



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α' ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΓΝΑ**  
**«ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΤΩΝ**  
**ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ ΜΕΣΩ**  
**ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ DANTROLENE SODIUM ΣΤΗ**  
**ΒΛΑΒΗ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ**  
**ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ»**

**ΗΛΙΑΣ ΣΑΜΙΩΤΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΘΩΡΑΚΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΘΩΡΑΚΟΣ ΚΑΙ**  
**ΑΓΓΕΙΩΝ, ΓΝΑ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ»**

**ΑΘΗΝΑ 2021**

*Αφιερώνεται στη Μητέρα μου,  
στη σύζυγό μου Δήμητρα και στις κόρες μου Μαίρη και Σοφία για τη διαρκή υπομονή  
και υποστήριξη.*

## ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃσι, καὶ διδάξιν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λουπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξιν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονεῖς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την

οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

## ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα:	Σαμιώτης Β. Ηλίας
Ειδικότητα:	Χειρουργός Θώρακος
Ημερομηνία γέννησης:	18 Σεπτεμβρίου 1975
Τόπος γέννησης:	Ηράκλειο Κρήτης
Υπηκοότητα:	Ελληνική
Οικογενειακή κατάσταση:	Έγγαμος, δυο τέκνα
Διεύθυνση:	17 <sup>ης</sup> Νοεμβρίου 15, Χολαργός Αττικής Τ.Κ. 15562
Τηλέφωνα:	Κινητό: 6973648238
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:	: <a href="mailto:ilinet@hotmail.com">ilinet@hotmail.com</a> <a href="mailto:samiotisilias@gmail.com">samiotisilias@gmail.com</a>

### ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

#### **1. ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ**

(Ηράκλειο Κρήτης 29/09/2004, Αρ. πρωτ: 7554)

#### **2. ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΘΩΡΑΚΟΣ**

(Αθήνα 02/10/2015, Αρ. πρωτ: 17630)

#### **1. ΙΤΑΛΙΚΗ ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ**

Εξάμηνη πρακτική παρακολούθηση και εξετάσεις για την Ιταλική άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος. Βαθμός άριστα 176/200.

(Diploma di abilitazione all'esercizio della professione MEDICO CHIRURGO Catania 23/07/2004)

## **ΤΙΤΛΟΙΣΠΟΥΔΩΝ**

### **1. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ (MSc)**

**Τίτλος:** Διακρατικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών “Ένδαγγειακές τεχνικές”

**Φορέας:** Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών και Πανεπιστήμιο Milano - Bicocca, Ιταλία

**Ημερομηνία λήψης:** 12/2017

**Βαθμός:** Άριστα (9,04)

### **2. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ (MSc)**

**Τίτλος:** «Ογκολογία Θώρακος: Σύγχρονη κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση & έρευνα».

**Φορέας:** Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Ημερομηνία λήψης:** 07/2014

**Βαθμός:** Λίαν Καλώς (7,52)

### **3. ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΑΤΑΝΙΑΣ ΙΤΑΛΙΑΣ**

**Έτος Εισαγωγής:** 1996

**Λήψη Πτυχίου:** 28/07/2003

**Βαθμός Πτυχίου:** Άριστα 106/110 (9,5)

Αναγνώριση τίτλου σπουδών και βαθμολογική αντιστοιχία (9,5) ΔΟΑΤΑΠ (02/2017)

## **ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ**

Περίοδος: 07/09/2004 – 07/06/2005 ως οπλίτης Ιατρός

Κέντρο Εκπαίδευσης Άρτας: 3 μήνες

ΤΕ Πέτρας Λέσβου, ΣΕΑΠ Ηράκλειου

## **ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ**

Περίοδος: 15/11/2005 – 15/05/2007

ΓΝ ΚΥ ΣΗΤΕΙΑΣ: 3 μήνες

ΠΙ Καρυδιού: 15 μήνες

## **ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ - ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

### ***Επικουρικός Επιμελητής Β', Χειρουργός Θώρακος***

Περίοδος: 21/09/2019 – τρέχουσα θέση  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»  
Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων  
Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

### ***Επικουρικός Επιμελητής Β', Χειρουργός Θώρακος***

Περίοδος: 11/08/2018 – 10/08/2019  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»  
Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων  
Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

### ***Επικουρικός Επιμελητής Β', Χειρουργός Θώρακος***

Περίοδος: 10/07/2017 – 09/07/2018  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»  
Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων  
Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

### ***Παρατασιακός ειδικευόμενος με τίτλο ειδικότητας, Χειρουργός Θώρακος***

Περίοδος: 20/03/2015 – 19/03/2017  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»  
Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων  
Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

### ***Παρατασιακός ειδικευόμενος, Χειρουργικής Θώρακος***

Περίοδος: 09/10/2015 – 19/03/2015  
Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»  
Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων  
Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

## ***Ειδικότητα***

### **Καρδιοχειρουργική (2 χρόνια)**

Περίοδος: 01/07/2013 – 08/10/2015

Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»

Κλινική Χειρουργικής Καρδιάς – Θώρακος – Αγγείων

Διευθυντής: Χ. Χαρίτος

Περίοδος: 08/10/2010 – 30/06/2011

Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο

Γ Καρδιοχειρουργική Κλινική

Διευθυντής: Γ. Παλατιανός

### **Θωρακοχειρουργική (2 χρόνια)**

Περίοδος: 01/07/2011 – 30/06/2013

Γενικό Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός»

Κλινική Θώρακος Αγγείων

Διευθυντής: Ι. Μπελένης

### **Γενική Χειρουργική (3 χρόνια)**

Περίοδος: 03/01/2008 – 21/09/2010

Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου «Βενιζέλειο Πανάνειο», Ηράκλειο , Κρήτης

Β' Χειρουργικό Τμήμα

Διευθυντής: Μ. Βελεγράκης

## ***Οπλίτης Ιατρός***

Περίοδος: 07/09/2004 – 07/06/2005

Κέντρο Εκπαίδευσης Άρτας: 3 μήνες

ΤΕ Πέτρας Λέσβου, ΣΕΑΠ Ηράκλειου : 6 μήνες

## ***Αγροτικός Ιατρός***

Περίοδος: 15/11/2004 – 14/02/2005

Γ.Ν.- Κ.Υ. Σητείας : Χειρουργική , Παθολογική και Καρδιολογική Κλινική : 3 μήνες

Περίοδος: 15/02/2006 – 15/05/2007

Άγονο Π. Ι Καρυδίου : Αγροτικός Ιατρός :15 μήνες



Δημοσιεύσεις: 112 δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε περιοδικά και σε Συνέδρια της Ελλάδας και του Εξωτερικού, 11 από τις οποίες στο Pub Med.

Μέλος Εταιρειών συλλόγων: Μέλος της Ελληνικής Χειρουργικής Εταιρείας Θώρακος, Καρδιάς και Αγγείων, European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Μέλος του Ιατρικού συλλόγου Αθηνών, Ηράκλειου και Σητείας.

## **ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

**Τίτλος «ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ DANTROLENE SODIUM ΣΤΗ ΒΛΑΒΗ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ»**

Ημερομηνία αιτήσεως ανάθεσης διδακτορικής διατριβής: 25/07/2016

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 29/11/2016

κ. Κοτανίδου Αναστασία, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

κ. Δευτεραίος Σπυρίδων, Καθηγητής Καρδιολογίας ΕΚΠΑ

κ. Βασιλειάδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

Ημερομηνία έγκρισης θέματος διδακτορικής διατριβής και αφετηρία εκπόνησης:  
17/03/2017

Ημερομηνία χορήγησης άδειας πρωτοκόλλου διαδικασιών σε ζώα από τη γενική διεύθυνση αγροτικής οικονομίας και κτηνιατρικής πολιτικής τμήμα της Περιφέρειας Αττικής: 05/08/2015

Κέντρο διεξαγωγής του πειραματικού τμήματος της μελέτης: Πειραματικό Χειρουργείο Φαρμακευτικής Εταιρείας «ΕΛΠΙΕΝ»

### **Εκθέσεις προόδου:**

1<sup>η</sup> έκθεση προόδου: 22/12/2017

2<sup>η</sup> έκθεση προόδου: 08/02/2019

3<sup>η</sup> έκθεση προόδου: 24/01/2020

**Κατάθεση διδακτορικής διατριβής:** Φεβρουάριος 2021.

### **Προέδρος Ιατρικής Σχολής**

Πέτρος Π. Σφηκάκης Καθηγητής Παθολογίας

### **Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

κ. Κοτανίδου Αναστασία, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

κ. Δευτεραίος Σπυρίδων, Καθηγητής Καρδιολογίας ΕΚΠΑ

κ. Δημοπούλου Ιωάννα-Μαρία Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

κ. Ορφανός Στυλιανός Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

κ. Φιλιππάτος Γεράσιμος Καθηγητής Καρδιολογίας ΕΚΠΑ

κ. Βασιλειάδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας Εντατικής Θεραπείας ΕΚΠΑ

κ. Μπουτάτη Ελένη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας ΕΚΠΑ

**Βαθμός «ΑΡΙΣΤΑ» 10**

Δημοσιεύσεις/ανακοινώσεις:

## **Dantrolene Induces Mitigation of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Ryanodine Receptor Inhibition**

PMID: 33460764 DOI: 10.1053/j.semtcvs.2021.01.004

Ilias Samiotis, Nikolaos A Papakonstantinou, Panagiotis Dedeilias, Ioannis Vasileiadis, Apostolos Papalois, Spyridon Deftereos, Anastasia Kotanidou.

### **Abstract**

The impairment of intracellular calcium homeostasis plays an essential role during ischemia-reperfusion injury. Calcium release from sarcoplasmic reticulum which is triggered by myocardial ischemia is mainly mediated by ryanodine receptors. Dantrolene sodium is a ryanodine receptor antagonist. The objective of the present study was to evaluate the in-vivo impact of dantrolene sodium on myocardial ischemia-reperfusion injury in swine models. An in vivo, experimental trial comparing 10 experimental animals which received dantrolene sodium with 9 control swine models was conducted. Their left anterior descending coronary artery was temporarily occluded for 75 minutes via a vessel tourniquet, which was then released. Myocardial reperfusion was allowed for 24 hours. Dantrolene was administered at the onset of the reperfusion period and levels of troponin, creatine phosphokinase and CKMB between the two groups were compared. Additionally, various other hemodynamic parameters and left ventricular morphology and function were examined. There were significantly lower values of troponin, creatine phosphokinase and CKMB in the dantrolene group indicating less ischemia-reperfusion injury. Moreover, the post-ischemic cardiac index was also greater in the dantrolene group, whereas viable myocardium was also better preserved. In conclusion, the in vivo cardioprotective role of dantrolene sodium against ischemia-reperfusion injury in swine models was indicated in this study. Therefore, dantrolene sodium administration could be a promising treatment against ischemia-reperfusion injury in humans. However, large randomized clinical studies should be firstly carried out to prove this hypothesis.

Keywords: calcium homeostasis; dantrolene sodium; ischemia-reperfusion injury; myocardial ischemia; troponin.

**Article word Count:** 3143

**Figure legends word count:** 357

Η εργασία αυτή έχει δημοσιευτεί στο περιοδικό Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery (IF : 2.133).

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

1.1 ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	16
1.2 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ	17
1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ	24
1.4 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ	31
1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ	34
1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ	53

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ (RYRS)

2.1 RYRS	60
2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ	63
2.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ RYRS	69
2.4 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ RYR	73

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ	80
I. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.	80
A. IN VIVO ΧΟΪΡΕΙΟ ΠΡΌΤΥΠΟ	80
B. ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ	84
C. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ	85
D. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΙΣΤΟΥ	87
E. ΗΛΕΚΤΡΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΗΜΑ, ΥΠΕΡΧΟΓΡΑΦΗΜΑ ΚΑΙ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ	87
II. ΚΑΤΑΛΗΚΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	88
III. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΚΑΙΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	88
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	89
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
ΕΠΙΚΡΙΣΗ	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα στο σημείο αυτό να διατυπώσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καρδιοχειρουργό, χειρουργικό μου πάτερα και δάσκαλο κ. Παναγιώτη Δεδεηλία. Ο κ. Δεδεηλίας ήταν από τους επινοητές του θέματος της διατριβής, παρακολούθησε την εξέλιξή του, συμμετείχε στα πειράματα, το υποστήριξε με τις υποδείξεις του, καθώς επίσης με ενθάρρυνε και παρότρυνε διαρκώς.

Τέλος με έφερε σε επαφή με την καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθύντρια της Α΄ Κλινικής Εντατικής Θεραπείας του Γ.Ν.Α. «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» κ. Αναστασία Κοτανίδου η οποία με ενθουσιασμό δέχθηκε το θέμα, καθώς επίσης φρόντισε για την παρακολούθηση και αυστηρή τήρηση των απαραίτητων προθεσμιών. Με την επιστημονική της καθοδήγηση το θέμα αναπτύχθηκε και μεθοδεύτηκε ορθά. Την ευχαριστώ θερμά για την στήριξη και την συμπαράσταση όλων αυτό τον καιρό ως επιβλέπουσα της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Δευτεραίο Σπυρίδων καθηγητή Καρδιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών που ήταν από τους επινοητές του θέματος και υπεύθυνος του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Χωρίς τους δύο καθηγητές η διατριβή αυτή δεν θα είχε υλοποιηθεί.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στον αν. Καθ. κ. Απόστολο Παπαλόη που εκτός από τη διαρκή παρότρυνση παρείχε τον χώρο στην ΕΛΠΕΝ και φρόντισε την υποτροφία που κάλυψε τα έξοδα της μελέτης.

Οι τρεις αναφερόμενοι καθηγητές ενδιαφέρθηκαν ζωηρά για την πειραματική μελέτη. Γνωρίζαμε ότι θα ήταν δύσκολο να δοκιμάσουμε τέτοιο μοντέλο που απαιτούσε ένα 24ωρο πείραμα σε χοίρους αλλά ο ενθουσιασμός μας ήταν μεγάλος και το τολμήσαμε.

Ευχαριστώ τους Αναισθησιολόγους του Ευαγγελισμού κκ. Άννα Παναγιώτου και Αγγελική Λουκά. Με τη βοήθεια των ανωτέρω υλοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα 24ωρη πειραματική μελέτη σε χοίρους με γενική αναισθησία.

Στη διάρκεια αυτής της μελέτης ευτύχησα να έρθω σε επαφή με την ομάδα των εξαιρετικών καρδιολόγων και ερευνητών, τους κυρίους Χρήστο Αγγελίδη, Νικόλαο Παπουτσιδάκη και τον βιολόγο Γιώργο Φωτάκη οι οποίοι ήταν από τους επινοητές του πρωτοκόλλου και βασικοί συντελεστές των πειραμάτων.

Με τις επιστημονικές τους γνώσεις έδωσαν στη διατριβή αυτή μεγαλύτερο βάθος, αξία και την παρούσα εικόνα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον εξαιρετικό συνάδελφο κ. Νίκο Παπακωνσταντίνου που με τις επιστημονικές του γνώσεις, είχε σημαντικό ρόλο για τη δημοσίευση της εργασίας στο περιοδικό Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery .

Ευχαριστώ τον εξαιρετικό συνάδελφο Edison Jahaj για τις συμβουλές που μου έδωσε για την συγγραφή της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την νοσηλεύτρια του πειραματικού της ΕΛΠΕΝ κ. Ελευθερίας Καραμπελα που επιμελώς βοήθησε στην υλοποίηση του πειράματος καθώς και στην συντήρηση των βιολογικών δειγμάτων. Επίσης, ευχαριστώ όλο το προσωπικό της ΕΛΠΕΝ, κτηνιάτρους, νοσηλευτές, βοηθούς νοσηλευτές, τεχνικούς για την αφοσίωση και την αμέριστη βοήθειά τους, όπως και το Βιοχημικό Τμήμα του Ευαγγελισμού για τις βιοχημικές αναλύσεις των αιματολογικών δειγμάτων.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

#### 1.1 ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Το μυοκάρδιο είναι το λειτουργικό τμήμα του τοιχώματος της καρδιάς. Αποτελείται από μυϊκές ίνες που είναι ολοκληρωτικά ιδιαίτερου τύπου (μεταξύ εγκάρσιων γραμμωτών και λείων μυϊκών ινών) και χαρακτηρίζεται ως καρδιακός μυϊκός ιστός. Με τη ρυθμική συστολή του μυοκαρδίου δίνεται στην καρδιά η ιδιότητα της αντλίας. Το μυοκάρδιο των κοιλιών είναι παχύτερο και ισχυρότερο από το μυοκάρδιο των κόλπων επειδή εκτελούν διαφορετικό μηχανικό έργο.

Στο μυοκάρδιο βρίσκεται το σύστημα που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και τη διάδοση του ερεθισματογόνου δυναμικού ενεργείας. Το κέντρο παραγωγής των ηλεκτρικών ώσεων (φλεβόκομβος) βρίσκεται στον δεξιό κόλπο στη βάση της άνω κοίλης φλέβας και αποτελείται από μια ταινία εξειδικευμένων κυττάρων (Βαρσαμίδης 2001). Ανατομικά, οι ίνες του μυοκαρδίου διαχωρίζονται στο φλεβοκομβικό μέρος που παράγει τις ηλεκτρικές ώσεις και το κολποκοιλιακό δεμάτιο μέσω του οποίου το δυναμικό διαβιβάζεται από τους κόλπους διαδοχικά στις κοιλίες (Douglas, 2007). Στο μυοκάρδιο βρίσκεται το σύστημα που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή και τη διάδοση του ερεθισματογόνου δυναμικού ενεργείας. Το κέντρο παραγωγής των ηλεκτρικών ώσεων (φλεβόκομβος) βρίσκεται στον δεξιό κόλπο, στη βάση της άνω κοίλης φλέβας και αποτελείται από μια ταινία εξειδικευμένων κυττάρων. Ανατομικά, οι ίνες του μυοκαρδίου διαχωρίζονται στο φλεβοκομβικό μέρος που παράγει τις ηλεκτρικές ώσεις και το κολποκοιλιακό δεμάτιο μέσω του οποίου το δυναμικό διαβιβάζεται από τους κόλπους διαδοχικά στις κοιλίες (Βαρσαμίδης, 2001).



## 1.2 ΙΣΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

Η ισχαιμική καρδιοπάθεια αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στις δυτικές χώρες σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2008, με πρόβλεψη για σημαντική αύξηση των θανάτων έως το 2030. Το παθοφυσιολογικό υπόβαθρο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων περιλαμβάνει τη βλάβη ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, η οποία όμως μπορεί να εμφανιστεί τόσο σε περιπτώσεις οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (STEMI, NSTEMI) και ασταθούς στηθάγχης όσο και σε άλλες καταστάσεις, όπως καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με τη βοήθεια εξωσωματικής κυκλοφορίας, όπου έχουμε προσωρινή μείωση της αιματικής ροής στα στεφανιαία αγγεία με επακόλουθη αποκατάσταση αυτής. Οι εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου είναι, ο στηθαγχικός πόνος, αποτελεί τη συνήθη εκδήλωση της ανεπαρκούς αιμάτωσης του μυοκαρδίου και εκδηλώνεται με δυσφορία στο κέντρο του θώρακα, που μπορεί να έχει χαρακτήρα σφιζίματος, καψίματος ή πίεσης. Η στηθάγχη μπορεί να αντανακλά στα δυο χέρια, την περιοχή του τραχήλου, της κάτω γνάθου, τη μεσοπλάτια χώρα και το επιγάστριο. Ορισμένες φορές, όταν ο πόνος είναι έντονος, παρουσιάζονται ιδρώτας, ναυτία ή εμετός.

### Εκδηλώσεις της στεφανιαίας νόσου

1. Η περίοδος χωρίς συμπτώματα. Η διαδικασία της αθηροσκλήρωσης δεν προκαλεί συμπτώματα. Επίσης, σε ασθενείς που δεν έχουν σοβαρές στενώσεις των στεφανιαίων αρτηριών μπορεί να μην εμφανίζονται συμπτώματα, παρά την παρουσία αθηρωματικών αλλοιώσεων στα στεφανιαία αγγεία. Θα πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι σε αρκετούς ασθενείς και παρά την παρουσία σοβαρών στενώσεων στα στεφανιαία, δεν εμφανίζεται κανένα προειδοποιητικό σύμπτωμα (ιδίως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη) και σε αυτούς η παρουσία της στεφανιαίας νόσου είναι ιδιαίτερα «ύπουλη» και επικίνδυνη. Ένας άλλος λόγος μη εμφάνισης προειδοποιητικών σημείων μπορεί να είναι το γεγονός πως πολλές φορές όταν ο αυλός ενός στεφανιαίου αγγείου αποφράσσεται σταδιακά, γειτονικά σε αυτό αγγεία τα οποία τροφοδοτούν την ίδια ή παραπλήσιες περιοχές διατείνονται και αυξάνουν τη ροή τους, βοηθώντας έτσι την αναπλήρωση του στενωμένου αγγείου και την κάλυψη των αναγκών της περιοχής εκείνης του καρδιακού μυ. Το δίκτυο αυτό των διατεταμένων αγγείων ονομάζεται τότε «παραπλευρη κυκλοφορία» και βοηθά στην προφύλαξη πολλών ασθενών από ενδεχόμενο έμφραγμα του μυοκαρδίου, παρακάμπτοντας στην ουσία την αποφραγμένη αρτηρία. Παράπλευρο δίκτυο μπορεί επίσης να αναπτυχθεί και μετά από ένα

έμφραγμα, βοηθώντας στην αποκατάσταση της διαταραγμένης αιματικής ροής και επάγοντας την ανάνηψη της ισχαιμης περιοχής.

2. Η σταθερή στηθάγχη. Είναι η εμφάνιση του στηθαγχικού πόνου είτε κατά τη διάρκεια σωματικής δραστηριότητας είτε κατά τη διάρκεια έντονου συναισθηματικού stress. Η σταθερή στηθάγχη γενικά αποτελεί μία σχετικά καλοήγη κλινική κατάσταση και συνήθως προσφέρει τη δυνατότητα για την επιλογή και την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

3. Η ασταθής στηθάγχη. Είναι η εμφάνιση του στηθαγχικού πόνου σε συνθήκες ηρεμίας. Αποτελεί μία πιο επικίνδυνη μορφή στεφανιαίας νόσου, γι' αυτό και έχει χαρακτηριστεί προεμφραγματική στηθάγχη. Είναι σαφές ότι μία τέτοια ασταθής κατάσταση πρέπει να αντιμετωπίζεται με εισαγωγή σε νοσοκομείο, ώστε με τη χορήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη εξέλιξη προς έμφραγμα του μυοκαρδίου.

4. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Είναι η νέκρωση μιας περιοχής του καρδιακού μυός και εκδηλώνεται με τυπική στηθάγχη, η οποία όμως είναι παρατεταμένης διάρκειας, δε σταματά με την ανάπαυση και διαρκεί περισσότερο από μισή ώρα. Επιβάλλεται η άμεση μεταφορά του ασθενούς σε νοσοκομείο, γιατί μόνο σε εξειδικευμένο χώρο και από εξειδικευμένο προσωπικό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη μεγαλύτερη δυνατή επιτυχία.

5. Ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος. Αποτελεί την πλέον δραματική εκδήλωση από όλο το κλινικό φάσμα της στεφανιαίας νόσου. Η στεφανιαία νόσος και οι επιπλοκές της ευθύνονται για το 80% περίπου των αιφνίδιων καρδιακών θανάτων. Το 50% περίπου των οφειλόμενων σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου θανάτων εκδηλώνονται ως αιφνίδιοι θάνατοι. Είναι επίσης τραγικό ότι στο 25% των περιπτώσεων ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος αποτελεί την πρώτη και δυστυχώς μοιραία εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου.

Παρότι ο όρος «ισχαιμία» που υποδηλώνει τη μειωμένη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα αναφέρεται στην ιατρική βιβλιογραφία από τις αρχές του 19ου αιώνα, τις τελευταίες δεκαετίες έχει επίσης ανακαλυφθεί και μελετηθεί εκτεταμένα το φαινόμενο της βλάβης εξ' επαναιματώσεως (reperfusion injury, RI), κατά το οποίο η ταχεία αποκατάσταση της αιματικής ροής οδηγεί στην ενεργοποίηση βιοχημικών καταρρακτών που έχουν ως αποτέλεσμα την επέκταση της ισχαιμικής

βλάβης. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου για ισχαιμική καρδιακή νόσο, όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, η παχυσαρκία, το κάπνισμα, ο διαβήτης, η καθιστική ζωή, το οικογενειακό ιστορικό, το άγχος, η ηλικία και το φύλο, με την ασθένεια να είναι πιο διαδεδομένη στους άνδρες. Ωστόσο, τα ποσοστά ισχαιμικών καρδιακών παθήσεων έχουν μειωθεί τα τελευταία 20 χρόνια πιθανώς λόγω αλλαγών στον τρόπο ζωής που προκαλούνται από την αυξημένη ευαισθητοποίηση για τους παράγοντες κινδύνου.

Η ισχαιμική καρδιακή νόσος προκύπτει όταν υπάρχει διαταραχή ισορροπίας μεταξύ της ζήτησης μυοκαρδιακού οξυγόνου και της προσφοράς αίματος.

Το τοίχωμα του μυοκαρδίου περιέχει το δικό του αγγειακό δίκτυο γνωστό ως στεφανιαία κυκλοφορία. Η ελαττωματική λειτουργία αυτής της κυκλοφορίας, συνήθως λόγω αθηρωματικών πλακών ή θρόμβων, προκαλεί μείωση ροής αίματος και στη συνέχεια ισχαιμία και / ή έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI). Το ενδοθήλιο των αρτηριών μετά από έκθεση σε συγκεκριμένους παράγοντες κινδύνου (π.χ. δυσλιπιδαιμία, προϊόντα οξειδωσης επί υπεργλυκαιμίας, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες επί παχυσαρκίας, κ.ά.) ενισχύει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά του, που προάγουν την προσέγγιση των λευκών αιμοσφαιρίων στην εσωτερική επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος. Ακολουθεί η μετανάστευση και εναπόθεση των λευκοκυττάρων στον έσω χιτώνα του αγγείου (intima). Αυτή καθορίζεται από χημειοτακτικές κυτοκίνες που παράγονται από συστήματα μοριακής σηματοδότησης που σχετίζονται με τους παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρυνσης. Μετά την εγκατάστασή τους στον έσω αρτηριακό χιτώνα, τα λευκά αιμοσφαίρια -κυρίως μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα- επικοινωνούν με το ενδοθήλιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος. Τα διάφορα μόρια μεσολαβητές φλεγμονής και ανοσίας περιλαμβάνουν προσταγλανδοειδή και άλλα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος π.χ. λευκοτριένες, αυτακοειδή, όπως η ισταμίνη, αλλά και κυτοκίνες και συστατικά του συμπλέγματος. Ως μείζων συνέπεια της φλεγμονώδους ενεργοποίησης τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από τον μέσο χιτώνα του αγγείου (tunica media) στον έσω χιτώνα (intima), όπου πολλαπλασιάζονται και παράγουν μια πλούσια και σύνθετη εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix). Ταυτόχρονα εκλύουν μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metallo proteinases, MMP) ως απάντηση σε διάφορα αιμοδυναμικά, φλεγμονώδη και αυτοάνοσα ερεθίσματα. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, μπορεί να γίνει ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, θρόμβωση και κατά συνέπεια το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (Douglas, 2007).

Η διακοπή της παροχής οξυγόνου και των θρεπτικών ουσιών και η διακοπή της απομάκρυνσης του διοξειδίου του άνθρακα οδηγεί σε διακοπή της οξειδωτικής φωσφορύλωσης, εκπόλωση της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και σημαντική μείωση της παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), με αποτέλεσμα να διαταράσσονται ταχύτατα τόσο η συστολική όσο και η διαστολική καρδιακή λειτουργία. Καθώς παραμένει η ισχαιμία, η εξάντληση του ATP και της γλυκόζης, η μη δυνατή αποβολή του διοξειδίου του άνθρακα και η υπερπαραγωγή και μη απομάκρυνση γαλακτικού οξέος έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυττάριου pH και την ενεργοποίηση της ιοντοανταλλακτικής αντλίας  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  η οποία εξάγει ιόντα  $\text{H}^+$  και εισάγει ιόντα  $\text{Na}^+$ . Απουσία της ATP, η λειτουργία της  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPάσης ανεπαρκεί ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενδοκυττάριου  $\text{Na}^+$ . Η επαγωγή του ιοντοαντάλλακτη  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  και η μειωμένη επαναπρόσληψη ιόντων ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο προκαλεί την ενδοκυττάρια και ενδομιτοχονδριακή συσσώρευση  $\text{Ca}^{++}$ , το οποίο λειτουργεί ως επαγωγέας βιοχημικών οδών που τελικά καταλήγουν σε απόπτωση ή νέκρωση του μυοκαρδίου. Το 1960 οι Jennings et al. έδειξαν ότι η αποκατάσταση της αιματικής ροής στα στεφανιαία αγγεία μπορεί να επιταχύνει τη νέκρωση του μυοκαρδίου σε ένα πειραματικό μοντέλο (Jennings 1960).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη της βλάβης επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου που μπορεί να ευθύνεται για το 50% της εμφραγματικής περιοχής και να συνεχίσει να υφίσταται έως και τρεις ημέρες μετά την αποκατάσταση της ισχαιμίας. Κλινικά είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν με σαφήνεια από αυτές που οφείλονται στην προηγηθείσα ισχαιμία, ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι φαινόμενα όπως οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης (reperfusion arrhythmias) και το απόπληκτο μυοκάρδιο (stunned myocardium) οφείλονται σε βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στη φάση της επαναιμάτωσης.

Οι ηλεκτροφυσιολογικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στη φάση της ισχαιμίας περιλαμβάνουν την απουσία οξυγόνου, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλής ενέργειας φωσφορικών ως συνέπεια της αναερόβιας γλυκόλυσης. Η γλυκόλυση οδηγεί σε παραγωγή ATP μέσω της μεμβράνης που σκοπό έχει την ελάττωση της απώλειας  $\text{K}^+$  και τον περιορισμό της αύξησης του ενδοκυττάριου  $\text{Na}^+$ .

Η εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταβολικών τελικών προϊόντων όπως είναι τα γαλακτικά και άλλα

πρωτόνια που προκαλούν την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού  $\text{Na}^+$  και  $\text{Ca}^{++}$ . Η  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) είναι μία ρυθμιστική πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από μεταβολές του ενδοκυττάρου ασβεστίου και ελέγχει μέσω φωσφορυλίωσης μια σειρά από πρωτεΐνες του μυοκαρδιακού κυττάρου. Η CaMKII (ισόμορφή της στην καρδιά των ενηλίκων να είναι η CaMKII $\beta$ ) είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης. Εντός του κυττάρου, η CaMKII απαντά συνήθως σε ομοδωδεκαμερή μορφή και σε ανενεργό κατάσταση και είναι στερεοτακτικά διαμορφωμένη ώστε η ρυθμιστική περιοχή της (regulatory domain) να παρεμποδίζει τη δέσμευση του ATP και του υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή (catalytic domain). Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου προκαλεί την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος ασβεστίου/καλμοδουλίνης ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex) στην CaMKII, μεταβάλλοντας την στερεοτακτική της δομή, ελευθερώνοντας την καταλυτική περιοχή και ενεργοποιώντας την CaMKII (Rosenberg OS 2005). Στην παθολογική εισροή ασβεστίου εντός του κυττάρου η CaMKII μπορεί να δράσει βλαπτικά (Erickson JR 2014). Η φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης ως δείκτης ενεργοποίησης της CaMKII σε πειραματικές μελέτες, κατέδειξαν ότι η CaMKII κορυφώνει την ενεργοποίησή της εντός 5 λεπτών από την έναρξη της ισχαιμίας και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα λίγα λεπτά μετά, για να επανενεργοποιηθεί τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης (Vittone L et al. 2002).

Το αυξημένο αυτό φορτίο  $\text{Ca}^{++}$  θεωρείται υπεύθυνο για την εμφάνιση των ισχαιμικής αιτιολογίας κοιλιακών αρρυθμιών και για τον κυτταρικό θάνατο. Η χορήγηση ενός αναστολέα της CaMKII (KN93) σε ένα ex-vivo πειραματικό μοντέλο βρέθηκε να οδηγεί σε σημαντική μείωση της ισχαιμικής σύσπασης (ischemic contracture) και των αρρυθμιών επαναιμάτωσης. Ωστόσο κατά την πρώτη ώρα επαναιμάτωσης η αναστολή της CaMKII μείωσε σημαντικά τη μυοκαρδιακή συσταλτικότητα (Vila-Petroff M et al. 2010). Επίσης η αναστολή της ενεργοποίησης της CaMKII μειώνει τις μετα-εκπολώσεις σε κυτταρικό επίπεδο και, εν τέλει, τις παρατηρούμενες αρρυθμίες (Bell JR et al. 2014). Η αναστολή της ενεργοποίησης της CaMKII σε ένα πειραματικό μοντέλο αρουραίων και σε διαγονιδιακά ποντίκια με αυξημένη έκφραση ενός αναστολέα της CaMKII σε σύγκριση με ποντίκια φυσιολογικού φαινοτύπου όταν υπεβλήθησαν σε ισχαιμία/επαναιμάτωση βελτίωσε τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και την έκταση της βλάβης μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση, μειώνοντας τόσο τη νεκρωτική περιοχή όσο και την έκταση

της απόπτωσης των μυοκαρδιοκυττάρων (Li J et al. 2007). Μεγαλομοριακές ενώσεις επίσης απελευθερώνονται στην κυκλοφορία όπως είναι η κρεατινική κινάση (CK), η μυοσφαιρίνη και οι τροπονίνες C, I, T. Η διαρροή του K<sup>+</sup> είναι μία από τις πρωιμότερες μεταβολικές διαταραχές της μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Προκαλεί τοπική αποπόλωση της μεμβράνης με συνέπεια τη δημιουργία του ρεύματος βλάβης που παλινδρομεί από τη βεβλαμμένη προς την υγιή περιοχή κατά την επαναπόλωση και από την υγιή προς την βεβλαμμένη περιοχή κατά την αποπόλωση. Το ρεύμα βλάβης γίνεται εμφανές με τις γνωστές ηλεκτροκαρδιογραφικές ST αλλαγές λίγο μετά την έναρξη της ισχαιμίας. Το ρεύμα βλάβης μπορεί να δημιουργήσει κυκλώματα επανεισόδου στα όρια ισχαιμικής και μη ισχαιμικής περιοχής με πιθανή την εκδήλωση κοιλιακών αρρυθμιών και κοιλιακής μαρμαρυγής.

Στο φυσιολογικό μυοκάρδιο, στη φάση της συστολής, το μήκος και πάχος της μυοκαρδιακής ίνας μεταβάλλεται κατά 15-25% σε σχέση με τη διαστολή (βράχυνση και πάχυνση). Η μυοκαρδιακή ισχαιμία προκαλεί ελάττωση της συστολικής βράχυνσης και πάχυνσης και συνοδό παράδοξη πρόωμη συστολική επιμήκυνση και λέπτυνση όπως επίσης και μετασυστολική πάχυνση και βράχυνση της μυοκαρδιακής ίνας. Οι ισχαιμικής αιτιολογίας διαταραχές της τοιχωματικής κινητικότητας είναι γνωστές υπερηχογραφικά ως υποκινησία, ακινησία (ελαττωμένη ή απουσία κινητικότητας) ή δυσκινησία (παράδοξη κινητικότητα).

Εξαιτίας τοπικών αλληλεπιδράσεων, οι απομακρυσμένες καλά αιματούμενες περιοχές του μυοκαρδίου παρουσιάζουν εμφανή αύξηση της κινητικότητας. Ωστόσο η αυξημένη αυτή κινητικότητα χαρακτηρίζεται ως «παράδοξη» και δεν παρέχει πλήρη αντιρρόπηση στη διαταραγμένη κινητικότητα του ισχαιμικού μυοκαρδίου .

Η ισχαιμία όμως προκαλεί και διαστολική δυσλειτουργία. Η διαταραχή της συστολής (μετασυστολική βράχυνση και πάχυνση) συνοδεύεται από αύξηση της σταθεράς χρόνου της ισοογκαιμικής χάλασης και ελάττωση της μέγιστης ροής πλήρωσης της κοιλίας. Επιπρόσθετα η ισχαιμία ελαττώνει την ευενδοτότητα της κοιλίας . Η ελάττωση αυτή είναι ευθέως ανάλογη με την έκταση και τη διάρκεια της ισχαιμίας και ελαττώνεται περαιτέρω με την απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας. Η ελάττωση της ευενδοτότητας δεν περιορίζεται στην ισχαιμική περιοχή αλλά επεκτείνεται και σε απομακρυσμένες αιματούμενες περιοχές. Η επίδραση αυτή συμβάλλει στην απότομη αύξηση της τελοδιαστολικής πίεσης της ΑΚ, κάτι που συχνά

παρατηρείται και μετά από επεισόδια περιοχικής μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Όταν η ισχαιμία ή η νέκρωση αφορούν μεγάλη περιοχή του μυοκαρδίου η καρδιά ανεπαρκεί ως αντλία.

Η ελάττωση του όγκου παλμού και η πτώση της καρδιακής παροχής, προκαλούν υπόταση και ταχυκαρδία που ελαττώνουν τη στεφανιαία ροή. Η αύξηση των τελοδιαστολικών πιέσεων συμβάλλει επίσης στην ελάττωση της στεφανιαίας ροής και η αύξηση του τοιχωματικού stress στην αυξημένη κατανάλωση  $O_2$  από το μυοκάρδιο. Όλοι αυτοί οι παράγοντες αλληλεπιδρούν και επιδεινώνουν την ισχαιμία. Με την πτώση της καρδιακής παροχής παραβλάπεται και η περιφερική ιστική άρδευση. Στους αντιρροπιστικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται η συμπαθητική διέγερση και η κατακράτηση ύδατος σε μία προσπάθεια να αυξηθεί το προφορτίο. Οι μηχανισμοί αυτοί όμως επιδεινώνουν την κατάσταση λόγω αύξησης των μυοκαρδιακών απαιτήσεων σε  $O_2$  και αύξησης της μεταφόρτισης.

### 1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΙΣΧΑΙΜΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ

Πάνω από το 90% των οξέων στεφανιαίων ισχαιμικών επεισοδίων του συνδέονται με σχηματισμό θρόμβων μετά από ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Τα πρώιμα συμπτώματα της ισχαιμικής καρδιακής νόσου περιλαμβάνουν στηθάγχη που σταδιακά αυξάνεται σε σοβαρότητα (ή γίνεται ασταθής) καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, οδηγώντας σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, το οποίο συνήθως ξεκινά μετά την απόφραξη της αρτηρίας. Η ισχαιμία συνήθως εξελίσσεται από υποξία (μειωμένη παροχή οξυγόνου) και οδηγεί σε μία κατάσταση στην οποία η καρδιά δεν είναι σε θέση να διατηρήσει τον ρυθμό της κυτταρικής οξειδωσης οδηγώντας σε μεταβολικές ανισορροπίες. Μετά την ολική ή μερική απόφραξη μιας στεφανιαίας αρτηρίας, μεταβολικές και λειτουργικές αλλαγές ξεκινούν μέσα σε δευτερόλεπτα. Αυτές οι αλλαγές είναι αρχικά αναστρέψιμης φύσης (αναισθητοποίηση του μυοκαρδίου), ωστόσο, εάν το οξυγόνο στερείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, αυτές οι αλλαγές σταδιακά γίνονται πιο σοβαρές, οδηγώντας σε βλάβη των ιστών και τελικά σε μη αναστρέψιμο τραυματισμό, νέκρωση (έμφραγμα).

Αντίθετα, εάν η παροχή αίματος αποκατασταθεί γρήγορα, η επανεισδοχή οξυγόνου προωθεί την αποκατάσταση του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού. Επιπλέον, η σοβαρότητα και η εξέλιξη της ισχαιμίας δεν καθορίζεται αποκλειστικά από την έκταση της στέρησης οξυγόνου αλλά από πολλούς άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της σχετικής συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών. Η μείωση της παροχής αίματος κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας περιορίζει επίσης την απομάκρυνση αυτών των μεταβολιτών συμβάλλοντας περαιτέρω στον σοβαρό μεταβολικό τραυματισμό. Η κύρια πηγή ATP στον καρδιακό μυ είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Εάν τα μιτοχόνδρια εκτεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου (ιδιαίτερα εάν συνυπάρχουν υψηλά επίπεδα φωσφορικών και ελευθέρων ριζών) έχουμε διόγκωσή τους και αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επίσης παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης σε μόρια μεγέθους έως 1,5 kDalton. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως «μετάβαση διαπερατότητας» (permeability transition, PT) όπως περιγράφηκε από τους Haworth και Hunter, που επίσης κατέδειξαν ότι οφείλεται στη διάνοιξη ενός διαύλου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, του «μιτοχονδριακού πόρου μετάβασης διαπερατότητας» (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) (Haworth RA et al. 1979).



