

**ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Ν. ΣΙΤΑΡΑΣ
ΚΑΙ
ΑΠΟ ΤΟΝ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΟΜΕΑ ΤΟΥ ΩΝΑΣΕΙΟΥ ΚΑΡΔΙΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΥ
ΚΕΝΤΡΟΥ
ΕΠΙΤΙΜΟΣ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Δ. ΚΟΚΚΙΝΟΣ**

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

**«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ
ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ»**

ΑΝΤΩΝΙΟΣ Κ. ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΙΔΙΚΟΣ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ. ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΑΥΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑΝ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΙΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ. ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΕΙ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΩΣ, ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΣΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΙΟΥΤΩΝ.

Η αίτηση για την εκπόνηση της διατριβής έγινε τον Μάρτιο του 2005.

Στις 02/09/2005 ορίσθηκαν ως τριμελής συμβουλευτική επιτροπή οι κ.κ.

ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΚΟΚΚΙΝΟΣ, Ομότιμος Καθηγητής Καρδιολογίας Παν. Αθηνών

ΙΩΑΝΝΗΣ ΡΙΖΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Παν. Αθηνών

ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΒΥΣΣΟΥΛΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Παν. Αθηνών

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα.

(ΝΟΜΟΣ 5343/1932, Άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Δημόπουλος Αντώνιος

Έτος γεννήσεως: 1971

Πτυχίο Ιατρικής 1998

Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος 1999

Ολοκλήρωση ειδικότητας καρδιολογίας 2011

Μετεκπαίδευση στην επεμβατική καρδιολογία στο γερμανικό καρδιολογικό κέντρο του Μονάχου (Deutsches Herzzentrum München) 5/2011- σήμερα

Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος στην Γερμανία 2012

Γλωσσική Επάρκεια: Αγγλικά, Γερμανικά

Δημοσιεύσεις

1: Andreou AY, Iakovou I, Dimopoulos AK, Karatasakis G, Anastasiou P, Vasiliadis I, Pavlides G. Complex coronary artery anatomy in a patient with prolapsing left atrial myxoma. Herz. 2012 May;37(3):342-6. Epub 2011 Sep 28. PubMed PMID: 21947023.

2: Andreou AY, Iakovou I, Psathas C, Dimopoulos AK, Papamentzelopoulos S, Pavlides G. Isolated right ventricular infarction during percutaneous coronary intervention. Herz. 2012 Mar;37(2):222-4. Epub 2011 Feb 25. PubMed PMID: 21347695.

3: Spargias K, Polymeros S, Dimopoulos A, Manginas A, Pavlides G, Balanika M, Smirli A, Stavridis G, Dangas G, Cokkinos DV. The predictive value and evolution of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels following transcatheter aortic valve implantation. J Interv Cardiol. 2011 Oct;24(5):462-9. doi: 10.1111/j.1540-8183.2011.00654.x. Epub 2011 Sep 2. PubMed PMID: 21883470.

4: Iakovou I, Dimopoulos A, Dangas G. Normal to normal: a method of treatment of coronary aneurysms with deployment of bare-metal stents. *J Invasive Cardiol.* 2011 May;23(5):E121-5. PubMed PMID: 21562359.

5: Kalofoutis C, Mourouzis I, Galanopoulos G, Dimopoulos A, Perimenis P, Spanou D, Cokkinos DV, Singh J, Pantos C. Thyroid hormone can favorably remodel the diabetic myocardium after acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2010 Dec;345(1-2):161-9. Epub 2010 Aug 22. PubMed PMID: 20730619.

6: Spargias K, Alexopoulos E, Thomopoulou S, Dimopoulos A, Manginas A, Pavlides G, Voudris V, Karatasakis G, Athanassopoulos G, Cokkinos DV. Effect of balloon valvuloplasty in patients with severe aortic stenosis on levels of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. *Am J Cardiol.* 2009 Sep 15;104(6):846-9. PubMed PMID: 19733722.

7: Dimopoulos AK, Manginas A, Pavlides G, Cokkinos DV. PCI in severely degenerated saphenous vein graft using a novel mesh-covered stent together with a conventional embolic protection system. *Hellenic J Cardiol.* 2009 Sep-Oct;50(5):429-35. PubMed PMID: 19767288.

8: Mourouzis I, Dimopoulos A, Saranteas T, Tsinarakis N, Livadarou E, Spanou D, Kokkinos AD, Xinaris C, Pantos C, Cokkinos DV. Ischemic preconditioning fails to confer additional protection against ischemia-reperfusion injury in the hypothyroid rat heart. *Physiol Res.* 2009;58(1):29-38. Epub 2008 Jan 17. PubMed PMID: 18198989.

9: Pantos C, Dritsas A, Mourouzis I, Dimopoulos A, Karatasakis G, Athanassopoulos G, Mavrogeni S, Manginas A, Cokkinos DV. Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. *Eur J Endocrinol.* 2007 Oct;157(4):515-20. PubMed PMID: 17893267.

10: Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Dimopoulos A, Xinaris C, Kokkinos AD, Panagiotou M, Cokkinos DV. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Aug;32(2):333-9. Epub 2007 Jun 7. PubMed PMID: 17560116.

11: Pantos C, Mourouzis I, Dimopoulos A, Markakis K, Panagiotou M, Xinaris C, Tzeis S, Kokkinos AD, Cokkinos DV. Enhanced tolerance of the rat myocardium to ischemia and reperfusion injury early after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2007 Jul;102(4):327-33. Epub 2007 Feb 8. PubMed PMID: 17285351.

12: Pantos C, Mourouzis I, Xinaris C, Kokkinos AD, Markakis K, Dimopoulos A, Panagiotou M, Saranteas T, Kostopanagiotou G, Cokkinos DV. Time-dependent changes in the expression of thyroid hormone receptor alpha 1 in the myocardium after acute myocardial infarction: possible implications in cardiac remodelling. *Eur J Endocrinol*. 2007 Apr;156(4):415-24. PubMed PMID: 17389455.

13: Pantos C, Malliopoulos V, Mourouzis I, Thempeyioti A, Paizis I, Dimopoulos A, Saranteas T, Xinaris C, Cokkinos DV. Hyperthyroid hearts display a phenotype of cardioprotection against ischemic stress: a possible involvement of heat shock protein 70. *Horm Metab Res*. 2006 May;38(5):308-13. PubMed PMID: 16718626.

Πρόλογος

Στην παρούσα μελέτη ερευνάται η ανθεκτικότητα του εμφραγματικού μυοκαρδίου στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης και ο ρόλος που διαδραματίζουν σε αυτό η πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας 27 (HSP27) και 70 (HSP70). Επίσης μελετάται η επίδραση της χορήγησης της θυρεοειδικής ορμόνης μετεμφραγματικά τόσο στην λειτουργικότητα της μετεμφραγματικής καρδιάς όσο και στην τροποποίηση της αντοχής της καρδιάς έναντι σε μια νέα ισχαιμική βλάβη. Οι δράσεις της θυρεοειδικής ορμόνης στο καρδιαγγειακό και ιδιαίτερα μετεμφραγματικά αποτελούν ένα σημαντικό και επίκαιρο θέμα καθώς τα θυρεοειδικά ανάλογα βρίσκονται υπο κλινική δοκιμή σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα.

Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Διονύσιο Κόκκινο, Ομότιμο Καθηγητή Καρδιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την ουσιαστική επιστημονική του καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της επιστημονικής μου διαδρομής, στον κ. Ιωάννη Ρίζο, Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας Παν. Αθηνών, και τον κ. Γρηγόρη Βυσσούλη, Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδιολογίας Παν. Αθηνών για την αμέριστη συμπαράστασή τους στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής. Επίσης στον κ. Κωνσταντίνο Πάντο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες γιατί μου δίδαξε τις τεχνικές της Πειραματικής Καρδιολογίας και συνέβαλε με την εμπειρία του σε όλα τα στάδια διεξαγωγής της μέλετης αυτής.

Επίσης εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, καθώς και στο Ίδρυμα Αλέξανδρος Ωνάσης για την οικονομική επιχορήγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Περιεχόμενα

«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΕ ΜΟΝΤΕΛΑ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ»	1
Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ	2
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
A. ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ	13
Παθοφυσιολογία Της Ισχαιμίας Του Μυοκαρδίου	13
Πρωτεϊνική Κινάση C	22
Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα ερεθίσματα («Mitogen activated protein kinases ή MAPKs»)	24
Πρωτεΐνες Θερμικής Καταπληξίας	25
B. ΒΛΑΒΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	42
Εισαγωγή	42
Υπερχοληστερολαιμία Και Ισχαιμική Βλάβη	42
Διαβητικό Μυοκάρδιο Και Ισχαιμική Βλάβη	43
Ισχαιμική Βλάβη Στο Υπερτροφικό Μυοκάρδιο	44
Γηράσκον μυοκάρδιο και Ισχαιμική βλάβη.....	46
Ισχαιμική Προπόνηση Στο Παθολογικό Μυοκάρδιο	46
Γ. ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	49
Αναδιαμόρφωση Μετά Από Έμφραγμα Του Μυοκαρδίου	49
Δ. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ	55

Δράση της θυροξίνης έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης -Μηχανισμοί.....	55
Γενομική δράση της θυρεοειδικής ορμόνης.....	56
Μη-γενομική δράση της θυρεοειδικής ορμόνης.....	57
Δράση της θυροξίνης στην καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου	59
ΣΚΟΠΟΣ	62
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ.....	64
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	65
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ.....	65
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ	66
ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	66
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙΣΑΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ.....	68
Αναισθητοποίηση – χορήγηση ηπαρίνης	68
Αφαίρεση καρδιάς	68
Διάλυμα διαπύτισης	68
Ανάρτηση απομονωθείσας καρδιάς.....	68
Θερμοκρασία.....	69
Βηματοδότηση.....	69
Ροή διαλύματος	70
Πρόκληση ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	70
Μετρήσεις αιμοδυναμικών παραμέτρων στις διάφορες πειραματικές φάσεις.....	71
ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Τ3 ΚΑΙ Τ4	74

ΜΕΤΡΗΣΗ Τ ₃	74
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	74
ΜΕΤΡΗΣΗ Τ ₄	76
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	76
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	78
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΑΙ ΜΗ-ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ.....	78
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA)	79
SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ.....	80
ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ HSP27	81
ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ HSP27 και HSP70	82
ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ HSP27 και της ΟΛΙΚΗΣ HSP70	83
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΝ α ΚΑΙ β ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ.....	83
Μέτρηση αποδέσμευσης της γαλακτικής αφυδρογενάσης (LDH)	83
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ.....	84
Μελέτες αντοχής του μυοκαρδίου στην ισχαιμία-επαναιμάτωση.....	85
Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης	86
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	86
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
ΒΑΣΙΚΗ ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ Θ.Ο.....	88

ΕΠΙΠΕΔΑ ΘΥΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	88
Βασικές παράμετροι καρδιακής λειτουργικότητας μετρημένες υπερηχογραφικά	89
Βασικές παράμετροι καρδιακής λειτουργικότητας μετρημένες στην συσκευή –Langendorff..	90
Έκφραση των ισομορφών μυοσίνης στο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο	91
ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ	92
Προφίλ της ισχαιμικής υπερσυσπασης	92
Παράμετροι μετισταμικής λειτουργικότητας και νέκρωσης (αποδέσμευση LDH).....	93
Ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών	95
ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ ΜΕΤΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ Θυροξίνης	96
Προφίλ της ισχαιμικής υπερσυσπασης	96
Παράμετροι μετισταμικής λειτουργικότητας και νέκρωσης.....	97
Πρωτεϊνική έκφραση της ολικής και φωσφορυλιωμένης HSP27	99
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	100
Abstract	112

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

Παθοφυσιολογία Της Ισχαιμίας Του Μυοκαρδίου

Σε συνθήκες ισχαιμίας, υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών αλλά και οξυγόνου στο μυοκάρδιο. Η έλλειψη του οξυγόνου προκαλεί αναστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και ανεπάρκεια της λειτουργίας του κύκλου του Krebs αλλά και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στα πρώτα λεπτά της ισχαιμίας παρατηρείται μείωση των επιπέδων ATP, μείωση της φωσφοκρεατίνης (που προσπαθεί να αναπληρώσει το ATP) και σημαντική αύξηση του ADP, AMP και φωσφόρου. Οι παραπάνω ενδοκυττάρια μεταβολές οδηγούν σε άμεση *καταστολή της συσταλτικότητας* στην ισχαιμική περιοχή. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εξοικονόμηση ενέργειας από το κύτταρο[1]

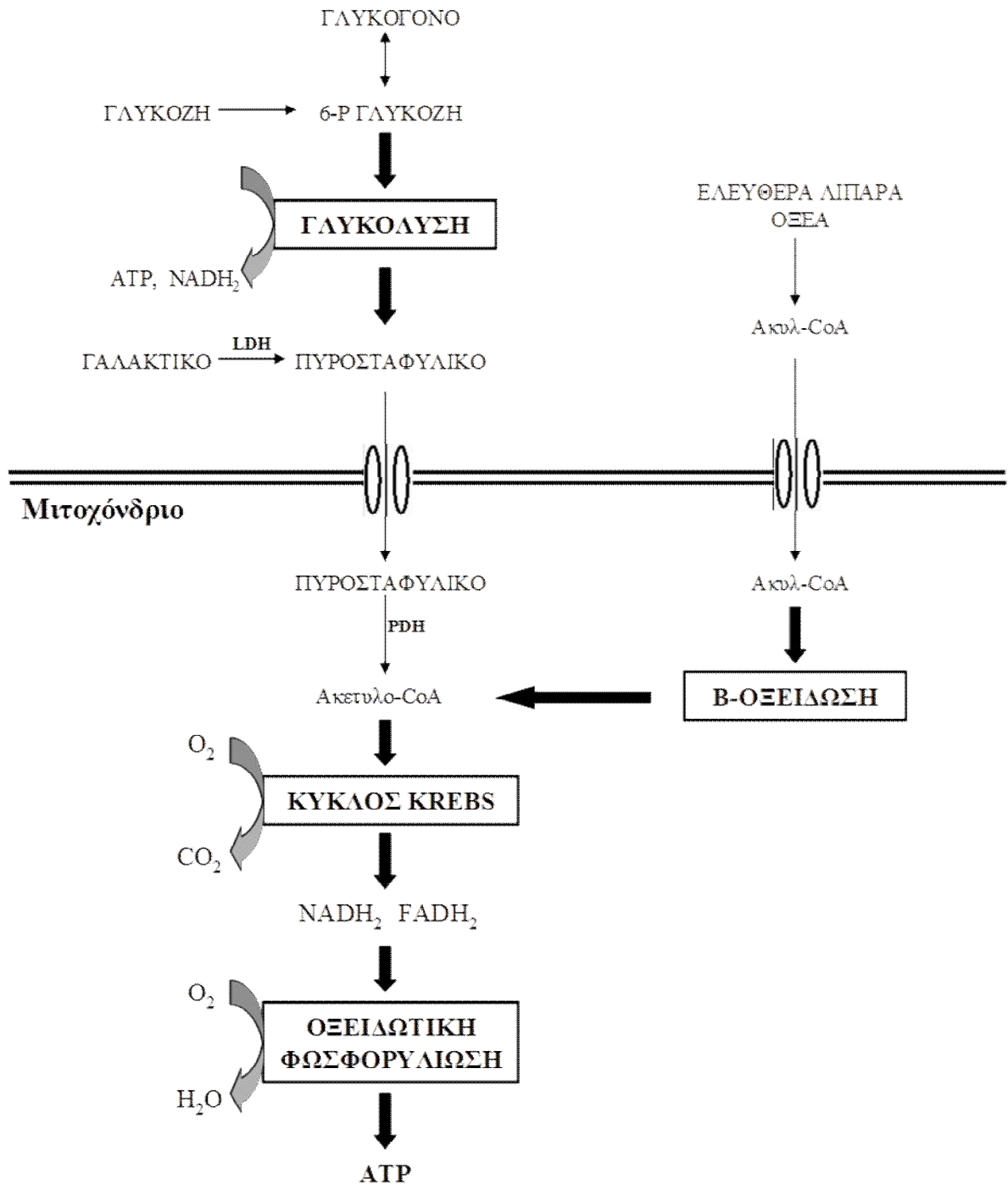
Αναερόβια Γλυκόλυση- Ενδοκυττάρια Οξέωση

Η αναερόβια γλυκόλυση επάγεται σε μια προσπάθεια του κυττάρου να παράγει ενέργεια χωρίς τη χρησιμοποίηση οξυγόνου. Συγκεκριμένα, η μείωση του ATP και η αύξηση των ADP, AMP και φωσφόρου προκαλεί την είσοδο γλυκόζης που υπάρχει στον εξωκυττάριο χώρο, την αποδόμηση του γλυκογόνου και την επαγωγή των αντιδράσεων της αναερόβιας γλυκόλυσης. Αυτό γίνεται με την επαγωγή του ενζύμου της φωσφοφρουκτοκινάσης το οποίο διαθέτει αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης για τους παραπάνω μεταβολίτες. Τα ένζυμα της αναερόβιας γλυκόλυσης δεν βρίσκονται στο κυτοσόλιο αλλά συνδέονται πάνω σε φωσφολιπίδια της μεμβράνης [2]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ενέργεια που παράγεται από την αναερόβια γλυκόλυση στη διάρκεια της ισχαιμίας να χρησιμοποιείται εκλεκτικά από τις αντλίες της μεμβράνης του κυττάρου για τη διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης [3, 4]. Το πυροσταφυλικό που παράγεται από την αναερόβια γλυκόλυση δεν μπορεί να συνεχίσει στον κύκλο του Krebs και μετατρέπεται σε γαλακτικό. Η σταδιακή αύξηση των επιπέδων του γαλακτικού οδηγεί σε *ενδοκυττάρια οξέωση*. Η οξέωση προκαλεί μια σειρά από κυτταρικές βλάβες όπως μείωση της συσταλτικότητας καθώς τα ιόντα H^+ ανταγωνίζονται το ασβέστιο, μετουσίωση πρωτεϊνών, μιτοχονδριακή βλάβη, ενεργοποίηση των λυσοσωμάτων [1].

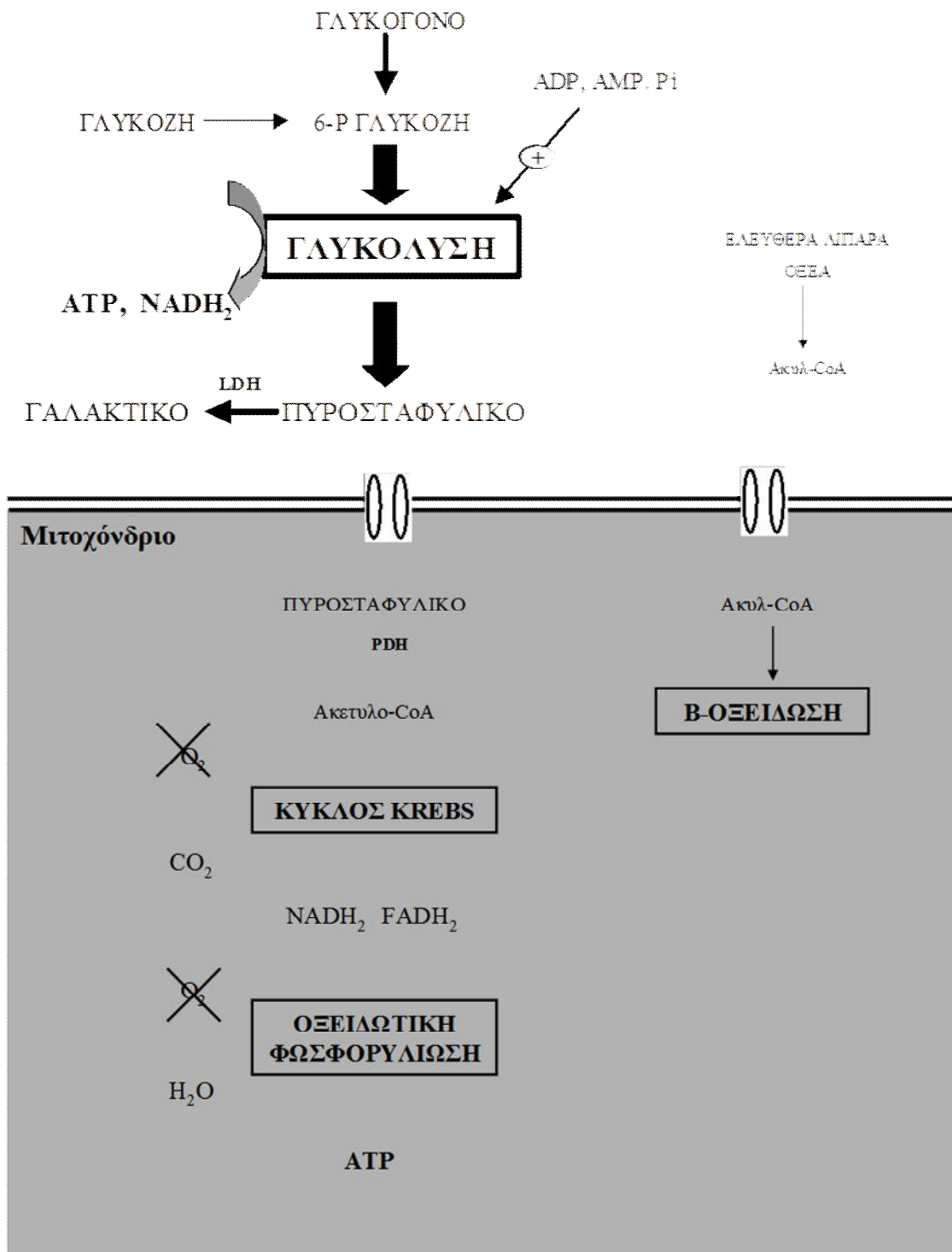
Διαταραχή Μεταβολισμού Λιπαρών Οξέων

Καθώς αναστέλλεται ο αερόβιος μεταβολισμός, συμβαίνει και σταδιακή αναστολή της β-οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την *ενδοκυττάρια συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων και πολλών ενδιάμεσων*

μεταβολιτών τους. Παράλληλα, η ενεργοποίηση των φωσφολιπασών έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Τα προϊόντα της αποδόμησης αυτής, τα λυσοφωσφογλυκερίδια καταστρέφουν τη μεμβρανική διπλοστοιβάδα, αναστέλλουν τη λειτουργία των αντλιών της μεμβράνης και προκαλούν αρρυθμίες [5]



Εικόνα 1. Μεταβολισμός της καρδιάς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες



Εικόνα 2 Μεταβολισμός της καρδιάς σε συνθήκες ισχαιμίας

Διαταραχή Λειτουργικότητας Αντλιών

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας οι αντλίες ιόντων διατηρούν την λειτουργία τους με τη βοήθεια του ATP που παράγεται από την αναερόβια γλυκόλυση. Ωστόσο η λειτουργία της αναερόβιας γλυκόλυσης μπορεί να διατηρηθεί για περιορισμένο μόνο χρονικό διάστημα, καθώς υπάρχει εξάντληση του γλυκογόνου που παρέχει τη γλυκόζη. Επίσης, η οξέωση που αναπτύσσεται σταδιακά δρα ανασταλτικά στα ένζυμα της

γλυκόλυσης. Η διακοπή της γλυκόλυσης που επέρχεται μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα οδηγεί σε απότομη πτώση των επιπέδων ATP και αναστολή της λειτουργίας των αντλιών της μεμβράνης που διατηρούν την ιοντική ομοιόσταση. Οι πιο σημαντικές από τις αντλίες αυτές είναι η Na^+/K^+ ATPάση και $\text{SR}(\text{Ca}^{+2})\text{-ATP}$ άση [6]. Η διακοπή της λειτουργίας της αντλίας Na^+/K^+ ATPάσης οδηγεί σε: 1. αύξηση του ενδοκυττάρου νατρίου με συνέπεια να αυξάνει η ωσμωτική πίεση και να προκαλείται οίδημα του κυττάρου 2. μείωση του ενδοκυττάρου καλίου που προδιαθέτει σε ανάπτυξη αρρυθμιών. Η ενδοκυττάρια αύξηση του νατρίου επάγεται επίσης και λόγω της αναπτυσσόμενης οξέωσης μέσω του ανταλλάκτη Na^+/H^+ [7]. Το αυξημένο ενδοκυττάριο νάτριο επάγει την ενδοκυττάρια αύξηση του ασβεστίου μέσω του ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ [6].

Η $\text{SR}(\text{Ca}^{+2})\text{-ATP}$ άση είναι η αντλία που ρυθμίζει τη μεταφορά του ενδοκυττάρου ασβεστίου μέσα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο μετά το τέλος της συστολής και με τον τρόπο αυτό ευοδώνει την διαστολή του μυοκαρδίου. Η αναστολή της λειτουργίας της προκαλεί συσσώρευση ασβεστίου στον ενδοκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα να προκαλούνται: 1. βλάβες των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, 2. αύξηση του μιτοχονδριακού ασβεστίου και βλάβη των μιτοχονδρίων, 3. ενεργοποίηση των κασπασών και του μηχανισμού της απόπτωσης, 4. ενεργοποίηση των φωσφολιπασών, 5. αρρυθμίες [6, 8]

Βλάβη Επαναιμάτωσης

Η επαναιμάτωση της ισχαιμικής περιοχής, δηλαδή η επαναφορά της στεφανιαίας ροής, αποτελεί την απαραίτητη προϋπόθεση για να αποφευχθεί η νέκρωση. Ωστόσο, η ίδια η επαναιμάτωση μπορεί να πυροδοτήσει μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην κυτταρική βλάβη και τον θάνατο. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως βλάβη επαναιμάτωσης [9, 10]. Η βλάβη επαναιμάτωσης έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και την ενδοκυττάρια αύξηση του ασβεστίου [11]. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν ιδιαίτερα ενεργές χημικές ενώσεις ικανές να αντιδράσουν με οποιοδήποτε μόριο εντός του κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου είναι αυτές με την μεγαλύτερη βιολογική σημασία και παράγονται κατά τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης όταν επανέρχεται η παροχή οξυγόνου στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι η ρίζα του υπεροξειδίου, η ρίζα του υδροξυλίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα του οξειδίου του αζώτου και ο περοξυνιτρίτης. Πηγή παραγωγής των ριζών αυτών στην επαναιμάτωση είναι τα

μιτοχόνδρια του κυττάρου που έχουν υποστεί βλάβη [10]. Οι δράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι πολλαπλές: Αντιδρούν με πρωτεΐνες του κυττάρου και προκαλούν τη μετουσίωση τους, καταστρέφουν τη μεμβρανική διπλοστοιβάδα οξειδώνοντας τα λιπαρά οξέα της μεμβράνης. Επίσης καταστρέφουν το DNA του κυττάρου επάγοντας τον μηχανισμό απόπτωσης και προκαλούν απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο και είσοδό του από τον εξωκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα την ανάπτυξη σημαντικής διαστολικής δυσλειτουργίας στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης [10] [11]

Ισχαιμία Και Κυτταρικός Θάνατος

Η παρατεταμένη ισχαιμία μπορεί να καταλήξει σε κυτταρικό θάνατο που γίνεται είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση. Η *νέκρωση* χαρακτηρίζεται από την δημιουργία κυτταρικού οιδήματος που καταλήγει σε ρήξη της μεμβράνης και θάνατο του κυττάρου. Το κυτταρικό οίδημα προκαλείται από την έλλειψη ATP που οδηγεί σε διαταραχή της ιοντικής ομοιόστασης, αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης H^+ , Na^+ και Ca^{+2} και αύξηση της ωσμωτικής πίεσης του κυττάρου. Τα παραπάνω σε συνδιασμό με τη βλάβη που υφίστανται η κυτταρική μεμβράνη (μεταβολίτες λιπαρών οξέων, φωσφολιπάσες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) αλλά και το μηχανικό στρες στο οποίο υπόκεινται ο κυτταροσκελετός (ισχαιμική σύσπαση) μπορεί να οδηγήσουν σε ρήξη του κυττάρου [12].

Η *απόπτωση* αποτελεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και χρειάζεται ενέργεια για να προχωρήσει. Προκαλείται από την ενεργοποίηση μιας σειράς πρωτεολυτικών ενζύμων, των κασπασών, που αποδομούν βασικά κυτταρικά μόρια καθώς και το DNA του κυττάρου. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, διάσπαση του πυρήνα, κατακερματισμό του DNA και σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων. Τα αποπτωτικά σώματα είναι τμήματα της μεμβράνης του κυττάρου που περιέχουν τα κατεστραμμένα κυτταρικά συστατικά. Τα αποπτωτικά σώματα απορροφώνται από τα γειτονικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης μετά από ισχαιμία προκαλείται με τους εξής μηχανισμούς:

1. Η βλάβη των μιτοχονδρίων οδηγεί στον σχηματισμό ειδικών πόρων πάνω στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (mitochondrial permeability transition pores) μέσω των οποίων γίνεται απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, του αποπτωτικού παράγοντα (AIF) και του συμπλέγματος Smac/DIABLO στο κυτοσόλιο. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν ενεργοποίηση των κασπασών. Η μιτοχονδριακή βλάβη προκαλείται από

την οξέωση, την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [13]15. [14].

2. Ενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων του κυττάρου από τους παράγοντες TNFα και Fas. Οι παράγοντες αυτοί εκκρίνονται τόσο από τα φλεγμονώδη κύτταρα όσο και από τα καρδιακά κύτταρα που βρίσκονται στην περιοχή και η σύνδεσή τους πάνω στους αντίστοιχους υποδοχείς των καρδιακών κυττάρων ενεργοποιεί τον μηχανισμό των κασπασών [15].

3. Ενεργοποίηση της p53 πρωτεΐνης και της JNK κινάσης. Αυτοί οι μηχανισμοί της απόπτωσης θεωρούνται ανεξάρτητοι των κασπασών.

Κυτταροσκελετός Και Ισχαιμία

Σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του κυττάρου παίζει ο κυτταροσκελετός, ιδιαίτερα σε καταστάσεις ισχαιμικού στρες. Ο σκελετός του κυττάρου μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις ξεχωριστές δομές: Τα σαρκομερίδια (μυοϊνίδια), τα μικρονημάτια, τα ενδιάμεσα νημάτια και τους μικροσωληνίσκους.

Το *σαρκομερίδιο* αποτελεί την βασική λειτουργική μονάδα στην οποία βασίζεται η λειτουργία της συστολής του καρδιακού κυττάρου. Κάθε σαρκομερίδιο αποτελείται από νημάτια F-ακτίνης (λεπτά νημάτια) και νημάτια μυοσίνης (παχιά νημάτια). Τα σαρκομερίδια συνδέονται μεταξύ τους στις Z περιοχές με την πρωτεΐνη α-ακτινίνη. Στη διάρκεια της συστολής, τα νημάτια ακτίνης γλιστρούν κατα μήκος των νηματίων μυοσίνης και αυτό επιτυγχάνεται με τη επαναλαμβανόμενη σύνδεση και αποσύνδεση των κεφαλών των μορίων της μυοσίνης πάνω στην ακτίνη με κατανάλωση ATP. Ο έλεγχος της συστολής πραγματοποιείται από την τροπομυοσίνη η οποία αναστέλλει τις συνδέσεις ακτίνης-μυοσίνης. Η λειτουργία της τροπομυοσίνης ελέγχεται από άλλες πρωτεΐνες, τις τροπονίνες T, I και C που είναι ευαίσθητες στις αλλαγές των συγκεντρώσεων του ασβεστίου [12]. Τα *μικρονημάτια* έχουν διάμετρο 5 nm και συντίθενται από την πρωτεΐνη ακτίνη. Η ακτίνη είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη η οποία πολυμερίζεται και σχηματίζει νημάτια (F-ακτίνη). Τα νημάτια της ακτίνης έχουν πολική διάταξη με τις υπομονάδες να είναι στραμμένες όλες προς μια κατεύθυνση [16]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα νημάτια να επεκτείνονται πάντα προς τη μια πλευρά. Τα νημάτια της ακτίνης σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα πλέγμα (τον *κυτταρικό φλοιό*) ακριβώς κάτω από την κυτταρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, τα

νημάτια της ακτίνης διατάσσονται σε ένα δίκτυο σταυρωτών συνδέσεων με τη βοήθεια συνδετικών πρωτεϊνών όπως η φιλαμίνη (filamin) ενώ ταυτόχρονα προσφύονται στη μεμβράνη μέσω πρωτεϊνών όπως η σπεκτρίνη και η αγκυρίνη [17]. Οι δεσμοί της φιλαμίνης με την ακτίνη έχουν την ιδιότητα να χαλαρώνουν ώστε να υπάρχει ελαστικότητα της μεμβράνης αλλά όμως ανθίστανται σε απότομες παραμορφώσεις. Επομένως, η λειτουργία αυτού του δικτύου είναι να παρέχει μηχανική στήριξη στην κυτταρική μεμβράνη ενώ ανθίσταται στις αιφνίδιες δυνάμεις παραμόρφωσης. Επιπλέον, τα μικρονημάτια συνδέονται σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν διακυτταρικές δομές που ονομάζονται συνάψεις πρόσφυσης. Τα *ενδιάμεσα νημάτια* έχουν διάμετρο 10 nm και στα καρδιομυοκύτταρα σχηματίζονται από την πρωτεΐνη δεσμίνη [18]. Τα νημάτια αυτά βρίσκονται προσδεδεμένα στην πυρηνική μεμβράνη και οργανώνονται σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο στην εσωτερική δομή του καρδιομυοκυττάρου που αποτελείται από επιμήκεις και εγκάρσιες ίνες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Οι εγκάρσιες ίνες έχει δειχθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ότι σχηματίζουν νηματοειδείς δακτυλίους γύρω από τα μυοϊνίδια στο επίπεδο των Z γραμμών [19] και καταλήγουν να προσδεθούν στα πλάγια της κυτταρικής μεμβράνης. Οι επιμήκεις ίνες πορεύονται κατά μήκος των μυοϊνιδίων, συνδέονται πάνω στα μιτοχόνδρια και καταλήγουν στα δεσμοσώματα της κυτταρικής μεμβράνης [20]. Τα ενδιάμεσα ινίδια σχηματίζουν ένα ινώδες πλέγμα το οποίο συνδέει και στηρίζει ταυτόχρονα όλα τα οργανίδια του καρδιακού κυττάρου και μπορεί να αντέχει σε εξωτερικές και εσωτερικές πιέσεις [21]. Φαίνεται επίσης ότι τα ενδιάμεσα ινίδια συνδέονται στενά και με τον κυτταρικό φλοιό. Η σπεκτρίνη και η αγκυρίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασύνδεση αυτή καθώς διαθέτουν θέσεις αλληλεπίδρασης με την δεσμίνη [22]. Οι *μικροσωληνίσκοι* έχουν διάμετρο 25 nm και στα καρδιομυοκύτταρα σχηματίζονται από τις δυο υπομονάδες (α και β) της πρωτεΐνης τουμπουλίνης μετά από πολυμερισμό. Οι μικροσωληνίσκοι ξεκινούν από μια ειδική περιοχή του κυττάρου που λέγεται κεντρόσωμα και σχηματίζουν διακριτά όργανα τα κεντριόλια. Κάθε κεντριόλιο αποτελείται από νημάτια τουμπουλίνης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με συνδετικές πρωτεΐνες. Οι μικροσωληνίσκοι πολυμερίζονται και αποπολυμερίζονται μέσα στο κύτταρο ξεκινώντας από το κεντρόσωμα. Ο ρόλος των μικροσωληνίσκων στο καρδιακό κύτταρο είναι να σχηματίζουν ένα δίκτυο που επιτρέπει τη μεταφορά κυστιδίων και οργανιδίων σε διάφορες περιοχές του κυττάρου ενώ ταυτόχρονα δημιουργούν το σκελετό για τα διαμερίσματα του κυττάρου που ορίζονται από μεμβράνη, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο [23]. Παρότι αρκετά είναι γνωστά για την

δομή του κυτταροσκελετού, πολύ λίγα γνωρίζουμε για τον τρόπο που ελέγχεται και ρυθμίζεται αυτή η δομή από το κύτταρο. Σήμερα ξέρουμε ότι ο κυτταροσκελετός είναι μια δυναμική δομή που ανταποκρίνεται και προσαρμόζεται στα διάφορα ερεθίσματα όπως η υπερτροφία, η αύξηση ή η ατροφία. Ο τρόπος που επιτυγχάνεται αυτό και τα μόρια που συμμετέχουν σε αυτή τη ρύθμιση δεν είναι γνωστά.

