ Liu F, Ni W, Zhang J, Wang G, Li F, Ren W. Administration of curcumin protects kidney tubules against Renal Ischemia-Reperfusion Injury (RIRI) by modulating Nitric Oxide (NO) signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017;44(1):401–11.
- ²²² Yang XM, Cui L, Alhammouri A, Downey JM, Cohen MV. Triple therapy greatly increases myocardial salvage during ischemia/reperfusion in the in situ rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013 Oct;27(5):403-12. doi: 10.1007/s10557-013-6474-9. PMID: 23832692; PMCID: PMC3816766.
- ²²³ Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Anesth*. 2014 Apr;28(2):235-41. doi: 10.1007/s00540-013-1716-3. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24113863.
- ²²⁴ Alexopoulos P, Panoutsopoulou K, Vogiatzis G, Koletsis E, Dougenis D, Tsopanoglou NE. Combined Treatment With Exenatide and Cyclosporine A or Parstatin 1-26 Results in Enhanced Reduction of Infarct Size in a Rabbit Model. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 Jul;70(1):34-41. doi: 10.1097/FJC.0000000000000492. PMID: 28679129.
- ²²⁵ Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak AF, Fernandez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Huebner N, Iszvak Z, Jacob H, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno-Quinn C, Mullins J, Mullins LJ, Olsson T, Riley

-
- L, Saar K, Serikawa T, Shul JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K (2008) Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet* 40:516–522.
- ²²⁶ Bader M. Rat models of cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol.* 2010;597:403-14. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3_27. PMID: 20013248.
- ²²⁷ JOHNS TN, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg.* 1954 Nov;140(5):675-82. doi: 10.1097/00000658-195411000-00006. PMID: 13208115; PMCID: PMC1609650.
- ²²⁸ Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail.* 1995 Mar;1(2):169-77. doi: 10.1016/1071-9164(95)90019-5. PMID: 9420647.
- ²²⁹ Wayman NS, McDonald MC, Chatterjee PK, Thiernemann C. Models of coronary artery occlusion and reperfusion for the discovery of novel antiischemic and antiinflammatory drugs for the heart. *Methods Mol Biol.* 2003;225:199-208. doi: 10.1385/1-59259-374-7:199. PMID: 12769489.
- ²³⁰ Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *News Physiol Sci.* 1998 Aug;13:203-210. doi: 10.1152/physiologyonline.1998.13.4.203. PMID: 11390791.
- ²³¹ Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* 61, 291–332 (1895). <https://doi.org/10.1007/BF01812150>
- ²³² Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Meth* Mar-Apr. 2007;55(2):113–26.
- ²³³ Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch* 61:291–307
- ²³⁴ Dhein, S. (2005). The Langendorff Heart. In: Dhein, S., Mohr, F.W., Delmar, M. (eds) *Practical Methods in Cardiovascular Research.* Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_9
- ²³⁵ Watanabe M, Okada T. Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Methods Mol Biol.* 2018;1816:107-116. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8. PMID: 29987814.
- ²³⁶ Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1932;210:33–6.
- ²³⁷ Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):C1783–92.
- ²³⁸ Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86(1):276–88.

-
- ²³⁹ Herr DJ, Aune SE, Menick DR. Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp*. 2015 Jul 27;(101):e52908. doi: 10.3791/52908. PMID: 26274877; PMCID: PMC4544760.
- ²⁴⁰ Duan L, Liang C, Li X, Huang Z, Liu S, Wu N, Jia D. Lycopene restores the effect of ischemic postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic rats. *Int J Mol Med*. 2019 Jun;43(6):2451-2461. doi: 10.3892/ijmm.2019.4166. Epub 2019 Apr 15. PMID: 31017253; PMCID: PMC6488174.
- ²⁴¹ Yuan X, Niu HT, Wang PL, Lu J, Zhao H, Liu SH, Zheng QS, Li CG. Cardioprotective Effect of Licochalcone D against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Langendorff-Perfused Rat Hearts. *PLoS One*. 2015 Jun 9;10(6):e0128375. doi: 10.1371/journal.pone.0128375. PMID: 26058040; PMCID: PMC4461317.
- ²⁴² Wang QD, Swärth A, Sjöquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiol Scand*. 2001 Feb;171(2):123-8. doi: 10.1046/j.1365-201x.2001.00788.x. PMID: 11350272.
- ²⁴³ Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FR. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med*. 2000 Apr 15;28(8):1232-42. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00240-9. PMID: 10889453.
- ²⁴⁴ Zuurbier CJ, Eerbeek O, Goedhart PT, Struys EA, Verhoeven NM, Jakobs C, Ince C. Inhibition of the pentose phosphate pathway decreases ischemia-reperfusion-induced creatine kinase release in the heart. *Cardiovasc Res*. 2004 Apr 1;62(1):145-53. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.010. PMID: 15023561.
- ²⁴⁵ Mizuno T, Watanabe M, Sakamoto T, Sunamori M. L-arginine, a nitric oxide precursor, attenuates ischemia-reperfusion injury by inhibiting inositol-1,4,5-triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 Apr;115(4):931-6. doi: 10.1016/S0022-5223(98)70376-9. PMID: 9576231.
- ²⁴⁶ Saitoh T, Nakajima T, Kawahara K. Possible Involvement of Apoptotic Death of Myocytes in Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *Japanese Journal of Physiology*, 53, 247–252, 2003.
- ²⁴⁷ J.M. Downey „Measuring infarct size by the tetrazolium method” <http://www.usouthal.edu/ishr/help/ttc/>
- ²⁴⁸ Yuan X, Niu HT, Wang PL, Lu J, Zhao H, Liu SH, Zheng QS, Li CG. Cardioprotective Effect of Licochalcone D against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Langendorff-

Perfused Rat Hearts. PLoS One. 2015 Jun 9;10(6):e0128375. doi: 10.1371/journal.pone.0128375. PMID: 26058040; PMCID: PMC4461317.