Μακροσκοπικές βλάβες είναι εμφανείς μόνο σε παρατεταμένη διάνοιξη του MPTP. Στη φυσιολογική ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου στα μιτοχόνδρια μικρής διάρκειας διανοιξείς πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην προστασία από τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Zorogon BD et al. 2014). Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν ότι ο MPTP μπορεί να βρίσκεται σε ανοικτή, κλειστή ή ενδιάμεση μορφή (Zoratti M et al.1994) αλλά μελέτες κινητικής διαφόρων μορίων προτείνουν αντί για ενδιάμεσες καταστάσεις την ταχεία μετάβαση από ανοικτή σε κλειστή μορφή και αντίστροφα (Crompton M et al.1990). Η παροδική διάνοιξη των MPTPs μπορεί να απελευθερώσει το ασβέστιο που βρίσκεται εντός των μιτοχονδρίων συμβάλλοντας στην απρόσκοπτη λειτουργία των μεταβολικών οδών (Korge P, et al. 2011). Διαγονιδιακά ποντίκια που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτόν τον μηχανισμό ομοιόστασης του ασβεστίου εμφανίζουν αυξημένη έκφραση υπερτροφίας, ίνωσης και μείωσης της συσταλτικότητας της καρδιάς ως απάντηση σε αύξηση του μεταφορτίου (Elrod JW, et al. 2010). Η διάνοιξη του MPTP δεν αναστέλλει μόνο την οξειδωτική φωσφορυλίωση διαταράσσοντας τα ηλεκτροχημικά δυναμικά εντός του μιτοχονδρίου, αλλά οδηγεί στην αναστροφή της δράσης της FoF1 ATP συνθετάσης, προκαλώντας υδρόλυση του εναπομείναντος ATP ή αυτού που παράγεται αναερόβια με γλυκόλυση (Halestrap AP. 2010). Το παρατηρούμενο οίδημα που προκαλείται από την ελεύθερη δίοδο μικρών μορίων (<1,5 KDalton) από τον ανοικτό MPTP αλλά όχι των μεγαλομοριακών πρωτεϊνών προκαλεί την αύξηση της κολλοειδοσμωτικής πίεσης, η οποία εισάγει μόρια νερού εντός του μιτοχονδρίου.

Η ελεύθερη δίοδος ιόντων  $H^+$  και η επακόλουθη κατάρρευση του ηλεκτροχημικού δυναμικού εκατέρωθεν της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την εκπόλωση αυτής και ευθύνεται για την παύση της βιοχημικής αλυσίδας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Οι Crompton et al. το 1987, κατέδειξαν ότι ο MPTP διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη μυοκαρδιακή βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης υποστηρίζοντας ότι οι μεταβολές στα επίπεδα του ασβεστίου και φωσφορικών κατά την ισχαιμία προκαλούσαν τη διάνοιξη του MPTP. Ωστόσο, το 1995 οι Griffiths και Halestrap μετρώντας την παγίδευση τροποποιημένων μορίων γλυκόζης εντός των μιτοχονδρίων, κατέδειξαν ότι ο MPTP παραμένει κλειστός κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και ανοίγει στα πρώτα δύο με τρία λεπτά της επαναιμάτωσης. Η άμεση αποκατάσταση του ενδοκυττάρου pH κατά την επαναιμάτωση προκαλεί τη διάνοιξη του πόρου με καταστροφικά για το κύτταρο

αποτελέσματα, όπως προαναφέρθηκαν. Πειραματικές μελέτες με τη χρήση αναστολέων της διάνοιξης του MPTP, όπως η κυκλοσπορίνη Α, κατέδειξαν τη σημασία του MPTP στη νέκρωση των μυοκαρδιοκυττάρων σε κυτταρικό επίπεδο. Πειραματικά μοντέλα με διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί το γονίδιο της κυκλοφιλίνης-D (μόριο που δρα η κυκλοσπορίνη) έδειξαν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στη νέκρωση από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Nakagawa T, et al. 2005). Η κυκλοφιλίνη-D, μιας peptidylprolyl-cis-trans ισομεράσης, η αναστολή της οποίας από την κυκλοσπορίνη Α όπως αναφέρθηκε προστατεύει τα μιτοχόνδρια από τη βλαπτική διάνοιξη του MPTP σε ισχαιμία/επαναιμάτωση, αποτελέσματα που προήλθαν από τη χρήση διαγονιδιακών ποντικών με γονότυπο CypD(-/-), τα οποία δεν εμφάνισαν την τυπική διάνοιξη του MPTP σε αυξημένα επίπεδα ασβεστίου ή/και οξειδωτικού στρες. Το 2014 οι Chiari et al. δοκίμασαν και στην κλινική πράξη τη χορήγηση κυκλοσπορίνης για προστασία από βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε καρδιοχειρουργική επέμβαση αντικατάστασης αορτικής βαλβίδας και κατέδειξαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν κυκλοσπορίνη είχαν χαμηλότερα επίπεδα τροπονίνης I σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μοριακή φύση του MPTP δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Οι He και Lemasters ανακοίνωσαν ότι ο MPTP δεν έχει μία και μοναδική μοριακή σύνθεση αλλά σχηματίζεται από συσσωματώματα ελευθέρων πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου τα οποία σταθεροποιούνται από την κυκλοφιλίνη-D παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ασβεστίου.

Η ταυτοποίησή της γίνεται πολύπλοκη, γιατί οι πρωτεΐνες που θεωρούνταν βασικά δομικά στοιχεία του MPTP, όπως ο μεταφορέας του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (adenine nucleotide transporter - ANT), βρέθηκε τελικά ότι ασκούν αποκλειστικά ρυθμιστικό και όχι δομικό ρόλο. Σημαντική είναι η συμμετοχή στη δομή του MPTP από την ATP συνθετάση και συγκεκριμένα η c υπομονάδα του μορίου αυτού. Διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) με ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) αναστέλλουν τόσο τη δράση της ATP συνθετάσης όσο και το άνοιγμα του MPTP (Feniouk BA 2008). Η αναστολή της έκφρασης της c υπομονάδας της ATP συνθετάσης αναστέλλει σχεδόν πλήρως τη διάνοιξη του MPTP από αυξημένα επίπεδα ασβεστίου και ελευθέρων ριζών, με τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα σε υπερέκφραση της c υπομονάδας (Bonora M, et al. 2013). Έχουν βρεθεί απομονωμένα μόρια c υπομονάδας που δημιουργούν ιοντικούς διαύλους σε τεχνητές φωσφολιπιδιακές μεμβράνες και μπορούν να επάγουν

τη μετάβαση διαπερατότητας σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, δράση που ήταν δυνατό να ανασταλεί με τη χορήγηση κυκλοσπορίνης (γνωστού αναστολέα του ανοίγματος του MPTP). Αντιθέτως η αναστολή της έκφρασης της  $\alpha$  υπομονάδας της ATP συνθετάσης δεν είχε ουσιαστική επίδραση στη δράση του MPTP. Οι Alavian et al. παρουσίασαν ένα δομικό μοντέλο του MPTP το οποίο περιλαμβάνει την  $\epsilon$  υπομονάδα της ATP συνθετάσης, η οποία σχηματίζει έναν διάυλο ευαίσθητο στις μεταβολές του ηλεκτρικού δυναμικού. Η υπερφόρτιση ασβεστίου προκαλεί διόγκωση στην  $\epsilon$  υπομονάδα και την αποδεσμεύει από την ATP συνθετάση, επιτρέποντάς της να λειτουργήσει ως στοιχείο του MPTP. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας η καρδιά υφίσταται σχεδόν στιγμιαία αρκετές μεταβολικές αλλαγές που επιτρέπουν μείωση της ζήτησης οξυγόνου και αποτελεσματικότερη χρήση υποστρωμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μετάβαση των καρδιομυοκυττάρων από τον μεταβολισμό των αερόβιων λιπαρών οξέων σε αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης. Υπό σοβαρές ισχαιμικές καταστάσεις, η μόνη πηγή γλυκολυτικού υποστρώματος γίνεται γλυκογόνο, δεδομένου ότι δεν υπάρχει ροή αίματος για την παροχή γλυκόζης στον ιστό, γεγονός που οδηγεί σε γρήγορη διάσπαση του γλυκογόνου και αύξηση του αριθμού των μεταφορών γλυκόζης. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας ο ρυθμός γλυκόλυσης αυξάνεται. Αυτό πιστεύεται ότι είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, διότι το γλυκολυτικό ATP βρίσκεται δίπλα στο σάρκωμα και το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR), επιτρέποντας την προτιμησιακή χρήση για την υποστήριξη αντλιών ιόντων (αντλία  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$  στο σάρκωμα και αντλία  $\text{Ca}^{2+} \text{ATPase}$  στο SR). Επίσης, έχει ένα ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και στον περιορισμό της ισχαιμικής συστολής (η οποία χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό συμπλοκών σκληρότητας μεταξύ των διασταυρούμενων γεφυρών ακτινομυζίνης λόγω μείωσης του ρυθμού ροής γλυκολυτικού ATP). Επομένως, η συνεχιζόμενη παραγωγή γλυκολυτικού ATP περιορίζει αναμφίβολα τον βαθμό τραυματισμού και καθορίζει την πιθανή βιωσιμότητα του μυοκαρδίου. Ωστόσο, καθώς η ισχαιμία γίνεται πιο σοβαρή, το γαλακτικό και άλλα αναγωγικά ισοδύναμα συσσωρεύονται λόγω της μειωμένης αποβολής και το μυοκάρδιο γίνεται πιο όξινο λόγω της παραγωγής  $\text{H}^+$ . Η μείωση του ενδοκυτταρικού pH, μαζί με τη συσσώρευση NADH, πρωτονίων, γαλακτικού, ηλεκτρικού και αλανίνης αναστέλλει την παραγωγή ATP μέσω αναστολής ενζύμων όπως πυρουβική πυροσταφυλική αφυδρογονάση, φωσφοφρουκτοκινάση και γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση, καθώς και προκαλεί αναστολή της μεταφοράς μηλικού-ασπαρτικού και του κύκλου κιτρικού οξέος.

Αυτό τελικά καταστέλλει τη συσταλτική λειτουργία και μεταβάλλει την ιοντική ομοιόσταση. Δεδομένου ότι η επαναφωσφορλίωση του ADP σε ATP λαμβάνει χώρα με πολύ πιο αργό ρυθμό κατά τη διάρκεια της αναερόβιας γλυκόλυσης και συνεπώς της ισχαιμίας, η δεξαμενή νουκλεοτιδίων αδενίνης αποδομείται επίσης κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας καθώς ο ενεργειακός δεσμός του ADP συλλαμβάνεται μέσω της δράσης της αδενυλικής κινάσης. Στη διαδικασία, το AMP σχηματίζεται, συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και αποδομείται σε αδενοσίνη. Η αδενοσίνη στη συνέχεια χάνεται από την ομάδα νουκλεοτιδίων αδενίνης καθώς καταβολίζεται σε ινοσίνη και υποξανθίνη, και οι δύο συμβάλλουν ενδεχομένως στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Υπό συνθήκες εξάντλησης της ενέργειας (δηλαδή κατά τη διάρκεια του αναερόβιου μεταβολισμού), το κυτοσόλιο και τα μιτοχόνδρια των μυοκαρδιακών κυττάρων φορτώνονται επίσης με προϊόντα καταβολισμού όπως  $\text{Na}^+$  και  $\text{Ca}^{2+}$ . Καθώς μειώνεται το ενδοκυτταρικό pH, ο εναλλάκτης  $\text{Na}^+ / \text{H}^+ (\text{NHE})$  γίνεται προοδευτικά πιο ενεργός λόγω διέγερσης της θέσης αισθητήρα  $\text{H}^+$  της πρωτεΐνης εναλλάκτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση  $\text{Na}^+$  καθώς η οδός εξώθησης  $\text{Na}^+$  (αντλία  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$ ) απενεργοποιείται λόγω μειωμένων επιπέδων ATP. Η συσσώρευση  $\text{Na}^+$  μπορεί να οδηγήσει τον εναλλάκτη  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , αφαιρώντας το  $\text{Na}^+$  σε αντάλλαγμα για εξωκυτταρικό  $\text{Ca}^{2+}$ , οδηγώντας σε εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  και επακόλουθη υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$ . Αυτές οι ιοντικές ανισορροπίες οδηγούν στην αναστολή της ηλεκτροχημικής βαθμίδας  $\text{H}^+$  που απαιτείται για την παραγωγή ενέργειας, αλλοιωμένη διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και επίσης συμβάλλει στην επιβλαβή παρατεταμένη συστολή του κυττάρου.

Ένα άλλο συστατικό της ισχαιμικής βλάβης προκαλείται από τη συσσώρευση ουσιών, όπως οι  $\text{K}^+$  και οι κατεχολαμίνες στον εξωκυτταρικό χώρο του οξέος ισχαιμικού μυοκαρδίου. Οι κατεχολαμίνες απελευθερώνονται μετά από 10 ή περισσότερα λεπτά ισχαιμίας και η αύξηση της συγκέντρωσης εξωκυτταρικής κατεχολαμίνης τροποποιεί τη συσσώρευση εξωκυτταρικού  $\text{K}^+$ . Αυτό παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ηλεκτροφυσιολογικών αλλαγών, οι οποίες συχνά οδηγούν σε σοβαρή κοιλιακή αρρυθμία. Η απελευθέρωση κατεχολαμινών από το καρδιακό νεύρο κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας μπορεί επίσης να προκαλέσει συσσωμάτωση αιμοπεταλίων εντός του ισχαιμικού μυοκαρδίου και να διεγείρει τους  $\beta$ -αδρενοδέκτες. Η διέγερση των  $\beta$ -αδρενο υποδοχέων στην καρδιά οδηγεί σε

ινοτροπικές και αγγειοδιασταλτικές αποκρίσεις σε αντίθεση με τη διέγερση του αδρενο υποδοχέα, η οποία προκαλεί αγγειοσυστολή.

### Απόπτωση

Είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, διαδικασία κατά την οποία ένας καταρράκτης βιοχημικών διεργασιών προκαλεί τη συρρίκνωση του κυττάρου και των ινών χρωματίνης, τον κατακερματισμό των νουκλεϊκών οξέων σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα και τελικά καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο. Σε μεγάλο βαθμό παραμένει άθικτη η δομική ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, γεγονός που επάγει τις διεργασίες φλεγμονής σε μικρότερο βαθμό και διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών σωματίων και την επούλωση.

Η αποπτωτική διαδικασία αποτελείται από την εξωγενή (extrinsic) ή μιτοχονδριακή και την ενδογενή (intrinsic) οδό ή οδό των υποδοχέων νέκρωσης (death receptor pathway), που όμως έχουν ως κοινό αποτέλεσμα την κατάληξη της ενεργοποίησης πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες. Οι δυο αυτές οδοί δεν είναι απόλυτα διακριτές, αλλά υπάρχει σημαντική βιοχημική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Πιθανότατα υπάρχει και τουλάχιστον μια τρίτη οδός που διαμεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα (Igney FH 2002). Σε περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου γύρω από τη νεκρωτική περιοχή συχνά παρατηρείται μια περιοχή καλά περιγεγραμμένη από κύτταρα, ο ονομαζόμενος αποπτωτικός δακτύλιος (Saraste A et al. 1999). Στην ενδογενή αποπτωτική οδό, σημαντικός είναι ο ρόλος του το ασβεστίου και των μιτοχονδρίων. Υψηλά επίπεδα ασβεστίου και το άνοιγμα του MPTP, μπορεί να οδηγήσουν σε απευθείας νέκρωση. Ενδέχεται όμως να προκαλέσουν αύξηση της διαπερατότητας ή διάρρηξη της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα επαγωγέων της απόπτωσης. Ο καλύτερα μελετημένος επαγωγέας είναι το κυτόχρωμα c, αλλά και πολυάριθμες πρωτεΐνες (Omi/HtrA2, Smac/DIABLO, AIF) οι οποίες φαίνεται ότι μπορεί να έχουν αυτόν τον ρόλο (Giorgi C. Et al. 2012). In vitro, έχει βρεθεί ότι σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που επικρατούν κατά την ισχαιμία μπορεί να οδηγήσουν στην απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα του κυτοχρώματος c, επάγοντας την ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3 και τελικά την αποπτωτική διαδικασία.

Η εξωγενής οδός απόπτωσης, δεν απαντά στα ενδοκυτταρικά ερεθίσματα, αλλά στην ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου (death receptors), οι οποίοι αποτελούν

μεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR). Περιλαμβάνουν μια ομόλογη «περιοχή θανάτου» (death domain) στην οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες που επάγουν το αποπτωτικό ερέθισμα. Οι πιο μελετημένες είναι οι βιοχημικές οδοί που περιλαμβάνουν τον Παράγοντα Νέκρωσης Ογκων-α (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) καθώς και τον υποδοχέα του (TNFR1) και το σύμπλεγμα Fas–Fasligand, είναι μια κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από μακροφάγα. Η σύνδεση του TNF- $\alpha$  στον υποδοχέα TNFR1 οδηγεί στη δέσμευση της πρωτεΐνης TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Associated Death Domain) με συμμετοχή των πρωτεϊνών FADD και RIP, ενώ η σύνδεση του Fas-ligand στον υποδοχέα Fas επίσης ενεργοποιεί την πρωτεΐνη FADD (Fas-Associated via Death Domain). Η FADD αλληλοεπιδρά με την προκασπάση 9 με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλέγματος (death-inducing signaling complex, DISC) και την ενεργοποίηση της κασπάσης 8.

Η διαδικασία της απόπτωσης είναι σημαντικά αυξημένη κατά τα αρχικά λεπτά της επαναιμάτωσης, τότε που η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου, η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου και η διάνοιξη του MPTP είναι στο μέγιστο. Ξεκινά άμεσα από την έναρξη της ισχαιμίας, ενώ κατά την επαναιμάτωση υπερδιπλασιάζεται ο αριθμός των κυττάρων που αποπίπτουν. Πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι τελικά η συμμετοχή της απόπτωσης έναντι της νέκρωσης στην εμφραγματική περιοχή είναι πολύ μεγαλύτερη σε ποσοστό 86% έναντι μόνο 14%. Υπάρχουν όμως και μελέτες με διαφορετικά αποτελέσματα, με την νέκρωση να είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την έκταση της μυοκαρδιακής βλάβης στην ισχαιμία/επαναιμάτωση, ενώ άλλες με σταθερή συνύπαρξη νέκρωσης και απόπτωσης. Τα διαφορετικά αποτελέσματα έχουν να κάνουν με το γεγονός ότι η διάρκεια της ισχαιμίας διαφέρει από μελέτη σε μελέτη. Έτσι, σε παρατεταμένη ισχαιμία, αναμένεται η νέκρωση όλων σχεδόν των μυοκαρδιοκυττάρων της ισχαιμικής περιοχής, ενώ σε ισχαιμία μικρότερης διάρκειας, ο σχετικός ρόλος της βλάβης επαναιμάτωσης (και απόπτωσης) αναμένεται να είναι αυξημένος.

#### 1.4 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ/ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Η βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Ischemia/Reperfusion, I/R) είναι μια παθοφυσιολογική διαδικασία, η οποία συναντάται σε πολλές κλινικές περιπτώσεις, μεταξύ των οποίων βρίσκονται το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, ενώ αποτελεί επίσης αναπόφευκτη συνέπεια ενός χειρουργείου καρδιάς και της μεταμόσχευσης οργάνων (Ellis et al. 1996). Στην τελευταία περίπτωση, οι βλάβες διακρίνονται σε ψυχρής ισχαιμίας και θερμής ισχαιμίας. Ψυχρή ισχαιμία είναι ο χρόνος, κατά τον οποίο το μόσχευμα στερείται αιμάτωσης και διατηρείται μόνο με την ψύξη και το διάλυμα συντήρησης. Ο κρίσιμος αυτός χρόνος είναι καθοριστικός παράγοντας για τη λειτουργία του μοσχεύματος και την έκβαση της μεταμόσχευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ψυχρής ισχαιμίας, πάνω από ένα συγκεκριμένο για κάθε όργανο χρονικό όριο, τόσο υψηλότερο είναι και το ποσοστό πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας του μοσχεύματος μετά τη μεταμόσχευση (primary non-function). Ως έναρξη του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας λαμβάνεται η χρονική στιγμή του αποκλεισμού της αορτής του δότη, κατά τη συγκομιδή των οργάνων και η έναρξη έγχυσης του ψυχρού διαλύματος συντήρησης των μοσχευμάτων (Belzer and Southard, 1998). Ο όρος θερμή ισχαιμία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ισχαιμία κυττάρων και οργάνων κάτω από νορμοθερμικές συνθήκες (θερμοκρασία σώματος).

Στην περίπτωση μεταμόσχευσης οργάνων, ο όρος χρησιμοποιείται για την περιγραφή δύο διακριτών από άποψη φυσιολογίας χρόνων ισχαιμίας:

- (1) Την περίοδο ισχαιμίας κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, από την αφαίρεση του οργάνου του δότη από τον πάγο μέχρι την επαναιμάτωση του οργάνου στον λήπτη (ισχαιμία στο λήπτη, warm ischemia in recipient) και
- (2) την περίοδο ισχαιμίας κατά τη διάρκεια εξαγωγής του μοσχεύματος από τον δότη, από τη στιγμή του αγγειακού αποκλεισμού (ή της ασυστολίας σε περίπτωση δότη του οποίου πλέον δεν υποστηρίζεται η καρδιακή λειτουργία), μέχρι να ξεκινήσει η ψυχρή αιμάτωση (θερμή ισχαιμία στον δότη, warm ischemia in donor). Οι αυτές περιόδους θερμής ισχαιμίας διαφέρουν ως προς τη φύση και την έκταση των παθοφυσιολογικών συνεπειών τους.

Συνήθως βέβαια στη βιβλιογραφία ο όρος θερμή ισχαιμία χρησιμοποιείται για να περιγράψει χωρίς διάκριση τις δύο αυτές περιόδους (Halazun et al. 2007). Ως προς τον παθογενετικό μηχανισμό, έχειδειχθεί ότι οι βλάβες από τη θερμή και την ψυχρή ισχαιμία διαφέρουν. Ιδιαίτερο παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό της ψυχρής ισχαιμίας αποτελεί η αστάθεια της κυτταρικής μεμβράνης. Η σταθερότητα της μεμβράνης ως προς τη διαπερατότητά της σε νερό και χημικές ουσίες εξαρτάται από την ακεραιότητα της λιπιδικής διπλοστιβάδας και σχετίζεται στενά με τις συνθήκες θερμοκρασίας, pH και ωσμωτικότητας. Η μείωση της θερμοκρασίας προκαλεί μετάπτωση φάσης των λιπιδίων (phase transition), το οποίο οδηγεί σε αλλαγές στη σταθερότητα της μεμβράνης. Επιπλέον, αλλάζει δραστικά τα προσδεδεμένα στη μεμβράνη ένζυμα. Οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, η οποία συμβάλλει στο κυτταρικό οίδημα (Belzer and Southard, 1998). Έχειδειχθεί σε επίπεδο οργάνου, ότι οι περιοχές οι οποίες προσβάλλονται κατά τη θερμή και την ψυχρή ισχαιμία διαφέρουν. Συγκεκριμένα για το ήπαρ έχειδειχθεί ότι κατά τη θερμή ισχαιμία βλάπτονται κυρίως τα ηπατοκύτταρα, ενώ κατά την ψυχρή τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Ikeda et al. 1992). Αν και η αποκατάσταση της ροής του αίματος στο όργανο το οποίο ισχαιμεί είναι ουσιώδης για την πρόληψη ανεπανόρθωτης κυτταρικής βλάβης, η επαναιμάτωση αυτή καθαυτή μπορεί να αυξήσει την ιστική βλάβη επιπλέον της προκληθείσας από την ισχαιμία (Parks et al. 1986). Η κυτταρική βλάβη μετά από επαναιμάτωση προηγουμένως ισχαιμούντων μεν, αλλά βιώσιμων ιστών ορίζεται ως βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Ischemia Reperfusion Injury, IRI).

Ειδικότερα, η βλάβη από την επαναιμάτωση περιλαμβάνει τις παρακάτω επιμέρους διαταραχές:

1) Την πρόκληση αρρυθμιών

2) Τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και την πρόκληση βλάβης της μικροκυκλοφορίας. Μία συνέπεια αυτής της κατάστασης είναι το φαινόμενο της μειωμένης ή και ολοκληρωτικά καταργημένης επανόδου της αιματικής ροής (non reflow) μετά την άρση της απόφραξης της στεφανιαίας αρτηρίας.

3) Την εμφάνιση του απόπληκτου μυοκαρδίου (stunned myocardium), το οποίο ενώ είναι βιώσιμο, εμφανίζει παροδική και αναστρέψιμη ελάττωση της συσταλτικότητας.



4) Την πρόκληση νέκρωσης κάποιου αριθμού μυοκαρδιακών κυττάρων, τα οποία ήταν βιώσιμα κατά τη χρονική στιγμή της επαναιμάτωσης, ή την επιτάχυνση της νέκρωσης ορισμένων κυττάρων που έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά την περίοδο της ισχαιμίας (Liem et al. 2007).

Με τον όρο μυοκαρδιακή αποπληξία αναφερόμαστε στην παροδική μυοκαρδιακή δυσλειτουργία που επιμένει μετά την επαναιμάτωση, παρά την απουσία μη αναστρέψιμης βλάβης (νέκρωσης) (Braunwald et al. 1982). Η διάρκεια της μυοκαρδιακής αποπληξίας υπερβαίνει κατά πολύ τη διάρκεια της προηγηθείσης ισχαιμίας. Παροδικός αποκλεισμός διάρκειας 15min μπορεί να προκαλέσει διαταραχές σύσπασης πέραν του 24ώρου (Johnston et al. 2004). Η μυοκαρδιακή αποπληξία προκαλεί όχι μόνο συστολική αλλά και διαστολική δυσλειτουργία και διαγιγνώσκεται από την εμμένουσα διαταραχή της συσταλτικότητας που σταδιακά βελτιώνεται με την πάροδο του χρόνου, εφόσον βέβαια έχει αποκατασταθεί η φυσιολογική στεφανιαία ροή. Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τη μυοκαρδιακή αποπληξία είναι: η βλάβη που προκαλείται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (oxygen free radicals - OFRs) (Bolli et al. 1989), η διαταραχή της ομοιοστασίας του ενδοκυττάρου ασβεστίου και πιθανώς η αλλαγή της δομής των συσταλών πρωτεϊνών (Bolli et al. 1998). Με την επαναιμάτωση, η παραγωγή OFRs προκαλεί βλάβη του σαρκελήμματος και μεγάλη εισροή ασβεστίου. Το ασβέστιο ενεργοποιεί ενδογενείς πρωτεάσες (καλπαΐνες) που ελαττώνουν την απαντητικότητα των μυοϊνιδίων στο ασβέστιο. Αν αυτή η μεγάλη εκφόρτιση ασβεστίου εμποδιστεί, τότε η μυοκαρδιακή αποπληξία δεν εκδηλώνεται. Η διαστολική δυσλειτουργία μπορεί να είναι απότοκος της διαταραχής της χάλασης της προκαλούμενης από το ασβέστιο.

Σε πειραματικές μελέτες η αποπληξία περιορίζεται αν προηγηθεί χορήγηση αντιοξειδωτικών, δεσμευτών των OFRs ή ανταγωνιστών ασβεστίου. Η συστολική δυσλειτουργία όμως μπορεί να αναστραφεί με τη χρήση ινοτρόπων, χωρίς περαιτέρω μυοκαρδιακή βλάβη και συνεπώς η χρήση των προαναφερθέντων παραγόντων κρίνεται περιττή. (Becker et al. 1986). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι ινότροποι παράγοντες αναστρέφουν την αποπληξία σχετίζεται με την άποψη ότι ένας από τους μηχανισμούς της αποπληξίας είναι η απευαισθητοποίηση των μυοϊνιδίων στο ασβέστιο. Είναι πιθανό ότι τα ινότροπα απλώς αντιπαρέρχονται αυτήν την απευαισθητοποίηση αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα του ασβεστίου στα μυοϊνίδια. (Kloner et al. 2001).

## 1.5 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη βλάβη επαναιμάτωσης προκειμένου να αναδειχθούν φαρμακολογικοί στόχοι για το σχεδιασμό αποτελεσματικών θεραπειών. Ο σημαντικός ρόλος των μιτοχονδρίων στην καρδιά είναι η παροχή ATP με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση για να διατηρηθεί απαιτεί τον φραγμό της διαπερατότητας της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια των θηλαστικών περιέχουν λανθάνων μη ειδικούς πόρους (mitochondrial permeability transition pores MPTPs), εντός της εσωτερικής μεμβράνης, που η διάνοιξή τους εμποδίζει όχι μόνο τη σύνθεση του ATP κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, αλλά επιτρέπει την αναστροφή της ATP συνθάσης, προκαλώντας υδρόλυση του ATP. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης MPTPs των καρδιομυοκυττάρων καταλήγει στην αποπόλωση της μεμβράνης και στην αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, οδηγώντας στην εξάντληση των αποθεμάτων του ATP και τον κυτταρικό θάνατο.

Στην ουσία, το άνοιγμα των MPTP μετατρέπει τα μιτοχόνδρια από οργανίδια ενέργειας σε συντελεστές που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Οι MPTP ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά σε πειραματικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα τέλη του 1970 από τους Haworth και Hunter (Sang-Bingong et al. 2015). Συγκεκριμένα αναφέρονται στο μιτοχονδριακό κανάλι, το οποίο προκαλεί απότομη αλλαγή στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το άνοιγμα των MPTP καθιστά τη μιτοχονδριακή μεμβράνη μη επιλεκτικά διαπερατή σε μόρια μικρότερα από 1,5 KDa. Με τον τρόπο αυτό καταρρέει το δυναμικό της μεμβράνης επηρεάζοντας δυσμενώς την οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα την εξάντληση του ATP και τον κυτταρικό θάνατο. Ένα άλλο αποτέλεσμα του ανοίγματος των MPTP είναι η πρόκληση οιδήματος και η ρήξη της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό οδηγεί στην εναπόθεση προ-αποπτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C, από τον ενδομεμβρανώδη χώρο στο κυτταρόπλασμα, εκκινώντας τον αποπτωτικό μηχανισμό και τον κυτταρικό θάνατο (Hausenloy et al. 2003). Επιπλέον, η υπερβολική πρόσληψη μιτοχονδριακού ασβεστίου, αποτελεί ένα σημαντικό έναυσμα για τον κυτταρικό θάνατο όπου και

διαμεσολαβείται μέσω του ανοίγματος των MPTP. Το άνοιγμα των πόρων ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου (Bhosale et al. 2015).

Οι MPTP παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκταση της βλάβης από επαναιμάτωση (Bernardi 2013). Οι MPTP είναι κλειστοί κατά την ισχαιμία, ενώ ανοίγουν κατά την επαναιμάτωση (Hausenloy et al. 2015; Griffiths et al. 1995). Σε πρωτοποριακές μελέτες που διεξήχθησαν από την ομάδα του Crompton, δείχθηκε ότι οι MPTPs σε απομονωμένα ηπατικά και καρδιακά μιτοχόνδρια ρυθμίζονται από παράγοντες όπως το  $Ca^{++}$ , ανόργανα φωσφορικά, το οξειδωτικό stress και το ATP. Οι παράγοντες αυτοί κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης προκαλούν άνοιγμα των MPTP. Οι Griffiths και Halastrop ανακάλυψαν ότι οι MPTP παραμένουν κλειστοί κατά τη διάρκεια της οξείας ισχαιμίας του μυοκαρδίου και ανοίγουν στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης (Hausenloy 2003). Οι MPTP παραμένουν κλειστοί κατά τη διάρκεια της ισχαιμικής περιόδου, μιας και το άνοιγμά τους αναστέλλεται από τις όξινες συνθήκες ( $pH < 7$ ), που προκαλούνται από την έκλυση του γαλακτικού οξέος (Griffiths 1997). Στην επαναιμάτωση παρατηρείται περαιτέρω εισροή ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, έκρηξη του οξειδωτικού stress και ταχεία διόρθωση της οξέωσης, μιας και το γαλακτικό οξύ "ξεπλένεται". Όλοι αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στην αύξηση της πιθανότητας του ανοίγματος των MPTP, κατά τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, ύστερα από μια παρατεταμένη περίοδο ισχαιμίας (Suleiman 2001).

Η πρόληψη του ανοίγματος των MPTPs κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, έχει επιτευχθεί με τη χρήση γνωστών αναστολέων των MPTPs, π.χ. της κυκλοσπορίνης A. Για τον λόγο αυτό, οι αναστολείς των MPTPs παρέχουν ένα σημαντικό θεραπευτικό εργαλείο για την πρόληψη των βλαβών από την επαναιμάτωση. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει επιβεβαιώσει ότι οι καρδιο-προστατευτικές επιδράσεις της αναστολής των MPTPs, ήταν εμφανείς όταν ο αναστολείς των MPTPs χορηγούνταν πριν ή κατά τη διάρκεια των πρώτων 15 λεπτών της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου, τονίζοντας με τον τρόπο αυτό τη σημασία της παρέμβασης στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης. Ως εκ τούτου οποιαδήποτε θεραπευτική στρατηγική που στοχεύει στη μυοκαρδιακή βλάβη από επαναιμάτωση, πρέπει να χορηγείται είτε κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης, είτε λίγα λεπτά πριν, προκειμένου να αποφευχθεί το άνοιγμα των MPTPs (Hausenloy 2003). Η IR συνιστά μια πολύπλοκη σειρά από γεγονότα, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την κυτταρική και ιστική βλάβη. Αυτά συγκεντρώνονται στα ακόλουθα.

## Οξειδωτικό στρες

Ένας από τους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης κατά την περίοδο της ισχαιμίας είναι η δημιουργία ελεύθερων ριζών και ενός επακόλουθου καταρράκτη οξειδωτικού stress. Το οξειδωτικό stress αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου προκαλούν βλάβη σε όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Συγκεκριμένα μπορούν να οδηγήσουν, μεταξύ άλλων, στην υπεροξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και παραγωγή αραχιδονικού οξέως, στη χημειοταξία και ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και σε βλάβες του DNA (Toyokuni et al. 1999).

Το οξειδωτικό στρες προέρχεται από την ανατροπή της ισορροπίας ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών ενώσεων οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) ή αζώτου και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι βλάβες που προκαλούνται επηρεάζουν τη λειτουργικότητα πολλών κυτταρικών ομοιοστατικών συστημάτων. Πιο ευπαθείς είναι ιστοί με μικρό βαθμό κυτταρικής διαίρεσης, όπως ο καρδιακός μυς, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των βλαβών που προέρχονται από την οξειδωτική καταπόνηση. Ο καρδιακός ιστός, επιπρόσθετα, υποβάλλεται σε έντονη οξειδωτική καταπόνηση, καθώς λειτουργεί έντονα και ακατάπαυστα σε όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού (Lefter 2000). Μετά από μυοκαρδιακή ιστική βλάβη (π.χ. μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου) παρατηρείται έντονη διαδικασία αναδόμησης του μυοκαρδίου. Χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον όγκο, τη σύσταση, και την οργάνωση της εξωκυττάριας ύλης, με σκοπό την ομαλοποίηση της πίεσης των τοιχωμάτων. Παρόλα αυτά, η αύξηση της ενδιάμεσης ίνωσης, η προοδευτική απώλεια του συνδετικού κολλαγόνου και η διολίσθηση μεταξύ μυϊκών κυττάρων οδηγεί σε προοδευτική κοιλιακή διάταση, αρρυθμίες, μείωση του κλάσματος εξώθησης και καρδιακή ανεπάρκεια (Sawyer 2002; Grieve 2004).

Οι ROS μπορεί να είναι είτε ελεύθερες ρίζες, είτε μπορούν να δημιουργήσουν ελεύθερες ρίζες, καθώς αντιδρούν με βιολογικά μόρια. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Μια ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται με δύο τρόπους: με ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού ενός κανονικού μορίου ή με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι και ο πιο διαδεδομένος τρόπος στα βιολογικά συστήματα, με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε ένα κανονικό μόριο (αναγωγή:  $A+e_{-} \rightarrow A_{-}\bullet$ ) ή με την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από ένα κανονικό μόριο (οξείδωση:  $A-e_{-} \rightarrow A^{+}\bullet$ ). Οι ROS διακρίνονται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν ( $\text{ClO}^{-}$ ), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος ( $\text{HClO}$ ), συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ( $\cdot\text{O}_2^{-}$ ) και μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Κατά την I/R παράγονται ελεύθερες ρίζες με διάφορους τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν το σύστημα της οξειδάσης του NADPH, την παραγωγή αραχιδονικού οξέος και το σύστημα της υποξανθίνης/οξειδάσης της υποξανθίνης (το οποίο αποκτά μεγαλύτερη βαρύτητα κατά την επαναιμάτωση). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας δημιουργούνται ROS μέσω της οξειδάσης του NADPH.

Το σύστημα αυτό βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων/μακροφάγων και καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε ανιόν υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο αντιδρά με τις πρωτεΐνες που περιέχουν ομάδες σιδήρου-θείου (iron-sulfur proteins, π.χ. μεταλλοπρωτεΐνες, συνένζυμο Q, αφυδρογονάση του NADPH), μειώνοντας τη δραστηριότητά τους και απελευθερώνοντας σίδηρο, που μπορεί με τη σειρά του να οδηγήσει σε σχηματισμό ριζών υδροξυλίου (Chen 2009). Ως προς την ενεργοποίηση του συστήματος της οξειδάσης του NADPH στην I/R, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή μεσολαβείται από το σύστημα του συμπληρώματος και μάλιστα μέσω της κλασικής οδού (Simone et al. 2014).

Στα μεταβολικά ενεργά καρδιομυοκύτταρα τα μιτοχόνδρια αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή ROS, επομένως αποτελούν και τον σημαντικότερο στόχο τους (Paradies 2001). Η έκθεση σε ελεύθερες ρίζες και αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του μιτοχονδρίου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών από το μιτοχόνδριο, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ασταθούς συστήματος, το οποίο, αυτό-τροφοδοτείται μεταδίδοντας τις διαταραχές στα γειτονικά μιτοχόνδρια. Είναι δυνατό, δηλαδή, μία τοπική αλλοίωση να πολλαπλασιαστεί και να επεκταθεί σε όλο το κύτταρο ή και σε γειτονικά κύτταρα (Brady 2004).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στη βλάβη του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση, επάγοντας το άνοιγμα των MPTPs (Zweier JI 1988). Δυστυχώς, σε πειράματα που έχουν μέχρι τώρα διεξαχθεί, τόσο σε ζώα όσο και στον άνθρωπο σε κλινικές μελέτες, η καρδιοπροστατευτική δυναμική της αντιοξειδωτικής θεραπείας είχε ασαφή αποτελέσματα (Downey JM 1990). Το οξειδωτικό στρες μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) κατά την επαναιμάτωση. Σε ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία που αυξάνει τα επίπεδα του NO δεν παρατηρήθηκε μείωση της βλάβης του μυοκαρδίου από επαναιμάτωση (Kitakaze M 2007).

### **Το σύστημα του συμπληρώματος**

Το σύστημα του συμπληρώματος ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της βλάβης από επαναιμάτωση. Αυτό συμβάλλει στον σχηματισμό αναφυλατοξινών των C3a, C4a και C5a. Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελείται από πολυάριθμες μεμβρανικές και πρωτεΐνες πλάσματος (πολλές ως προ-ένζυμα) οι οποίες ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση από αντιγόνα παθογόνων μικροοργανισμών συνδεδεμένα με αντισώματα αλλά και από ενδογενή μόρια κινδύνου (Rossen RD, et al.1994).

Το σύστημα συμπληρώματος επάγει την κυτταρική βλάβη, αυξάνοντας την κυτταρική διαπερατότητα και την απελευθέρωση της ισταμίνης, καθώς και του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον ο παράγοντας C5a είναι ισχυρός διεγέρτης για την προσκόλληση των ουδετεροφίλων και της παραγωγής υπεροξειδίου (Moens AL 2005). Μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω τριών οδών: της κλασικής οδού, της εναλλακτικής οδού και της οδού της λεκτίνης. Οι τρεις οδοί συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών C3 και C5 και τον σχηματισμό του μεμβρανοεπιθητικού συμπλέγματος (membrane attack complex, MAC) που προκαλεί οφωνινοποίηση των παθογόνων και κυτταρόλυση. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην καρδιακή ισχαιμία είναι γνωστή από παλιά και, περισσότερο πρόσφατα, έχει τεκμηριωθεί η συμμετοχή και των τριών οδών ενεργοποίησης στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, κλασικής, εναλλακτικής αλλά ιδιαίτερα της οδού λεκτίνης. Η χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων ενεργοποίησης της οδού της λεκτίνης σε ένα πειραματικό μοντέλο καρδιακής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης μείωσε τη συσσώρευση των ουδετεροφίλων και, τελικά, την έκταση της βλάβης (Jordan JE, et al. 2001).

Η σημασία της οδού της λεκτίνης για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος κατά τη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης αποδειχθεί από γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα στα οποία είχε αποκλειστεί η οδός της λεκτίνης αλλά με δυνατότητα ενεργοποίησης του συμπληρώματος με την κλασική ή εναλλακτική οδό και εμφάνισαν μικρότερη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίστροφα, πειραματόζωα χωρίς έκφραση της πρωτεΐνης C1q (βασικό συστατικό της κλασικής οδού ενεργοποίησης) αλλά με άθικτη την οδό ενεργοποίησης της λεκτίνης δεν είχαν την ίδια προστασία (Walsh MC et al. 2005).