Ο κυτταροσκελετός υφίσταται μεγάλες βλάβες κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Η φυσιολογική δομή των σαρκομεριδίων υφίσταται σοβαρή παραμόρφωση, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται κατακερματισμένη κατα τόπους ενώ οι Z περιοχές είναι δύσκολο να διακριθούν. Το επερχόμενο οίδημα οδηγεί σε απομάκρυνση της κυτταρικής μεμβράνης από τα μυοϊνίδια καθώς σχηματίζονται μεγάλες φυσαλίδες ακριβώς κάτω από τη μεμβράνη που την αποσπούν από τον κυτταρικό φλοιό.[24, 25]. Μέσα στις φυσαλίδες αυτές που είναι γεμάτες με νερό βρίσκονται κυκλοφορούντα μιτοχόνδρια. Στα σημεία που βρίσκονται τα δεσμοσώματα, τα ινίδια της ακτίνης ρήγνυνται [26, 27]. Επιπλέον, αποκόλληση των ενδιαμέσων νηματίων παρατηρείται στα σημεία προσκόλλησής τους στις Z περιοχές, στην κυτταροπλασματική και πυρηνική μεμβράνη αλλά και στα μιτοχόνδρια [28].

Η ισχαιμική βλάβη του κυτταροσκελετού μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στον προκαλούμενο από την ισχαιμία κυτταρικό θάνατο. Συγκεκριμένα, με την επέλευση των παραπάνω αλλοιώσεων, προκαλείται μια διαταραχή της αρχιτεκτονικής του κυττάρου που το καθιστά εύθραυστο σε μηχανικές ή ωσμωτικές δυνάμεις. Ο επικείμενος κυτταρικός θάνατος μετά από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης είναι το αποτέλεσμα τόσο της διαταραχής του κυτταροσκελετού όσο και της ανάπτυξης ωσμωτικών (διαταραχές ιόντων) και μηχανικών (ισχαιμική σύσπαση, βλάβη επαναιμάτωσης) δυνάμεων. Ένας ενισχυμένος κυτταροσκελετός μπορεί πιθανά να αποτρέψει τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης σε κύτταρα που έχουν υποστεί σοβαρή ισχαιμική βλάβη και να τους επιτρέψει να ανακάμψουν μετά από επαναιμάτωση.

Το πιο σημαντικό αίτιο της ισχαιμικής βλάβης του κυτταροσκελετού φαίνεται ότι είναι η υπερφόρτιση με ασβέστιο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του ενδοκυττάρου ασβεστίου ενεργοποιούν μια σειρά από πρωτεάσες, με πιο σημαντική τη καλπαΐνη (calpain). Η πρωτεάση αυτή προκαλεί αποδόμηση σε πολλές πρωτεΐνες των σαρκομεριδίων, όπως η α-ακτινίνη, η τροπονίνη I και T, αλλά και στα ινίδια της δεσμίνης και της μυοσίνης [29]

Ισχαιμία Και Φλεγμονώδης Απάντηση

Μετά την εγκατάσταση της ισχαιμικής βλάβης, η λύση των καρδιακών κυττάρων και η απελευθέρωση των συστατικών τους στην κυκλοφορία οδηγεί σε συσσώρευση πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στην ισχαιμική περιοχή. Τα κύτταρα αυτά εισέρχονται από το ενδοθήλιο των αγγείων και προσελκύονται με χημειοτακτικό τρόπο. Μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση των ουδετεροφίλων είναι η ιντερλευκίνη 8, το συμπλήρωμα 5α, αλλά και το ICAM-1. Ρόλος των πολυμορφοπυρήνων είναι να αποδομήσουν και να ρευστοποιήσουν την περιοχή που έχει νεκρωθεί με τα πρωτεολυτικά ένζυμα που διαθέτουν. Στη συνέχεια τα μακροφάγα που προσελκύονται στην περιοχή φαγοκυτταρώνουν τα προϊόντα της ρευστοποίησης. Μετά την ρευστοποίηση, αρχίζει η οργάνωση του εμφράκτου με τη βοήθεια ινοβλαστών που κινητοποιούνται και παράγουν νέα κολλαγόνα ινίδια στην περιοχή. Έτσι ολοκληρώνεται η οργάνωση της ισχαιμικής περιοχής που έχει νεκρωθεί και δημιουργείται μια ουλή.

Ενδογενές Σύστημα Κυτταροπροστασίας Και Ισχαιμία

Η ισχαιμία και η επαναιμάτωση προκαλούν μια σειρά από βλαπτικές δράσεις στο καρδιακό κύτταρο που μπορούν να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, το ίδιο το κύτταρο διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς τους οποίους κινητοποιεί σε καταστάσεις στρες για να προστατευθεί. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αλλαγή στην έκφραση των πρωτεϊνών του μυοκαρδίου αλλά και ενεργοποίηση συγκεκριμένων μορίων που επιτυγχάνεται με φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών ή μετακίνηση πρωτεϊνών στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Οι αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών επιτυγχάνονται είτε με τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης είτε με αλλαγές στην σταθερότητα του m-RNA, στο μεταφραστικό ρυθμό και στον ρυθμό αποδόμησης των πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί προστασίας του καρδιακού κυττάρου περιλαμβάνουν παράγοντες που επάγονται από την υποξία, όπως είναι ο hypoxia inducible factor (HIF) ενεργοποίηση κινάσων με καρδιοπροστατευτική δράση όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), καθώς και παράγοντες που επάγονται από το θερμικό στρες, όπως είναι ο heat shock factor (HSF), ένας μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει την έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (HSPs).

Hypoxia Inducible Factor (HIF)

Πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα που επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων ιδιαίτερα σημαντικών για την αντοχή του κυττάρου σε συνθήκες στρες. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του HIF προκαλεί την επαγωγή πρωτεϊνών όπως, η συνθάση του NO, ο αυξητικός παράγων του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), ο υποδοχέας του VEGF, η οξυγενάση της αίμης (HO-1), οι πρωτεΐνες μεταφορείς της γλυκόζης (GLUT) και τα περισσότερα από τα ένζυμα της αναερόβιας γλυκόλυσης [30]. Ο παράγοντας HIF αποτελείται από 2 υπομονάδες, τον HIFα και τον HIFβ. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο HIFα συντίθεται και αποδομείται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Κάτω από συνθήκες υποξίας όμως, η αποδόμηση του HIFα αναστέλλεται, αυξάνονται τα επίπεδά του στον πυρήνα όπου συνδέεται με τον HIFβ και ενεργοποιείται το σύμπλεγμα [31, 32] [33] [34]. Η αποδόμηση του HIFα φαίνεται ότι ελέγχεται από μια πρωτεΐνη η οποία περιέχει δακτύλιο αίμης και επομένως είναι ευαίσθητη στις αλλαγές της τάσης του οξυγόνου ([35], [36]). Το αρχικό ερέθισμα δηλαδή για την ενεργοποίηση του παράγοντα HIF είναι η πτώση της μερική τάσης του οξυγόνου, πριν ακόμη συμβεί η πτώση του ATP και η συσσώρευση των μεταβολιτών. Επιπλέον, ο παράγοντας HIF διαθέτει περιοχές πάνω στις οποίες συνδέονται μόρια συν-ενεργοποιητές και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν την λειτουργία του [37],[38].

Πρωτεϊνική Κινάση C

Ο όρος PKC αναφέρεται στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης αποτελούμενης από 12 ισοένζυμα.

Τα ισοένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους στην εξάρτηση για ενεργοποίηση από το ασβέστιο ή από τη διακυλγλυκερολη (DAG) που παράγεται από τη φωσφολιπάση C ή τη φωσφολιπάση D. Οι κλασικές μορφές ή c-PKC (α, βI, βII, και γ) για την ενεργοποίησή τους εξαρτώνται από την παρουσία του ασβεστίου καθώς και του DAG. Οι καινοφανείς μορφές ή n-PKC (δ, ε, η, θ, μ) των οποίων η ενεργοποίηση δεν εξαρτάται από την παρουσία του ασβεστίου. Οι άτυπες μορφές ή a-PKC (ζ, λ, ι) των οποίων η ενεργοποίηση δεν εξαρτάται ούτε από το ασβέστιο, ούτε από το DAG. Συγκεκριμένες ισομορφές μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από τους εστέρες της φορβόλης, από διάφορα φωσφολιπίδια, καθώς και από τα λιπαρά οξέα που παράγονται στα κύτταρα από την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2. Σημειώνεται ότι όλα τα ισοένζυμα ενεργοποιούνται από την φωσφατιδυλσερίνη και αυτή η εξάρτηση

της δραστηριότητας από την φωσφατιδυλσερίνη, είναι που χαρακτηρίζει την δραστηριότητα των PKC από τις άλλες κινάσες της μεμβράνης.

Κάθε μια από αυτές τις ισομορφές περιέχει μια αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή και μια καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή με δραστηριότητα κινάσης. Οι ρυθμιστικές περιοχές όλων των ισομορφών περιέχουν μια αυτοανασταλτική περιοχή, περιοχή ψευδουποστρώματος, που διατηρεί το ένζυμο σε αδρανή κατάσταση.

Η ενεργοποίηση των PKC απαιτεί σε πρώτο χρόνο αποκόλληση του ψευδουποστρώματος παρουσία του συμπαράγοντα και στη συνέχεια μετατόπιση του ισοενζύμου στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκεί ενώνεται με έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα (RACK), ο οποίος είναι ξεχωριστός για κάθε ισοένζυμο και των οποίων η ενεργοποίηση, μπορεί να τροποποιήσει διαφορετικά μονοπάτια του συστήματος MAPK (Πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα) τα οποία με τη σειρά τους ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την υπερτροφία, την κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση ή την αντοχή του κυττάρου στο στρες.

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία του μυοκαρδίου από την ισχαιμία-επαναιμάτωση. Η ενεργοποίηση της PKC ενέχεται στην καρδιοπροστασία που επάγεται από την ισχαιμική προπόνηση [39], [40] [41], [42]. Διαφορετικά ισόμορφα της PKC έχουν μελετηθεί σε σχέση με την καρδιοπροστασία. Η PKCε είναι εκείνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ισχαιμική προπόνηση σε *in vivo* και κυτταρικά μοντέλα [39], [43], [44]

Η PKCε κωδικοποιεί τρία διαφορετικά μηνύματα ανάλογα με τον βαθμό ενεργοποίησής της. Ελαφρώς αυξημένα επίπεδα PKCε προάγουν την καρδιοπροστασία χωρίς υπερτροφία. Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι ενεργοποιεί την συνιστώσα της ERK, του συμπλέγματος της MAPK. Επιπλέον, σε αυτή την καρδιοπροστατευτική δράση προστίθεται και η αντί-αποπτωτική δράση σε επίπεδο μιτοχονδρίων. Μία επιπλέον αύξηση των επιπέδων της PKCε, διατηρώντας τα σε μεσαία επίπεδα, προκαλεί καρδιακή υπερτροφία χωρίς ανεπάρκεια. Η υψηλή συγκέντρωση PKCε προκαλεί υπερτροφία με καρδιακή ίνωση και ανεπάρκεια. Σε αυτή την περίπτωση, έχουμε ενεργοποίηση της συνιστώσας του JNK στο σύστημα της MAPK και επιπλέον, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του PKCε, την δυνατότητά του τελευταίου, να αντιμετωπίζεται και να ενεργοποιεί τον ενδοκυττάριο υποδοχέα (RACK1) του PKCβII (RACK- mediated PKC isoform switching), ο οποίος προάγει τον

υπερτροφικό και ανεπαρκούντα μυοκαρδιακό φαινότυπο [45]. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι έχει η PKCε στον έλεγχο της προσκόλησης και της μετανάστευσης των ινοβλαστών μέσω της στενής σχέσης ανάμεσα στη PKCε και στην β1-ιντεγκρίνη επιτρέποντας έτσι μια αμφίδρομη επικοινωνία ανάμεσα στο μυοκύτταρο και τον εξωκυττάριο χώρο.

Η PKCα αποτελεί την κύρια ισομορφή τόσο στον άνθρωπο όσο και στους επιμύες. Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει την ενεργοποίηση της PKCα με την καρδιακή υπερτροφία, την διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και την ισχαιμική βλάβη. Επιπλέον η μη-παραγωγή μυοκαρδιακής PKCα από γενετικά τροποποιημένους επιμύες (PKCα^{-/-}), αυξάνει την συσπαστικότητα της καρδιάς ενώ σε διαγονιδιακούς επιμύες η υπερέκφραση της PKCα οδήγησε σε σοβαρή δυσλειτουργία της κοιλίας, λόγω διαταραχών στην ομοιόσταση του ασβεστίου και καταστολή της συστολής των μυοϊνιδίων εξαιτίας της φωσφορυλίωσης της τροπονίνης (cTnI και cTnT) [46].

Φαίνεται λοιπόν, ότι η PKCα μπορεί να δράσει σαν ένα ήπιο ινότροπο, το οποίο δεν παρουσιάζει απευαισθητοποίηση και εξαιτίας της δράσης του τόσο μέσω της SERCA όσο και των μυοϊνιδίων, παρουσιάζεται πιο ασφαλές σε σχέση με τα ινότροπα τα οποία αυξάνουν τα επίπεδα του cAMP. Υποθετικά, αυτή η στοχευμένη αύξηση της καρδιακής συσταλτικότητας στην ανεπαρκούσα καρδιά, μέσω της αναστολής της PKCα, θα μπορούσε να αναστείλει το νευροενδοκρινές ερέθισμα που προάγει τη καρδιακή αναδιαμόρφωση [47].

Η PKCδ παίζει επίσης ένα σημαντικό ρόλο στη φαρμακολογική ισχαιμική προπόνηση σε μοντέλο απομονωθέντων νεογνικών καρδιομυοκυττάρων [48], [49]. Το συγκεκριμένο ισόμορφο της PKC που ενέχεται κάθε φορά στην καρδιοπροστασία φαίνεται να εξαρτάται από το ερέθισμα που χρησιμοποιείται για την πρόκληση ισχαιμικής προπόνησης και ίσως από το είδος που μελετάται κάθε φορά.

Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα ερεθίσματα («Mitogen activated protein kinases ή MAPKs»)

Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων με την ονομασία «mitogen activated protein kinases ή MAPKs» έχει σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική απάντηση του μυοκαρδίου στο ισχαιμικό στρες [50]. Αρκετά δεδομένα δείχνουν ότι μέρος της κυτταρικής απάντησης στο ισχαιμικό στρες περιλαμβάνει ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας των MAPKs, όπως η p38 MAPK και οι JNKs [51]. Σε μοντέλα απομονωθείσας καρδιάς επίμυος, η p38 MAPK ενεργοποιείται από την ολική ισχαιμία

και η ενεργοποίηση της διατηρείται και κατά την επαναιμάτωση [52] [53] [54] [55], ενώ οι JNKs ενεργοποιούνται μόνο κατά την επαναιμάτωση [52] [54], [56]. Δεν έχει διευκρινιστεί εάν η ενεργοποίηση των κινασών αυτών είναι βλαπτική για την επιβίωση του κυττάρου ή είναι μέρος ενός προστατευτικού μηχανισμού έναντι της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι η διάρκεια ή/και η ένταση του ερεθίσματος καθορίζουν τον τρόπο ενεργοποίησής τους και το αποτέλεσμα, ευεργετικό ή βλαπτικό, που έχουν στην κυτταρική επιβίωση μετά από στρες. Συγκεκριμένα, μια παροδική ενεργοποίηση της p38 MAPK δεν βλάπτει αλλά μπορεί και να ωφελεί την κυτταρική αντοχή στο στρες, ενώ παρατεταμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK επάγει τον κυτταρικό θάνατο [57] [58], [59]. Παρόμοια συμπεράσματα αναφέρονται και για την ενεργοποίηση των JNKs μετά από ποικίλα είδη στρες [60].

Πρωτεΐνες Θερμικής Καταπληξίας

Εισαγωγή

Η ανακάλυψη των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (HSPs) έγινε πριν από 40 χρόνια με την παρατήρηση ότι η έκθεση της Δροσόφιλας σε υψηλές θερμοκρασίες είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας νέας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάστηκαν έτσι από το ερέθισμα που επάγει την έκφρασή τους. Ωστόσο, οι μελέτες που επακολούθησαν για τις πρωτεΐνες αυτές έδειξαν ότι εκφράζονται και σε συνθήκες ηρεμίας, ενώ επάγονται ακόμη περισσότερο μετά από ποικίλα είδη στρες (όχι μόνο μετά το θερμικό στρες) και μετά από ερεθίσματα ορμονικά αλλά και χημικά. Επιπλέον, η έκφραση τους παρατηρείται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς όπως στα βακτήρια, στα θηλαστικά και στον άνθρωπο [61]. Αυτή η διατήρηση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας κατά την εξελικτική διαδικασία δεν αφορά μόνο το φάσμα των οργανισμών που συναντώνται αλλά και τις ίδιες τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν αξιοθαύμαστη ομοιότητα στους διάφορους οργανισμούς. Συγκεκριμένα η HSP90 των θηλαστικών παρουσιάζει 78% ομοιότητα αμινοξέων με την αυτή της Δροσόφιλας [61]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην άποψη ότι οι πρωτεΐνες αυτές πρέπει να είναι εξαιρετικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου ειδικά κάτω από συνθήκες στρες. Πράγματι, σήμερα γνωρίζουμε ότι επιτελούν βασικές κυτταρικές λειτουργίες και αποτελούν σημαντικότατο κομμάτι της προσαρμοστικής απάντησής στο στρες. Μια από τις κύριες λειτουργίες τους είναι η ιδιότητα να δρουν ως χαπερονίνες (από την λέξη chaperones που σημαίνει μόρια που προστατεύουν τις πρωτεϊνικές δομές) και να

διευκολύνουν την αναδίπλωση, μετακίνηση και σωστή στερεοδιαμόρφωση των πρωτεϊνών [62]

Πρωτεΐνες Θερμικής Καταπληξίας Και Καρδιοπροστασία

Οι Currie και συν. για πρώτη φορά απέδειξαν ότι η έκθεση επιμύων σε υψηλή θερμοκρασία για μικρό διάστημα και η υποβολή της καρδιάς των επιμύων αυτών σε ισχαιμία οδηγεί σε αυξημένη λειτουργική ανάκαμψη του μυοκαρδίου, σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς κατά Langendorff [63]. Επιπλέον, η βλάβη επαναιμάτωσης που μετρήθηκε με την απελευθέρωση της κρεατίνης κινάσης βρέθηκε μειωμένη στις καρδιές που υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες. Τα αποτελέσματα αυτά για πρώτη φορά έδειξαν ότι ένα ερέθισμα που επάγει τη παραγωγή πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας σε ολόκληρη καρδιά, παράγει ένα προστατευτικό αποτέλεσμα έναντι μιας επικείμενης ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Η αρχική μελέτη των Currie και συν. επεκτάθηκε και επιβεβαιώθηκε από άλλους ερευνητές σε πειραματικά μοντέλα μελέτης απομονωθείσας καρδιάς [64] [65]. Ακολούθησε αναπαραγωγή των μελετών αυτών σε *in vivo* μοντέλο. Συγκεκριμένα, οι Donnelly και συν. έδειξαν ότι η έκθεση επίμυων σε θερμικό στρες οδηγεί σε μείωση της νέκρωσης της καρδιάς που επάγεται μετά από διακοπή της αιμάτωσης της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας για 35 min [66]. Επιπλέον, οι Marber και συν. κατάφεραν να δείξουν ότι μικρά επαναλαμβανόμενα επεισόδια ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (5 λεπτών) επάγουν την παραγωγή HSPs και μειώνουν την έκταση του εμφράγματος όταν οι καρδιές αυτές υποβληθούν σε ισχαιμία 30 λεπτών σε *in vivo* μοντέλο [67]). Ορισμένες μελέτες συσχετίζουν το προστατευτικό αποτέλεσμα που επάγεται με το ποσό των HSPs που παράγεται από το ερέθισμα. Αυτό κυρίως έχει δειχθεί για την HSP70 πρωτεΐνη [68, 69].

Έκφραση Των Πρωτεϊνών Θερμικής Καταπληξίας

Η σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας επάγεται ως απάντηση σε ποικίλες μορφές κυτταρικού στρες, συμπεριλαμβανομένης της υπερθερμίας, της υποξίας, της ισχαιμίας και της μηχανικής τάσης [70]. Η απάντηση αυτή προϋποθέτει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα heat shock factor 1 (HSF1) που είναι ο μεσολαβητής μεταξύ ερεθίσματος και έκφρασης των HSPs. Φαίνεται ότι ο HSF1 ενεργοποιείται από την έλλειψη του ATP, την αύξηση της θερμοκρασίας και την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Σημαντικό επίσης ερέθισμα είναι και ο σχηματισμός αποδιαταγμένων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η χορήγηση σε κυτταροκαλλιέργειες αναλόγων αμινοξέων που οδηγούν στο σχηματισμό

κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ενεργοποιεί τον HSF1. Σε συνθήκες ηρεμίας, ο HSF1 διατηρείται στον πυρήνα του κυττάρου σε ανενεργό μορφή και είναι συνδεδεμένος σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα μαζί με την HSP90, HSP70 και την p23 πρωτεΐνη [71]. Η διάσπαση του πρωτεϊνικού αυτού συμπλέγματος οδηγεί στην αλλαγή της στερεοδιαμόρφωση του HSF1 και επάγει το σχηματισμό ομοειδών τριμερών. Τα τριμερή αυτά του HSF1 συνδέονται με αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του μοτίβου (nGAAn) που βρίσκονται στα γονίδια στόχους που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας και επάγουν τη μεταγραφή τους. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του HSF1 αποτελεί ένα επιπρόσθετο ρυθμιστικό μηχανισμό της ενεργότητάς του ως μεταγραφικού παράγοντος [72]. Στα κύτταρα των θηλαστικών, υπάρχουν άλλες τρεις ισομορφές του HSF (HSF2-4) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, αλλά δεν αρκούν για την απάντηση στο θερμικό στρες όταν δεν υπάρχει ο HSF1 [73],[74, 75]. Συγκεκριμένα, σε γενετικώς τροποποιημένα ποντίκια με έλλειψη του HSF1, η απάντηση στο θερμικό στρες καταργείται ([75]). Χημικά ερεθίσματα (αλκοόλη, σαλικυλικά, αρσενικό) που επάγουν τις HSPs, δεν ενεργοποιούν in vitro τον HSF1 και πιστεύεται ότι δρουν μέσω του σχηματισμού αναδιατεταγμένων πρωτεϊνών [76]

Λειτουργίες Των Πρωτεϊνών Θερμικής Καταπληξίας

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας επιτελούν μια σειρά από λειτουργίες σημαντικές για την επιβίωση του κυττάρου σε συνθήκες ηρεμίας αλλά κυρίως κάτω από συνθήκες στρες και αποτελούν μέρος της προσαρμοστικής απάντησης του κυττάρου στις συνθήκες αυτές. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας φαίνεται να επιτελούν τις παρακάτω λειτουργίες [75]

α) Συνδέονται παροδικά με τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και καθυστερούν την αναδίπλωσή τους μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση του πολυπεπτιδίου.

β) Διατηρούν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση για να είναι δυνατή η μεταφορά τους διαμέσω των μεμβρανών των οργανιδίων του κυττάρου.

γ) Εξασφαλίζουν τη σωστή επαναδιάταξη των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και αναστέλλουν τη συσσωμάτωση και καθίζησή τους. Βοηθούν με τον τρόπο αυτό αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες να αποκτήσουν και πάλι τη λειτουργική δραστηριότητά τους.

δ) Κατευθύνουν τις μη αναστρέψιμα μετουσιωμένες πρωτεΐνες προς αποδόμηση.

ε) Βοηθούν στην αποσύνθεση τοξικών μεταβολιτών από τα πρωτεασώματα και συμμετέχουν στην επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων που πραγματοποιείται στα Β-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα.

στ) Διατηρούν το σύμπλεγμα του στεροειδούς αποϋποδοχέα σε στερεοδιαμόρφωση που παρουσιάζει αυξημένη συγγένεια με τον μόριο που συνδέεται με αυτόν.

ζ) Ασκούν ανασταλτική δράση στους μηχανισμούς απόπτωσης που επάγονται μετά από διάφορα είδη στρες και ερεθίσματα (TNF-α, ceramide).

η) Σταθεροποιούν και ενισχύουν τον κυτταροσκελετό και ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης.

Κατηγορίες Πρωτεϊνών Θερμικής Καταπληξίας

Οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας μπορούν να διαχωριστούν στις ακόλουθες ομάδες:

HSPs υψηλού μοριακού βάρους: Σ' αυτήν περιλαμβάνονται τέσσερις εκπρόσωποι: HSP110, HSP90α, HSP90β και GRP (glucose responsive protein). Οι HSP90α και HSP90β παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητας τους να ρυθμίζουν τους υποδοχείς των στεροειδών και να συνεργάζονται με την HSP70.

Πρωτεΐνες HSP70: Σ' αυτήν περιλαμβάνονται τρεις εκπρόσωποι, η HSP72, HSP73 και η GRP (glucose responsive protein) 78. Η HSP73 εκφράζεται σταθερά και συστηματικά σε όλα τα κύτταρα και η έκφραση της αυξάνεται ελάχιστα μετά την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων. Λέγεται και *μη επαγωγίμη HSP70 (constitutive) ή HSC*. Η HSP72 επάγεται κυρίως κάτω από συνθήκες στρες και λέγεται και *επαγωγίμη HSP70 (inducible)*. Η GRP78 εντοπίζεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η έκφρασή της τροποποιείται ανάλογα με τα επίπεδα της γλυκόζης. Η HSP70 είναι η περισσότερο μελετημένη οικογένεια των HSPs.

Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας: Σ' αυτήν περιλαμβάνονται δυο εκπρόσωποι, η HSP60 και HSP10. Αυτές εντοπίζονται στα

μιτοχόνδρια και συνεργάζονται για να επιτευχθεί σωστή στερεοδιαμόρφωση των πρωτεϊνών. Ανάλογη της HSP60 στα βακτήρια είναι η πρωτεΐνη GroEL.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΑΤΑΠΛΗΞΙΑΣ**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ - ΔΡΑΣΕΙΣ**

1. HSPs υψηλού μοριακού βάρους	<ul style="list-style-type: none">• Αναστολή απόπτωσης• Προστασία μέσω NO
2. Πρωτεΐνες HSP70	<ul style="list-style-type: none">• Αναστολή απόπτωσης• Προστασία μέσω NO• Προστασία από ελεύθερες ρίζες• Αναστολή κυτοκινών• Επαναδιάταξη πρωτεϊνών
3. Μιτοχονδριακές χαπερονίνες	<ul style="list-style-type: none">• Αναστολή απόπτωσης• Προστασία μιτοχονδρίων
4. Πρωτεΐνες HSP40	Οχι πλήρως διευκρινισμένος ρόλος
5. HSP32 (οξυγενάση της αίμης)	<ul style="list-style-type: none">• Προστασία από ελεύθερες ρίζες• Αναστολή απόπτωσης• Προστασία μιτοχονδρίων
6. αΒ-κρυσταλλίνη	<ul style="list-style-type: none">• Αναστολή απόπτωσης• Προστασία κυτταροσκελετού• Επαναδιάταξη πρωτεϊνών
7. Ουμπικουΐνη	<ul style="list-style-type: none">• Διευκόλυνση της αποδόμησης των μετουσιωμένων πρωτεϊνών
8. HSP27	<ul style="list-style-type: none">• Αναστολή απόπτωσης30 • Προστασία από ελεύθερες ρίζες

	<ul style="list-style-type: none"> • Προστασία κυτταροσκελετού • Επαναδιάταξη πρωτεϊνών
--	---

Πρωτεΐνες HSP40: Σ' αυτήν περιλαμβάνονται δυο εκπρόσωποι, η HSP40, η οποία συνεργάζεται με την HSP70 αλλά ο ρόλος της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος και η HSP47, μια γλυκοπρωτεΐνη, που έχει την ικανότητα να συνδέεται με το κολλαγόνο.

HSPs μικρού μοριακού βάρους: Σ' αυτήν περιλαμβάνονται τέσσερις εκπρόσωποι, η HSP32, η **HSP27**, η αΒ-κρυσταλλίνη και η ουμπικουΐνη. Η HSP32 λέγεται και οξυγενάση της αίμης (HO) και εμφανίζει τρεις ισομορφές HO-1, HO-2 και HO-3. Η HSP27 και η αΒ-κρυσταλλίνη έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταροσκελετό

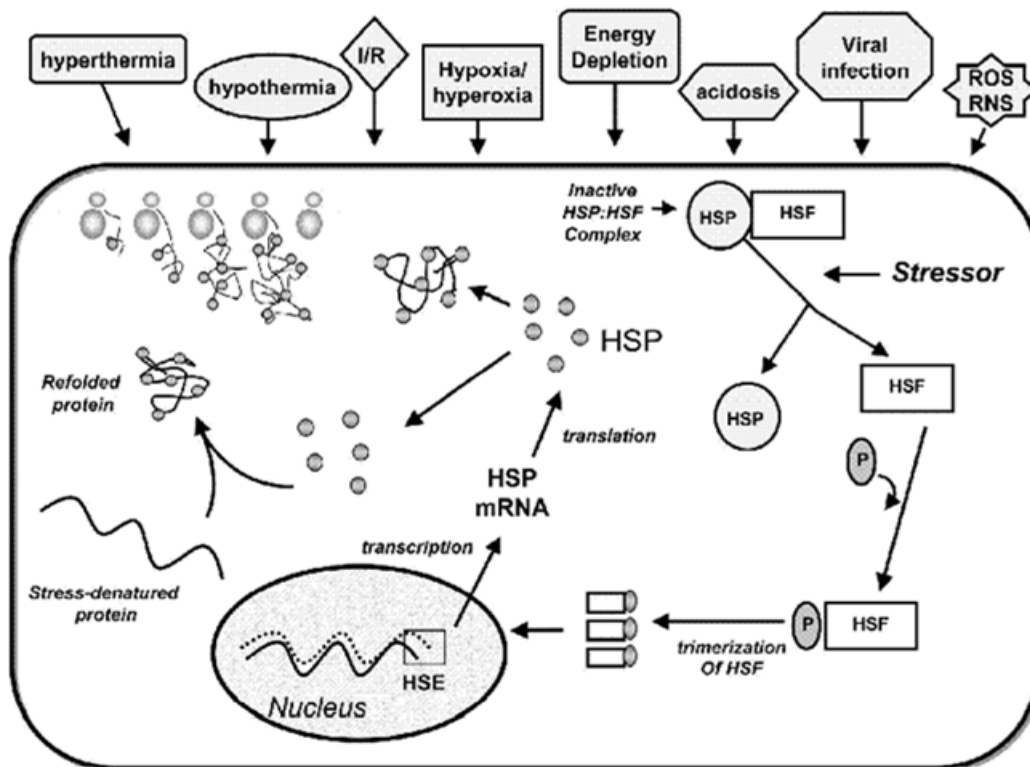
Πρωτεΐνες HSP70

Τα μέλη της ομάδος των HSP70 πρωτεϊνών βρίσκονται σε αφθονία στα ευκαρυωτικά κύτταρα και έχουν ευρέως μελετηθεί. Στο κυτοσόλιο η HSP70 συνδέεται με τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια πριν απελευθερωθούν από τα ριβοσώματα ή με κακώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Όλα τα μέλη της HSP70 διαθέτουν δυο διακριτές περιοχές: μια N-τελική περιοχή με ιδιότητα ATPάσης και μια C-τελική περιοχή με ικανότητα σύνδεσης με υδρόφοβα πεπτίδια των υποστρωμάτων-στόχων [77, 78]. Η σύνδεση αυτή που πραγματοποιείται με κατανάλωση ATP, απομονώνει τις υδρόφοβες αλληλουχίες από το γύρω περιβάλλον και στη συνέχεια η ελεγχόμενη απελευθέρωση της πρωτεΐνης επιτρέπει την προοδευτική στερεοδιαμόρφωσή της με το σωστό τρόπο. Η HSP40 συνδέεται με τις κακώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και με την HSP70 σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να ακολουθήσει τρεις διαφορετικούς δρόμους ανάλογα με την αντικατάσταση της HSP40 από τις πρωτεΐνες Hip (HSP70 interacting protein), Hop (HSP70/ HSP90 organizing protein) και Har (HSP70 accessory protein) [79], [80], [81]. Η Hip συνδέεται με την περιοχή ATPάσης της HSP70 και διεγείρει τη δραστηριότητα της σταθεροποιώντας ταυτόχρονα το σύμπλεγμα. Η Hop λειτουργεί σαν ένας φυσικός συνδετικός κρίκος μεταξύ HSP70 και

HSP90 διευκολύνοντας τη μεταφορά κακώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μεταξύ τους. Η Har διεγείρει την απελευθέρωση των πολυπεπτιδίων από την HSP70 αλλά ο ρόλος της είναι μερικώς μόνο διευκρινισμένος. Σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία έχει η ενέργεια που προκύπτει από την υδρόλυση του ATP, η οποία χρησιμοποιείται σε διαδοχικά βήματα για να βοηθήσει στην αναδίπλωση και να αποτρέψει την συσσωμάτωση και καθίζηση των πολυπεπτιδίων.

Ο ρυθμιστικός ρόλος της HSP70 είναι σημαντικός σε σχέση και με τα μονοπάτια ενεργοποίησης των μηχανισμών απόπτωσης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η HSP70 αναστέλλει το σύμπλεγμα ολιγομερών της πρωτεΐνης Araf-1 που ενεργοποιεί την κασπάση-9 και τον μηχανισμό απόπτωσης [82],[83]. Επιπλέον, η HSP70 φαίνεται ότι αναστέλλει το μηχανισμό απόπτωσης και με άλλο τρόπο ανεξάρτητο του μονοπατιού των πρωτεολυτικών ενζύμων, των κασπασών. Αυτή η δράση έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με την ικανότητα της HSP70 να αναστέλλει την JNK κινάση (c-jun N-terminal kinase) η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του αποπτωτικού

κυτταρικού θανάτου από ορισμένα ερεθίσματα [84], [85]. Η καρδιοπροστατευτική δράση της HSP70 έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες. Υπερέκφραση της HSP70 σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, είχε ως αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων αυτών από επικείμενη έκθεση σε θερμικό ή ισχαιμικό στρες σε σχέση με αυτά που δεν υπερέκφραζαν HSP70 [86], [87]. Στη συνέχεια, οι Cumming και συν. έδειξαν παρόμοια προστασία έναντι ισχαιμικού ή θερμικού στρες σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων καρδιακών κυττάρων επίμυος που υπερέκφραζαν διαγονιδιακά την HSP70, [88]. Μελέτες σε καρδιακά κύτταρα, χρησιμοποιώντας πιο αποτελεσματικές μεθόδους διαγονιδιακής υπερέκφρασης της HSP70, επιβεβαίωσαν την προστασία έναντι ισχαιμικού στρες και έδειξαν για πρώτη φορά τη ικανότητα της HSP70 να αναστέλλει το μηχανισμό της απόπτωσης [89]. Τα τελευταία χρόνια έγινε εφικτή η παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν την HSP70 στην καρδιά και σε άλλους ιστούς. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι καρδιές των ποντικών αυτών είναι προστατευμένες έναντι της ισχαιμίας όπως εκτιμήθηκε από τη μείωση της έκτασης του εμφράκτου, της απελευθέρωσης της κρεατίνης κινάσης και τη διόρθωση της μεταβολικής οξέωσης [90], [91], [92]



Εικόνα 3 φυσιολογικοί οδοί ενεργοποίησης της HSP70

Πρωτεΐνη Θερμικής Καταπληξίας 27 (Hsp27)

Η HSP27 είναι μια πρωτεΐνη θερμικής καταπληξίας μικρού μοριακού βάρους (27 KDa) των θηλαστικών. Ονομάζεται και HSP25 εξαιτίας μιας μορφής της πρωτεΐνης με ελαφρώς μικρότερο μοριακό βάρος που εμφανίζεται σε ορισμένα θηλαστικά (χοίρος, ποντίκι). Έχει διατηρηθεί φυλογενετικά σε μεγάλο βαθμό και εκφράζεται σε πολλούς ιστούς όπως οι σκελετικοί μύες, η καρδιά, ο φακός του οφθαλμού, οι πνεύμονες, ο στόμαχος και το δέρμα [93]. Επιπλέον, ανιχνεύεται σε μεγάλες ποσότητες σε παθήσεις όπως η νόσος του Alzheimer και σε αρκετά νεοπλάσματα [94], [95]

Δομή Και Μορφές Της Hsp27

Η HSP27, όπως και οι άλλες πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας μικρού μοριακού βάρους, θεωρείται ότι διαθέτει σφαιρική δομή. Αποτελείται από δυο διακριτές περιοχές. Η μία περιοχή είναι η C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης που είναι κοινή για όλες τις HSPs χαμηλού μοριακού βάρους. Η N-τελική περιοχή είναι διαφορετική και περιέχει μια υδρόφοβη περιοχή. Η δομή της HSP27 είναι τέτοια που σχηματίζει μια κοιλότητα στο κέντρο μέσα στην οποία βρίσκεται καλυμμένη η υδρόφοβη περιοχή διατηρώντας όμως επαφή με το γύρω κυτταρικό περιβάλλον [96],[97] Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν

δείξει ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου σχηματίζει ολιγομερή συμπλέγματα που έχουν μοριακό βάρος από 200 έως 800 KDa. Συγκεκριμένα, οι Lambert και συν. έδειξαν σε κυτταροκαλλιέργειες ότι η μορφή της HSP27 που κυριαρχεί σε φυσιολογικές συνθήκες είναι ένα σύμπλεγμα με μοριακό βάρος 700 KDa ενώ ταυτόχρονα ανευρίσκονται και τετραμερή, διμερή και μονομερή σε πολύ μικρότερο βαθμό. [98]. Οι Rogalla και συν. αναφέρουν επίσης ότι η HSP27 φυσιολογικά υπάρχει σε ένα σύμπλεγμα μοριακού βάρους 530 KDa (24-μέρη), ενώ ανιχνεύονται σε μικρά ποσά τετραμερή και διμερή [99]. Σε μια άλλη μελέτη, οι Ehnsparger και συν. έδειξαν την ύπαρξη της HSP25 σε συμπλέγματα των 400 KDa (16-μερη) ενώ ανιχνεύτηκαν τετραμερή και διμερή [100]. Με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα συμπλέγματα αυτά φαίνονται ως σφαιρικές δομές μεγέθους 10-25 nm [101]. Τα διαφορετικά βιβλιογραφικά δεδομένα σε σχέση με μέγεθος των συμπλεγμάτων της HSP27 πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικά είδη κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες αυτές.

Σε αποδιατακτικές συνθήκες τα μεγαλομοριακά συμπλέγματα της HSP27 διασπώνται σε τετραμερή και διμερή, μια διαδικασία που είναι αναστρέψιμη μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών [100]. Για το λόγο αυτό, τα διμερή και τετραμερή έχουν θεωρηθεί ως οι δομικές μονάδες από τις οποίες δημιουργούνται τα συμπλέγματα. Επιπρόσθετα, μετά από αύξηση της θερμοκρασίας τα συμπλέγματα αυτά έχουν την τάση να αυξάνουν σε μέγεθος σχηματίζοντας συσσωματώματα που ξεπερνούν το 1 MDa.

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο σχηματισμός των ολιγομερών βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις των μορίων της HSP27 σε 2 περιοχές. Η μια περιοχή βρίσκεται στο C-τελικό άκρο ανάμεσα στα αμινοξέα 94-178 και θεωρείται ότι είναι μια β-δομή, ενώ η άλλη περιοχή βρίσκεται στο N-τελικό άκρο. Οι περιοχές αυτές θεωρούνται απαραίτητες για το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των συμπλεγμάτων, ενώ η αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής τους μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση σε μικρότερα ολιγομερή [98]

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην στερεοδιαμόρφωση αλλά και στις λειτουργίες της HSP27 παίζει η φωσφορυλίωση που υφίσταται σε διάφορες θέσεις όπου υπάρχει το αμινοξύ σερίνη. Τόσο η ανθρώπινη HSP27 όσο και η HSP27 του επίμου διαθέτουν δυο θέσεις φωσφορυλίωσης, μία στο αμινοξύ σερίνη 15 (στην υδρόφοβη περιοχή) και μία στο αμινοξύ σερίνη 82. Η ανθρώπινη HSP27 έχει επιπλέον μια θέση φωσφορυλίωσης

στην σερίνη 78, ενώ στην HSP27 του επίμυ αυτό έχει αντικατασταθεί από την ασπαραγίνη [98]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η HSP27 βρίσκεται κυρίως σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή και σε ένα ποσοστό σε μονοφωσφορυλιωμένη μορφή. Η φωσφορυλίωσή της επάγεται μετά από διάφορα είδη στρες και φαίνεται ότι έχει ως συνέπεια την διάσπαση των ολιγομερών συμπλεγμάτων. Συγκεκριμένα μελέτες που βασίστηκαν σε μεταλλάξεις του γονιδίου της HSP27 στις θέσεις που φωσφορυλιώνεται έδειξαν ότι φωσφορυλίωση της θέσης 15 ή 82 οδηγεί σε μείωση των ολιγομερών συμπλεγμάτων και αύξηση των μικρότερων συμπλεγμάτων, αλλά μόνο φωσφορυλίωση και των δυο θέσεων οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας σχηματισμού των ολιγομερών συμπλεγμάτων [98] [99]. Φαίνεται ότι οι φωσφορυλίωσεις προκαλούν αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση του μορίου με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι περιοχές που αλληλεπιδρούν τα μόρια της HSP27 μεταξύ τους.

Καθοριστικό στοιχείο της τεταρτοταγούς δομής της HSP27 φαίνεται να είναι και η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε δυο μόρια HSP27. Οι δεσμοί αυτοί δημιουργούνται ανάμεσα στα αμινοξέα κυστεΐνης δυο μορίων HSP27 της θέσης 141. Αυτό είναι και το μόνο αμινοξύ κυστεΐνης που διαθέτει η HSP27. Συγκεκριμένα, οι Eaton και συν. έδειξαν ότι μετά από προκλητή δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στο πρωτεϊνικό κλάσμα καρδιάς επίμυος, τα ολιγομερή συμπλέγματα της HSP27 διασπώνται σε μικρότερου μοριακού βάρους συμπλέγματα [102]. Το παραπάνω φαινόμενο πραγματοποιήθηκε παρουσία αναστολέων της φωσφορυλίωσης. Επομένως, η δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα στα μόρια της HSP27, όπως συμβαίνει σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση των συμπλεγμάτων σε τετραμερή ή διμερή ανεξάρτητα από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του μορίου [102]

Πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν την παρουσία ολιγομερών συμπλεγμάτων που αποτελούνται όχι μόνο από την HSP27 αλλά περιέχουν και μόρια αΒ-κρυσταλίνης. Η μεγάλη συγγένεια των δυο αυτών πρωτεϊνών φαίνεται ότι τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να σχηματίζουν ετερο-ολιγομερή συμπλέγματα [93].

Χαπερονική Δράση Της Hsp27

Η HSP27 όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας διαθέτει σημαντική χαπερονική δράση βοηθώντας στην αναδίπλωση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι Jacob και συν. έδειξαν ότι η παρουσία της HSP27

αναστέλλει την μετουσίωση και κροκύδωση πρωτεϊνών σε υψηλή θερμοκρασία in vitro [103]. Η ιδιότητα αυτή της HSP27 είναι ανεξάρτητη της παρουσίας ATP, το οποίο είναι απαραίτητο για άλλες HSPs. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η παρουσία της HSP27 επιβραδύνει σημαντικά την απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου α-γλυκοσιδάση σε υψηλή θερμοκρασία, ενώ αυξάνει το ποσοστό του ενζύμου που επανέρχεται στην φυσιολογική τριτοταγή του δομή όταν η θερμοκρασία επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα [103]. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ιδιότητα αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της HSP27. Το προτεινόμενο μοντέλο με το οποίο ασκεί η HSP27 την χαπερονική της δράση περιλαμβάνει προσρόφηση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών πάνω στην επιφάνεια των συμπλεγμάτων της HSP27, αναστολή της συσσωμάτωσης και καθίζησης των πρωτεϊνών και διατήρησή τους σε μια κατάσταση όπου μπορούν να επανακτήσουν την φυσιολογική τους δομή. Αυτό επιτυγχάνεται με την επακόλουθη δράση άλλων πρωτεϊνών όπως η HSP70 και την κατανάλωση ATP [100],[103]. Άλλες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η HSP27 μπορεί να δράσει και ως συνοδευτικό μόριο που βοηθά την αποδόμηση από τα πρωτεοσώματα μετουσιωμένων πρωτεϊνών που δεν καταφέρνουν να αναδιπλωθούν.

Η χαπερονική δράση της HSP27 ασκείται κυρίως από τα ολιγομερή συμπλέγματα και τα κοκκία. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μονομερή, διμερή και τετραμερή διαθέτουν πολύ μικρή χαπερονική ικανότητα. Συγκεκριμένα, οι Rogalla και συν. αναφέρουν ότι η πλήρως φωσφορυλιωμένη μορφή της HSP27 που δεν είναι ικανή να σχηματίζει ολιγομερή, δεν μπορεί να δράσει αποτελεσματικά ως χαπερονίνη [99]. Φαίνεται πως τα μεγάλα ολιγομερή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ισχυρή σύνδεση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και την προστασία τους.

Hsp27 Και Κυτταροσκελετός

Η HSP27 είναι μια πρωτεΐνη που διαδραματίζει καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό και στην σταθεροποίηση των νηματίων της ακτίνης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μικρονημάτια αυτά σχηματίζουν τον κυτταρικό φλοιό που στηρίζει την κυτταρική μεμβράνη. Έχουν μορφή διπλής έλικας και σχηματίζονται με πολυμερισμό των μονομερών της ακτίνης. Κάθε νημάτιο εμφανίζει πολικότητα, με το αρνητικό ή οξύ άκρο και το θετικό άκρο. Το θετικό άκρο έχει την ικανότητα να προσδένει ελεύθερα μόρια ακτίνης και να επιμηκύνει το δεμάτιο με γρήγορο ρυθμό. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, μόρια ακτίνης προσδένονται στο θετικό άκρο και αποκολλώνται από το αρνητικό άκρο με τον ίδιο ρυθμό, διατηρώντας τη δυναμική δομή

του νηματίου σταθερή. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών προσδένεται πάνω στα μόρια της ακτίνης και ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά την διαδικασία του πολυμερισμού [104]. Η HSP27 έχει από νωρίς αναγνωριστεί ως μια πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να προσδένεται πάνω στο θετικό άκρο των νηματίων της ακτίνης και αναστέλλει τον πολυμερισμό προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξής τους [105]. Η ανασταλτική αυτή δραστηριότητα της HSP27 έχειδειχθεί ότι εξαρτάται από το βαθμό φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Μόνο η μονομερής και μη φωσφορυλιωμένη HSP27 έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης, ενώ τα φωσφορυλιωμένα μονομερή ή τα ολιγομερή δεν παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες [106]. Επιπλέον, η ανασταλτική δράση της HSP27 στον πολυμερισμό της ακτίνης χάνεται με τη δημιουργία διμερών που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ τους λόγω αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωση που υφίστανται το μόριο [105]. Είναι σημαντικό ότι ερεθίσματα που επάγουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες, προκαλούν φωσφορυλίωση της HSP27 και επάγουν τον σχηματισμό πυκνού και δυνατού κυτταροσκελετού.

Από *in vitro* πειράματα, φαίνεται ότι υπάρχει μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και HSP27. Συγκεκριμένα, έχει περιγραφεί ότι η αλληλουχία των αμινοξέων στις περιοχές αλληλεπιδράσεις δυο μορίων ακτίνης μεταξύ τους σχηματίζει μια β-δομή και παρουσιάζει δομική αναλογία με την αλληλουχία των αμινοξέων της HSP27 στις θέσεις 159-168 που επίσης σχηματίζουν μια β-δομή [107]. Έτσι η HSP27 μπορεί να μιμηθεί ένα μονομερές ακτίνης, να συνδεθεί πάνω στο θετικό άκρο του μικρονηματίου και να αναστείλλει περαιτέρω ανάπτυξή του.

Τα φωσφορυλιωμένα μονομερή της HSP27 όχι μόνο δεν αναστέλλουν τον πολυμερισμό των νηματίων της ακτίνης αλλά προστατεύουν και ενισχύουν τον κυτταροσκελετό. Υπερέκφραση της φωσφορυλιούμενης μορφής της HSP27 προκαλεί προστασία του κυτταροσκελετού από έκθεση σε παράγοντες που έχουν την ικανότητα να τον διασπούν και να τον αποδιοργανώνουν. Τέτοιοι παράγοντες είναι η κυτοχλασίνη-D και αντικαρκινικά φάρμακα [108]. Υπερέκφραση της φωσφορυλιούμενης μορφής της HSP27 σε κυτταροκαλλιέργειες προκαλεί αύξηση των νηματίων ακτίνης στον κυτταρικό φλοιό και σχετίζεται με αυξημένη αντοχή των κυττάρων έναντι θερμικού ή οξειδωτικού στρες. Η αντοχή αυτή οφείλεται σε αυξημένη σταθερότητα των μικρονηματίων της ακτίνης και σε ταχύτερη επαναδιοργάνωση της διαταραγμένης δομής τους [109]. Αντίθετα, οι παραπάνω ιδιότητες της HSP27 δεν

εμφανίζονται όταν υπερεκφράζεται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο το οποίο παράγει πρωτεΐνη μη ικανή να φωσφορυλιωθεί.

Το προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης της HSP27 με τον κυτταροσκελετό παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.

Hsp27 Και Απόπτωση

Η HSP27 φαίνεται ότι ρυθμίζει τον αποπτωτικό μηχανισμό με πολλούς τρόπους. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης ακολουθεί κυρίως δύο δρόμους: έναν εξωγενή δρόμο που αφορά τους παράγοντες Fas και TNFα και έναν ενδογενή δρόμο που αφορά τα μιτοχόνδρια και την απελευθέρωση κυτοχρώματος c. Κομβικό σημείο και των δυο αποπτωτικών δρόμων αποτελεί η ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Μελέτες αναφέρουν ότι η HSP27 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το μη ενεργό μόριο της προ-κασπάσης 3 και να εμποδίζει την περαιτέρω ενεργοποίησή του [110], [111]. Οι Samali και συν. έδειξαν ότι η HSP27 μπορεί να αναστείλει την απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια που επάγεται από αποπτωτικά ερεθίσματα [112]. Η ιδιότητα αυτή της HSP27 μπορεί να οφείλεται είτε σε μια δράση της παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης Bcl-2 ή στην δυνατότητά της να σταθεροποιεί το δίκτυο της ακτίνης το οποίο υποστηρίζει τα μιτοχόνδρια μέσα στο κύτταρο [113]. Επιπλέον, οι Bruey και συν. έδειξαν ότι η HSP27 αλληλεπιδρά με το κυτόχρωμα c μετά τη απελευθέρωσή του από το μιτοχόνδριο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλέγματος που ενεργοποιεί την κασπάση 9 [114]. Έχει βρεθεί ότι υπερέκφραση της HSP27 αναστέλλει την ενεργοποίηση της απόπτωσης που προκαλείται τόσο από τον παράγοντα Fas όσο και από τον TNFα [115], [116]). Συγκεκριμένα, οι Mehlen και συν. αναφέρουν ότι η υπερέκφραση της ανθρώπινης HSP27 αναστέλλει τον κατακερματισμό του DNA και αυξάνει σημαντικά την επιβίωση κυττάρων που εκτέθηκαν στους αποπτωτικούς παράγοντες Fas και σταυροσπορίνη. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ο μηχανισμός, μέσω του οποίου η HSP27 αναστέλλει την προκαλούμενη από τον Fas απόπτωση, οφείλεται στην αναστολή του παράγοντα Daxx. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι τα φωσφορυλιωμένα διμερή της HSP27 αλληλεπιδρούν με τον Daxx και αναστέλλουν την σύνδεση του με τον παράγοντα Ask1, που ενεργοποιεί την JNK κινάση και προκαλεί απόπτωση [117]. Στα παραπάνω πρέπει να προστεθεί και ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης της HSP27 με την Akt κινάση. Η ενεργοποίηση της κινάσης αυτής έχει δειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή των μηχανισμών απόπτωσης και συμβάλλει καθοριστικά στην κυτταρική επιβίωση από

διάφορα είδη στρες. Οι Konishi και συν. έδειξαν ότι η HSP27 έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση της Akt κινάσης μετά από κυτταρικό στρες [118]

Φωσφορυλίωση Της Hsp27 Και Ενδοκυττάρια Μετατόπιση

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η HSP27 βρίσκεται κυρίως σε μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η φωσφορυλίωση της επάγεται από μια σειρά ερεθισμάτων (αυξητικοί παράγοντες) και διάφορα είδη στρες. Συγκεκριμένα, το θερμικό στρες έχει δείχθει ότι προκαλεί έντονη φωσφορυλίωση της HSP27 σε κυτταροκαλλιέργειες [119], [109]. Επιπλέον, η εφαρμογή οξειδωτικού στρες με χορήγηση H₂O₂ προκαλεί φωσφορυλίωση της HSP27 [120]. Αντικρουόμενα δεδομένα παρουσιάζονται όσον αφορά την επίδραση της ισχαιμίας στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της HSP27 πιθανώς εξαιτίας των διαφορετικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν. Μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες καρδιομυοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων έδειξαν ότι η εφαρμογή ισχαιμικού στρες προκαλεί αποφωσφορυλίωση της HSP27 [121] [122]. Αντίθετα, οι Yoshida και συν. πειραματιζόμενοι σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς επίμυος, αναφέρουν ότι η εφαρμογή ισχαιμίας προκάλεσε σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της HSP27 [123]. Ο μηχανισμός με τον οποίο επάγεται η φωσφορυλίωση της HSP27 βασίζεται σε μια κινάση σερίνης που ονομάζεται MAPKAP2. Η κινάση αυτή ενεργοποιείται από την p38 MAP κινάση. Η αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων ενεργοποίησης έχει δείχθει *in vitro*. Επιπλέον, σε καλλιέργειες νεογνικών καρδιομυοκυττάρων επίμυος, η εφαρμογή οξειδωτικού στρες προκαλεί ενεργοποίηση της p38 MAP κινάσης με παρόμοια κινητική με αυτή της ενεργοποίησης της MAPKAP2 και της HSP27, ενώ αναστολή της p38 MAP κινάσης οδηγεί σε αναστολή της φωσφορυλίωσης της HSP27 (142). Η ενεργοποίηση της MAPKAP2 μπορεί ακόμη να προκληθεί και από τις p42/44 ERK κινάσες ([124]). Ένας άλλος μηχανισμός φωσφορυλίωσης της HSP27 φαίνεται ότι είναι μέσω της δ-ισομορφής της πρωτεϊνικής κινάσης C. Έχει βρεθεί ότι ιστοί που υπερεκφράζουν την PKCδ, έχουν αυξημένα ποσά φωσφορυλιωμένης HSP27. Επιπλέον, *in vitro* η προσθήκη PKCδ μαζί με HSP27 προκαλεί την έντονη φωσφορυλίωση της τελευταίας [125]. Η μετατόπιση της HSP27 σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα μετά από εφαρμογή στρες είναι μια σημαντική ιδιότητα της πρωτεΐνης αυτής. Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι η εφαρμογή θερμικού στρες προκαλεί μετατόπιση της πρωτεΐνης από το κυτοσόλιο όπου κυρίως βρίσκεται στον πυρήνα και στον κυτταροσκελετό. Η μετατόπιση αυτή έχει δείχθει τόσο με ανίχνευση της HSP27 με western blotting στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα όσο και

με ανοσοιστοχημεία και μικροσκοπήση [119]., [126].Μετά από εφαρμογή ισχαιμικού στρες σε καλλιέργειες καρδιομυοκυττάρων κονίκλων, έχει δειχθεί με western blotting ότι η HSP27 μετατοπίζεται σημαντικά στο μη διαλυτό κομμάτι του κυττάρου που αποτελείται από τον πυρήνα και τον κυτταροσκελετό [121].Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι Yoshida και συν. αναφέρουν ότι σε απομονωθείσες καρδιές επίμυων με τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας διαπίστωσαν μετατόπιση της HSP27 από το κυτοσόλιο στον πυρήνα και στις Z-περιοχές των σαρκομεριδίων [123]

Hsp27 Και Προστασία

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η HSP27 έχει την ικανότητα να προστατεύει τόσο από το θερμικό όσο και από το ισχαιμικό στρες. Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν οι Landry και συν [127]. έδειξαν ότι η γονιδιακή υπερέκφραση της ανθρώπινης HSP27 σε κυτταρικές σειρές ποντικών παρέχει προστασία των κυττάρων αυτών από την εφαρμογή θερμικού στρες. Η ίδια ερευνητική ομάδα σε μια μεταγενέστερη μελέτη και πάλι σε κυτταρικές σειρές ποντικών προκάλεσε υπερέκφραση της HSP27 με γονίδιο που η έκφρασή του είναι ελεγχόμενη από την παρουσία CdCl₂. Το CdCl₂ προκάλεσε την υπερέκφραση της HSP27 και προστασία από θερμικό στρες, ενώ η απόσυρσή του οδήγησε σε επαναφορά της HSP27 στα φυσιολογικά επίπεδα και σε απώλεια της προστασίας [108] [109], έδειξαν ότι η γονιδιακή υπερέκφραση μιας μορφής της HSP27 που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί δεν προσφέρει προστασία από το θερμικό στρες. Επιπλέον, η προστασία αυτή σχετίζεται με προστασία των ινιδίων της ακτίνης από την καταστρεπτική δράση της κυτοχλαζίνης-D, ιδιότητα που δεν εμφανίζεται μετά από υπερέκφραση της μη φωσφορυλιωμένης μορφής.

Οι Martin και συν. παρατήρησαν ότι νεογνικά καρδιομυοκύτταρα επίμυων παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή σε ισχαιμικό στρες και υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη HSP27 σε σχέση με τα ενήλικα καρδιομυοκύτταρα επίμυων [128]. Στην ίδια μελέτη έδειξαν ότι η γονιδιακή υπερέκφραση της ανθρώπινης HSP27 στα ενήλικα καρδιομυοκύτταρα επίμυων επάγει καρδιοπροστασία έναντι ισχαιμίας. Από τη άλλη πλευρά, η υπερέκφραση ενός γονιδίου συμπληρωματικού του γονιδίου της HSP27 (anti-sense) προκαλεί μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα νεογνικά καρδιομυοκύτταρα επίμυων κατά 80% και τα κάνει περισσότερο ευάλωτα στο ισχαιμικό στρες [128]. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας απομονωθέντα καρδιομυοκύτταρα κυνός αναφέρεται ότι η υπερέκφραση της ανθρώπινης HSP27

οδηγεί σε προστασία μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση [129] Η παραπάνω μελέτη είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς το μυοκάρδιο του κυνός είναι πολύ κοντά στο ανθρώπινο μυοκάρδιο.

Η HSP27 έχει επίσης προταθεί και ως καθοριστικό μόριο στην προστασία που επάγει η ισχαιμική προπόνηση στην καρδιά. Οι Eaton και συν. αναφέρουν ότι σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς επίμυος μετά από ισχαιμική προπόνηση παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση της HSP27 από το διαλυτό στο αδιάλυτο κυτταρικό κλάσμα που σχετίστηκε με επαγωγή προστασίας από επικείμενο ισχαιμικό στρες. Αντίθετα, 2 ώρες μετά την ισχαιμική προπόνηση η HSP27 έχει επιστρέψει στο διαλυτό κλάσμα και η προστασία έχει χαθεί [130]. Σε μια άλλη μελέτη, οι Sakamoto και συν έδειξαν και πάλι σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς επίμυος ότι η ισχαιμική προπόνηση επάγει τη μετατόπιση της HSP27 στα σαρκομερίδια και προστατεύει από ισχαιμικό στρες. Επιπλέον, η εκλεκτική αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C ή της p38 MAP κινάσης οδηγεί σε αναστολή της μετατόπισης της HSP27 και απώλεια της καρδιοπροστασίας [131] Σε μια πρόσφατη μελέτη, αναφέρεται ότι καρδιές διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν HSP27 εμφανίζουν μικρότερη έκταση εμφράγματος μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς [132]. Επιπλέον, οι Hollander και συν έδειξαν ότι σε διαγονιδιακούς ποντικούς, η υπερέκφραση της HSP27 ή μιας μορφής της πρωτεΐνης που δεν φωσφορυλιώνεται, έχει ως αποτέλεσμα την καρδιοπροστασία έναντι ισχαιμίας-επαναιμάτωσης που εκτιμήθηκε με βάση την λειτουργική ανάκαμψη και την απελευθέρωση κρεατίνης κινάσης σε μοντέλο απομονωθείσας καρδιάς κατά Langendroff [133]

Β.ΒΛΑΒΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ.

Εισαγωγή

Ενώ η βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης έχει επαρκώς μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα φυσιολογικού μυοκαρδίου, λιγότερο γνωστή είναι η συμπεριφορά του ήδη παθολογικού μυοκαρδίου απέναντι στο ισχαιμικό στρες η οποία φαίνεται να ποικίλει ανάλογα το εκάστοτε πειραματικό μοντέλο και να δημιουργεί έτσι σημαντική διχογνωμία στη διεθνή βιβλιογραφία.

Φαίνεται λοιπόν σε ορισμένα πειραματικά μοντέλα ότι το παθολογικό μυοκάρδιο κατέχει μηχανισμούς προσαρμογής στο ισχαιμικό στρες με αποτέλεσμα αυξημένη προστασία έναντι της ισχαιμικής βλάβης. Αντίθετα, σε άλλα πειραματικά μοντέλα παρουσιάζεται αυξημένη ευαισθησία έναντι της ισχαιμικής βλάβης. Μάλιστα, καθιερωμένοι μηχανισμοί προστασίας όπως η ισχαιμική προπόνηση, φαίνεται να μην λειτουργούν το ίδιο στο παθολογικό μυοκάρδιο. Ειδικότερα:

Υπερχοληστερολαιμία Και Ισχαιμική Βλάβη

Η υπερχοληστερολαιμία είναι ένας μείζων παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου και η μελέτη της επίδρασης της υπερχοληστερολαιμίας στην αντίσταση του μυοκαρδίου στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης έχει άμεσο κλινικό ενδιαφέρον. Η υπερχοληστερολαιμία έχει συνδυαστεί με μεγαλύτερης έκτασης εμφράγματα σε διάφορα πειραματικά μοντέλα ιδιαίτερα μετά από βραχύχρονη έκθεση των πειραματόζων σε αυτή (2 εβδομάδες) [134]. Το αποτέλεσμα ήταν ιδιαίτερα δυσμενές σε πειραματόζωα με υπερχοληστερολαιμία λόγω συγγενούς έλλειψης υποδοχέων LDL [135]. Αντίθετα σε άλλα πειραματικά μοντέλα κυρίως μετά από έκθεση σε υπερχοληστερολαιμία μεγαλύτερης διάρκειας (6-8 εβδομάδες), παρουσιάζεται αυξημένη προστασία του μυοκαρδίου στη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης ακόμα και σε πειραματόζωα με συγγενή έλλειψη υποδοχέων LDL καθώς και σε αυτά με συγγενή έλλειψη από-λιποπρωτεΐνης απο-E [136]. Πολλοί παράγοντες ευθύνονται για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα όπως η σύσταση της διαίτας που προκάλεσε την υπερχοληστερολαιμία, η παρουσία ή όχι αθηροσκλήρωσης, το πειραματικό μοντέλο πρόκλησης ισχαιμίας αλλά και η διάρκεια έκθεσης στην υπερχοληστερολαιμία. Ιδιαίτερα η τελευταία δείχνει να είναι ένας μείζων παράγοντας που καθορίζει την αντοχή. Τα μυοκαρδιακά επίπεδα GSH τα οποία παρουσιάζονται μειωμένα στις δύο

πρώτες εβδομάδες υπερχοληστερολαιμίας με συνοδό ανάκαμψη των επιπέδων τους κατά τα όψιμα στάδια αυτής αποτελούν μία από τις αιτίες της διαφορετικής απάντησης του υπερχοληστερολαιμικού μυοκαρδίου στην ισχαιμική βλάβη [135]. Επίσης σημαντικό ρόλο στο ιδιαίτερα ευάλωτο μυοκάρδιο απέναντι στην ισχαιμική βλάβη κατά τα πρώιμα στάδια της υπερχοληστερολαιμίας φαίνεται να παίζουν τα αυξημένα επίπεδα λειτουργικότητας των κασπασών 1 και 3 τα οποία οδηγούν και σε μεγαλύτερο βαθμό απόπτωσης. Μάλιστα η αναστολή της λειτουργικότητας της κασπάσης 1 μείωσε τη δυσμενή δράση της πρώιμης υπερχοληστερολαιμίας στη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης [137].

Διαβητικό Μυοκάρδιο Και Ισχαιμική Βλάβη

Στο διαβητικό μυοκάρδιο παρουσιάζεται επίσης σημαντική διχογνωμία όσον αφορά την αντοχή του στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών σε πειραματικά μοντέλα πρόκλησης διαβήτη μέσω χορήγησης στρεπτοζοκίνης ή αλοξάνης, παρουσιάζουν είτε αυξημένη είτε μειωμένη αντοχή στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα.

Ο διαβήτης φαίνεται να προσφέρει προστασία έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης κυρίως στα πρώιμα στάδια. [[138],[139],[140]]. Η αυξημένη αυτή αντοχή της διαβητικής καρδιάς έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς όπως στη μείωση της συσσώρευσης προϊόντων γλυκόλυσης (γαλακτικό οξύ και H⁺) [141], σε μεταβολές στη ρύθμιση του pH (μείωση λειτουργικότητας της αντλίας Na⁺/H⁺) [142], καθώς και στην ενεργοποίηση κινασών επιβίωσης όπως η ERK και η PKCε. Πράγματι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK βρέθηκαν αυξημένα σε διαβητικές καρδιές τόσο πριν όσο και μετά την ισχαιμία-επαναιμάτωση [139]. Επίσης η αναστολή της ενεργοποίησης των PKC κινασών εκμηδένισε την αντοχή του διαβητικού μυοκαρδίου στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης [143]. Άλλοι μηχανισμοί που παρατηρούνται κυρίως πρώιμα μετά από πρόκληση διαβήτη, είναι η αυξημένη έκφραση του VEGF και της eNOS με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή NO και τη μείωση του οξειδωτικού στρες [144]. Παράλληλα η καρδιοπροστασία συνοδεύεται με αυξημένα επίπεδα phospho-HSP27 στο διαβητικό μυοκάρδιο ενώ η χορήγηση ινσουλίνης μείωσε τα επίπεδα της HSP27 μειώνοντας έτσι και την καρδιοπροστατευτική της δράση [145]. Επίσης τα μειωμένα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα διαβητικών πειραματόζων, φαίνεται να συνεισφέρουν στην μειωμένη συχνότητα των αρρυθμιών επαναιμάτωσης στο διαβητικό μυοκάρδιο [146]. Αντίθετα, σε άλλες πειραματικές

συνθήκες όπως στα όψιμα στάδια διαβήτη (6 εβδομάδες) [138] σε ισχαιμία χαμηλής ροής καθώς και σε μοντέλα προσθήκης λιπαρών οξέων στο διάλυμα διαπύκνωσης, οι διαβητικές καρδιές παρουσιάζονται ιδιαίτερα ευάλωτες στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Επίσης ιδιαίτερα ευάλωτες παρουσιάζονται οι διαβητικές καρδιές ποντικών με συνοδό υπερχοληστερολαιμία [141].

Η αυξημένη ευαισθησία των διαβητικών καρδιών στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης που παρατηρείται κάτω από ιδιαίτερες πειραματικές συνθήκες, έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς : η μειωμένη απορρόφηση και ο χαμηλός μεταβολισμός της γλυκόζης που παρατηρείται στις διαβητικές καρδιές ενοχοποιούνται για την ευάλωτη διαβητική καρδιά σε συνθήκες ισχαιμίας χαμηλής ροής. [141, 142, 147]. Επίσης το αυξημένο οξειδωτικό στρες στις διαβητικές καρδιές συνοδεύεται με χαμηλά επίπεδα OH⁻ παίζοντας σημαντικό ρόλο στο αυξημένο μέγεθος εμφράγματος που παρατηρείται μετά από παρατεταμένη έκθεση σε ισχαιμία [148]. Επίσης ο ρόλος της iNOS μέσω της ρύθμισης αμυντικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια ισχαιμίας επαναιμάτωσης φαίνεται να καταλύεται στο διαβητικό μυοκάρδιο [149].

Ισχαιμική Βλάβη Στο Υπερτροφικό Μυοκάρδιο

Το υπερτροφικό μυοκάρδιο παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης συγκριτικά με το φυσιολογικό. Η αυξημένη αυτή ευαισθησία οφείλεται κυρίως στις σημαντικές αλλαγές που παρατηρούνται στην υπερτροφία και αφορούν κυρίως σε ανωμαλίες στο τριχοειδικό δίκτυο, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στον ενδοκυττάριο κύκλο του Ca, και στην ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης. Μάλιστα φαρμακευτικές δράσεις και στους τρεις αυτούς άξονες δείχνουν να βελτιώνουν την ανοχή του υπερτροφικού μυοκαρδίου έναντι της ισχαιμίας.

Ανωμαλίες τριχοειδικού δικτύου: Ανατομικές και λειτουργικές ανωμαλίες στα αγγεία της μικροκυκλοφορίας του στεφανιαίου δικτύου, όπως π.χ. η χαμηλή πυκνότητα τριχοειδών αγγείων ανά μονάδα όγκου μυοκαρδιακού ιστού, είναι συχνές στην υπερτροφία του μυοκαρδίου και επηρεάζουν την αντοχή στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Αύξηση της τριχοειδικής πυκνότητας με τη χορήγηση αυξητικού παράγοντα VEGF, σε πειραματόζωα με μυοκαρδιακή υπερτροφία μετά από περίδεση της θωρακικής αορτής, αύξησε την περιοχική ιστική αιμάτωση βελτιώνοντας ταυτόχρονα και την μετισχαιμική καρδιακή λειτουργικότητα. [150].

Διαταραχές στον μεταβολισμό: η καρδιακή υπερτροφία συνοδεύεται από χαμηλού βαθμού οξειδωση της γλυκόζης και αυξημένο ρυθμό γλυκόλυσης. Η διέγερση την οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω της ενεργοποίησης της πυρουβικής αφυδρογονάσης με χορήγηση διχλωρο-ακετικού κατά την διάρκεια της επαναιμάτωσης βελτίωσε την μετσοχαιμική καρδιακή λειτουργικότητα σε πειραματικά μοντέλα. [151]

Διαταραχές στον κύκλο του ασβεστίου: αλλαγές στην ομοιόσταση του ιόντος καθώς και η μειωμένη λειτουργικότητα της ATP-σης του ασβεστίου του σαρκοπλασματικού δικτύου, οδηγούν σε κυτταρική υπερφόρτωση του ενδοκυττάριου χώρου με ασβέστιο με συνακόλουθο αποτέλεσμα την μειωμένη ανάκαμψη της διαστολικής λειτουργικότητας μετά το τέλος της ισχαιμίας. Η Cariporide, ένας ειδικός αποκλειστής της αντλίας Na^+/H^+ , βελτίωσε την τελική διαστολική λειτουργικότητα σε πειραματικά μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας επιμύων μετά από επίδεση της θωρακικής αορτής. Η σημαντικότερη επίδραση της cariporide ήταν να μειώσει τη μετσοχαιμική αύξηση της διαστολικής πίεσης (contracture) στα υπερτροφικά πειραματόζωα. Επίσης μείωσε και το μέγεθος της ισχαιμικής νέκρωσης όπως αυτό αντανακλάται από την μέτρηση της CPK [152]4| Η χορήγηση βεραπαμίλης επίσης μείωσε την έκταση της ισχαιμικής βλάβης σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας επαναιμάτωσης υπερτροφικού μυοκαρδίου [153]

Ενεργοποίηση του άξονα ρενίνης αγγειοτενσίνης: η ρενίνη και η αγγειοτενσίνη II βρίσκονται αυξημένες στο υπερτροφικό μυοκάρδιο με περαιτέρω αύξησή τους μετά από την επαναιμάτωση. Έχει παρατηρηθεί μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της αγγειοτενσίνης και του βαθμού ανάκαμψης της μυοκαρδιακής λειτουργικότητας μετά από βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [154]. Επίσης η χορήγηση καπτοπρίλης, ενός αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης βελτίωσε την ανάκαμψη της καρδιακής λειτουργικότητας μετά από έκθεση σε βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. [155]

Υπερτροφία και φλεγμονή: Ο παράγοντας TNF-alpha βρέθηκε αυξημένος στην υπερτροφική καρδιά ενός πειραματικού μοντέλου περιόδου αορτής. Φαίνεται μάλιστα να συμβάλει και στην μειωμένη ευαισθησία της υπερτροφικής καρδιάς στην ισχαιμική βλάβη. Η χορήγηση ειδικών anti-TNF αντισωμάτων βελτίωσε την λειτουργική ανάκαμψη μετά την ισχαιμία. [156]

Γηράσκον μυοκάρδιο και Ισχαιμική βλάβη

Η αντίσταση του μυοκαρδίου στη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης φαίνεται να διαφοροποιείται με την πάροδο της ηλικίας [157-159]. Σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας χαμηλής ροής οι καρδιές μεγάλης ηλικίας παρουσιάζουν αυξημένη αγγειοσύσπασση με περιορισμένη αποκατάσταση της μετσχαιμικής λειτουργικότητας [160]. Σε άλλα πειραματικά μοντέλα ολικής ισχαιμίας τα δυσμενή αποτελέσματα παρατηρούνται κυρίως σε μέσης ηλικίας ομάδες πειραματόζων με μειωμένη την μετσχαιμική λειτουργικότητα αλλά και αυξημένο ποσοστό αρρυθμιών επαναιμάτωσης συγκριτικά με αντίστοιχα νεαρά πειραματόζωα [161]. Η αυξημένη αυτή ευαισθησία των πειραματόζων μέσης ηλικίας συνδυάστηκε με αυξημένο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας με μειωμένη δραστηριότητα της καταλάσης με αποτέλεσμα την μειωμένη δυνατότητα αποβολής των ριζών του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα γηράσκοντα κύτταρα [162]. Φαίνεται η αιτία του αυξημένου οξειδωτικού στρες να μην είναι η αυξημένη παραγωγή ριζών αλλά η μειωμένη δυνατότητα αποβολής τους από τα μυοκαρδιακά κύτταρα [163]. Επίσης παρατηρείται αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου λόγω μειωμένης λειτουργικότητας SERCA και άλλων αντλιών διαχείρισης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, αλλά και αυξημένη λειτουργικότητα της NHE στα γηράσκοντα κύτταρα [[159, 160].