²⁴⁹ Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179(2):798–803

²⁵⁰ Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979 Jul;195(2):460-7. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2. PMID: 38751.

²⁵¹ González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. *World J Cardiol*. 2018 Sep 26;10(9):74-86. doi: 10.4330/wjc.v10.i9.74. PMID: 30344955; PMCID: PMC6189069.

²⁵² Förstermann U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung*. 1994 Mar;44(3A):402-7. PMID: 7514413.

²⁵³ Morgan, M., Liu, Zg. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* 21, 103–115 (2011). <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>

²⁵⁴ Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 (Pt 1)(Pt 1):93-8. doi: 10.1042/bj3070093. PMID: 7717999; PMCID: PMC1136749.

²⁵⁵ Rossello X, Riquelme JA, Davidson SM, Yellon DM. Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion. *J Cell Mol Med*. 2018 Feb;22(2):926-935. doi: 10.1111/jcmm.13394. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29159980; PMCID: PMC5783840.

²⁵⁶ Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Apr;13(4):193-209. doi: 10.1038/nrcardio.2016.5. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26843289.

²⁵⁷ Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2007 Nov;116(2):173-91. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.005. Epub 2007 Jun 30. PMID: 17681609.

²⁵⁸ Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124. PMID: 3769170.

²⁵⁹ Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inse J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30
123

year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* 2016 Nov;111(6):70. doi: 10.1007/s00395-016-0588-8. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27766474; PMCID: PMC5073120.

²⁶⁰ Rossello X, Riquelme JA, Davidson SM, Yellon DM. Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb;22(2):926-935. doi: 10.1111/jcmm.13394. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29159980; PMCID: PMC5783840.

²⁶¹ Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol.* 2016 Apr;13(4):193-209. doi: 10.1038/nrcardio.2016.5. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26843289.

²⁶² Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986 Nov;74(5):1124-36. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124. PMID: 3769170.

²⁶³ Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, Ibanez B, Iliodromitis EK, Inzerle J, Jennings R, Kalia N, Kharbanda R, Lecour S, Marber M, Miura T, Ovize M, Perez-Pinzon MA, Piper HM, Przyklenk K, Schmidt MR, Redington A, Ruiz-Meana M, Vilahur G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Garcia-Dorado D. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol.* 2016 Nov;111(6):70. doi: 10.1007/s00395-016-0588-8. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27766474; PMCID: PMC5073120.

²⁶⁴ Bromage DI, Pickard JM, Rossello X, Ziff OJ, Burke N, Yellon DM, Davidson SM. Remote ischaemic conditioning reduces infarct size in animal in vivo models of ischaemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Res.* 2017 Mar 1;113(3):288-297. doi: 10.1093/cvr/cvw219. PMID: 28028069; PMCID: PMC5408955.

²⁶⁵ Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet.* 1993 Jul 31;342(8866):276-7. doi: 10.1016/0140-6736(93)91819-8. PMID: 8101304.

²⁶⁶ Wang M, Zhang J, Gong N. Role of the PI3K/Akt signaling pathway in liver ischemia reperfusion injury: a narrative review. *Ann Palliat Med.* 2022 Feb;11(2):806-817. doi: 10.21037/apm-21-3286. Epub 2021 Dec 27. PMID: 35016518.

²⁶⁷ Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2007 Nov;116(2):173-91. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.005. Epub 2007 Jun 30. PMID: 17681609.

²⁶⁸ Rafiee P, Theriot ME, Nelson VM, Heidemann J, Kanaa Y, Horowitz SA, Rogaczewski A, Johnson CP, Ali I, Shaker R, Binion DG. Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and

Hsp27. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Nov;291(5):C931-45. doi: 10.1152/ajpcell.00474.2005. Epub 2006 Jun 21. PMID: 16790501.

²⁶⁹ Amzel LM, Huang CH, Mandelker D, Lengauer C, Gabelli SB, Vogelstein B. Structural comparisons of class I phosphoinositide 3-kinases. *Nat Rev Cancer.* 2008 Sep;8(9):665-9. doi: 10.1038/nrc2443. PMID: 18633356; PMCID: PMC2847604.

²⁷⁰ Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Jun;50(6):940-50. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018. Epub 2011 Mar 6. PMID: 21385587.

UCHWAŁA NR WAW2/099/2020

z dnia 09 września 2020 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „**Wpływ równoczesnego podania diphenyliodonium oraz L-argininy w buforze o kwasowym odczynie na wielkość obszaru uszkodzenia poreperfuzyjnego serca u szczurów**” z dnia 26 czerwca 2020 roku, złożonego przez: Centrum Badań Przedklinicznych CBP WUM, adres: ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa, zaplanowanego przez Małgorzatę Wojciechowską² przy udziale³ -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, sercowo naczyniowy układ krążenia krwi i limfy [PB2].
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: terminalna, bez odzyskania przytomności.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
Szczur wędrowny, Sprague Dawley (SPRD/Clzd)	12 tygodni	67

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Małgorzata Wojciechowska, Adrian Barzyc, Wojtek Łysik, Karol Momot.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 15.09.2020 do 15.09.2025 r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie ~~zostanie/nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej ~~w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.~~

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczerp/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2019 r. poz. 1392, z późn. zm.). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia pod kątem oceny etycznej zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2020 r. poz. 256) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż decyzja jest zgodna z wnioskiem strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
II Lokalna Komisja Etyczna
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
02-786 Warszawa, ul. Ciszewskiego 8
tel. 22 59-35622
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA
II Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW

/ Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Dobrowolska
(Podpis Przewodniczącej Komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu