

UROCORTIN ENRICHED CARDIOPLEGIA. Methods and results of a newly cardiac protection. In vivo model of diabetic versus non diabetic rats.

Arresto Cardioplegico con una soluzione arricchita di Urocortina. Modello in vivo e confronto nel ratto diabetico e non diabetico.

Maddalena Tessari M.Sc.

Correlatori: Prof. Giuseppe Faggian (University of Verona Italy)

Prof. Tiziano Scarabelli (Mount Sinai School of Medicine,
New York, NY, USA)



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI
CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIOVASCOLARI

CICLO /ANNO XXV - 2009

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

UROCORTIN ENRICHED CARDIOPLEGIA.
METHODS AND RESULTS OF A NEWLY CARDIAC PROTECTION.
IN VIVO MODEL OF DIABETIC VERSUS NON DIABETIC RATS.

Arresto Cardioplegico con una soluzione arricchita di Urocortina.
Modello in vivo e confronto nel ratto diabetico e non diabetico.

S.S.D. MED 23

Coordinatore: Prof Alessandro Mazzucco

Tutor: Prof Giuseppe Faggian (Università di Verona)
Prof. Tiziano Scarabelli Mount Sinai Hospital New York (NY-USA (esperto
della materia)

Dottorando: Dott.ssa Maddalena Tessari

For the degree of Doctor of Philosophy

Scuola di Dottorato in Scienze della Vita e della Salute

Dottorato in Scienze Cardiovascolari

Università degli Studi di Verona - Verona , Italy

This thesis is dedicated to the mentorship of the late Prof. Hisanori Suzuki who encouraged me to pursue in cardiovascular research.

Abstract:

The protection of the myocardium in cardiac surgery will always be one of the most important and of concern moment for the surgeon when deciding to operate on a patient. Always keeping in mind that this procedure should aim to improve the quality of life of the patient, especially in those who show, (already before the operation), a certain degree of contractile deficit.

The conflicting results of experimental studies in the last decade again raise many doubts about their effectiveness in the clinical setting. A solution to the dispute may only result from a better understanding of the fundamental concepts on the metabolism of the heart muscle and damage by ischemia and reperfusion injury during cardioplegic arrest. Basic research is therefore not only useful, but necessary and indispensable to try to resolve these doubts by applying experimental models that are as close as possible to clinical reality, as occurred in our experimental model.

Recent studies have shown a certain cellular metabolic activity even during cardiac arrest induced with cardioplegic solution, thus demonstrating the need to add to a standard cardioplegic solutions , appropriate substrates that acts to improve the protection itself. Other studies have also demonstrated the superiority of blood cardioplegia compared to crystalloid, especially for its more physiological features. As regards the temperature and the routes of administration to induce cardiac arrest remains at the discretion of the surgeon.

We have shown that the cardioplegic arrest induces overexpression of endogenous UCN and the addition of UCN in the cardioplegic solution infused in diabetic rat versus control probably induces both at mRNA level and at protein level a colocalization of PKCepsilon with mitochondrial translocation, inducing the survival of myocytes against cell death by apoptosis. Whereas the loss and / or functional impairment of myocytes after cardioplegic arrest is known to cause reduction of cardiac contractility and resulting in increased mortality and morbidity, functional data measured with conductance catheter appear to reduce the extent of cardiac dysfunction if opposed to the control group that had received a cardioplegia devoid of UCN. This strategy is a proposed cardioplegic solutions supplementation with exogenous UCN that seems to be promising to reduce the risk of cardiac dysfunction and cell apoptosis after surgery in patients exposed to damage from I / R associated with cardioplegic arrest.

RIASSUNTO

La protezione del miocardio in cardiocirurgia sarà sempre uno dei più importanti momenti per il chirurgo quando decide di operare al cuore un paziente. Sempre tenendo presente che questa procedura dovrebbe puntare a migliorare la qualità della vita del paziente, soprattutto in coloro che mostrano, (già prima dell'operazione), un certo grado di deficit contrattile.

I risultati contrastanti di studi sperimentali negli ultimi dieci anni, ancora una volta sollevano molti dubbi sulla efficacia delle varie soluzioni cardioplegiche

utilizzate in ambito clinico. Una soluzione alla controversia può risultare solo da una migliore comprensione dei concetti fondamentali del metabolismo del muscolo cardiaco del danno da ischemia e riperfusione durante l'arresto cardioplegico. La ricerca di base è quindi non solo utile, ma necessaria e indispensabile per tentare di risolvere questi dubbi, applicando modelli sperimentali che siano il più vicino possibile alla realtà clinica, come è avvenuto nel nostro modello sperimentale.

Recenti studi hanno dimostrato una certa attività metabolica cellulare anche durante l'arresto cardiaco indotto dopo somministrazione di una soluzione cardioplegica, dimostrando in tal modo la necessità e l'utilità di aggiungere additivi alle soluzioni cardioplegiche standard, tali da migliorare la protezione stessa. Altri studi hanno dimostrato la superiorità della cardioplegia con sangue, quale veicolo fondamentale, rispetto alle soluzioni cristalloidi, soprattutto per le migliori caratteristiche fisiologiche. Per quanto riguarda la temperatura e le vie di somministrazione per indurre l'arresto cardiaco ciò rimane ancor oggi a discrezione del chirurgo.

Abbiamo già dimostrato in studi precedenti, che l'arresto cardioplegico induce la sovraespressione di UCN endogena e che l'aggiunta di UCN nella soluzione cardioplegica infusa nel ratto diabetico verso i casi di controllo probabilmente induce sia a livello di mRNA che a livello proteico una colocalizzazione della PKCepsilon con la sua successiva traslocazione mitocondriale ciò inducendo una migliore sopravvivenza dei miociti contro la morte cellulare per apoptosi. Considerando che la perdita e / o la

compromissione funzionale dei miociti dopo l'arresto cardioplegico è causa nota di riduzione della contrattilità cardiaca e conseguente aumento della mortalità e morbilità, i dati funzionali rilevati con cateteri a conduttanza sembrano poter ridurre l'entità della disfunzione cardiaca se contrapposti al gruppo di controllo che aveva ricevuto una cardioplegia priva di UCN. Questa strategia che abbiamo applicato nello studio è propositiva allo studio di soluzioni cardioplegiche attraverso la supplementazione di UCN esogena, promettente per ridurre il rischio di disfunzione cardiaca e l'apoptosi delle cellule miocitiche dopo intervento chirurgico nei pazienti esposti ai danni da I / R associati all'arresto cardioplegico.

INDICE

Premesse

CAPITOLO 1

1.1. Cardioprotezione

1.2. Struttura e funzione del cuore

1.2.1. Il Miocita

1.3 Danno acuto da Ischemia e Riperfusione

1.3.1 Ischemia acuta

1.3.2 Apoptosi, Autofagia- Oncosi e Necrosi

1.3.3 La morte cellulare. La transizione tra danno reversibile e irreversibile

1.4 Danno da riperfusione

1.4.1 L'Ipotesi dell'ossigeno paradossso

1.4.2 Formazione dei radicali liberi

1.4.3 Il miocardio stordito

1.4.4 Infiammazione

1.4.5 Precondizionamento iuschemico e cardioprotezione

1.4.6 Il condizionamento farmacologico

CAPITOLO 2

2.1 La Famiglia delle Urocortine dei meccanismi di cardioprotezione

2.2 Le Urocortine e lo scompenso cardiaco

2.3 Urocortine ed ischemia

CAPITOLO 3

3.1 Ischemia perioperatoria

3.2 Diabete e protezione miocardica

CAPITOLO 4

4.1 Metodi di protezione miocardica

4.2 Vie di somministrazione della cardioplegia

4.3 Altre strategie di protezione miocardica

CAPITOLO 5

5.1 Modelli sperimentali

5.2 Sviluppo e disegno di un circuito extracorporeo

5.3 Il nostro modello sperimentale

CAPITOLO 6

6.1 Materiali e Metodi protocollo di studio

6.2 Caratteristiche tecniche dell'ossigenatore

6.3 Immunoistochimica

6.4 Emodinamica

DISCUSSIONE

Premesse

Prima del 1628, non era ancora noto come funzionasse il cuore, fino a quando William Harvey rifiutando le teorie di Galeno e descrivendo la circolazione del sangue e il ruolo del cuore quale elemento propulsore fondamentale alla circolazione, aprì di fatto una nuova era. Opie, più recentemente (1), descrive il cuore come "organo instancabile", in un costante stato di attività meccanica e metabolica nello svolgere le proprie funzioni che sono quelle di fornire ai tessuti dell'organismo i necessari substrati metabolici. Tutto questo, il cuore lo esegue con alcuni prerequisiti che sono: una normale funzione cellulare intrinseca mantenuta da un flusso continuo di sangue contenente ossigeno, da fattori nutritivi da cui deriva la sua stessa energia per il funzionamento, quest'ultima derivante dal metabolismo dell'ATP che si trasforma in ADP e Fosfato inorganico P_i . Quindi, un'enorme quantità di energia è necessaria al funzionamento continuo del cuore che è stimata essere di circa 8% del pool totale di ATP trasformato in ADP durante una singola contrazione. Ciononostante i miociti mantengono costante la loro concentrazione di ATP in quanto il metabolismo del miocita è programmato a rigenerare continuamente la sua energia vitale.

NOTE PRELIMINARI SUI MECCANISMI METABOLICI DI BASE

Rassegna dei processi coinvolti nella produzione e utilizzo energetico.

❖ Utilizzazione dell'ATP

Durante la normale contrazione cardiaca il cuore utilizza la gran parte dell'energia disponibile. Quando un potenziale di azione arriva al miocita, il Ca^{++} ionizzato entra nella cellula attraverso i canali del sarcoplasma e altro calcio viene rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico nel citosol. Questo porta ad un aumento di quasi 100 volte la concentrazione intracellulare di calcio, responsabile dell'inizio della contrazione delle miofibrille. Gli ioni calcio sono quindi la causa del cambiamento nella conformazione del complesso della troponina che in ultima analisi porta alla formazione di ponti trasversali tra molecole di actina e miosina, a sua volta responsabili di fornire la forza contrattile dei miofilamenti. Il ruolo dell'ATP in questo processo è duplice: 1) ogni "testa" della molecola di miosina/ATPasi, richiede l'aggancio di una molecola di ATP e 2) la "rottura" dell'ATP e la formazione di ADP e P_i prima per staccarsi dall'actina. Così, in assenza di abbondante ATP, la formazione ciclica di actina-miosina non può avvenire. Altro ruolo cruciale dell'ATP è quello di fornire energia per rimuovere successivamente il calcio rilasciato nel citosol, ponendo fine al ciclo di contrazione ed in preparazione per il prossimo ciclo. L'ATP è in grado di rimuovere direttamente il calcio attraverso la $\text{Ca}^{++}/\text{ATPasi}$ del sarcolemma e del reticolo sarcoplasmatico e indirettamente, attraverso le pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ del sarcolemma.