Ισχαιμική Προπόνηση Στο Παθολογικό Μυοκάρδιο

Ισχαιμική Προπόνηση Και Υπερχοληστερολαιμία

Η ισχαιμική προπόνηση φαίνεται να λειτουργεί προστατευτικά έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης στις υπερχοληστερολαιμικές καρδιές αλλά με μειωμένη δραστηριότητα [164, 165]. Επίσης η ευνοϊκή δράση της χημικής ισχαιμικής προπόνησης με χορήγηση δοτών NO φαίνεται να μην διατηρείται στο μυοκάρδιο υπερλιπιδαιμικών ζώων ειδικά κατά τα πρώιμα στάδια. Η χορήγηση πραβαστατίνης αποκατέστησε την ένταση της ευνοϊκής δράσης της ισχαιμικής προπόνησης απέναντι στη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. 101

Ισχαιμική προπόνηση στη διαβητική καρδιά

Η δράση της ισχαιμικής προπόνησης στη διαβητική καρδιά ποικίλει. Έτσι σε διαβητικά πειραματόζωα μετά από χορήγηση στρεπτοζοκίνης η ισχαιμική προπόνηση απέτυχε να αυξήσει την αντοχή του διαβητικού μυοκαρδίου στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης [166]. Επίσης η φαρμακευτική ισχαιμική προπόνηση μέσω

φαινυλεφρίνης, αδενοσίνης ή διαζοξίδης απέτυχε να προστατεύσει διαβητικές καρδιές από την βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης [167]. η προστατευτική επίδραση των K-οπιοειδών αγωνιστών φαίνεται να είναι μειωμένη στο διαβητικό μυοκάρδιο γεγονός που συνδυάζεται με μειωμένη σύνθεση των heat shock protein 70 που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες. [168]. Επίσης η δυσλειτουργία των μιτοχονδριακών-K(ATP) καναλιών φαίνεται να συνεισφέρει στη μείωση της προστατευτικής δράσης της ισχαιμικής προπόνησης στο διαβητικό μυοκάρδιο [51,84]. Μια ακόμα μελέτη δείχνει ότι ακόμα και η υπερθερμία απέτυχε να προστατεύσει τις διαβητικές καρδιές από την βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης κάτι που δεν συνέβη και στις φυσιολογικές καρδιές της μελέτης. Αυτό αποδίδεται στη χαμηλή έκφραση των HSP72 αλλά και της φωσφορυλίωσης της Akt που βρέθηκε μειωμένη σε διαβητικές καρδιές μετά από έκθεση σε θερμικό σοκ. Μάλιστα η χορήγηση ινσουλίνης φαίνεται να αποκαθιστά τα επίπεδα HSP72 και την απάντηση στην ισχαιμία επαναιμάτωση μετά από θερμικό σοκ. [169]

Ισχαιμική Προπόνηση Στην Υπερτροφική Καρδιά

Σημαντικός αριθμός μελετών σε πειραματικά μοντέλα καρδιακής υπερτροφίας δείχνουν ότι η προστασία της ισχαιμικής προπόνησης διατηρείται στο υπερτροφικό μυοκάρδιο πειραματικών μοντέλων διαφόρων τύπων προκλητής υπερτροφίας:

Η ισχαιμική προπόνηση φαίνεται να εμπλέκει την οδό επαγωγής σήματος του JAK-STAT σε μυοκάρδιο ποντικών με υπερτροφία του μυοκαρδίου μετά από περίδεση της θωρακικής αορτής, περιορίζοντας την ενεργοποίηση της STAT-3 μειώνοντας έτσι την δραστηριότητά της. [170]

Παράλληλα, σε ποντικούς με καρδιακή υπερτροφία μετά από περίδεση της κοιλιακής αορτής, οι ανταγωνιστές των K-(ATP) καναλιών αναχαίτισαν τις προστατευτικές ιδιότητες της ισχαιμικής προπόνησης, τονίζοντας έτσι τον καθοριστικό ρόλο των καναλιών αυτών στην προστατευτική δράση της ισχαιμικής προπόνησης στο υπερτροφικό μυοκάρδιο.

Ισχαιμική Προπόνηση Στη Γηράσκουσα Καρδιά

Η ισχαιμική προπόνηση φαίνεται να μη διατηρεί την προστατευτική της δράση στο γηράσκον μυοκάρδιο [[171]-[172, 173]], όπως επίσης το θερμικό καθώς και το υποξαιμικό στρες φαίνεται να μην διατηρούν την δυνατότητα προπόνησης του γηράσκοντος μυοκαρδίου απέναντι σε μια ακόλουθη βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης

[174]. Αυτό μπορεί να οφείλεται εν μέρη σε διαταραχές των πρωτεϊνών από-φωσφορυλίωσης που επέρχονται με την αύξηση της ηλικίας. Έτσι σε πειρατικά μοντέλα γηράσκοντων ποντικών η δραστικότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A), βρέθηκε να είναι αυξημένη ενώ η αναστολή της ενδογενούς πρωτεϊνικής φωσφατάσης με τη χρήση οκαδαϊκού οξέως επανέφερε την προστατευτική δράση της ισχαιμικής προπόνησης. [175]. Επιπρόσθετα, στην μείωση της προστατευτικής δράσης της ισχαιμικής προπόνησης στο γηράσκον μυοκάρδιο συμβάλει και η παρατηρούμενη μείωση της κοννεξίνης-43 [176]

Αντίθετα με τα προαναφερθέντα, υπάρχουν μελέτες σε πειραματικά μοντέλα που αναφέρουν αυξημένη αντίσταση του γηράσκοντος μυοκαρδίου στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης, όπως και προστατευτική δράση της ισχαιμικής προπόνησης χωρίς όμως τη διαμεσολάβηση της πρωτεϊνικής κινάσης PKC-ε.

Γ. ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Αναδιαμόρφωση Μετά Από Έμφραγμα Του Μυοκαρδίου

Εισαγωγή

Στη μετεμφραγματική αναδιαμόρφωση μπορεί να αναγνωριστεί μια πρώιμη φάση (<72 ωρών), η οποία περιορίζεται στην περι-εμφραγματική περιοχή και μια απώτερη φάση (>72 ωρών), στην οποία η αναδιαμόρφωση αφορά όλο γενικά το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές σε κυτταρικό αλλά και μακροσκοπικό επίπεδο. Σε επίπεδο μυοκαρδιακού κυττάρου παρατηρείται: υπερτροφία, διαταραχή συστολής, και χάλασης των ινών, ίνωση του διάμεσου χώρου, και τέλος κυτταρικός θάνατος λόγω απόπτωσης. Σε μακροσκοπικό επίπεδο παρατηρείται έκκεντρη υπερτροφία, σταδιακή διάταση των κοιλοτήτων και διαστρέβλωση της αρχιτεκτονικής. [177-179].

Υπερτροφία

Αφετηρία της διαδικασίας της καρδιακής αναδιαμόρφωσης είναι το μυοκαρδιακό κύτταρο και καθοριστικός παράγοντας αυτής της διαδικασίας είναι η τάση που ασκείται στα τοιχώματα [177, 178, 180].

Η τοιχωματική τάση εξαρτάται από την ενδοκοιλοτική πίεση στην αριστερή κοιλία, το πάχος του τοιχώματος, καθώς και τις διαστάσεις και την γεωμετρία της κοιλότητας. Όσο αυξάνει η πίεση στη κοιλότητα και η ακτίνα της αριστερής κοιλίας τόσο αυξάνει και η τοιχωματική τάση σύμφωνα με το νόμο του Laplace (Τοιχωματική τάση = ακτίνα / πάχος τοιχώματος). Το μυοκάρδιο, στην περίπτωση που παρατείνεται η αυξημένη τοιχωματική τάση, προσπαθεί να αντιρροπίσει και μέσω της υπερτροφίας της αριστεράς κοιλίας, αυξάνει το πάχος του τοιχώματος, μειώνοντας έτσι την τοιχωματική τάση προς τα φυσιολογικά επίπεδα. Επισημαίνεται ότι η εμφραγματική περιοχή δεν μπορεί να υπερτραφεί, πράγμα το οποίο συμβαίνει με το υπόλοιπο μυοκάρδιο.

Οι δυνάμεις αυτές, ασκούνται πάνω στο μυοκαρδιακό κύτταρο, το οποίο διατείνεται, διατείνοντας ταυτόχρονα και τα μόρια της ιντεγκρίνης τα οποία με τη σειρά τους μεταδίδουν τις δυνάμεις αυτές στον κυτταροσκελετό και από εκεί στον πυρήνα σηματοδοτώντας την έναρξη παραγωγής νέων πρωτεϊνών. Με αυτόν τον τρόπο το μυοκαρδιακό κύτταρο μπορεί να χαρακτηριστεί σαν ένας αισθητήρας μηχανικών δυνάμεων ([181-184]

Παράλληλα, η υπόταση και η χαμηλή καρδιακή παροχή προκαλούν ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος, αυξημένες συγκεντρώσεις AT II και ενδοθηλίνης, αυξάνοντας μέσω της αγγειοσυσπασσης περαιτέρω το μεταφόρτιο και την τοιχωματική τάση. Επιπλέον η ενεργοποίηση των AT1 υποδοχέων, των α_1 αδρενεργικών υποδοχέων καθώς και της ενδοθηλίνης, ενεργοποιούν, μέσω της σύζευξής τους με την G πρωτεΐνη (Gq), την πρωτεΐνη κινάση C (PKC), η οποία με την σειρά της μέσω της MAP κινάσης ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες και πρώτο-ογκογονίδια όπως το c-fos, c-myc και c-jun που οδηγούν προς την υπερτροφία. Η χρόνια αιμοδυναμική επιβάρυνση οδηγεί το κύτταρο σε ένα γονιδιακό επαναπρογραμματισμό και στην παραγωγή πρωτεϊνών που ως αποτέλεσμα έχουν την μετατόπιση του κυττάρου προς έναν εμβρυϊκού τύπου φαινότυπο [185]. Ο εμβρυϊκός φαινότυπος περιλαμβάνει μεταβολές στις ισομορφές της μυοσίνης, επαγωγή αυξητικών παραγόντων όπως το TGF- β , παραγωγή των νατριουρητικών πεπτιδίων, καθώς και της σκελετικής α -ακτίνης [186]. Σε μεταβολικό επίπεδο, έχουμε μια προς τα κάτω ρύθμιση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την οξειδωση των λιπαρών οξέων και στην ταυτόχρονη αύξηση της γλυκόλυσης. Ειδικότερα η μετατόπιση του μεταβολικού υποστρώματος φαίνεται να οφείλεται στην μειωμένη έκφραση του πυρηνικού υποδοχέα PPAR- α [187]

Διαταραχή Συσταλτικότητας

Η σύσπασση της μυοκαρδιακής ίνας απαιτεί δύο παράγοντες 1) την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και 2) την δυνατότητα ολίσθησης των νηματίων της ακτίνης επί της μυοσίνης. [188]

Η πόλωση της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί το άνοιγμα των L-καναλιών ασβεστίου επιτρέποντας την είσοδο ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου. Πλησίον των διαύλων του ασβεστίου βρίσκονται οι υποδοχείς της ρυανοδίνης, εγκατεστημένοι επί της σαρκοπλασματικής μεμβράνης. Η είσοδος ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργοποιεί τους υποδοχείς της ρυανοδίνης, που με τη σειρά τους προκαλούν την έκλυση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο και την αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα.

Η συστολή επιτυγχάνεται με την ολίσθηση των λεπτών νηματίων ακτίνης επί των παχέων νηματίων μυοσίνης. Ειδικότερα κάθε νηματίο ακτίνης περιελίσσεται γύρω

από το βαρύτερο μόριο της τροπομυοσίνης (Tm). Θεμελιώδη ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης παίζουν τα συμπλέγματα της τροπονίνης, τα οποία βρίσκονται σε τακτά διαστήματα των 38,5 nm κατά μήκος της τροπομυοσίνης. Κάθε σύμπλεγμα αποτελείται από την τροπονίνη C (Tn-C), την τροπονίνη I (Tn-I) και την τροπονίνη T (Tn-T). Η τροπονίνη C (Tn-C) ενεργοποιείται από το ασβέστιο που ελευθερώνεται από το σαρκοπλασματικό δίκτυο κατά την έναρξη της συστολής και δεσμεύει το ανασταλτικό μόριο της τροπονίνης I (Tn-I), το οποίο εμποδίζει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ακτίνη και την μυοσίνη. Σε κάθε περίπτωση όταν τα επίπεδα του ασβεστίου είναι χαμηλά, όπως στη διαστολή, η Tn-I ενώνεται με την ακτίνη εμποδίζοντας την σύνδεση με την μυοσίνη. Η τροπονίνη T παράλληλα, κατανέμει το ανασταλτικό αποτέλεσμα του συμπλέγματος της τροπονίνης, μέσω της τροπομυοσίνης, σε επτά μονομερή ακτίνης εν απουσία του ασβεστίου. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων του ασβεστίου η τροπονίνη T αποσύρει την ανασταλτική της δράση και ενεργοποιεί την ATP-αση της ακτινομυοσίνης.

Παράλληλα τα παχιά νημάτια της μυοσίνης αποτελούνται από δύο διαφορετικούς τύπους αλυσίδων τις βαριές (MHC) και τις ελαφρές (MLC). Κάθε νημάτιο μυοσίνης καταλήγει σε μία δίοβο κεφαλή με την οποία ενώνεται μέσω του αυχένα. Οι μισές κεφαλές προσανατολίζονται προς το ένα άκρο του σαρκομέριου και οι άλλες μισές προς το άλλο. Πάνω στη δίοβο κεφαλή αναγνωρίζονται δύο περιοχές. Μια περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης και μία περιοχή προσκόλλησης του ATP. Η προσκόλληση του ATP προκαλεί μία σειρά από μεταβολές που δίνουν έναρξη στο κύκλο της συστολής.

Παρουσία λοιπόν υψηλών συγκεντρώσεων ασβεστίου, η κεφαλή της μυοσίνης ενώνεται με το νημάτιο της ακτίνης στην πρώτη από τις διαδοχικές σταθερές θέσεις. Κατόπιν μετακινείται στη δεύτερη θέση, τρίτη από τις διαδοχικές θέσεις που κατά σειρά χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη συγγένεια μυοσίνης-ακτίνης.

Ο τρόπος με τον οποίο η χημική ενέργεια της σύνδεσης μυοσίνης-ακτίνης μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια είναι ότι η κεφαλή του μορίου της μυοσίνης περιστρέφεται οπότε η παραγόμενη δύναμη μεταδίδεται μέσω του λαιμού του μορίου στο παχύ νημάτιο προκαλώντας την ολίσθηση της μυοσίνης επί της ακτίνης.

Η διαταραχή της συστολής στο αναδιαμορφωμένο μυοκαρδιακό κύτταρο οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι η παραγωγή ισομορφών

αλυσίδων μυοσίνης χαμηλής συστολικής ικανότητας που παρατηρείται στα πλαίσια του γονιδιακού επαναπρογραμματισμού προς τον εμβρυϊκού τύπου φαινότυπο (Vlahos, McDowell et al. 2003).

Το μόριο της μυοσίνης συνίσταται από ένα ζεύγος βαρέων αλυσίδων (MHC, Myosin Heavy Chains) και δύο διαφορετικά ζεύγη ελαφρών (MLC, Myosin Light Chains), τα MLC1 και MLC2. Στο φυσιολογικό μυοκάρδιο, οι διάφορες μορφές της ισομυοσίνης εξαρτώνται τόσο από το είδος του οργανισμού όσο και από το είδος του μυός, κόλπος ή κοιλία. Στους επίμυες, υπάρχουν τρεις ισομορφές μυοσίνης. Η V1 είναι η κύρια ισομορφή και συνίσταται από δύο α -MHC, η V3 περιέχει δύο β -MHC, ενώ η V2 είναι ετεροδιμερές και αποτελείται από μία εκ των α -MHC και β -MHC. Η ενζυματική δράση τύπου ATP-άσης είναι μεγαλύτερη για τη V1 ισομορφή και μικρότερη για τη V3 [189-191]. Στο ανθρώπινο μυοκάρδιο, η ισομορφή β -MHC αντιπροσωπεύει το 90%-95% του ισοενζύμου της μυοσίνης [192]

Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις διάφορες ισομορφές της μυοσίνης τροποποιείται ως απάντηση στη χρόνια μηχανική υπερφόρτωση. Έτσι, στην καρδιακή αναδιαμόρφωση, παρατηρούνται τα εξής: 1) αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την ταχεία, α -MHC, ισομορφή της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης στο μυοκάρδιο. 2) επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τη βραδεία, β -MHC, ισομορφή της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Η πολύπλοκη αυτή ρύθμιση πραγματοποιείται σε επίπεδο μεταγραφής [193]. Ουσιαστικά, αυτό το οποίο έχουμε, είναι η αντικατάσταση της ισομορφής α -MHC (V1), στην βραδεία ισομορφή μυοσίνης β -MHC (V2), μειώνοντας θεωρητικά την ταχύτητα βράχυνσης της μυϊκής ίνας, επιτρέποντας έτσι στη καρδιά, να παράγει δύναμη με χαμηλότερο μεταβολικό κόστος φτάνοντας στην απαιτούμενη τάση πιο αργά. Το μειονέκτημα αυτής της αντιρρόπησης είναι η μειωμένη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου. Αν και στον άνθρωπο η ισομορφή V2 αποτελεί την πλειονότητα, αυτό το οποίο παρατηρείται είναι μια επιπλέον αύξηση του λόγου β -MHC/ α -MHC συμβάλλοντας στην τροποποίηση της συσταλτικότητας [194], [195, 196].

Πέρα από το μυοκάρδιο των κοιλιών ο εμβρυϊκός φαινότυπος κατά το έμφραγμα αφορά και το μυοκάρδιο των κόλπων. Ο φυσιολογικός κόλπος συνίσταται κυρίως από τη $\text{MHC}\alpha$ ισομορφή και βραχύνεται ταχύτερα από την κοιλία. Η μηχανική υπερφόρτωση αυτού που παρατηρείται στο έμφραγμα αλλά και σε άλλες καταστάσεις, συνοδεύεται από ελάττωση της περιεκτικότητας σε $\text{MHC}\alpha$, μια ελάττωση που είναι

ανάλογη της παρατηρούμενης διάταξης του κόλπου [193, 197, 198]. Η καρδιακή αναδιαμόρφωση επιφέρει προσαρμοστική αλλαγή της ισομορφής της μυοσίνης στους κόλπους.

Ένας δεύτερος μηχανισμός μείωσης της συστολικής λειτουργίας στο εμφραγματικό κύτταρο είναι η ενεργοποίηση συγκεκριμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η τροπονίνη I (cTnI) καθώς και η τροπονίνη T (cTnT) αποτελούν τα υποστρώματα φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων ισομορφών της όπως η PKCε και η PKCα, που παρατηρείται κατά την διάρκεια της καρδιακής αναδιαμόρφωσης, φωσφορυλιώνει συγκεκριμένες θέσεις στα μόρια της cTnI και της cTnT έχοντας συνολικά σαν αποτέλεσμα μια αρνητική ινότροπη δράση. Πιο συγκεκριμένα η φωσφορυλίωση της τροπονίνης στις θέσεις Ser 43/45 μειώνει την μέγιστη τάση που μπορούσε να αναπτύξει η μυοκαρδιακή ίνα κάτω από την ίδια συγκέντρωση ασβεστίου [199, 200]. Σε διαφορετική μελέτη η φωσφορυλίωση στις θέσεις Thr 143 και Ser 43/45 ήταν υπεύθυνη για την μειωμένη δράση της ακτινομυοσίνης ATPασης [201]. Επιπλέον τα λεπτά νημάτια της ακτίνης στην ανεπαρκούσα καρδιά παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στο ασβέστιο, μετατοπίζοντας έτσι την καμπύλη δύναμης/συγκέντρωση ασβεστίου προς τα δεξιά. Παράλληλα είχαμε μείωση της μέγιστης ταχύτητας ολίσθησης των νηματίων πιθανόν λόγω του μειωμένου ρυθμού αποκόλλησης των κεφαλών της μυοσίνης.

Διαταραχή Διαστολικής Χάλασης

Κατά τη διάρκεια της επαναπόλωσης το κυτταροπλασματικό ασβέστιο μειώνεται μέσω μιας αντλίας, ασβέστιο ATP-ασης του σαρκοπλασματικού δικτύου (SERCA2a), που επαναπροωθεί τα ιόντα Ca^{2+} προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο, καθώς και από μία αντλία της μεμβράνης Na^{+}/Ca^{2+} που αποβάλλει ιόντα ασβεστίου προς τον εξωκυττάριο χώρο, ανταλλάσσοντας τα με ιόντα νατρίου. Η δράση της SERCA2a ελέγχεται από μία πρωτεΐνη της σαρκοπλασματικής μεμβράνης την φωσφολαμβάνη. Η φωσφολαμβάνη αναστέλει την δράση της SERCA2a. Όταν όμως η φωσφολαμβάνη φωσφορυλιώνεται από την πρωτεΐνη κινάση A, χάνει την ιδιότητα της να αναστέλει τη δράση της SERCA2a. Επιπλέον στο εσωτερικό του σαρκοπλασματικού δικτύου υπάρχει μια άλλη πρωτεΐνη η καλσικουεστρίνη η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα ιόντα ασβεστίου στο εσωτερικό του ΣΔ, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την διαφορά

συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, ανάμεσα στο ΣΔ και το κυτόπλασμα, ενάντια στην οποία θα έπρεπε να λειτουργήσει η SERCA2a και κατ επέκταση καταναλώνοντας λιγότερη ενέργεια. Στην ανεπαρκούσα καρδιά υπάρχει μια μείωση της έκφρασης καθώς και της ενζυμικής δραστηριότητας της SERCA2a. Η προς τα κάτω ρύθμιση της SERCA2a είναι συνδεδεμένη με μειωμένη επαναπρόσληψη ασβεστίου από το κυτόπλασμα.

Κυτταρικός Θάνατος

Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί σημαντικό παράγοντα της καρδιακής αναδιαμόρφωσης εξαιτίας του ότι προκαλεί:

- α) απώλεια συσταλού μυός
- β) αντισταθμιστική υπερτροφία των υπολοίπων καρδιακών κυττάρων και
- γ) ίνωση

Η μείωση του συσταλού μυός είναι το κύριο χαρακτηριστικό της καρδιακής ανεπάρκειας, οποιασδήποτε αιτιολογίας, και συνοδεύεται από αντισταθμιστική αύξηση του μεγέθους των μυοκυττάρων και διάμεση ίνωση.

Κύριες αιτίες του κυτταρικού θανάτου είναι η νέκρωση και η απόπτωση. Το πιο συχνό αίτιο νέκρωσης στην καρδιακή ανεπάρκεια είναι η συνεχιζόμενη ισχαιμία ή το επανέμφραγμα.

Από την άλλη πλευρά η απόπτωση αναφέρεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που συμβαίνει λόγω ενεργοποίησης ενδογενών ενδονουκλεασών και συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση ορισμένων ρυθμιστικών γονιδίων [202, 203]. Δύο διαφορετικά μονοπάτια οδηγούν στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο όπου και στα δύο έχουμε την ενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων, τις κασπάσες. Στο εξωγενές μονοπάτι παράγοντες όπως ο TNF-α ενώνονται με συγκεκριμένους υποδοχείς της μεμβράνης ενεργοποιώντας τις κασπάσες. Στο ενδογενές μονοπάτι το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα συχνά λόγω κάποιου ερεθίσματος, όπως ισχαιμία ή υπερφόρτωσης ασβεστίου, ενεργοποιώντας τις κασπάσες [204]

Δ. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αν και πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικά ένζυμα αλλά και δομικές πρωτεΐνες ρυθμίζονται μέσω της θυρεοειδικής ορμόνης η θυρεοειδική ορμόνη αυτή καθαυτή λίγο έχει διερευνηθεί για το ρόλο της στην καρδιακή νόσο. Αυτό βασίστηκε στην πίστη σε δύο δόγματα: της δυσμενούς επίδρασης της ταχυκαρδίας του υπερθυρεοειδισμού στη έκβαση της καρδιακής νόσου καθώς και στην εσφαλμένη αντίληψη ότι το σύνδρομο χαμηλής T3 που απαντάται σε καρδιακές αλλά και συστηματικές νόσους έχει καρδιοπροστατευτικό ρόλο και έτσι δεν χρήζει ειδικής θεραπείας. Παρόλα αυτά παρουσιάζονται όλο και περισσότερα πειραματικά αλλά και κλινικά δεδομένα που αφορούν αφενός μεν στον δυσμενή ρόλο του συνδρόμου χαμηλής T3 στην θνητότητα και νοσηρότητα της καρδιακής ανεπάρκειας [205],[206], αφετέρου δε στην προστατευτική δράση της θυρεοειδικής ορμόνης στην καρδιά. [207, 208]

Η μοριακή βάση αυτής της δράσης αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας ανοίγοντας ταυτόχρονα νέους ορίζοντες στη θεραπεία της καρδιακής νόσου.

Δράση της θυροξίνης έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης - Μηχανισμοί

Η θυρεοειδική ορμόνη θεωρητικά θα μπορούσε να έχει δυσμενή αποτελέσματα στο μυοκάρδιο όσον αφορά την ισχαιμική βλάβη λόγω της επιτάχυνσης του καρδιακού ρυθμού. Παρόλα αυτά καινούρια δεδομένα παρουσιάζονται που υποστηρίζουν τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο της θυρεοειδικής ορμόνης.

Η οξεία αλλά και η χρόνια χορήγηση θυροξίνης δείχνει να προστατεύει το μυοκάρδιο έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Έτσι πρώιμες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας επαναιμάτωσης καθώς και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη, δείχνουν ότι η χορήγηση της θυροξίνης κατά την φάση της επαναιμάτωσης είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της μετσοισχαιμικής λειτουργικότητας [209]; [210, 211] [212], [213], [214], [215],[216]

Επίσης το αποτέλεσμα αυτό στη λειτουργικότητα συνοδεύτηκε με μικρότερη μυοκαρδιακή βλάβη καθώς και σημαντική μείωση της απόπτωσης όπως δείχνουν τα μειωμένα επίπεδα LDH και τροπονίνης μετά την επαναιμάτωση. [217], [216]

Η προθεραπεία με θυροξίνη δείχνει να προστατεύει το μυοκάρδιο από μετέπειτα ισχαιμική βλάβη, με τρόπο ανάλογο της προστασίας που προσφέρει η ισχαιμική προπόνηση. Έτσι σε καρδιές που χορηγήθηκε θυροξίνη, η p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) βρέθηκε μειωμένη στο τέλος της ισχαιμίας. Επίσης η ισχαιμική σύσπαση επιταχύνθηκε κατά την αρχική φάση της επαναιμάτωσης. Τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις ισχαιμικά προπονούμενες καρδιές σε αντίθεση με τις φυσιολογικές. [218];[213]; [219, 220];[221];[208]

ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ	
<i>Θετική ρύθμιση</i>	
1.	α-MHC
2.	Ca ²⁺ -ATPase του σαρκοπλασματικού δικτύου
3.	Ρυανοδίνη
4.	L-κανάλια Ca ²⁺
5.	Εξαρτώμενα από το δυναμικό κανάλια K ⁺ (Kv 1.5, Kv 4.2, Kv 4.3)
6.	Κανάλια K ⁺ HCN2 και HCN4 (ρεύμα υπερπόλωσης)
7.	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
8.	β-αδρενεργικός υποδοχέας
<i>Αρνητική ρύθμιση</i>	
1.	β-MHC
2.	Φωσφολαμβάνη
3.	Ανταλλάκτης Na ⁺ /Ca ²⁺
4.	Αδενυλική κυκλάση V, VI

ΜΗ-ΓΕΝΟΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ	
1.	Ενεργοποίηση καναλιών Na ⁺
2.	Ενεργοποίηση εξαρτώμενων από το δυναμικό καναλιών K ⁺ (Kv 4.2, Kv 4.3)
3.	Ενεργοποίηση επαναπολωτικών καναλιών επανεισόδου του K ⁺
4.	Ενεργοποίηση Ca ⁺² -ΑΤΡασης του σαρκοπλασματικού δικτύου
5.	Ενεργοποίηση πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (μεταβολισμός γλυκόζης)
6.	Ενεργοποίηση οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (μιτόχονδρια)
7.	Ενεργοποίηση PKC
8.	Ενεργοποίηση PI3-κινάσης
9.	Ενεργοποίηση p42/p44 MAPK
10.	Θετική ινότροπος δράση
11.	Αγγειοχάλαση

Πίνακας 1 Δράσεις που επάγονται οξέως μετά από χορήγηση θυρεοειδικής ορμόνης σε σημαντικά ενδοκυττάρια μόρια και λειτουργίες.

Ρύθμιση Ενδοκυττάρων Κινασών

Ενδοκυττάριας κινάσης ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια του στρες ελέγχοντας με τη σειρά τους, μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου οδών μεταγωγής σήματος, την αντοχή του κυττάρου στο ισχαιμικό στρες. Η ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών κινασών- p38 MAPK και JNKs έχει γενικά -ανάλογα με τη διάρκεια και την ένταση του ερεθίσματος που τις ενεργοποιεί- δυσμενή επίδραση στην πρόγνωση, ενώ την ίδια στιγμή η ενεργοποίηση των- λεγόμενων προ-επιβιωτικών κινασών- ERK or PI3K/Akt έχει προστατευτικό ρόλο [52], *Pantos From Mechanisms to Theurapeutic Potentials*). Μια εύθραυστη ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών ξεχωριστών ενδοκυττάρων οδών μεταγωγής σήματος δείχνει να καθορίζει και την τελική πρόγνωση του κυττάρου μετά την έκθεση στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης (*Pantos From Mechanisms to Theurapeutic Potentials*). Έτσι οι φαρμακολογικές επεμβάσεις που στοχοποιούν και τροποποιούν τις οδούς μεταγωγής σήματος των κινασών του στρες μπορεί να

αποτελέσουν στο μέλλον σημαντικές συνιστώσες στην αντιμετώπιση της ισχαιμικής καρδιακής νόσου.

Η θυρεοειδική ορμόνη δείχνει να ενεργοποιεί τις προ-επιβιωτικές PI3K/Akt οδούς μεταγωγής σήματος στα καρδιακά κύτταρα και έτσι να προσφέρει προστασία έναντι μιας επακόλουθης βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης. [207]. Επίσης έχει δειχτεί ότι η ενεργοποίηση της p38 MAPK κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας είναι μειωμένη σε καρδιές μετά από χρόνια χορήγηση θυροξίνης, μέσω μηχανισμού που ενέχει αφενός την μειωμένη παροχή της απαραίτητης ενέργειας για την φωσφορυλίωση της p38 MAPK λόγω του μειωμένου ATP που παρατηρείται στα υπερθυρεοειδικά κύτταρα, και αφετέρου την υπερέκφραση της PKC δ που ασκεί με τη σειρά της αρνητική δράση στην ενεργοποίηση της p38 MAPK κατά τη διάρκεια ισχαιμικού στρες [208, 217]

Θυροξίνη Και Πρωτεΐνες Οξειδωτικού Στρες

“Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου η θυρεοειδική ορμόνη φαίνεται να παρέχει καρδιοπροστασία είναι μέσω επαγωγής οδών μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται κατά το οξειδωτικό στρες. Αυτό δείχνουν άλλωστε τα μετρίως αυξημένα MDA επίπεδα – που είναι και δείκτης οξειδωτικού στρες- στα μυοκαρδιακά κύτταρα πειραματόζων μετά από χορήγηση θυροξίνης καθώς και η επαγωγή καρδιοπροστατευτικών μορίων όπως η HSP70 που κανονικά επάγονται κατά το οξειδωτικό στρες. [221]. Παρόμοιοι άλλωστε μηχανισμοί έχουν προταθεί για την προστασία που παρέχει η θυροξίνη έναντι του ισχαιμικού στρες και σε άλλους ιστούς όπως το ήπαρ [222].

Θυροξίνη Και Κυτταροσκελετός. Ρόλος Των Hsps Μικρού Μοριακού Βάρους

Οι HSPs μικρού μοριακού βάρους όπως αναφέρθηκε ήδη είναι σημαντικά ρυθμιστικά μόρια της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού και οι παρεμβάσεις που επιταχύνουν την μετατόπιση των πρωτεϊνών αυτών στον κυτταροσκελετό κατά την ισχαιμία, όπως η ισχαιμική προπόνηση, δρουν καρδιοπροστατευτικά. [223]. Η θυροξίνη αυξάνει τα επίπεδα της φωσφοριωμένης HSP₂₇ στα μυοκαρδιακά κύτταρα και συγχρόνως φαίνεται να επιταχύνει και την μετατόπιση των πρωτεϊνών αυτών στον κυτταροσκελετό κατά την ισχαιμία. Φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν έναν κυρίαρχο ρόλο στην προστατευτική δράση της θυροξίνης έναντι της ισχαιμίας. [220].

Δράση της θυροξίνης στην καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου

Όπως περιγράψαμε το μυοκάρδιο υφίσταται κατά την πρώιμη και όψιμη μετεμφραγματική περίοδο αναδιαμόρφωση με σημαντικές μεταβολές σε κυτταρικό αλλά και μακροσκοπικό επίπεδο. Οι αλλαγές αυτές αποτελούν μέρος της προσαρμοστικότητας της καρδιάς στις νέες μεταβολικές και αιμοδυναμικές συνθήκες και είναι ιδιαίτερα έντονες σε εμφράγματα με μεγάλη απώλεια μυοκαρδιακού ιστού. Η καρδιά στην προσπάθεια της να εξισορροπήσει το αυξημένο συστολικό και διαστολικό στρες –που πλέον κατανέμεται σε μικρότερο αριθμό λειτουργικών κυττάρων– κινητοποιεί ενδοκυττάριους μηχανισμούς υπερτροφίας με αλλαγές στον όγκο το σχήμα και τη διάταξη των μυοκαρδιακών κυττάρων. Οι ίδιοι όμως ενδοκυττάριοι μηχανισμοί προωθούν παράλληλα την μετάπτωση της έκφρασης των πρωτεϊνών συστολής σε πρωιμότητες ισομορφές με κέρδος το μικρότερο μεταβολικό κόστος αλλά με μειονέκτημα την χαμηλότερη συσταλτικότητα. Το αποτέλεσμα είναι ένα φαύλος κύκλος που οδηγεί τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Φαίνεται λοιπόν ότι οι φαρμακευτικές παρεμβάσεις που επάγουν την υπερτροφία χωρίς αλλαγές ή ακόμα και με βελτίωση στην έκφραση των πρωτεϊνών συστολής θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα σημαντικό βήμα στην αναστολή της παθολογικής αναδιαμόρφωσης μετά το έμφραγμα και την αποτροπή της καρδιακής ανεπάρκειας.