### Αναερόβιος μεταβολισμός και ATP

Ο αερόβιος μεταβολισμός περιλαμβάνει τη γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται 38 μόρια ATP. Σε συνθήκες ισχαιμίας, ενεργοποιείται ο αναερόβιος μεταβολισμός. Στην περίπτωση αυτή η ενέργεια παράγεται με δύο τρόπους, με την αναερόβια γλυκόλυση και με τη διάσπαση των ήδη διαθέσιμων νουκλεοτιδίων αδενοσίνης. Κατά την αναερόβια γλυκόλυση έχουμε ζύμωση του πυροσταφυλικού οξέος (το οποίο απουσία οξυγόνου δεν μπορεί να εισέλθει στον κύκλο του Krebs) προς γαλακτικό οξύ. Η διαδικασία αυτή αποδίδει 2 μόρια ATP, ενώ λόγω του παραγόμενου οξέος, το ενδοκυττάριο pH μειώνεται. Σε οξεία ισχαιμία παρατηρείται μείωση του ATP, αφενός λόγω του ότι αυτό πλέον παράγεται μόνο μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης και αφετέρου λόγω της κατανάλωσης του ενεργειακού φορτίου της φωσφοκρεατίνης ((PC) PCr + ADP ATP + Κρεατίνη).

Επί παρατεταμένης ισχαιμίας επέρχεται κατανάλωση και της δεξαμενής των αδενυλικών με διάσπαση του ATP μέχρι το επίπεδο της αδενοσίνης (ATP→ADP→AMP→ Αδενοσίνη). Τα προϊόντα διασπάσεως του ATP μέχρι το επίπεδο του AMP είναι αδιαπέραστα για την κυτταρική μεμβράνη και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Η αδενοσίνη διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη.

Ως εκ τούτου, όταν η διάσπαση φθάσει στο επίπεδο της αδενοσίνης, αυτή διαχέεται στον εξωκυττάριο χώρο και στερεί το ενδοκυττάριο περιβάλλον από το κατάλληλο υπόστρωμα παραγωγής ενέργειας. Επιπλέον, η παραπέρα διάσπαση της αδενοσίνης οδηγεί σε υποξανθίνη, η οποία στη φάση της επαναιμάτωσης οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, μέσω μηχανισμού που αναλύεται παρακάτω (Kosieradzki, et al. 2008).

## **Δυσλειτουργία κυτταρικών αντλιών και ανισορροπία ιόντων**

Η έλλειψη ATP διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, επηρεάζοντας τόσο το δυναμικό της όσο και τις αντλίες ενεργού μεταφοράς μικρομοριακών ενώσεων και ιόντων (οι οποίες λειτουργούν με την κατανάλωση ATP). Κατά την ισχαιμία, επικρατεί η ενδοκυττάρια οξέωση. Ως αντισταθμιστικό μηχανισμό στο όξινο pH και στην παρουσία ιόντων  $H^+$ , η αντλία  $Na^+/H^+$  εκκρίνει περίσσεια ιόντων υδρογόνου στον εξωκυττάριο χώρο, που οδηγεί στην ενδοκυττάρια συσσώρευση ιόντων νατρίου (Sanada et al. 2011). Το έλλειμμα ATP επηρεάζει την ενεργό μεταφορά ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της αντλίας  $Na/K$ -ATP, συσσώρευση του νατρίου και μέσω διάχυσης, νερού στον ενδοκυττάριο χώρο με επακόλουθο οίδημα. Αντισταθμιστικά το κύτταρο χρησιμοποιεί τις αντλίες ανταλλαγής  $Na^+/Ca^{2+}$  για να εξάγει το νάτριο, το οποίο όμως οδηγεί σε υπερφόρτωση ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου. Η ανισορροπία αυτή συμβαίνει επίσης μέσα στα οργανίδια, οδηγώντας σε οίδημα και αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων και επέκταση και σχηματισμό κυστιδίων μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ρήξη των λυσοσωμάτων και η απελευθέρωση των περιεχομένων τους, αποτελεί το τελικό γεγονός πριν από τον κυτταρικό θάνατο (Eltzschig and Eckle 2011).

Εκτός από τα ιόντα νατρίου, τα οποία συσσωρεύονται ενδοκυττάρια, αυξάνονται επίσης τα ενδοκυττάρια επίπεδα  $Ca^{2+}$  λόγω απενεργοποίησης της αντλίας  $Ca^{2+}$ -ATP, η οποία φυσιολογικά εξάγει τα ιόντα ασβεστίου έξω από το κύτταρο και λόγω της αντλίας ανταλλαγής  $Na^+/Ca^{2+}$ , όπως προαναφέρθηκε, (Roberts and Christini, 2011) αλλά και επειδή η έλλειψη ATP αναστέλλει την επαναπρόσληψη  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Sanada, et al.2011).

Η συσσώρευση ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού με τις εξαρτώμενες από το ασβέστιο πρωτεάσες, όπως είναι οι καλπαΐνες. Οι καλπαΐνες παραμένουν ανενεργές λόγω του όξινου περιβάλλοντος, αλλά μπορεί να βλάψουν τα κύτταρα μετά από την επαναφορά του Ph στα φυσιολογικά επίπεδα κατά την επαναιμάτωση (Inserre et al, 2012). Μια άλλη συνέπεια της συσσώρευσης  $Ca^{2+}$  είναι η δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια κατά την ισχαιμία. Αυτό προκαλεί διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου μετάβασης (mitochondrial transition



pore, mPTP) μετά την επαναιμάτωση, με επακόλουθο την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο (Gustafsson and Gottlieb, 2008; Peng and Jou, 2010).

Επίσης, έχει δειχθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της φωσφολιπάσης A2 (PLA2) μπορεί να οδηγήσει στην προσβολή κυτταρικών μεμβρανών, υπεροξειδωση λιπιδίων της μεμβράνης και απελευθέρωση ελευθέρων λιπαρών οξέων (κυρίως αραχιδονικού οξέος), με επακόλουθο την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας, παραγωγής ελευθέρων ριζών και την αναστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Cocco et al., 1999; Phillis et al., 2003).

### **Τα microRNAs**

Τα microRNAs (MiRNAs ή MiRs) αποτελούν μια κατηγορία μη κωδικοποιών (non-coding) μορίων ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) τα οποία είναι μια πρόσφατη ανακάλυψη και βρίσκονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα ζώων, φυτών και σε ορισμένους ιούς παίζοντας σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων. Αποτελούνται από μία μονή αλυσίδα RNA μήκους περίπου 22 βάσεων. Αρχικά τα MiRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II σε μεγάλα μόρια (pri-MicroRNA) τα οποία περικόπτονται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα του πυρήνα σε πρόδρομα MiRNAs (pre-MiRNAs), μεγέθους περίπου 70 βάσεων. Το μόριο αυτό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου με τη δράση της πρωτεΐνης DICER μετατρέπεται στο ώριμο MiRNA, μεγέθους περίπου 22 βάσεων. Έπειτα μαζί με ριβονουκλεϊκές πρωτεΐνες, ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα RNA-induced silencing complex (RISC), το οποίο μπορεί να συνδεθεί με το mRNA-στόχο και να παρεμποδίσει τη μετάφρασή του άμεσα ή επιταχύνοντας τον καταβολισμό του (Wang et al. 2010). Με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time polymerase chain reaction, rt-pcr) βρέθηκε σε ένα πειραματικό μοντέλο καρδιακής ισχαιμίας/επαναιμάτωσης σημαντική απορρύθμιση της παραγωγής του MiR-21. Με τεχνικές *in situ* υβριδοποίησης και ανοσοϊστοχημείας διαπιστώθηκε ότι το MiR-21 εντοπίζεται στους ινοβλάστες της εμφραγματικής περιοχής ρυθμίζοντας τη λειτουργία του ομολόγου φωσφατάσης και τενσίνης (Phosphatase and tensin homologue, PTEN). Το PTEN ελέγχει τη δράση της μεταλλοπρωτεάσης υποστρώματος-2 (matrix metalloprotease-2) στην ισχαιμική περιοχή, η οποία συμμετέχει ενεργά στην αναδιαμόρφωση της περιοχής βλάβης. Παρόμοια αποτελέσματα ως προς την

υπερέκφραση του MiR-21 έδειξε μια άλλη μελέτη, με τη σημαντική προσθήκη ότι η εξάλειψη (knock down) του MiR-21 προκάλεσε την απώλεια της προστασίας που παρείχε η ισχαιμική προετοιμασία (ischemic preconditioning) in vivo (Cheng Y, et al. 2010).

Τόσο in vivo όσο και in vitro, το MiR-21 προστάτευσε τα μυοκαρδιοκύτταρα από την επαγόμενη από ισχαιμία/επαναιμάτωση απόπτωση (Cheng Y, et al. 2010). Οι Rane et al. έδειξαν ότι τα επίπεδα του MiR-199a μειώνονται ταχέως στα μυοκαρδιοκύτταρα σε συνθήκες ισχαιμίας και ότι αυτή η μείωση συνδέεται με την υπερέκφραση του επαγόμενου από υποξία παραγοντα-1α (hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α), διαταραχή της έκφρασης του γονιδίου p53 και απόπτωση. Η τεχνητή αναπλήρωση του MiR-199a κατά την υποξία ανέστειλε την υπερέκφραση του HIF-1α και μείωσε την απόπτωση. Ο ρόλος των MiRNAs στην απόπτωση ενισχύθηκε από τη μελέτη της δράσης του MiR-494 σε συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης. Μοντέλο γενετικά τροποποιημένων ποντικών με υπερέκφραση του MiR-494 στο μυοκάρδιο, βρέθηκε ότι καρδιές που τοποθετούνταν σε σύστημα Langendorff και υποβάλλονταν σε ισχαιμία/επαναιμάτωση εμφάνισαν καλύτερη συσταλτικότητα, μειωμένα επίπεδα γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) και μειωμένη έκταση της εμφραγματικής περιοχής και των κυττάρων σε απόπτωση σε σύγκριση με καρδιές ποντικών με φυσιολογικό γονότυπο. In vitro βρέθηκε ότι οι δράσεις αυτές προέρχονταν, τουλάχιστον εν μέρει, από την αναστολή της κασπάσης 3. Παρότι στόχοι του MiR-494 ήταν τόσο προ- όσο και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, συνολικά η ενεργοποίησή του προστάτευσε το μυοκαρδιοκύτταρο. Όπως το MiR-494, έτσι και η υπερέκφραση των MiR-144 και 451 διαπιστώθηκε ότι προστάτευσαν τα μυοκαρδιοκύτταρα από τις βλάβες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης επηρεάζοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης CUG triplet repeat-binding protein 2(CUGBP2), η οποία παρεμποδίζει τη μετάφραση του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) (Zhang X, et al. 2010). Σε αντίθεση με τα MiR-494, 144 και 451, η υπερέκφραση του MiR-15 σε καρδιακό ιστό ποντικών ή χοίρων συσχετίστηκε με αυξημένο μέγεθος εμφράγματος από τους Hullinger et al., ενώ η τεχνητή καταστολή του άμβλυνε την βλαπτική του δράση. Παρομοίως, η τεχνητή υπερέκφραση του MiR-320 με gain-of-function αλλά και διαγονιδιακές τεχνικές (το οποίο φυσιολογικά αναστέλλεται στην ισχαιμία/επαναιμάτωση) συνδέθηκε με αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου και απόπτωσης, με τα αντίστροφα αποτελέσματα σε προσθήκη του αναστολέα του. Στόχος του MiR-320 φαίνεται πως

είναι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ-20 (heat shock protein-20), γνωστή για τις καρδιοπροστατευτικές της δράσεις σε συνθήκες ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

Ένα βασικό πρόβλημα των μελετών των MiRNAs είναι ότι η συντριπτική τους πλειοψηφία πειράματα τρωκτικών ή κυτταρικές σειρές, έτσι ώστε η αναγωγή των αποτελεσμάτων τους στον άνθρωπο να μην είναι προς το παρόν εύκολα. Παρότι ο μηχανισμός δράσης των MiRNAs είναι εξαιρετικά διατηρημένος εξελικτικά προκύπτει ότι η δράση συγκεκριμένων MiRNAs μπορεί να διαφέρει από τα πειραματόζωα στον άνθρωπο, τα MiRNAs πιθανότατα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των βλαβών που παρατηρούνται στην ισχαιμία/επαναιμάτωση του μυοκαρδίου.

### **Η φλεγμονώδης αντίδραση**

Τα ουδετερόφιλα είναι σημαντικά για την πρόκληση της βλάβης από επαναιμάτωση, με την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου, πρωτεασών, και προφλεγμονών μεσολαβητών, όπου και ενισχύουν περαιτέρω τη διείδυση των ουδετεροφίλων στο ευπαθές μυοκάρδιο (Dreyer WJ 1991). Η τοπική συσσώρευση των αιμοπεταλίων συμβάλλει επίσης στους μικροεμβολισμούς, όπου και εν μέρει είναι υπεύθυνοι για τη βλάβη από επαναιμάτωση.

Κατά την επαναιμάτωση παρατηρείται ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, επιδεινώνοντας με τον τρόπο αυτό τη βλάβη στο μυοκάρδιο. Επίσης τα αιμοπετάλια επιδεινώνουν την μικροκυκλοφορία, οδηγώντας σε περαιτέρω μικροαγγειακή συμφόρηση, θρόμβωση και μειωμένη στεφανιαία ροή (Neves LA 1997). Κατά την ισχαιμία παρατηρείται έκφραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως μόρια προσκόλλησης των ουδετεροφίλων (ICAMs), κυτταροκίνες (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8), ET-1 και θρομβοξάνη A2 (TX-2), αλλά και αναστολή της παραγωγή άλλων «ευεργετικών» ουσιών και ενζύμων, όπως η συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και οι προσταγλανδίνες (Carden et al., 2000). Επίσης, ήδη κατά την ισχαιμία έχουμε ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα την άμεση, αλλά και έμμεση κυτταρική βλάβη, μέσω χημειοταξίας ουδετεροφίλων και επακόλουθης παραγωγής ελευθέρων ριζών μέσω της οξειδωτικής έκρηξης (oxidative burst) των ουδετεροφίλων (Riedemann and Ward, 2003). Συνεπώς επάγεται μια προφλεγμονώδης κατάσταση, η οποία καθιστά τους ιστούς περισσότερο ευάλωτους σε σοβαρότερες βλάβες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης.

## Αγγειογένεση

Αντισταθμιστικός μηχανισμός στην υποξία θεωρείται η υπερέκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF – vascular endothelial growth factor), ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, ώστε να αυξηθεί η άρδευση των ιστών δεδομένης της χαμηλής παροχής οξυγόνου. Το πρωταρχικό βήμα της διαδικασίας αυτής, είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής του VEGF, η οποία επάγεται από τον ενεργοποιούμενο από την υποξία παράγοντα 1, (Hypoxia-Inducible - Factor1, HIF-1). Η αγγειογένεση όμως κατά την ισχαιμία, πέρα από τον αντισταθμιστικό ρόλο, όπως προαναφέρθηκε, διευκολύνει και τη μετέπειτα εγκατάσταση της τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Forsythe et al., 1996). Παρά τις παραπάνω διαδικασίες, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων νεκρώνεται σε σχέση με την περίοδο επαναιμάτωσης που ακολουθεί. Σε μία μελέτη *in vitro* με καρδιομυοκύτταρα (Vanden et al., 1996) 4% και 17% της βιωσιμότητας των καρδιομυοκυττάρων χάθηκαν μετά από 1 και 4 h ισχαιμίας σε σύγκριση με το 73% μετά από 3 h επαναιμάτωσης. Οι βλάβες από επαναιμάτωση εντοπίζονται αφενός σε τοπικό επίπεδο, στο όργανο το οποίο υποβλήθηκε σε ισχαιμία και αφετέρου σε συστηματικά, σε απομακρυσμένα όργανα μετά την αποκατάσταση της αιματικής ροής. Οι τοπικές βλάβες αφορούν τόσο άμεσα στο όργανο που ισχαιμεί, μέσω δηλαδή βλάβης του παρεγχύματος, και κυτταρικού θανάτου, όσο και έμμεσα, μέσω διαταραχών της μικροκυκλοφορίας, με μηχανισμούς όπως είναι ο τραυματισμός του ενδοθηλίου, η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, το φαινόμενο της μη επαναιμάτωσης (non-reflow) τριχοειδών. Οι συστηματικές βλάβες που αφορούν σε απομακρυσμένα όργανα, μεσολαβούνται μεταξύ άλλων από το οξειδωτικό stress και την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους διαδικασίας, με μεσολαβητές διάφορες κυτταροκίνες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και το σύστημα του συμπληρώματος.

## Διαταραχές μικροκυκλοφορίας

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επενδύουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων αποτελούν μία ζωτική και δυναμική δομή η οποία είναι απαραίτητη για την αγγειακή ομοιόσταση. Τα κύτταρα αυτά φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ευπαθή στα αποτελέσματα της κυτταρικής υποξίας (ισχαιμίας) και επανοξυγόνωσης (επαναιμάτωσης). Όπως προαναφέρθηκε, πολλές από τις δράσεις της υποξίας επιδεινώνονται μετά την επανοξυγόνωση. Συνεπώς, κατά την αρχική περίοδο μετά την επαναιμάτωση, η σοβαρή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβαίνει ταχέως και μπορεί να εξελιχθεί χωρίς εμφανή μορφολογικά κυτταρική βλάβη. Αυτές οι μορφολογικές μεταβολές που συνοδεύουν την επαναιμάτωση μετά από παρατεταμένη ισχαιμία γενικά επάγουν το κυτταρικό οίδημα, την απώλεια πινοκυτταρικών κυστιδίων, αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων από την υποκείμενη βασική μεμβράνη και προσκόλληση των ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων (κυρίως ουδετεροφίλων) στην επιφάνεια του ενδοθηλίου (Parvums, 1999).

Εκτεταμένες αλλαγές στους δραστικούς μεταβολίτες του οξυγόνου και του NO παρατηρούνται νωρίς μετά την επαναιμάτωση, με την παραγωγή των τελευταίων να μειώνεται (Grisham et al. 1998). Παρόλο που όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο μικροαγγειακό δίκτυο εκτίθενται παρόμοια στις συνέπειες της I/R, το αποτέλεσμα της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας φαίνεται να εκδηλώνεται με ειδικό για κάθε τοποθεσία τρόπο μέσα στη μικροκυκλοφορία (Granger et al. 1999). Αυτό έχει ως συνέπεια, η απόκριση των αρτηριολίων, των τριχοειδών και των φλεβιδίων στην I/R να διαφέρει. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στα αρτηριόλια μετά από την I/R εκφράζεται πρωτίστως ως ελαττωματική, ενδοθλιο-εξαρτώμενη, από NO-μεσολαβούμενη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων ως απόκριση σε όλους τους αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες, που μεσολαβούνται από υποδοχείς, όπως είναι η ακετυλοχολίνη (Banda et al., 1997; Granger, 1998; Kuo et al., 1992). Η ελαττωματική αγγειοδιαστολή μπορεί να οφείλεται είτε σε μειωμένη σύνθεση του NO, είτε σε αυξημένη απενεργοποίησή του από τις παραγόμενες ROS κατά την I/R.

Το NO συντίθεται από μια οικογένεια ενζύμων, τις συνθετάσες του NO (NOS) που μετατρέπουν την L-αργινίνη σε NO και κιτρουλίνη με συμπαραγόντες την τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4) και την αναχθείσα μορφή του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH). Δύο μορφές του ενζύμου υπάρχουν στα

ενδοθηλιακά κύτταρα: η ενδοθηλιακή NOS (eNOS), η οποία εκφράζεται συνεχώς και μια επαγώγιμη μορφή (inducible iNOS). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα οι NOS ανταγωνίζονται με την αργινάση για την L-αργινίνη. Η δραστηριότητα της αργινάσης έχει αναφερθεί ότι αυξάνει μετά από I/R, με αποτέλεσμα να μειώνει την L-αργινίνη που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του NO. Η παρεμπόδιση της αργινάσης στην I/R συντηρεί την ενδοθήλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, αν και όχι πλήρως, αναδεικνύοντας ότι αποτελεί έναν από τους διάφορους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αρτηριακή δυσλειτουργία (Hein et al. 2003). Τέλος τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκτούν έναν φλεγμονώδη φαινότυπο που παράγει μόρια προσκόλλησης που προκαλούν συσσώρευση λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων, ενώ οι διακυττάριοι στεγανοί σύνδεσμοι (tight junctions) διαταράσσονται, και προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Ένας άλλος μηχανισμός δυσλειτουργίας της NO-μεσολαβούμενης χάλασης που έχει προταθεί, είναι αυτός της υπερπαραγωγής ανιόντων υπεροξειδίου (το οποίο μπορεί να εξουδετερώσει το NO) από τα μετα-ισχαιμικά ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς έχει δείχθει ότι η δισμουτάση του υπεροξειδίου και άλλα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστρέψουν την απόκριση αυτή στα μετα-ισχαιμικά αρτηριόλια (Harrison, 1997). Δεδομένου ότι έχει δείχθει σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με έλλειμμα για τα λευκοκύτταρα (CD11/CD18) ή για τα μόρια προσκόλλησης στο ενδοθήλιο (P-selectin, ICAM-1), ότι αυτά δεδιαθέτουν ελαττωματική ενδοθηλιο-εξαρτώμενη χάλαση μετά από την I/R, είναι πιθανό ότι τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα αποτελούν μια άλλη δυνητική πηγή υπεροξειδίου το οποίο μπορεί να απενεργοποιήσει το NO που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από την επαναιμάτωση (Banda et al. 1997). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που συμβαίνει στα τριχοειδή μετά από την I/R εκδηλώνεται τόσο ως αυξημένη διήθηση υγρού μέσα στο διακυττάριο χώρο όσο και ως μείωση στον αριθμό των τριχοειδών που αιματώνονται (φαινόμενο non-reflow).

Παρόλο που λίγα είναι σχετικά γνωστά για τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη διήθηση υγρών των τριχοειδών, μελέτες δείχνουν ότι αυτή πιθανώς να οφείλεται στην αυξημένη υδραυλική αγωγιμότητα του ενδοθηλιακού φραγμού, παρά ως αυξημένη διατριχοειδική πίεση (Harris et al. 1996). Η αναστολή της NOS, η οποία σε ειδάλως φυσιολογικά τριχοειδή διεγείρεται από τη μειωμένη παραγωγή NO στα μετα-ισχαιμικά ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό διήθησης υγρών, υπονοώντας ότι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του

NO θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση της τριχοειδικής διήθησης σε απόκριση της I/R (Harris et al. 1997). Η κακή αιμάτωση των τριχοειδών, η οποία εκδηλώνεται ως μειωμένος αριθμός αιματούμενων τριχοειδών και ιστική υποξία, έχει περιγραφεί σε πολλά διαφορετικά όργανα που εκτίθενται σε I/R. Σε μερικούς ιστούς, π.χ. στο ήπαρ, η κακή κατανομή της αιμάτωσης στη μικροκυκλοφορία φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της απόφραξης των τριχοειδών από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα (με ή χωρίς προσδεδεμένα αιμοπετάλια), με μερική παρεμπόδιση της αιματικής ροής να μεσολαβείται από τα οίδηματώδη και μερικώς αποκολλημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (Salak R. and Salak TC. 1995).

Σε άλλους ιστούς, φαίνεται ότι η συσσώρευση διακυτταρικού οιδήματος προκαλείται από διαρροή, μεσολαβούμενη από λευκοκύτταρα, εμπλουτισμένων σε πρωτεΐνες υγρών στα μετα-ισχαιμικά φλεβίδια, τα οποία οδηγούν σε συμφόρηση της μικροκυκλοφορίας, παρακωλύοντας περαιτέρω την κυκλοφορία των συστατικών του αίματος στα τριχοειδή (Jerome et al. 1994).

Οι μηχανισμοί αυτοί υποστηρίζονται από μελέτες που περιγράφουν βελτίωση της τριχοειδικής διήθησης, που σχετίζεται με απόφραξη τριχοειδών, σε ποντίκια τα οποία είναι γενετικά τροποποιημένα και φέρουν είτε έλλειμμα λευκοκυττάρων είτε έλλειμμα μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο (Horie et al. 1997).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δειχθεί σε ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, το οποίο εμπλέκει το ανιόν του υπεροξειδίου στην αγγειακή απόκριση στην I/R (Horie et al. 1998). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στα μετατριχοειδικά φλεβίδια συνεισφέρει στο μεγαλύτερο βαθμό της φλεγμονώδους απόκρισης η οποία σχετίζεται με I/R. Η προσκόλληση λευκοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων, η μετανάστευση των λευκοκυττάρων διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων, η συσσώρευση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, η εξαγγείωση της αλβουμίνης και η ενισχυμένη παραγωγή οξειδωτικών, αποτελούν χαρακτηριστικά της απόκρισης των φλεβιδίων στη I/R (Granger et al. 1998, 1999).

Ενώ οξειδωτικό stress μετά την I/R υφίστανται τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε όλα τα τμήματα του αγγειακού δικτύου, τα κύτταρα εκείνα που επενδύουν τα μετατριχοειδικά φλεβίδια φαίνεται να είναι εκείνα που επωμίζονται το μεγαλύτερο βάρος. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι υπάρχουν δύο πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου στα μετα-ισχαιμικά φλεβίδια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και

τα λευκοκύτταρα (Granger, 1999). Μια σημαντική πηγή υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, τα οποία πηγάζουν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης. Το ένζυμο αυτό, υπάρχει στους περισσότερους ιστούς και λειτουργεί καταλυτικά σε μια σειρά αντιδράσεων που μετατρέπουν την υποξανθίνη σε ουρικό οξύ. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το 80%-90% του μορίου υπάρχει με τη μορφή της αφυδρογονάσης και χρησιμοποιεί το NAD (Nicotinamine Adenine Dinucleotide) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε περιπτώσεις ισχαιμίας, μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (οξειδάση της ξανθίνης). Η συσσώρευση της υποξανθίνης, όπως προαναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας οδηγεί σε μια έκρηξη παραγωγής υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ένζυμο αυτό όταν το οξυγόνο εισέρχεται ξανά στα αιμοφόρα αγγεία τη στιγμή της επαναιμάτωσης (Granger, 1998). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, ήδη κατά την υποξία ή ισχαιμία προάγεται η μετατροπή της ανηγμένης μορφής της NAD- αφυδρογονάσης στην οξειδωμένη της μορφή, την NAD-οξειδάση, η οποία καταλύει την παραγωγή υπεροξειδίου. Ο μηχανισμός αυτός της παραγωγής οξειδωτικών μορίων υποστηρίζεται από αναφορές κατά τις οποίες παρατηρείται μείωση του οξειδωτικού στρες *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων και σε μετα-ισχαιμικά φλεβίδια στα οποία έχει γίνει προχορήγηση με αναστολείς οξειδάσης της ξανθίνης, όπως είναι η αλλοπουρινόλη (Ratych et al. 1997). Ενώ η οξειδάση της ξανθίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να συνεισφέρει στο αρχικό οξειδωτικό στρες που επάγεται στα φλεβίδια μετά από μερικά λεπτά επαναιμάτωσης, τα λευκοκύτταρα που προσκολλούνται στο ενδοθήλιο φαίνεται πως συνεισφέρουν στην περεταίρω παραγωγή και διατήρηση του οξειδωτικού στρες που ακολουθεί (Granger, 1998). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από μελέτες που καταδεικνύουν μείωση του οξειδωτικού στρες στα μετα-ισχαιμικά φλεβίδια ζώων στα οποία έχουν προ-χορηγηθεί εξουδετερωτικά αντισώματα εναντίων μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων ή των λευκοκυττάρων (Salas et al. 1999).

Έχει επίσης δειχθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα του NO αποτελεί έναν από τους καθοριστικούς παράγοντες της έκβασης της φλεγμονώδους απόκρισης που παρατηρείται στα φλεβίδια μετά από I/R. Οι δράσεις του NO περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων: κυτταρική προστασία μέσω μείωσης του οξειδωτικού stress, μείωσης απελευθέρωσης κυτταροκινών, προσκόλλησης λευκοκυττάρων και απόπτωσης και



επίσης προστασία ενάντια στη δυσλειτουργία του μικροαγγειακού δικτύου που επάγεται από I/R και επιτυγχάνεται μέσω των συστατικών που απελευθερώνουν NO, τα οποία αναπληρώνουν τα αποθέματα των ιστών σε NO στους μετα-ισχαιμικούς ιστούς.

## **Η αυτοφαγία**

Κυτταρική διεργασία για τα γερασμένα ή/και αλλοιωμένα πρωτεϊνικά μόρια και κυτταρικά οργανίδια που αποδομούνται στο εσωτερικό του κυττάρου και αντικαθίστανται από νέα. Αφορά μεγαλομόρια και οργανίδια και αποτελεί μέρος των φυσιολογικών ομοιοστατικών μηχανισμών του κυττάρου. Τρεις είναι οι τύποι αυτοφαγίας, η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η ελεγχόμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς αυτοφαγία (Chaperone Mediated Autophagy, CMA) (Sridhar S, et al. 2012).

Η μακροαυτοφαγία, περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια:

- α) Την έναρξη, είτε στα πλαίσια των φυσιολογικών ομοιοστασιών μηχανισμών του κυττάρου είτε ως απάντηση σε κάποιο βλαπτικό ερέθισμα.
- β) Την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος, είναι μια μεμβρανώδης δομή η οποία περικλείει τα οργανίδια και πρωτεϊνικά μόρια προς καταστροφή.
- γ) Τον σχηματισμό του αυτολυσοσώματος, που αποτελείται από ένα αυτοφαγόσωμα που συντήκεται με ένα λυσόσωμα.
- δ) Την πέψη και αποδόμηση των περιεχομένων του αυτοφαγοσώματος από τα ένζυμα του λυσοσώματος και ανακύκλωση των καταστράμενων δομικών υλικών των οργανιδίων.

Ο έλεγχος της αυτοφαγίας γίνεται από την πρωτεΐνη – στόχος ραπαμυσίνης των θηλαστικών (mammalian target of rapamycin, mTOR), που λειτουργεί ως «ανιχνευτής στρες», καθώς σε βλαπτικά ερεθίσματα, η αναστολή της δράσης της είναι το πιο σημαντικό και κρίσιμο πρώτο βήμα για την έναρξη της αυτοφαγίας. Ακόμα ελέγχει την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος είναι τα σχετιζόμενα με την αυτοφαγία γονίδια (autophagy-related genes, ATGs). Υπάρχουν πειραματικές μελέτες σε ποντίκια με απενεργοποίηση αυτών των γονιδίων που συνδυάστηκε με γέννηση απογόνων με

φυσιολογικό φαινότυπο αλλά οδήγησε στο θάνατο την πρώτη ημέρα της ζωής. Στο μυοκάρδιο είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των κυτταρικών οργανιδίων. Σε παθολογικές συνθήκες, ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, καρδιακής ανεπάρκειας, έχει αποδειχθεί αύξηση της αυτοφαγικής δραστηριότητας, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό αποτελεί μέρος της διαδικασίας επούλωσης ή να συμμετέχει στη μυοκαρδιακή βλάβη. Μετά από υποξία ή βλάβη από ελεύθερες ρίζες, η απομάκρυνση δυσλειτουργικών οργανιδίων είναι απαραίτητη για την αποκατάσταση της κυτταρικής λειτουργίας και για αυτό η αυτοφαγία θεωρείται ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός επιβίωσης του κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες παρουσιάζουν ένα νέο τύπο κυτταρικού θανάτου, τον αυτοφαγικό θάνατο, που πιστεύεται ότι μαζί με τη νέκρωση και την απόπτωση, παίζει και αυτός σημαντικό ρόλο για στις βλάβες του μυοκαρδίου που δημιουργούνται κατά την ισχαιμία/επαναιμάτωση. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και μελέτες που κατέδειξαν τον προστατευτικό ρόλο της αυτοφαγίας στην ισχαιμία/επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Στην ισχαιμία, τα μειωμένα επίπεδα ATP επάγουν την ενεργοποιούμενη από μονοφοσφορική αδενοσίνη κινάση (Adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) που με τη σειρά της μέσω της οδού της mTOR ενεργοποιεί την αυτοφαγία. Το αυξημένο ενδοκυττάριο ασβέστιο, οι ελεύθερες ρίζες καθώς και το άνοιγμα των μιτοχονδριακών πόρων (MPTPs) προκαλούν την έναρξη της αυτοφαγίας (Gustafsson AB, et al. 2009).

Η απελευθέρωση αμινοξέων και ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά τον καταβολισμό, συμμετέχουν στην παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Η αναστολή της αυτοφαγίας μειώνει την παραγωγή ATP και επιδεινώνει την κυτταρική βλάβη μετά από στέρηση γλυκόζης. Η αυτοφαγία των μιτοχονδρίων (μιτοφαγία) προστατεύει από τις βλαπτικές επιδράσεις της συμμετοχής των μιτοχονδρίων στις διεργασίες της κυτταρικής νέκρωσης και απόπτωσης (Hoshino A, et al. 2012). Οι Hamacher-Brady et al. σε ένα *in vitro* έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου Beclin 1, (ελεγχεται από mTOR) και η αδρανοποίηση της αυτοφαγίας οδήγησαν σε αύξηση της απόπτωσης, ενώ αντίστροφα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην υπερέκφραση του Beclin 1. Σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικών όπου απενεργοποιήθηκε το γονιδίου STAT-1, παρουσιάστηκε αύξηση της αυτοφαγίας, σε μικρότερου μεγέθους εμφραγμάτων μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση.

Η χορήγηση 3-μεθυλαδενίνης, γνωστού αναστολέα της αυτοφαγίας, οδήγησε στην απώλεια αυτής της καρδιοπροστατευτικής δράσης (Mc Cormick J, et al.

2012). Σημαντικός είναι ο ρόλος της αυτοφαγίας και στα φαινόμενα του ischemic pre conditioning και post conditioning (Brown DI, et al. 2015) και ιδιαίτερα στην συμμετοχή της μιτοφαγίας (Huang C, et al. 2011). Η υπερβολική αυτοφαγική διαδικασία είναι πολύ πιθανό να δρα βλαπτικά για το κύτταρο, εάν υπάρχει μεγάλη καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων. Οι Valentim et al. έδειξαν ότι η αναστολή της αυτοφαγίας με 3-μεθυλαδενίνη ή απενεργοποίηση της έκφρασης του Beclin 1 συνδέθηκε με μειωμένο κυτταρικό θάνατο. Καθώς ότι υπάρχει και συνεργία μεταξύ των μοριακών οδών που ελέγχουν την αυτοφαγία και την απόπτωση. Η ενεργοποίηση μέσω του Beclin 1 έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl 2 και την υπερέκφραση του προ-αποπτωτικού Bnip 3. Εάν το βλαπτικό ερέθισμα της ισχαιμίας/επαναιμάτωσης είναι σχετικά μικρό, η αυτοφαγία έχει θετικά αποτελέσματα για το μυοκάρδιο, ενώ εάν το ερέθισμα είναι μεγάλο σε ένταση ή/και διάρκεια, η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας συμβάλλει στην αύξηση της μυοκαρδιακής βλάβης.

### **Ενδογενής φλεγμονώδης**

Είναι η απάντηση που παράγεται από αγγελιοφόρους που δε σχετίζονται με παθογόνα, αλλά συλλογικά αναφέρονται ως DAMPs. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται σαν «μοντέλου κινδύνου» (Matzinger P. 2002). Τα μόρια που λειτουργούν ως DAMPs μετά την επαναιμάτωση της καρδιάς περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heart shock proteins, HSPs), το high-mobility group box-1 (HMGB1) και θραύσματα φιμπρονεκτίνης. Αρκετές HSPs (όπως οι HSP20 και HSP70) έχουν προστατευτική δράση στην ισχαιμία του μυοκαρδίου και λειτουργούν ως πρωτεϊνικοί συνοδοί (chaperones) που προστατεύουν τις κυτταρικές πρωτεΐνες από τη διάταξη. Υπάρχουν όμως, in vivo πειραματικά μοντέλα που αμφισβητούν αυτή τη θεωρία (Yellon DM, et al.1992). Η HSP60, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση και αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (Li Y, et al. 2011). Το HMGB1, ένα μόριο που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των νουκλεϊκών οξέων και τη μεταγραφή των γονιδίων, είναι το καλύτερα μελετημένο παράδειγμα DAMP. Συμβάλλει στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω των υποδοχέων TLR2, TLR4, και TLR9 (Park JS, 2004; Tian J, et al. 2007). Στο μυοκάρδιο, το HMGB1 δρά ως επαγωγέας της φλεγμονώδους αντίδρασης και της ιστικής βλάβης μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση (Andrassy M, et al. 2008).

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μία κοινή αλληλουχία αμινοξέων που συναντιούνται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και σε παρεγχυματικά, όπως είναι τα μυοκαρδιακά. Περιγράφονται περίπου 10 TLRs σε ανθρώπινους ιστούς (Medzhitov R, et al. 1997). Στην αρχή περιγράφησαν ως υποδοχείς αναγνώρισης κοινών βιοχημικών «υπογραφών» των μικροβιακών παθογόνων (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), όπως λιποπολυσακχαρίτες (που αναγνωρίζονται από τον TLR4), πεπτιδογλυκάνες (από τον TLR1 και 2), λιποπρωτεΐνες (TLR2 και 6), ιικό RNA (TLR7 και 8), ολιγονουκλεοτίδια (TLR9) και την πρωτεΐνη φλαγγελίνη (TLR5) (Shizuo A, Hiroaki H 2003). Επίσης, οι TLRs συμμετέχουν σε πολλές παθοφυσιολογικές διεργασίες που δε σχετίζονται με παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθούν από τα μόρια DAMPs ως απάντηση σε ιστική βλάβη, με την ενδογενή απάντηση του ανοσοποιητικού μέσω της επαγωγής του παράγοντα NF-κB. Η πρόωμη ενεργοποίηση των TLRs στην ισχαιμία/επαναιμάτωση του μυοκαρδίου δρα προστατευτικά στο μυοκάρδιο, όπως έχουν δείξει πειραματικές μελέτες. Σε μελέτες στις οποίες οι TLRs αδρανοποιήθηκαν πλήρως μέσω αντισωμάτων ή γονιδιακών μεθόδων έδειξαν μειωμένο μέγεθος εμφράγματος (Arslan F et al. 2010).

## 1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ

Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιοπάθεια περιλαμβάνουν την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου φαρμακευτικά ή επεμβατικά. Η απόφραξη μπορεί να προληφθεί φαρμακολογικά ελέγχοντας τους παράγοντες κίνδυνου τροποποιώντας τον τρόπο ζωής και τους παράγοντες κινδύνου, ή εάν συμβεί απόφραξη, να αντιμετωπιστεί φαρμακολογικά με θρομβολυτικά, αγγειοδιασταλτικά, ινότροπους παράγοντες και σε πιο σοβαρές περιπτώσεις με επεμβατικές διαδικασίες, όπως πρωτοπαθή αγγειοπλαστική, αορτοστεφανιαία παράκαμψη, μηχανική υποστήριξη και μεταμόσχευση. Είναι πολύ γνωστό ότι η διάσωση του ισχαιμικού ιστού είναι πιο επιτυχής όταν οι παρεμβάσεις ξεκινούν το συντομότερο δυνατό μετά την απόφραξη των αγγείων, με αποτέλεσμα την αποκατάσταση της ροής του αίματος (επανάγχυση) στο προσβεβλημένο μυοκάρδιο. Ο τραυματισμός επαναπόχυσης είναι η κυτταρική βλάβη και δυσλειτουργία που συμβαίνει κατά την αποκατάσταση της ροής του αίματος και μπορεί ενδεχομένως να οδηγήσει σε θανατηφόρες αρρυθμίες ή / και στον θάνατο των κυττάρων που αποδυναμώθηκαν αλλά είναι δυναμικά λειτουργικά πριν από την αναρροή. Η ύπαρξη τραυματισμού από επαναιμάτωση μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, έχει κλινικές επιπτώσεις στην αποκατάσταση της καρδιακής λειτουργίας σε προισχαιμικά επίπεδα, ιδιαίτερα μετά από επεμβατικές διαδικασίες όπως η τοποθέτηση stent, χειρουργική επέμβαση στεφανιαίας παράκαμψης, στεφανιαία αγγειοπλαστική, μηχανική υποστήριξη, μεταμόσχευση καρδιάς.

Μετά από οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας εμφανίζεται ως μια προσαρμοστική διαδικασία με την οποία το μυοκάρδιο αλλάζει σχήμα, μέγεθος και λειτουργία ως απόκριση στο στρες. Αυτές οι επιβλαβείς προσαρμογές περιλαμβάνουν το σχηματισμό ουλώδους ιστού και ίνωσης σε ζώνες εμφράγματος μέσω του πολλαπλασιασμού των μυοϊνοβλαστών και της αυξημένης εναπόθεσης συστατικών εξωκυτταρικής μήτρας μαζί με παθολογική υπερτροφία. Αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν στην αύξηση της δυσκαμψίας του μυοκαρδίου, της συσταλτικής δυσλειτουργίας, της μειωμένης καρδιακής απόδοσης, της διαστολικής δυσλειτουργίας, της κοιλιακής μαρμαρυγής και της αριστερής κοιλιακής ανεπάρκειας που παρατηρούνται μετά το MI. Τελικά, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κοιλιακή διαστολή, καρδιακή ανεπάρκεια και ακόμη και ξαφνικό θάνατο. Εάν οι μηχανισμοί που υποκύπτουν σε τραυματισμό επανάγχυσης μπορεί να γίνουν κατανοητοί, μπορεί να

υπάρχει η πιθανότητα βελτίωσης της ανάκαμψης από αυτές τις διαδικασίες μέσω της εφαρμογής συγκεκριμένων παρεμβάσεων πριν ή κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης.