Oltre alla energia necessaria per la funzione contrattile, il cuore richiede una energia basale per la necessità di conservare l'impianto strutturale della cellula miocitica e per le altre funzioni metaboliche ed elettrofisiologiche. Questa energia viene utilizzata principalmente per mantenere i gradienti ionici delle pompe i, quali la pompe Na^+/K^+ $\text{Ca}^{++}/\text{ATPasi}$ dipendenti e per la sintesi e la degradazione delle biomolecole. Queste funzioni ATP-dipendenti non sono solo il prerequisito per la generazione del potenziale d'azione e della contrazione, ma consentono anche molti processi cellulari quali il co-trasporto di molecole attraverso la membrana.

❖ Sintesi dell'adenosina (2-3)

L'adenosina è un nucleoside purinico endogeno costituito da una molecola di adenina e ribosio uniti da un legame glicosidico.



L' Adenosina ha una presenza ubiquitaria in tutte le cellule come precursore dei nucleotidi adeninici: ATP, ADP, AMP. Questi nucleotidi possono essere

rilasciati da una ampia varietà di cellule (per esempio cardiomiociti, cellule endoteliali, piastrine e neutrofilii) o dalle terminazioni nervose adrenergiche. In normali condizioni fisiologiche, l'adenosina è generata sia a livello intracellulare che negli spazi extracellulari. Nel cuore per idrolisi dell' AMP ad adenosina con un legame di membrana con la ecto-5'-nucleotidase o con la stessa molecola (endo-5'-nucleotidase) ma a livello del citosol oppure dal catabolismo della of S-adenosil omocisteina. Inoltre l'adenosina prodotta nel citosol può entrare nello spazio interstiziale attraversando il sarcolemma dei miociti e penetrare nelle cellule endoteliali attraverso un trasportatore nucleosidico.

Durante le normali condizioni basali, il metabolismo ossidativo richiede la massima estrazione di ossigeno dal sangue coronarico, di conseguenza, la sintesi di ATP è più efficacemente promossa aumentando il flusso sanguigno coronarico. Un'interruzione del trasporto di ossigeno provoca una rottura dell'equilibrio tra la produzione di ATP e il suo consumo. Come risultato le concentrazioni di ATP diminuiscono mentre i livelli di ADP e Pi aumento. L'ADP è metabolizzato ulteriormente ad AMP che viene ulteriormente defosforilato a formare adenosina. In condizioni in cui vi è un netto catabolismo cardiaco di ATP derivante dalla diminuzione di ossigeno, come nell' ipossia o ischemia, o in seguito ad un accelerato utilizzo di ATP, quale per esempio un aumento delle catecolamine circolanti, l'adenosina può formarsi dalla 5'-nucleotidasi attivata del citosol dall' ADP stesso.

❖ Sintesi vascolare dell'adenosina (4-5)

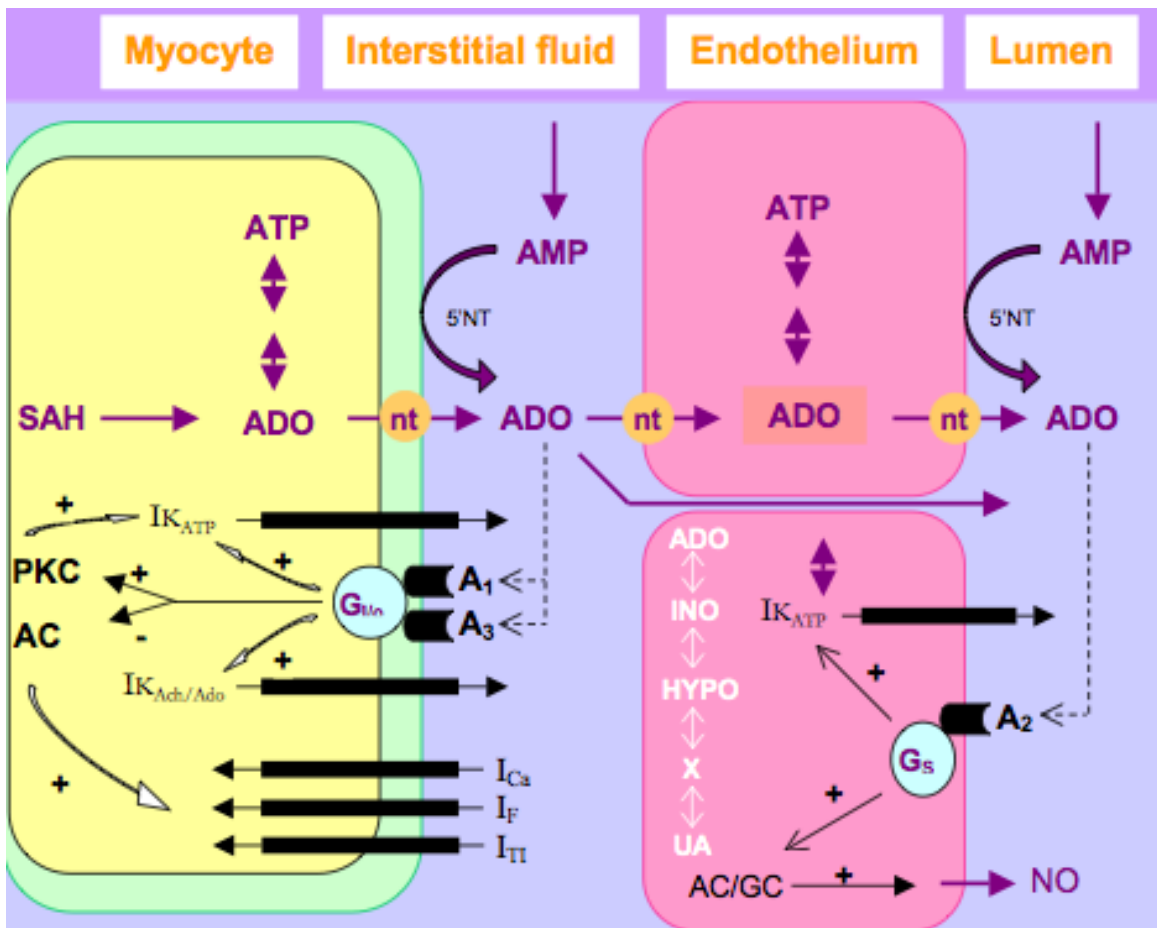
Quantità molto elevate di adenosina sono prodotte dai cardiomiociti nel cuore ischemico o ipossico e dall'endotelio vascolare e quella prodotta dall'endotelio si è dimostrata essere un importante sito di produzione. Il contenuto di ATP nelle cellule endoteliali umane è 2 a 3 volte superiore a quello di altre cellule, inclusi i cardiomiociti. Le cellule endoteliali impiegano tutti gli enzimi chiave per la formazione e metabolismo dei composti adeninici. Come nei miociti e in altre cellule, l'adenosina viene rilasciata dall'endotelio vascolare durante i periodi di stress quali ischemia o ipossia.

La via di formazione dell'adenosina differisce nelle cellule endoteliali da quella dei cardiomiociti. L'adenosina endoteliale deriva principalmente dal metabolismo extracellulare di AMP attraverso la 5-ectonucleotidasi piuttosto che dalla rottura dell'AMP intracellulare da parte delle nucleotidasi del citosol.

❖ Metabolismo dell'adenosina (6-7-8-9)

Oltre ad essere una fonte importante di adenosina, l'endotelio è anche una barriera metabolica (Nees et al, 1985; Kroll et al, 1989). L'adenosina somministrata per via eogena, in concentrazioni inferiori a 1 μM , non attraversa la barriera endoteliale per raggiungere l'interstizio e quindi non

entra in contatto diretto con i miociti. L'endotelio regola lo scambio dell'adenosina tra i miociti e se stessa. L'adenosina è probabilmente "compartimentalizzata" tra miociti ed endotelio dove il suo rilascio è indipendentemente regolato dal metabolismo rapido dei nucleosidi dell'endotelio, su entrambi i lati, extraluminale e luminale.



Formazione dell'Adenosina, metabolismo e accoppiamento recettore-effettore. (10)

L'Adenosina extracellulare viene ripresa nelle cellule vicine attraverso uno specifico sistema di trasporto dei nucleosidi transmembrana. A basse concentrazioni (<1 mM), l'adenosina è sequestrata nelle cellule endoteliali di

cui il 90-92% viene rapidamente fosforilata dalla adenilato-chinasi e incorporata nel pool delle adenine - nucleotidiche o degradate. Tuttavia, in condizioni di ischemia, quando la concentrazione di adenosina aumenta, da circa 0,8 mM a circa 2 μ M, l'adenosina deaminasi metabolizza preferibilmente l'adenosina ad inosina perché questa è in grado di rimuovere meglio l'adenosina della adenosina-chinasi. L'inosina può diffondersi nello spazio extracellulare ed essere ulteriormente catabolizzata a ipoxantina, xantina, e acido urico.

In sintesi, l'adenosina è: o refosforilata ad AMP dall'adenosina-chinasi o deaminata ad inosina dalla adenosina deaminasi. Gli effetti dell'adenosina sono molto localizzati e si estinguono rapidamente a causa della brevissima emivita che è meno di 8-10 sec nel sangue umano e che fanno dell'adenosina somministrata per via esogena, il farmaco con la vita più breve di qualsiasi altro usato in medicina.

❖ Produzione di ATP mitocondriale

Le fonti di ATP nel muscolo cardiaco sono la fosforilazione ossidativa di ADP nella catena respiratoria e la fosforilazione a livello dei substrati nella via glicolitica o dell'acido citrico (o citrato o Krebs o tricarbossilico). (Fig. 1)

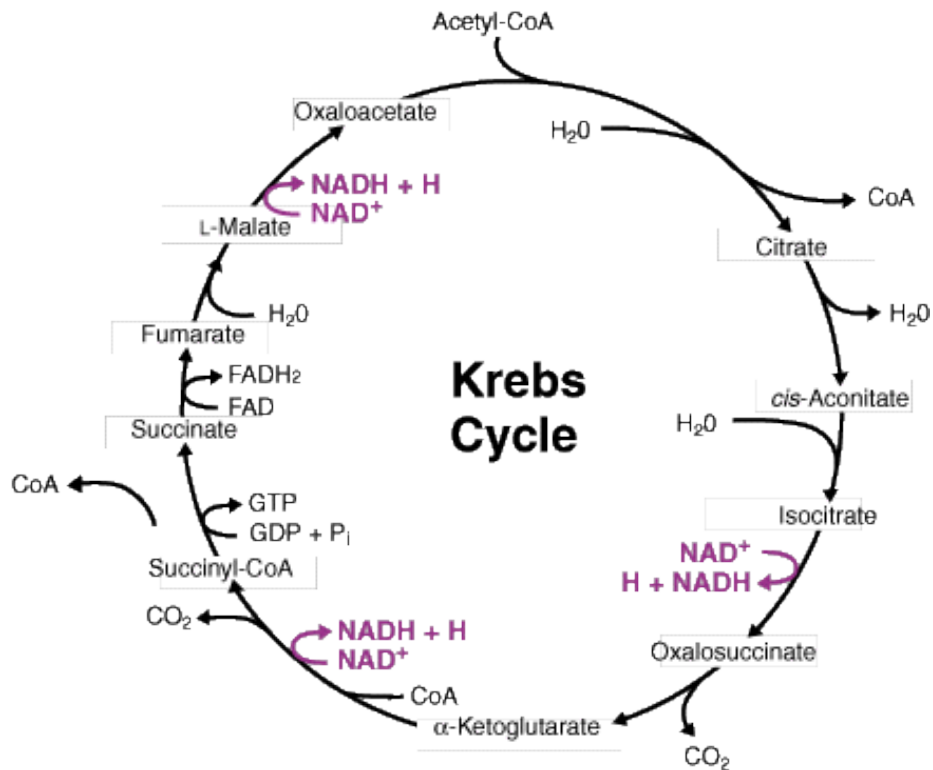


Fig. 1 Ciclo di Krebs

In condizioni normali, la fosforilazione ossidativa è di gran lunga il più importante meccanismo cellulare. Per esempio, l'ossidazione completa di una singola molecola di glucosio-6-fosfato in condizioni aerobiche produce un totale di 38 molecole di ATP, mentre l'ossidazione della stessa molecola in condizioni anaerobiche ne può produrre solo 3. Alla luce di un turnover così rapido di ATP, il cuore dipende da un continuo apporto di ossigeno per svolgere le proprie funzioni.

❖ Ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa di ADP ad ATP dipende dalla produzione di equivalenti riducenti e il passaggio di elettroni lungo la catena respiratoria

mitocondriale. In breve, substrati ricchi di energia sono convertiti in acetil-CoA, che viene poi ossidato nel ciclo dell'acido citrico o Krebs (Figura 2), i cui enzimi sono situati nei mitocondri.

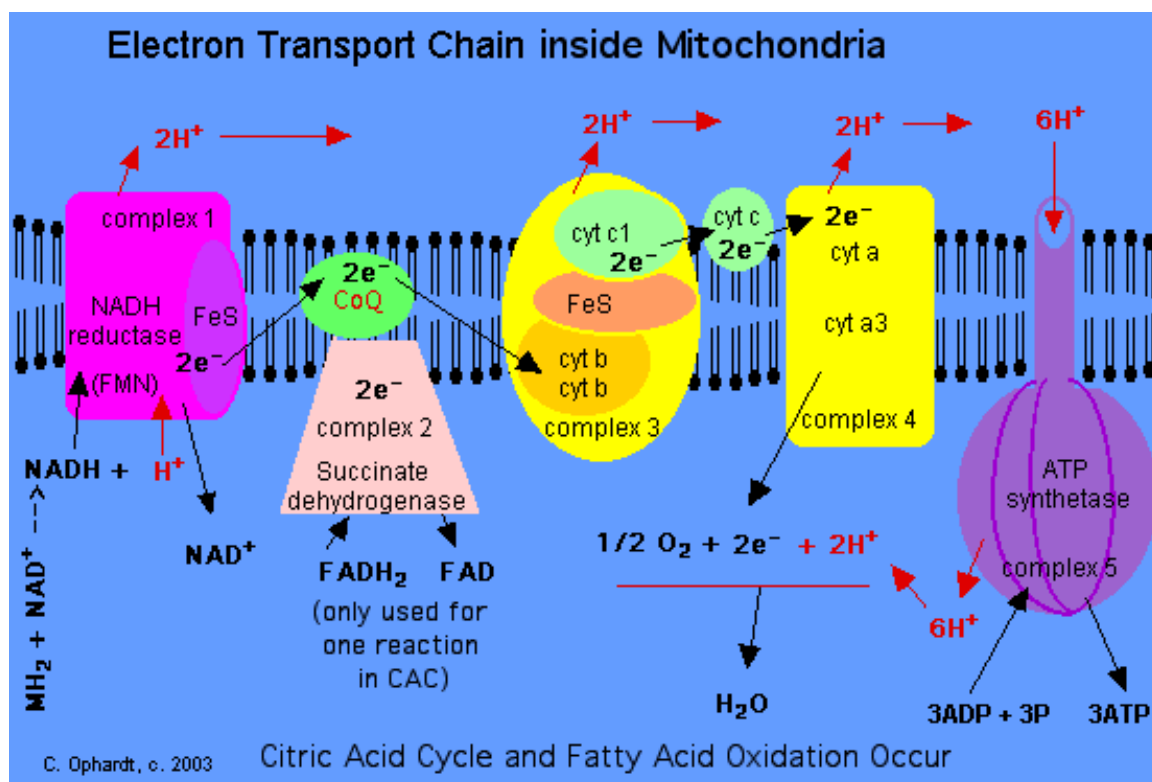
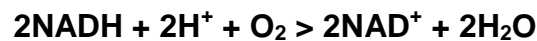


Fig.2 Catena di trasporto degli elettroni all'interno dei mitocondri

In diverse fasi del loro catabolismo, i substrati generano "equivalenti riducenti" nella forma di nicotinamide-adenil-dinucleotide, forma ridotta (NADH_2 o $\text{NADH} \cdot \text{H}^+ \text{O}^-$) e / o flavin-adenin-dinucleotide nella forma ridotta (FADH_2). Inoltre, un equivalente di ATP per ciclo (nel ciclo di Krebs) viene prodotto nella forma di guanosin-trifosfato (GTP), tramite fosforilazione nella fase di conversione di succinil-CoA a succinato (Figura A). NADH_2 e FADH_2 , trasferiscono i propri elettroni alla catena di trasporto degli elettroni all'interno

della membrana mitocondriale, dove reagiscono con ossigeno molecolare per produrre acqua. Nel processo degli elettroni attraverso i Citocromi (b, c. ed a), l'ATP viene prodotto tramite un meccanismo che coinvolge la creazione di un gradiente di protoni attraverso la membrana mitocondriale, "pommando" i protoni fuori da ciascun citocromo.

Questo gradiente trans-mitocondriale forza i protoni a rientrare nella matrice mitocondriale attraverso una proteina di membrana chiamata ATP-sintetasi che causa la fosforilazione dell'ADP ad ATP.



e



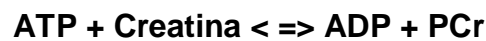
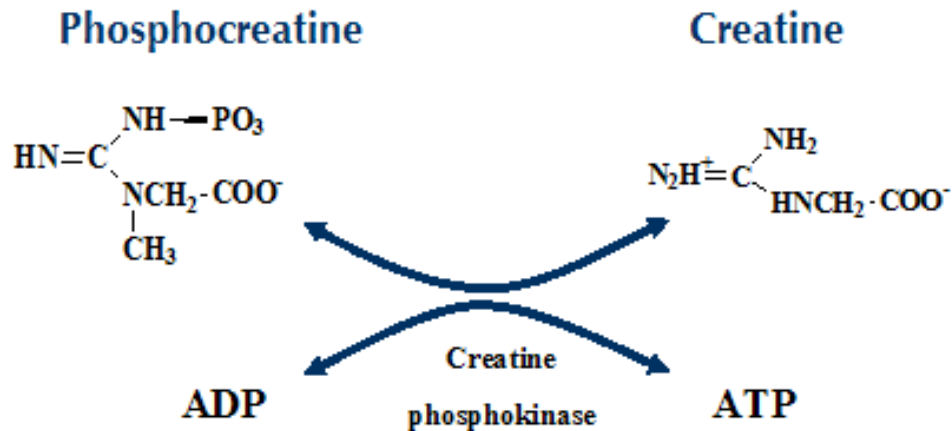
Così, la ri-ossidazione di ogni NADH_2 in NAD produce 3 molecole di ATP utilizzando un atomo di ossigeno, la ri-ossidazione di FADH_2 produce 2 ATP per atomo di ossigeno utilizzato (perché gli elettroni dal FADH_2 entrano nella catena degli elettroni dopo il primo passaggio). In altre parole, NADH_2 presenta una fosforilazione-ossidativa (PO) con un rapporto di 3, mentre il FADH_2 è di 2. Ciò significa che il "carburante", quali acidi grassi, che producono più FADH_2 che NADH_2 , utilizzano anche più ossigeno per produrre la stessa quantità di energia. Ciò ha implicazioni importanti per la

scelta del substrato energetico utilizzato dal cuore, soprattutto in situazioni di carenza di ossigeno.

❖ Le Creatinchinasi

Sia il ciclo dei citrati, che gli eventi di fosforilazione ossidativa avvengono nei mitocondri. Così quindi le grandi quantità di ATP prodotte dalla ATP sintetasi mitocondriale devono essere trasportate nel citoplasma. Ciò viene ottenuto dal sistema creatina chinasi (CK) costituito da due isoenzimi. Per prima cosa, l' isoenzima CK mitocondriale di membrana trasferisce il legame fosfato ad alta energia dell'ATP ad una molecola di creatina, formando così la fosfocreatina (PCr) nel citoplasma.

Phosphocreatine-ATP Interaction



Nel citoplasma, la PCr è in equilibrio con ATP e ADP tramite la reazione sopra scritta e si pensa che essa possa giocare due ruoli: 1) PCr può agire come serbatoio di energia, tamponando il livello citoplasmatico di ATP in accordo con l'equilibrio della reazione sopra scritta, catalizzata dall'isoenzima CK citoplasmatico. Questo aiuta a mantenere costanti i livelli di ATP in molte circostanze, per esempio durante una richiesta elevata di ATP durante lo sforzo (PCr diminuisce ma l'ATP è mantenuto costante), 2) la PCr può funzionare come trasportatore di energia prodotta dai mitocondri nei siti di utilizzazione quali le miofibrille dove l'ATP viene rigenerato ancora dagli isoenzimi CK per essere utilizzato da parte delle miofibrille.

CAPITOLO 1

1.1 Cardioprotezione

Le malattie cardiovascolari (MCV) sono la prima causa di morte nel mondo ed è stimato che siano circa 17 milioni i morti ogni anno secondo l'*Organizzazione Mondiale della Sanità, report 2000*. Il ventesimo secolo ha visto straordinari progressi nel campo della medicina cardiovascolare, dalla cardiologia interventistica alla chirurgia dei bypass coronarici al trapianto di cuore. Eppure, nonostante tali progressi, le malattie cardiovascolari continuano ad essere ancora la causa più comune di mortalità e morbilità nel mondo sviluppato, con costi elevatissimi che influenzano sempre più i bilanci degli Stati. La scienza di base è potenzialmente l'unica via che può portare a risultati in grado di essere traslati nell'industria farmaceutica per lo sviluppo di nuovi farmaci capaci di proteggere il miocardio specialmente nei casi di ischemia acuta. Nel campo della chirurgia a cuore aperto, è ancora vivo il capitolo più generale della cardioprotezione durante l'arresto del cuore per permettere al chirurgo di operare in un organo esangue e fermo. Purtroppo nessuna delle soluzioni impiegate finora riesce a soddisfare una protezione del miocardio adeguata e molto spesso si assiste a disfunzioni contrattili post-operatorie che riducono l'efficacia stessa dell'intervento anche nel lungo periodo. In effetti alcune delle scoperte, più recenti quali il

precondizionamento ischemico hanno aperto più porte di quanto ne abbiano chiuse. La ricerca quindi di una migliore protezione del miocardio attraverso presidi farmacologici iniettabili nelle coronarie con le soluzioni cardioplegiche, è l'ultima frontiera della ricerca di base per trovare strategie finalizzate a preservare o migliorare la vitalità del miocardio e dei vasi durante e dopo gli interventi cardiocirurgici. Il lavoro presentato in questa tesi aggiunge nuove conoscenze nel campo della cardioprotezione testando gli effetti di una soluzione cardioplegica addizionata di Urocortina in un modello di ratto in vivo affetto da diabete mellito.

Ipotesi

Sono state chiaramente dimostrate le differenze qualitative e quantitative dei profili di espressione genica di miociti cardiaci in pazienti diabetici rispetto a pazienti non diabetici, in particolare quelle relative alla risposta infiammatoria e lo stress ossidativo dopo circolazione extracorporea e arresto cardioplegico.

Nel nostro studio si vuole dimostrare se l'aggiunta di Urocortina nella soluzione cardioplegica possa avere un ruolo protettivo nell'ischemia e riperfusione in cuori di ratti diabetici e non diabetici, sottoposti ad arresto cardioplegico e successiva riperfusione in circolazione extracorporea.

1.2 Struttura e funzione del cuore (Miocita e strutture subcellulari) (11)

Una delle più importanti missioni scientifiche di questo secolo è stata l'integrazione della ricerca di base con la medicina clinica, meglio nota come *Medicina Traslazionale*. Importantissimi risultati sono stati raggiunti dalla genetica e dagli studi biomolecolari e cellulari, tanto che qualche autore ha definito questo approccio : " *Autopsia molecolare del cuore*" (G.Thiene). I più recenti progressi nel chiarire la struttura e la funzione del miocardio attraverso la ricerca di base ne hanno cambiato il paradigma classico, per cui oggi siamo in grado di capire meglio la struttura cardiaca e la funzione il loro reciproco rapporto e l'integrazione con l'organismo intero.

La comprensione del cuore si è evoluta nel tempo, dai greci con le osservazioni di Aristotele che lo considerava quale sede dell'intelligenza a Galeno, considerato il padre della fisiologia sperimentale, stabilendo che le arterie e il sangue non contenevano aria ma un liquido vitale. Le indagini di Galeno avevano portato alla comprensione che il cuore spostava il sangue in tutto il corpo, credendo però che la divisione tra il cuore destro e quello sinistro fosse porosa. Fu invece Vesalio (1514-1564) e Serveto (1511-1553) a capire che il cuore destro e sinistro non erano porosi ma nettamente separati dal setto interventricolare e con Cesalpino che nel 1571 comprese meglio la funzione delle valvole e quindi conseguentemente anche la meccanica del cuore. L'affinamento degli studi lo si deve sicuramente alle opere di William Harvey che hanno gettato le basi fondamentali per altri

famosi scienziati del 17° e 18° Secolo. Solo nei primi anni del 900 s'inizia ad entrare nei meccanismi più fini di comprensione della contrazione ventricolare e ciò lo si deve a Sidney Ringer (1835-1910) che individua il ruolo essenziale degli ioni calcio nella contrazione muscolare, quasi per caso.

Il miocardio è un tessuto altamente organizzato, composto da vari tipi cellulari che includono: cellule muscolari lisce, fibroblasti e miociti cardiaci. La cellula contrattile fondamentale (unità contrattile) del miocardio è il miocita. Esamineremo le componenti strutturali del miocita nel contesto funzionale del processo contrattile.

Il cuore umano contiene circa 2-3 miliardi di cellule muscolari cardiache, queste rappresentano comunque meno di un terzo del numero totale di cellule nel cuore. Le rimanenti sono rappresentate da una vasta gamma di cellule addizionali, tra cui quelle muscolari lisce, cellule endoteliali dei vasi coronarici e dell'endocardio, fibroblasti, mastociti e più recentemente sono state anche individuate "cellule staminali" pluripotenti cardiache. Questi agglomerati cellulari distinti non sono isolati l'uno dall'altro ma interagiscono invece fisicamente attraverso fattori solubili paracrini, autocrini ed endocrini. (Fig.3).

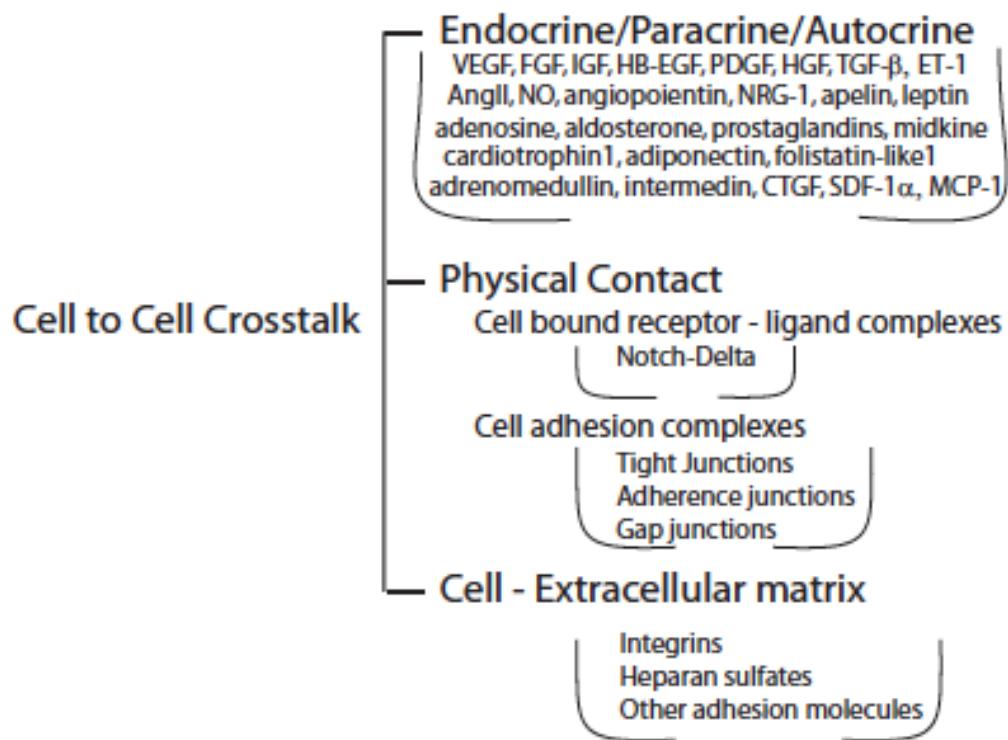


Fig.3 (Adapted from ref: Tirziu et al. Circulation August 31,2010)

1.2.1 Il miocita (Fig.4) (12)

Nel corso di una vita media il cuore si contrae circa 3 miliardi di volte pompando circa 500 milioni di litri di sangue per kg di massa cardiaca (Dobson, 2003). La contrazione del cuore umano consuma circa 3,5 kg di adenosina trifosfato (ATP) ogni giorno fornendo una fonte immediata di energia per la contrazione muscolare, il mantenimento di gradienti di ioni e altre funzioni vitali. La maggior parte di ATP utilizzata dal cuore è richiesta per la contrazione (60 - 70%) seguita da trasporto attivo dalle pompe sodio-potassio (11% - 15%).

I miociti, o unità muscolari sono cellule multinucleate molto lunghe. Sono cellule eccitabili e quindi capaci sotto l'influenza di una appropriata stimolazione elettrica o meccanica, di contrarsi.

Nella (Fig 4a) si può vedere la struttura di un miocita (nella figura più a destra, adirittura si possono vedere sullo sfondo gli eritrociti che circolano uno dietro l'altro nei capillari che corrono lungo la fibra muscolare stessa). Possiamo anche osservare che i miociti sono composti da numerose miofibrille, in cui vi sono striature regolari orizzontali e verticali. Nell'immagine a microscopia elettronica si notano i sarcomeri che sono le vere unità funzionali del miocita. Questi sarcomeri (delimitati da due strisce z) sono a loro volta composti da miofilamenti spessi e sottili disposti longitudinalmente, rispettivamente composti da molecole di actina e miosina.

Sotto l'effetto di una adeguata stimolazione (potenziale di azione arrivato alla giunzione neuromuscolare) gli ioni Ca^{++} , sono rilasciati nello spazio intracellulare. L'aumento della concentrazione di calcio intracellulare provoca cambiamenti nella struttura delle molecole di actina e miosina, che ha come effetto il trascinarsi tra l'uno e l'altro dei filamenti, causando così un accorciamento della fibra muscolare stessa.

Ogni fibra muscolare è fortemente innervata da numerose terminazioni nervose di un singolo neurone, che innerva anche le fibre adiacenti, la contrazione simultanea di molte fibre adiacenti provoca l'accorciamento del muscolo.

È ormai chiaro che i diversi tipi di cellule negli organi solidi percepiscono stimoli diversi e integrare le loro risposte. Pertanto, nessuna cellula è un'isola, soprattutto nel cuore. Le interazioni nel tessuto cardiaco deve essere coordinato per garantire che tra cellula-cellula vi sia un "crosstalk" atto ad integrare risposte biologiche a vari stimoli (Fig.3). Le cellule nel cuore utilizzano un numero elevato di "canali" per comunicare con l'ambiente circostante e con le cellule vicine. Tra questi, il più studiato è la via paracrina e autocrina, che utilizza una lunga lista di fattori secreti come il VEGF, FGF, TGF β , ET-1, PDGF, IGF, HGF, angiopoietine, NO, NRG-1, Apelin e Fstl-1, Urocortine. Le comunicazioni endocrine cellula-cellula, utilizzando molecole come l'adiponectina e adrenomedullina/intermedin che possono anche svolgere un ruolo nella risposta all'ipertrofia. Altri tipi di comunicazione cellulare che sono state esplorate meno estesamente nel contesto di una

risposta ipertrofica sono quelle che includono contatti cellula-cellula, giunzione-mediate, cellula-matrice e attraverso segnali delle molecole di adesione quali le integrine, che possono modulare l'ipertrofia ventricol assieme a fattori di crescita e altri mediatori umorali.

Un aspetto particolarmente importante delle interazioni cellula-cellula nel cuore è il segnale bidirezionale tra miociti ed endotelio. Una maggiore comprensione di come i cambiamenti della massa delle cellule endoteliali possa incidere assieme ai segnali paracrini all' ipertrofia potrebbe essere di grande interesse per la formulazione di nuovi approcci terapeutici quali l'angiogenesi per il trattamento dello scompenso cardiaco.