Η σηματοδότηση της θυροξειδικής ορμονής ως κεντρικός ρυθμιστής μεταξύ παθολογικής και φυσιολογικής καρδιακής Υπερτροφίας

Υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις ότι η θυροξίνη επάγει την καρδιακή υπερτροφία ανεξάρτητα από τις αλλαγές που επιφέρει στις συνθήκες αιμοδυναμικής φόρτισης. Φαίνεται να επάγει την υπερτροφία με την ενεργοποίηση της PI3K/Akt/mTOR οδού επαγωγής σήματος μέσω του διαμεμβρανικού TRα1 υποδοχέα. [224]. Ο TRα1 υποδοχέας φαίνεται να διαδραματίζει κριτικό ρόλο στην επαγωγή φυσιολογικής αλλά και παθολογικής υπερτροφίας ανάλογα της παρουσίας ή όχι του φυσιολογικού του συνδέτη που είναι η θυροξίνη. Έτσι η υπερέκφραση του TRα1 υποδοχέα στα νεογνικά καρδιακά κύτταρα παρουσία θυροξίνης είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της p38 MAPK και την επαγωγή υπερτροφίας. Αντίθετα η υπερέκφραση του TRα1 υποδοχέα εν απουσία του συνδέτη (θυροξίνη) κατέληξε μεν σε υπερτροφία αλλά με παθολογικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών συστολής (πρώιμες ισομορφές χαμηλής συστολικής ικανότητας) [225].

Επίσης η θυροξίνη φαίνεται να προάγει υπερτροφία χωρίς την ανάπτυξη καρδιακής ίνωσης. Στην πράξη η θυροξίνη αναστέλλει την λειτουργικότητα του προ-α1 επαγωγέα του κολλαγόνου και υπορυθμίζει την βιοσύνθεση του κολλαγόνου τύπου I [226]. Ενδιαφέρον είναι ότι σε ένα πειραματικό μοντέλο καρδιακής ίνωσης, η χορήγηση θυροξίνης ανέστειλε την έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου I προλαμβάνοντας έτσι την ίνωση κατά την υπερτροφία μετά από περίδεση της κοιλιακής αορτής [227]

Επίδραση Της Θυροξίνης Στο Σχήμα Των Μυοκαρδιακών Κυττάρων

Η Θυροξίνη προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο σχήμα των μυοκαρδιακών κυττάρων. Οι αλλαγές αυτές είναι σημαντικές γιατί επηρεάζουν την συνολική μορφολογία της καρδιάς. Στα νεογνικά μυοκαρδιακά κύτταρα παρατηρείται επιμήκυνση και ομαλή αναδιοργάνωση των ινών στο χώρο. Αυτό παρατηρήθηκε σε αντίθεση με το ακανόνιστο σχήμα αλλά και την αποδιοργανωμένη διάταξη που παρατηρήθηκε μετά από έκθεση των ινών στην φαινυλεφρίνη. Επίσης αν και οι δύο ουσίες προάγουν την πρωτεϊνοσύνθεση, η θυροξίνη σε αντίθεση με την φαινυλεφρίνη αυξάνει τον λόγο α-MHC/β-MHC. Η απάντηση αυτή προέρχεται από την ενεργοποίηση διαφορετικών οδών κινασών. Έτσι η φαινυλεφρίνη προκαλεί μια πρώιμη και σταθερή ενεργοποίηση της ERK κινάσης συνοδευόμενη με αυξημένη φωσφορυλίωσης MAPK, JNK και Akt. Κινασών. Αντίθετα, με τη θυροξίνη η ενεργοποίηση της ERK προκαλείται πρώιμα αλλά είναι παροδική. Τα επίπεδα της JNK κινάσης βρέθηκαν μειωμένα ενώ καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα των Akt και p38 MAPK κινασών. [228]

Επίδραση Της Θυροξίνης Στην Λειτουργικότητα

Η χορήγηση της θυροξίνης πρώιμα αλλά και όψιμα μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου έδειξε να βελτιώνει την συστολική λειτουργικότητα μεταβάλλοντας την έκφραση των πρωτεϊνών συστολής. Έτσι η χορήγηση της θυροξίνης κατά την πρώιμη μετεμφραγματική περίοδο δείχνει να προλαμβάνει την αύξηση του ποσοστού της β μυοσίνης στο βιώσιμο μυοκάρδιο των μετεμφραγματικών καρδιών. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου SERCA/PLB [229]; [230]. Παράλληλα η χορήγηση της θυροξίνης όψιμα μετεμφραγματικά κατάφερε ακόμα και να αναστρέψει τον παθολογικό εμβρυικό φαινότυπο των ισόμορφων των πρωτεϊνών συστολής. [231]

Υπάρχει σημαντικός αριθμός ενδείξεων ότι οδοί επαγωγής σήματος όπως οι PKC or HSP 70 μπορεί να ενέχονται στη ρύθμιση της συσταλτικότητας της καρδιάς. Ιδιαίτερα ισομορφές της PKC όπως η α και ε μπορούν να ελέγχουν την συσταλτικότητα

μέσω της φωσφορυλίωσης των μυοϊνιδίων [232]; [233]. Μάλιστα, η φαρμακολογική ή η γονιδιακή αναστολή της PKC α ενισχύει την καρδιακή συσταλτικότητα και μετριάζει την καρδιακή ανεπάρκεια. [232], ενώ η υπερέκφραση PKC ϵ ενισχύει την καρδιακή ανεπάρκεια. Επίσης η δυσλειτουργία της πρωτεΐνης HSP70 δείχνει να είναι επίσης σημαντική τόσο για την αντοχή του μυοκαρδίου έναντι στο ισχαιμικό στρες, αλλά και για την καρδιακή λειτουργικότητα. Η απαλοιφή της HSP70 σε γενετικά προσαρμοσμένα μοντέλα πειραματόζων, μείωσε την αντοχή στο ισχαιμικό στρες και ταυτόχρονα επιδείνωσε και την συσταλτικότητα [234], [235]. Η χορήγηση της θυροξίνης αμέσως μετά το έμφραγμα σε πειραματικά μοντέλα, μείωσε την έκφραση των PKC α και PKC ϵ ενώ αντίθετα αύξησε την έκφραση της HSP70 δείχνοντας έτσι ένα καινούριο μονοπάτι μέσω του οποίου η θυροξίνη προάγει την βελτίωση της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου [230].

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε, ενώ η βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης έχει συστηματικά διερευνηθεί σε φυσιολογικές καρδιές, λιγότερες μελέτες υπάρχουν που αφορούν στην απάντηση του ήδη παθολογικού ιστού στο ισχαιμικό στρες και οι περισσότερες αφορούν την υπερτροφική και την διαβητική καρδιά. Λιγότερα δεδομένα υπάρχουν σε πειραματικά μοντέλα εμφράγματος μυοκαρδίου και τα περισσότερα έχουν εστιάσει στην ισχαιμική προπόνηση και την προστατευτική δράση της στην μετεμφραγματική καρδιά. Λίγα είναι γνωστά για τους ενδογενείς μηχανισμούς προστασίας που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της δομικής αλλά και λειτουργικής αναδιαμόρφωσης που υφίσταται το βιώσιμο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο και ακόμα λιγότερα για τον χρονικό προσδιορισμό των αλλαγών αυτών.

Μηχανισμοί που αφορούν ενδοκυττάριας οδούς που σχετίζονται με την θυροξίνη, φαίνεται να αναπτύσσονται όψιμα μετά το έμφραγμα. Ο μεταβολισμός της θυροξειδικής ορμόνης τροποποιείται και οι θυροξειδικοί υποδοχείς TRα1 και TRβ1 απορυθμίζονται με αποτέλεσμα μια υποθυροξειδικού τύπου απάντηση του μυοκαρδίου στην ισχαιμική βλάβη. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τροποποίηση της αντοχής της καρδιάς στο ισχαιμικό στρες αλλά και με δυσμενή αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά.

Σκοπός της εργασίας μας είναι η μελέτη της αντοχής του εμφραγματικού μυοκαρδίου έναντι της ισχαιμικής βλάβης κατά την πρώιμη μετεμφραγματική περίοδο πριν από την ολοκλήρωση των δομικών-λειτουργικών αλλαγών της καρδιακής αναδιαμόρφωσης με τις δυσμενείς προγνωστικά συνέπειες από την εγκατάσταση του εμβρυικού φαινοτύπου. Αυτό άλλωστε αποκτά και κλινικό ενδιαφέρον αν αναλογιστούμε την αυξημένη συχνότητα των ισχαιμικών επεισοδίων κατά την πρώιμη μετεμφραγματική περίοδο σε συνδυασμό με την ιδιαίτερα αρνητική προγνωστική σημασία μιας νέας απώλειας βιώσιμου καρδιακού ιστού.

Λαμβάνοντας υπόψη την θετική επίδραση της χορήγησης της θυροξίνης στην αναστροφή της διαδικασίας της καρδιακής αναδιαμόρφωσης σε πειραματικά μοντέλα [230] αλλά συγχρόνως και την προστατευτική δράση αυτής έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε πειραματικά μοντέλα υγιούς καρδιάς, η δράση της θυροξίνης στο ήδη παθολογικό μυοκάρδιο και κυρίως στο εμφραγματικό μυοκάρδιο αποχτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η μελέτη αυτή θα αφορά την δεύτερη φάση έρευνας της παρούσης διατριβής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν άρρενες επίμυες τύπου Wistar-Kyoto, βάρους 280-320g. Ο χειρισμός των πειραματόζων έγινε σύμφωνα με τις Οδηγίες για τη Φροντίδα και τη Χρήση των Πειραματόζων (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals), όπως περιγράφονται στο US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, 1985). Οι επίμυες κρατήθηκαν σε κλιματιζόμενο, ειδικά διαμορφωμένο χώρο σταθερής θερμοκρασίας και περιοδικού φωτισμού και προσέλαβαν τροφή και νερό *ad libitum*. Η αναισθησία των επίμυων επιτεύχθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση υδροχλωρικής κεταμίνης (150 mg/kg).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

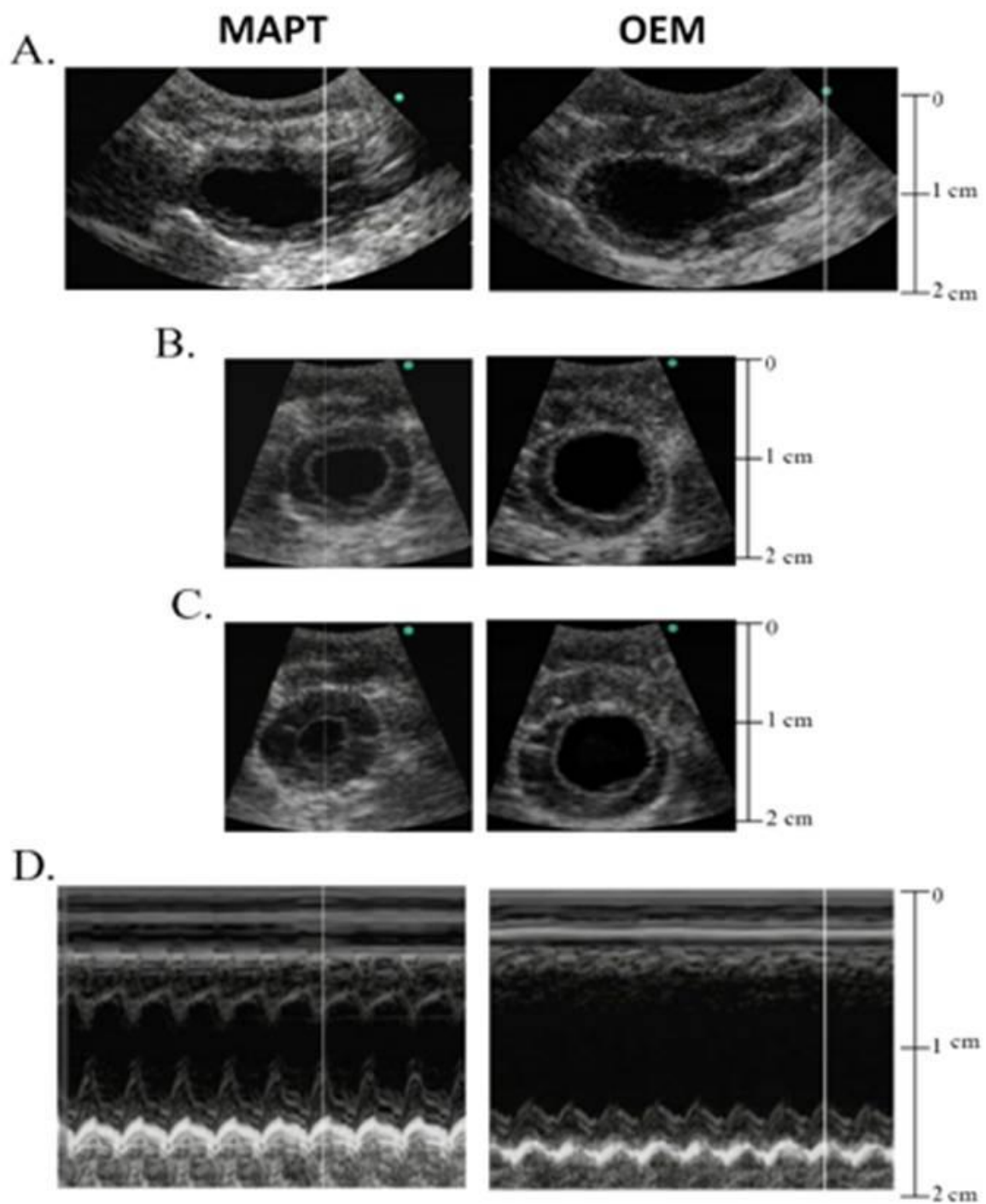
Στους επίμυες προκλήθηκε έμφραγμα του μυοκαρδίου με απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Αρχικά, υποβλήθηκαν σε αναισθησία με κεταμίνη (70 mg/kg) και μιδαζολάμη (0.1 mg/kg) ενδοπεριτοναϊκά, και κατόπιν σε διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό με αναπνευστήρα σταθερού όγκου (Harvard Apparatus, Inspira) ρυθμισμένο σε 50 αναπνοές/min και αναπνεόμενο όγκο 1ml/100g. Η γενική αναισθησία διατηρήθηκε με αναισθητικό αέριο (σεβοφλουράνιο 1-2%). Οι επίμυες υποβλήθηκαν σε αριστερή θωρακοτομή, στο 4^ο μεσοπλεύριο διάστημα, και ακολούθως περικαρδιοτομή. Η απολίνωση της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας έγινε με ράμμα 6-0 Prolene. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συρραφή του θωρακικού τοιχώματος. Η επέμβαση έγινε υπό συνεχή ΗΚΓφική παρακολούθηση, για εκτίμηση της καρδιακής συχνότητας και των ισχαιμικών αλλοιώσεων μετά την απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας. Η θερμοκρασία σώματος διατηρήθηκε στους 37°C με θερμαινόμενη κουβέρτα (Harvard Homeothermic Blanket, 50-7061). Οι επίμυες αφέθηκαν ώστε να αναρρώσουν για 2 εβδομάδες. Η ίδια διαδικασία (αναισθησία, διασωλήνωση, θωρακοτομή, ανάρρωση για 2 εβδομάδες) ακολουθήθηκε και σε εικονικά χειρουργημένους επίμυες, όπου δεν έγινε απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας.

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ

Οι επίμυες που έχουν υποστεί έμφραγμα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες, 24 ώρες μετά την επέμβαση. Η πρώτη εξ αυτών λαμβάνει κανονική τροφή (OEM), ενώ η δεύτερη, τροφή η οποία περιέχει 0.05% σκόνη θυρεοειδικής ορμόνης (Sigma, T1251, περιέχει 0.42μg/mg T₃ και 1.7 μg/mg T₄) για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων (OEM-ΘΟ). Η παραπάνω δόση της θυρεοειδικής ορμόνης έχει καθοριστεί από πιλοτικές μελέτες οι οποίες επιδιώκουν το μέγιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς την ύπαρξη ανεπιθύμητων ενεργειών. Η μέση ημερήσια πρόσληψη θυρεοειδικής ορμόνης ανά επίμυα ήταν 4μg T₃ και 16μg T₄, ενώ η απορρόφηση της θυρεοειδικής ορμόνης κυμαινόταν μεταξύ 50-75%. Οι εικονικά χειρουργηθέντες επίμυες ελάμβαναν κανονική τροφή και χαρακτηρίστηκαν ως ΜΑΡΤ.

ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Η υπερηχογραφική εκτίμηση πραγματοποιήθηκε με το ειδικό σύστημα Sonosite 180 Plus, υπερηχογραφικής ανάλυσης υψηλής συχνότητας με μορφομετατροπέα 7.0-MHz. Ελήφθησαν εικόνες κατά τον επιμήκη και εγκάρσιο άξονα της καρδιάς και υπολογίστηκε το κλάσμα εξωθήσεως, η διάμετρος της αριστεράς κοιλίας σε διαστολική (LVIDd) και συστολική φάση (LVIDs), το πάχος του οπισθίου τοιχώματος της αριστεράς κοιλίας (LVPW) και η ταχύτητα συστολικής βράχυνσης του οπισθίου τοιχώματος (PWV).



Εικόνα 4: υπερηχογραφική μελέτη στους επίμυες, A: προβολή κατά τον επιμήκη άξονα, B-C: προβολή κατά τον εγκάρσιο άξονα, D: μέτρηση ταχύτητας συστολής με την χρήση M-mode

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙΣΑΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ.

Καρδιές επίμιων μελετήθηκαν σε πειραματική διάταξη απομονωθέντων οργάνων σύμφωνα με την τεχνική Langendorff (Σχ. 12,13,14). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα πειραματικά στάδια:

ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΗΠΑΡΙΝΗΣ

Η αναισθητοποίηση των πειραματόζων έγινε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση υδροχλωρικής κεταμίνης σε δόση 150mg/kg βάρους. Ακολούθως χορηγήθηκε ηπαρίνη ενδοπεριτοναϊκά σε δόση 1000 IU/kg βάρους για την αποφυγή σχηματισμού θρόμβων.

ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΣ

Κάθε επίμυς μετά από την αναισθητοποίηση ακινητοποιήθηκε σε χειρουργική τράπεζα όπου έγινε χειρουργική διάνοιξη του θώρακα και εκτομή της καρδιάς, η οποία αμέσως μετά την αφαίρεσή της και μέχρι την απομόνωσή της από τους περιβάλλοντες ιστούς τοποθετήθηκε σε παγωμένο διάλυμα Krebs-Henseleit.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΙΑΠΟΤΙΣΗΣ

Η σύσταση του διαλύματος Krebs-Henseleit με το οποίο διαποτίστηκε η καρδιά αναφέρεται στον Πίνακα 1. Κατά την παρασκευή του διαλύματος μετά την προσθήκη γλυκόζης και πριν από την προσθήκη CaCl_2 το διάλυμα εμπλουτίστηκε με μείγμα O_2 95%- CO_2 5%. Το απιονισμένο ύδωρ που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος παρέχεται από εναλλακτήρα ιόντων τύπου Labconco.

ΑΝΑΡΤΗΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙΣΑΣ ΚΑΡΔΙΑΣ

Μετά από την απομόνωση από τους περιβάλλοντες ιστούς και σε χρονικό διάστημα που δεν υπερβαίνει τα 60 sec, η καρδιά αναρτήθηκε στην υποδοχή αορτής της

συσκευής Langendorff, όπου προσδέθηκε με νήμα και ακολούθως διαποτίστηκε παλίνδρομα με διάλυμα Krebs-Henseleit.

Συστατικό	mmol/lit διαλύματος	Μοριακό βάρος	Αναλογία gr/lit
NaCl	1.5	58.44	6.721
KCl	5.6	74.55	0.417
NaH ₂ PO ₄	0.5	156.01	0.078
KH ₂ PO ₄	0.5	136.9	0.068
MgCl ₂	1.0	203.3	0.203
NaHCO ₃	25.0	84.01	2.100
Γλυκόζη	10.0	180.16	1.802
CaCl ₂	1.8	147.0	0.265

Πίνακας 2 :Σύσταση διαλύματος Krebs-Henseleit

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα διατηρήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 37° C. Αυτό επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία ύδατος σταθερής θερμοκρασίας μεταξύ των διπλών τοιχωμάτων που διαθέτουν τα υάλινα όργανα. Στις περιόδους ισχαιμίας όπου διακόπηκε η ροή του διαλύματος, η καρδιά παρέμεινε στο εσωτερικό του λουτρού διαπότισης, το οποίο περιέχει διάλυμα Krebs-Henseleit.

ΒΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Κάθε καρδιά βηματοδοτήθηκε με συχνότητα 320 παλμούς ανά min με το βηματοδότη τύπου Harvard, το ηλεκτρόδιο του οποίου εφάπτεται στην επιφάνεια του μυοκαρδίου. Η

λειτουργία του βηματοδότη διακόπηκε κατά τις περιόδους ισχαιμίας καθώς και στα 8 πρώτα λεπτά της τελικής επαναιμάτωσης.

ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας η ροή στα στεφανιαία αγγεία διατηρήθηκε σταθερή σε τέτοιο επίπεδο έτσι ώστε η μέση πίεση διαπότισης των στεφανιαίων (Perfusion Pressure) να βρίσκεται στο επίπεδο των 65-70 mmHg. Έλεγχος της ροής έγινε με ογκομετρικό σωλήνα πριν από την έναρξη του πειράματος και σε τακτά χρονικά διαστήματα.

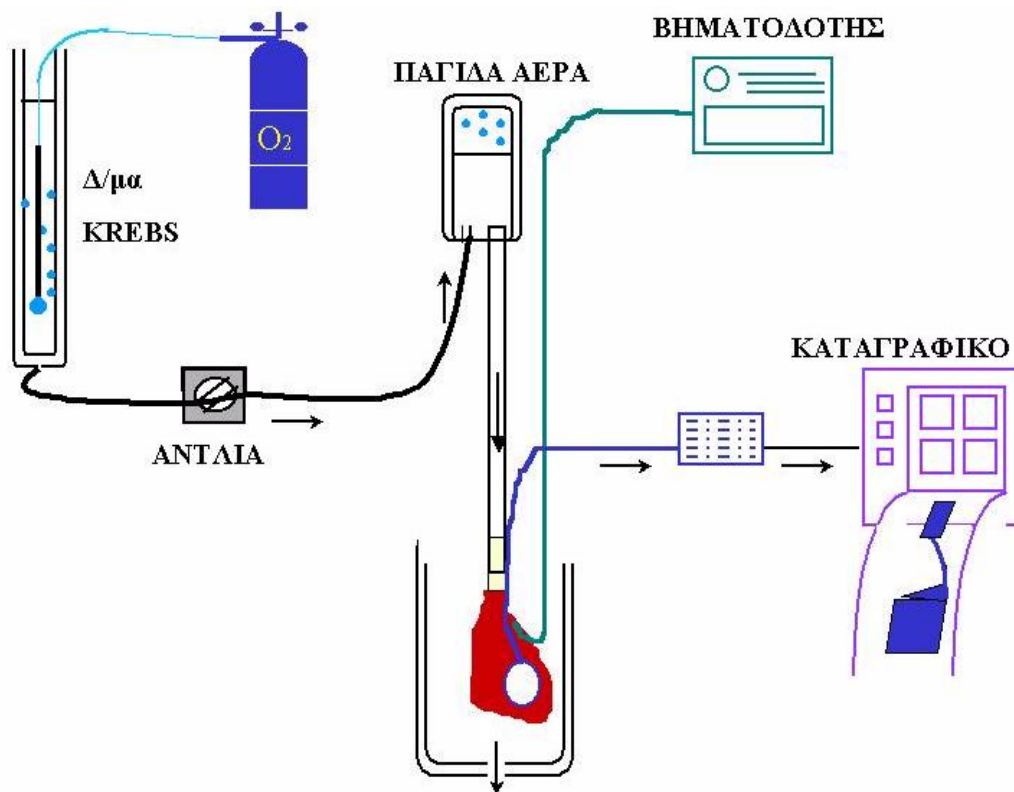
ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η ροή του διαλύματος στα στεφανιαία αγγεία διακόπηκε σταματώντας τη λειτουργία της αντλίας. Αυτό οδήγησε σε διακοπή τόσο της παροχής θρεπτικών συστατικών όσο και οξυγόνου στο μυοκάρδιο προκαλώντας ολική ισχαιμία μηδενικής ροής. Στη διάρκεια της ισχαιμίας, η καρδιά διατηρήθηκε μέσα σε δ/μα σταθερής θερμοκρασίας 37° C. Κατά την επαναιμάτωση, έγινε επαναφορά της λειτουργίας της αντλίας.

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ

Μετά τη διενέργεια τομής στον αριστερό κόλπο το μπαλόνι προωθήθηκε στο εσωτερικό της αριστεράς κοιλίας. Το μπαλόνι που βρίσκεται στην άκρη καθετήρα 6F, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το μετατροπέα πίεσης διατάθηκε με ύδωρ μέχρι να αποκτήσει τέτοιο όγκο, ώστε η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας να είναι 6 mmHg. Ο όγκος αυτός δε μεταβλήθηκε στη διάρκεια του πειράματος, με αποτέλεσμα η συστολή της αριστεράς κοιλίας να είναι ισοογκωτική. Επειδή δε ο όγκος της κοιλότητας της αριστεράς κοιλίας διατηρείται σταθερός, το μήκος της καρδιακής ίνας κατά τη διαστολή, που αντιπροσωπεύει το προφορτίο, δε μεταβάλλεται. Συνεπώς, η μέγιστη συστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας και η αναπτυσσόμενη πίεση της αριστεράς κοιλίας (LVDP- left ventricular developed pressure), η οποία ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ μέγιστης συστολικής και τελοδιαστολικής πίεσης αριστεράς κοιλίας, αντιπροσωπεύουν ένα δείκτη συσταλτικότητας ο οποίος λαμβάνεται σε ισομετρικές συνθήκες, και όχι απλά αιμοδυναμικές παραμέτρους. Ο μετατροπέας πίεσεως συνδέθηκε με ειδική συσκευή που μετατρέπει το αναλογικό σήμα σε ψηφιακό σήμα το οποίο λαμβάνεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και αναλύθηκε από ειδικό λογισμικό (IOX). Επιπρόσθετοι δείκτες της συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας, όπως η θετική και αρνητική πρώτη παράγωγος της LVDP ($+dp/dt$ και $-dp/dt$ σε mmHg/sec) υπολογίσθηκαν μέσω του λογισμικού αυτού.

Μετά από τη λήξη κάθε πειραματικού πρωτοκόλλου η καρδιά απομακρύνθηκε από την συσκευή με τη χρήση αποστειρωμένων εργαλείων και ακολούθως παρασκευάστηκε η αριστερά κοιλία και υπολογίσθηκε το βάρος της. Κάθε δείγμα μυοκαρδιακού ιστού τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο και ακολούθως σε καταψύκτη θερμοκρασίας -80°C .

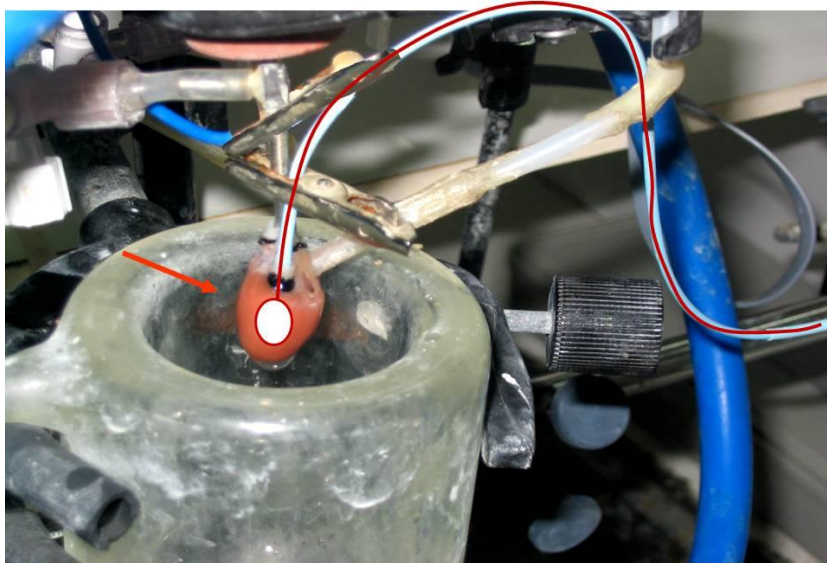


Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης Langendorff

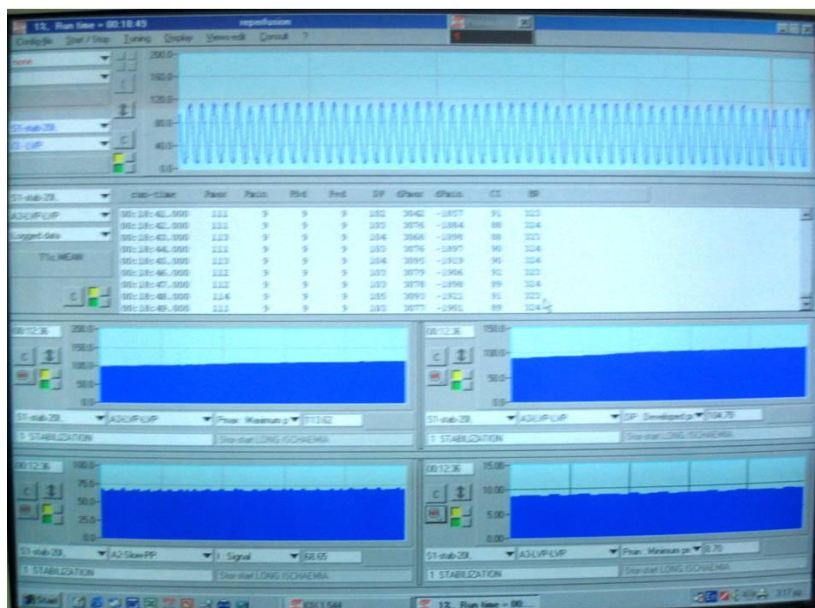
A.



B.



Εικόνα 6: Α. Πειραματική συσκευή απομονωθείσας καρδιάς Β. Απομονωθείσα καρδιά επίμυος κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας



Εικόνα 7: Εικόνα συνεχούς καταγραφής αιμοδυναμικών παραμέτρων από απομονωθείσα αριστερά κοιλία επίμυος μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ T₃ ΚΑΙ T₄

ΜΕΤΡΗΣΗ T₃

Για τη μέτρηση της T₃ χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) προσδιορισμού της ολικής τριϊωδοθυρονίνης (T₃). Το συγκεκριμένο kit είναι 96 θέσεων. Η αρχή μεθόδου, στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της T₃ των δειγμάτων ορού των ασθενών και T₃ που έχει προσδεθεί πάνω στο ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase) για τη σύνδεση με ειδικά αντισώματα για την T₃ που βρίσκονται ακινητοποιημένα στα πλακίδια. Η ολική T₃ αποδεσμεύεται από τις συνδετικές πρωτεΐνες μέσω ενός παράγοντα που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από εκπλύσεις, προστίθεται ειδικό υπόστρωμα το οποίο καταλύεται από το ένζυμο HRP με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος. Η ενζυμική αντίδραση (μπλε χρώμα) είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσού της T₃ που βρίσκεται σε κάθε δείγμα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματοςθειϊκού οξέος (αλλαγή χρώματος από μπλε σε κίτρινο). Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση σε ειδική συσκευή ELISA στα 450 nm και η συγκέντρωση της T₃ στα δείγματα και στο control διαβάζεται από την καμπύλη αναφοράς.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

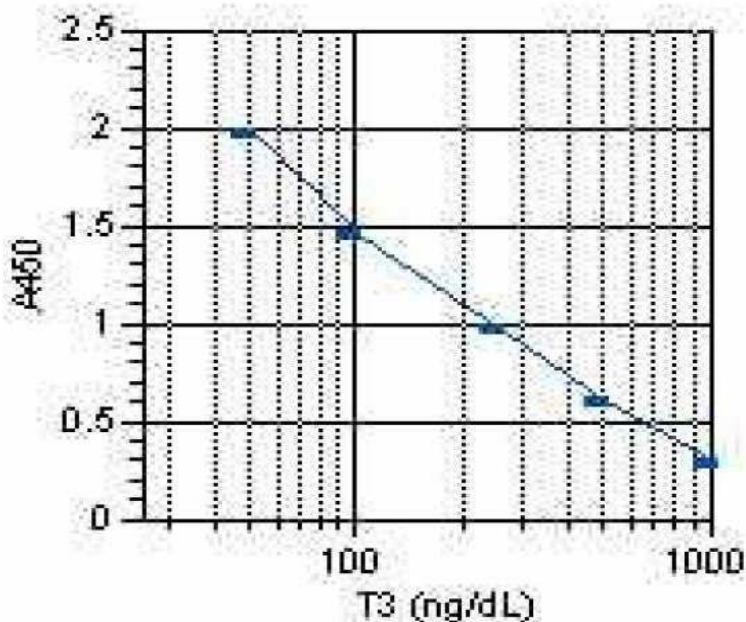
Πριν την έναρξη της μεθόδου αφήνουμε τα δείγματα ορού να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πηγάδια δεν πρέπει να στεγνώσουν σε κανένα από τα στάδια της μεθόδου. Το διάλυμα έκπλυσης αραιώνεται σε αναλογία 1:20 με απεσταγμένο νερό. Τα στάδια που εκτελούνται, είναι τα εξής:

1. Τοποθέτηση 50μl από κάθε δείγμα και από τα δείγματα αναφοράς εκτός από το τυφλό δείγμα.
2. Προσθήκη 100μl από το διάλυμα του ενζυμικού συμπλέγματος σε κάθε πηγάδι.

Μικρή ανάδευση.

3. Κάλυψη του πλακιδίου και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αναρρόφηση και έκπλυση των πηγαδιών 5 φορές με 300 μl διάλυμα έκπλυσης.
5. Προσθήκη 200 μl υποστρώματος του ενζύμου HRP ανά τακτά διαστήματα σε κάθε πηγάδι. Το υπόστρωμα προκύπτει με ανάμιξη ίσου όγκου διαλύματος A και B.
6. Κάλυψη του πλακιδίου, ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 50 μl διαλύματος θειϊκού οξέος σε όλα τα πηγάδια στα ίδια τακτά διαστήματα, όπως στο βήμα 6.
8. Μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm χρησιμοποιώντας ELISA reader, σε διάστημα 30 λεπτών.

Αρχικά υπολογίζεται ο λόγος $[A/A_0] \times 100$ για τα πρότυπα και τα δείγματα, όπου A η απορρόφηση για κάθε ζευγάρι προτύπου ή δείγματος και A_0 η μέση απορρόφηση του δείγματος αναφοράς 0 ug/dl. Σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη σε log-log κλίμακα απεικονίζοντας τις τιμές απορρόφησης των προτύπων σε σχέση με τις αντίστοιχες ολικές συγκεντρώσεις T_3 . Οι ολικές συγκεντρώσεις T_3 του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων των ασθενών διαβάζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς



Διάγραμμα 1: Τυπική καμπύλη ανάλυσης για T3. Τυπική σε 7-8 πειραματικές μελέτες

ΜΕΤΡΗΣΗ T₄

Για τη μέτρηση της T₄ χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) προσδιορισμού της ολικής τριϊωδοθυρονίνης (T₄). Το συγκεκριμένο kit είναι 96 θέσεων. Η αρχή μεθόδου, στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της T₄ των δειγμάτων ορού των ασθενών και T₄ που έχει προσδεθεί πάνω στο ένζυμο HRP (Horseradish peroxidase) για τη σύνδεση με ειδικά αντισώματα για την T₄ που βρίσκονται ακινητοποιημένα στα πλακίδια. Η ολική T₄ αποδε-σμεύεται από τις συνδετικές πρωτεΐνες μέσω ενός παράγοντα που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από εκπλύσεις, προστίθεται ειδικό υπόστρωμα το οποίο καταλύεται από το ένζυμο HRP με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος. Η ενζυμική αντίδραση (μπλε χρώμα) είναι αντιστρόφως ανάλογη του ποσού της T₄ που βρίσκεται σε κάθε δείγμα. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος θειϊκού οξέος (αλλαγή χρώματος από μπλε σε κίτρινο). Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση σε ειδική συσκευή ELISA στα 450 nm και η συγκέντρωση της T₄ στα δείγματα και στο control διαβάζεται από την καμπύλη αναφοράς.