Αδιαμφισβήτητα η σύγχρονη αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (OEM) επικεντρώνεται στην όσο το δυνατόν ταχύτερη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν συνδράμει η αντιθρομβωτική φαρμακευτική αγωγή και οι τεχνικές επαναιμάτωσης, όπως η πρωτογενής αγγειοπλαστική (PPCI), η θρομβόλυση, αλλά και πιο πρόσφατα η διευκολυνόμενη (facilitated) και κυρίως η επικουρική (adjunctive) αγγειοπλαστική για το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST διαστήματος. Επίσης, η εφαρμογή τεχνικών της επεμβατικής καρδιολογίας έχει αποφασιστικό ρόλο στη διερεύνηση και αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος. Η χορήγηση πρόσθετων θεραπειών στοχεύει στη μείωση της εκτάσεως του εμφράγματος, την αποφυγή πρώιμων επιπλοκών αλλά και τη μείωση του κινδύνου για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα. Υπολογίζεται ότι 30 περίπου θάνατοι προλαμβάνονται ανά 1000 ασθενείς που υποβάλλονται σε θρομβόλυση για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, με τους 20 από αυτούς να αφορούν ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία μεταξύ 7 και 12 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων τους.

Η έγκαιρη επαναιμάτωση του εμφράγματος, μέσω κυρίως τη πρωτογενούς διαδερμικής στεφανιαίας παρέμβασης, είναι η θεραπεία επιλογής σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάσπαση διαστήματος ST (STEMI). Η παρέμβαση αυτή έχειδειχθεί ότι περιορίζει σημαντικά την έκταση της μυοκαρδιακής ιστικής βλάβης, διατηρεί τη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας και μειώνει την συχνότητα και σοβαρότητα της καρδιακής ανεπάρκειας (Keely et al, 2003). Ωστόσο, παρά τη σημαντική πρόοδο στο πεδίο της επεμβατικής καρδιολογίας, η θνησιμότητα των ασθενών STEMI παραμένει υψηλή, με την ενδονοσοκομειακή θνησιμότητα να φθάνει στο 5-6% και να αυξάνεται σε 7-18% στη διάρκεια ενός έτους.

Επιπλέον, η νοσηρότητα παραμένει σημαντική με περίπου το 5-6% των ασθενών να εκδηλώνουν ένα επακόλουθο καρδιαγγειακό επεισόδιο σε διάστημα 30 ημερών και περίπου 2,7% να χρειάζεται εκ νέου νοσηλεία σε διάστημα ενός έτους (Yellon et al. 2007). Είναι σήμερα καλά τεκμηριωμένη η άποψη ότι η τελική έκταση της ιστικής βλάβης του μυοκαρδίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την κινητοποίηση διαδικασιών αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου (cardiac remodeling),

που σχετίζονται στενά με την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της αναπτυσσόμενης καρδιακής ανεπάρκειας και του αριθμού των θανάτων.

Αν και η επαναιμάτωση του εμφράγματος είναι απαραίτητη για τη διάσωση του μυοκαρδίου, έρχεται ως αντίτιμο το γεγονός ότι η επαναιμάτωση από μόνη της και ανεξάρτητα από την ισχαιμία μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο μυοκάρδιο, ενισχύοντας τον ρυθμό και την έκταση απόπτωσης των καρδιακών κυττάρων - ένα φαινόμενο που ονομάζεται "μυοκαρδιακή βλάβη επαναιμάτωσης". Εκτιμάται ότι η βλάβη επαναιμάτωσης είναι υπεύθυνη για περίπου το 50% της τελικής έκτασης της ιστικής βλάβης του μυοκαρδίου (Yetgin et al. 2010).

Η Κυκλοσπορίνη A (CsA) απομονώθηκε το 1971 από τον μύκητα *Tolypocladium* σε ιατρική χρήση από το 1983.(Naesens M 2009). Χρησιμοποιείται σαν ανοσοκατασταλτικό φάρμακο, το οποίο χορηγείται σε μεταμοσχευθέντες ασθενείς. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται στην θεραπεία ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα όπως, ρευματοειδή αρθρίτιδα, ψωρίαση, νόσος του Crohn και νεφρωσικό σύνδρομο (Rodríguez,2016). Επιπλέον, χορηγείται με τη μορφή οφθαλμικών σταγόνων στην αντιμετώπιση της ξηράς κερατοεπιπεφυκίτιδας. Έχει ως μηχανισμό δράσης της τη μείωση της δραστηριότητας των T λεμφοκυττάρων και την ανοσολογική απόκρισή τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την σύνδεση της CsA με την κυκλοφιλίνη D. Το σύμπλοκο CsA/κυκλοφιλίνη D αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης της καλσινευρίνης, η οποία με τη σειρά της είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής που ρυθμίζουν την έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών (Matsuda and May,2000). Η CsA δεσμεύεται με την κυκλοφιλίνη D (ανοσοφιλίνη) των λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα των T κύτταρων και αναστέλλει τη μεταγραφή της ιντερλευκίνης-2. Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί έχει παρατηρηθεί υψηλή συγγένεια της κυκλοσπορίνης με τη CyP-A, που συμβάλλει στη ανοσοκαταστολή των μεταμοσχευθέντων ασθενών. Έτσι η συγγένεια αυτή οδήγησε σε μια σειρά πειραμάτων όπου και απεδείχθη η αναστολή των MPTP από την κυκλοσπορίνη. Το 2008, οι Piro και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι που δοκίμασαν την CsA ως θεραπευτική παρέμβαση σε ασθενείς με STEMI για την αναστολή των MPTPs στη θεραπεία της βλάβης επαναιμάτωσης. Τα αποτελέσματα αυτής της κλινικής μελέτης φάσης II έδειξαν μία σημαντική μείωση της έκτασης της ιστικής βλάβης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε μία μεγαλύτερη πολυκεντρική κλινική μελέτη φάσης III (CIRCUS, NCT01502774), στην οποία τέθηκαν κρισιμότερα καταληκτικά σημεία

(θνησιμότητα ασθενών, νοσοκομειακή νοσηλεία, καρδιακή ανεπάρκεια και βαθμός διατήρησης της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση CsA (2,5 mg/Kg βάρος σώματος) σε ασθενείς STEMI, πριν την επαναιμάτωση, δεν απέδειξε βελτίωση για κανένα από τα καταληκτικά σημεία της μελέτης, σε σχέση με την ομάδα των ασθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Η εξενατίδη είναι ένας μακράς δράσης αγωνιστής του GLP-1 υποδοχέας, που συμμετέχει στη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Αποτελείται από 39 αμινοξέα και έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα παγκρεατικά κύτταρα (Erdogluo 2013). Η εξενατίδη είναι η συνθετική μορφή της εξενδίνης-4, μιας ορμόνης που βρέθηκε στο σάλιο του Monster Gila και απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον John Eng MD το 1992. Εμφανίζει βιολογικές ιδιότητες παρόμοιες με το ανθρώπινο πεπτίδιο που προσομοιάζει τη γλυκαγόνη (glugagon-likepeptide 1, GLP-1), ένα ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης κατά την έκκριση της ινσουλίνης. Η εξενατίδη βελτιώνει τα επίπεδα της γλυκόζης προκαλώντας την έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα. Η εξενατίδη εγκρίθηκε από το FDA στις 28 Απριλίου του 2005 για υποδόρια χορήγηση σε ασθενείς των οποίων ο σακχαρώδης διαβήτης δεν ήταν καλά ελεγχόμενος με από του στόματος υπογλυκαιμικά φάρμακα. Σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της, η εξενατίδη πιστεύεται ότι διευκολύνει τον έλεγχο της γλυκόζης με τουλάχιστον τέσσερις τρόπους:

1. Αυξάνει την έκκριση της ινσουλίνης από το πάγκρεας, ως απάντηση στην κατανάλωση γευμάτων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η απελευθέρωση περισσότερο κατάλληλης ποσότητας ινσουλίνης, που βοηθά στη μείωση της αύξησης του σακχάρου στο αίμα. Η εξενατίδη καταστέλλει, επίσης, την παγκρεατική απελευθέρωση της γλυκαγόνης, σε απάντηση της πρόσληψης τροφής.
2. Βοηθά στο να επιβραδύνει τη γαστρική κένωση και έτσι μειώνει το ρυθμό με τον οποίο εμφανίζεται η γλυκόζη από τη πρόσληψη τροφής στο αίμα.
3. Έχει μια μικρή αλλά παρατεταμένη επίδραση στη μείωση της όρεξης, προάγοντας τον κορεσμό μέσω του υποθαλάμου. Γενικά η μεγαλύτερη απώλεια βάρους επιτυγχάνεται με τους ανθρώπους που είναι οι πιο υπέρβαροι κατά την έναρξη της θεραπείας με εξενατίδη.



4. Μειώνει την περιεκτικότητα λίπους στο ήπαρ. Η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ ή η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) συνδέεται άμεσα με διάφορες μεταβολικές διαταραχές, ιδιαίτερα της χαμηλής τιμής της HDL χοληστερόλης και των υψηλών τιμών των τριγλυκεριδίων.

Κατά την ισχαιμία του μυοκαρδίου, η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας δεδομένου ότι δεν απαιτείται οξυγόνο. Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι ο GLP-1 υποδοχέας ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση έναντι της βλάβης επαναιμάτωσης. Επιπλέον, οι Timmen και συνεργάτες έδειξαν σε χοίρους, ότι η εξενατίδη παρέχει σημαντική καρδιοπροστασία και βελτιώνει τη συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το άνοιγμα των MPTPs συνδέεται τόσο με την απόπτωση όσο και με τον κυτταρικό θάνατο. Πειραματικές μελέτες με την εξενατίδη έδειξαν ότι μπορεί να αναστέλλει το άνοιγμα των MPTPs, προκαλώντας με τον τρόπο αυτό καρδιοπροστατευτική δράση.

Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (protease-activated receptors- PARs) ανήκουν στην οικογένεια των συζευγμένων με G- πρωτεΐνες υποδοχέων και ενεργοποιούνται μετά από πρωτεόλυση του αμινο-τελικού τους άκρου. Ο PAR-1, το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας που ανακαλύφθηκε, ενεργοποιείται από πρωτεάσες της σερίνης και κυρίως την θρομβίνη. Αποτελείται από 425 αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν συνολικά επτά διαμεμβρανικές περιοχές.

Η πρωτεολυτική διάσπαση του ανθρώπινου PAR-1 από τη θρομβίνη πραγματοποιείται μεταξύ των αμινοξέων αργινίνη 41 (Arg41) και σερίνη 42 (Ser42). Αποτέλεσμα της διάσπασης αυτής είναι η αποκάλυψη ενός νέου αμινο-τελικού άκρου στον υποδοχέα και την απελευθέρωση ενός πεπτιδίου μήκους 41 αμινοξέων (Duncan 2009). Το νέο αμινο-τελικό άκρο μέσω της χαρακτηριστικής αλληλουχίας SFLLRN προσδένεται στην ειδικά συντηρημένη περιοχή της δεύτερης εξωκυττάριας αγκύλης του PAR-1 υποδοχέα, λειτουργώντας ως «προσδεμένος» αγωνιστής, πυροδοτώντας έναν καταρράκτη ενδοκυττάρια βιοχημικών αντιδράσεων (Tsoranoglou 2009).

Μέχρι σήμερα ο ρόλος της θρομβίνης και του PAR-1 υποδοχέα έχουν μελετηθεί εκτενώς (Tsoranoglou 2009). Αντιθέτως, λίγη προσοχή έχει δοθεί στη μελέτη του ρόλου του αποσπώμενου πεπτιδίου με τα 41 αμινοξέα, το οποίο προκύπτει ως "θραύσμα" από την ενεργοποίηση του PAR-1 υποδοχέα. Το πεπτίδιο αυτό σήμερα είναι γνωστό ως «παρστατίνη» (Zaniaetal, 2008).

Η παρστατίνη είναι ένα αμφιπαθές μόριο καθώς η αλληλουχία των αμινοξέων της προσδίδει στο πεπτίδιο λιπόφιλες καθώς και υδρόφιλες ιδιότητες. Η παρστατίνη έχει Μοριακό Βάρος 4468 Da και ως προς τις φυσικοχημικές της ιδιότητες έχει διαχωριστεί σε δύο θυγατρικά μόρια. Ένα υδρόφοβο που αποτελείται από τα αμινοξέα 1-23, όπου και συνιστά το κύριο μέρος της αλληλουχίας των αμινοξέων 1-26 του πεπτιδικού υπομορίου της PAR 1-126 και ένα υδρόφιλο, την PAR 24-41, που φέρει τα αμινοξέα 24-41. Πειράματα εξωγενούς χορήγησης της παρστατίνης αποδεικνύουν το σαφή εντοπισμό της στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και τη σταδιακή είσοδό της εντός του κυτταροπλάσματος. Φαίνεται ότι το υδρόφοβο τμήμα του μορίου ευοδώνει την κυτταροδιεισδυτική ικανότητα και τις κυτταρικές δράσεις της παρστατίνης. Αντίθετα, η εξάλειψη του λιπόφιλου τμήματος της παρστατίνης καθιστά το μόριο πλήρως λειτουργικά αναποτελεσματικό. Ωστόσο ερωτήματα σχετικά με τον επιμέρους μηχανισμό αλληλεπίδρασης της παρστατίνης με την κυτταρική μεμβράνη, την πιθανή ταυτοποίηση εμπλεκόμενων εξωκυττάρων υποδοχέων και το μηχανισμό ενδοκυτταρικής εισόδου του πεπτιδίου παραμένουν αδιευκρίνιστα (Zania, 2008).

Οι πρώτες μελέτες με το πεπτίδιο αυτό αποκάλυψαν μια ισχυρή αντι-αγγειογεννητική δράση, τόσο έναντι στη βασική αγγειογένεση όσο και στην αγγειογένεση που επάγονται από τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα των αγγείων (VEGF) και τον βασικό αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (bFGF). Η δράση της αυτή αποδείχθηκε σε *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου, καθώς και σε *ex vivo* μελέτες σε μοντέλο δακτυλίων αρτησίας αρουραίου (Zania, 2008).

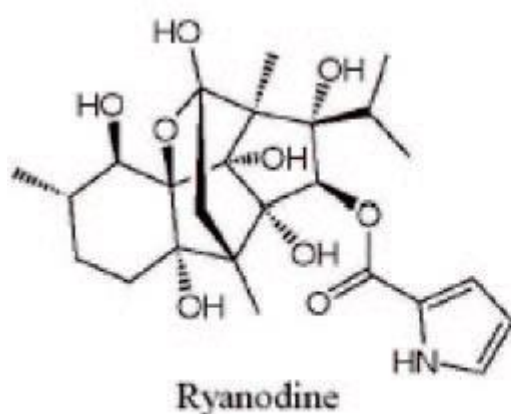
Επιπρόσθετα, σε *in vitro* μοντέλα αγγειογένεσης έχει δειχθεί ότι η παρστατίνη αναστέλλει τη μετανάστευση και την οργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε τριχοειδικούς αυλούς. Επίσης, η χορήγηση της παρστατίνης καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια σήματα κινασών (MAPK) και προάγοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης κασπασών (Zania, 2008). Μια επιπλέον ενδιαφέρουσα ιδιότητα της παρστατίνης αναδείχθηκε σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα μυοκαρδιακής βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, καθώς η παρστατίνη εμφάνισε καρδιοπροστατευτική δράση μετά από ενδοφλέβια χορήγησή της πριν ή μετά από την καρδιακή ισχαιμία καθώς και στα πρώτα 10 δευτερόλεπτα της επαναιμάτωσης.

Η καρδιοπροστασία της παρστατίνης αφορά τόσο τα καρδιομυοκύτταρα όσο και την στεφανιαία κυκλοφορία και φαίνεται να διεκπεραιώνεται μέσω ενός εξαρτώμενου από Gi πρωτεΐνης μονοπατιού, στο οποίο εμπλέκονται η p38 MAPK κινάση, οι κινάσες ERK1/2, η συνθάση του NO(NOS) και οι εξαρτώμενοι από ATP δίαυλοι καλίου. Επιπλέον, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η παρστατίνη ασκεί μια, ελεγχόμενη από το NO αγγειοδιασταλτική δράση, επιδρώντας στα καρδιομυοκύτταρα (Strade, 2009). Επιπλέον της επίδρασής της στη καρδιά, η παρστατίνη αποδείχθηκε ικανή στην προστασία των νεφρών από βλάβη εξ ισχαιμίας και επαναιμάτωσης (Kyriazis et al, 2010). Η ενδοφλέβια χορήγηση παρστατίνης πριν από την επαγωγή της ισχαιμίας και την πρόκληση νεφροπάθειας είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της νεφρικής δυσλειτουργίας, καθώς και των ιστολογικών βλαβών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ (RYRS)

### 2.1 RYRS

Οι υποδοχείς ρυανοδίνης (RyRs) ανακαλύφθηκαν ως πρωτεΐνες με θέσεις πρόσδεσης για το αλκαλοειδές ρυανοδίνη, το οποίο προέρχεται από το φυτό της Ν. Αμερικής *Ryania speciosa* (εικόνα 1), ένα γνωστό για την εντομοκτόνο δράση του. Σε συγκεντρώσεις  $\mu\text{M}$  η ρυανοδίνη “κλειδώνει” τον υποδοχέα σε μια μισάνοιχτη κατάσταση, προκαλώντας την αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$ , η οποία με τη σειρά της επάγει  $\text{Ca}^{2+}$ -επαγόμενη απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο, με συνέπεια τη μαζική μυϊκή σύσπαση και σπασμούς. Σε συγκεντρώσεις  $\text{mM}$  η ρυανοδίνη κλείνει τελείως το κανάλι οδηγώντας σε παράλυση. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ισομορφές των υποδοχέων ρυανοδίνης (RyR1–3). Ο υποδοχέας RyR1 είναι ο πρώτος που κλωνοποιήθηκε και εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μυς, ο RyR2 στην καρδιά και σε άλλους κυτταρικούς τύπους (εξωκρινή, επιθηλιακά κύτταρα κ.λπ.). Είναι υπεύθυνοι για την απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από το ενδοπλασματικό και σαρκοπλασματικό δίκτυο, μέσω της οποίας ελέγχουν πολλές  $\text{Ca}^{2+}$ -εξαρτώμενες διαδικασίες του κυττάρου. Είναι κυρίως γνωστοί για τη συμμετοχή τους στη σύνδεση διέγερσης-σύσπασης μέσω απελευθέρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Santonastasi et al. 2007).



*Ryania speciosa*

Εικόνα 1: *Ryania speciosa*

Οι RyRs είναι ετεροτετραμερή συμπλέγματα που αποτελούν το μεγαλύτερο γνωστό έως σήμερα κανάλι ιόντων, περίπου 2,2 MDa, με το κάθε μονομερές να αποτελείται από 5.000 αμινοξέα.

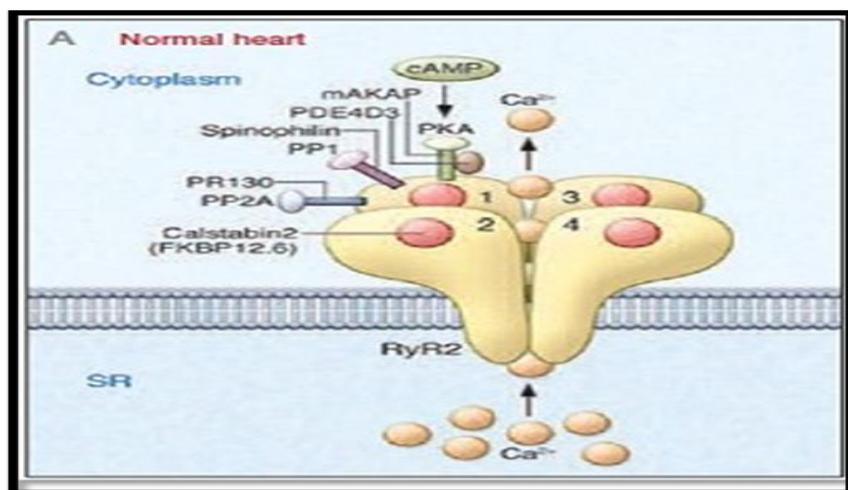
Το κάθε μονομερές αποτελείται από έξι διαμεμβρανικές περιοχές (S1-S6), τον χαρακτηριστικό P-βρόχο ανάμεσα στην S5 και την S6 περιοχή, καθώς και ένα τεράστιο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αποτελεί το 80% του καναλιού. Το NH<sub>2</sub>-άκρο περιέχει θέσεις σύνδεσης για τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες PP1 (οι οποίες συνδέονται μέσω της πρωτεΐνης σπινοφιλίνης) και PP2A, για την κινάση PKA (η οποία συνδέεται μέσω μιας mAΚAP, A-Kinase Anchoring Protein), για την καλμοδουλίνη και την FKBP (FK506 Binding Protein), η σύνδεση της οποίας έχει αρνητικό αποτέλεσμα στη λειτουργία του καναλιού. Το τεράστιο NH<sub>2</sub>-άκρο με τις ποικίλες θέσεις πρόσδεσης επιτρέπει τη λεπτή, αρνητική ή θετική, ρύθμιση του καναλιού από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, μικρών μορίων αλλά και μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων. Οι υποδοχείς RyR, όταν η συγκέντρωση του Ca<sup>2+</sup> μέσα στο ΣΔ είναι χαμηλή (1 mM), συνδέονται μέσω των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του ΣΔ junctin και tradin με την ανασταλτική Ca<sup>2+</sup>-buffering πρωτεΐνη καλσεκεστρίνη (calsequestrin), και παραμένουν κλειστά. Όταν η συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> αυξηθεί (10 mM) η καλσεκεστρίνη απομακρύνεται και τα κανάλια ανοίγουν (Goanzalez et al. 2007; Marx et al. 2000). Στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο περικλείονται τα ιόντα ασβεστίου, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενδοκυττάρια διεργασία της συστολής. Η λειτουργία του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου είναι κεφαλαιώδους σημασίας για το μυοκαρδιακό κύτταρο, καθώς διασφαλίζει την ομαλή εναλλαγή πολύ χαμηλών και πολύ υψηλών ενδοκυττάριας συγκεντρώσεων ελεύθερων ιόντων ασβεστίου. Κληρονομικές ή επίκτητες μεταβολές στη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών της μεμβράνης του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου, εκτρέποντας την ομαλή διακύμανση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Αυτός ο βασικός παθοφυσιολογικός μηχανισμός παρατηρείται σε πολλές καρδιακές παθήσεις, με κύρια την καρδιακή ανεπάρκεια. Οι παθήσεις αυτές συνδυάζονται με μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου κατά την συστολή, ή/και με αυξημένη συγκέντρωση κατά τη διαστολή. Ο διπλώνας αποτελεί μία λειτουργική μονάδα, αποτελούμενη από τους διαύλους ασβεστίου και τους υποδοχείς ρυανοδίνης που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση. Μέσω του εγκάρσιου σωληνώδους συστήματος της κυτταρικής μεμβράνης, παρέχεται ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου και του εξωκυττάριας χώρου. Με αυτό τον τρόπο, η μεταβολή του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης μεταβάλλει την λειτουργία των υποδοχέων που βρίσκονται στο σαρκοενδοπλασματικό δίκτυο, απελευθερώνοντας ασβέστιο στο εσωτερικό του κυττάρου. Η απελευθέρωση του

ασβεστίου κατά τη συστολή γίνεται κυρίως μέσω των υποδοχέων ρυανοδίνης, αλλά και μέσω των υποδοχέων 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης. Η επαναπρόσληψη του ασβεστίου κατά την διαστολή γίνεται μέσω της ΑΤΡάσης του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου. Οι υποδοχείς ρυανοδίνης βρίσκονται στις τελικές ακρολοφίες της μεμβράνης του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου, πολύ κοντά στους διαύλους ασβεστίου του εγκάρσιου σωληνώδους συστήματος της κυτταρικής μεμβράνης. Η συνύπαρξη των δύο πρωτεϊνών που ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο ασβέστιο σε κοντινή απόσταση, τους καθιστά πρακτικά μία λειτουργική μονάδα, που ονομάζεται διπλώνας. Οι τελικές ακρολοφίες της μεμβράνης του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου γειτνιάζουν επίσης με τις χασματικές συνάψεις, ευοδώνοντας την μετάδοση των ιοντικών μεταβολών μεταξύ των μυοκαρδιακών κυττάρων.

## 2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΡΥΑΝΟΔΙΝΗΣ

Ο κύριος επαγωγέας του ανοίγματος των καναλιών RyRs είναι το  $Ca^{2+}$ . Στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα η εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης οδηγεί στο άνοιγμα των τάση-εξαρτώμενων L-τύπου καναλιών  $Ca^{2+}$ ,  $CaV1.2$ , με αποτέλεσμα την είσοδο  $Ca^{2+}$  από τον εξωκυτταρικό χώρο. Στη συνέχεια, το  $Ca^{2+}$  συνδέεται απευθείας ή μέσω της καλμοδουλίνης στην  $NH_2$ -τελική περιοχή κάθε υπομονάδας του καναλιού RyR2, το οποίο εκφράζεται στα καρδιακά κύτταρα, ανοίγει το κανάλι και απελευθερώνεται  $Ca^{2+}$  από το ΣΔ στο κυτταρόπλασμα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο υποδοχέας RyR2 δρα ως ενισχυτής σήματος και η διαδικασία είναι γνωστή  $Ca^{2+}$ -επαγόμενη απελευθέρωση  $Ca^{2+}$ . Ωστόσο, όσο τα επίπεδα  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα αυξάνονται, το  $Ca^{2+}$  προκαλεί το κλείσιμο του καναλιού RyR2. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν πολλές θέσεις σύνδεσης για το  $Ca^{2+}$  με διαφορετικές συγγένειες και διαφορετικές κινητικές σύνδεσης. Παρότι το  $Ca^{2+}$  είναι ο κύριος προσδέτης που επάγει το άνοιγμα των καναλιών, δεν είναι απαραίτητο σε όλους τους τύπους των υποδοχέων της ρυανοδίνης. Στην περίπτωση του RyR1, ο οποίος εκφράζεται στους σκελετικούς μυς, υπάρχει μια φυσική σύνδεση ανάμεσα στο τάση-εξαρτώμενο L-τύπου κανάλι  $Ca^{2+}$ ,  $CaV1.1$  της πλασματικής μεμβράνης των T-σωληναρίων και του RyR1. Ο ενδοκυτταρικός βρόχος του  $CaV1.1$ , που συνδέει τις υπομονάδες II και III (II-III linker), αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα RyR1. Η αλλαγή του δυναμικού της πλασματικής μεμβράνης προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης στο κανάλι  $CaV1.1$ , η οποία συνεπιφέρει το άνοιγμα του RyR1, χωρίς να απαιτείται η σύνδεση του  $Ca^{2+}$ . Και στις δύο περιπτώσεις (σκελετικά ή καρδιακά μυϊκά κύτταρα), μετά τη σύσπαση που προκαλείται από την αύξηση του  $Ca^{2+}$ , επέρχεται χάλαση λόγω της άντλησης του  $Ca^{2+}$  πίσω στο ΣΔ, από την  $Ca^{2+}$ -ATPάση SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase). Οι υποδοχείς RyRs είναι, επίσης, ευαίσθητοι σε συνθήκες οξειδοαναγωγής, μπορούν να ενεργοποιηθούν, για παράδειγμα, έπειτα από S-νιτροσυλίωση, όταν η συγκέντρωση του NO αυξηθεί σημαντικά (Wehrens et al. 2006). Το μακρομοριακό σύμπλοκο (εικόνα 2) του καρδιακού τύπου υποδοχέα ρυανοδίνης (RyR2) αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες RyR2 (1-4 δείχνουν τα τέσσερα μονομερή). Κάθε υπομονάδα RyR2 δεσμεύει ένα μόριο καλσταβίνης 2 (επίσης γνωστό ως FKBP12.6 και πρωτεΐνη αγκύρωσης κινάσης μυών A (mAKAP), η οποία είναι η πρωτεΐνη στόχευσης για την καταλυτική και ρυθμιστική υπομονάδα πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και φωσφοδιεστεράση 4D3 (PDE4D3) πρωτεΐνη φωσφατάση 2A

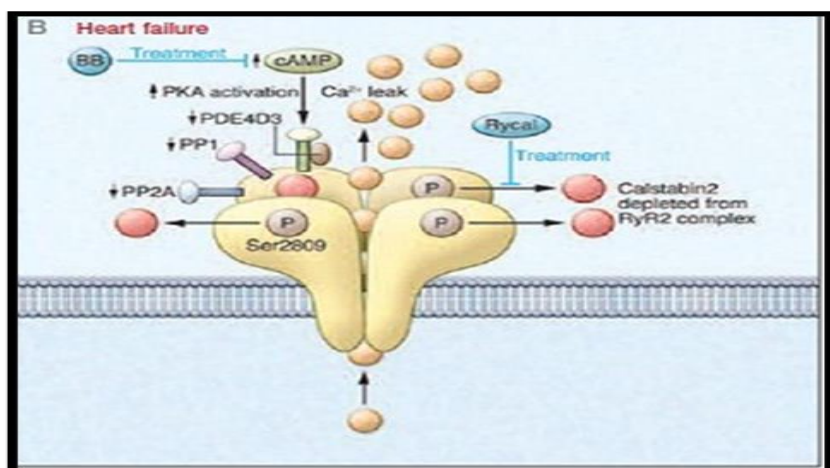
(PP2A) και η πρωτεΐνη στόχευσης PR130 και πρωτεΐνη φωσφατάση 1 (PP1) και η πρωτεΐνη στόχευσης της σφινοφιλίνης. Η οδός β-αδρενεργικής σηματοδότησης μπορεί να ενεργοποιήσει το PKA μέσω της δεύτερης αγγελιοφόρου κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) (Wehrens et al. 2006).



Εικόνα 2: Το μακρομοριακό σύμπλοκο του φυσιολογικού καρδιακού τύπου υποδοχέα της ρυανοδίνης.

Σε καρδιακή ανεπάρκεια (εικόνα 3) η υπερφωσφορυλίωση PKA του RyR2 στο Ser2809, λόγω μειωμένων επιπέδων PDE4D3, PP1 και PP2A στο μακρομοριακό σύμπλεγμα RyR2, εξαντλεί την καλσταβίνη 2 από το κανάλι RyR2. Αυτή η αναδιαμόρφωση του RyR2 που προκαλείται από το άγχος, προκαλεί διαρροή του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) από το σαρκοπλοασματικό δίκτυο λόγω μη φυσιολογικών ανοιγμάτων καναλιού RyR2, που μπορεί να προληφθεί με θεραπεία με β-αποκλειστές (BBs), οι οποίοι παρεμβαίνουν στους β-αδρενεργικούς υποδοχείς ( $\beta$ -AR) μονοπάτι σηματοδότησης, ή με Rycals, τα οποία επιλεκτικά αυξάνουν τη συγγένεια δέσμευσης της καλσταβίνης2 με PKA-φωσφορυλιωμένο, νιτροζυλιωμένο και οξειδωμένο RyR2.





Εικόνα 3: Το μακρομοριακό σύμπλοκο υποδοχέα της ρυανοδίνης στην καρδιακή ανεπάρκεια.

Ο υποδοχέας καρδιακής ρινοδίνης (RyR2) είναι ένα κανάλι απελευθέρωσης ομοτετραμερούς  $\text{Ca}^{2+}$  που βρίσκεται στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR). Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού καρδιακού κύκλου, η αποπόλωση της μεμβράνης του πλάσματος ξεκινά το άνοιγμα διαύλων  $\text{Ca}^{2+}$  τύπου L (LTCC), μέσω των οποίων το εξωκυτταρικό  $\text{Ca}^{2+}$  εισέρχεται στο κυτόπλασμα. Η εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  δρα ως σκανδάλη που στη συνέχεια ενεργοποιεί τα κανάλια RyR2, οδηγώντας σε δέκα φορές μεγαλύτερη απελευθέρωση του SR  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτόπλασμα. Κατά τη φάση της συστολής της καρδιάς, το αυξημένο κυτταροπλασματικό  $\text{Ca}^{2+}$  συνδέεται με την τροπονίνη-C, επιτρέποντας στην ακτίνη και τη μυοσίνη να αλληλοδιασπάρονται και να προκαλεί σαρκομερή μείωση, προκαλώντας έτσι συστολή του μυοκαρδίου. Η διαστολική χαλάρωση συμβαίνει όταν το κυτταροπλασματικό  $[\text{Ca}^{2+}]$  μειώνεται καθώς το  $\text{Ca}^{2+}$  εξωθείται μέσω του ανταλλάκτη  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX) ή αντλείται ενεργά πίσω στο SR μέσω του σαρκο / ενδοπλασματικού δικτύου  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Ταυτόχρονα, η χαλάρωση του μυοκαρδίου σχετίζεται άμεσα με τη διαστολική μείωση των επιπέδων  $\text{Ca}^{2+}$ . Έτσι, ο φυσιολογικός έλεγχος της απελευθέρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  από το SR είναι απαραίτητος για έγκαιρη συστολή και χαλάρωση κατά τη διάρκεια του καρδιακού κύκλου. Παθολογική «διαρροή» του  $\text{Ca}^{2+}$  κατά τη διάρκεια της διαστολής μπορεί να είναι επιβλαβής και να οδηγήσει σε καρδιακές αρρυθμίες (Xu et al. 1998; Wehrens et al. 2004).

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι η μη φυσιολογική μεσολαβούμενη από RyR2 απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από το SR μπορεί να οδηγήσει σε κολπικές και κοιλιακές αρρυθμίες που σχετίζονται με αιφνίδιο καρδιακό θάνατο. Αυξημένη SR  $Ca^{2+}$  απελευθέρωσης κατά τη διάρκεια της διαστολής μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση του  $Na^+ / Ca^{2+}$  -exchanger, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί ένα παροδικό ρεύμα προς τα μέσα που μπορεί να προκαλέσει μετά-αποπολώσεις και δυναμικά δράσης. Αυτές οι μετά-αποπολώσεις έχουν παρατηρηθεί σε ανθρώπους και έχουν συνδεθεί άμεσα με αρρυθμογένεση σε ζωικά μοντέλα αρρυθμιών (Wehrens et al. 2005)

Η γενετική ευαισθησία σε καρδιακές αρρυθμίες μπορεί να προκύψει απευθείας από γενετικές μεταλλάξεις στο RyR2, όπως σε ασθενείς με κατεχολαμινεργική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία (CPVT). Μεταλλάξεις σε άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τις υπομονάδες που σχηματίζουν πόρους εντός του μακρομοριακού συμπλόκου RyR2 έχουν επίσης αναφερθεί ότι παρέχουν γενετική ευαισθησία σε καρδιακές αρρυθμίες και/ή καρδιομυοπάθεια. Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν άμεσες ενδείξεις ότι μία διαταραχή στη λειτουργία RyR2 μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη καρδιακών αρρυθμιών.(George et al. 2003; Wehrens et al. 2004).

Επιπλέον, η επίκτητη δομική καρδιακή νόσος, για παράδειγμα καρδιακή ανεπάρκεια ή ισχαιμία του μυοκαρδίου, έχει αποδειχθεί ότι τροποποιεί τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του RyR2 μέσω νιτροζυλίωσης, οξειδωσης και φωσφορυλίωσης, η οποία θα μπορούσε επίσης να αυξήσει την ευαισθησία σε διαστολική απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  και αρρυθμίες. Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές εξαιρετικές κριτικές σχετικά με τις στρατηγικές τροποποίησης της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης για τη μείωση της ενεργοποίησης RyR2, θα περιορίσουμε το πεδίο αυτής της αναθεώρησης κυρίως σε φαρμακολογικές στρατηγικές για τη σταθεροποίηση του RyR2 άμεσα για τη μείωση του αρρυθμικού δυναμικού. (Witcher et al. 1991).

Επειδή το RyR2 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο κατά τη σύζευξη διέγερσης-συστολής, είναι σημαντικό οι αντιαρρυθμικές ενώσεις που στοχεύουν στο σύμπλεγμα καναλιών RyR2 να μην παρεμβαίνουν στη συστολική απελευθέρωση SR  $Ca^{2+}$ . Ταυτόχρονα, η αναστολή της διαστολικής απελευθέρωσης SR  $Ca^{2+}$  είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των ενώσεων που θα μπορούσαν να αποτρέψουν

αρρυθμίες. Η δραστηριότητα του RyR2 μπορεί να ρυθμιστεί από πολλές φυσικές και φαρμακολογικές ενώσεις, όπως αναλύονται αλλού με περισσότερες λεπτομέρειες. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να διαμορφώσουν το RyR2 με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης της πύλης διαύλου, της μετατόπισης καναλιού ιόντων, της σύνθεσης υπομονάδας RyR2 ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Dulhunty et al. 2007).

Οι υποδοχείς ρανοδίνης (RyRs) είναι τα μεγαλύτερα κανάλια ιόντων που είναι σήμερα γνωστά. Είναι πολύ μεγάλα (2,2 MDa)  $Ca^{2+}$  κανάλια που παίζουν βασικό ρόλο στη σύζευξη διέγερσης (EC). Τα RyRs υπάρχουν σε όλα τα ζώα. Τρία ισόμορφα RyR έχουν ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά: RyR1, RyR2 και RyR3. Το RyR1, το πιο μελετημένο από αυτά, εκφράζεται κυρίως σε σκελετικούς μυς. Το RyR2 εκφράζεται κυρίως στον καρδιακό μυ αλλά υπάρχει και στον λείο μυ και στον νευρικό ιστό. Το RyR3 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε μια ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένου του νευρικού συστήματος και του μυός του διαφράγματος. (Witcher et al. 1991; Yano et al. 2000).

Η ταυτότητα αλληλουχίας αμινοξέων μεταξύ των τριών ισόμορφων είναι 66%. Οι μεγαλύτερες διαφορές συγκεντρώνονται σε τρεις «αποκλίνουσες περιοχές», στις οποίες περιλαμβάνονται τα υπολείμματα 1342-1403, 1872-1923 και 4254-4631 (αρίθμηση RyR1). Τα πειράματα νοκ-άουτ ποντικού έδειξαν ότι τα RyR1 και RyR2 έχουν κρίσιμο ρόλο στη φυσιολογία και την ανάπτυξη: ποντίκια με έλλειψη RyR1 πέθαναν λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας, ενώ εκείνα που δεν είχαν RyR2 πέθαναν κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Ποντίκια που δεν είχαν την ισόμορφη RyR3 ήταν βιώσιμα αλλά παρουσίασαν μειωμένη κοινωνική συμπεριφορά. Δομικά, τα RyRs είναι ομοτετραμερή, με κάθε υπομονάδα να έχει περίπου 5000 αμινοξέα. Βρίσκονται συχνότερα ενσωματωμένα στη μεμβράνη του σαρκοπλασματικού δικτύου (SR) της ραβδωτής των μυϊκών κυττάρων σε τριπλούς κόμβους τ-σωληναρίων. Σε αυτές τις συνδέσεις, βρίσκονται δίπλα στον τύπο L διαύλους ασβεστίου με τάση, που ονομάζονται επίσης υποδοχείς 1,4-διυδροξυπυριδίνης (LCC ή DHPRs). Τα DHPRs αποτελούνται από πέντε υπομονάδες, αν και μόνο δύο περιοχές είναι απαραίτητες για τη διέγερση-συστολή σύζευξη: ο βρόχος II – III της  $\alpha 1S$  υπομονάδας και η Ο-τερματική ουρά της  $\beta 1\alpha$  υπομονάδας.

Η σύζευξη EC αναφέρεται στη στενή αλληλεπίδραση μεταξύ DHPR και RyRs στην οποία η αποπόλωση της μεμβράνης SR συνδέεται με το άνοιγμα των RyRs.