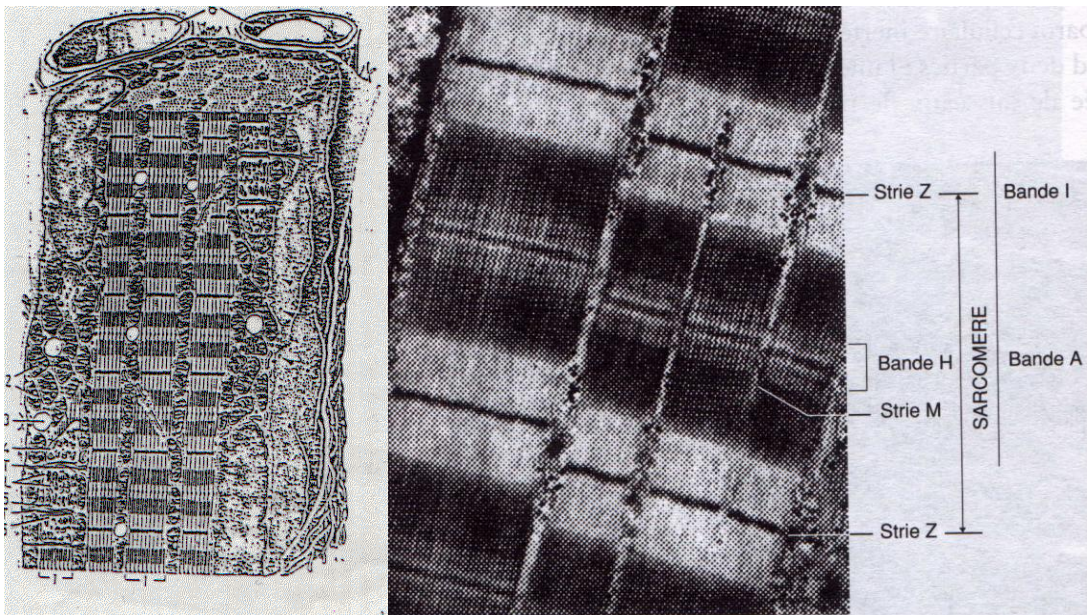


Fig.4a Struttura del miocita

L'ATP (Fig.4b) viene rifornito da complesse reazioni chimiche e da altri "combustibili" come gli acidi grassi, lattati e glucosio. Il rifornimento di ATP nel miocardio avviene per 3 percorsi principali 1) fosforilazione ossidativa, 2) glicolisi, e 3) attraverso la Fosfo-creatin-chinasi.

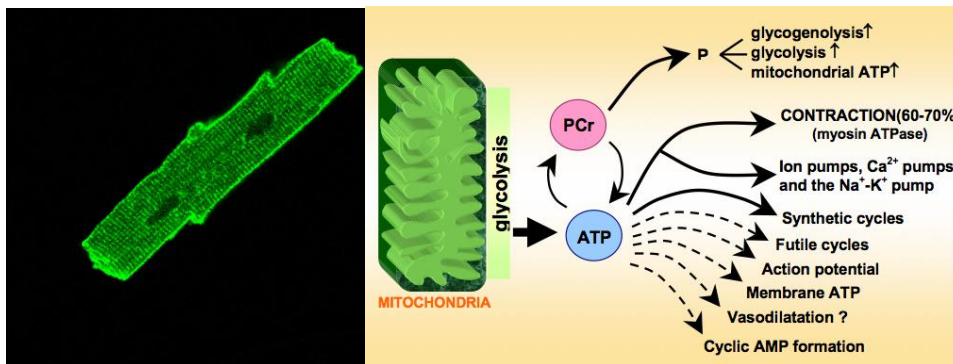


Fig. 4b) Immagine confocale di miociti di ratto isolato e schema del metabolismo dell'ATP

1.3 Danno acuto da ischemia e riperfusione (13-14-15-16-17)

Per ischemia miocardica si intende una riduzione del flusso sanguigno coronarico tale per cui, l'apporto di ossigeno al miocardio risulti insufficiente per le richieste metaboliche. A seconda della durata dell'ischemia il danno cellulare può essere reversibile o irreversibile con conseguente morte

cellulare (infarto). Un danno da riperfusione può essere letale in quanto può aumentare la dimensione di un infarto del miocardio. Nella Fig. 5c, le sezioni istologiche del cuore sono state colorate con cloruro di trifeniltetrazolo (TTC), con questa colorazione, il tessuto infartuato appare colorato di bianco mentre il tessuto vitale è colorato in rosso. Sulla sinistra, la dimensione dell'infarto è mostrata come percentuale dell'area a rischio. A seguito di ischemia, una riperfusione efficace, abbassa sostanzialmente le dimensioni dell'infarto, mentre un danno da riperfusione la diminuisce. La prevenzione di lesioni letali da riperfusione, si attua attraverso interventi di cardioprotezione al momento della riperfusione stessa, oppure con il preconditionamento ischemico. (Yellon)

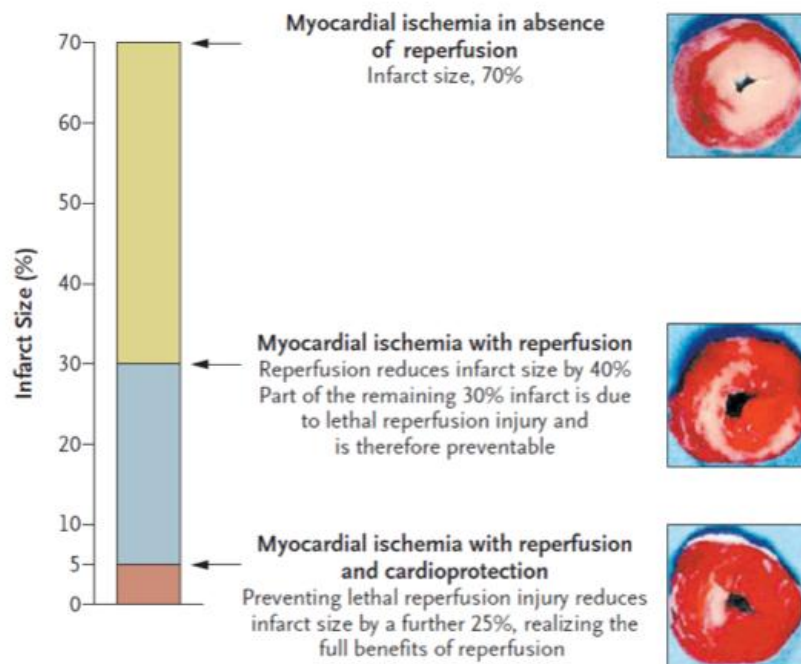


Fig.5c (Tratto da Yellon e Hausenloy, 2007)

Un'ischemia acuta e prolungata porta a complesse alterazioni metaboliche e strutturali che alla fine influenzano l'integrità elettrica del cuore e del microcircolo (Taggart). La composizione cellulare del miocardio si altera progressivamente con il perdurare dell'ischemia con lesioni che sono ancora reversibili entro i 15 minuti.

Durante la fase d'ischemia, i miociti subiscono numerose modificazioni, incluse: 1) diminuzione dei fosfati ad alta energia e 2) del pool di ADP, 3) esaurimento del glicogeno, 4) accumulo di lattato, 5) acidosi e 6) lieve edema intracellulare (Fig.6). Quando si re-instaura il flusso arterioso (entro i 15 minuti) si può rendere reversibile questa fase di sofferenza cellulare recuperando alla loro funzione i miociti danneggiati. Questo periodo di ri-perfusione se da un lato ripristina il metabolismo aerobico e promuove il salvataggio dei miociti, dall'altro esaspera i danni, (reversibili), sviluppati durante il periodo d'ischemia che possono portare a nuovi danni che inducono ad una disfunzione miocardica post-ischemica. Se la ri-perfusione non si verifica entro il periodo di ischemia reversibile e persiste nel tempo le alterazioni metaboliche successive contribuiscono alla transizione da danno reversibile a danno irreversibile che si manifesta come necrosi e apoptosi.

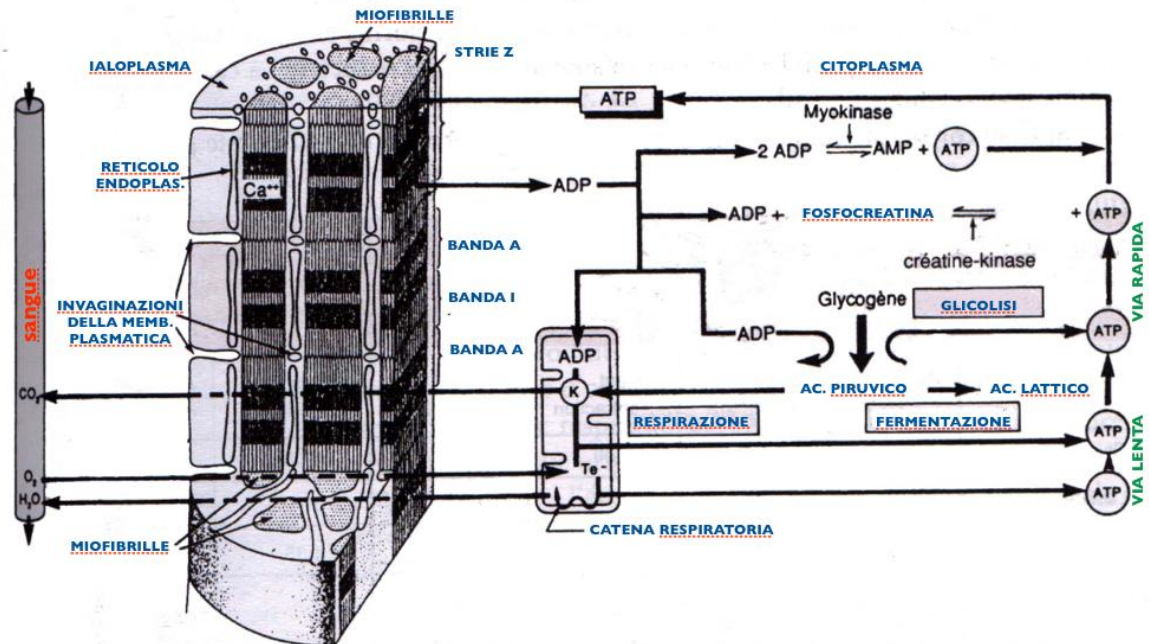


Fig. 6 Principali vie metaboliche del miocita e possibili target nell'ischemia.

1.3.1 ischemia acuta (18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28)

La completa occlusione di un'arteria coronaria, se prolungata porta inevitabilmente ad un infarto transmurale. A livello di metabolismo locale, la sintesi di ATP è affidata da fonti esogene quale principalmente quella degli acidi grassi. Con la cessazione del flusso sanguigno l'ossigeno tissutale è notevolmente ridotto e solo piccole quantità di ossigeno è ancora presente negli eritrociti intrappolati nei capillari e legato alla mioglobina. Il rilascio di ossigeno viene rapidamente consumato nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale "chiudendo" il ciclo della respirazione ossidativa nei mitocondri. E' stato dimostrato, che la cessazione della respirazione mitocondriale avviene già dopo 2 sec. dall'insorgenza della ischemia globale

nel cuore isolato del ratto. L'ischemia induce il metabolismo energetico a passare da un metabolismo aerobico a quello anaerobico. In concomitanza all'inibizione del metabolismo ossidativo mitocondriale, l'ischemia provoca una riduzione immediata in ATP, glucosio-6-fosfato, e aumenta la disponibilità di AMP e fosfato inorganico. A loro volta, questi metaboliti e modulatori aumentano l'attività delle fosforilasi e fosfofruttochinasi provocando un'accelerazione della glicogenolisi e glicolisi anaerobica con produzione concomitante di lattato e protoni.