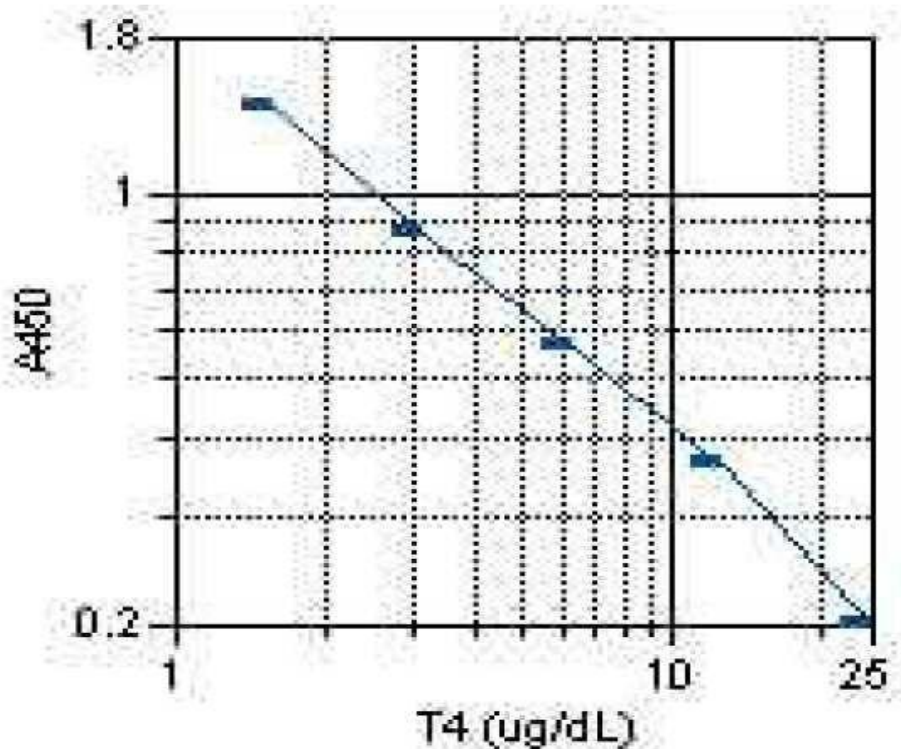
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Πριν την έναρξη της μεθόδου αφήνουμε τα δείγματα ορού να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πηγάδια δεν πρέπει να στεγνώσουν σε κανένα από τα στάδια της μεθόδου. Το διάλυμα έκπλυσης αραιώνεται σε αναλογία 1:20 με απεσταγμένο νερό. Τα στάδια που εκτελούνται, είναι τα εξής:

1. Τοποθέτηση 25 μl από κάθε δείγμα και από τα δείγματα αναφοράς εκτός από το τυφλό δείγμα.
2. Προσθήκη 100μl διαλύματος ενζυμικού συμπλέγματος σε κάθε πηγάδι. Μικρή ανάδευση.
3. Κάλυψη του πλακιδίου και επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αναρρόφηση και έκπλυση των πηγαδιών 5 φορές με 300 μl διάλυμα έκπλυσης.

5. Προσθήκη 200 μl υποστρώματος του ενζύμου HRP ανά τακτά διαστήματα σε κάθε πηγάδι. Το υπόστρωμα προκύπτει με ανάμιξη ίσου όγκου διαλύματος Α και Β.
6. Κάλυψη του πλακιδίου και ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 50 μl διαλύματος θειϊκού οξέος σε όλα τα πηγάδια στα ίδια τακτά διαστήματα, όπως στο βήμα 6.
8. Μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή μέτρησης ELISA.

Σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη σε log-log κλίμακα απεικονίζοντας τις τιμές απορρόφησης των προτύπων σε σχέση με τις αντίστοιχες ολικές συγκεντρώσεις T_3 . Οι ολικές συγκεντρώσεις T_3 του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων των ασθενών διαβάζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 2)



Διάγραμμα 2: Τυπική καμπύλη ανάλυσης για T4. Τυπική σε 5-7 πειραματικές μελέτες

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΑΙ ΜΗ-ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ

0.2 g ιστού αριστεράς κοιλίας από το κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκαν σε 2 ml διαλύματος ομογενοποίησης.

Το διάλυμα ομογενοποίησης παρασκευάστηκε ως εξής:

1. **5 ml** Tris-HCl (100mM pH=7.5)
2. **300μl** EDTA (500 mM)
3. **500 μl** PMSF (100 mM)
4. **300 μl** leupeptin (5 mg/ml)
5. **500 μl** Na₃VO₄ (100 mM) και
6. **50 μl** TritonX100
7. Έγινε ογκομέτρηση μέχρι τα 50ml.

Τα συστατικά του διαλύματος έχουν συγκεκριμένο ρόλο στη διαδικασία. Το Tris-HCl αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα και χρησιμοποιείται για να ρυθμίζει το pH του δ/τος μέσα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Το EDTA δεσμεύει το ασβέστιο. Το PMSF και leupeptin αποτελούν αναστολείς πρωτεασών έτσι ώστε οι απομονωθείσες πρωτεΐνες να διατηρηθούν ανέπαφες. Το Na₃VO₄ είναι αναστολέας των φωσφατασών και εμποδίζει την αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Το TritonX100 ανήκει στις απορρυπαντικές ουσίες και διαλυτοποιεί πλήρως τα κομμάτια της κυτταρικής μεμβράνης.

Με την ομογενοποίηση προκαλείται κατακερματισμός του ιστού, σπάσιμο των μεμβρανών και λύση των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες του ιστού αιωρούνται μέσα στο διάλυμα ομογενοποίησης. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 9150 rpm (10000g) για 10min στους 4 °C. Με τη φυγοκέντρηση αυτή καθιζάνουν, οι πρωτεΐνες του αδιάλυτου κλάσματος του κυττάρου (πυρήνας-κυτταροσκελετός), ενώ στο υπερκείμενο παραμένουν οι διαλυτές πρωτεΐνες (κυτοσόλιο-μεμβράνη).

Αφαιρείται από κάθε δείγμα το υπερκείμενο και φυλάσσεται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 ml διαλύματος ομογενοποίησης. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση όπως και παραπάνω. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αυτής πετιέται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 ml διαλύματος ομογενοποίησης. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για τον καθαρισμό του ιζήματος που δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις από πρωτεΐνες του κυτοσολίου. Τελικά το δείγμα φιλτράρεται μέσα από μια λεπτή, αποστειρωμένη γάζα που κρατάει τυχόν αδιάλυτα σωματίδια (ινώδης ιστός) και τοποθετείται στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Με τη μέθοδο αυτή που έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό της HSP27, διαχωρίζονται τελικά 2 κυτταρικά πρωτεϊνικά κλάσματα για κάθε δείγμα: το διαλυτό κλάσμα που περιέχει τις πρωτεΐνες κυτοσολίου-μεμβράνης και το αδιάλυτο κλάσμα που περιέχει τις πρωτεΐνες πυρήνα και κυτταροσκελετού.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BCA)

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με τη τεχνική που στηρίζεται στην οξειδο-αναγωγική αντίδραση που πραγματοποιεί ο CuSO_4 όταν έρθει σε επαφή με πρωτεΐνη. Η αντίδραση αυτή προκαλεί αλλαγή του χρώματος του CuSO_4 .

Η διαδικασία μέτρησης είναι η ακόλουθη:

1. Προσθέτουμε σε αριθμημένα σωληνάρια **96 μl H_2O** και **4 μl από κάθε δείγμα**
2. Προσθέτουμε 50 ml διαλύματος A σε 1 ml διαλύματος CuSO_4 (βλ. Παρασκευή $\Delta/\mu\alpha\tau\omega\nu$)
3. Από αυτό το $\delta/\mu\alpha$ προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο 2 ml.
4. Επωάζουμε τα δείγματα 30 min στους $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min.
6. Πραγματοποιούμε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 562 nm.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προκύπτει από την τιμή της φωτομέτρησης για το κάθε δείγμα με αναγωγή πάνω σε πρότυπη καμπύλη που γίνεται με πρότυπες συγκεντρώσεις αλβουμίνης σε διάλυμα ομογενοποίησης.

SDS ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Την απομόνωση των πρωτεϊνών και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους, ακολούθησε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή έχει ως ακολούθως: Ποσότητα από κάθε δείγμα που αντιστοιχεί σε 40μg ολικής πρωτεΐνης αναμιγνύεται με ίση ποσότητα διαλύματος Laemmli και θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 5 min στους 95°C. Η διαδικασία αυτή προκαλεί πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών στην πρωτοταγή τους δομή. Στη συνέχεια, τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% με τη ακόλουθη σύσταση: 4.1 ml d.d. H₂O, 3.3 ml Acrylamide, 2.5 ml TrisHCl 1.5M pH 8.8, 100 μl SDS 10%, 50 μl APS, 5 μl TEMED. Οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος διατρέχουν τους πόρους του πηκτώματος με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου 200 V που εφαρμόζεται για διάστημα 50 min. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα σε ειδικό δ/μα (Running buffer, βλ. Παρασκευή Δ/ματων). Με τον τρόπο αυτό, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο επόμενο στάδιο, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Hybond ECL) με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου (100 V για 1.5h στους 4 °C). Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα σε ειδικό δ/μα (Towbin buffer, βλ. Παρασκευή Δ/ματων). Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη βάφεται με τη κόκκινη χρωστική ronceau που έχει την ιδιότητα να συνδέεται πάνω στις πρωτεΐνες και να τις χρωματίζει. Με τον τρόπο αυτό, ελέγχεται η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς καθώς και τυχόν μικρές διακυμάνσεις στα φορτώματα των πρωτεϊνών ανάμεσα στα δείγματα.

ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ HSP27

Η ανοσοανίχνευση της φωσφορυλιωμένης HSP27 έγινε με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Επώαση της μεμβράνης για **1 ώρα με διάλυμα γάλακτος που καλύπτει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος πάνω στη μεμβράνη.**
Διάλυμα : 1.25gr non-fat milk + 25ml TBS-Tween.
2. Πλύσιμο της μεμβράνης 4 φορές x 5 min με 100 ml TBS-Tween.
3. Επώαση της μεμβράνης για **18-20 ώρες στους 4 °C** με το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος (αραίωση **1:1000**). *Διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος : 0.5gr αλβουμίνη + 10ml TBS-Tween + 10μl του αντισώματος.* Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα της εταιρείας Cell Signalling που προσδένεται ειδικά, μόνο πάνω στην πρωτεΐνη HSP27 που είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 82.
4. Πλύσιμο της μεμβράνης 4 φορές x 5 min με 100ml TBS-Tween.
5. Επώαση της μεμβράνης για **1 ώρα** με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος (αραίωση **1:4000**) υπό ανάδευση. *Διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος: 0.75gr non-fat milk + 15ml TBS-Tween + 3.75μl του αντισώματος (anti-rabbit HRP, Cell Signalling).* Το 2^ο αντίσωμα προσδένεται ειδικά πάνω στο 1^ο αντίσωμα ενώ είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase.
6. Πλύσιμο της μεμβράνης 4 φορές x 5 min με 100ml TBS-Tween.
7. Επώαση της μεμβράνης για 1 min με το διάλυμα ανίχνευσης (Lumiglo detection). Το ένζυμο horseradish peroxidase έχει την ικανότητα παρουσία του δ/τος ανίχνευσης να καταλύει αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός (χημειοφωταύγεια).
8. Έκθεση της μεμβράνης πάνω σε φιλμ.
9. Εμφάνιση του φιλμ. Το φως που παράγεται από την αντίδραση προκαλεί αμαύρωση πάνω στο φιλμ η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται.

ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ HSP27 και HSP70

Η ανοσοανίχνευση της ολικής **HSP27** και **HSP70** έγινε με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Επώαση της μεμβράνης για **1 ώρα με διάλυμα γάλακτος που καλύπτει τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος πάνω στη μεμβράνη.**
Διάλυμα : 1.25gr non-fat milk + 25ml TBS-Tween.
2. Για την **HSP27**, ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για **1h σε θερμοκρασία δωματίου**, υπό ανάδευση με το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος (αραίωση **1:500**).
Διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος : 0.5gr non-fat milk + 10ml TBS-Tween + 20μl του αντισώματος. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα της εταιρείας SantaCruz Biotechnologies που προσδένεται πάνω σε όλες τις μορφές της HSP27, φωσφορυλιωμένες και μη. Για την **HSP70**, ακολούθησε επώαση της μεμβράνης για **18-20 ώρες στους 4 °C**, υπό ανάδευση με το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος (αραίωση **1:1000**). *Διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος : 0.5gr non-fat milk + 10ml TBS-Tween + 10μl του αντισώματος.* Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα της εταιρείας StressGen.
3. Πλύσιμο της μεμβράνης 4 φορές x 5 min με 100ml TBS-Tween.
4. Επώαση της μεμβράνης για **1 ώρα** με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος (αραίωση **1:4000**). *Διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος: 0.75gr non-fat milk + 15ml TBS-Tween + 3.75μl του αντισώματος. (anti-goat HRP ή anti-mouse HRP).* Το 2^ο αντίσωμα προσδένεται ειδικά πάνω στο 1^ο αντίσωμα ενώ είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο horseradish peroxidase.
5. Πλύσιμο της μεμβράνης 4 φορές x 5 min με 100ml TBS-Tween.
6. Επώαση της μεμβράνης για 1 min με το διάλυμα ανίχνευσης (Lumiglo detection). Το ένζυμο horseradish peroxidase έχει την ικανότητα παρουσία του δ/τος ανίχνευσης να καταλύει αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός (χημειοφωταύγεια).
7. Έκθεση της μεμβράνης πάνω σε φίλμ.
8. Εμφάνιση του φίλμ. Το φώς που παράγεται από την αντίδραση προκαλεί αμαύρωση πάνω στο φίλμ η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ HSP27 και της ΟΛΙΚΗΣ HSP70

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών πάνω στο φιλμ έγινε με τη βοήθεια ειδικού συστήματος ανάλυσης Alphascan Imaging Densitometer (σαρωτής, ηλεκτρονικός υπολογιστής και ειδικό λογισμικό) που μετρά την πυκνότητα αμαύρωσης και το εμβαδόν της αμαύρωσης που παράγεται πάνω στο φιλμ για κάθε δείγμα. Η έκφραση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με βάση την οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος εξομαλυνόμενη με βάση μικρές διακυμάνσεις στα φορτώματα των δειγμάτων.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΝ α ΚΑΙ β ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ

Ποσότητα 0,15 g ιστού από την αριστερή κοιλία κάθε δείγματος ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα TBS (100 mM, pH 6.8). Ακολουθώντας, αραιώνονται 40 φορές σε διάλυμα Laemmli και ηλεκτροφορήθηκαν 2μg ολικής πρωτεΐνης(158,159). Παρασκευάστηκε γέλη 8% σε ακρυλαμίδιο (wt/vol), με περιεκτικότητα 5% (vol/vol) σε γλυκερόλη. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Biorad Protean II xi unit στα 240 V για 21 h στους 8 οC. Η γέλη μονιμοποιήθηκε και βάφτηκε με ειδική χρώση αργύρου (Biorad silver stain kit). Οι ισομορφές α και β της μυοσίνης ποσοτικοποιήθηκαν με το σύστημα AlphaScan Imaging Densitometer (Alpha Innotech Corporation, USA).

Μέτρηση αποδέσμευσης της γαλακτικής αφυδρογενάσης (LDH)

Το υγρό απορροής των στεφανιαίων συγκεντρώθηκε κατά την διάρκεια της επαναιμάτωσης και χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της γαλακτικής αφυδρογενάσης σπεκτροφωτομετρικά σε IU/L (LDH UV Fluid, Rolf Greiner Biochemica). Μετά τη μέτρηση της αποδέσμευσης της ολικής LDH ακολούθησε αναγωγή ανά γραμμάριο βιώσιμου καρδιακού ιστού. Το αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης μυοκαρδιακής νέκρωσης ισχαιμίας επαναιμάτωσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

Οι καρδιές από τους εικονικά χειρουργημένους αρουραίους καθώς και από τους εμφραγματικούς (αυτούς που υπεβλήθησαν σε απολίνωση της στεφανιαίας αρτηρίας) με ή χωρίς θυροξίνη αφαιρέθηκαν στο τέλος των 3 εβδομάδων και αναρτήθηκαν στην συσκευή λανγκενητορφ, '. Εκεί υπεβλήθησαν σε 20 λεπτά σταθεροποίηση, 30 λεπτά ολικής ισχαιμίας και 45 λεπτά επαναιμάτωσης. SHAM, n=10; AMI, n=9 and AMI+TH, n=8. Οι καρδιές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των δεικτών λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας πριν και μετά την ισχαιμία-επαναιμάτωση και για την ταυτοποίηση της ανοχής της του μυοκαρδίου έναντι του ισχαιμικού στρες (ανάκαμψη της λειτουργικότητας).

Ως δείκτες λειτουργικότητας της αριστεράς κοιλίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- LVSP: Συστολική πίεση αριστεράς κοιλίας (mmHg)
- LVEDP: Τελοδιαστολική πίεση αριστεράς κοιλίας (mmHg)
- LVDP: Αναπτυσσόμενη πίεση αριστεράς κοιλίας (mmHg), η οποία αποτελεί τη διαφορά των δύο προηγούμενων τιμών. Η LVDP μετρήθηκε στο τέλος της περιόδου σταθεροποίησης (LVDPs) και στα 45 λεπτά της αποκατάστασης ροής (LVDP_r). Ο λόγος LVDP_r/LVDPs εκφραζόμενος ως εκατοστιαίο ποσοστό (LVDP%) χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ανάκαμψης της αριστεράς κοιλίας.
- +dp/dt και -dp/dt: η θετική και αρνητική πρώτη παράγωγος της LVDP, που αποτελούν ακριβείς δείκτες της συστολικής και διαστολικής λειτουργίας της αριστεράς κοιλίας, αντίστοιχα.
- LVEDV: Τελοδιαστολικός όγκος αριστεράς κοιλίας, ο οποίος είναι ίσος με τον όγκο του μπαλονιού.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Καρδιές από τους εικονικά χειρουργημένους αρουραίους καθώς και από τους εμφραγματικούς με ή χωρίς θυροξίνη αφαιρέθηκαν 3 εβδομάδες μετά το έμφραγμα και εκ πλύθηκαν σε διάλυμα Krebs. Έπειτα ακολούθησε απομόνωση της αριστερής κοιλίας και απομάκρυνση του ουλώδους ιστού. Το υπόλοιπο κομμάτι κατεψύχθη με τη χρήση υγρού αζώτου

Στη συνέχεια, οι καρδιές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της έκφρασης της ολικής και φωσφορυλιωμένης HSP27 και HSP70, καθώς και των ισομορφών της βαρέας αλύσου μυοσίνης (SHAM-base, n=5 and AMI-base, n=5, AMI+TH-base, n=5).

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκφράστηκαν σε μέσες τιμές και παράλληλα υπολογίσθηκε το πειραματικό σφάλμα. Για τη διενέργεια πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνσή με τη χρήση της διόρθωσης κατά Bonferroni ή Dunnett. Για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ δύο ομάδων με κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t-test, ενώ στις περιπτώσεις που δεν τηρούνταν η προϋπόθεση της κανονικότητας χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney. Αν η πιθανότητα p ήταν μικρότερη από 0.05, τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΒΑΣΙΚΗ ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ Θ.Ο.

ΕΠΙΠΕΔΑ ΘΥΡΟΕΙΔΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Τα επίπεδα των T3 και T4 δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά δυο εβδομάδες μετά το έμφραγμα. Από την άλλη οι εμφραγματικοί επιμύες που έλαβαν θυρεοειδική ορμόνη παρουσίασαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα των T3 και T4. Η καρδιακή συχνότητα ήταν αυξημένη κατά 15% στην ομάδα OEM-ΘΟ σε σχέση με την ομάδα OEM, $p < 0,05$, ενώ δεν παρουσίαζε στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκρινόμενη με την ομάδα ΜΑΡΤ

	ΜΑΡΤ (n=10)	OEM (n=9)	OEM-ΘΟ (n=8)
T3 (nM)	1.4 (0.2)	1.27(0.2)	2.1 (0.5)**
T4 (nM)	79(12)	82 (18)	125 (10.0)**
Καρδιακή συχνότητα (σφ/λεπτο)	332 (25)	315 (35)	362 (30)**
Βάρος βιώσιμου μυοκαρδίου (mg)	625 (20)	450 (50)*	580 (35) ⁺

** $p < 0.05$ vs ΜΑΡΤ και OEM , * $p < 0.05$ vs ΜΑΡΤ, ⁺ $p < 0.05$ vs OEM

Πίνακας 3: επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών και καρδιακή συχνότητα

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΡΗΜΕΝΕΣ ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΑ

Οι μετεμφραγματικές καρδιές δυο εβδομάδες μετά την περίδεση του προσθίου κατιόντα παρουσίαζαν σημαντική διάταση της αριστερής κοιλίας και μειωμένη συσταλτικότητα. Η χορήγηση θυρεοειδικής ορμόνης είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή αύξηση του LVIDd με σημαντική βελτίωση σε όλους τους δείκτες της συσταλτικότητας,

	MAPT (n=10)	OEM (n=9)	OEM-ΘΟ (n=8)
Εμβαδόν ουλής (mm²)	-----	133 (8.8)	126 (9.7)
Βάρος ουλής (mg)	-----	252 (16.4)	207 (21.0)
LVIDd (mm)	6.7(0.3)	9.2(0.26)*	8.8(0.3)*
LVIDs (mm)	4.2(0.52)	8.1(0.4)*	7.1(0.46)**
LVPW (mm)	1.9(0.1)	2.0(0.1)	2.3(0.1)**
PWV (mm/sec)	35(8.8)	22(6.9)*	34(5.0) ⁺
EF%	71.5(6.8)	30(6.0)*	45.8(4.9)**

** p<0.05 vs MAPT και OEM , * p<0.05 vs MAPT, ⁺ p<0.05 vs OEM

Πίνακας 4: Βασικές παράμετροι καρδιακής λειτουργικότητας μετρημένες υπερηχογραφικά

ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΡΗΜΕΝΕΣ ΣΤΗΝ ΣΥΣΚΕΥΗ -LANGENDORFF

Οι τιμές των LVDP, +dp/dt and -dp/dt και για τις 3 ομάδες πειραματόζων μετρημένες σε ισομετρικές συνθήκες σταθερού προφορτίου-ανεξάρτητες μεταφορτίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα όλοι οι συστολικοί και διαστολικοί δείκτες λειτουργικότητας είναι σημαντικά μειωμένοι στις εμφραγματικές καρδιές. Αντίθετα η θυροξίνη φαίνεται να αναστρέφει και σχεδόν να φυσιολογικοποιεί τις δυσμενείς τιμές.

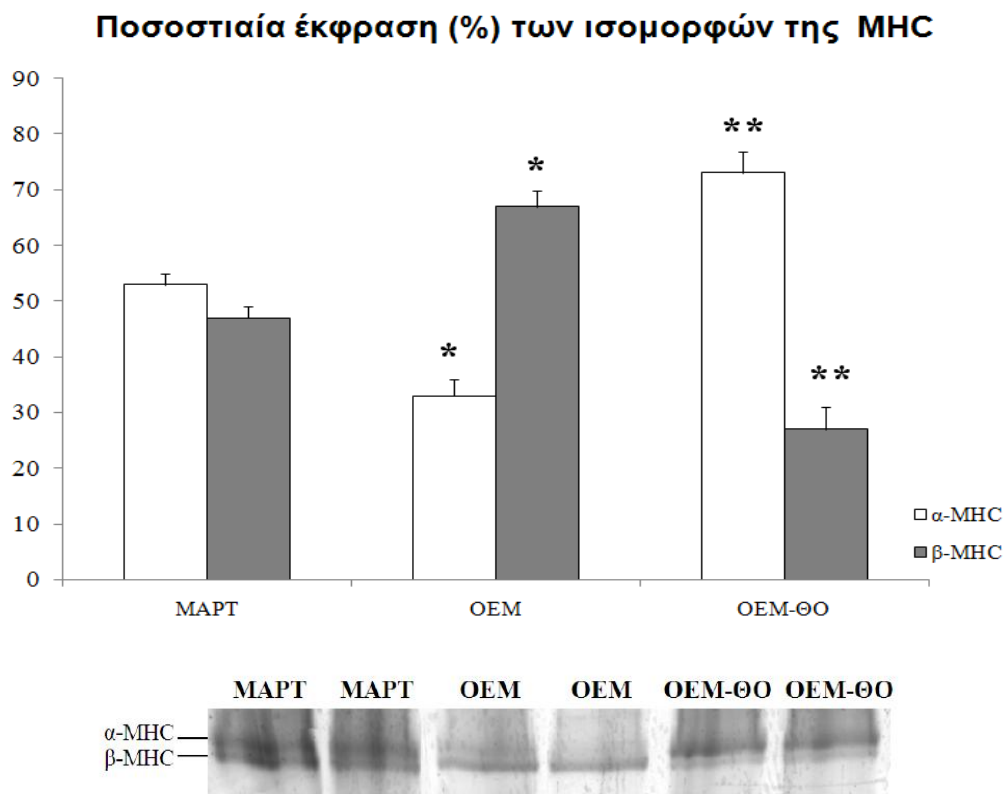
	MAPT (n=10)	OEM (n=9)	OEM-ΘΟ (n=8)
LVDP (mmHg)	117.5 (2.2)	87.4 (5.1)*	115.5 (6.5)**
+dp/dt (mmHg/s)	3994 (319)	2338 (135)*	3841 (295)**
-dp/dt (mmHg/s)	1938 (63)	1592 (65)*	2602 (155)#

** p<0.05 vs MAPT και OEM , * p<0.05 vs MAPT, † p<0.05 vs OEM

Πίνακας 5: Βασικές παράμετροι καρδιακής λειτουργικότητας μετρημένες στην συσκευή Langendorff

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΜΥΟΣΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Στις εμφραγματικές καρδιές (AMI-base hearts) ο λόγος της α -MHC προς την β -MHC βρέθηκε να είναι 1,5/2 δηλαδή 50% μειωμένος συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές καρδιές (SHAM-base hearts) όπου βρέθηκε σχετικά ισοροπημένος. Αυτό αντανακλά την αύξηση των ισομορφών της β -MHC. Αντίθετα στις μετεμφραγματικές καρδιές ζώων που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με θυροξίνη (AMI+TH-base hearts) παρατηρείται αναστροφή του τύπου των ισομορφών της μυοσίνης με αύξηση της α -MHC προς τη β -MHC. Έτσι το κλάσμα στις υπερθυροειδικές εμφραγματικές καρδιές βρέθηκε 2,5/1.

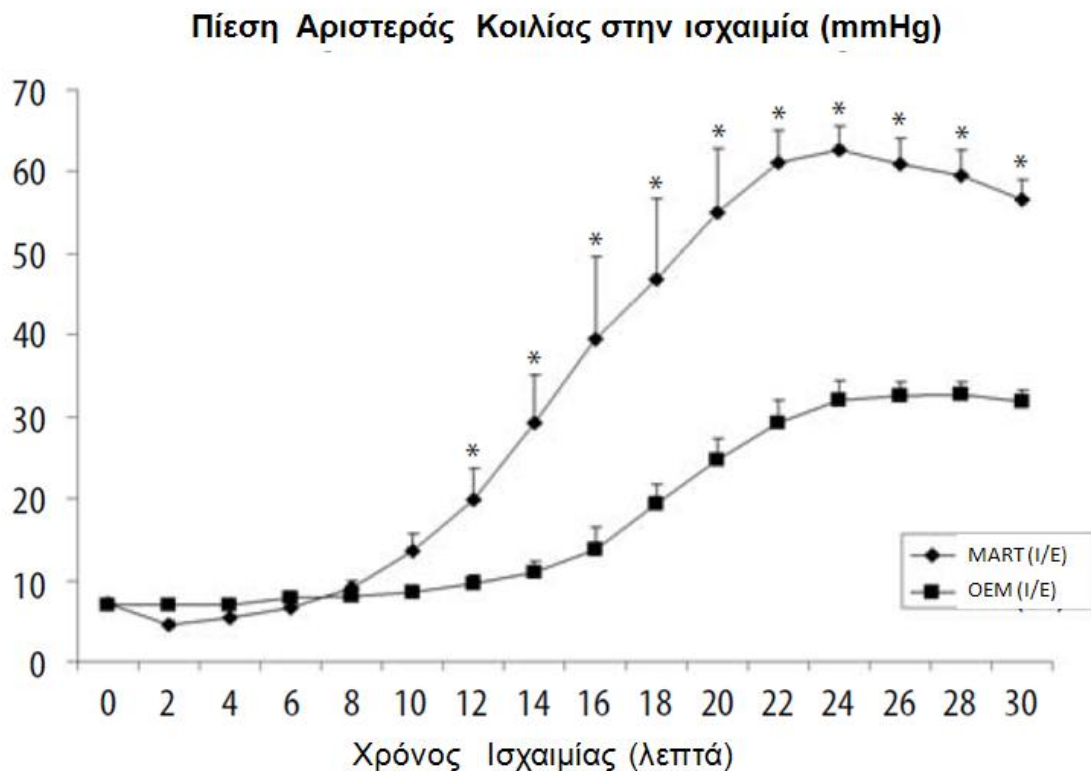


Εικόνα 8: Έκφραση των ισομορφών μυοσίνης στο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο

ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΥΠΕΡΣΥΣΠΑΣΗΣ

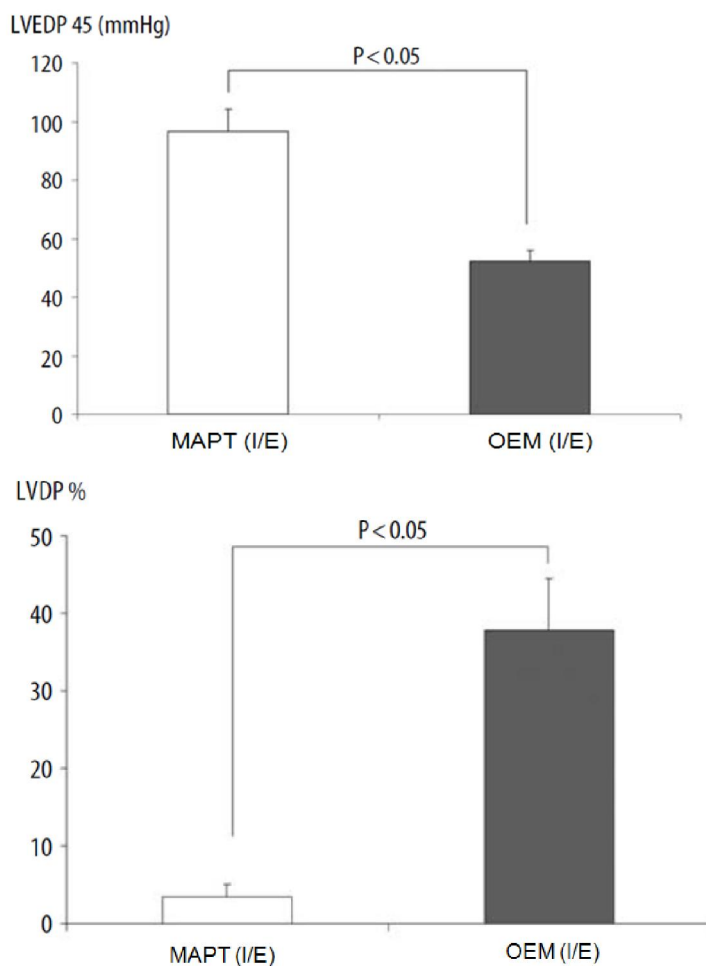
Τα προφίλ της ισχαιμικής σύσπασης φαίνονται στην φωτογραφία ... Στις εμφραγματικές καρδιές η τιμή της ισχαιμικής υπερσύσπασης είναι σημαντικά μειωμένη ενώ παρατηρείται σχετικά πρωιμότερα συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές καρδιές.



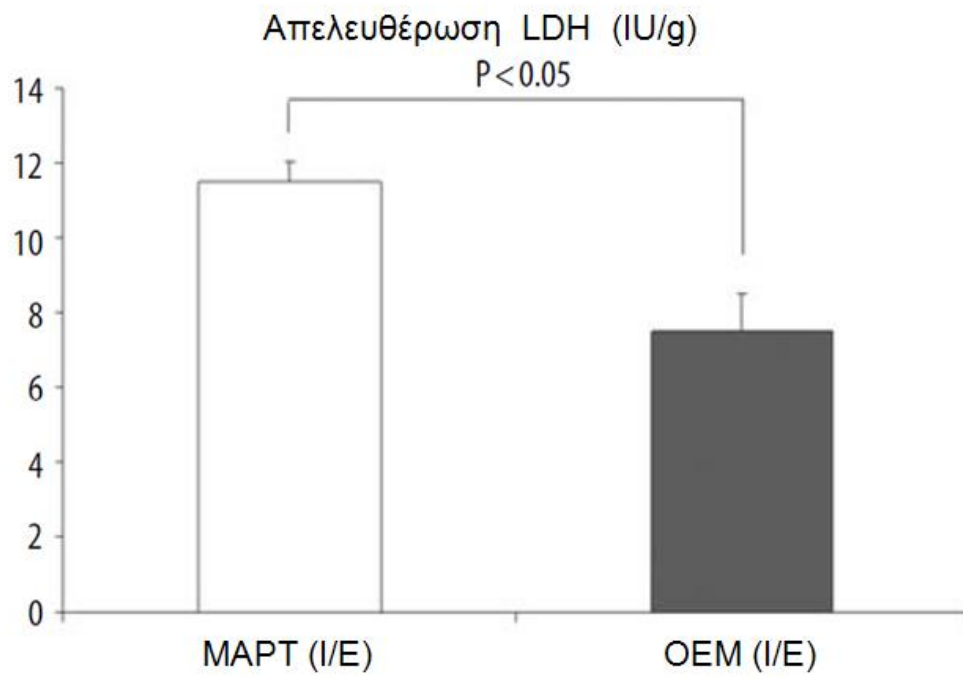
Εικόνα 9: Προφίλ της ισχαιμικής υπερσύσπασης στο εμφραγματικό μυοκάρδιο

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΜΕΤΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ (ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ LDH)

Η τελοδιαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας στο τέλος της επανοιμάτωσης (LVEDP45) ήταν 96.6 (7.5) για τα SHAM(I/R) και 52.1 (3.7) για τα AMI(I/R), $P < 0.05$. Η συστολική αναπτυσσόμενη πίεση της αριστερής κοιλίας LVDP45 ήταν 4.0 (1.8) για τις εικονικά χειρουργημένες μη εμφραγματικές καρδιές SHAM(I/R) έναντι του 33.9 (6.1) για τις εμφραγματικές καρδιές AMI(I/R), $P < 0.05$. πρόσθετα η επι τις εκατό τιμή της τελικής μετischαιμικής αναπτυσσόμενης πίεσης συγκριτικά με την προισχαιμική βασική τιμή LVDP% ήταν 3.5 (1.6) για τις εικονικά χειρουργημένες μη εμφραγματικές καρδιές SHAM(I/R) και 37.9 (6.7) για τις εμφραγματικές AMI(I/R), $P < 0.05$. Η απελευθέρωση της LDH (IU/g) ήταν 11.4 (0.56) για τα SHAM(I/R) συγκριτικά με 7.5 (1.0) για τα AMI(I/R), $P < 0.05$.