Έχουν περιγραφεί δύο ξεχωριστοί μηχανισμοί με τους οποίους ενεργοποιείται το άνοιγμα RyR και το  $Ca^{2+}$  απελευθερώνεται στο κυτόπλασμα από το SR. Στα καρδιομυοκύτταρα, κατά τη διάρκεια της αποπόλωσης της μεμβράνης, τα DHPR ανοίγουν, επιτρέποντας μικρές ποσότητες  $Ca^{2+}$  να περάσουν από τον εξωκυτταρικό χώρο στο κυτταρόπλασμα των μυοκυττάρων. Αυτά τα ιόντα  $Ca^{2+}$  στη συνέχεια συνδέονται με τοποθεσίες υψηλής συγγένειας στο RyR, ενεργοποιώντας το έτσι και αυξάνοντας την πιθανότητα να ανοίξει. Το άνοιγμα RyR απελευθερώνει το  $Ca^{2+}$  που είναι αποθηκευμένο στο SR στο κυτόπλασμα. Αυτά τα ιόντα στη συνέχεια συνδέονται με την τροπονίνη C στα μυόφιλα, προκαλώντας έτσι μυϊκή συστολή. Η διαδικασία με την οποία τα ιόντα  $Ca^{2+}$  δεσμεύουν το RyR, προκαλώντας το άνοιγμα και την απελευθέρωση του επιπρόσθετου ασβεστίου, ονομάζεται απελευθέρωση ασβεστίου που προκαλείται από το ασβέστιο. Ο μηχανισμός αυτός και οι πολλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί έχουν μελετηθεί εκτενώς σχετικά με τα φυσιολογικά, μοριακά και βιοφυσικά επίπεδα. Στους σκελετικούς μύες, τα RyR συνδέονται άμεσα με DHPRs. Σε αυτήν την περίπτωση, δύο συστατικά του DHPR αλληλεπιδρούν με το RyR1 ως απόκριση στην αποπόλωση της επιφανειακής μεμβράνης. Η ευαισθησία του DHPR στις μεταβολές τάσης στη μεμβράνη του πλάσματος έχει ως αποτέλεσμα μια αλλαγή διαμόρφωσης που ανιχνεύεται από το RyR1 (Repress et al. 2012; Rodriguez et al. 2003).

### 2.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΤΩΝ RYRS

Πολλά άρθρα έχουν αναθεωρήσει τη βασική φαρμακολογία του RyR και ενώ αυτά ήταν χρήσιμα, απαριθμώντας τις μυριάδες ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του καναλιού (που κυμαίνεται από την ονομαστική ρυανοδίνη έως τους αλογονωμένους υδρογονάνθρακες και τα παράγωγα καρβαλίνης) κανένα δεν έχει προσεγγίσει το θέμα με σκοπό να εξηγήσει πώς αυτοί οι (ant) αγωνιστές έχουν χρησιμοποιηθεί ως χρήσιμα εργαλεία για την αποσαφήνιση ενδείξεων για τη λειτουργία καναλιού λόγω των επιδράσεών τους στην απελευθέρωση  $Ca^{2+}$ . Ενώ το RyR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του  $Ca^{2+}$  σε πολλούς τύπους κυττάρων, η σημασία του στον ραβδωτό μυ έχει διερευνηθεί έντονα και αντλούμε το μεγαλύτερο μέρος των πληροφοριών μας από μελέτες σε αυτούς τους ιστούς.

#### **Εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τον αποκλεισμό του RyR και αποτροπή απελευθέρωσης SR / ER $Ca^{2+}$ .**

Το Ryanodine είναι ένα αλκαλοειδές που παράγεται στο στέλεχος και τις ρίζες του θάμνου *Ryania speciosa* Vahl. Στα σπονδυλωτά ξεκινά σε σκελετικούς μυς και σε χαλαρή παράλυση στον καρδιακό μυ. Η θέση δράσης της ρυανοδίνης στον ενδοκυτταρικό χειρισμό  $Ca^{2+}$  αποδείχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 όταν εφαρμόστηκε σε απομονωμένα κυστίδια μεμβράνης SR με σκελετικό και καρδιακό μυ. Και στα δύο συστήματα, η ρυανοδίνη αποδείχτηκε ότι παράγει, ανάλογα με τη συγκέντρωση, αύξηση (0,01-10  $\mu M$ ) ή μείωση (πάνω από 10  $\mu M$ ) στην παθητική απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από αυτά τα κυστίδια. Αυτοί οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ρυανοδίνη θα μπορούσε, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, είτε να αυξάνει είτε να μειώνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης SR τροποποιώντας τη λειτουργία ενός καναλιού απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$ . Τα παράλληλα πειράματα δέσμευσης [ $^3H$ ] -αριανοδίνης ταυτοποίησαν τόσο τις θέσεις σύνδεσης υψηλής (KD 1-10 nM) όσο και τις χαμηλές (KD 1-10  $\mu M$ ) και πρότειναν ότι το RyR ήταν το κανάλι απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$ . Αυτό επιβεβαιώθηκε από την επίδειξη ότι το RyR λειτουργεί ως κατιόν-επιλεκτικό, υψηλής αγωγιμότητας, ευαίσθητο στο κανάλι της ρυανοδίνης. Ωστόσο, όπως τονίστηκε παραπάνω, φαίνεται ότι η λειτουργική συνέπεια της αλληλεπίδρασης της ρυανοδίνης με τον υποδοχέα της εξαρτάται από τη συγκέντρωση προσδέματος και οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζονται αυτές οι

ενέργειες, οι οποίοι εξαρτώνται από τη συγκέντρωση, αποκαλύφθηκαν μόνο όταν οι δράσεις της ρυανοδίνης ερευνήθηκαν σε πειράματα ενός καναλιού (Repress et al. 2012).

Οι λειτουργικές ιδιότητες των μεμονωμένων καναλιών RyR μπορούν να μελετηθούν μετά την ενσωμάτωση είτε απομονωμένων κυστιδίων μεμβράνης είτε κεκαθαμένων πρωτεϊνών διαύλου σε επίπεδες διπλό στιβάδες φωσφολιπιδίων. Μόλις βρεθεί στη διπλή στιβάδα, τόσο οι ιδιότητες πύλης όσο και ιόντων χειρισμού του RyR μπορούν να χαρακτηριστούν υπό συνθήκες σφικτήρα τάσης και η εφαρμογή ρυανοδίνης στα κανάλια υπό αυτές τις συνθήκες αποκάλυψε σημαντικές λεπτομέρειες των μηχανισμών στις οποίες βασίζεται η δράση της σε απομονωμένα κυστίδια SR και σε ιστούς. Το RyR ενσωματώνεται σε διπλές στιβάδες με σταθερό προσανατολισμό, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο ορισμός των κυτοσολικών και αυλών του καναλιού. Η προσθήκη ρυανοδίνης στην κυτοσολική πλευρά του καναλιού RyR έχει αναφερθεί ότι προκαλεί τρεις εξαρτώμενες από τη συγκέντρωση συνέπειες. Έχει προταθεί ότι οι χαμηλές νανογραμμομοριακές συγκεντρώσεις ρυανοδίνης μπορούν να διεγείρουν μια αύξηση στην ανοιχτή πιθανότητα ( $P_o$ ) του RyR (Wehrens et al. 2005).

Η πιο χαρακτηριστική παρατήρηση μετά την προσθήκη υψηλών νανογραμμομοριακών ή μικρομοριακών συγκεντρώσεων ρυανοδίνης σε μεμονωμένα κανάλια RyR είναι ότι ο συνδέτης δεν έχει άμεση επίδραση στη λειτουργία του καναλιού. Η μεταβλητή καθυστέρηση μεταξύ της προσθήκης και της δράσης της ρυανοδίνης αντικατοπτρίζει τον αργό ρυθμό συσχέτισης της ρυανοδίνης με τη θέση σύνδεσης της στην πρωτεΐνη του καναλιού. Όταν η ρυανοδίνη δεσμεύεται τελικά, παράγει δραματικά αποτελέσματα τόσο στην πύλη όσο και στις ιδιότητες χειρισμού ιόντων του καναλιού. Το  $P_o$  είναι αυξημένο (συνήθως σε τιμή που πλησιάζει το 1,0), ενώ οι ρυθμοί μετατόπισης ιόντων μέσω του καναλιού μειώνονται. Η κλασματική αγωγιμότητα (FC) της τροποποιημένης κατάστασης της ρυανοδίνης (η ενιαία αγωγιμότητα με τη δεσμευμένη με ρυανοδίνη εκφραζόμενη ως αναλογία της αγωγιμότητας απουσία της ρυανοδίνης) ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του κατιόντος φορτίου και τόσο τα στερεοφωνικά όσο και τα ηλεκτροστατικά χαρακτηριστικά του δεσμευμένου προσδέματος.

Η αξιοσημείωτη αύξηση του  $P_o$  υπερτερεί κατά πολύ των μειωμένων ρυθμών κίνησης ιόντων μέσω του ανοικτού καναλιού, έτσι ώστε συνολικά η συνέπεια αυτής

της μορφής αλληλεπίδρασης ρυανοδίνης θα ήταν η αύξηση του ρυθμού μετατόπισης ιόντων μέσω του καναλιού.

Ο ρυθμός αποσύνδεσης της δεσμευμένης ρυανοδίνης από ένα μόνο κανάλι είναι πολύ αργός, έτσι ώστε το κανάλι να παραμείνει στην τροποποιημένη κατάσταση μετά την αφαίρεση όλης της μη δεσμευμένης ρυανοδίνης και θα παραμείνει σε αυτήν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αυτός ο πολύ αργός ρυθμός διαχωρισμού είναι απολύτως συνεπής με τους ρυθμούς διαχωρισμού της  $[^3\text{H}]$ -αριανοδίνης από πληθυσμούς απομονωμένων κυστιδίων SR των σκελετικών μυών.

Υψηλές συγκεντρώσεις ρυανοδίνης (υψηλή μικρομοριακή και άνω) προκαλούν επίσης την εμφάνιση της υψηλής  $P_{50}$ , μειωμένης αγωγιμότητας, τροποποιημένης κατάστασης που περιγράφεται παραπάνω. Ωστόσο, με τη συνεχιζόμενη παρουσία της ρυανοδίνης το κανάλι κλείνει και δεν επιστρέφει είτε στην κατάσταση τροποποιημένης ρυανοδίνης είτε στην κανονική πύλη διαύλου εντός του χρονικού πλαισίου ενός πειράματος ενός καναλιού (Fruen et al. 1997).

Γενικά, αναφέρεται ότι η ρυανοδίνη χρησιμοποιείται για να «μπλοκάρει» την απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από το ER ή το SR αυτών των κυττάρων. Ωστόσο, δεδομένου του πολύ ευρέος φάσματος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μελέτες (για παράδειγμα, οι αντιπροσωπευτικές έρευνες που αναφέρονται παραπάνω έχουν χρησιμοποιήσει προστιθέμενες συγκεντρώσεις ρυανοδίνης που κυμαίνονται από 100 nM έως 1 mM), ο ακριβής μηχανισμός δράσης μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για να χαρακτηριστούν οι ενδοκυτταρικές δράσεις της ρυανοδίνης που προστίθενται στο εξωτερικό του κυττάρου. Οι Hansford & Lakatta (1987) παρακολούθησαν τις αλλαγές στο κυτταροπλασματικό  $\text{Ca}^{2+}$  σε απομονωμένα καρδιακά μυοκύτταρα μετά την προσθήκη 10 nM σε 1  $\mu\text{M}$  εξωκυτταρικής ρυανοδίνης. Παρατήρησαν μια συγκέντρωση και εξαρτώμενη από τον χρόνο αύξηση στο κυτταροπλασματικό  $\text{Ca}^{2+}$  και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δράση της ρυανοδίνης ήταν η απελευθέρωση του αποθηκευμένου SR  $\text{Ca}^{2+}$ . Επιπλέον, πρότειναν ότι η μεταβολή της λειτουργίας των μυοκυττάρων που προκαλείται από τη ρυανοδίνη ήταν η συνέπεια της εξάντλησης του SR  $\text{Ca}^{2+}$  φορτίου.

## **B. Εργαλεία που χρησιμοποιούνται για το άνοιγμα του RyR και την εκκίνηση του SR / ER Ca<sup>2+</sup> + Release**

Η καφεΐνη είναι μια φυσική μεθυλοξανθίνη φυτών. Αν και δεν είναι τόσο επιλεκτική όσο η ρυανοδίνη, η καφεΐνη χρησιμοποιείται ευρέως ως φαρμακολογικό εργαλείο για την αύξηση των καναλιών Po of RyR και έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας Ca<sup>2+</sup> των οργανικών οργάνων αποθήκευσης μεμβράνης ενδοκυτταρίνης όπως το SR των άθικτων καρδιακών μυϊκών κυττάρων. Η ικανότητα της καφεΐνης να διεγείρει την απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από SR μυών είναι γνωστή για πάνω από 30 χρόνια και η θέση δράσης της έχει καθιερωθεί ως RyR παρακολουθώντας τις δράσεις της σε μεμονωμένα κανάλια RyR και από SR σκελετικών και καρδιακών μυών. Σε αντίθεση με τη ρυανοδίνη, η μεταβολή στην πύλη RyR που παράγεται από την καφεΐνη δε σχετίζεται με αλλαγή στην αγωγιμότητα ενός καναλιού. (Szantesi et al. 2001). Οι αρχικές έρευνες των μηχανισμών στις οποίες βασίζεται η αύξηση που προκαλείται από την καφεΐνη στον καρδιακό μυ RyR Po έδειξαν ότι συγκεντρώσεις κάτω των 2,0 mM ευαισθητοποίησαν το κανάλι σε κυτοσολικό Ca<sup>2+</sup>. Με την παρουσία συγκεντρώσεων ενεργοποίησης κυτοσολικού Ca<sup>2+</sup> (0,1-10 μM), οι συγκεντρώσεις καφεΐνης αυξάνουν το Po αυξάνοντας τη συχνότητα των ανοιγμάτων των καναλιών χωρίς να μεταβάλουν σημαντικά τους χρόνους ανοίγματος. Αυτές οι συγκεντρώσεις καφεΐνης ήταν αναποτελεσματικές κατά την απενεργοποίηση των συγκεντρώσεων του κυτοσολικού Ca<sup>2+</sup>. Ωστόσο, το κανάλι θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί σε αυτές τις συνθήκες αδρανοποίησης από υψηλότερες συγκεντρώσεις καφεΐνης (> 5,0 mM) (Zhao et al. 2001).



## 2.4 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ RyR

Η εύρεση θεραπειών για ασθένειες που σχετίζονται με το RyR είναι ένας συνεχώς μεταβαλλόμενος τομέας έρευνας. Προς το παρόν, η κακοήθης υπερθερμία φαίνεται να είναι η μόνη πάθηση που σχετίζεται με το RyR και μπορεί να αντιμετωπιστεί τέλεια από ένα φάρμακο που φαίνεται να έχει άμεση δράση στο ίδιο το κανάλι για όλα τα άλλα διάφορα φαρμακολογικά φάρμακα που βρίσκονται σε εξέλιξη. Για παράδειγμα, η κατεχολαμινεργική πολύμορφη κοιλιακή ταχυκαρδία, (CPVT) αντιμετωπίζεται με β-αποκλειστές, οι οποίοι λόγω της δράσης τους στη μείωση των επιδράσεων στην αδρενεργική κίνηση υπό πίεση / άσκηση μειώνουν το αρρυθμογόνο φορτίο στους ασθενείς. Ωστόσο, δεν είναι αποτελεσματικές σε όλες τις περιπτώσεις όπου υπάρχει επίμονη επανεμφάνιση ταχυαρρυθμιών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η συμπαθητική χαλάρωση έχει προταθεί ως εναλλακτική λύση. Ωστόσο, αυτές οι στρατηγικές είναι επεμβατικές και επιφέρουν τεράστια επίπτωση στο κόστος και ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη για ανάπτυξη καλύτερης φαρμακευτικής θεραπείας στην CPVT. Δεν προκαλεί έκπληξη, που μερικά από αυτά έχουν εμπλακεί περαιτέρω ως χρήσιμα στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας (Heart Failure HF), καθώς παρόμοιοι μηχανισμοί δυσλειτουργίας RyR2 μπορεί να λειτουργούν. Ωστόσο, στην HF που θεωρείται μια πιο περίπλοκη ασθένεια, οι αναδυόμενες θεραπείες τείνουν να στοχεύουν στον έλεγχο των κινασών που μπορεί να επηρεάσουν το RyR2, αντικατοπτρίζοντας την πολύπλευρη φύση της δυσρύθμισης σε αυτή την κατάσταση. Έχουν, λοιπόν, αναπτυχθεί φαρμακευτικές ουσίες που δρουν στην αντιμετώπιση της δυσλειτουργίας των υποδοχέων RyR. Το K201, γνωστό ως JTV519 κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών, ή αλλιώς ως μονοϋδροχλωρική 4- [3- (4βενζυλπιπεριδιν-1-υλ) προπιονυλ] -7- μεθοξυ-2,3,4,5-τετραϋδρο-1,4-βενζοθειαζεπίνη, είναι παράγωγο 1,4-βενζοθειαζεπίνης, που είναι γνωστό ότι είναι ένας ανασταλτικός αποκλειστής διαύλων ιόντων. Φαίνεται ότι ο μη ειδικός χαρακτήρας της δράσης αυτού του φαρμάκου ήταν το κλειδί για την αποτελεσματικότητά του στην πρόληψη της εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου (Loughrey et al. 2007). Ωστόσο, είναι επίσης γνωστό ότι στοχεύει το RyR2, και κάπως αμφιλεγόμενα, το μακρομοριακό σύμπλοκο αυτού του ενδοκυτταρικού καναλιού ιόντων.

Το S107 (μερικές φορές γνωστό ως Rycal ή 2,3,4,5-τετραϋδρο-7-μεθοξυ-4-μεθυλο-1,4-βενζοθειαζεπίνη) είναι ένα παράγωγο του K201, που πιστεύεται ότι στοχεύει ειδικότερα στο RyR. Εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία ως

φάρμακο με επίδραση στο RyR1, για να βοηθήσει στην αύξηση της ικανότητας άσκησης. Η μειωμένη ικανότητα άσκησης συσχετίστηκε με το αποτέλεσμα της αποσύνδεσης του FKBP12 από το κανάλι με φαινομενικά αποτέλεσμα διάρροής και η δράση του S107 ήταν να αποκαταστήσει αυτή την αλληλεπίδραση (Hunt et al., 2007). Το δαντρολένιο (dantrolene) (1 - ([5- (4-νιτροφαινυλ) -2-φουρυλ] μεθυλιδεναμινο) ιμιδαζολιδιν-2,4-διόνη άλας νατρίου) είναι ένα γνωστό μυοχαλαρωτικό που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κακοήθους υπερθερμίας (malignant hyperthermia MH), τα συμπτώματα των οποίων πιστεύεται ότι συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της υπερβολικής κινητοποίησης  $Ca^{2+}$  από το SR και μπορεί να είναι θανατηφόρα εκτός εάν αντιμετωπιστεί με αυτό το φάρμακο.

Η κακοήθης υπερπυρεξία (KY) είναι φαρμακογενετική διαταραχή, η οποία ενεργοποιείται από πτητικά αναισθητικά και σουκκινυλοχολίνη (SCh) και εξελίσσεται σε δυνητικά θανατηφόρο υπερμεταβολικό σύνδρομο διαταραχής της ομοιόστασης του ασβεστίου των σκελετικών μυών. Εκτιμάται ως σπάνια, αλλά σοβαρή επιπλοκή. Η άμεση σχέση με την αναισθησία και η μεγάλη θνητότητα και νοσηρότητα συνιστούν σοβαρότατους λόγους ευαισθητοποίησης και ετοιμότητας εκ μέρους του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού κάθε αναισθησιολογικού τμήματος. Από πολύ νωρίς έγινε αντιληπτό ότι «το βασικό μάθημα που ελήφθη από την πρώτη περίπτωση ασθενούς με KY που διασώθηκε (1960, από τον Denborough M.) είναι ότι η επιβίωση από την κρίση KY εξαρτάται πάρα πολύ από την έγκαιρη αναγνώριση και την άμεση δράση». Η βασική παθολογική διαταραχή, σύμφωνα με πειραματικές μελέτες σε χοίρους και *in vitro* μελέτες σε ανθρώπινους μυς, εντοπίζεται στην ανεξέλεγκτη απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) εντός του σαρκοπλάσματος. Η αύξηση αυτή οδηγεί σε παρατεταμένη σύσπαση των μυϊκών ινιδίων, υπερμεταβολική κατάσταση και απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας. Ειδικότερα το  $Ca^{2+}$  είναι απαραίτητο ιόν για την πραγματοποίηση της μυϊκής σύσπασης. Αποθηκεύεται εντός του σαρκοπλασματικού δικτύου του μυϊκού κυττάρου και όταν εκλύεται το δυναμικό ενέργειας με σκοπό τη μυϊκή σύσπαση, προκαλείται απελευθέρωση των  $Ca^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο εσωτερικό του μυϊκού κυττάρου, το σαρκόπλασμα. Η έξοδος προς το σαρκόπλασμα γίνεται μέσω των υποδοχέων της ρυανοδίνης (RyRs). Πρόκειται για ενδοκυττάριους διαύλους ασβεστίου της μεμβράνης του σαρκοπλασματικού δικτύου, που συνιστούν τον κύριο μηχανισμό διακίνησης των  $Ca^{2+}$  εντός του μυϊκού κυττάρου. Η μοριακή βάση της υπερβολικής απελευθέρωσης

Ca<sup>2+</sup> στους σκελετικούς μυς είναι, κύρια, η μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ρυανοδίνης τύπου 1 (RyR1). Για 30 σημειακές μεταλλάξεις υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία ότι ευθύνονται για την ευαισθησία εκδήλωσης ΚΥ στον άνθρωπο. Μεταλλάξεις έχουν επίσης διαπιστωθεί σε ασθενείς ύποπτους για ΚΥ σε υποδοχέα που συνεργάζεται με τον RyR: στην α1-υπομονάδα του υποδοχέα της διυδροπυριδίνης (δυναμικο-εξαρτώμενος διάυλος ασβεστίου στην επιφάνεια του μυϊκού κυττάρου, DHPR, L-type Ca<sup>2+</sup> channel), κωδικοποιούμενης από το CACNA1S. Το δαντρολένιο (Dantrium IV) είναι η μόνη, προς το παρόν, ευρέως αποδεκτή ειδική αγωγή για την ΚΥ. Αναστέλλει την ενδοκυττάρια απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Είναι στείρο μικροβίων, συσκευασμένο σε φιαλίδια των 70ml που περιέχουν 20mg dantrolene sodium, 3000mg mannitol και αρκετό sodium hydroxide, με pH 9.5 και διαλύεται με 60ml Water for Injection (WFI). Χρειάζονται αποθέματα 36 φιαλιδίων, γιατί σε ένα μέσο ενήλικα η μέγιστη δόση δαντρολενίου είναι (10mg/Kg x 70Kg ΒΣ) 700mg. Είναι προτιμότερο να χορηγείται από φλεβική οδό μεγάλου εύρους (κίνδυνος φλεβίτιδας – επιπλοκή ελάσσονος σημασίας όταν απειλείται η ζωή του ασθενούς). Συνυπάρχει διαθέσιμο στο χώρο WFI στείρο μικροβίων, χωρίς βακτηριοστατικά, για τη διάλυση του δαντρολενίου: 60ml/φιαλίδιο (δεν χρησιμοποιείται άλλος διαλύτης). Το δαντρολένιο αποθηκεύεται στο χώρο του χειρουργείου, σε θέση γνωστή σε όλους, με στόχο την άμεση διάθεση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Πρέπει να είναι διαθέσιμο εντός 10min από τη στιγμή της λήψης της απόφασης αντιμετώπισης ΚΥ. Χορήγηση αρχικής δόσης δαντρολενίου 2,5mg/kg ενδοφλεβίως (1mg/kg σε παιδιά < 20 kg) και επόμενων δόσεων ανάλογα με τις ανάγκες, έως ότου μειωθεί η θερμοκρασία του ασθενή και σταθεροποιηθεί το καρδιοαναπνευστικό του σύστημα. Μέγιστη δόση τα 10mg/kg. Εάν δόση μεγαλύτερη από 20mg/kg ΒΣ δεν είναι επιτυχής, η διάγνωση της ΚΥ θα πρέπει να επανεξεταστεί. Μετά τη σταθεροποίηση, το δαντρολένιο συνεχίζεται για τουλάχιστον 36 ώρες, (1mg/kg/6h IV bolus ή σε συνεχή έγχυση) καθώς έχει αναφερθεί υποτροπή της ΚΥ σε ποσοστό έως 25% των περιπτώσεων εντός 48 ωρών από το επεισόδιο. Το Dantrolene έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπει τη διαρροή SR Ca<sup>2+</sup> και πιστεύεται ευρέως ότι το κάνει με άμεσο αποτέλεσμα στο RyR, αν και αυτό αμφισβητήθηκε. Ωστόσο, αυτές οι αποκλίσεις έχουν αποδοθεί σε διαφορές στα είδη ή τη θερμοκρασία, καθώς η αναστολή του Dantrolene είναι αναποτελεσματική στους <25°C. Έχει αποδειχθεί ότι τουλάχιστον εν μέρει αποκαθιστά την κανονική λειτουργία στα κανάλια RyR1 που φέρουν κακοήθεις μεταλλάξεις υπερθερμίας. Επιπλέον, έχει

προταθεί ότι η αναστολή του Dantrolene του RyR1 απαιτεί την παρουσία νουκλεοτιδίων CaM και αδενίνης, μια εξήγηση που δίδεται για να δικαιολογήσει την παραδοσιακή άποψη ότι το dantrolene δεν αναστέλλει αποτελεσματικά την απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  μέσω του RyR2 από οποιοδήποτε φυσικό και από ανασυνδυσασμένες πηγές, καθώς εκείνη τη στιγμή το isoform πιστεύεται ότι είναι λιγότερο ευαίσθητο στη δράση και των δύο αυτών αγωνιστών. Ωστόσο, πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι, λόγω των επιπλοκών της ανάλυσης, η επίδραση του CaM στο RyR2 μπορεί να έχει παρερμηνευτεί, υποδηλώνοντας ότι η διαφορά ευαισθησίας σε αυτή τη βοηθητική πρωτεΐνη δεν εξηγεί τις διαφορές επιδράσεις του δαντρολενίου που παρατηρούνται για τις δύο ισόμορφες.

Το Dantrolene Sodium είναι ένα παράγωγο hydrantoin που αρχικά περιγράφηκε ως μυοχαλαρωτικό, αλλά αργότερα βρέθηκε να είναι ένας ισχυρός θεραπευτικός παράγοντας για ασθενείς που πάσχουν από τη σπάνια απειλητική για τη ζωή κατάσταση γνωστή ως κακοήθης υπερθερμία (MH). Ασθενείς που είναι ευαίσθητοι σε MH τυπικά έχουν κληρονομήσει μεταλλάξεις στον υποδοχέα ρυανοδίνης τύπου 1 (RyR1) που βρίσκονται κυρίως στον σκελετικό μυ. Η έκθεση σε εισπνεόμενα αλογονωμένα αναισθητικά κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης μπορεί να προκαλέσει μαζική απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  προκαλούμενη από RyR1 που σχετίζεται με διάσπαση των μυών, αύξηση της κρεατινίνης ορού (CK), υπόταση, υπερθερμία και ταχυκαρδία, η οποία συχνά οδηγεί σε ενδοεγχειρητικό θάνατο. Έχει αποδειχθεί ότι το Dantrolene συνδέεται άμεσα με το N-άκρο του RyR1 και αποτρέπει τη διαρροή SR  $Ca^{2+}$  στον σκελετικό μυ, βελτιώνοντας έτσι τα κλινικά αποτελέσματα. Το Dantrolene πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών μεταξύ των N-τερματικών και των κεντρικών περιοχών των RyR1 και RyR2, αν και τα αποτελέσματα της καιτρόλης στα μεμονωμένα κανάλια RyR παραμένουν αμφιλεγόμενα.

Δεδομένου ότι το dantrolene βελτιώνει τη σταθερότητα τόσο του RyR1 όσο και του RyR2, το dantrolene έχει γίνει ένα μόριο ενδιαφέροντος για την πρόληψη των καρδιακών αρρυθμιών. Το dantrolene έχει προηγουμένως περιγράψει και ως αναστολέας των αρρυθμιών σε ζωικά μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. (Ohta et al. 1990). Πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι το dantrolene αναστέλλει την κατεχολαμινεργική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία σε ένα μοντέλο ετερόζυγου ποντικού με μετάλλαξη R2474S στο RyR2.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το dantrolene αποτρέπει την CPVT αποδόθηκε στη σταθεροποίηση μεταλλαγμένων καναλιών RyR2, και πιθανώς επίσης με την πρόληψη της επαγόμενης από PKA μείωσης της δέσμησης της καλμοδουλίνης στο RyR2. Σε αυτή τη μελέτη, το dantrolene δεν άσκησε αξιοσημείωτα αποτελέσματα στην καρδιακή λειτουργία ποντικών άγριου τύπου. Ωστόσο, το dantrolene έκανε σωστές ελαττωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών εντός του RyR2 που απομονώθηκαν από σκύλους με καρδιακή ανεπάρκεια, που σχετίζονται με την καταστολή των καθυστερημένων μετεπόλωσης (Sigalas et al. 2009).

Ένα άμεσο αποτέλεσμα έχει επίσης εμπλακεί, με την υπόδειξη ότι η δέσμηση dantrolene αποκαθιστά τις αλληλεπιδράσεις εντός του τομέα που χάνονται ή εξασθενούν λόγω κακοήθους μετάλλαξης υπερθερμίας, ομαλοποιώντας έτσι τη λειτουργία του καναλιού. Επιπροσθέτως, έχει αναγνωριστεί μια θέση δέσμησης dantrolene τόσο στις αλληλουχίες RyR1 (υπολείμματα 590-609) όσο και σε RyR2 (κατάλοιπα 601-620), αν και η τελευταία θεωρήθηκε ότι δεν ήταν προσβάσιμη στο φάρμακο στη δομή του φυσικού καναλιού ή ίσως εξαρτάται από τη διαμόρφωση. Παρόλα αυτά, στοιχεία έχουν συγκεντρωθεί από μελέτες για καρδιακό ιστό / μυοκύτταρα υπέρ της θεραπευτικής επίδρασης του dantrolene στη διαρροή Ca<sup>2+</sup> που προκαλείται από το RyR2 στην ισχαιμία, την υπερτροφία και την καρδιακή δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια της σήψης.

Επιπλέον, οι Kobayashi et al. (2005) έχουν αποδείξει ότι το dantrolene καταστέλλει την αποσυμπίεση περιοχών N-τερματικών και κεντρικών τομέων RyR2 στο μοντέλο σηματοδότησης του nHF, οδηγώντας σε μειωμένη συχνότητα σπινθήρων. Στη συνέχεια, οι Ono et al. (2010) έδειξαν ότι στο ίδιο μοντέλο HF, αυτά τα κλειστά κανάλια RyR2 έδειξαν μειωμένη συγγένεια για CaM, και ότι η αποκατάσταση της κλειστής ροής από το dantrolene επίσης αποκατέστησε τη σύνδεση αυτής της βοηθητικής πρωτεΐνης και την ταυτόχρονη μείωση της συχνότητας σπινθήρα σε απομονωμένα καρδιομυοκύτταρα σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα. Περιέργως, η προσθήκη πίσω κορεστικών επιπέδων CaM μείωσε επίσης τη συχνότητα σπινθήρα, αλλά δεν είχε ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τομέων, υποδηλώνοντας ότι ένας άλλος μηχανισμός ήταν σε λειτουργία σε αυτήν την περίπτωση. Όπως αναμενόταν, αυτή η ιδέα επεκτάθηκε στην κατεχολαμινεργική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία (CPVT1) και η προκατεργασία των R2474S +/- ποντικών με dantrolene μείωσε σημαντικά τη συχνότητα σπινθήρα σε απομονωμένα

καρδιομυοκύτταρα και ανέστειλε την επαγόμενη από ισοπροτερενόλη VT, και αυτό συνδέθηκε και πάλι με σύνδεση CaM. Είναι ενδιαφέρον ότι το dantrolene δεν είχε καμία επίδραση στα αυθόρμητα γεγονότα απελευθέρωσης Ca<sup>2+</sup> που παρατηρήθηκαν σε κύτταρα που εκφράζουν ανασυνδυασμένα ένα μεταλλαγμένο τομέα I (N4104K), το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ομοιότητες με τον υποτιθέμενο μηχανισμό του K201.

Σύμφωνα με αυτό, το dantrolene, όπως το K201, βρέθηκε να διορθώνει τη δυσρύθμιση του RyR2 που προκλήθηκε από την αποσύνδεση του FKBP12.6 χρησιμοποιώντας το FK506. Επιπλέον, οι μελέτες μικροσκοπίας κρυο-ηλεκτρονίων των καναλιών RyR2 όπου μια ετικέτα GFP εισήχθη κοντά στη θέση δέσμευσης του dantrolene (Arg626) αποκάλυψαν ότι η ακολουθία βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτή για τη σύνδεση FKBP12.6, αν και η πλήρης έκταση της λειτουργικής σχέσης μεταξύ αυτών των δύο ιστότοπων δεν έχει διερευνηθεί. Παρ'όλα αυτά, πρέπει να γίνουν σημαντικές προσπάθειες για να διευκρινιστεί πλήρως η βελτίωση των επιδράσεων του dantrolene στη δυσλειτουργία του RyR2 (Marx et al. 2000).

Το ασβέστιο αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα, με εξέχοντα ρόλο στη βλάβη που δημιουργείται κατά την επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου (ischemia/reperfusion injury) (Garcia-Dorado et al. 2012; Zheng et al. 2011). Επιδρώντας σε μια πληθώρα μεταβολικών οδών και συμμετέχοντας στον έλεγχο διαφόρων υποκυτταρικών οργανιδίων/λειτουργιών (μεταξύ των οποίων είναι και η διάνοιξη του mitochondrial permeability transition pore – mPTP) μπορεί να επιδράσει σημαντικά στην έκταση αυτής (Morota et al. 2013). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για τον σκοπό αυτό (Faucconnier et al. 2011). Ο υποδοχέας της ρυανοδίνης (RyR2), μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση, έχει συσχετιστεί με τη συσσώρευση ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, φαινόμενο το οποίο με τη σειρά του συμβάλλει στη βλάβη κατά την επαναιμάτωση. Σε ένα πειραματικό μοντέλο η χορήγηση ενός σταθεροποιητή των διαύλων ασβεστίου RyR2 είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση του μεγέθους του εμφράγματος (Faucconnier et al. 2011).

Τα τελευταία χρόνια το dantrolene sodium έχει γίνει αντικείμενο πολλαπλών ερευνών, είναι γνωστό ότι αποτελεί θεραπεία εκλογής για την κακοήθη υπερθερμία, είναι ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της ρυανοδίνης, ο οποίος αναστέλλει την παθολογικά αυξημένη απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο των

προσβεβλημένων ατόμων (Krause et al. 2004; Correia et al. 2012; Bandschapp et al. 2012; Kim et al. 2012). Στην καρδιαγγειακή νόσο, η αλληλεπίδραση του dantrolene με τους υποδοχείς RyR2 των πασχόντων καρδιακών μυοκυττάρων έχει τεκμηριωθεί με μια πλειάδα μελετών, τόσο στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας (Kobayashi et al. 2009; Maxwell et al. 2012) όσο και στην περίπτωση της κατεχολαμινεργικής πολύμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας (Jung et al. 2012). Πρόσφατα η χορήγηση dantrolene, μετά από κοιλιακή μαρμαρυγή, βελτίωσε την επιβίωση, διορθώνοντας τη διαταραγμένη ενδοκυττάρια διαχείριση του ασβεστίου (Zamiri et al. 2014). Στα πλαίσια της βλάβης κατά την επαναιμάτωση το dantrolene έχει γενικά δείξει ότι λειτουργεί κυτταροπροστατευτικά. Το 1999 οι Preckel et al. χρησιμοποιώντας ένα in vitro πειραματικό μοντέλο έδειξαν ότι μειώνει την απελευθέρωση της κρεατινικής κινάσης, υποδηλώνοντας έτσι μείωση της βλάβης κατά την επαναιμάτωση (Precker et al. 2000). Ωστόσο, σε ένα άλλο in vivo πειραματικό μοντέλο, δε φάνηκε να υπάρχει καμία επίδραση στο μέγεθος αυτής (Precker et al. 2000). Το 2000 οι Yu et al. ανέφεραν τη δοσο-εξαρτώμενη μείωση της ιστικής νέκρωσης (έως 50%) και αύξηση της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου (Yu et al. 2000). Μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη διεξήχθη από τον Zucchi και την ομάδα του (Zucchi et al. 2001). Οι ερευνητές αφότου συσχέτισαν την προστασία που παρέχεται στην καρδιά κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης με την ενεργοποίηση του υποδοχέα της αδενοσίνης A3, παρατήρησαν ότι παρουσία του dantrolene, το IB-MECA, ένας αγωνιστής των υποδοχέων A3, δεν παρείχε επιπλέον προστασία. Η κυτταροπροστατευτική δράση του φαρμάκου έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς (Inan et al. 2010; Lopez-Neblina et al. 2007).

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### I. Σκοπός

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του dantrolene sodium ως προς τη μείωση της βλάβης εξ ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Το σύνολο των προηγηθεισών επιτυχημένων προσπαθειών έγινε σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών. Εξ όσων γνωρίζουμε, η παρούσα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια που γίνεται σε μεγαλύτερα θηλαστικά, των οποίων η καρδιακή φυσιολογία και ανατομία ομοιάζει με αυτή της ανθρώπινης καρδιάς (Galvez et al. 2014; Lelovas et al. 2014). Σε ένα δεύτερο επίπεδο, σκοπείται επίσης η διερεύνηση των επιδράσεων του φαρμάκου στον καρδιακό ρυθμό, στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και στο φαινόμενο του «απόπληκτου» μυοκαρδίου (myocardial stunning), ενώ σε ένα τρίτο επίπεδο επιθυμητή είναι και η διερεύνηση των πιθανών παθοφυσιολογικών μηχανισμών, μέσω των οποίων επιδρά το φάρμακο.

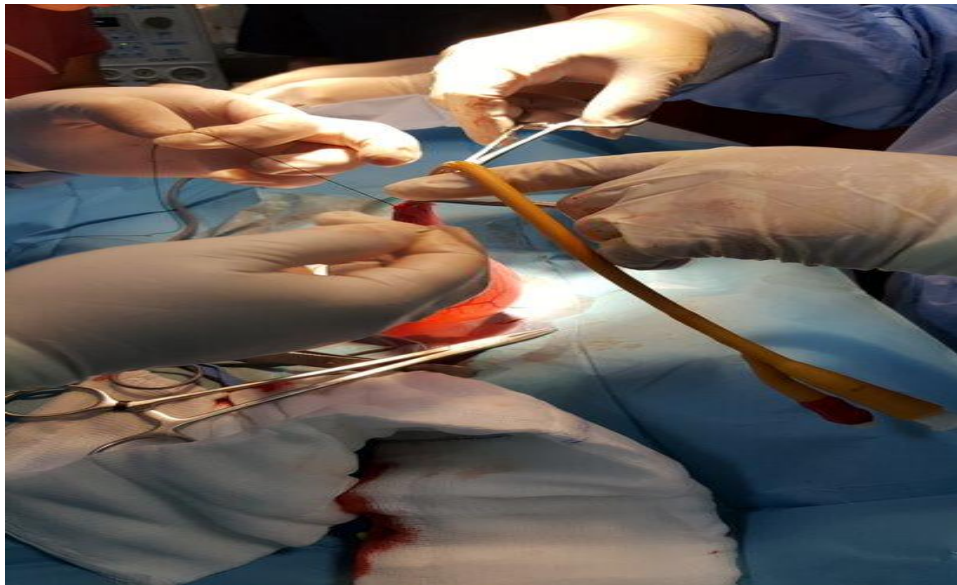
### II. Μέθοδος και υλικά.