Una caratteristica importante dell' ischemia è pertanto la rapida diminuzione di ATP e PCr. Durante il periodo di ischemia, la glicogenolisi anaerobica diventa il primo processo per rigenerare ATP nella cellula ischemica. In questa fase, inoltre, la forza contrattile delle cellule ischemiche diminuisce notevolmente al passaggio dal metabolismo aerobico a quello anaerobico.

Nel miocardio ischemico, alla diminuzione dell'ATP, l'ADP è ulteriormente suddiviso in AMP che a sua volta viene ulteriormente metabolizzato in inosina monofosfato (IMP) e adenosina. (più nel dettaglio: Fig.7a)

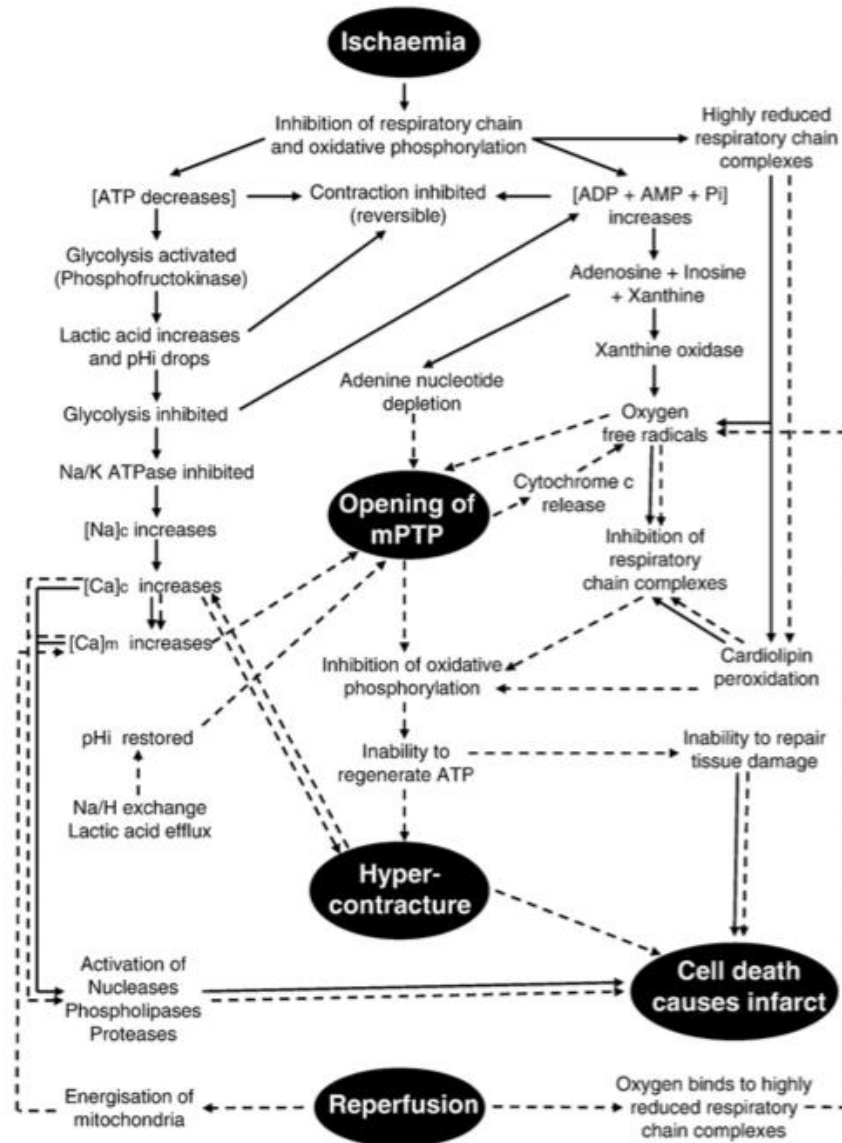


Fig.7a - Rappresentazione schematica dell'ischemia e riperfusione

La produzione di adenosina ha quindi il significato di essere correlata con la gravità dell'ischemia. Ciò produce nel cuore una vasodilatazione compensatoria e ad un rallentamento della frequenza cardiaca e inoltre inibisce i flussi di calcio intracellulari.

Mentre la produzione di ATP dalla glicolisi anaerobica si dimostra essere utile durante l'ischemia, l'accumulo intracellulare di prodotti finali del metabolismo come i lattati e i protoni $[H^+]$ possono viceversa esacerbare il danno miocardico.

Crescenti concentrazioni di lattato hanno un effetto negativo sulla glicolisi, l'acidosi porta ad un aumento dello scambio Na^+ / H^+ con conseguente scambio Na^+ / Ca^{++} , ciò elevando i livelli intracellulari degli ioni $[Na^+]$ e $[Ca^{++}]$. Oltre all'accumulo di sodio, elevate concentrazioni di lattato hanno dimostrato causare altri effetti deleteri nella cellula miocardica ischemica, per esempio, il lattato ha mostrato di essere in grado di alterare il potenziale d'azione e di contribuire al rigonfiamento mitocondriale diminuendo le capacità di fosforilazione dei mitocondri.

Il sovraccarico di calcio durante l'ischemia contribuisce alla necrosi o disfunzione miocardica, in almeno quattro modi: 1) le fosfolipasi sono attivate dal calcio e portano alla degradazione della membrana cellulare, 2) una elevata concentrazione di calcio intracellulare contribuisce allo stato di contrattura ischemica, cioè ad una prolungata contrazione, 3) un eccessivo movimento di calcio fuori e dentro il reticolo sarcoplasmatico può portare ad aritmie (ad esempio quelle da post-depolarizzazione), 4) i mitocondri diventano sovraccarichi di calcio con conseguente inutile uso dell'ATP e quindi di conseguenza aumentata richiesta di ossigeno che porta ad un aumento dell'ischemia intracellulare.

Dal 1935 è noto che una delle prime conseguenze di un'ischemia grave è la disfunzione che si verifica entro 10 secondi dopo l'inizio dell'ischemia. La

causa principale della disfunzione contrattile nei cuori ischemici resta però ancora non del tutto chiarita. La deplezione di ATP si pensa svolga un ruolo primario, stante il fatto che la contrazione miocardica dipende dai substrati energetici disponibili; tuttavia l'anomalia contrattile si instaura ancora prima della riduzione totale dell' ATP. È possibile che riduzioni anche piccole dell' ATP, accoppiate a difettoso trasporto dell'energia, possa provocare un rapido cambiamento nella funzione contrattile. Allo stesso modo, piccole riduzioni di ATP possono ridurre l'ingresso del Ca^{++} attraverso il sarcolemma e reticolo sarcoplasmatico e condizionare la compromissione della contrattilità. Inoltre, l'accumulo di prodotti del metabolismo ischemico possono avere un ruolo nella disfunzione contrattile tra cui il lattato, l'acidosi intracellulare e l'accumulo di fosfato inorganico (Pi).

In sintesi, i cambiamenti metabolici che risultano da un'ischemia grave danno luogo ad una ridotta fosforilazione ossidativa dallo spostamento del metabolismo: dalla glicolisi aerobica alla glicogenolisi anaerobica, accumuli di ATP e PCr si esauriscono rapidamente con il diminuire del pH intracellulare. La disfunzione delle pompe di membrana conducono all'ingresso di calcio, sodio e acqua nella cellula.

1.3.2 "APOPTOSI- AUTOFAGIA- ONCOSI E NECROSI"

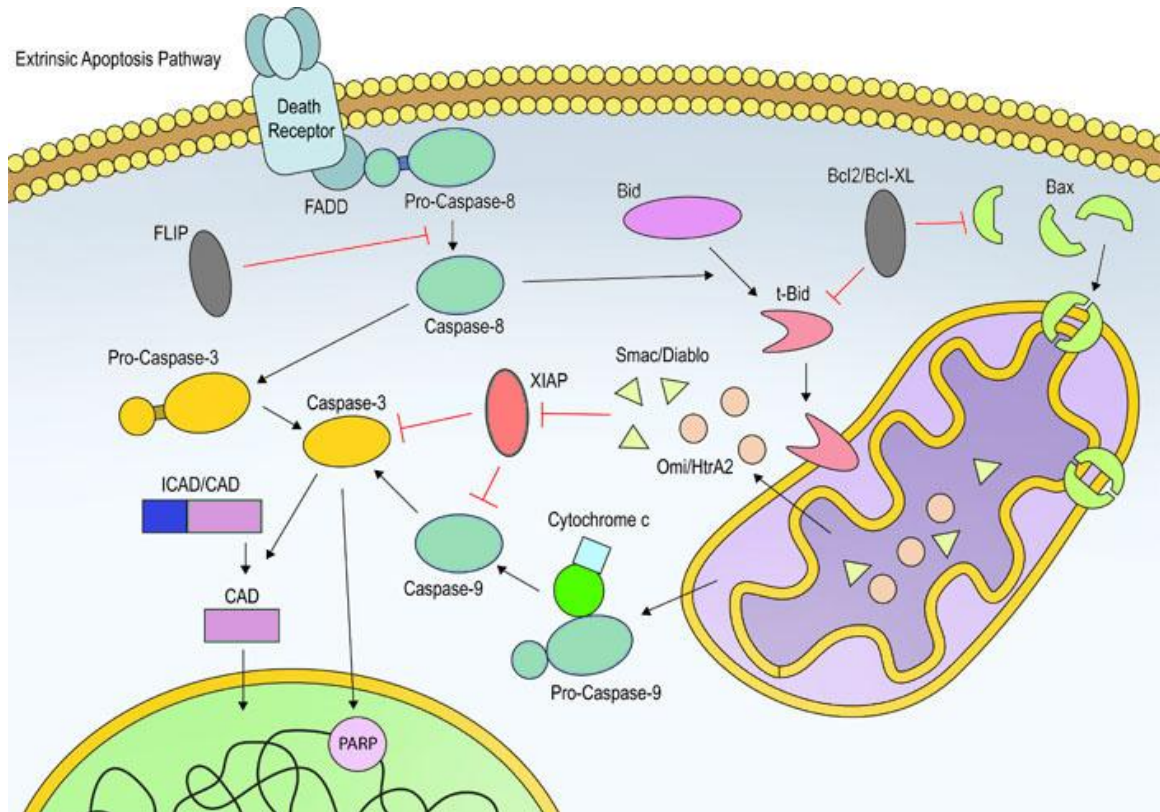


FIG. 7b Apoptosi

Morfologicamente, l'apoptosi è caratterizzata da contrazione cellulare, condensazione e marginazione della cromatina e gemmazione della membrana plasmatica (Figura 7b).

Gli organelli cellulari, materiale nucleare e citoplasmatico, sono circondati da una membrana citoplasmatica intatta e questi corpi apoptotici vengono

fagocitati dai fagociti o, in modo meno efficiente, da altre cellule vicine . Quando la fagocitosi è ritardata, per ragioni non ancora note, i frammenti apoptotici subiscono necrosi. Nell'apoptosi, a seguito della rapida vescicolazione e fagocitosi, nessun materiale intracellulare viene rilasciato nell'ambiente extracellulare e conseguentemente non vi è alcuna risposta infiammatoria locale o diffusa. Al contrario, la rottura della membrana plasmatica durante la necrosi porta alla dispersione del contenuto intracellulare, che induce una forte reazione infiammatoria.