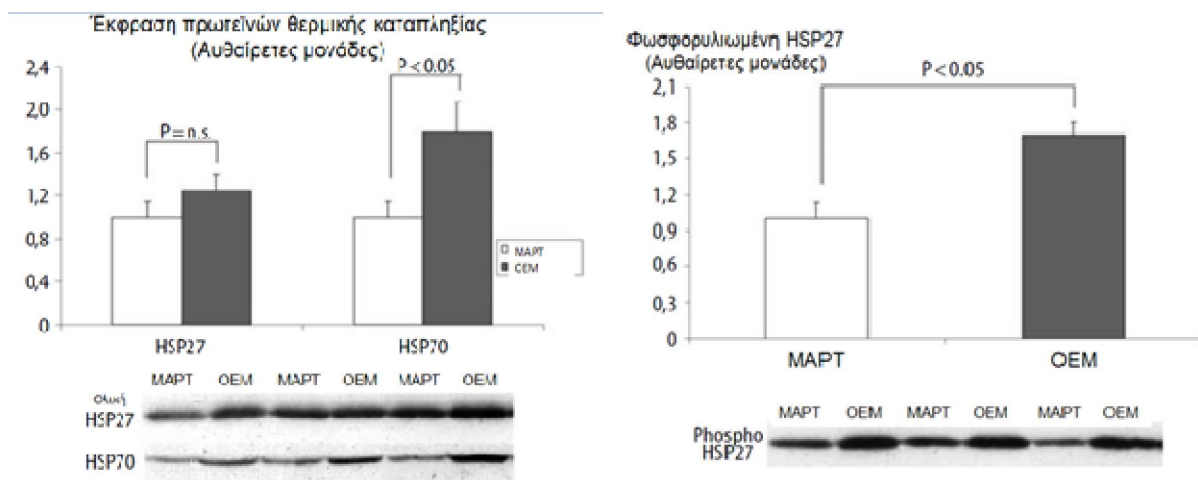
Εικόνα 10: Παράμετροι μετischαιμικής λειτουργικότητας μετρημένες στην συσκευή Langendorff



Εικόνα 11: Παράμετροι μετισταμικής νέκρωσης (αποδέσμευση LDH)

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Στις εμφραγματικές καρδιές (AMI-base hearts) η έκφραση της HSP70 βρέθηκε 1.8-φορές αυξημένη συγκρινόμενη με τις μη εμφραγματικές καρδιές (SHAM-base hearts) $P < 0.05$. Η ολική Total HSP27 έδειξε μια μικρή μόνο αύξηση στις εμφραγματικές καρδιές (AMI-base hearts) 1.25 φορές συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές (SHAM-base hearts) αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό. Παρόλα αυτά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης HSP27 βρέθηκαν αυξημένα κατά 1.7-fold στις εμφραγματικές καρδιές (AMI-base hearts) συγκριτικά με τις φυσιολογικές (SHAM-base hearts), $P < 0.05$

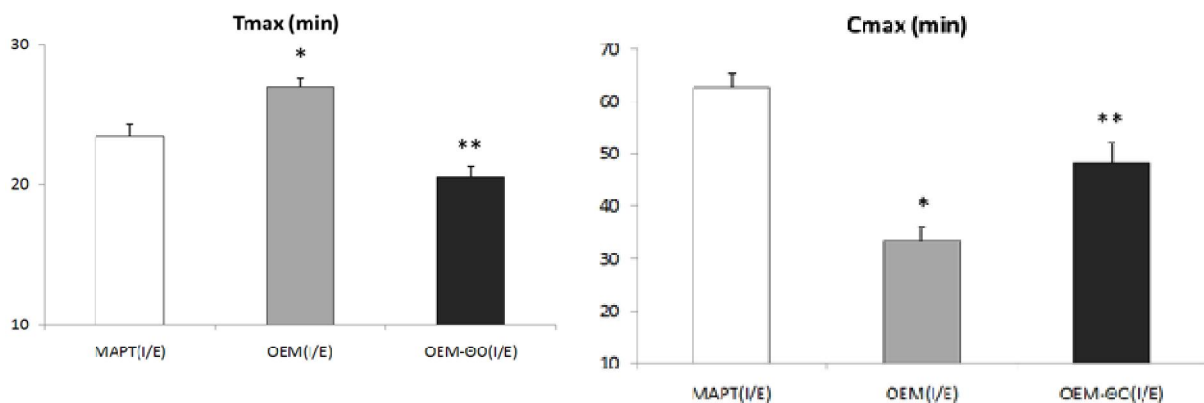


Εικόνα 12: έκφραση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας στο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο

ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ ΜΕΤΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΥΡΟΞΙΝΗΣ

ΠΡΟΦΙΛ ΤΗΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΥΠΕΡΣΥΣΠΑΣΗΣ

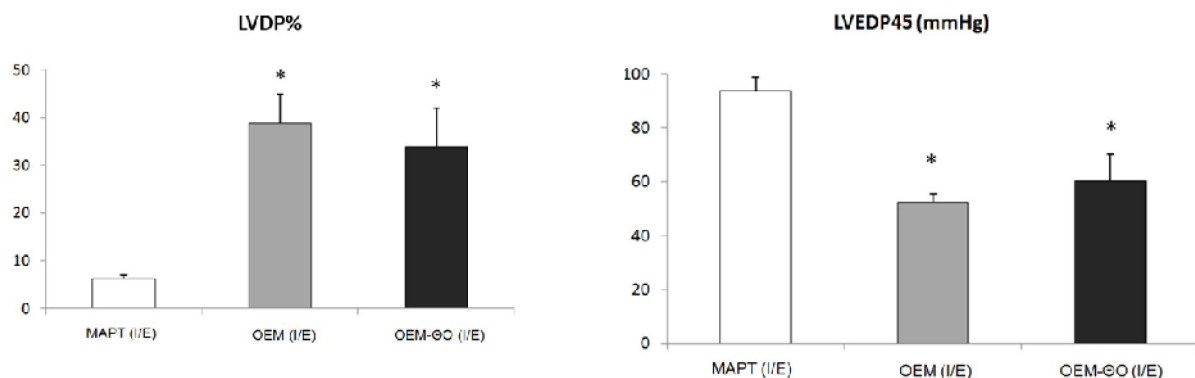
Το προφίλ της ισχαιμικής υπερσύσπασης φαίνεται στον πίνακα. Στις εμφραγματικές καρδιές ο χρόνος επίτευξης της ισχαιμικής υπερσύσπασης (Tmax) βρέθηκε αυξημένος συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές καρδιές 27 ± 0.6 min vs. 23.4 min. Αντίθετα το απόλυτο μέγεθος της ισχαιμικής υπερσύσπασης (Cmax) ήταν μειωμένο (33.5 ± 2.5 mmHg vs. 62.6 ± 2.6 mmHg). Στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές ο χρόνος επίτευξης της ισχαιμικής υπερσύσπασης ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τις εμφραγματικές μη υπερθυρεοειδικές καρδιές αλλά και τις μη εμφραγματικές καρδιές (20.5 ± 1.8 min, $p < 0.05$ vs. AMI). Επίσης το μέγεθος της υπερσύσπασης βρέθηκε αυξημένο συγκριτικά με τις εμφραγματικές καρδιές αλλά μειωμένο σε σύγκριση με τις μη εμφραγματικές εικονικά χειρουργηθείσες καρδιές. με τις δύο ομάδες σύγκρισης (48.2 ± 4.0 mmHg, $p < 0.05$ vs SHAM and AMI).



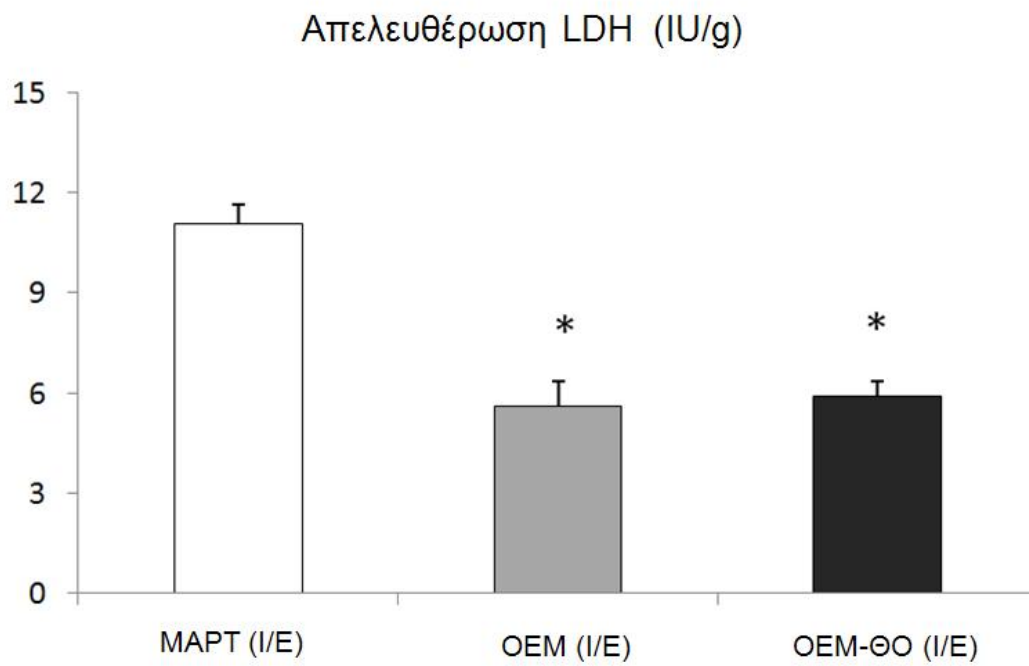
Εικόνα 13: προφίλ της ισχαιμικής υπερσύσπασης στις υπερθυρεοειδικές εμφραγματικές καρδιές

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΜΕΤΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ

Στις εμφραγματικές καρδιές, η παραγωγίμη πίεση LVDP45 αλλά και η διαστολική πίεση LVEDP45 ήταν 34.7 ± 5.4 mmHg και 52.2 ± 3.2 mmHg. Στις μη εμφραγματικές καρδιές οι αντίστοιχες τιμές ήταν 6.0 ± 1.4 mmHg και 93.7 ± 5.2 mmHg $p < 0.05$ (Fig.). Στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH hearts), οι τιμές των LVDP45 and LVEDP45 ήταν 38.2 ± 9.0 mmHg και 60.3 ± 9.8 mmHg αντίστοιχα ($p < 0.05$ vs. SHAM). Επιπρόσθετα, η εκατοστιαία αναλογία της αναπτυσσόμενης μετischαιμικής πίεσης συγκριτικά με την τιμή της σταθεροποίησης (LVDP%) ήταν 6.2 ± 0.7 για τις μη εμφραγματικές καρδιές (SHAM), 38.9 ± 6.0 για τις εμφραγματικές (AMI), ($p < 0.05$ vs. SHAM) και 33.9 ± 8.1 για τις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH) ($p < 0.05$ vs. SHAM). Η απελευθέρωση της LDH (IU/g) was 11.1 ± 0.55 για τις μη εμφραγματικές (SHAM) καρδιές vs 5.6 ± 0.78 για τις εμφραγματικές (AMI) ($p < 0.05$), και 5.9 ± 0.47 για τις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH), $p < 0.05$.



Εικόνα 14: Παράμετροι μετischαιμικής λειτουργικότητας της υπερθυρεοειδικής μετεμφραγματικής καρδιάς μετρημένες στην συσκευή Langendorff



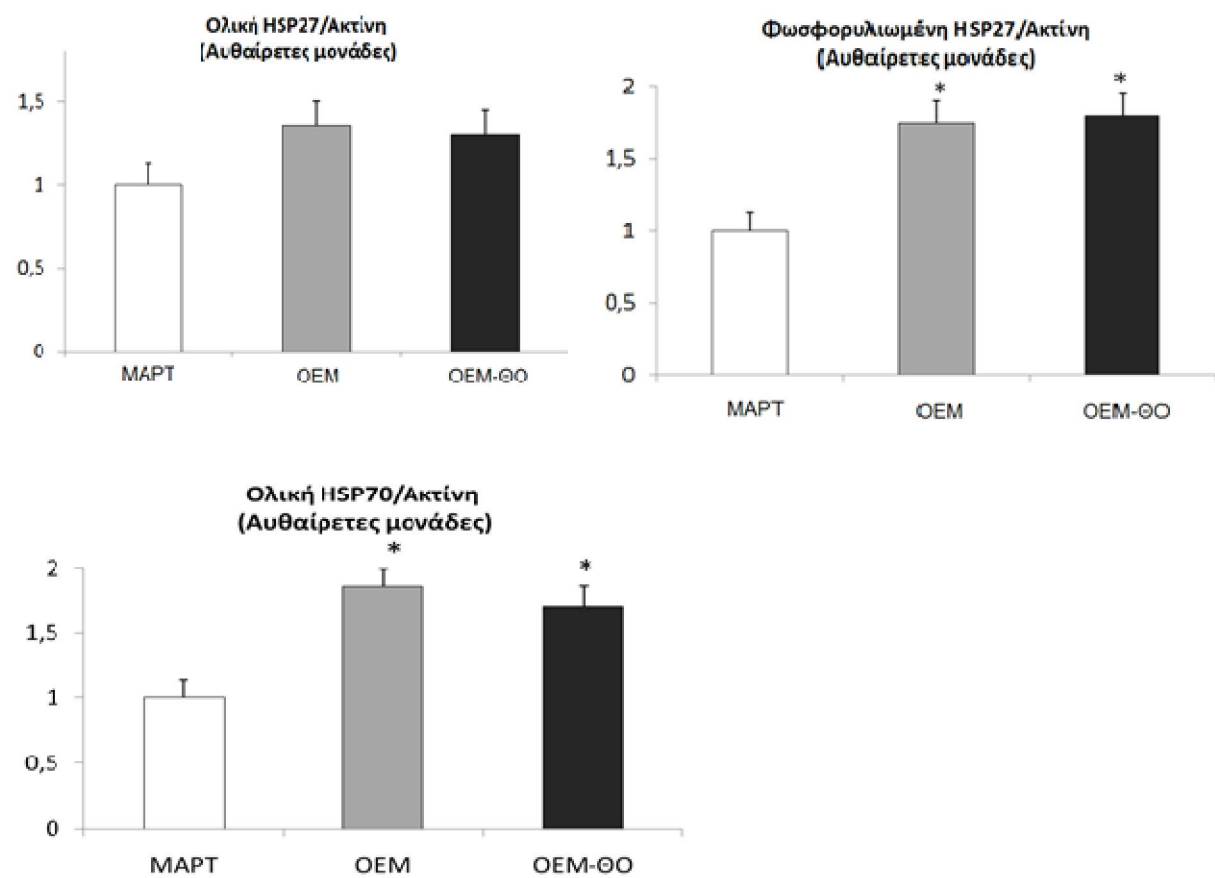
Εικόνα 15: Παράμετροι μετσοχαιμικής νέκρωσης (αποδέσμευση LDH) στο υπερθυρεοειδικό εμφραγματικό μυοκάρδιο

ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΗΣ HSP27

Η έκφραση της HSP70 αυξήθηκε κατά 1.8 φορές στις εμφραγματικές καρδιές (AMI-base) και 1.7 φορές στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH-base) συγκρινόμενη με τις μη εμφραγματικές (SHAM-base). ($P < 0.05$)

Η ολική HSP27 παρουσίασε μια μικρή αύξηση στις εμφραγματικές (AMI-base) αλλά και στις μη εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH-base) αλλά σε επίπεδο μη στατιστικής σημαντικότητας.

Αντίθετα τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης HSP27 στις εμφραγματικές (AMI-base) και εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές (AMI+TH-base) βρέθηκαν αυξημένα κατά 1.75 και 1.8 φορές αντίστοιχα, συγκρινόμενα με τις μη εμφραγματικές καρδιές (SHAM-base) ($p < 0.05$).



Εικόνα 16: έκφραση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας στο υπερθυρεοειδικό μετεμφραγματικό μυοκάρδιο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η καταγραφή της λειτουργικότητας, του βιώσιμου εμφραγματικού μυοκαρδίου πρώιμα 2 εβδομάδες μετά το οξύ έμφραγμα και κυρίως η μελέτη της αντοχής αυτού σε νέα βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Επίσης μελετήσαμε τις αλλαγές στην αντοχή αυτή του εμφραγματικού μυοκαρδίου μετά την χορήγηση ενός παράγοντα τροποποίησης της μετεμφραγματικής λειτουργικότητας όπως είναι η θυροξίνη.

Η λειτουργικότητα της εμφραγματικής καρδιάς μετρήθηκε σε *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες και βρέθηκε σημαντικά μειωμένη 2 εβδομάδες μετά την πρόκληση του εμφράγματος. Έτσι όπως προαναφέρθηκε το κλάσμα εξώθησης σαν δείκτης που αντανακλά τη συνολική συστολική λειτουργικότητα της καρδιάς βρέθηκε σημαντικά μειωμένο συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές καρδιές. Βέβαια το κλάσμα εξώθησης σαν δείκτης σφαιρικής λειτουργικότητας πιθανά να μην αντανακλά με ακρίβεια την συσταλτικότητα του μη εμφραγματικού ιστού επηρεαζόμενο από την γεωμετρία της καρδιάς, από το μέγεθος της ουλής την απώλεια συσταλτού ιστού αλλά και από τις συνθήκες προφόρτισης και τοιχωματικού στρες. Προκειμένου να μελετήσουμε καλύτερα την λειτουργικότητα του βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού, προχωρήσαμε στην μέτρηση ενός δείκτη που αντανακλά πιο καλά την τμηματική συσταλτικότητα όπως η ταχύτητα συστολής του βιώσιμου μη εμφραγματικού τοιχώματος. Το τοίχωμα που μελετήθηκε ήταν το κατώτερο τοίχωμα άρα και το πιο απομακρυσμένο από την εμφραγματική βλάβη, δεδομένο ότι τα εμφράγματα της μελέτης ήταν πρόσθια. Και αυτός ο δείκτης βρέθηκε σημαντικά μειωμένος στις εμφραγματικές καρδιές συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές. Βέβαια και η ταχύτητα συστολής αν και τμηματικός δείκτης συσταλτικότητας, επηρεάζεται και αυτός, σαν τους περισσότερους *in vivo* δείκτες από τις αιμοδυναμικές συνθήκες που φαίνεται να είναι επηρεασμένες μετεμφραγματικά.

Με στόχο μια πιο αντικειμενική μέτρηση της λειτουργικότητας προχωρήσαμε στην αφαίρεση των καρδιών και στην μέτρηση της λειτουργικότητας σε *in vitro* συνθήκες, με την χρήση της συσκευής Langendorff. Οι μετρήσεις έγιναν σε συνθήκες σταθερού

προφορτίου και ισομετρικής συστολής. Όλες οι μετρήσεις της λειτουργικότητας βρέθηκαν μειωμένες στο μυοκάρδιο των εμφραγματικών καρδιών, αντανακλώνοντας έτσι - πέρα από την απώλεια συσταλτής μάζας - τη δυσλειτουργία του βιώσιμου μη εμφραγματικού ιστού λόγω της αρχόμενης διαδικασίας της καρδιακής αναδιαμόρφωσης, με όλες τις δυσμενείς συνέπειες στην λειτουργικότητα αλλά και την πρόγνωση που περιγράψαμε σε προηγούμενα κεφάλαια.

Φαίνεται λοιπόν ότι η διαδικασία της παθολογικής καρδιακής αναδιαμόρφωσης να ξεκινά πρώιμα στο μετεμφραγματικό μυοκάρδιο, τουλάχιστο στα μεγάλα εμφράγματα όπως αυτά της μελέτης. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε πέραν από το λειτουργικό επίπεδο, και σε μοριακό επίπεδο με τη μέτρηση των ισομορφών της μυοσίνης. Ενώ στις μη εμφραγματικές καρδιές το κλάσμα ήταν ισορροπημένο με τις δύο ισομορφές να μην υπερτερούν η μία της άλλης (50% α -MHC / 50% β -MHC) , στις εμφραγματικές καρδιές φαίνεται το κλάσμα να αναστρέφεται με την σαφή υπεροχή της β μυοσίνης έναντι της α . (30% α -MHC / 70% β -MHC). Αυτό εν μέρει δικαιολογεί και τα λειτουργικά αποτελέσματα , αν αναλογιστούμε τις διαφορετικές ιδιότητες των δύο αυτών ισομορφών όσον αφορά την ταχύτητα επίτευξης της συστολικής διαδικασίας αλλά και το συνολικό παραγόμενο μηχανικό έργο. Είναι αξιοσημείωτο ότι αν και τα γονίδια της καρδιακής μυοσίνης φαίνεται να βρίσκονται γενικά κάτω από τον έλεγχο της T3 [190], στο πρώιμο αυτό μετεμφραγματικό στάδιο των 2 εβδομάδων, δεν προκύπτουν σημαντικές αλλαγές στις οδούς επαγωγής σήματος της θυροξίνης. Αυτές, όπως αναφέρεται σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου μας φαίνεται να ξεκινούν στις 8 εβδομάδες μετεμφραγματικά στο δεδομένο πειραματικό εμφραγματικό μοντέλο [236]. Φαίνεται λοιπόν η μεταβολή του κλάσματος των ισομορφών της μυοσίνης πρώιμα μετεμφραγματικά να σχετίζεται περισσότερο με μηχανισμούς που αφορούν τις αιμοδυναμικές συνθήκες φόρτισης της καρδιάς όπως προκύπτει και από άλλες μελέτες ισομορφών της μυοσίνης σε διάφορες παθολογικές συνθήκες φόρτισης [192, 197].

Η αντοχή της μετεμφραγματικής καρδιάς στην ισχαιμία μελετήθηκε με το πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε απομονωμένη καρδιά που περιγράφηκε εκτενώς στις μεθόδους, με την χρήση της συσκευής Langendorff. Οι καρδιές

υπεβλήθησαν σε ολική ισχαιμία μηδενικής ροής για 30 λεπτά που ακολουθήθηκε από 45 λεπτά επαναιμάτωσης.

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής φάσης η ισχαιμική σύσπαση μελετήθηκε στις εμφραγματικές καρδιές σε σύγκριση με τις μη εμφραγματικές. Στις εμφραγματικές καρδιές ο χρόνος επίτευξης της ισχαιμικής υπερσύσπασης (Tmax) βρέθηκε αυξημένος συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές καρδιές ενώ το απόλυτο μέγεθος της ισχαιμικής υπερσύσπασης (Cmax) ήταν μειωμένο. Κατά τη φάση της επαναιμάτωσης η ανάκαμψη της μετισχαιμικής λειτουργικότητας όπως αντανακλάται από την αναπτυσσόμενη συστολική πίεση καθώς και από την διαστολική πίεση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις εμφραγματικές καρδιές συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές. Επίσης η κυτταρική νέκρωση κατά την ισχαιμία αλλά και την επαναιμάτωση μετρούμενη με την συνολική LDH που απελευθερώθηκε από τις καρδιές μέχρι το τέλος του πειράματος, ήταν και αυτή σημαντικά μειωμένη στις εμφραγματικές καρδιές. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι η εμφραγματική καρδιά παρουσιάζει αυξημένη αντοχή έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης.

Ενώ υπάρχουν σημαντικά δεδομένα για την αντοχή παθολογικού μυοκαρδίου στην ισχαιμική βλάβη τα πιο πολλά από αυτά αφορούν παθολογίες όπως ο διαβήτης, η καρδιακή υπερτροφία ή η καρδιακή ανεπάρκεια.[142, 237-239] Λίγες μελέτες έχουν παρουσιάσει δεδομένα για την αντίσταση του αναδιαμορφούμενου εμφραγματικού μυοκαρδίου, έναντι της ισχαιμικής βλάβης[240, 241]. Έτσι π.χ. σε ένα πειραματικό μοντέλο ολικής ισχαιμίας επαναιμάτωσης, το μέγεθος της ιστικής νέκρωσης ήταν σαφώς μειωμένο στις εμφραγματικές καρδιές συγκριτικά με τις φυσιολογικές. [242]

Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες μελέτες αναλώνονται περισσότερο στην μελέτη της δράσης της ισχαιμικής προπόνησης πάνω στο παθολογικό μυοκάρδιο παρά στους ενδογενείς μηχανισμούς που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης και οι οποίοι δρουν καρδιοπροστατευτικά έναντι στην ισχαιμική βλάβη[240, 242, 243]. Για αυτούς τους μηχανισμούς λίγα είναι γνωστά.

Καταρχάς θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί ότι η αυξημένη αυτή αντοχή των εμφραγματικών καρδιών οφείλεται σε μια διαδικασία φυσικής επιλογής των πιο

ανθεκτικών στην ισχαιμία πειραματόζων. Όμως αν και η πιθανότητα αυτή δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως, είναι τόσοι άλλοι παράγοντες εκτός της ισχαιμίας που θα μπορούσαν να ευθύνονται για την θνητότητα των πειραματόζων κατά την μετεμφραγματική περίοδο, όπως π.χ. αιμορραγία, πνευμοθώρακας, λοίμωξη, οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, αρρυθμίες κτλ, ώστε είναι απίθανο μόνο τα ανθεκτικά στην ισχαιμία πειραματόζωα επιβίωσαν όλων αυτών των επιπλοκών. Το πιο πιθανό είναι ότι κατά την διαδικασία της αναδιαμόρφωσης αναπτύσσονται από το ίδιο το μυοκαρδιακό κύτταρο προστατευτικοί μηχανισμοί που το καθιστούν ισχυρό έναντι μιας ενδεχόμενης ισχαιμικής βλάβης, με το αντίτιμο βέβαια της πενιχρής λειτουργικότητας που παρουσιάζουν οι αναδιαμορφούμενες καρδιές.

Ο ευεργετικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας και κυρίως της HSP70 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της, έχει εκτενώς μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Όπως προαναφέραμε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο στην εισαγωγή η υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών δεν σχετίζεται αποκλειστικά με το θερμικό στρες. Σε μια πρωτεομική μελέτη καρδιακής ανεπάρκειας επαγόμενης με τεχνητή ταχυκαρδία σε πειραματόζωα, βρέθηκε αυξημένο ποσοστό μικρομοριακών πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας, (HSP) 27, και HSP20. Μάλιστα ιδιαίτερα αυξημένα βρέθηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης HSP27 πρωτεΐνης που είναι και η δραστική μορφή της πρωτεΐνης [244].

Η ισχαιμία επίσης προάγει την υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. Επίσης η ισχαιμική προπόνηση φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών και να επάγει έτσι καρδιοπροστασία [245]. Επίσης όπως προαναφέραμε η αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας επάγεται σε διάφορες παθολογίες του καρδιακού μυός όπως ο διαβήτης ή η καρδιακή υπερτροφία του υπερθυρεοειδισμού [220]. Η υπερέκφραση της φωσφορυλιωμένης HSP27 φαίνεται επίσης να εμπλέκεται στην προστασία που παρουσιάζουν οι διαβητικές καρδιές κατά τα πρώιμα στάδια του διαβήτη στην ισχαιμική βλάβη [145].

Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, προχωρήσαμε στη μελέτη των ενδεχόμενων αλλαγών στην έκφραση των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας στο εμφραγματικό μυοκάρδιο, στα

πρώτα στάδια της κυτταρικής αναδιαμόρφωσης. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, τα επίπεδα της HSP70 βρέθηκαν 2 φορές αυξημένα στις εμφραγματικές καρδιές συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα της HSP27. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της HSP27. Η αύξηση αυτή των πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας προκαλεί τουλάχιστο κατά ένα μέρος την αυξημένη αντίσταση της εμφραγματικής καρδιάς στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης.

Ο ρόλος της θυροξίνης στην προστασία από την βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης έχει επιμελώς μελετηθεί στο μη εμφραγματικό μυοκάρδιο. Έτσι η οξεία χορήγηση T3 φαίνεται να βελτιώνει την μετeisχαιμική λειτουργικότητα μετά την έκθεση σε ολική ισχαιμία και επαναιμάτωση σε ex vivo πειραματικά μοντέλα κυνός [213]. Παρόμοια σε ένα μοντέλο απομονωμένης καρδιάς επίμυων η οξεία χορήγηση T3 βελτίωσε το καρδιακό έργο καθώς και την αποτελεσματικότητα της καρδιάς μετά από την έκθεση σε βλάβη ολικής ισχαιμίας επαναιμάτωσης [219]. Η χρόνια χορήγηση θυροξίνης για δυο εβδομάδες ή για δέκα ημέρες επίσης κατέληξε σε αυξημένη προστασία έναντι της βλάβης ολικής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης ενώ η χορήγηση δοβουταμίνης κατέληξε σε δυσμενή αποτελέσματα [208, 246].

Η δράση της χρόνιας χορήγησης θυροξίνης όσον αφορά την αντίσταση της εμφραγματικής καρδιάς έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Άλλωστε όπως περιγράψαμε πρόκειται για ένα ήδη προστατευμένο υπόστρωμα έναντι της βλάβης ισχαιμίας επαναιμάτωσης οπότε όπως θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί δεν έχει κάποιο νόημα η χορήγηση ενός παράγοντα βελτίωσης της ήδη βελτιωμένης αντοχής έναντι της ισχαιμικής βλάβης. Όπως περιγράψαμε όμως στην εισαγωγή, η πρόγνωση στην εμφραγματική αναδιαμορφούμενη καρδιά δεν καθορίζεται μόνο από το θετικό - ούτως ή άλλως - γεγονός της αυξημένης αντίστασης στη ισχαιμική βλάβη που περιγράψαμε νωρίτερα αλλά κυρίως καθορίζεται από την μειωμένη λειτουργικότητα, την δυσμενή ανατομία-γεωμετρία και τον προγραμματισμένο θάνατο –απόπτωση που υφίστανται τα μυοκαρδιακά κύτταρα από τα πρώιμα ακόμα στάδια της καρδιακής αναδιαμόρφωσης.

Στο κεφάλαιο της εισαγωγής επίσης παρουσιάσαμε την ευνοϊκή επίδραση της θυροξίνης έναντι της παθολογικής αναδιαμόρφωσης που παρατηρείται μετά από μεγάλα εμφράγματα.[217, 230, 247] Ένα μεγάλο μέρος των μελετών προέρχεται από το δικό μας εργαστήριο. Στην δικιά μας μελέτη που αφορά χορήγηση θυροξίνης άμεσα μετά το έμφραγμα και για 2 εβδομάδες κατά την πρώιμη μετεμφραγματική περίοδο παρατηρείται σημαντική δράση της θυροξίνης έναντι της καρδιακής αναδιαμόρφωσης με μεταβολή στην σύνθεση των ισομορφών της μυοσίνης της βασικής δηλαδή πρωτεΐνης του συσταλτού μηχανισμού του καρδιακού κυττάρου. Έτσι παρατηρούμε αναστροφή του κλάσματος με αύξηση της α-μυοσίνης συγκριτικά με την β-μυοσίνη. Αυτό εν μέρει δικαιολογεί και τους σαφώς βελτιωμένους δείκτες συσταλτικότητας – υπερηχοκαρδιογραφικούς αλλά και βασικούς ισομετρικούς λειτουργικούς δείκτες σε συνθήκες σταθερής προφόρτισης μετά την ανάρτηση της καρδιάς στην συσκευή Langendorff - στις υπερθυρεοειδικές εμφραγματικές καρδιές συγκριτικά με τις ευθυρεοειδικές εμφραγματικές αλλά ακόμα και τις μη εμφραγματικές. Έτσι το κλάσμα α-μυοσίνης / β-μυοσίνη στις υπερθυρεοειδικές εμφραγματικές καρδιές βρέθηκε σημαντικά αυξημένο συγκριτικά με τις υπόλοιπες εμφραγματικές και μη εμφραγματικές καρδιές. Έχουμε δηλαδή μια πλήρη αναστροφή και όχι μόνο μια αναστολή της διαδικασίας της αναδιαμόρφωσης όσον αφορά τουλάχιστο στις ισομορφές των συσταλτών πρωτεϊνών. Αυτό συνάδει και με την βελτίωση της συσταλτικότητας που όχι μόνο βελτιώθηκε στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές αλλά έφτασε στα επίπεδα των μη εμφραγματικών. Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με άλλες μελέτες χορήγησης θυροξίνης στο εμφραγματικό μυοκάρδιο που κατοχυρώνουν την ευνοϊκή της δράση έναντι της παθολογικής αναδιαμόρφωσης [228].

Με αποδεδειγμένη την ευνοϊκή επίδραση της θυροξίνης στην συσταλτικότητα και γενικά στην αναστροφή της παθολογικής καρδιακής αναδιαμόρφωσης του εμφραγματικού μυοκαρδίου, αποχτά ιδιαίτερη αξία και η μελέτη της δευτερογενούς δράσης αυτής όσον αφορά την τροποποίηση της ήδη αυξημένης αντίστασης του εμφραγματικού μυοκαρδίου στην ισχαιμική βλάβη. Αυτό αποτελεί και το δεύτερο μέρος της μελέτης μας.

Όσον αφορά την επίδραση της θυροξίνης στο προφίλ της ισχαιμικής σύσπασης, αυτή φαίνεται να επιταχύνεται αλλά και να αυξάνεται στις μη εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές

καρδιές που υποβάλλονται σε ολική ισχαιμία [208, 248]. Αυτό δεν φαίνεται να αποδίδεται στην υπερτροφία του υπερθυρεοειδισμού αφού δεν παρατηρείται στην υπερτροφία άλλης αιτιολογίας όπως η περίδεση αορτής. Η βασική αιτία φαίνεται να είναι η εξάντληση της καρδιάς από τις αποθήκες γλυκογόνου που συμβαίνει κατά την διάρκεια της θεραπείας με θυροξίνη και καταλήγει στην σταθερά μειωμένη παραγωγή ATP κατά την διάρκεια της ισχαιμίας. Είναι άλλωστε ο ίδιος μηχανισμός που δημιουργεί το χαρακτηριστικό αυτό προφίλ της επιταχυνόμενης ισχαιμικής σύσπασης σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμικής ή φαρμακευτικής (δοβουταμίνης ή νορεπινεφρίνης) προπόνησης του μυοκαρδίου πριν την ισχαιμία. Στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές ο χρόνος επίτευξης της ισχαιμικής υπερσύσπασης ήταν σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τις εμφραγματικές μη υπερθυρεοειδικές καρδιές αλλά και τις μη εμφραγματικές. Παρόλα αυτά το μέγεθος της υπερσύσπασης βρέθηκε αυξημένο μεν συγκριτικά με τις εμφραγματικές καρδιές αλλά μειωμένο σε σύγκριση με τις μη εμφραγματικές εικονικά χειρουργηθείσες καρδιές. Φαίνεται λοιπόν η θυροξίνη να επιταχύνει καθώς και να εντείνει την ισχαιμική υπερσύσπαση και στις εμφραγματικές καρδιές.

Όσον αφορά την δράση της θυροξίνης στην προστασία του μυοκαρδίου από την ισχαιμική βλάβη, αυτή μετρήθηκε με λειτουργικές παραμέτρους αλλά και με δείκτες κυτταρικής νέκρωσης. Έτσι η μετισταμική λειτουργικότητα όπως αντανακλάται με τους συστολικούς δείκτες της αναπτυσσόμενης πίεσης, αλλά και τους δείκτες της συστολικής αλλά και διαστολικής ταχύτητας μεταβολής της πίεσης ανά μονάδα χρόνου, βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στις υπερθυρεοειδικές καρδιές συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές αλλά και σχετικά αυξημένη συγκριτικά με τις εμφραγματικές. Όσον αφορά την συνολική νέκρωση όπως αυτή μετρήθηκε με την μέτρηση της συνολικής LDH βρέθηκε σημαντικά μειωμένη συγκριτικά με τις μη εμφραγματικές, ενώ η διαφορά με τις εμφραγματικές καρδιές ήταν σε μη στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Στις μοριακές μετρήσεις η έκφραση της HSP70 αυξήθηκε σημαντικά στις εμφραγματικές καρδιές αλλά στις εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές συγκρινόμενη με τις μη εμφραγματικές.

Η ολική HSP27 παρουσίασε μια μικρή αύξηση στις εμφραγματικές αλλά και στις μη εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές αλλά σε επίπεδο μη στατιστικής

σημαντικότητας. Αντίθετα τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης HSP27 στις εμφραγματικές και εμφραγματικές υπερθυρεοειδικές καρδιές βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα, συγκρινόμενα με τις μη εμφραγματικές καρδιές. Βλέπουμε λοιπόν ότι η θυροξίνη προστατεύει το εμφραγματικό μυοκάρδιο ενισχύοντας τους ήδη αναπτυγμένους μηχανισμούς προστασίας του παθολογικού αυτού υποστρώματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το βιώσιμο μυοκάρδιο μετά από ένα μεγάλο έμφραγμα μυοκαρδίου υφίσταται λειτουργικές και δομικές μεταβολές που είναι γνωστές σαν καρδιακή αναδιαμόρφωση. Οι αλλαγές αυτές ξεκινούν σχετικά πρώιμα μετά το έμφραγμα και έχουν σαν αποτέλεσμα την μειωμένη λειτουργικότητα και ανεπάρκεια της εμφραγματικής καρδιάς. Παράλληλα όμως με όλες αυτές τις δυσμενείς μεταβολές αναπτύσσονται εξίσου πρώιμα και προστατευτικοί μηχανισμοί που θωρακίζουν το εναπομείναν μυοκάρδιο έναντι μιας νέας ισχαιμικής βλάβης. Στους μηχανισμούς αυτούς σημαντικό ρόλο όπως αποδεικνύεται από την μελέτη μας παίζουν οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας HSP27 και HSP70

Η χορήγηση της θυροξίνης άμεσα μετεμφραγματικά και για την πρώιμη περίοδο των δύο εβδομάδων, φαίνεται να έχει σαν αποτέλεσμα την αναστροφή της διαδικασίας της αναδιαμόρφωσης και τη σχετική αποκατάσταση της λειτουργικότητας. Ταυτόχρονα φαίνεται όχι μόνο να μην αναιρεί τους προστατευτικούς μηχανισμούς που αναπτύσσει το μυοκάρδιο μετά το έμφραγμα σε σχέση με την αντοχή έναντι μιας νέας ισχαιμικής βλάβης αλλά μάλλον να τους ενισχύει. Ο διπλός αυτός ευεργετικός ρόλος καθιστά την θυροξίνη σε πρωταγωνιστικό ρόλο στην θεραπεία του εμφράγματος σε πειραματικό τουλάχιστον επίπεδο, αλλά και σε κλινικό πιθανά επίπεδο υπό την μορφή αναλόγων μορφών που διατηρούν τις ευεργετικές ιδιότητες ενώ ταυτόχρονα είναι απαλλαγμένες από τις δυσάρεστες επιδράσεις της καθεαυτού θυροξίνης στον άνθρωπο.