#### A. In vivo χοίρειο πρότυπο

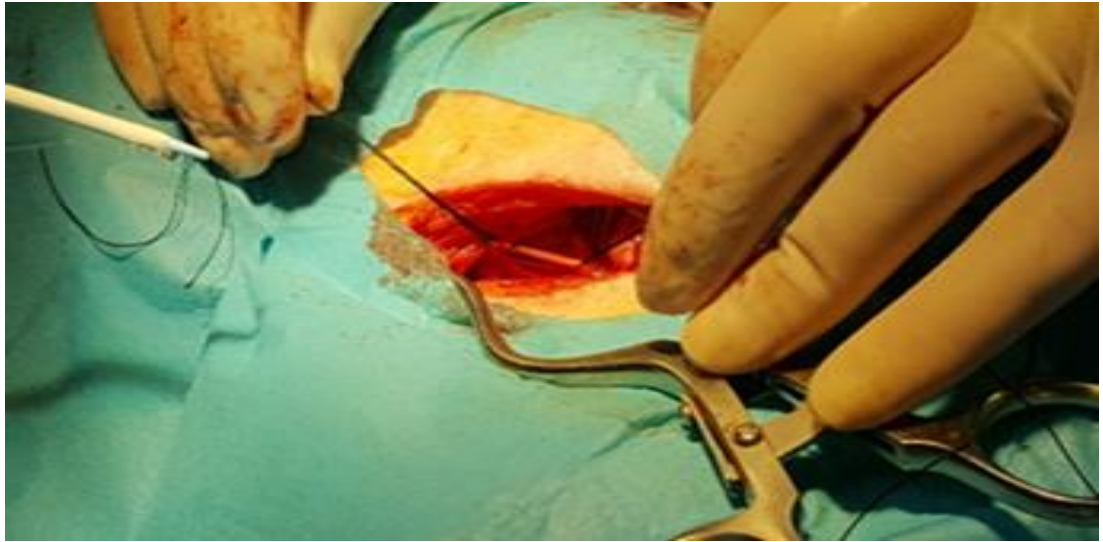
Έπειτα από έγκριση της Επιτροπής Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε μελέτη σε χοίρους που πληρούν τις προϋποθέσεις της ισχύουσας Ευρωπαϊκής νομοθεσίας (π.δ. 56/ Απρίλιος 2013, European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes - Council of Europe No 123, Strasbourg 1985). Η μελέτη συμπεριέλαβε εικοσιπέντε (οι δεκαεννέα ολοκλήρωσαν την πειραματική μελέτη) ευμεγέθεις οικόσιτους χοίρους, παρόμοιας ηλικίας και σωματικού βάρους (περίπου 35 kg). Στο σύνολο των ζώων και κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους, ώστε να αποφευχθεί η αυξημένη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων διεγχειρητικά, χορηγήθηκαν 325 mg ακετυλοσαλικυλικού οξέος για τρεις ημέρες. Έπειτα από ολονύχτια στέρηση τροφής, αλλά ελεύθερη πρόσβαση σε νερό οι χοίροι έλαβαν προνάρκωση αποτελούμενη από κεταμίνη (20 mg/kg) και ατροπίνη (0,04 mg/kg) χορηγηθείσα ενδομυϊκά και οδηγήθηκαν στο πειραματικό χειρουργείο. Για τη συνεχή καταγραφή τριών ηλεκτροκαρδιογραφικών απαγωγών, επτά ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στον θώρακα, στη ράχη και στα άκρα των χοίρων (Shousa et al. 2010). Ακολούθως χορηγήθηκε με



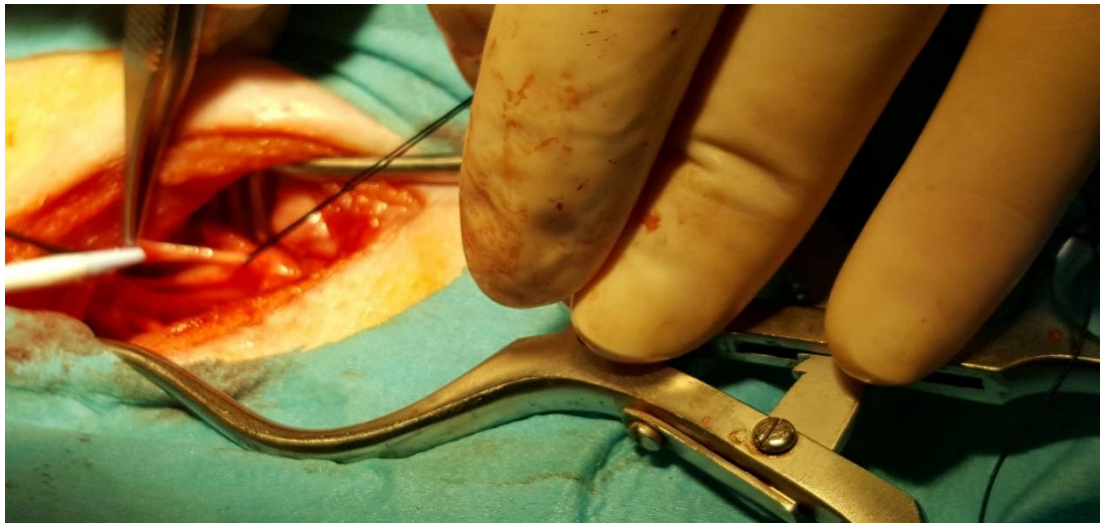
ταχεία ενδοφλέβια έγχυση (bolus) φαιντανύλη (fentanyl) και πεντοβαρβιτάλη (pentobarbital) ως εισαγωγή στη γενική αναισθησία και οι χοίροι διασωληνώθηκαν για να τεθούν σε μηχανικό αερισμό με αναπνευστήρα. Μέτρηση των αποβαλλόμενων ούρων έγινε μέσω χειρουργικού καθετηριασμού της ουροδόχου κύστης (εικόνα 4). Η διατήρηση της αναισθησίας επιτεύχθηκε με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση μιδαζολάμης 0,3 mg/Kg/h, φαιντανύλης 0,02 mg/kg/h και πεντοβαρβιτάλης 4 mg/Kg/h. Με ανοικτή χειρουργική μέθοδο τοποθετήθηκαν στη δεξιά έσω σφαγίτιδα φλέβα και στην καρωτίδα κεντρικές ενδαγγειακές γραμμές (εικόνες 5,6). Ένας καθετήρας πνευμονικής αρτηρίας (Swan–Ganz) τοποθετήθηκε διά μέσου της φλεβικής κεντρικής γραμμής μετά τη διενέργεια της μέσης στερνοτομής (εικόνα 7). Οι τιμές pH, pO<sub>2</sub> και pCO<sub>2</sub> του αρτηριακού αίματος προσδιορίζονταν επανειλημμένα και ανάλογα θα προσαρμόζονταν οι ρυθμίσεις του αναπνευστήρα για την αναπνευστική συχνότητα και τον αναπνεύσιμο όγκο. Η ενδοτραχειακή θερμοκρασία διατηρείθηκε, μέσω παροχής εξωτερικής θερμότητας, στους 37,5°C έως 39,0°C. Η αρτηριακή πίεση υποστηρίχθηκε με την έγχυση ενδοφλέβιων διαλυμάτων NaCl 0.9%.



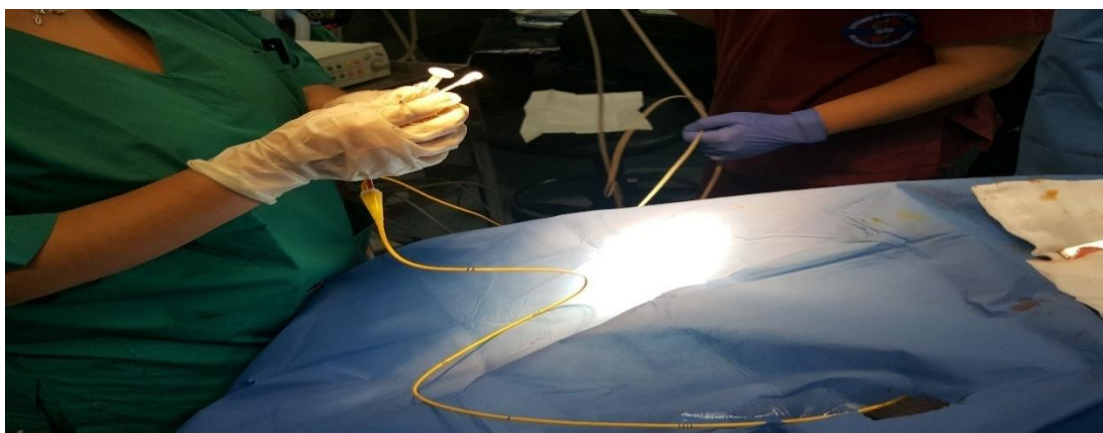
Εικόνα 4. Παρασκευή και καθετηριασμός ουροδόχου κύστεως



Εικόνα 5. Παρασκευή σφαγιτιδας

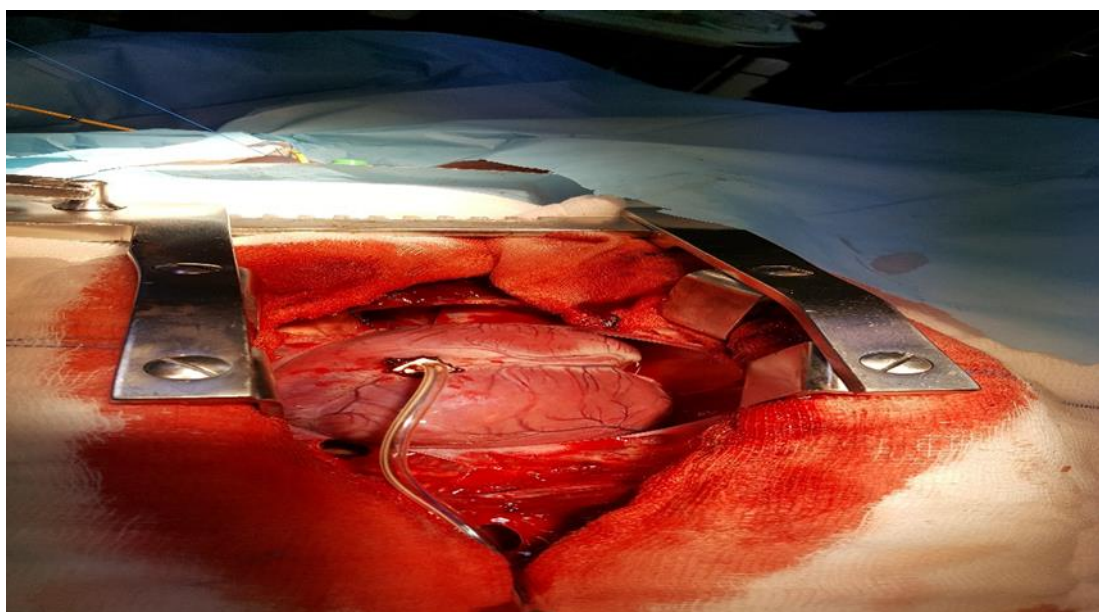


Εικόνα 6. Τοποθέτηση κεντρικής φλεβικής γραμμής.



Εικόνα 7. Τοποθέτηση καθετήρα πνευμονικής αρτηρίας (Swan-Ganz).

Μετά το πέρας μιας περιόδου σταθεροποίησης 30 λεπτών, η είσοδος στη θωρακική κοιλότητα επιτεύχθηκε με μέση στερνοτομή και στη συνέχεια έγινε διάνοιξη του περικάρδιου, ώστε να ανευρεθεί ο πρόσθιος κατιόντας κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας (LAD). Ακολούθησε προσωρινή απολίνωση του αγγείου περιφερικά του 2<sup>ου</sup> διαγωνίου κλάδου αυτού με τουρνικέ (εικόνα 8), με μέθοδο που να αποτραπεί η βλάβη του τοιχώματος του αγγείου και η απόφραξη αυτού κατά την επαναιμάτωση που ακολούθησε (Klocke et al. 2007).



Εικόνα 8. Προσωρινή απολίνωση LAD με τουρνικέ

Η επιτυχής απόφραξη του αγγείου επιβεβαιώθηκε με χρήση κεφαλών υπερήχου Doppler επί του LAD, περιφερικότερα και κεντρικότερα της απολίνωσης και εκτιμήθηκε η ενδοαυλική ροή. Η απόφραξη και η αποκατάσταση της ροής του αγγείου διαπιστώθηκε επιπροσθέτως και από τις δυναμικές αλλαγές του ηλεκτροκαρδιογραφήματος (ΗΚΓ) (ανάσπαση του τμήματος ST), καθώς και από τον αποχρωματισμό μακροσκοπικά του μυοκαρδίου που αιματώνωνταν από το απολινωθέν αγγείο. Μετά την πάροδο 75 λεπτών ισχαιμίας έγινε άρση της απόφραξης (ισχαιμίας) και 24ωρη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου επεισόδια κοιλιακών αρρυθμιών (πολύμορφης ή μονόμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας, κοιλιακής μαρμαρυγής), διάρκειας μεγαλύτερης των 10 δευτερολέπτων, ανατάχθηκαν ηλεκτρικά με τη χρήση απινιδωτή (20 joules επικαρδιακά).

Εφόσον οι κοιλιακές αρρυθμίες δεν είχαν επιτυχή ανάταξη έπειτα από πέντε προσπάθειες απινίδωσης, έγινε διακοπή της ανάνηψης, το ζώο θανατώθηκε και αποκλείστηκε από τον πληθυσμό της μελέτης. Μετά την παρέλευση των 24 ωρών της επαναιμάτωσης έγινε έγχυση υπέρκορου διαλύματος KCl σε κεντρικό αγγείο με σκοπό την ευθανασία του ζώου. Τα πειραματόζωα έλαβαν χημειοπροφύλαξη με χορήγηση προεγχειρητικά αμικιλίνης/σουλμπακτάμης ενδοφλεβίως (1.5g άπαξ) και επαναληπτικές δόσεις 1.5 g/6 h καθ'όλη τη διάρκεια του 24/ώρου.

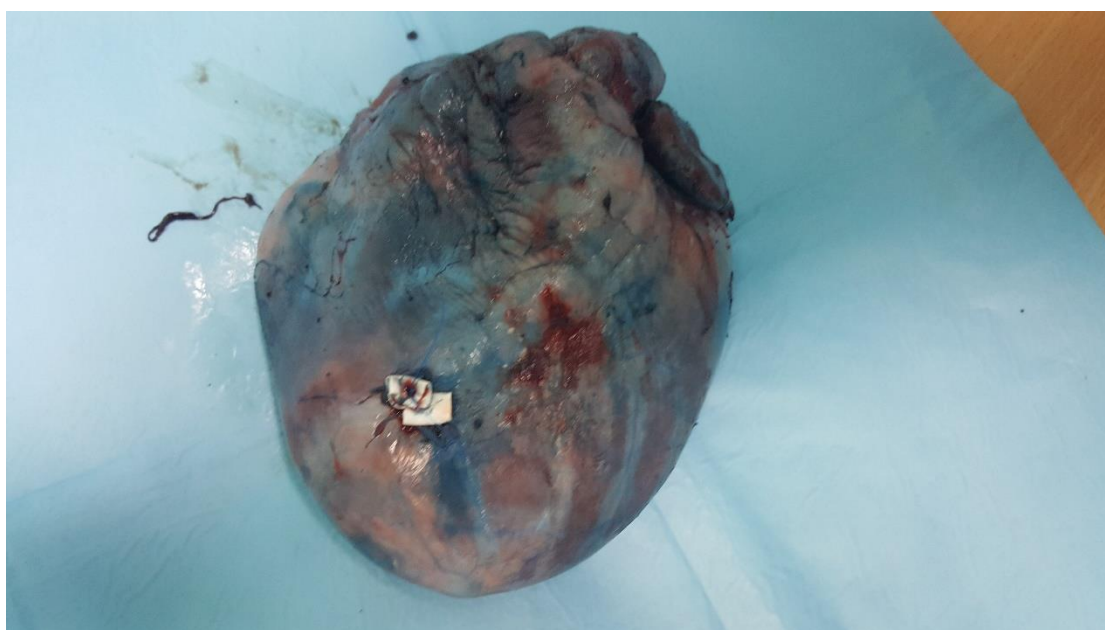
## **B. Παρέμβαση**

Τα ζώα διαχωρίστηκαν με τυχαιοποιημένη κατανομή σε δυο ομάδες, των 10 χοίρων, εκ των οποίων χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg) και μία των 9 στην οποία χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% με bolus έγχυση, διά του κεντρικού φλεβικού καθετήρα, ως δόση φόρτισης, 15 λεπτά προ της ισχαιμίας. Ακολούθως, χορηγήθηκε συνεχής ενδοφλέβια έγχυση (δια του κεντρικού φλεβικού καθετήρα) dantrolene (με ροή 0,25 mg/kg/hr) ή διάλυμα NaCl 0,9% αντίστοιχα, ως δόση συντήρησης, μέχρι την ολοκλήρωση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Η δόση του dantrolene προσδιορίστηκε με βάση τα δεδομένα προηγούμενων μελετών σε *in vivo* χοίρεια μοντέλα κακοήθους υπερθερμίας, καθώς και από δεδομένα άλλων ζωικών μοντέλων (Boys et al. 2010; Carmo et al. 2010). Η κατανομή της θεραπείας στις δυο ομάδες (στην ομάδα μελέτης που έλαβε dantrolene και στην ομάδα ελέγχου που έλαβε NaCl 0,9%) παράμεινε κρυφή για τους ερευνητές μέχρι την ολοκλήρωση των πειραμάτων.



### C. Προσδιορισμός της περιοχής σε κίνδυνο και του μεγέθους του εμφράγματος

Μετά την ολοκλήρωση 24 ωρών επανααιμάτωσης ο LAD απολινώθηκε εκ νέου στο ίδιο σημείο, η ανιούσα αορτή αποκλείστηκε (aortic cross-clamp) και έγινε εγχύση στη στεφανιαία κυκλοφορία 1 ml/kg της χρωστικής Evan's blue (2%) για να αφορίσει το ισχαιμικό μυοκάρδιο (εικόνα 9). Στη συνέχεια χορηγήθηκε υπέρκορο διάλυμα KCl στη στεφανιαία κυκλοφορία με σκοπό την ευθανασία του ζώου δια της καρδιακής ανακοπής.



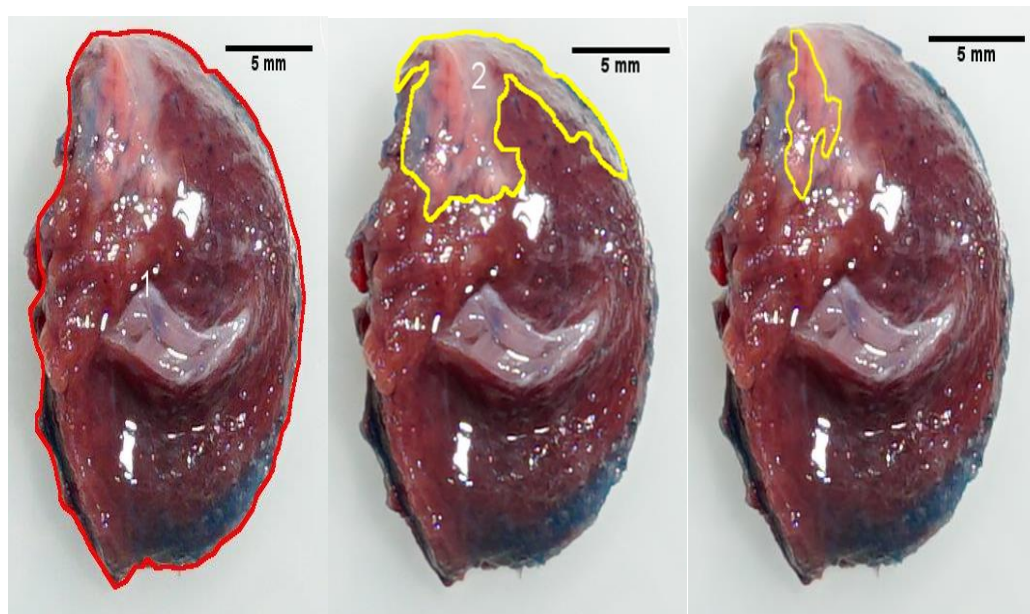
Εικόνα 9. Εγχύση Evan's blue (2%)

Έπειτα από εκτομή και έκπλυση της καρδιάς η δεξιά κοιλία και οι κόλποι αυτής διαχωρίστηκαν και απορρίφθηκαν. Η αριστερή κοιλία τεμαχίστηκε (από κορυφή προς βάση) σε λεπτά τεμάχια πάχους περίπου 0,5 cm (εικόνα 10). Στη βασική επιφάνεια κάθε τεμαχίου οριοθετήθηκε με ινδική μελάνη η περιοχή του μυοκαρδίου που δεν προσέλαβε Evan's blue (περιοχή σε κίνδυνο – area at risk/aaR). Τα ιστοτεμάχια εμβαπτίστηκαν για 10 min στους 37°C σε διάλυμα 0.8% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) το οποίο χρωματίζει το βιώσιμο μυοκάρδιο με ζωνρό κεραμέρυθρο χρώμα (Fishbein et al. 1981; Holmbom et al. 1993) ενώ η περιοχή που δεν χρωματίστηκε από το TTC αντιπροσώπευε το νεκρωτικό μυοκάρδιο. Οι τομές φωτογραφήθηκαν ψηφιακά και η νεκρωτική περιοχή καθώς και η περιοχή σε κίνδυνο, προσδιορίστηκαν επακριβώς

με επιπεδομετρία (planimetry), ενώ το σχετικό μέγεθος του εμφράγματος (η έκταση της νέκρωσης) εκφράστηκε ως ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο (I/aaR) (εικόνα 11).



Εικόνα 10. Τεμαχισμός της ΑΡ κοιλίας μετά από χρώση.



A

B

Γ

Εικόνα 11. Α) Περιοχή σε κίνδυνο, Β) ισχαιμικό μυοκάρδιο, Γ) βιώσιμο μυοκάρδιο

#### **D. Μετρήσεις βιοδεικτών και δειγματοληψία ιστού**

Η συγκέντρωση της κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CK), του καρδιακού ισοενζύμου της κινάσης της κρεατίνης (CK-MB) και της τροπονίνης I (cTnI) στο πλάσμα των χοίρων προσδιορίστηκε την ώρα 0 (προ της απολίνωσης του LAD), αμέσως μετά την αποκατάσταση της ροής (άρση ισχαιμίας) και στη συνέχεια ανά δίωρο για εικοσιτέσσερις ώρες. Εκτός των προαναφερθεισών τομών, συλλέχθηκαν δείγματα ιστών από διαφορετικές περιοχές της αριστερής κοιλίας, τα οποία και καταμετρήθηκαν, ζυγίσθηκαν και αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης για πιθανούς επιπρόσθετους ελέγχους.

#### **E. Ηλεκτροκαρδιογράφημα, υπερηχογράφημα και επεμβατική παρακολούθηση**

Η συνεχής καταγραφή ΗΚΓ (monitoring) είχε ως σκοπό την εκτίμηση της οξείας μυοκαρδιακής βλάβης και των διαταραχών του ρυθμού. Η υπερηχογραφική εκτίμηση της καρδιάς των πειραματόζωων, πραγματοποιήθηκε από καρδιολόγο σε δυο χρόνους: αμέσως μετά την προσπέλαση στη θωρακική κοιλότητα και μετά από τις 24 ώρες της επαναιμάτωσης (Aarsaether et al. 2012).

Οι μετρήσεις από 2D και M-mode υπερηχογραφήματα τουλάχιστον τριών συνεχόμενων καρδιακών κύκλων αποθηκεύθηκαν ψηφιακά για μεταγενέστερη ανάλυση, μέσω κατάλληλου λογισμικού. Οι διαστάσεις της αριστερής κοιλίας (LV) και των τοιχωμάτων αυτής, το κλάσμα εξώθησής της (LVEF) και η κλασματική της βράχυνση (LVFS), καθώς και οι όγκοι αυτής (LV volumes) συμπεριελήφθησαν στις μετρήσεις. Επίσης πληθώρα αιμοδυναμικών παραμέτρων καταγράφηκαν με καθετήρα Swan–Ganz σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία (ανά δίωρο) όπως κοιλιακές πιέσεις, καρδιακή παροχή (cardiac output - CO), καρδιακός δείκτης (cardiac index - CI), όγκος παλμού (stroke volume - SV), δείκτης όγκου παλμού (SV index - SVI) και αγγειακές αντιστάσεις σε συστηματική (total peripheral resistance - TPR) και πνευμονική κυκλοφορία (pulmonary vascular pressure–PVR) και πίεση ενσφήνωσης (pulmonary artery wedge pressure - PAWP)

## **II. Καταληκτικά σημεία της μελέτης.**

Τα κύρια καταληκτικά σημεία της μελέτης ήταν το σχετικό μέγεθος του εμφράγματος (ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο), η νεκρωτική περιοχή καθώς και η περιοχή σε κίνδυνο, σημεία που προσδιορίστηκαν επακριβώς με επιπεδομετρία (planimetry), ενώ το σχετικό μέγεθος του εμφράγματος (η έκταση της νέκρωσης) εκφράστηκε ως ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο (I/aaR). Δευτερεύοντα τελικά σημεία αποτελούν: ο αριθμός των καταγεγραμμένων, εντός των πρώτων 24 ωρών από την επαναιμάτωση, αρρυθμιολογικών επεισοδίων (ως αρρυθμία ορίζεται οποιοσδήποτε ρυθμός εκτός του φλεβοκομβικού ρυθμού).

Το μέγεθος του εμφράγματος, εκτιμήθηκε από τις μετρήσεις των καρδιακών βιοδεικτών (CK,CK-MB,TnI) που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη νέκρωση των μυοκυττάρων (το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη της γραφικής παράστασης του χρόνου προς τη συγκέντρωση). Η μυοκαρδιακή βλάβη μετρήθηκε μέσω καθετήρα πνευμονικής αρτηρίας (Swan Ganz) με μετρήσεις ανά δίωρο, του καρδιακού δείκτη, της καρδιακής παροχής, της πίεσης ενσφήνωσης του προφορτίου, της κατάστασης του ενδαγγειακού όγκου και του κορεσμού σε οξυγόνο του μικτού φλεβικού αίματος και τέλος τη συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας (LVEF, LVFS, LV volumes).

## **III.Υπολογισμός αναγκαίου δείγματος της μελέτης**

Προκειμένου να ανιχνευθεί μια μείωση κατά 20% στο σχετικό μέγεθος εμφράγματος (ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο), επί τη βάσει ενός υποθετικού μέσου σχετικού μεγέθους εμφράγματος στους μάρτυρες 0,75 με τυπική απόκλιση 0,10, απαιτήθηκαν 19 πειραματόζωα (για 80% πιθανότητα απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης σε δίπλευρο επίπεδο σφάλματος τύπου I ίσο με 0,05 εφόσον υπάρχει τουλάχιστον 20% πραγματική διαφορά στις μέσες τιμές των δύο ομάδων). Το ποσοστό πειραματικής αποτυχίας ήταν περίπου στο 20% (οξεία θνησιμότητα των πειραματόζωων, άλλες καταστροφικές επιπλοκές κ.ά.) (Klocke et al. 2007; Munz et al. 2011). Απαιτήθηκαν 25 πειραματόζωα συνολικά για το πείραμα.



## Υλικό και μέθοδοι

Η μελέτη συμπεριέλαβε δεκαεννέα ευμεγέθεις οικόσιτους χοίρους (9 για την ομάδα ελέγχου). Υπό γενική αναισθησία μετά από μέση στερνοτομή αναγνωρίστηκε και απολινώθηκε προσωρινά με τουρνικέ ο πρόσθιος κατιόντας για 75min. Μετά την άρση της ισχαιμίας ελήφθησαν δείγματα αίματος για τον υπολογισμό της κινάσης της φωσφοκρεατίνης, του καρδιακού ισοενζύμου της κινάσης της κρεατίνης (CK-MB) και της τροπονίνης I (cTnI) στον ορό του αίματος των χοίρων, την ώρα 0 (προ της απολίνωσης του LAD), αμέσως μετά την αποκατάσταση της ροής (άρση ισχαιμίας) και στη συνέχεια ανά δίωρο για εικοσιτέσσερις ώρες. Επίσης πληθώρα αιμοδυναμικών παραμέτρων καταγράφηκαν με καθετήρα Swan–Ganz της καρδιακής παροχής, του καρδιακού δείκτη και της πίεσης ενσφήνωσης κάθε δυο ώρες και μελέτη της βλάβης του μυοκαρδίου (ισχαιμικό και βιώσιμο μυοκάρδιο) μετά από χρώση της καρδιάς στις 24 ώρες.

## **I. Αποτελέσματα**

### **Στατιστική ανάλυση**

Οι μέσες τιμές (mean) και οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test ή το μη παραμετρικό κριτήριο Mann-Whitney. Η μεταβολή των μετρήσεων των παραμέτρων στον χρόνο παρακολούθησης λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο και την ομάδα ελέγχθηκε με τη χρήση μεικτών γραμμικών μοντέλων (linear mixed models) από τα οποία προέκυψαν συντελεστές εξάρτησης ( $\beta$ ) και τα τυπικά σφάλματά τους (standard errors=SE). Ελέγχθηκε και η αλληλεπίδραση χρόνου-ομάδας. Τα επίπεδα σημαντικότητας είναι αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.

### **Αποτελέσματα**

Το δείγμα αποτελείται από 19 ζώα, χωρισμένα σε 2 ομάδες: την ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg) που είχε 10 ζώα (52,6%) με μέσο βάρος τα 46,7 kgr (SD=3,5 kgr) και την ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% που είχε 9 ζώα (47,4%) με μέσο βάρος τα 45,5 kgr (SD=3,0 kgr). Το βάρος ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες ( $p=0,430$ ).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές των όγκων, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.

**Table 4.** Volume Comparisons Between Dantrolene Sodium and NaCl Groups

	Dantrolene sodium (2.0 mg/kg) Mean or Median (SD or IQR)	NaCl 0,9% Mean or Median (SD or IQR)	P
Total LV volume, mean (SD) (mm <sup>3</sup> )	81857.9 (11162.5)	94481.5 (11413.8)	0.026*
Total viable volume, median (IQR) (mm <sup>3</sup> )	79894.1 (6654.3–85146.2)	95647.1 (86508.5–99789)	0.028†
Total viable volume outside aaR, median (IQR) (mm <sup>3</sup> )	78139.8 (64704.5–84859.1)	93645.1 (85984–97564.9)	0.035†
Total area at risk volume, median (IQR) (mm <sup>3</sup> )	4386.8 (2306.4–7064.9)	5120 (2286.5–6820)	0.566†
Total infract volume, median (IQR) (mm <sup>3</sup> )	3536.7 (2019.3–5081.5)	2923.6 (1670–4811)	0.150†
Total viable volume, inside aaR median (IQR) (mm <sup>3</sup> )	945.9 (287.1–2010.9)	1891.8 (526.6–2197.6)	0.460†
Total viable volume, mean (SD) (%)	95.4 (2.4)	96.9 (1.3)	0.109*
Total viable volume outside aaR, mean (SD) (%)	93.6 (3.5)	95.0 (1.9)	0.289*
Total area at risk volume, mean (SD) (%)	6.4 (3.5)	5.0 (1.9)	0.299*
Total infract volume, mean (SD) (%)	4.6 (2.4)	3.2 (1.3)	0.116*
Total viable volume inside aaR, mean (SD) (%)	1.8 (1.4)	1.8 (0.9)	0.968*
Infract risk area, mean (SD) (%)	78.1 (8.1)	70.6 (7.6)	0.053*
Viable risk area, mean (SD) (%)	21.9 (8.1)	29.5 (7.5)	0.049*

aaR, area at risk; IQR, interquartile range; kg: kilograms; LV, left ventricle; mg: milligrams; P, probability; SD, standard deviation.

\*Student's t test;

†Mann-Whitney test.

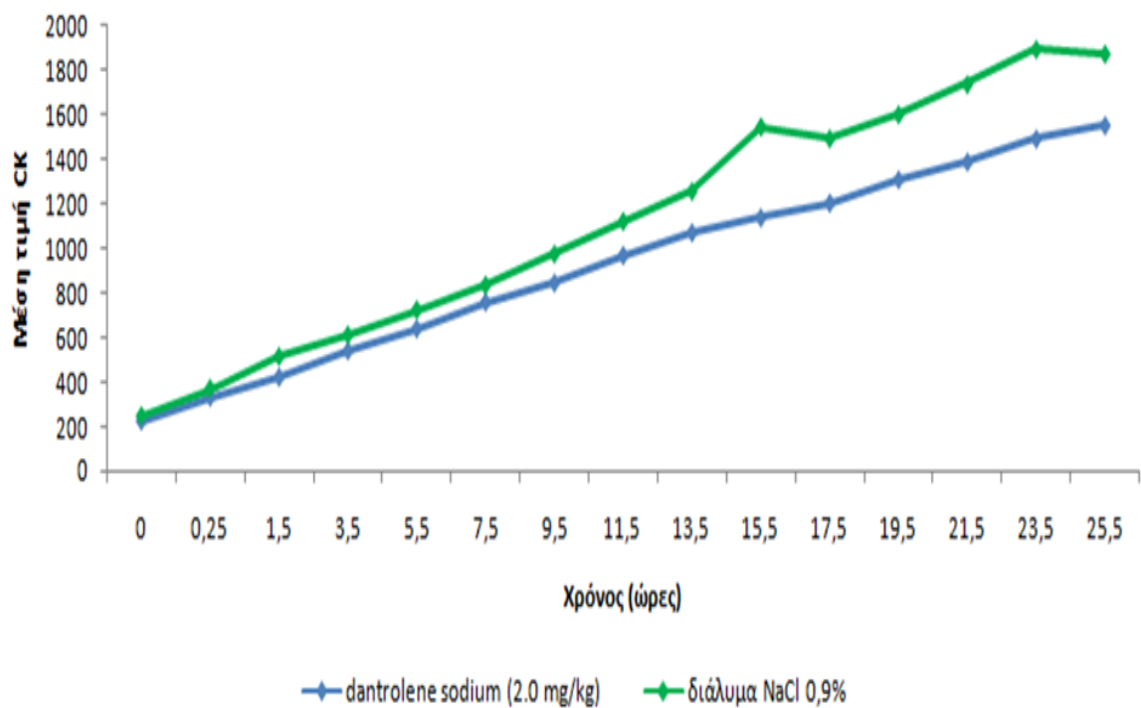
Σημαντικά χαμηλότερες τιμές Total LV volume, Total viable volume, Total viable volume outside και Viable risk area είχε η ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές CK στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

CK (IU/L)		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	223,5	108,1	246,0	100,3	0,645
Ισχαμία	0,25	330,5	17,0	369,0	29,4	<b>0,002</b>
0	1,50	420,1	75,7	512,3	58,6	<b>0,009</b>
2	3,50	538,6	78,0	609,6	66,2	<b>0,049</b>
4	5,50	637,2	59,0	722,1	59,1	<b>0,006</b>
6	7,50	756,9	57,1	833,1	69,9	<b>0,018</b>
8	9,50	842,7	51,4	973,1	64,9	<b>&lt;0,001</b>
10	11,50	967,3	42,7	1120,7	78,4	<b>&lt;0,001</b>
12	13,50	1068,2	29,2	1255,1	92,4	<b>&lt;0,001</b>
14	15,50	1136,0	46,4	1546,0	604,4	<b>0,047</b>
16	17,50	1201,3	63,5	1492,8	138,6	<b>&lt;0,001</b>
18	19,50	1306,5	95,1	1600,4	175,4	<b>&lt;0,001</b>
20	21,50	1386,3	104,8	1735,7	157,5	<b>&lt;0,001</b>
22	23,50	1489,3	73,9	1894,3	126,1	<b>&lt;0,001</b>
24	25,50	1549,5	126,8	1873,0	203,3	<b>0,001</b>
<b>AUC<sub>g</sub></b>		25168,58	1108,19	30578,82	2167,70	<b>&lt;0,001</b>
<b>AUC<sub>i</sub></b>		19627,43	2038,15	24362,49	3009,74	<b>0,001</b>

Μόνο στην αρχική μέτρηση ήταν παρόμοιες οι τιμές CK των δύο ομάδων. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές CK στο χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CK και σαν ανεξάρτητες το χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους.

Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	64,09	2,04	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	-24,80	27,17	0,361
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	-14,55	2,82	<b>&lt;0,001</b>

<sup>+</sup>συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup>τυπικό σφάλμα συντελεστή

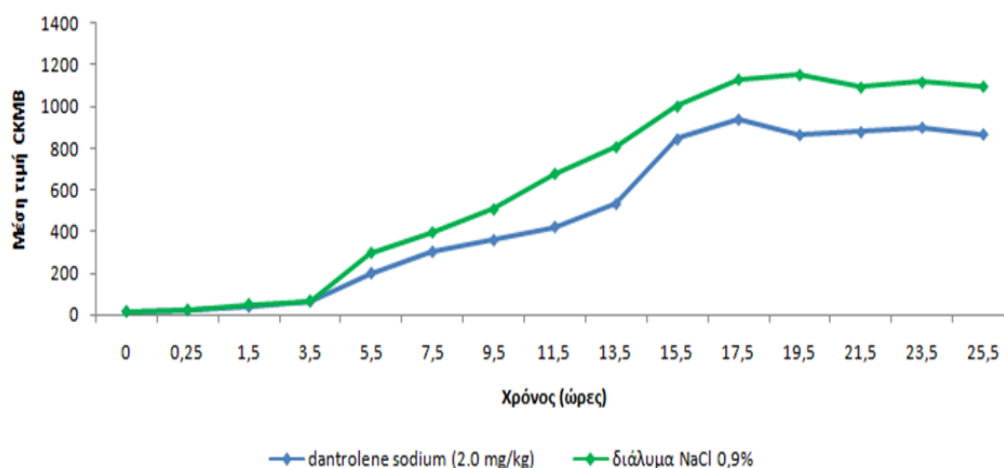
Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του CK στο χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CK ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές CKMB στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

CKMB (IU/L)		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	15,1	4,5	16,3	4,6	0,566
Ισχαμία	0,25	20,3	3,2	24,9	6,0	<b>0,048</b>
0	1,50	37,5	9,0	51,6	15,4	<b>0,025</b>
2	3,50	62,8	29,4	68,1	24,2	0,675
4	5,50	200,3	68,3	298,4	53,6	<b>0,003</b>
6	7,50	303,2	69,9	397,1	68,6	<b>0,009</b>
8	9,50	359,2	62,9	507,4	64,3	<b>&lt;0,001</b>
10	11,50	423,3	74,1	678,7	176,4	<b>0,001</b>
12	13,50	533,6	167,1	806,7	162,0	<b>0,002</b>
14	15,50	845,5	270,5	1002,4	196,2	0,170
16	17,50	940,5	290,5	1131,8	139,6	0,091
18	19,50	866,5	267,6	1154,2	144,4	<b>0,011</b>
20	21,50	880,1	200,7	1093,9	126,6	<b>0,014</b>
22	23,50	902,3	186,8	1118,8	138,1	<b>0,011</b>
24	25,50	869,6	147,4	1098,2	72,1	<b>0,001</b>
<b>AUC<sub>g</sub></b>		13582,25	2525,30	17717,82	1685,25	<b>0,001</b>
<b>AUC<sub>i</sub></b>		13197,20	2519,87	17301,32	1710,29	<b>0,001</b>

Οι τιμές CKMB των δύο ομάδων ήταν παρόμοιες στην αρχική μέτρηση, στις 3,5, 15,5 και 17,5 ώρες. Σε όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές CKMB στο χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CKMB και σαν ανεξάρτητες το χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	51,46	2,47	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	-26,55	30,74	0,388
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	-10,19	3,41	<b>0,003</b>

<sup>+</sup>συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup>τυπικό σφάλμα συντελεστή

Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του CKMB στο χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CKMB ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

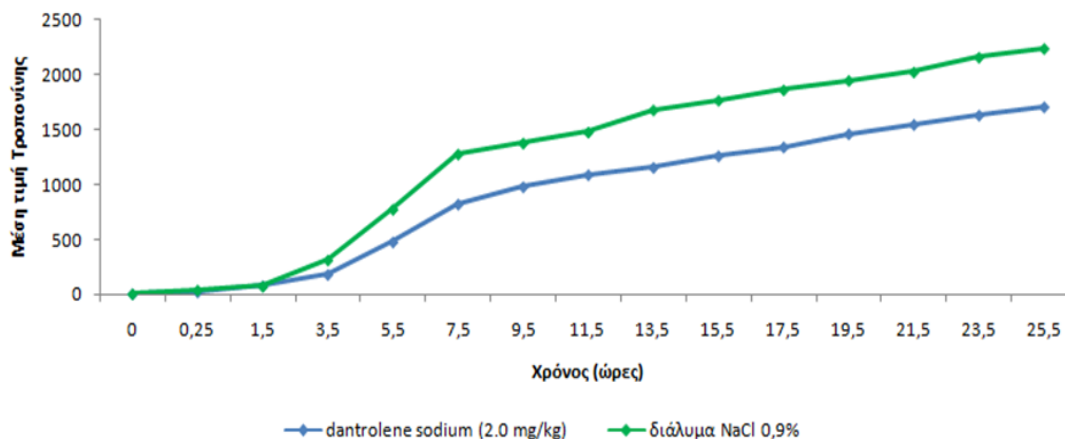


Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές τροπονίνης στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

Τροπονίνη (pg/mL)		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	5,4	3,7	5,4	1,4	0,996
Ισχαμία	0,25	23,7	6,9	38,8	25,7	0,091
0	1,50	78,1	25,5	73,4	34,2	0,738
2	3,50	180,2	23,7	312,3	86,8	<b>0,049</b>
4	5,50	475,6	153,4	773,2	159,2	<b>&lt;0,001</b>
6	7,50	819,4	183,6	1275,0	237,2	<b>0,001</b>
8	9,50	976,9	204,4	1374,8	146,4	<b>&lt;0,001</b>
10	11,50	1085,7	206,9	1474,7	145,6	<b>&lt;0,001</b>
12	13,50	1153,5	199,6	1675,7	178,8	<b>&lt;0,001</b>
14	15,50	1258,5	146,3	1763,7	149,1	<b>&lt;0,001</b>
16	17,50	1338,4	165,1	1858,5	149,7	<b>&lt;0,001</b>
18	19,50	1457,6	96,3	1944,6	146,4	<b>&lt;0,001</b>
20	21,50	1542,6	122,5	2020,6	135,3	<b>&lt;0,001</b>
22	23,50	1626,5	165,8	2155,3	134,1	<b>&lt;0,001</b>
24	25,50	1701,9	161,6	2234,2	141,5	<b>0,001</b>
<b>AUC<sub>g</sub></b>		25677,05	3051,87	35640,16	2966,94	<b>&lt;0,001</b>
<b>AUC<sub>i</sub></b>		25539,94	3129,07	35503,20	2962,95	<b>&lt;0,001</b>

Στις πρώτες μετρήσεις, μέχρι τη 1,5 ώρα, ήταν παρόμοιες οι τιμές της τροπονίνης των δύο ομάδων. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές τροπονίνης στον χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές τροπονίνης και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	72,62	1,03	<0,001
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	-0,22	1,30	0,868
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	-25,10	1,50	<0,001

<sup>+</sup> συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup> τυπικό σφάλμα συντελεστή