Pertanto, le lesioni dove l'apoptosi è la modalità predominante della morte cellulare l'infiammazione sarà minore che in quelle in cui la morte è per necrosi. Classicamente, l'apoptosi può iniziare attraverso i recettori di morte cellulare o da lesioni del mitocondrio (Figura 7c).

Insieme, questi due meccanismi causano l'attivazione di una cascata di enzimi proteolitici - le caspasi - che con la loro azione "rompono" un gran numero di substrati essenziali utili al mantenimento dell'integrità cellulare, causando così la morte della cellula (66). Il recettore percorso di morte.

La via recettoriale

I recettori di morte cellulare sono espressi ubiquitariamente, e sono caratterizzati dalla presenza di un "death domain" intracellulare, che legandosi al recettore, trasduce il segnale apoptotico (67-68).

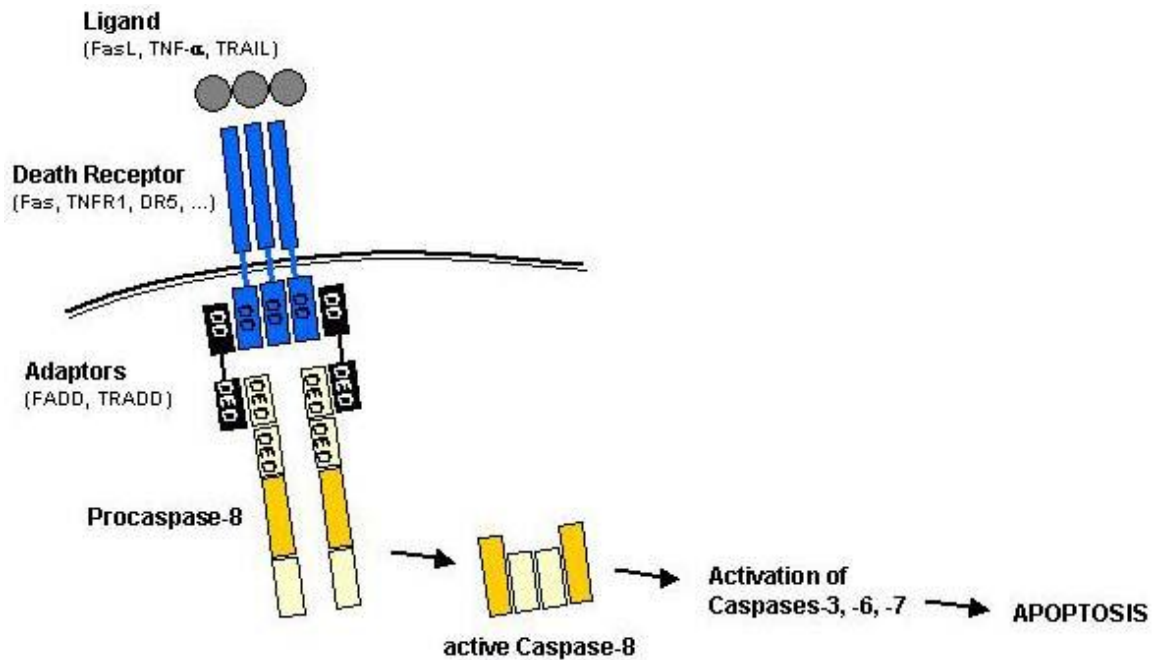


FIG.7c Ligando e recettore

Sono stati identificati sei recettori di morte comprendendo anche il CD95 (noto anche come APO-1, Fas), Il Fattore di Necrosi Tumorale alfa (TNFa) TNFR1, e DR3-6, tutti sono espressi nel cuore (69-70). I loro corrispondenti ligandi, CD95 (CD95L), TNFa e TNF- -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), sono anch'essi espressi nel cuore. Sebbene i precisi meccanismi di induzione dell'apoptosi dopo legame con i "recettori di morte" vari tra i diversi recettori, ci sono comunque alcune caratteristiche comuni.

La via mitocondriale

Una vasta gamma di stimoli apoptotici convergono sui mitocondri a causare il rilascio di una serie di fattori apoptotici presenti nello spazio intermembrana mitocondriale (71). Così come agenti che danneggiano i mitocondri direttamente. La via mitocondriale può anche essere attivata a seguito della

interazione del recettore morte, dove la "caspasi-8 attiva", scinde la proteina BH3 (vedi sotto), Bid, il cui prodotto di scissione, tBID, migra verso i mitocondri e danneggia la membrana mitocondriale (recensito in 23). Il Citocromo c, un componente della catena di trasporto degli elettroni, è normalmente localizzato all'esterno della membrana mitocondriale interna, e il suo rilascio nel citosol è generalmente il primario e più critico fattore per l'inizio dell'apoptosi mitocondriale-mediata (24) (Fig.7d).

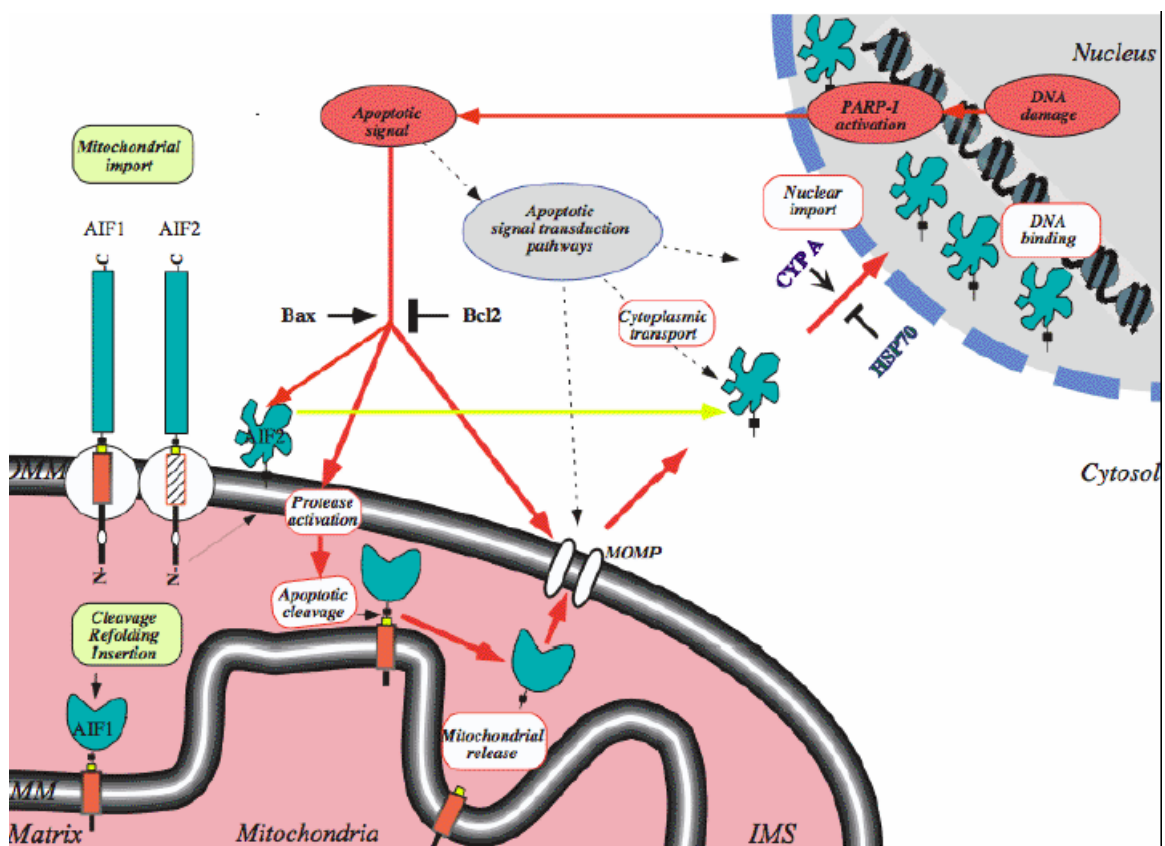


FIG.7d La via mitocondriale dell'apoptosi

Nel citosol, il citocromo c si lega (in presenza di ATP), all' Apoptosis Protease Activating Factor (Apaf-1). La Procaspasi-9 viene reclutata e attivata in un complesso proteico chiamato apoptosoma (72-73) (Figura 7e).

Caspasi-9 scinde poi attiva le caspasi effettrici che sono enzimaticamente attive quali le caspasi-3, -6 e -7.