Περίληψη

Αναγνωρίζεται πλέον ότι οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου επιρρεάζουν την αντοχή του μυοκαρδίου έναντι του ισχαιμικού στρες. Έτσι η παρούσα μελέτη ασχολείται με την απάντηση της μετεμφραγματικής καρδιάς στην ισχαιμία σε ένα πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης και τους πιθανούς μηχανισμούς που υποκρύπτονται. Έτσι οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου προκλήθηκε σε αρσενικούς επίμυες μέσω απολίνωσης της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας ενώ δημιουργήθηκε και μια ομάδα ελέγχου με εικονικά χειρουργηθέντα ζώα. Πειραματικός υπερθυρεοειδισμός προκλήθηκε στα 9 από τα 17 εμφραγματικά ζώα. Στις 2 εβδομάδες μετεμφραγματικά καρδιακή δυσλειτουργία παρατηρήθηκε στις εμφραγματικές καρδιές όπως φάνηκε από το μειωμένο κλάσμα εξώθησης καθώς και τους βασικούς δείκτες λειτουργικότητας της απομονωμένης καρδιάς. Η λειτουργικότητα των εμφραγματικών υπερθυρεοειδικών καρδιών παρουσίασε σημαντική ανάκαμψη. Οι απομονωθείσες καρδιές στην συνέχεια υπεβλήθησαν σε 30 ισχαιμία μηδενικής ροής που ακολουθήθηκε από 45 λεπτά επαναιμάτωσης. Η ισχαιμική σύσπαση ήταν σημαντικά μειωμένη στις εμφραγματικές καρδιές ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση και επιτάχυνση στις υπερθυρεοειδικές εμφραγματικές καρδιές. Η μετischαιμική λειτουργικότητα ήταν σημαντικά μειωμένη στα εικονικά χειρουργηθέντα ζώα συγκριτικά με τα εμφραγματικά και υπερθυρεοειδικά εμφραγματικά. Η μετischαιμική αναπτυσσόμενη συστολική πίεση (LVDP45) σε mmHg ήταν 4.0 (1.8) για τα SHAM (I/R) vs 33.9 (6.1) για τα εμφραγματικά AMI (I/R) vs 38.2 (9.0) για τα υπερθυρεοειδικά εμφραγματικά AMI-THYR (I/R) $P < 0.05$. Η μετischαιμική διαστολική πίεση της αριστερής κοιλίας (LVEDP45) ήταν 96.6 (7.5) για τα SHAM (I/R) vs 52.1 (3.7) για τα AMI (I/R), vs 60.3 (9.8) για τα AMI-THYR (I/R) $P < 0.05$. Η απελευθέρωση της LDH σε IU/g LDH ήταν 11.4 (0.56) για τα SHAM vs 7.5 (1.0) για τα εμφραγματικά AMI vs 5.9 (0.47) for AMI-THYR $P < 0.05$. Αυτή η απάντηση συνδιάστηκε με τον διπλασιασμό της έκφρασης της HSP70 καθώς και 1,7 φορές αύξηση στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης HSP27 στις εμφραγματικές καρδιές AMI καθώς και στις υπερθυρεοειδικές εμφραγματικές καρδιές $P < 0.05$ σε σχέση με τα εικονικά χειρουργημένα ζώα SHAM

Συμπερασματικά, το μετεμφραγματικό μυοκάρδιο φαίνεται να είναι ανθεκτικό στην βλάβη ισχαιμίας επαναιμάτωσης και οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας heat shock protein 70 και 27 συμμετέχουν στον μηχανισμό προστασίας. Η χορήγηση θυροξίνης βελτίωσε την βασική αλλά και την μετσχαιμική λειτουργικότητα της εμφραγματικής καρδιάς

Abstract

It is now recognized that changes occurring during cardiac re-modeling may influence the tolerance of the myocardium to ischemic stress. Therefore, the present study investigated the response of the post-infarcted heart to ischemia in an experimental model of ischemia and reperfusion injury and the possible underlying mechanisms. Acute myocardial infarction (AMI) was induced in Wistar male rats by ligating the left coronary artery (AMI, n = 17), while sham-operated rats were used as controls (SHAM, n = 10). Experimental hyperthyroidism was induced in 9 or 17 AMI hearts. At 2 weeks, cardiac dysfunction was observed in AMI, as indicated by the reduction of the left ventricular EF% and by the basal isolated heart measurements. Basal function in AMI-THYR hearts was significantly improved. Isolated hearts were then subjected to 30 min of zero-flow global ischemia followed by 45 min of reperfusion. Ischemic contracture was significantly depressed in AMI hearts while was increased in AMI-THYR hearts. Post-ischemic function was significantly reduced in SHAM in relation to AMI and AMI-THYR hearts. Left ventricular developed pressure (LVDP45) in mmHg was 4.0 (1.8) for SHAM (I/R) vs 33.9 (6.1) for AMI (I/R) vs 38.2 (9.0) for AMI-THYR (I/R) $P < 0.05$ Post-ischemic left ventricular end diastolic pressure (LVEDP45) was 96.6 (7.5) for SHAM (I/R) vs 52.1 (3.7) for AMI (I/R), vs 60.3 (9.8) for AMI-THYR (I/R) $P < 0.05$ LDH release in IU/g LDH was 11.4 (0.56) in SHAM vs 7.5 (1.0) for AMI vs 5.9 (0.47) for AMI-THYR $P < 0.05$. This response was associated with 2-fold increase in HSP70 expression and 1.7 fold increase in the expression of the phospho-HSP27, in AMI and AMI-THYR hearts vs SHAM $P < 0.05$

In conclusion, the post-infarcted heart seems to be resistant to ischemia-reperfusion injury and heat shock protein 70 and 27 may be involved in this response. Thyroxine administration resulted in improvement of basal and postischemic function of the infarcted heart.

Βιβλιογραφία

1. Opie, L.H. and M.N. Sack, *Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(9): p. 1077-89.
2. Pierce, G.N. and K.D. Philipson, *Binding of glycolytic enzymes to cardiac sarcolemmal and sarcoplasmic reticular membranes*. J Biol Chem, 1985. **260**(11): p. 6862-70.
3. Dizon, J., et al., *Metabolic inhibition in the perfused rat heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 2): p. H1082-9.
4. Cross, H.R., et al., *Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved*. Circ Res, 1996. **78**(3): p. 482-91.
5. Lopaschuk, G.D., *Alterations in fatty acid oxidation during reperfusion of the heart after myocardial ischemia*. Am J Cardiol, 1997. **80**(3A): p. 11A-16A.
6. Carmeliet, E., *Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 917-1017.
7. Sun, H.Y., et al., *Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in hypoxia/re-oxygenation-induced neonatal rat cardiomyocyte apoptosis*. Eur J Pharmacol, 2004. **486**(2): p. 121-31.
8. Stapleton, M.T. and A.P. Allshire, *Modulation of rigor and myosin ATPase activity in rat cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(7): p. 1349-58.
9. Fujiwara, H., et al., *Acceleration of cell necrosis following reperfusion after ischemia in the pig heart without collateral circulation*. Am J Cardiol, 1989. **63**(10): p. 14E-18E.
10. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
11. Grinwald, P.M., *Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium*. J Mol Cell Cardiol, 1982. **14**(6): p. 359-65.
12. Ganote, C. and S. Armstrong, *Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(8): p. 1387-403.
13. Borutaite, V., et al., *Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1537**(2): p. 101-9.
14. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 67-71.
15. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
16. Marchesi, V.T., *Stabilizing infrastructure of cell membranes*. Annu Rev Cell Biol, 1985. **1**: p. 531-61.
17. Burridge, K., T. Kelly, and P. Mangeat, *Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types*. J Cell Biol, 1982. **95**(2 Pt 1): p. 478-86.

18. Price, M.G., *Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton--a putative load-bearing structure*. Am J Physiol, 1984. **246**(4 Pt 2): p. H566-72.
19. Tokuyasu, K.T., A.H. Dutton, and S.J. Singer, *Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle*. J Cell Biol, 1983. **96**(6): p. 1736-42.
20. Tidball, J.G., *Desmin at myotendinous junctions*. Exp Cell Res, 1992. **199**(2): p. 206-12.
21. Lazarides, E., *Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space*. Nature, 1980. **283**(5744): p. 249-256.
22. Langley, R.C., Jr. and C.M. Cohen, *Association of spectrin with desmin intermediate filaments*. J Cell Biochem, 1986. **30**(2): p. 101-9.
23. Rappaport, L. and J.L. Samuel, *Microtubules in cardiac myocytes*. Int Rev Cytol, 1988. **113**: p. 101-43.
24. Ganote, C.E. and S.M. Humphrey, *Effects of anoxic or oxygenated reperfusion in globally ischemic, isovolumic, perfused rat hearts*. Am J Pathol, 1985. **120**(1): p. 129-45.
25. Sage, M.D. and R.B. Jennings, *Cytoskeletal injury and subsarcolemmal bleb formation in dog heart during in vitro total ischemia*. Am J Pathol, 1988. **133**(2): p. 327-37.
26. Vander Heide, R.S., et al., *An in vitro model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1990. **22**(2): p. 165-81.
27. Vander Heide, R.S. and C.E. Ganote, *Increased myocyte fragility following anoxic injury*. J Mol Cell Cardiol, 1987. **19**(11): p. 1085-103.
28. Ganote, C.E. and R.S. Vander Heide, *Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study*. Am J Pathol, 1987. **129**(2): p. 327-44.
29. Rappaport, L., *Ischemia-reperfusion associated myocardial contractile dysfunction may depend on Ca(2+)-activated cytoskeleton protein degradation*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 810-2.
30. Chi, N.C. and J.S. Karliner, *Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 437-47.
31. Semenza, G.L., *HIF-1 and human disease: one highly involved factor*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 1983-91.
32. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. **270**(3): p. 1230-7.
33. Huang, L.E., et al., *Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32253-9.
34. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
35. Bunn, H.F. and R.O. Poyton, *Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia*. Physiol Rev, 1996. **76**(3): p. 839-85.
36. Goldberg, M.A., S.P. Dunning, and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. Science, 1988. **242**(4884): p. 1412-5.

37. Ema, M., et al., *Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1905-14.
38. Freedman, S.J., et al., *Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5367-72.
39. Liu, G.S., et al., *Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(10): p. 1937-48.
40. Speechly-Dick, M.E., M.M. Mocanu, and D.M. Yellon, *Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat*. Circ Res, 1994. **75**(3): p. 586-90.
41. Ytrehus, K., Y. Liu, and J.M. Downey, *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1145-52.
42. Kawamura, S., et al., *Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon, which mediate functional protection in isolated rat heart*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. H2266-71.
43. Ping, P., et al., *Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity*. Circ Res, 1997. **81**(3): p. 404-14.
44. Qiu, Y., et al., *Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that epsilon is the isoform involved*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2182-98.
45. Hambleton, M., et al., *Inducible and myocyte-specific inhibition of PKCalpha enhances cardiac contractility and protects against infarction-induced heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(6): p. H3768-71.
46. Pass, J.M., et al., *Enhanced PKC beta II translocation and PKC beta II-RACK1 interactions in PKC epsilon-induced heart failure: a role for RACK1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(6): p. H2500-10.
47. Csukai, M. and D. Mochly-Rosen, *Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation*. Pharmacol Res, 1999. **39**(4): p. 253-9.
48. Wang, Y., K. Hirai, and M. Ashraf, *Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 731-41.
49. Zhao, J., et al., *The expression of constitutively active isoforms of protein kinase C to investigate preconditioning*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23072-9.
50. Rybin, V. and S.F. Steinberg, *Thyroid hormone represses protein kinase C isoform expression and activity in rat cardiac myocytes*. Circ Res, 1996. **79**(3): p. 388-98.
51. Fryer, L.G., et al., *Cardiac protein kinase C expression in two models of cardiac hypertrophy associated with an activated cardiac renin-angiotensin system: effects of experimental hyperthyroidism and genetic hypertension (the mRen-2 rat)*. J Endocrinol, 1998. **158**(1): p. 27-33.
52. Bogoyevitch, M.A., et al., *Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 162-73.
53. Ma, X.L., et al., *Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion*. Circulation, 1999. **99**(13): p. 1685-91.

54. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone and cardioprotection: study of p38 MAPK and JNKs during ischaemia and at reperfusion in isolated rat heart*. Mol Cell Biochem, 2003. **242**(1-2): p. 173-80.
55. Yin, T., et al., *Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19943-50.
56. Knight, R.J. and D.B. Buxton, *Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(1): p. 83-8.
57. Mackay, K. and D. Mochly-Rosen, *An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6272-9.
58. Mackay, K. and D. Mochly-Rosen, *Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(8): p. 1585-8.
59. Nagarkatti, D.S. and R.I. Sha'afi, *Role of p38 MAP kinase in myocardial stress*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(8): p. 1651-64.
60. Chen, Y.R., et al., *The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31929-36.
61. Latchman, D.S., *Heat shock proteins and cardiac protection*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(4): p. 637-46.
62. Parsell, D.A. and S. Lindquist, *The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins*. Annu Rev Genet, 1993. **27**: p. 437-96.
63. Currie, R.W., et al., *Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery*. Circ Res, 1988. **63**(3): p. 543-9.
64. Karmazyn, M., K. Mailer, and R.W. Currie, *Acquisition and decay of heat-shock-enhanced postischemic ventricular recovery*. Am J Physiol, 1990. **259**(2 Pt 2): p. H424-31.
65. Yellon, D.M., et al., *The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(8): p. 895-907.
66. Donnelly, T.J., et al., *Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?* Circulation, 1992. **85**(2): p. 769-78.
67. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circulation, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
68. Marber, M.S., et al., *Myocardial protection after whole body heat stress in the rabbit is dependent on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70-kD heat stress protein*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1087-94.
69. Hutter, M.M., et al., *Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 355-60.
70. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 441-69.
71. Zou, J., et al., *Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1*. Cell, 1998. **94**(4): p. 471-80.

72. Xavier, I.J., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 29147-52.
73. Morimoto, R.I., *Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators*. Genes Dev, 1998. **12**(24): p. 3788-96.
74. McMillan, D.R., et al., *Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7523-8.
75. Benjamin, I.J. and D.R. McMillan, *Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 1998. **83**(2): p. 117-32.
76. Williams, R.S. and I.J. Benjamin, *Protective responses in the ischemic myocardium*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 813-8.
77. Flynn, G.C., et al., *Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 726-30.
78. Blond-Elguindi, S., et al., *Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP*. Cell, 1993. **75**(4): p. 717-28.
79. Hohfeld, J., Y. Minami, and F.U. Hartl, *Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle*. Cell, 1995. **83**(4): p. 589-98.
80. Prapapanich, V., et al., *Molecular cloning of human p48, a transient component of progesterone receptor complexes and an Hsp70-binding protein*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(4): p. 420-31.
81. Chen, S., et al., *Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(6): p. 682-93.
82. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
83. Saleh, A., et al., *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 476-83.
84. Gabai, V.L., et al., *Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6826-36.
85. Park, H.S., et al., *Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase*. EMBO J, 2001. **20**(3): p. 446-56.
86. Heads, R.J., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(6): p. 695-9.
87. Mestril, R., et al., *Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury*. J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 759-67.
88. Cumming, D.V., et al., *Differential protection of primary rat cardiocytes by transfection of specific heat stress proteins*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(12): p. 2343-9.
89. Brar, B.K., et al., *Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 135-46.
90. Marber, M.S., et al., *Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1446-56.

91. Plumier, J.C., et al., *Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1854-60.
92. Radford, N.B., et al., *Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2339-42.
93. Bova, M.P., et al., *Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1035-42.
94. Iwaki, T., et al., *Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers*. Am J Pathol, 1993. **143**(2): p. 487-95.
95. Head, M.W., E. Corbin, and J.E. Goldman, *Overexpression and abnormal modification of the stress proteins alpha B-crystallin and HSP27 in Alexander disease*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1743-53.
96. Leroux, M.R., et al., *Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24646-56.
97. Kim, K.K., R. Kim, and S.H. Kim, *Crystal structure of a small heat-shock protein*. Nature, 1998. **394**(6693): p. 595-9.
98. Lambert, H., et al., *HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9378-85.
99. Rogalla, T., et al., *Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18947-56.
100. Ehrnsperger, M., et al., *The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14867-74.
101. Ehrnsperger, M., et al., *Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation*. EMBO J, 1997. **16**(2): p. 221-9.
102. Eaton, P., W. Fuller, and M.J. Shattock, *S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21189-96.
103. Jakob, U., et al., *Small heat shock proteins are molecular chaperones*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1517-20.
104. Mounier, N. and A.P. Arrigo, *Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact?* Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(2): p. 167-76.
105. Miron, T., et al., *A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein*. J Cell Biol, 1991. **114**(2): p. 255-61.
106. Benndorf, R., et al., *Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20780-4.
107. Rahman, D.R., N.J. Bentley, and M.F. Tuite, *The Saccharomyces cerevisiae small heat shock protein Hsp26 inhibits actin polymerisation*. Biochem Soc Trans, 1995. **23**(1): p. 77S.
108. Arrigo, A.P., *sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity*. Pathol Biol (Paris), 2000. **48**(3): p. 280-8.

109. Lavoie, J.N., et al., *Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization.* J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3420-9.
110. Concannon, C.G., S. Orrenius, and A. Samali, *Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c.* Gene Expr, 2001. **9**(4-5): p. 195-201.
111. Pandey, P., et al., *Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3.* Oncogene, 2000. **19**(16): p. 1975-81.
112. Samali, A., et al., *Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli.* Cell Stress Chaperones, 2001. **6**(1): p. 49-58.
113. Paul, C., et al., *Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 816-34.
114. Bruey, J.M., et al., *Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 645-52.
115. Hanash, S.M., et al., *Data base analysis of protein expression patterns during T-cell ontogeny and activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3314-8.
116. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.* Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
117. Charette, S.J. and J. Landry, *The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **926**: p. 126-31.
118. Konishi, H., et al., *Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27.* FEBS Lett, 1997. **410**(2-3): p. 493-8.
119. Bryantsev, A.L., et al., *Distribution, phosphorylation, and activities of Hsp25 in heat-stressed H9c2 myoblasts: a functional link to cytoprotection.* Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(2): p. 146-55.
120. Clerk, A., A. Michael, and P.H. Sugden, *Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes.* Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): p. 581-9.
121. Armstrong, S.C., M. Delacey, and C.E. Ganote, *Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 555-67.
122. Loktionova, S.A. and A.E. Kabakov, *Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells.* FEBS Lett, 1998. **433**(3): p. 294-300.
123. Yoshida, K., et al., *Translocation of HSP27 and MKBP in ischemic heart.* Cell Struct Funct, 1999. **24**(4): p. 181-5.
124. Huot, J., et al., *Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27.* Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 416-27.
125. Maizels, E.T., et al., *Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C.* Biochem J, 1998. **332** (Pt 3): p. 703-12.

126. Lavoie, J.N., et al., *Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 505-16.
127. Landry, J., et al., *Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 7-15.
128. Martin, J.L., et al., *Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes*. Circulation, 1997. **96**(12): p. 4343-8.
129. Vander Heide, R.S., *Increased expression of HSP27 protects canine myocytes from simulated ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(3): p. H935-41.
130. Eaton, P., et al., *Ischemic preconditioning: a potential role for constitutive low molecular weight stress protein translocation and phosphorylation?* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(6): p. 961-71.
131. Sakamoto, K., T. Urushidani, and T. Nagao, *Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(1): p. 137-42.
132. Efthymiou, C.A., et al., *Heat shock protein 27 protects the heart against myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(6): p. 392-4.
133. Hollander, J.M., et al., *Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model*. Circulation, 2004. **110**(23): p. 3544-52.
134. Golino, P., P.R. Maroko, and T.E. Carew, *The effect of acute hypercholesterolemia on myocardial infarct size and the no-reflow phenomenon during coronary occlusion-reperfusion*. Circulation, 1987. **75**(1): p. 292-8.
135. Girod, W.G., et al., *Effects of hypercholesterolemia on myocardial ischemia-reperfusion injury in LDL receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2776-81.
136. Dworschak, M., et al., *Increased tolerance to hypoxic metabolic inhibition and reoxygenation of cardiomyocytes from apolipoprotein E-deficient mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(1): p. H160-7.
137. Wang, T.D., et al., *Attenuation of increased myocardial ischaemia-reperfusion injury conferred by hypercholesterolaemia through pharmacological inhibition of the caspase-1 cascade*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(2): p. 291-300.
138. Xu, G., et al., *Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway*. Exp Mol Pathol, 2004. **76**(1): p. 57-65.
139. Aasum, E., et al., *Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 434-41.
140. Wang, P. and J.C. Chatham, *Onset of diabetes in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats leads to improved recovery of function after ischemia in the isolated perfused heart*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(5): p. E725-36.
141. Paulson, D.J., *The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 104-12.
142. Feuvray, D. and G.D. Lopaschuk, *Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 113-20.

143. Moon, C.H., et al., *Protein kinase C inhibitors abolish the increased resistance of diabetic rat heart to ischemia-reperfusion injury*. Jpn J Physiol, 1999. **49**(5): p. 409-15.
144. Ma, G., et al., *Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by short-term diabetes: enhancement of VEGF formation, capillary density, and activation of cell survival signaling*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **373**(6): p. 415-27.
145. Chen, H., et al., *Phosphorylated heat shock protein 27 is involved in enhanced heart tolerance to ischemia in short-term type 1 diabetic rats*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(7): p. 806-12.
146. Zhang, L., et al., *Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: role of hypothyroidism*. Eur J Pharmacol, 2002. **435**(2-3): p. 269-76.
147. Adameova, A., et al., *Hypercholesterolemia abrogates an increased resistance of diabetic rat hearts to ischemia-reperfusion injury*. Mol Cell Biochem, 2007. **295**(1-2): p. 129-36.
148. Di Filippo, C., et al., *Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion*. Diabetes, 2005. **54**(3): p. 803-10.
149. Marfella, R., et al., *Absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 454-62.
150. Friehs, I., et al., *Promoting angiogenesis protects severely hypertrophied hearts from ischemic injury*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(6): p. 2004-10; discussion 2011.
151. Wambolt, R.B., et al., *Dichloroacetate improves postischemic function of hypertrophied rat hearts*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(4): p. 1378-85.
152. Kevelaitis, E., et al., *Na⁺/H⁺ exchange inhibition in hypertrophied myocardium subjected to cardioplegic arrest: an effective cardioprotective approach*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(1): p. 111-6.
153. Lauerma, K., et al., *Verapamil reduces the size of reperfused ischemically injured myocardium in hypertrophied rat hearts as assessed by magnetic resonance imaging*. Am Heart J, 1996. **131**(1): p. 14-23.
154. Zhang, Y. and S. Xu, *Increased vulnerability of hypertrophied myocardium to ischemia and reperfusion injury. Relation to cardiac renin-angiotensin system*. Chin Med J (Engl), 1995. **108**(1): p. 28-32.
155. Zhang, Y.H. and S.C. Xu, *Captopril cardioplegia on myocardial protection in the hypertrophied rat hearts*. Int J Cardiol, 1994. **47**(2): p. 131-7.
156. Stamm, C., et al., *Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves postischemic recovery of hypertrophied hearts*. Circulation, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. I350-5.
157. Lesnefsky, E.J., et al., *Aging increases ischemia-reperfusion injury in the isolated, buffer-perfused heart*. J Lab Clin Med, 1994. **124**(6): p. 843-51.
158. Misare, B.D., I.B. Krukenkamp, and S. Levitsky, *Age-dependent sensitivity to unprotected cardiac ischemia: the senescent myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **103**(1): p. 60-4; discussion 64-5.
159. Ataka, K., et al., *Effect of aging on intracellular Ca²⁺, pHi, and contractility during ischemia and reperfusion*. Circulation, 1992. **86**(5 Suppl): p. II371-6.
160. Besse, S., et al., *Cardioprotection with cariporide, a sodium-proton exchanger inhibitor, after prolonged ischemia and reperfusion in senescent rats*. Exp Gerontol, 2004. **39**(9): p. 1307-14.

161. Starnes, J.W., D.K. Bowles, and K.S. Seiler, *Myocardial injury after hypoxia in immature, adult and aged rats*. Aging (Milano), 1997. **9**(4): p. 268-76.
162. Boucher, F., et al., *Age-dependent changes in myocardial susceptibility to zero flow ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts: relation to antioxidant status*. Mech Ageing Dev, 1998. **103**(3): p. 301-16.
163. Liu, P., et al., *Attenuation of antioxidative capacity enhances reperfusion injury in aged rat myocardium after MI/R*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2719-27.
164. Iliodromitis, E.K., et al., *The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits*. Atherosclerosis, 2006. **188**(2): p. 356-62.
165. Juhasz, B., et al., *Preconditioning in intact and previously diseased myocardium: laboratory or clinical dilemma?* Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(2): p. 325-33.
166. Tosaki, A., et al., *The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts*. Cardiovasc Res, 1996. **31**(4): p. 526-36.
167. Hassouna, A., et al., *Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(2): p. 450-8.
168. Qi, J.S., et al., *Failure to confer cardioprotection and to increase the expression of heat-shock protein 70 by preconditioning with a kappa-opioid receptor agonist during ischaemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats*. Diabetologia, 2004. **47**(2): p. 214-20.
169. Shinohara, T., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of akt, an essential signal for hyperthermia-induced heat-shock protein 72, is attenuated in streptozotocin-induced diabetic heart*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1307-15.
170. Butler, K.L., et al., *STAT-3 activation is necessary for ischemic preconditioning in hypertrophied myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H797-803.
171. Abete, P., et al., *Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(7): p. 1777-86.
172. Schulman, D., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1630-6.
173. Abete, P., et al., *Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H1978-87.
174. Honma, Y., et al., *Aging abolishes the cardioprotective effect of combination heat shock and hypoxic preconditioning in reperfused rat hearts*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(6): p. 489-95.
175. Fenton, R.A., E.W. Dickson, and J.G. Dobson, Jr., *Inhibition of phosphatase activity enhances preconditioning and limits cell death in the ischemic/reperfused aged rat heart*. Life Sci, 2005. **77**(26): p. 3375-88.
176. Boengler, K., G. Heusch, and R. Schulz, *Connexin 43 and ischemic preconditioning: effects of age and disease*. Exp Gerontol, 2006. **41**(5): p. 485-8.
177. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.

178. Gaudron, P., et al., *Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors.* Circulation, 1993. **87**(3): p. 755-63.
179. Erlebacher, J.A., et al., *Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study.* Am J Cardiol, 1982. **49**(5): p. 1120-6.
180. Grossman, W., *Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process?* Am J Med, 1980. **69**(4): p. 576-84.
181. MacKenna, D.A., et al., *Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 301-10.
182. Urbich, C., et al., *Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis.* Circ Res, 2000. **87**(8): p. 683-9.
183. Ingber, D.E., *Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology.* Circ Res, 2002. **91**(10): p. 877-87.
184. Kuppuswamy, D., *Importance of integrin signaling in myocyte growth and survival.* Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1240-2.
185. Vlahos, C.J., S.A. McDowell, and A. Clerk, *Kinases as therapeutic targets for heart failure.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(2): p. 99-113.
186. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation.* J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24313-6.
187. Barger, P.M., et al., *Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth.* J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1723-30.
188. Lionel H. Opie, *Heart Physiology. From Cell to Circulation* 4th Edition
189. Schwartz, K., et al., *Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction.* J Mol Cell Cardiol, 1981. **13**(12): p. 1071-5.
190. Morkin, E., *Regulation of myosin heavy chain genes in the heart.* Circulation, 1993. **87**(5): p. 1451-60.
191. Lompre, A.M., B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, *Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated.* J Biol Chem, 1984. **259**(10): p. 6437-46.
192. Gorza, L., et al., *Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium.* Circ Res, 1984. **54**(6): p. 694-702.
193. Bouvagnet, P., et al., *Local changes in myosin types in diseased human atrial myocardium: a quantitative immunofluorescence study.* Circulation, 1985. **72**(2): p. 272-9.
194. Bouvagnet, P., et al., *Fiber types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium. An anatomical description.* Circ Res, 1984. **55**(6): p. 794-804.
195. Bouvagnet, P., et al., *Development changes in the human cardiac isomyosin distribution: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies.* Circ Res, 1987. **61**(3): p. 329-36.
196. Mercadier, J.J., et al., *Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium.* Circ Res, 1983. **53**(1): p. 52-62.
197. Mercadier, J.J., et al., *Alpha-myosin heavy chain isoform and atrial size in patients with various types of mitral valve dysfunction: a quantitative study.* J Am Coll Cardiol, 1987. **9**(5): p. 1024-30.

198. Tsuchimochi, H., et al., *Isozymic changes in myosin of human atrial myocardium induced by overload. Immunohistochemical study using monoclonal antibodies.* J Clin Invest, 1984. **74**(2): p. 662-5.
199. Layland, J., R.J. Solaro, and A.M. Shah, *Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation.* Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 12-21.
200. Sadayappan, S., et al., *Cardiac myosin-binding protein-C phosphorylation and cardiac function.* Circ Res, 2005. **97**(11): p. 1156-63.
201. Venema, R.C., et al., *Role of protein kinase C in the phosphorylation of cardiac myosin light chain 2.* Biochem J, 1993. **294 (Pt 2)**: p. 401-6.
202. Mani, K. and R.N. Kitsis, *Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(5): p. 761-4.
203. Abbate, A., et al., *Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(5): p. 753-60.
204. Kajstura, J., et al., *Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats.* Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 86-107.
205. Pingitore, A., et al., *Early activation of an altered thyroid hormone profile in asymptomatic or mildly symptomatic idiopathic left ventricular dysfunction.* J Card Fail, 2006. **12**(7): p. 520-6.
206. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications.* Eur J Endocrinol, 2007. **157**(4): p. 515-20.
207. Kuzman, J.A., et al., *Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 841-4.
208. Pantos, C.I., et al., *Long-term thyroxine administration protects the heart in a pattern similar to ischemic preconditioning.* Thyroid, 2002. **12**(4): p. 325-9.
209. Dyke, C.M., et al., *Effects of triiodothyronine supplementation after myocardial ischemia.* Ann Thorac Surg, 1993. **56**(2): p. 215-22.
210. Dyke, C.M., et al., *Triiodothyronine-enhanced left ventricular function after ischemic injury.* Ann Thorac Surg, 1991. **52**(1): p. 14-9.
211. Holland, F.W., 2nd, P.S. Brown, Jr., and R.E. Clark, *Acute severe postischemic myocardial depression reversed by triiodothyronine.* Ann Thorac Surg, 1992. **54**(2): p. 301-5.
212. Kadletz, M., et al., *Effect of triiodothyronine on postischemic myocardial function in the isolated heart.* Ann Thorac Surg, 1994. **57**(3): p. 657-62.
213. Klemperer, J.D., et al., *Triiodothyronine improves left ventricular function without oxygen wasting effects after global hypothermic ischemia.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1995. **109**(3): p. 457-65.
214. Novitzky, D., D.K. Cooper, and A. Swanepoel, *Inotropic effect of triiodothyronine (T3) in low cardiac output following cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass: an initial experience in patients undergoing open heart surgery.* Eur J Cardiothorac Surg, 1989. **3**(2): p. 140-5.
215. Novitzky, D., et al., *Triiodothyronine in the recovery of stunned myocardium in dogs.* Ann Thorac Surg, 1991. **51**(1): p. 10-6; discussion 16-7.
216. Ranasinghe, A.M., et al., *Glucose-insulin-potassium and tri-iodothyronine individually improve hemodynamic performance and are associated with reduced*

- troponin I release after on-pump coronary artery bypass grafting*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I245-50.
217. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone improves postischaemic recovery of function while limiting apoptosis: a new therapeutic approach to support hemodynamics in the setting of ischaemia-reperfusion?* *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(1): p. 69-77.
 218. Buser, P.T., et al., *Postischemic recovery of mechanical performance and energy metabolism in the presence of left ventricular hypertrophy. A 31P-MRS study*. *Circ Res*, 1990. **66**(3): p. 735-46.
 219. Liu, Q., A.S. Clanachan, and G.D. Lopaschuk, *Acute effects of triiodothyronine on glucose and fatty acid metabolism during reperfusion of ischemic rat hearts*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(3 Pt 1): p. E392-9.
 220. Pantos, C., et al., *Thyroxine pretreatment increases basal myocardial heat-shock protein 27 expression and accelerates translocation and phosphorylation of this protein upon ischaemia*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **478**(1): p. 53-60.
 221. Pantos, C., et al., *Hyperthyroid hearts display a phenotype of cardioprotection against ischemic stress: a possible involvement of heat shock protein 70*. *Horm Metab Res*, 2006. **38**(5): p. 308-13.
 222. Fernandez, V., et al., *Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat*. *Hepatology*, 2007. **45**(1): p. 170-7.
 223. Eaton, P., et al., *AlphaB crystallin translocation and phosphorylation: signal transduction pathways and preconditioning in the isolated rat heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(9): p. 1659-71.
 224. Kenessey, A., E.A. Sullivan, and K. Ojamaa, *Nuclear localization of protein kinase C-alpha induces thyroid hormone receptor-alpha1 expression in the cardiomyocyte*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H381-9.
 225. Kinugawa, K., et al., *Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(6): p. 1618-28.
 226. Ziegelhoffer-Mihalovicova, B., et al., *The expression of mRNA of cytokines and of extracellular matrix proteins in triiodothyronine-treated rat hearts*. *Mol Cell Biochem*, 2003. **247**(1-2): p. 61-8.
 227. Wong, K., et al., *Pharmacological modulation of pressure-overload cardiac hypertrophy: changes in ventricular function, extracellular matrix, and gene expression*. *Circulation*, 1997. **96**(7): p. 2239-46.
 228. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling?* *Mol Cell Biochem*, 2007. **297**(1-2): p. 65-72.
 229. Ojamaa, K., et al., *Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(6): p. E1319-24.
 230. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007. **32**(2): p. 333-9.
 231. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60**(3): p. 49-56.

232. Hambleton, M., et al., *Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure*. *Circulation*, 2006. **114**(6): p. 574-82.
233. Scruggs, S.B., et al., *Partial replacement of cardiac troponin I with a non-phosphorylatable mutant at serines 43/45 attenuates the contractile dysfunction associated with PKCepsilon phosphorylation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2006. **40**(4): p. 465-73.
234. Belke, D.D., et al., *In vivo gene delivery of HSP70i by adenovirus and adeno-associated virus preserves contractile function in mouse heart following ischemia-reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(6): p. H2905-10.
235. Kim, Y.K., et al., *Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy*. *Circulation*, 2006. **113**(22): p. 2589-97.
236. Pantos, C., et al., *Thyroid hormone receptors alpha1 and beta1 are downregulated in the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemia-reperfusion*. *Basic Res Cardiol*, 2005. **100**(5): p. 422-32.
237. du Toit, E.F., et al., *Myocardial susceptibility to ischemic-reperfusion injury in a prediabetic model of dietary-induced obesity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(5): p. H2336-43.
238. Friehs, I. and P.J. del Nido, *Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **75**(2): p. S678-84.
239. Pantos, C., I. Mourouzis, and D. Cokkinos, *Protection of the abnormal heart*. *Heart Failure Reviews*, 2007. **12**(3-4): p. 319-330.
240. Miki, T., et al., *Alteration in erythropoietin-induced cardioprotective signaling by postinfarct ventricular remodeling*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **317**(1): p. 68-75.
241. Simonis, G., et al., *Regulation of the isozymes of protein kinase C in the surviving rat myocardium after myocardial infarction: distinct modulation for PKC-alpha and for PKC-delta*. *Basic Res Cardiol*, 2002. **97**(3): p. 223-31.
242. Mieno, S., et al., *Potent adenylate cyclase agonist forskolin restores myoprotective effects of ischemic preconditioning in rat hearts after myocardial infarction*. *Ann Thorac Surg*, 2002. **74**(4): p. 1213-8.
243. Miki, T., et al., *Cardioprotective mechanism of ischemic preconditioning is impaired by postinfarct ventricular remodeling through angiotensin II type I receptor activation*. *Circulation*, 2000. **102**(4): p. 458-63.
244. Dohke, T., et al., *Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure*. *J Card Fail*, 2006. **12**(1): p. 77-84.
245. Guisasola, M.C., et al., *Heat shock proteins, end effectors of myocardium ischemic preconditioning? Cell Stress Chaperones*, 2006. **11**(3): p. 250-8.
246. Pantos, C., et al., *Dobutamine administration exacerbates postischaemic myocardial dysfunction in isolated rat hearts: an effect reversed by thyroxine pretreatment*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **460**(2-3): p. 155-61.
247. Pantos, C., I. Mourouzis, and D.V. Cokkinos, *Thyroid hormone as a therapeutic option for treating ischaemic heart disease: from early reperfusion to late remodelling*. *Vascul Pharmacol*. **52**(3-4): p. 157-65.
248. Pantos, C.I., et al., *Propranolol diminishes cardiac hypertrophy but does not abolish acceleration of the ischemic contracture in hyperthyroid hearts*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. **36**(3): p. 384-9.