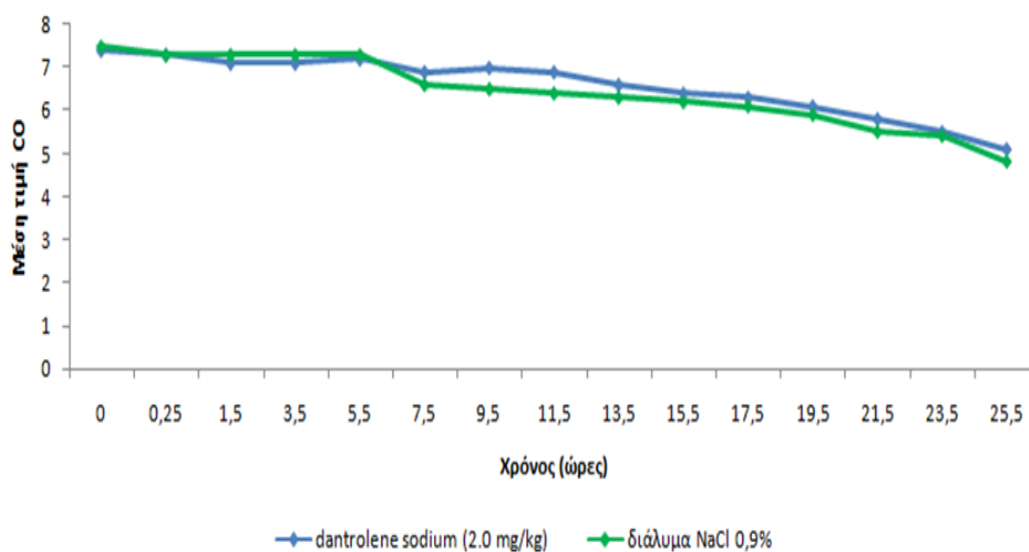
Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές της τροπονίνης στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές τροπονίνης ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές CO στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

CO mm Hg		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	7,4	0,7	7,5	0,3	0,768
Ισχαμία	0,25	7,3	0,8	7,3	0,4	0,799
0	1,50	7,1	0,7	7,3	0,5	0,579
2	3,50	7,1	0,5	7,3	0,3	0,397
4	5,50	7,2	0,4	7,3	0,4	0,719
6	7,50	6,9	0,4	6,6	0,4	0,188
8	9,50	7,0	0,3	6,5	0,4	<b>0,016</b>
10	11,50	6,9	0,5	6,4	0,5	0,062
12	13,50	6,6	0,6	6,3	0,5	0,178
14	15,50	6,4	0,6	6,2	0,6	0,345
16	17,50	6,3	0,5	6,1	0,6	0,303
18	19,50	6,1	0,5	5,9	0,6	0,488
20	21,50	5,8	0,3	5,5	0,5	0,184
22	23,50	5,5	0,5	5,4	0,6	0,636
24	25,50	5,1	0,6	4,8	0,4	0,171
<b>AUC<sub>g</sub></b>		166,50	10,68	161,74	10,04	0,333
<b>AUC<sub>i</sub></b>		36,70	12,61	40,19	11,37	0,536

Σε όλες σχεδόν τις μετρήσεις ήταν παρόμοιες οι τιμές της καρδιακή παροχή (cardiac output - CO) των δύο ομάδων. Μόνο στην μέτρηση των 9,5 ωρών είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές CO στον χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CO και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	-0,09	0,10	<0,001
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	-0,03	0,19	0,888
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	0,02	0,01	0,123

<sup>+</sup>συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup>τυπικό σφάλμα συντελεστή

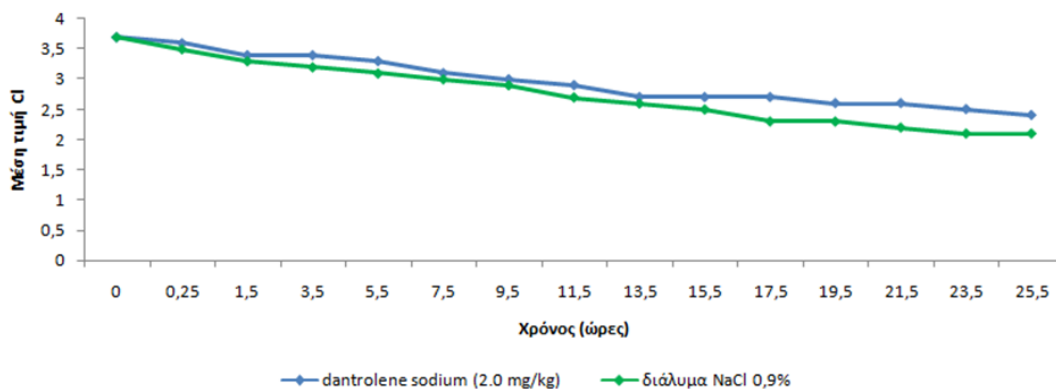
Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του CO στον χρόνο και μάλιστα με παρόμοιο βαθμό αύξησης. Στην αρχή οι τιμές CO ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές του καρδιακού δείκτη (cardiac index - CI) στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

CI mm Hg		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	3,7	0,2	3,7	0,2	0,991
Ισχαμία	0,25	3,6	0,2	3,5	0,2	0,390
0	1,50	3,4	0,1	3,3	0,3	0,328
2	3,50	3,4	0,2	3,2	0,2	0,175
4	5,50	3,3	0,2	3,1	0,2	0,088
6	7,50	3,1	0,2	3,0	0,4	0,492
8	9,50	3,0	0,2	2,9	0,2	0,219
10	11,50	2,9	0,2	2,7	0,2	0,107
12	13,50	2,7	0,3	2,6	0,2	0,296
14	15,50	2,7	0,3	2,5	0,2	0,139
16	17,50	2,7	0,4	2,3	0,2	<b>0,006</b>
18	19,50	2,6	0,4	2,3	0,2	<b>0,011</b>
20	21,50	2,6	0,3	2,2	0,2	<b>0,005</b>
22	23,50	2,5	0,3	2,1	0,2	<b>0,002</b>
24	25,50	2,4	0,3	2,1	0,2	<b>0,006</b>
<b>AUC<sub>g</sub></b>		74,12	4,48	68,43	3,91	0,009
<b>AUC<sub>i</sub></b>		13,18	4,49	16,01	3,36	0,141

Παρόμοιες ήταν οι τιμές CI των δύο ομάδων μέχρι την μέτρηση στις 15,5 ώρες. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC<sub>g</sub> ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% ενώ οι τιμές των AUC<sub>i</sub> ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές CI στον χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CI και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	-0,06	0,04	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	0,05	0,06	0,449
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	0,01	0,01	<b>0,013</b>

<sup>+</sup>συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup>τυπικό σφάλμα συντελεστή

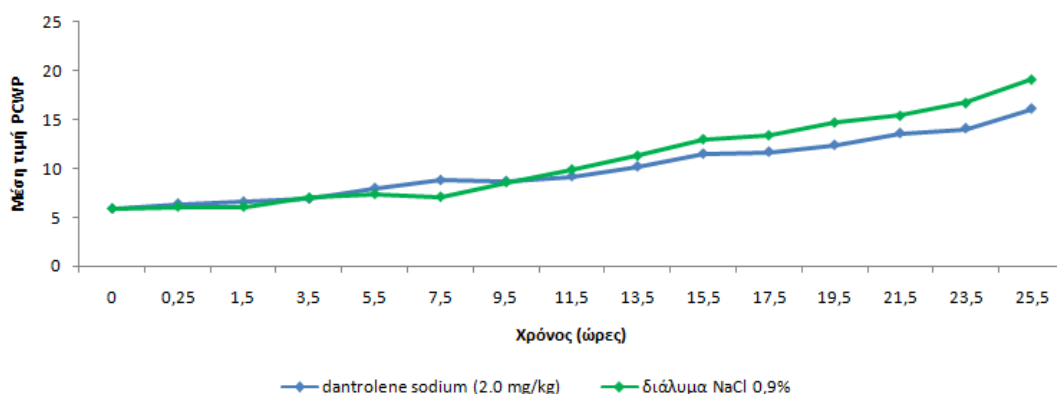
Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του CI στον χρόνο αλλά ο βαθμός μείωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CI ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές της πίεσης ενσφήνωσης (pulmonary artery wedge pressure - PAWP) στις διάφορες χρονικές μετρήσεις, στις δύο ομάδες χωριστά.

PCWP mm Hg		Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)		διάλυμα NaCl 0,9%		P Student's t-test
Μέτρηση	Χρόνος (ώρες)	Μέση τιμή	SD	Μέση τιμή	SD	
Αρχική	0	5,9	0,7	5,9	0,6	0,972
Ισχαμία	0,25	6,4	1,1	6,1	0,3	0,451
	0	6,6	1,3	6,1	1,3	0,413
	2	6,9	1,5	7,0	1,6	0,890
	4	8,0	2,4	7,4	2,3	0,618
	6	8,8	3,2	7,1	2,4	0,209
	8	8,7	2,9	8,6	2,2	0,905
	10	9,2	2,9	9,9	2,1	0,564
	12	10,2	2,8	11,3	2,9	0,398
	14	11,5	2,6	13,0	1,9	0,175
	16	11,7	3,3	13,4	1,6	0,168
	18	12,4	3,2	14,7	2,0	0,086
	20	13,6	3,5	15,4	2,5	0,206
	22	14,1	3,7	16,7	2,4	0,094
	24	16,1	3,2	19,1	3,3	0,060
<b>AUC<sub>g</sub></b>		262,56	58,11	283,47	30,43	0,348
<b>AUC<sub>i</sub></b>		119,76	53,97	147,47	24,60	0,176

Παρόμοιες ήταν οι τιμές PCWP των δύο ομάδων σε όλες τις μετρήσεις. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Στο γράφημα που ακολουθεί δίνεται η μεταβολή στις τιμές PCWP στον χρόνο, ξεχωριστά για κάθε ομάδα.



Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του PCWP και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Τα αποτελέσματα του μοντέλου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

	$\beta^+$	SE <sup>++</sup>	P
<b>Χρόνος</b>	0,50	0,04	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ομάδα</b>			
διάλυμα NaCl 0,9% (αναφορά)			
Dantrolene sodium (2.0 mg/kg)	0,084	0,59	0,150
<b>Χρόνος*Ομάδα</b>	-0,14	0,06	<b>0,018</b>

<sup>+</sup> συντελεστής εξάρτησης <sup>++</sup> τυπικό σφάλμα συντελεστή

Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του PCWP στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές PCWP ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του dantrolene sodium ως προς τη μείωση της βλάβης εξ ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου σε πειραματικό μοντέλο χοίρου.

Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις του φαρμάκου στην αιμοδυναμική κατάσταση, τον καρδιακό ρυθμό, τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και το φαινόμενο του «απόπληκτου» μυοκαρδίου. Το δείγμα που τελικά μελετήθηκε αποτελούταν από 19 ζώα, χωρισμένα σε 2 ομάδες, ανάλογα με τη χορήγηση ή όχι του σκευάσματος (10 έλαβαν dantrolene 2.0 mg/kg).

Ως προς τη μείωση της βλάβης επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της CK κρεατινοφωσφοκινάσης. Μόνο στην αρχική μέτρηση ήταν παρόμοιες οι τιμές CK των δύο ομάδων. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CK και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του CK στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CK ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Το CK-MB είναι ένας ευαίσθητος δείκτης μυοκαρδιακής νέκρωσης. Με δεδομένο ότι τα επίπεδα του CK-MB αυξάνονται σε βλάβη του μυοκαρδίου ενώ χαρακτηριστικό είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα CK-MB μπορεί να ανιχνευθούν μέσα σε 3 έως 8 ώρες από την έναρξη του θωρακικού άλγους, η εξέταση CK-MB μπορεί να αποκαλύψει περισσότερες πληροφορίες από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ολικής CK που μπορεί αρχικά να μην εμφανίζει αύξηση. Στη μελέτη μας οι τιμές CKMB των δύο ομάδων ήταν παρόμοιες στην αρχική μέτρηση, στις 3,5, 15,5 και 17,5 ώρες. Σε όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CKMB και σαν ανεξάρτητες τον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους.

Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του CKMB στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CKMB ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι Precker et al. (2000) οι οποίοι σε παλαιότερη πειραματική μελέτη που πραγματοποίησαν σε αρουραίους, με τεχνητή βλάβη επαναιμάτωσης μυοκαρδίου, η χορήγηση dantrolene sodium μείωσε τα επίπεδα της CK-MB, υποδηλώνοντας μείωση του κυτταρικού τραυματισμού επαναιμάτωσης σε απομονωμένες καρδιές αρουραίου. Ωστόσο, σε μία άλλη πειραματική μελέτη στα κουνέλια *in vivo*, δεν υπήρξε καμία επίδραση στην έκταση του τραύματος επαναιμάτωσης μετά από περιφερειακή ισχαιμία του μυοκαρδίου.

Ένας ακόμη δείκτης που μετρήθηκε ήταν τα επίπεδα τροπονίνης. Η καρδιακή τροπονίνη I (cTnI) είναι μία υπομονάδα του συμπλόκου ακτίνης-μυοσίνης, της συστατικής πρωτεΐνης του μυϊκού ινιδίου που υπάρχει μόνο στο μυοκάρδιο. Η τροπονίνη T (cTnT) και η ειδική καρδιακή τροπονίνη I είναι οι δύο ισομορφές που διαρρέουν στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της μυοκαρδιακής νέκρωσης και έχουν παρόμοια ακρίβεια στην αναγνώριση της οξείας μυοκαρδιακής βλάβης. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με προκάρδιο πόνο χωρίς έμφραγμα του μυοκαρδίου ακόμη και τα ελαφρώς αυξημένα επίπεδα της καρδιακής τροπονίνης T σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο μακροχρόνιας θνησιμότητας. Οι ερευνητές μελέτησαν περίπου 20.000 ασθενείς που παρουσιάστηκαν στα ιατρεία επειγόντων περιστατικών με πόνο στο στήθος και υποβλήθηκαν σε μέτρηση της υψηλής ευαισθησίας καρδιακής τροπονίνης T. Ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με οξεία αύξηση της τροπονίνης αποκλείστηκαν. Το 99ο εκατοστό μοριακό σημείο αποκοπής για την τιμή της τροπονίνης στη μελέτη ήταν 14 ng / L. Κατά τη διάρκεια περίπου 3 ετών παρακολούθησης το 7% των ασθενών πέθανε. Ο ετήσιος ρυθμός θνησιμότητας όλων των αιτιών ήταν χαμηλότερος (0,5%) μεταξύ των ατόμων με επίπεδα τροπονίνης κάτω από 5 ng / L και στη συνέχεια αυξήθηκε με αυξανόμενο επίπεδο τροπονίνης – φθάνοντας το 33% σε επίπεδα τροπονίνης των 50 ng / L ή υψηλότερα. Μετά από πολυπαραγοντική προσαρμογή, ο κίνδυνος θνησιμότητας διπλασιάστηκε σε επίπεδα τροπονίνης 5-9 ng / L (έναντι <5 ng / L) και ήταν δεκαπλάσιος σε επίπεδα τροπονίνης 50 ng / L ή υψηλότερα. Σύμφωνα με τους ερευνητές τα αποτελέσματα αυτά είναι

διαφωτιστικά καθώς είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι τα υψηλά επίπεδα ευαισθησίας της τροπονίνης T – ακόμη και όταν είναι σταθερά – σηματοδοτούν υψηλότερο κίνδυνο τριετούς θνησιμότητας.

Στις πρώτες μετρήσεις, μέχρι τη 1,5 ώρα, ήταν παρόμοιες οι τιμές της τροπονίνης των δύο ομάδων. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Ενώ στις πρώτες μετρήσεις, μέχρι τη 1,5 ώρα, οι τιμές της τροπονίνης των δύο ομάδων ήταν παρόμοιες, γεγονός που δεν διατηρήθηκε αφού η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το dantrolene sodium έδειξε σημαντικά χαμηλότερες τιμές από αυτή που είχε χορηγηθεί NaCl 0,9%. Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές τροπονίνης και σαν ανεξάρτητες το χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές της τροπονίνης στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές τροπονίνης ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη των Acikel et al. (2005) οι οποίοι σε ένα μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας που προκαλείται από την ισοπροτερενόλη, η χορήγηση Dantrolene μείωσε τα επίπεδα καρδιακής τροπονίνης, χαρακτηριστικό δείκτη κυτταρικής βλάβης του μυοκαρδίου και μείωσε τη σοβαρότητα της ιστολογικής καρδιακής βλάβης που υποδεικνύεται από ηωσινοφιλία και διάμεσο οίδημα.

Επιπλέον, σε όλες σχεδόν τις μετρήσεις ήταν παρόμοιες οι τιμές της καρδιακής παροχής των δύο ομάδων. Μόνο στη μέτρηση των 9,5 ωρών είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες. Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CO και σαν ανεξάρτητες στον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του CO στον χρόνο και μάλιστα με παρόμοιο βαθμό αύξησης. Στην αρχή οι τιμές CO ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του καρδιακού δείκτη στον χρόνο αλλά ο βαθμός μείωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Παρόμοιες ήταν οι τιμές CI των δύο ομάδων μέχρι την μέτρηση στις 15,5 ώρες. Σε όλες τις επόμενες μετρήσεις η ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Επίσης, οι τιμές των AUC<sub>g</sub> ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% ενώ οι τιμές των AUC<sub>i</sub> ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες. Στο μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του CI και σαν ανεξάρτητες στον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους, βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του CI στον χρόνο αλλά ο βαθμός μείωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Στην αρχή οι τιμές CI ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες.

Παρόμοιες ήταν οι τιμές της πίεσης ενσφήνωσης (pulmonary artery wedge pressure–PAWP) των δύο ομάδων σε όλες τις μετρήσεις. Επίσης, οι τιμές των AUC ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες. Στη συνέχεια έγινε μεικτό γραμμικό μοντέλο έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή τις τιμές του PCWP και σαν ανεξάρτητες στον χρόνο, την ομάδα και την αλληλεπίδρασή τους. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του PCWP στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg). Το αποτέλεσμα αυτό έχει άμεση σχέση με τη μείωση της μυοκαρδιακής βλάβης και τη συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας.

Σημαντικά χαμηλότερες τιμές Total LV volume, Total viable volume, Total viable volume outside και Viable risk area είχε η ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Το σχετικό μέγεθος του εμφράγματος (ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο, όπως αυτό αξιολογήθηκε από την παθολογοανατομική εξέταση) ήταν μικρότερο στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene.

Οι παραπάνω μετρήσεις δείχνουν ότι το dantrolene έχει προστατευτική δράση στην βλάβη μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση του μυοκαρδίου, βελτιώνει τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και συμβάλλει στην πρόληψη της αρρυθμίας.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από μια σχετικά πρόσφατη μελέτη των Chou et al. (2015).

Οι Chou et al.(2015) πραγματοποίησαν μελέτη προκειμένου να εκτιμηθεί εάν το dantrolene έχει πρωταρχικό αντιαρρυθμικό αποτέλεσμα και να προσδιορίσουν τον τρόπο δράσης του στο μυοκάρδιο τρωκτικών με τραυματισμούς μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση με ή χωρίς καρδιακή ανεπάρκεια που προκαλείται από βηματοδότηση. Πραγματοποίησαν ταυτόχρονη μεμβράνη τάσης και ενδοκυτταρική χαρτογράφηση  $Ca^{2+}$  για να διερευνήσουν τις ηλεκτροφυσιολογικές και  $Ca^{2+}$  μεταβολές κατά τη διάρκεια χορήγησης Dantrolene στα ζώα που προηγουμένως έχουν επεξεργαστεί με το σύστημα Langendorff. Αυτή είναι μια τεχνική διατήρησης της λειτουργίας της καρδιάς ex vivo. Η καρδιά αφαιρείται από το σώμα του ζώου, τοποθετείται στη συσκευή Langendorff και τροφοδοτείται αντίστροφα, μέσω της αορτής, με ένα διάλυμα εμπλουτισμένο με οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά και ηλεκτρολύτες. Με αυτόν τον τρόπο, αποφεύγονται οι επιπλοκές των in vivo πειραμάτων, όπως οι επιδράσεις του νευρικού συστήματος και των ορμονών του ζωντανού ζώου. Μελετήσαν τις επιδράσεις του dantrolene στην καταστολή της επαγωγίσιμης VPB και VF σε καρδιακές βλάβες μετά από IR με και χωρίς καρδιακή ανεπάρκεια, που προκαλείται από βηματοδότηση. Τα κύρια αποτελέσματα ήταν ότι το dantrolene δεν κατέστειλε τα αυθόρμητα VPBs και την επαγωγή VF και στις δύο ομάδες ενώ έδειξε να έχει αντιαρρυθμική δράση μέσω παράτασης των APD και ERP, τα οποία μπορεί να αποτελούν το υψηλότερο ποσοστό μετατροπής VF σε μικρότερες καρδιές στην ομάδα που δεν είναι σε καρδιακή ανεπάρκεια.

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι το dantrolene ήταν αποτελεσματικό στην καταστολή των πρώιμων κοιλιακών παλμών, VPBs μέσω της μείωσης των διαστολικών ταλαντώσεων SR  $Ca^{2+}$  σε μοντέλα με καρδιακή ανεπάρκεια, HF μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου. Σε δείγματα με προηγηθείσα βλάβη IR, οι Sharma et al. (1983) ανέφεραν ότι η επαναιμάτωση για 30 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του  $Ca^{2+}$  στη ζώνη IR. Ωστόσο, τα δεδομένα δεν έδειξαν μειωμένη τάση για VPB κατά τη διάρκεια της έγχυσης του dantrolene ούτε στην ομάδα HF ούτε στην ομάδα ελέγχου. Χαρακτηριστικά οι Vera et al. (1995) αναφέρουν ότι η ενεργοποιημένη δραστηριότητα μπορεί να μην είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τα VPBs σε περιπτώσεις IR. Οι Yee et al. (1988) σημείωσαν μόνο μικρού εύρους ταλαντώσεις μετά την επαναιμάτωση, χωρίς να καταγράφουν καμία ενεργοποιημένη

δραστηριότητα, γεγονός που δημιουργεί την άποψη ότι υπάρχουν αμφιβολίες για το αν η ενεργοποιημένη δραστηριότητα αποτελεί μηχανισμό αρρυθμιών επαναιμάτωσης. Οι Tamsah et al. (1999) ανέφεραν ότι η εξασθενημένη ανάκτηση της συσταλτικής λειτουργίας και η υπερφόρτωση  $Ca_i$  μετά την βλάβη IR οφείλονται σε μειωμένη πρόσληψη  $SR-Ca^{2+}$ , απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  και δραστηριότητες δέσμωσης ρυανοδίνης. Επομένως, η καταστολή της διαστολικής ροής  $SR-Ca^{2+}$  μόνη της ενδέχεται να μην επαρκεί για τη βελτίωση των συνθηκών υπερφόρτωσης  $Ca_i$  (Tamsah et al. 1999).

Οι Penkoske et al. παλαιότερα ανέφεραν ότι οι αρρυθμίες επαναιμάτωσης ξεκινούν από ενισχυμένη δραστηριότητα βηματοδότη και διατηρούνται με εντοπισμένη και επιβραδυνόμενη αγωγή εντός των περιοχών της βλάβης IR. Τόσο η IR που προκαλείται από τη δυσλειτουργία του καναλιού  $Na^+$  όσο και η αγωγιμότητα μειωμένου διακένου ως αποτέλεσμα του αυξημένου  $Ca_i$  του IR μυοκαρδίου μπορεί να προκαλέσουν ελαττωμένη αγωγή στην περιοχή IR. Οι Salata et al. (1982) ανέφεραν ότι το dantrolene δεν έχει καμία σημαντική επίδραση στην ταχύτητα της ανοδικής φάσης της φάσης 0, αλλά παρατείνει την APD που μεσολαβείται εν μέρει από τη μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ελεύθερου  $Ca^{2+}$ . Επομένως, το dantrolene μπορεί είτε να βελτιώσει την έκπτωση της αγωγιμότητας μειώνοντας τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ελεύθερου  $Ca^{2+}$  (για να βελτιώσει την αγωγιμότητα διακένωσης διακένου) ή περαιτέρω επιβράδυνση της ταχύτητας της αγωγιμότητας μέσω παρατεταμένης APD (ως παρορμήσεις που ταξιδεύουν μέσω μερικώς πυρίμαχου ιστού). Τα δεδομένα έδειξαν ότι το dantrolene επιδείνωσε την καθυστέρηση αγωγής και οδήγησε σε λειτουργικό μπλοκ εξαρτώμενης από τη συχνότητα, το οποίο μπορεί να παίζει ρόλο στη διευκόλυνση της επαγωγής VF. Οι Chou et al (2015) έδειξαν ότι η επιδείνωση της καθυστέρησης αγωγιμότητας προκλήθηκε από παράταση του APD, η οποία εξουδετέρωσε την αρρυθμογένεσή της εμποδίζοντας τη διάδοση των κυματοειδών για να σταματήσει την κοιλιακή μαρμαρυγή (VF).

Επιπλέον, το dantrolene παρατείνει τη διάρκεια του δυναμικού ενεργείας, APD, η οποία από μόνη της μπορεί να μειώσει την κοιλιακή μαρμαρυγή VF και να επηρεάσει την επιμονή της VF μέσω των επιδράσεών της στο μήκος κύματος. Ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της αστάθειας του επερχόμενου κύματος έχει συλλεχθεί από την ανάλυση της σχέσης αποκατάστασης της APD. Η APD ή η καρδιακή ανερεθιστότητα ελαττώνεται ως απάντηση στην αύξηση της καρδιακής συχνότητας.

Συγκεκριμένα, το διάστημα ανάμεσα στο τέλος μιας δυναμικής δράσης και της αρχής της επόμενης ή αλλιώς το διαστολικό διάστημα (DI) καθορίζει το μέγεθος της APD. Η βηματοδότηση με μικρό μήκος κύματος δίνει μικρή DI (και APD) και η καμπύλη αποκατάστασης χαρακτηρίζεται από τη σχέση DI : APD. Όταν ο λόγος της DI προς APD είναι πολύ μεγάλος(π.χ. >1), τότε μικρές αυξήσεις στην DI θα προκαλέσουν μεγάλες αλλαγές στην APD και ακολούθως εναλλαγές της APD. Οι εναλλαγές αυτές μπορεί να είναι είτε σύμφωνες, είτε όχι (αντίθετο μακρύ-βραχύ δυναμικό μεταξύ των κυττάρων). Αυτές οι καταστάσεις είναι έντονα αρρυθμογόνες, με τη μορφή πρόωρων έκτακτων αυτόνομων εκφορτίσεων των κυττάρων με μικρή APD, οι οποίες συναντούν ανερέθιστο ιστό, αποτελούμενο από κύτταρα με ευρεία APD, γεγονός που οδηγεί σε κατακερματισμό του κύματος και μαρμαρυγή. Ωστόσο, οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες και τα δεδομένα χαρτογράφησης έδειξαν επίσης ότι το dantrolene έχει προ-αρρυθμικά αποτελέσματα (δηλαδή επιβράδυνση του δυναμικού, αυξημένη κλίση αποκατάστασης APD και μείωση του ορίου βηματοδότησης της επαγωγής αρρυθμογόνων εναλλακτικών) στο μοντέλο IR. Αυτά τα φαινόμενα έχουν αποδειχθεί ότι δημιουργούν λειτουργική ηλεκτροφυσιολογική διασπορά που αποσταθεροποιεί την εξάπλωση των κυμάτων και ενισχύει την ευπάθεια των ιστών για έναρξη της επανεισόδου.

Η έλλειψη σημαντικών επιδράσεων του dantrolene στην επαγωγιμότητα και τη διατήρηση της VF στην ομάδα HF μπορεί να οφείλεται σε αντιστάθμιση των αντιαρρυθμικών και προαρρυθμικών αποτελεσμάτων της. Από την άλλη πλευρά, το dantrolene είχε υψηλότερο ποσοστό μετατροπής VF στην ομάδα που δεν είχε καρδιακή ανεπάρκεια, κάτι που πιθανότατα οφείλεται σε μεγαλύτερη επίδραση παράτασης της APD σε μικρότερες καρδιές στην ομάδα που δεν ήταν HF σε σύγκριση με την ομάδα HF. Οι Salata et al. έδειξαν ότι το δαντρολένιο παρατείνει την APD, πιθανώς δρώντας ως αναστολέας στα κανάλια Ca<sup>2+</sup> τύπου L, ακολούθως καταστέλλοντας τα ευαίσθητα σε Ca<sup>2+</sup> κανάλια καλίου. Επειδή τα κανάλια τύπου Ca<sup>2+</sup> τύπου L είναι μειωμένα στο HF που προκαλείται από βηματοδότηση, είναι πιθανό λιγότερα Ca<sup>2+</sup> τύπου L. Τα κανάλια είναι διαθέσιμα για να ανταποκριθούν στην ανασταλτική επίδραση του δαντρολενίου, με αποτέλεσμα μικρότερο βαθμό επιμήκυνσης APD στην ομάδα HF.

Το δαντρολένιο έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπει την VF σε περιπτώσεις οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (AMI). Ωστόσο, τα δεδομένα που παρουσιάζονται

υποδηλώνουν ότι το dantrolene δεν έχει σημαντικές επιπτώσεις στην επαγωγιμότητα και τη συντήρηση του VF σε αποτυχημένες καρδιές μετά τον IR τραυματισμό.

Τα κλινικά οφέλη της συνεχούς χρήσης του σε ασθενείς με HF με θεραπεία με AMI και VF storm post reperfusion δεν είναι προφανή και μπορεί να απαιτήσουν περαιτέρω έρευνες.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το dantrolene μπορεί να ελαχιστοποιήσει την IR σε μοντέλα θερμής ισχαιμίας, ωστόσο, μπορεί να προστατεύσει την καρδιά και μετά από παρατεταμένες περιόδους ψυχρής ισχαιμίας παρέχοντας καρδιοπροστασία σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Η χορήγηση με 1μM dantrolene κατά την υποθερμική αποθήκευση σε δείγματα βελτιώνει σημαντικά τη ροή της αορτής και την καρδιακή παροχή. Αντίθετα, υψηλότερες δόσεις στα 40μM dantrolene ήταν τοξικές και κατάργησαν την καρδιακή ανάρρωση (Siegmund et al. 1997). Η κακή λειτουργική ανάκαμψη που παρατηρήθηκε στα 40μM dantrolene μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη νέκρωση του μυοκαρδίου και από την άμεση αρνητική επίδραση στη συστολή του μυοκαρδίου, όπως φαίνεται από την αυξημένη απελευθέρωση LDH και τη μειωμένη ζώνη συστολής αντίστοιχα. Περαιτέρω, την ανασταλτική επίδραση του dantrolene στο  $Ca^H$  απελευθέρωση  $2+$  από το SR είναι πιθανό να αποτρέψει την υπερδιέγερση που προκαλείται από επαναδιάχυση η οποία με τη σειρά της προκαλείται από την ταχεία ανακύκλωση SR  $Ca^{2+}$ . Σε αντίθεση με τις τρέχουσες παρατηρήσεις, προηγούμενες αναφορές δείχνουν μία δοσο-εξαρτώμενη μείωση της απελευθέρωσης LDH. Ωστόσο, η μείωση της καρδιακής συσταλτικότητας έχει επίσης δειχθεί λόγω των μυοχαλαρωτικών χαρακτηριστικών που έχει το dantrolene σε συγκρίσιμες δόσεις (Meyler et al. 1976).

Η καρδιοπροστατευτική σηματοδότηση που είναι υπεύθυνη για τα λειτουργικά οφέλη του dantrolene κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Villanueva, et al. (2018) δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην ενεργοποίηση του AMPKα σε δείγματα στα οποία χορηγήθηκε dantrolene. Παρατηρήθηκαν αντίθετα πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε σχέση με το μονοπάτι της κίνησης διάσωσης από βλάβες επαναιμάτωσης, reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway RISK. Η αυξημένη σηματοδότηση ERK1 / 2 είναι απίθανο να εξηγήσει το παρατηρούμενο λειτουργικό όφελος καθώς δεν υπήρχε συσχέτιση με τη λειτουργική ανάκαμψη. Δεύτερον, παρατηρήθηκε μία



μείωση της φωσφορυλίωσης AKT σε δείγματα μετά από χορήγηση dantrolene, η οποία έρχεται σε αντίθεση με την αυξημένη φωσφορυλίωση AKT που παρατηρείται συνήθως σε σχέση με την καρδιοπροστατευτική δράση (Hausenloy et al. 2006). Η επίδραση που έχει το dantrolene στις προαναφερθείσες οδούς σηματοδότησης δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως. Ωστόσο, σε μοντέλα σκελετικών μυών σηματοδότησης που προκαλείται από καφεΐνη, το dantrolene δε μεταβάλλει τη φωσφορυλίωση AKT αλλά αναστέλλει την ενεργοποίηση του AMPKα (Jensen et al. 2007).

Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι το στενό θεραπευτικό εύρος δόσεων συμπληρώματος dantrolene που αντιστοιχούσε σε λειτουργικό όφελος παρουσιάζει πιθανό περιορισμό για την κλινική μετάφραση. Δεδομένου ότι το dantrolene ρυθμίζει την απελευθέρωση ασβεστίου από το SR, είναι πιθανό τα λειτουργικά και σηματοδοτικά αποτελέσματα να εξαρτώνται από το ασβέστιο και να επηρεάζονται από τις συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  στο σύστημα διάχυσης. Αυτό ισχύει σε μελέτες όπου οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  του ρυθμιστικού διαλύματος KHB άλλαξαν την καρδιακή ισομετρική δύναμη παρουσία και dantrolene (Fratea et al. 1997). Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, η μεσολαβητική αναστολή της απελευθέρωσης ασβεστίου μειώνεται όπως παρατηρείται σε μελέτες του καναλιού RyR1. Επιπλέον, η δομική διαμόρφωση του RyR2 μπορεί να περιορίσει την πρόσδεση του δαντρολένιου υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, η ισχαιμία/επαναιμάτωση από μόνη της αυξάνει σημαντικά τις ενδοκυτταρικές αποθήκες ασβεστίου και μπορεί να παρέχει την απαιτούμενη τροποποίηση της θέσης σύνδεσης RyR2 με το dantrolene (Kondratiev et al. 2008;Wold et al. 2013).

Έχει προταθεί ότι το dantrolene μπορεί κατά προτίμηση να έχει πρόσβαση στη θέση σύνδεσης RyR2 όταν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τομέων διαταράσσονται υπό συνθήκες κυτταρικού στρες όπως με τη γήρανση. Πράγματι, φαίνεται ότι το dantrolene διορθώνει την οποία δυσλειτουργία που προκαλείται από το ασβέστιο σε ηλικιωμένα καρδιομυοκύτταρα περισσότερο από ότι στα νεαρά καρδιομυοκύτταρα που υποδηλώνει ότι η καρδιοπροστασία με τη μεσολάβηση του dantrolene μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική σε ηλικιωμένους δότες (Domeier et al., 2014).

Στη μελέτη τους οι Villanueva, et al. (2018) έδειξαν το καρδιοπροστατευτικό όφελος του συμπληρώματος 1  $\mu$ M dantrolene σε ηλικιακή ομάδα των 3 μηνών που

όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Είναι πιθανό η λειτουργική ανάκαμψη των μεγαλύτερων σε ηλικία καρδιών (δηλ. 18 μηνών) μετά τη έγχυση dantrolene να εμφανίζει μεγαλύτερη διαφορά σε σύγκριση με τους ελέγχους, καθώς προηγούμενη εργασία που χρησιμοποίησε μεγαλύτερες σε ηλικία καρδιές έδειξε μεγαλύτερη καρδιακή ανάρρωση, σε καρδιές 18 μηνών έναντι 12 μηνών. Ωστόσο, οι λειτουργικές μελέτες που χρησιμοποιούν καρδιές δωρητών 12 μηνών και άνω παρουσιάζουν υλικοτεχνικές προκλήσεις λόγω της αυξημένης τριβής και του κόστους που σχετίζεται με τη διατήρηση επαρκών ζώων για την εξασφάλιση επαρκών αριθμών για πειραματικές ομάδες. Λόγω του περιορισμένου αριθμού ζώων ηλικίας 12 μηνών που ήταν για τη μελέτη, δοκιμάστηκε μόνο η βέλτιστη συγκέντρωση dantrolene και όχι διαφορετικές δόσεις του σκευάσματος. Συμπερασματικά, έχει αποδειχθεί ότι η συμπλήρωση του dantrolene βελτιώνει τη λειτουργική ανάκαμψη μετά από παρατεταμένη υποθερμική αποθήκευση καρδιών δότη από νεαρές αλλά όχι σε μεγαλύτερες καρδιές. Η μελέτη των Villanueva, et al. (2018) δείχνει ένα στενό θεραπευτικό παράθυρο για το dantrolene που υποδηλώνει ότι η δοκιμή σε ένα κλινικά σχετικό μοντέλο που ενσωματώνει εγκεφαλικό θάνατο μπορεί να απαιτεί περαιτέρω βελτιστοποίηση της δόσης.

Ένας κύριος στόχος στη μεταμόσχευση καρδιάς είναι η πρόληψη και ο μετριασμός του ισχαιμικού τραυματισμού κατά την προμήθεια οργάνων και η ψυχρή ισχαιμία κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά. Η αποτυχία των εξαρτώμενων από ATP αντλιών ιόντων κατά τη διάρκεια της υποξίας προκαλεί επιζήμιες αυξήσεις στις κυτταροσολικές συγκεντρώσεις  $\text{Na}^+$  και  $\text{Ca}^{2+}$ . Η θερμή επανέγχυση αίματος και η επαναξυγόνωση της καρδιάς του δότη προκαλούν περαιτέρω τραυματισμό λόγω της ταχείας ροής ATP και της αυξημένης απελευθέρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο(SR) μέσω υποδοχέων ρινοδίνης.

Υψηλές συγκεντρώσεις  $\text{Ca}^{2+}$  κυτταροσολικού προωθούνταχείες ταλαντώσεις  $\text{Ca}^{2+}$  και απελευθέρωση ασβεστίου που προκαλείται από ασβέστιο συμβάλλοντας στο μιτοχονδριακό  $\text{Ca}^{2+}$  πρόσληψη, άνοιγμα πόρων μετάβασης διαπερατότητας μιτοχονδρίων (mPTP) και επακόλουθη απόπτωση και νέκρωση (Piper et al. 2002). Η φαρμακολογική διαμόρφωση της απελευθέρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  από RyRs είναι μία προσέγγιση που θα μπορούσε να μειώσει τον τραυματισμό ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (IRI) της καρδιάς του δότη που προκαλείται από υπερφόρτωση  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ο κύριος μελετημένος ανταγωνιστής του υποδοχέα ρυανοδίνης, το dantrolene, χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία κακοήθους υπερθερμίας σε άτομα με μετάλλαξη στο ισόμορφο RyR1 του σκελετικού μυός.

Το dantrolene δεσμεύει επίσης την καρδιακή ισομορφή RyR2 και αναστέλλει την απελευθέρωση SR Ca<sup>2+</sup> μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση RyR από μια «μη φερμουάρ» διαμόρφωση υπό συνθήκες στρες (π.χ. υποξία) σε μια «διαμορφωμένη» κατάσταση που διατηρεί τη δέσμευση της καλμοδουλίνης και αποτρέπει τη διαστολική απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup>. Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει τα αντι-αρρυθμογόνα αποτελέσματα του dantrolene. Το dantrolene ανέστειλε τα αργά προς τα μέσα ρεύματα και παράτεινε τη διάρκεια του δυναμικού δράσης σε απομονωμένους σινοατριακούς και κολποκοιλιακούς κόμβους και μείωσε τις αρρυθμίες σε ένα μοντέλο ποντικού με επαγόμενη από άσκηση κοιλιακή ταχυκαρδία που περιέχει μια μετάλλαξη RyR2 ανάλογη με την ανθρώπινη κατεχολαμινική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία (CPV) .

Τα περιστατικά αυθόρμητης απελευθέρωσης Ca<sup>2+</sup> από SR RyRs μειώθηκαν σημαντικά στα καρδιομυοκύτταρα CPVT που έλαβαν δαντρολένη σε καρδιομυοκύτταρα που προέρχονταν από καρδιακή ανεπάρκεια. Επίσης, η χορήγηση dantrolene ανέστειλε τα αργά προς τα μέσα ρεύματα και παράτεινε τη διάρκεια του δυναμικού δράσης σε απομονωμένους σινοατριακούς και κολποκοιλιακούς κόμβους και μείωσε τις αρρυθμίες σε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικού με επαγόμενη από άσκηση κοιλιακή ταχυκαρδία που κατά τη διάρκεια καρδιοπνευμονικής ανάνηψης βοήθησε στην επιστροφή της αυθόρμητης κυκλοφορίας μετά την απινίδωση σε μοντέλο VF χοίρου. Στην ίδια μελέτη, η έγχυση dantrolene ανέστειλε τα αργά προς τα μέσα ρεύματα και παράτεινε τη διάρκεια του δυναμικού δράσης σε απομονωμένους σινοατριακούς και κολποκοιλιακούς κόμβους και μείωσε τις αρρυθμίες. Σε ένα μοντέλο ποντικού με επαγόμενη από άσκηση κοιλιακή ταχυκαρδία που από καρδιές κουνελιού με έγχυση Langendorff αύξησε την αντίσταση στην επαγόμενη από ισοπροτερενόλη VF και μείωσε τη διαστολική απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το RyR2. Αυτές οι σημαντικές μελέτες δείχνουν ότι η θεραπεία με Dantrolene μπορεί να διορθώσει τα μη φυσιολογικά καρδιακά φυσιολογικά συμβάντα που προκαλούνται από την τροποποιημένη απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> .

Προηγούμενες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει διάφορα μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε δοκιμή κατά πόσο το dantrolene ανέστειλε τα αργά προς τα μέσα ρεύματα και παρέτεινε τη διάρκεια του δυναμικού δράσης σε απομονωμένους σινοατριακούς και κολποκοιλιακούς κόμβους και μείωσε τις αρρυθμίες σε ένα μοντέλο ποντικού με επαγόμενη από άσκηση κοιλιακή ταχυκαρδία που ακόμα μπορεί να μειώσει την καρδιομυοκύτταρακη βλάβη μετά από την επαναιμάτωση.

Η χορήγηση του dantrolene σε Langendorff πριν από μια νορμοθερμική ισχαιμία βελτίωσε σημαντικά τη συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε και η χορήγηση κατά την επαναιμάτωση προκάλεσε ένα δόσοεξαρτώμενο προστατευτικό αποτέλεσμα που υποδεικνύεται από μειωμένη απελευθέρωση LDH και νέκρωση ιστών. Παρά τους βιοχημικούς δείκτες που καταδεικνύουν μειωμένο IR, δόσεις dantrolene άνω των 16  $\mu\text{M}$  άσκησαν αρνητική ινοτροπική επίδραση. Σε μια παρόμοια μελέτη, η χορήγηση Dantrolene (25  $\mu\text{M}$  ή 100  $\mu\text{M}$ ) κατά τη διάρκεια της αρχικής επανέγχυσης των 15 λεπτών μείωσε την απελευθέρωση κινάσης κρεατίνης παρά την έλλειψη λειτουργικής ανάκαμψης σε όλες τις ομάδες θεραπείας (Acikel et al. 2005).

## ΕΠΙΚΡΙΣΗ

Η φαρμακολογική διαμόρφωση της απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  από RyRs είναι μια προσέγγιση που θα μπορούσε να μειώσει τον τραυματισμό ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (IRI) της καρδιάς του δότη που προκαλείται από υπερφόρτωση  $Ca^{2+}$ . Το dantrolene έχει περιγραφεί ότι βελτιώνει την καρδιακή συσταλτικότητα σε καρδιακές διαταραχές, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στη χρήση του για τη μείωση των αρρυθμιών στη δομική καρδιακή νόσο. Η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (CHF) έχει συσχετιστεί με μια αρνητική σχέση συχνότητας δύναμης (φαινόμενο Bowditch) στην αποτυχία του μυοκαρδίου. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τη σχέση αρνητικής δύναμης-συχνότητας μυοκαρδίου με βελτίωση της ινοτροπικής απόκρισης στην ισοπροτερενόλη στο μυοκάρδιο. Αυτή η βελτιωμένη συσταλτικότητα δεν έχει ακόμη συσχετιστεί με συνολικές μεταβολές στο κυτταροπλασματικό  $[Ca^{2+}]$  ενώ θεωρείται ότι σχετίζεται με τη βελτίωση της διαστολικής απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$ . Περαιτέρω στοιχεία για τη μείωση του  $Ca^{2+}$  απελευθέρωσης σε βελτιωμένη συσταλτικότητα καταγράφηκαν από τους Kobayashi et al. οι οποίοι εξέτασαν τις επιδράσεις του dantrolene στην καρδιακή λειτουργία στις καρδιές μετά από επαναιμάτωση.

Η χορήγηση δαντρολένιου αποδείχθηκε ότι συνδέεται άμεσα κοντά στον N-τερματικό τομέα στο RyR2 στα αμινοξέα 601-620, μια τοποθεσία κρίσιμη για αλληλεπιδράσεις N-τερματικού και κεντρικού τομέα. Ενώ η αποσυμπίεση των N-τερματικών και των κεντρικών περιοχών συσχετίστηκε με αυθόρμητη διαρροή SR  $Ca^{2+}$ , το dantrolene καταστέλλει τόσο την αποσυμπίεση όσο και τη διαρροή SR  $Ca^{2+}$  (σπινθήρες) και τελικά καθυστερεί τις μεταπολωσεις, οι οποίες είναι συχνές στην καρδιακή ανεπάρκεια. Επιπλέον, το dantrolene αποκαθιστά τη δέσμευση της καλμοδουλίνης (CaM) στο RyR2, το οποίο συνήθως εξασθενεί σε καρδιακή ανεπάρκεια. Έτσι, το dantrolene φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο μόριο για τη θεραπεία των αρρυθμιών σε ασθενείς με CPVT και μπορεί να εξασθενήσει την καρδιακή δυσλειτουργία του  $Ca^{2+}$  που σχετίζεται με την καρδιακή ανεπάρκεια.

Στα πλαίσια της βλάβης κατά την επαναιμάτωση το dantrolene έχει γενικά δείξει ότι λειτουργεί κυτταροπροστατευτικά. Το 1999 οι Preckel et al. χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* πειραματικό μοντέλο έδειξαν ότι μειώνει την απελευθέρωση της κρεατινικής κινάσης, υποδηλώνοντας έτσι μείωση της βλάβης κατά την επαναιμάτωση. Στην πειραματική μας μελέτη φαίνεται ότι χορήγηση dantrolene

έχει προστατευτική δράση στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, κάτι που αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα των βιοδεικτών και από το ανατομικό παρασκεύασμα. Η χορήγηση dantrolene θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία ενάντια στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στους ανθρώπους.

Οι μέχρι τώρα μελέτες της επίδρασης του dantrolene στο μυοκάρδιο έχουν επίσης γίνει σε πειραματόζωα και συνοδεύτηκαν από θετικά αποτελέσματα, τόσο σε μικροσκοπικό επίπεδο (ιστολογικές εξετάσεις) όσο και μακροσκοπικό (δείκτες λειτουργικότητας αριστερής κοιλίας). Εν κατακλείδι, η χορήγηση dantrolene στην καρδιακή ισχαιμία/επαναιμάτωση είναι δυνατό να μειώσει την μυοκαρδιακή βλάβη σε αξιόλογο βαθμό. Οι συνθήκες είναι πιθανώς ώριμες και για την πρώτη μελέτη σε ασθενείς. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες για να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Γενικό Μέρος

Το ασβέστιο αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα, με εξέχοντα ρόλο στη βλάβη που δημιουργείται κατά την επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου (ischemia/reperfusion injury). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (SR) αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για το σκοπό αυτό. Ο υποδοχέας της ρυανοδίνης (RyR2), μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση, έχει συσχετιστεί με τη συσσώρευση ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, φαινόμενο το οποίο με τη σειρά του συμβάλλει στη βλάβη κατά την επαναιμάτωση. Το dantrolene sodium, το οποίο αποτελεί θεραπεία εκλογής για την κακοήγη υπερθερμία, είναι ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της ρυανοδίνης, ο οποίος αναστέλλει την παθολογικά αυξημένη απελευθέρωση ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο των προσβεβλημένων ατόμων. Στην καρδιαγγειακή νόσο, η αλληλεπίδραση του dantrolene με τους υποδοχείς RyR2 των πασχόντων καρδιακών μυοκυττάρων έχει τεκμηριωθεί με μια πλειάδα μελετών, τόσο στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας, όσο και στην περίπτωση της κατεχολαμινεργικής πολύμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας.

### Ειδικό Μέρος

**Σκοπός:** Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του dantrolene sodium ως προς τη μείωση της βλάβης εξ ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Το σύνολο των προηγηθεισών επιτυχημένων προσπαθειών έγινε σε πειραματικά μοντέλα τρωκτικών. Εξ όσων γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη προσπάθεια που έγινε σε μεγαλύτερα θηλαστικά, των οποίων η καρδιακή φυσιολογία και ανατομία ομοιάζει με αυτή της ανθρώπινης καρδιάς. Σε ένα δεύτερο επίπεδο, σκοπός ήταν επίσης η διερεύνηση των επιδράσεων του φαρμάκου στον καρδιακό ρυθμό, στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και στο φαινόμενο του «απόπληκτου» μυοκαρδίου (myocardial stunning), ενώ σε ένα τρίτο επίπεδο επιθυμητή ήταν και η διερεύνηση των πιθανών παθοφυσιολογικών μηχανισμών, μέσω των οποίων επιδρά το φάρμακο.

**Μέθοδος και υλικά:** Η μελέτη συμπεριέλαβε δεκαεννέα ευμεγέθεις οικόσιτους χοίρους. Μετά το πέρας μιας περιόδου σταθεροποίησης 30 λεπτών, η είσοδος στη θωρακική κοιλότητα επιτεύχθηκε με μέση στερνοτομή και διάνοιξη του περικάρδιου,

ώστε να ανευρεθεί ο πρόσθιος κατιόντας κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας (LAD). Ακολούθησε προσωρινή απολίνωση του αγγείου περιφερικά του 2ου διαγωνίου κλάδου αυτού με τουρνικέ, με μέθοδο που αποτρέπει τη βλάβη του τοιχώματος του αγγείου και την απόφραξη αυτού κατά την επαναιμάτωση που ακολούθησε. Μετά την πάροδο 75 λεπτών ισχαιμίας έγινε άρση της απόφραξης και 24ωρη μελέτη της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου. Μετά την παρέλευση των 24 ωρών της επαναιμάτωσης έγινε έγχυση υπέρκορου διαλύματος KCl στην αορτή με σκοπό την ευθανασία του ζώου. Τα ζώα διαχωρίστηκαν με τυχαιοποιημένη κατανομή σε δύο ομάδες, η μία των 10 χοίρων, στους οποίους χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg) με bolus έγχυση, διά του κεντρικού φλεβικού καθετήρα, ως δόση φόρτισης, 15 λεπτά προ της άρσης της ισχαιμίας και στην άλλη ομάδα των 9 όπου χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9%. Ακολούθως χορηγήθηκε συνεχής ενδοφλέβια έγχυση (διά του κεντρικού φλεβικού καθετήρα) dantrolene (με ροή 0,25 mg/kg/hr) ή διάλυμα NaCl 0,9% αντίστοιχα, ως δόση συντήρησης, μέχρι την ολοκλήρωση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Μετά την ολοκλήρωση 24 ωρών επαναιμάτωσης ο LAD απολινώθηκε εκ νέου στο ίδιο σημείο, η ανιούσα αορτή αποκλείστηκε (cross clamp) και έγινε έγχυση στη στεφανιαία κυκλοφορία 1 ml/kg της χρωστικής Evan's blue (2%) για να αφορίσει το ισχαιμικό μυοκάρδιο. Στη συνέχεια χορηγήθηκε υπέρκορο διάλυμα KCl στη στεφανιαία κυκλοφορία με σκοπό την ευθανασία του ζώου δια της καρδιακής ανακοπής. Έπειτα από εκτομή και έκλυση της καρδιάς η δεξιά κοιλία και οι κόλποι αυτής διαχωρίστηκαν και απορρίφθηκαν. Η αριστερή κοιλία τεμαχίστηκε (από κορυφή προς βάση) σε λεπτά τεμάχια πάχους περίπου 0,5 cm. Η βασική επιφάνεια κάθε τεμαχίου οριοθετήθηκε με ινδική μελάνη η περιοχή του μυοκαρδίου που δεν προσέλαβε κυανούν του Evan (περιοχή σε κίνδυνο – area at risk/aaR). Τα ιστοτεμάχια εμβαπτίστηκαν για 10 min στους 37°C σε διάλυμα 0.8% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) το οποίο χρωματίζει το βιώσιμο μυοκάρδιο με ζωηρό κεραμέρυθρο χρώμα ενώ η περιοχή που δεν χρωματίστηκε από το TTC αντιπροσώπευε το νεκρωτικό μυοκάρδιο. Οι τομές φωτογραφήθηκαν ψηφιακά και η νεκρωτική περιοχή καθώς και η περιοχή σε κίνδυνο, προσδιορίστηκαν επακριβώς με επιπεδομετρία (planimetry), ενώ το σχετικό μέγεθος του εμφράγματος (η έκταση της νέκρωσης) εκφράστηκε ως ποσοστό νεκρωτικής περιοχής ως προς την συνολική περιοχή σε κίνδυνο (I/aaR). Η συγκέντρωση των επιπέδων της κινάσης της φωσφοκρεατίνης (CK), του καρδιακού ισοενζύμου της κινάσης της κρεατίνης (CK-MB) και της τροπονίνης I (cTnI) στο πλάσμα των χοίρων προσδιορίστηκε την ώρα 0 (προ της απολίνωσης του LAD),



αμέσως μετά την αποκατάσταση της ροής και στη συνέχεια ανά δίωρο.. Με καθετήρα πνευμονικής αρτηρίας (Swan–Ganz) πληθώρα αιμοδυναμικών παραμέτρων καταγράφηκαν σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία (ανά δίωρο) όπως κοιλιακές πιέσεις, καρδιακή παροχή (cardiac output - CO), καρδιακός δείκτης (cardiac index - CI), όγκος παλμού (stroke volume - SV), δείκτης όγκου παλμού (SV index - SVI) και αγγειακές αντιστάσεις σε συστηματική (total peripheral resistance - TPR) και πνευμονική κυκλοφορία (pulmonary vascular pressure – PVR, pulmonary artery wedge pressure - PAWP).

**Αποτελέσματα:** Το δείγμα αποτελείται από 19 ζώα, χωρισμένα σε 2 ομάδες: στην πρώτη ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium (2.0 mg/kg) που είχε 10 ζώα (52,6%) με μέσο βάρος τα 46,7 kgr (SD=3,5 kgr) και τη δεύτερη ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα NaCl 0,9% που είχε 9 ζώα (47,4%) με μέσο βάρος τα 45,5 kgr (SD=3,0 kgr). Το βάρος ήταν παρόμοιο στις δύο ομάδες (p=0,430). Και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές της κινάσης της κρεατίνης (CK) στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές του καρδιακού ισοενζύμου της κινάσης της κρεατίνης (CK-MB) στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές της τροπονίνης στο χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές της καρδιακής παροχής (Cardiac Output, CO) στον χρόνο και μάλιστα με παρόμοιο βαθμό αύξησης. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική μείωση στις τιμές του καρδιακού δείκτη (Cardiac index CI) στον χρόνο αλλά ο βαθμός μείωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Βρέθηκε ότι και στις δύο ομάδες υπήρξε σημαντική αύξηση στις τιμές της πίεσης ενσφήνωσης (Pulmonary Capillary Wedge Pressure - PCWP) στον χρόνο αλλά ο βαθμός αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερος στην ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium. Σημαντικά χαμηλότερες τιμές Total LV volume, Total viable volume, Total viable volume outside και Viable risk area είχε η ομάδα που χορηγήθηκε dantrolene sodium.

**Συμπεράσματα και Προοπτικές:** Στα πλαίσια της βλάβης κατά την επαναιμάτωση το dantrolene έχει γενικά δείξει ότι λειτουργεί κυτταροπροστατευτικά. Στην πειραματική μας μελέτη φαίνεται ότι χορήγηση dantrolene έχει προστατευτική δράση στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, κάτι που αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα των βιοδεικτών και από το ανατομικό παρασκεύασμα. Η χορήγηση dantrolene θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία ενάντια στη βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης στους ανθρώπους. Οι συνθήκες είναι πιθανώς ώριμες και για την πρώτη μελέτη σε ασθενείς. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες για να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση.

## **ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **Abstract**

**Introduction:** The intracellular calcium ( $Ca^{+2}$ ) homeostasis is impaired and this is the crucial step of ischemia-reperfusion injury. Myocardial ischemia triggers increased  $Ca^{+2}$  release through the sarcoplasmic reticulum (SR) leading to cytosolic  $Ca^{+2}$  overload, subsequently resulting in additional irreversible injury. This  $Ca^{+2}$  release is partially carried out through major  $Ca^{+2}$  release channels called ryanodine receptors (RyR2). Dantrolene sodium is a RyR2 antagonist, its clinical use has been established since 1980s for effectively dealing with malignant hyperthermia. Therefore, a hypothesis has been created that dantrolene sodium could also modify SR  $Ca^{+2}$  release occurring during myocardial ischemia-reperfusion as a result of heart surgery under cardiopulmonary bypass or coronary artery balloon angioplasty. There is evidence that dantrolene may also have a relevant impact on cardiac muscle.

**Objective:** The objective of the present study was to evaluate the in-vivo impact of dantrolene sodium on myocardial ischemia-reperfusion injury in swine models. We hypothesized that administering dantrolene at the onset of the reperfusion period could be protective against myocardial ischemia-reperfusion injury. Although previous experimental attempts have successfully been conducted in rodents, this study is the first experimental study in larger mammals whose cardiac physiology and anatomy resemble those of human hearts.

**Materials and Methods:** Nineteen large domestic animals of similar age and body weight were included and randomized into control and study groups. The thoracic cavity of the animals was accessed through median sternotomy under general anesthesia. The left anterior descending coronary artery (LAD) was ligated distally to the second diagonal branch via a vascular tourniquet. After 75 minutes of ischemia, the tourniquet was released (time point 0) and reperfusion for 24 hours was allowed. During this reperfusion period, all animals were left intubated and sedated having their chests open. After 24 hours of reperfusion, the LAD was re-ligated at the same point, the ascending aorta was clamped and 1 mL/kg of Evan's blue dye (2%) was injected into the coronary circulation. Subsequently, the animals were euthanized by intracoronary overdose KCl delivery. After resection and rinsing of the heart, the right ventricle and atrium were separated and discarded. The left ventricle was cut into thin sections of about 0.5-cm length. The area at risk (aaR) of each piece was recognized by the absence of Evan blue uptake. All myocardial sections were immersed in a 0.8% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) solution for 10 minutes at 37°C. TTC solution gave an intense reddish color to the viable myocardium, whereas not stained areas were indicative of necrotizing myocardium (I). Planimetry, measuring surface areas and perimeters between differently traced regions, was used to accurately determine the aaR and I areas, while the relative infarct size was expressed as a percentage of I to aaR. (I/aaR). Levels of cTnI, CK, and CKMB in animals blood were measured at 0 hours (before LAD ligation), immediately after restoring the coronary flow and every 2 hours thereafter. Various hemodynamic parameters including intraventricular pressure, cardiac output (CO), cardiac index (CI), and pulmonary artery wedge pressure (PAWP) were also recorded through a Swan Ganz catheter which was preoperatively placed through the right internal jugular vein of every experimental model.

**Results:** A total of 19 animals (10 in group dantrolene sodium and 9 in group NaCl) were included in the study. At ischemia and at almost all the other time points dantrolene sodium group had significantly lower values of CK and CKMB as compared to NaCl group. Significantly lower values of Troponin were recorded for the dantrolene sodium group for all time points from second hour to 24 hours. CO and PCWP were not different between the study groups at any time point, while CI was greater for dantrolene sodium group from 16 to 24 hours. Calculation and comparison of AUCg and AUCi for all study indices (table 2) showed significantly lower values for

dantrolene sodium group concerning CK, CKMB and Troponin. No significant differences were found for the AUCs of CO and PCWP, while AUCg for CI was greater for dantrolene sodium group. PCWP showed a significant increase during follow up, while CO and CI showed a significant decrease during follow up. The interaction of study group with time was significant for all indices except for CO, indicating that dantrolene sodium group had lower increase in CK, CKMB, Troponin and PCWP compared to NaCl group. Furthermore, a significant interaction effect of study group with time was found for CI indicating that NaCl group had greater decrease in CI as compared to dantrolene sodium group. Volume comparisons between dantrolene sodium and NaCl groups showed significantly lower values of Total LV volume, Total viable volume, Total viable volume outside and Viable risk area in the dantrolene sodium group.

**Conclusion:** In conclusion, the in vivo cardioprotective role of dantrolene sodium against ischemia-reperfusion injury in 10 swine models compared to 9 control models was shown. Significantly lower postischemic levels of CK, CKMB and cTnI which are indicative of less ischemia-reperfusion injury were reported after dantrolene administration. Greater CI in the dantrolene group, as well as significantly lower values of total LV volume, total viable volume, total viable volume outside and viable risk area also confirmed the cardioprotective role of dantrolene sodium. Therefore, modulating intracellular Ca<sup>2+</sup> channels can be a novel cytoprotective strategy against ischemia-reperfusion injury. However, there are only experimental animal studies proving the aforementioned.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Aarsaether, E., Rosner, A., Straumbotn, E. & Busund, R. Peak longitudinal strain most accurately reflects myocardial segmental viability following acute myocardial infarction - an experimental study in open-chest pigs. *Cardiovascular ultrasound* 10, 23, doi:10.1186/1476-7120-10-23 (2012).
- 2) Acikel M, Buyukokuroglu ME, Erdogan F, Aksoy H, Bozkurt E, Senocak H. Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings. *Int J Cardiol.* 98(3):389–94. 10.1016/j.ijcard.2003.10.054 (2005)
- 3) Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nature medicine* 2004; 10:1200-7.
- 4) Anderson ME, Higgins LS, Schulman H. Disease mechanisms and emerging therapies: protein kinases and their inhibitors in myocardial disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3: 437–45.
- 5) Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 2010; 121:80-90.
- 6) Avner BS, Shioura KM, Scruggs SB et al. Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification. *Molecular and cellular biochemistry* 2012; 363:203-15.
- 7) Bandschapp, O. & Girard, T. Malignant hyperthermia. *Swiss medical weekly* 142, w13652, doi:10.4414/smw.2012.13652 (2012).
- 8) Becker LC, Levine JH, DiPaula AF et al. Reversal of dysfunction in post ischemic stunned myocardium by epinephrine and post extra systolic potentiation. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 580-589.
- 9) Bell JR, Curl CL, Ip WT, Delbridge LM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase inhibition suppresses post-ischemic arrhythmogenesis and

mediates sinus bradycardic recovery in reperfusion. *International journal of cardiology* 2012; 159:112-8.

- 10) Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007;292:H1227-36.
- 11) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS et al. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4695-4699.
- 12) Bolli R. Basic and clinical aspects of myocardial stunning. *Prog. 172 Cardiovasc. Dis.* 1998; 40: 477-516.
- 13) Bonora M, Bononi A, De Marchi E et al. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell cycle* 2013; 12:674-83
- 14) Boys, J. A., Toledo, A. H., Anaya-Prado, R., Lopez-Neblina, F. & Toledo-Pereyra, L. H. Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* 58, 875-882, doi:10.231/JIM.0b013e3181e5d719 (2010).
- 15) Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014; 73:70-9.
- 16) Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.
- 17) Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research* 2015; 116:531-49.
- 18) Canton M, Neverova I, Menabo R, Van Eyk J, Di Lisa F. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;286:H870-7

- 19) Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research* 2014;114:524-37.
- 20) Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovascular toxicology* 2002;2: 165-80.
- 21) Correia, A. C., Silva, P. C. & da Silva, B. A. Malignant hyperthermia: clinical and molecular aspects. *Revistabrasileira de anestesiologia*62, 820-837, doi:10.1016/s0034-7094(12)70182-4 (2012).
- 22) Crompton M, Costi A. A heart mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *The Biochemical journal* 1990; 266:33-9.
- 23) Do Carmo, P. L. et al. Intravenous administration of azumolene to reverse malignant hyperthermia in swine. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*24, 1224-1228, doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0556.x (2010).
- 24) Domeier TL, Roberts CJ, Gibson AK, Hanft LM, McDonald KS, Segal SS. Dantrolene suppresses spontaneous Ca<sup>2+</sup> release without altering excitation-contraction coupling in cardiomyocytes of aged mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;307(6):H818–29. pmid:25038147; PubMed Central PMCID: PMC4166750
- 25) Douglas, (2005) ANATOMY OF THE HEART, διαθέσιμο στη: [http://dscholarship.pitt.edu/7933/1/McConahyDouglas\\_June2007.pdf](http://dscholarship.pitt.edu/7933/1/McConahyDouglas_June2007.pdf)
- 26) Dulhunty AF, Beard NA, Pouliquin P, CasarottoMG . Agonists and antagonists of the cardiac ryanodine receptor: potential therapeutic agents? *Pharmacol Ther* 2007; 113: 247–63.
- 27) Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O<sub>2</sub> radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2001;280:H2649-57.
- 28) Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in pharmacology* 2014; 5:59.

- 29) Elrod JW, Wong R, Mishra S et al. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca(2+) exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *The Journal of clinical investigation* 2010; 120:3680-7.
- 30) Fauconnier, J. et al. Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13258-13263, doi:10.1073/pnas.1100286108 (2011).
- 31) Feniouk BA, Yoshida M. Regulatory mechanisms of proton-translocating F(O)F (1)-ATP synthase. *Results and problems in cell differentiation* 2008; 45:279-308.
- 32) Fishbein, M. C. et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *American heart journal* 101, 593-600 (1981).
- 33) Fratea S, Langeron O, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. In vitro effects of dantrolene on rat myocardium. *Anesthesiology*. 1997; 86(1):205–15. Epub 1997/01/01. PMID: 90
- 34) Fratea S, Langeron O, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. In vitro effects of dantrolene on rat myocardium. *Anesthesiology*. 1997;86(1):205–15. Epub 1997/01/01. pmid:9009956
- 35) Fruen BR, Mickelson JR, Louis CF. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J Biol Chem* 1997, 272:26965–26971
- 36) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
- 37) Galvez-Monton, C. et al. Comparison of two preclinical myocardial infarct models: coronary coil deployment versus surgical ligation. *Journal of translational medicine* 12, 137, doi:10.1186/1479-5876-12-137 (2014).
- 38) Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodriguez-Sinovas, A. & Piper, H. M. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovascular research* 94, 168-180, doi:10.1093/cvr/cvs116 (2012).



- 39) George CH, Higgs GV, Lai FA. Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circ Res.* 2003; 93:531-540.
- 40) Giorgi C, Baldassari F, Bononi A et al. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell calcium* 2012; 52:36-43.
- 41) Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM. Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 20612–7.
- 42) Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circulation research* 2009; 104:150-8.
- 43) Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society transactions* 2010; 38:841-60.
- 44) Hansford RG, Lakatta EG. Ryanodine releases calcium from sarcoplasmic reticulum in calcium-tolerant rat cardiac myocytes. *J Physiol* 1987, 390:453–467.
- 45) Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular research.* 2006; 70(2):240–53. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.01.017> PMID: 16545352.
- 46) Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular research.* 2006;70(2):240–53. pmid:16545352.
- 47) Haworth RA, Hunter DR. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Archives of biochemistry and biophysics* 1979; 195:460-7.
- 48) Holmbom, B., Naslund, U., Eriksson, A., Virtanen, I. & Thornell, L. E. Comparison of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Histochemistry* 99, 265-275 (1993).
- 49) Hoshino A, Matoba S, Iwai-Kanai E et al. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2012; 52:175-84.

- 50) Huang C, Andres AM, Ratliff EP, Hernandez G, Lee P, Gottlieb RA. Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PloS one* 2011;6:e20975.
- 51) Hunt DJ, Jones PP, Wang R, Chen W, Bolstad J, Chen K, Shimoni Y, Chen SR. K201 (JTV519) suppresses spontaneous Ca<sup>2+</sup> release and [3H] ryanodine binding to RyR2 irrespective of FKBP12.6 association. *Biochem J* 2007, 404:431–438
- 52) Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews Cancer* 2002; 2:277-88.
- 53) Inan, S. & Wei, H. The cytoprotective effects of dantrolene: a ryanodine receptor antagonist. *Anesthesia and analgesia* 111, 1400-1410, doi:10.1213/ANE.0b013e3181f7181c (2010).
- 54) Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of pathology* 1960; 70:68-78.
- 55) Jensen TE, Rose AJ, Hellsten Y, Wojtaszewski JF, Richter EA. Caffeine-induced Ca(2+) release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(1):E 286–92. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00693.2006> PMID: 17405829.
- 56) Jensen TE, Rose AJ, Hellsten Y, Wojtaszewski JF, Richter EA. Caffeine-induced Ca (2+) release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(1): E 286–92. pmid:17405829.
- 57) Johnston WE. Stunning, hibernation and preconditioning in Core Topics in Cardiac Anesthesia. Mackay JH, Arrowsmith JE 2004; 112-115.
- 58) Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104:1413-8.
- 59) Jung, C. B. et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO molecular medicine* 4, 180-191, doi:10.1002/emmm.201100194 (2012).

- 60) Kang JH, Kim SM. DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Molecules and cells* 1997; 7:777-82.
- 61) Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free radical biology & medicine* 2010;48:493-8.
- 62) Kim, D. C. Malignant hyperthermia. *Korean journal of anesthesiology* 63, 391-401, doi:10.4097/kjae.2012.63.5.391 (2012).
- 63) Klocke, R., Tian, W., Kuhlmann, M. T. & Nikol, S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovascular research* 74, 29-38, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.026 (2007).
- 64) Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001; 104 (24): 3158-3167.
- 65) Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, Hamada T, Parness J, Ikemoto N. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005, 280:6580–6587
- 66) Kobayashi S, Bannister ML, Gangopadhyay JP, Hamada T, Parness J, Ikemoto N. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2005, 280:6580–6587.
- 67) Kobayashi, S. et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *Journal of the American College of Cardiology* 53, 1993-2005, doi: 10.1016/j.jacc.2009.01.065 (2009).
- 68) Kondratiev TV, Wold RM, Aasum E, Tveita T. Myocardial mechanical dysfunction and calcium overload following rewarming from experimental hypothermia in vivo. *Cryobiology*. 2008;56(1):15–21. pmid:17983615.
- 69) Korge P, Yang L, Yang JH, Wang Y, Qu Z, Weiss JN. Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:34851-7.
- 70) Koshland DE, Jr. The molecule of the year. *Science* 1992; 258:1861.
- 71) Krause, T., Gerbershagen, M. U., Fiege, M., Weisshorn, R. & Wappler, F. Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new

- developments. *Anaesthesia*59, 364-373, doi:10.1111/j.1365-2044.2004.03658. (2004).
- 72) Kumarasinghe G, Gao L, Hicks M, Villanueva J, Doyle A, Rao P, et al. Improved heart function from older donors using pharmacologic conditioning strategies. *J Heart Lung Transplant*. 2016; 35(5):636– 46. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.12.020> PMID: 26899770.
- 73) Lelovas, P. P., Kostomitsopoulos, N. G. & Xanthos, T. T. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*53, 432-438 (2014).
- 74) Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ et al. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;287:H258-67.
- 75) Li J, Marionneau C, Koval O et al. Calmodulin kinase II inhibition enhances ischemic preconditioning by augmenting ATP-sensitive K<sup>+</sup> current. *Channels* 2007; 1:387-94.
- 76) Li Y, Si R, Feng Y et al. Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:31308-19.
- 77) Liem DA, Honda HM, Zhang J, et al, Past and present course of cardioprotection against ischemia- reperfusion injury. *J Appl Physiol*2007; 103:2129- 213
- 78) Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *The American journal of physiology* 1997;272:H2327-36.
- 79) Liu B, Tewari AK, Zhang L et al. Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: mitochondria as the major target. *Biochimica et biophysica acta* 2009; 1794:476-85.
- 80) Lopez-Neblina, F., Toledo-Pereyra, L. H., Toledo, A. H. & Walsh, J. Ryanodine receptor antagonism protects the ischemic liver and modulates TNF-alpha and IL-10. *The Journal of surgical research*140, 121-128, doi: 10.1016/j.jss.2006.12.003 (2007).

- 81) Loughrey CM, Otani N, Seidler T, Craig MA, Matsuda R, Kaneko N, Smith GL. K201 modulates excitation-contraction coupling and spontaneous Ca<sup>2+</sup> release in normal adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2007, 76:236–246.
- 82) MacFarlane NG, Miller DJ. Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat. *Circulation research* 1992; 70:1217-24.
- 83) Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi
- 84) Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research* 1999; 424:83-95.
- 85) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000; 101: 365–76.
- 86) Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296:301-5.
- 87) Maxwell, J. T., Domeier, T. L. & Blatter, L. A. Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302, H953-963, doi: 10.1152 / ajpheart. 00936.2011 (2012).
- 88) McCormick J, Suleman N, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012; 16:386-93.
- 89) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
- 90) Meyler MJ, Wesseling H, Agoston S. The effects of dantrolene sodium on cardiac and skeletal muscle in rats. *European journal of pharmacology*. 1976;39(1):127–31. pmid:964299.

- 91) Moberg J, Becker BF, Zahler S, Gerlach E. Hemodynamic effects of isoprostanes (8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α and E<sub>2</sub>) in isolated guinea pig hearts. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1997; 29:789-94.
- 92) Morota, S. et al. Functional and pharmacological characteristics of permeability transition in isolated human heart mitochondria. *PloS one* 8, e67747, doi:10.1371/journal.pone.0067747 (2013).
- 93) Munz, M. R., Faria, M. A., Monteiro, J. R., Aguas, A. P. & Amorim, M. J. Surgical porcine myocardial infarction model through permanent coronary occlusion. *Comparative medicine* 61, 445-452 (2011).
- 94) Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434:652-8.
- 95) Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *Journal of cellular biochemistry* 2001; 82:674-82.
- 96) Ohta T, Ito S, Ohga A. Inhibitory action of dantrolene on Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 1990, 178:11-19.
- 97) Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Tateishi H, Oda T, Okuda S, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010, 87:609-617
- 98) Park JS, Svetkauskaite D, He Q et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry* 2004;279: 7370-7.
- 99) Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circulation research* 2004;94:53-9.
- 100) Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat MB, Ma J, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG, Parness J. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* 2002, 277:34918-34923.

- 101) Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y. The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovascular research*. 2006;70(2):170–3. pmid:16600194.
- 102) Preckel, B., Schlack, W., Comfere, T. & Thamer, V. Effect of dantrolene in an in vivo and in vitro model of myocardial reperfusion injury. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 44, 194-201 (2000).
- 103) Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 1991; 288:481
- 104) Renner A, Sagstetter MR, Harms H, Lange V, Gotz ME, Elert O. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal protein adducts in the ischemic rat heart after transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2005; 24:730-6.
- 105) Respress JL, van Oort RJ, Li N, et al. Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. *Circ Res*. 2012;110:1474-1483.
- 106) Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1993; 25:153-63.
- 107) Rodriguez P, Bhogal MS, Colyer J. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol Chem*. 2003;278:38593-38600.
- 108) Rosenberg OS, Deindl S, Sung RJ, Nairn AC, Kuriyan J. Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* 2005; 123:849-60.
- 109) Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK et al. Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circulation research* 1994; 75:546-55.
- 110) Rubbo H, Radi R, Trujillo M et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269:26066-75.
- 111) Santonastasi M, Wehrens XH. Ryanodine receptors as pharmacological targets for heart disease. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 937–44.

- 112) Sawicki G, Leon H, Sawicka J et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005; 112:544-52.
- 113) Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R, Heusch G. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002; 283(4):H1740–2.
- 114) Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K. Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007; 293(3):H1714–20.
- 115) Shizuo Akira, Hiroaki Hemm Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family *Immunology Letters* 2003 Jan 22;85(2):85-95. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00228-6.
- 116) Shousha, S. et al. Comparison of electrocardiographic recordings in open-chest and closed-chest swine models. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*49, 852-855 (2010).
- 117) Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997; 96(12):4372–9.
- 118) Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997;96(12):4372–9. Epub 1998/01/07. pmid:9416906.
- 119) Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 1997;96(12):4372–9. Epub 1998/01/07. pmid:9416906.
- 120) Sigalas C, Bent S, Kitmitto A, O'Neill S, Sitsapesan R. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin can activate and inactivate cardiac ryanodine receptors. *Br J Pharmacol* 2009, 156:794–806.
- 121) Sparagna GC, Lesnefsky EJ. Cardiolipin remodeling in the heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2009; 53:290-301.
- 122) Spinale FG, Koval CN, Deschamps AM, Stroud RE, Ikonomidis JS. Dynamic changes in matrix metalloproteinase activity within the human



- myocardial interstitium during myocardial arrest and reperfusion. *Circulation* 2008;118: S16-23.
- 123) Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *The Journal of pathology* 2012; 226:255-73.
- 124) Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids* 2003; 25:207-18.
- 125) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-902.
- 126) Steinberg SF. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circulation research* 2013; 112:393-405.
- 127) Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-Lopez NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007 ;43:429-36.
- 128) Swedberg K, Komajda M, Bohm M, et al. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2010; 376:875-885.
- 129) Szentesi P, Collet C, Sarkozi S, Szegedi C, Jona I, Jacquemond V, Kovacs L, Csernoch L. Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 2001, 118:355–375.
- 130) Tian J, Avalos AM, Mao SY et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology* 2007; 8:487-96.
- 131) Ulus AT, Aksoyek A, Ozkan M, Katircioglu SF, Basu S. Cardiopulmonary bypass as a cause of free radical-induced oxidative stress and enhanced blood-borne isoprostanes in humans. *Free radical biology & medicine* 2003; 34:911-7.
- 132) Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochemical pharmacology* 2009; 77:826-34.
- 133) Vila-PetroffM, Mundina-Weilenmann C, Lezcano N et al. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular

- pH recovery from acidosis via Na(+)/H(+) exchanger activation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010; 49:106-12.
- 134) Villanueva JE, Gao L, Chew HC, Hicks M, Doyle A, Qui MR, et al. (2018) Functional recovery after dantrolene-supplementation of cold stored hearts using an ex vivo isolated working rat heart model. *PLoS ONE* 13(10): e0205850.
- 135) Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; 34:39-50.
- 136) Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; 106:1543-9.
- 137) Wang X, Zhang X, Ren XP et al. MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation* 2010; 122:1308-18.
- 138) Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *Journal of immunology* 2005; 175:541-6.
- 139) Webster, K. A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future cardiology* 8, 863-884, doi:10.2217/fca.12.58 (2012).
- 140) Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Ryanodine receptor-targeted anti-arrhythmic therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1047: 366–75.
- 141) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, Cheng Z, Deng SX, de Windt LJ, Landry DW, et al. Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:9607–9612.
- 142) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a

- critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:511-518.
- 143) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks A.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 2004; 94: e61–70.
- 144) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res*. 2004; 94: e61-e70.
- 145) Williams DL, Jr., Swenson CA. Disulfide bridges in tropomyosin. Effect on ATPase activity of actomyosin. *European journal of biochemistry / FEBS* 1982; 127:495-9.
- 146) Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*. 1991; 266:11144-11152.
- 147) White MY, Cordwell SJ, McCarron HC et al. Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems. *Proteomics* 2005; 5:1395-410.
- 148) White MY, Tchen AS, McCarron HC, Hambly BD, Jeremy RW, Cordwell SJ. Proteomics of ischemia and reperfusion injuries in rabbit myocardium with and without intervention by an oxygen-free radical scavenger. *Proteomics* 2006; 6:6221-33.
- 149) Wold RM, Kondratiev T, Tveita T. Myocardial calcium overload during graded hypothermia and after rewarming in an in vivo rat model. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(3):460–9. pmid:22950548.
- 150) Xia Z, Kuo KH, Godin DV, Walker MJ, Tao MC, Ansley DM. 15-F(2t)-isoprostane exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2005;289:H1366-72.
- 151) Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998; 279: 234–7.
- 152) Yano M, Ono K, Ohkusa T, et al. Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*. 2000; 102:2131-2136.

- 153) Yeager M. Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol.* 1998; 121(2):231–45. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3972> PMID: 9615440.
- 154) Yellon DM, Iliodromitis E, Latchman DS et al. Wholebody heat stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart. *Cardiovascular research* 1992; 26:342-6
- 155) Yu, G., Zucchi, R., Ronca-Testoni, S. & Ronca, G. Protection of ischemic rat heart by dantrolene, an antagonist of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Basic research in cardiology* 95, 137-143 (2000).
- 156) Zamiri, N. et al. Dantrolene improves survival after ventricular fibrillation by mitigating impaired calcium handling in animal models. *Circulation* 129, 875-885, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005443 (2014).
- 157) Zhang L, Chen CL, Kang PT et al. Peroxynitrite-mediated oxidative modifications of complex II: relevance in myocardial infarction. *Biochemistry* 2010; 49:2529-39.
- 158) Zhang Z, Feng HZ, Jin JP. Structure of the NH<sub>2</sub>-terminal variable region of cardiac troponin T determines its sensitivity to restrictive cleavage in pathophysiological adaptation. *Archives of biochemistry and biophysics* 2011; 515:37-45.
- 159) Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 2001, 276:13810–13816.
- 160) Zheng, H. et al. Calcium-sensing receptor activating phosphorylation of PKC $\delta$  translocation on mitochondria to induce cardiomyocyte apoptosis during ischemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry* 358, 335-343, doi:10.1007/s11010-011-0984-1 (2011).
- 161) Zoratti M, Szabo I. Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 1994; 26:543-53.
- 162) Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* 2014; 94:909-50.

- 163) Zucchi, R., Yu, G., Ghelardoni, S., Ronca, F. & Ronca-Testoni, S. A3 adenosine receptor stimulation modulates sarcoplasmic reticulum Ca (2+) release in rat heart. *Cardiovascular research* 50, 56-64 (2001).
- 164) Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2006; 70:181-90.
- 165) Βαρσαμίδης Κ (2001) Φυσιολογία του ανθρώπου Εκδόσεις University Studio Press Θεσσαλονίκη σελ.289-92.