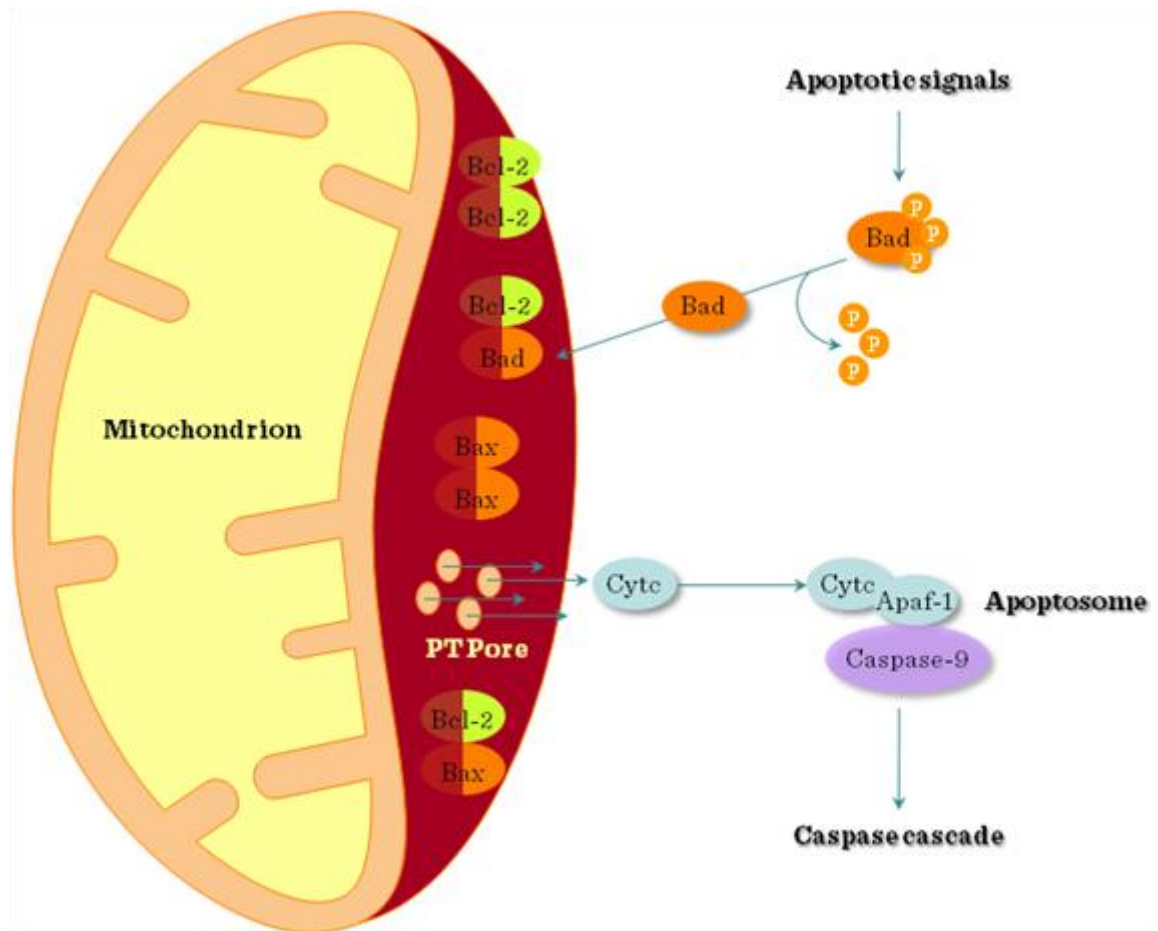


FIG. 7e Apoptosoma

Il Citocromo c è rilasciato tramite canali creati mediante interazione con altre proteine (Bax e Bak) (vedere sotto) nella membrana mitocondriale e successiva apertura dei pori di transizione di permeabilità mitocondriale (MTP). Questo canale è composto di proteine di entrambe le membrane, interna ed esterna, insieme con le proteine dello spazio intermembrana, e la loro apertura si traduce in ingresso di ioni, quali il calcio, causando rigonfiamento dei mitocondri. Questo rigonfiamento del mitocondrio, produce

rottura della membrana esterna, sebbene la membrana interna rimanga intatta, e il citocromo c si libera attraverso queste interruzioni nella membrana esterna (74).

L'autofagia

Autofagia comporta la formazione di una membrana che circonda organelli normali o danneggiati, e la digestione delle vescicole risultanti dai lisosomi (75). Sembra essere un meccanismo fisiologico della sopravvivenza cellulare durante periodi di digiuno temporaneo, è stata osservata nei topi tra nascita e suzione (76).

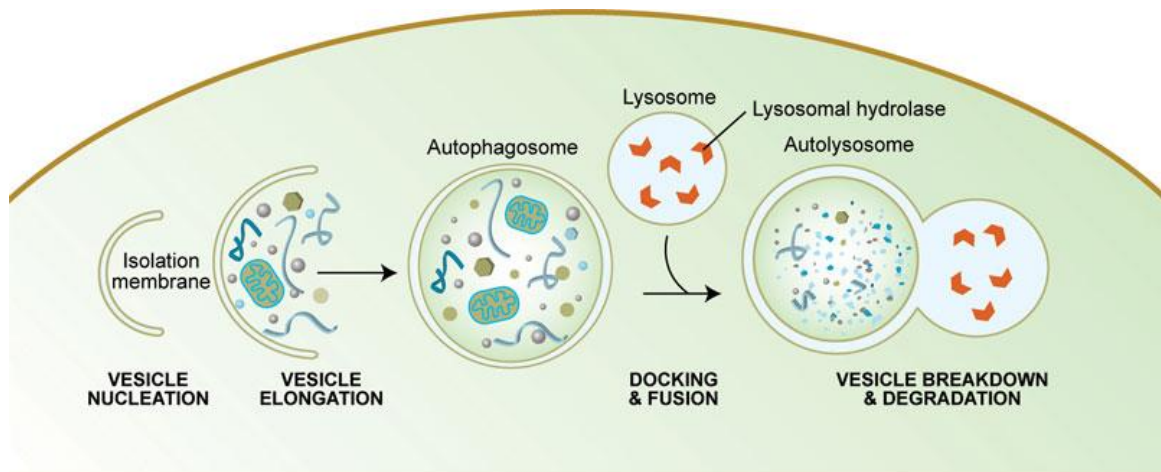


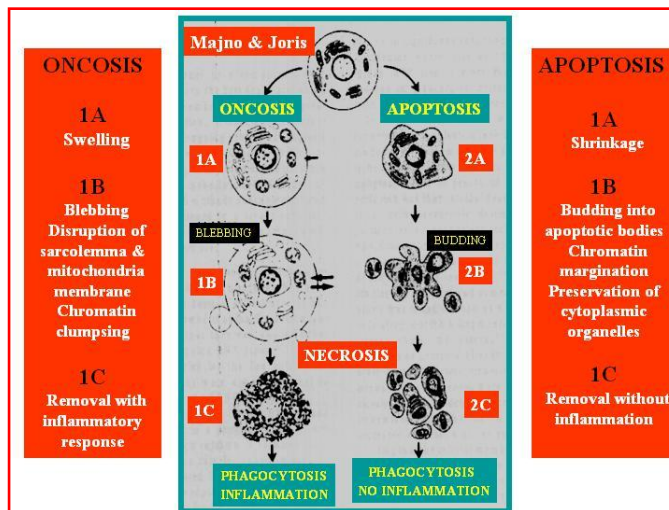
FIG.7f Autofagia

Come tale, può verificarsi anche durante brevi periodi di ischemia, sebbene il suo contributo, per esempio, nel preconditionamento non sia stato studiato. Vescicole autofagocitiche classiche e l'autofagia sono state osservate nei cuori di coniglio reso ipossico per 20-40 minuti e poi riperfuso (77), e questo è

stato associato con il recupero funzionale dei miociti. Sorprendentemente, forse, la successiva letteratura cardiologia ha prestato poca attenzione all'autofagia come un meccanismo di protezione cellulare nel miocardio ischemico, e questo potrebbe essere un settore promettente per ulteriori ricerche usando il nostro modello sperimentale. Se il periodo di digiuno è prolungato, le cellule in fase di autofagia procedono verso l'apoptosi. L'autofagia è quindi un processo di protezione, nonché un precursore di morte cellulare a seconda della intensità e durata dell'insulto.

Oncosi

In contrasto con l'apoptosi, che è caratterizzata da una contrazione cellulare,



l'oncosi (78,79) è caratterizzata da un rigonfiamento, sia degli organelli che dell'intera cella. E' il principale meccanismo di morte cellulare nel danno

ischemico e l'equilibrio tra oncosi e apoptosi sembra essere in gran parte determinato dal contenuto intracellulare di ATP. Se il contenuto di ATP scende al di sotto del 80% dei livelli normali, la morte avviene per oncosi; se invece i livelli di ATP sono elevati vi è l'apoptosi.

Come l'apoptosi, l'oncosi è anch'esso un processo proteolitico che coinvolge più altre proteine quali le calpaine piuttosto che le caspasi.

Necrosi

Vi è un consenso generale che la necrosi non si riferisca ad un meccanismo di morte cellulare, ma bensì ad una descrizione di una fase a vicolo cieco del destino di una cellula. L'autofagia, l'oncosi e l'apoptosi può dunque evolvere in necrosi.

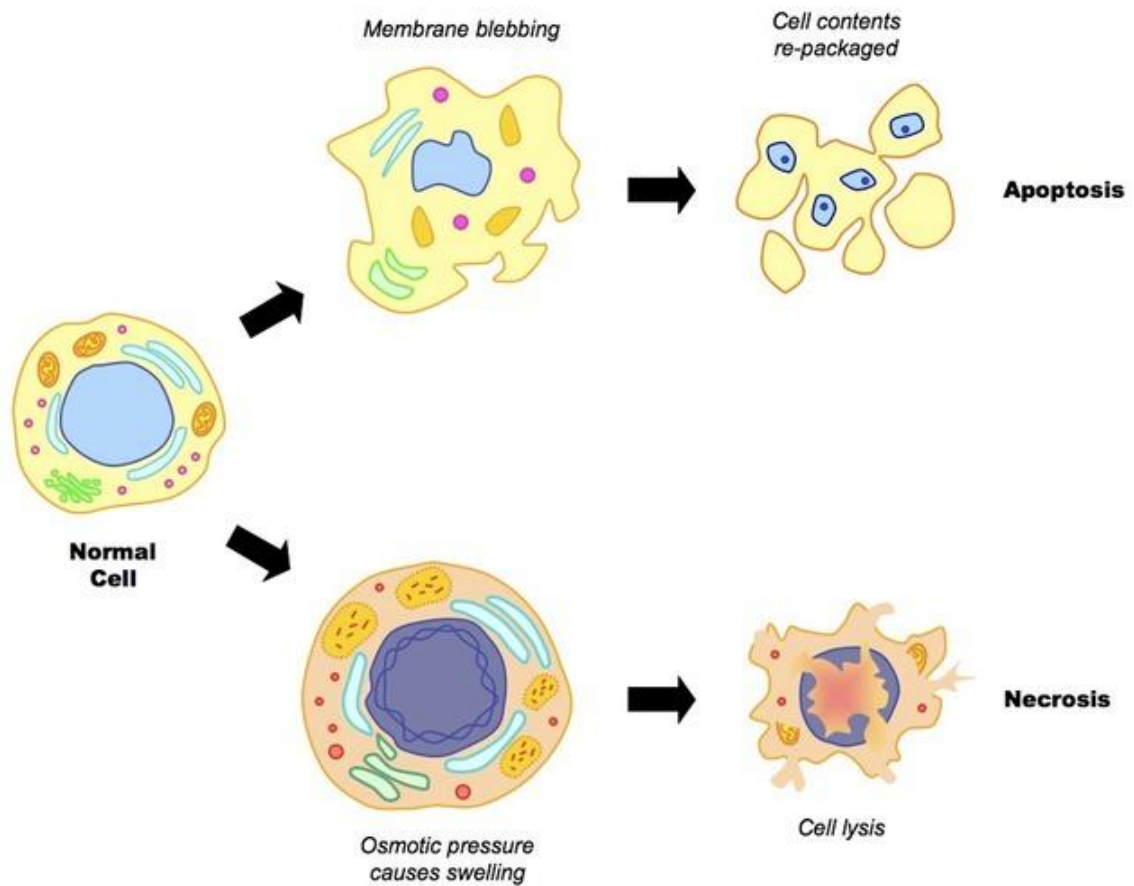


FIG.7g Evoluzione in Apoptosi e Necrosi

1.3.3 La morte cellulare. La transizione tra danno reversibile e irreversibile (29-30-31-32)

La gravità e la durata dell'ischemia determina: 1) la velocità con cui si instaura il danno, e 2) il tipo di danno. Nei primi 15-20 min d'ischemia il danno è reversibile, ma la contrattilità può essere depressa per pochi minuti o giorni. Per definizione, lesioni reversibili sono quelle in cui vi è il ritorno alla normale funzione e struttura di una regione di tessuto miocardico che era stata temporaneamente ischemica. La transizione da condizione reversibile a irreversibile sono ancora sconosciute. Tuttavia, la morte cellulare è ritenuta essere la conseguenza di una combinazione temporale di eventi ischemici, quali: i) la perdita critica di fosfati ad alta energia (ATP, PCr); ii) danno alla membrana cellulare da danni meccanici o metabolici; iii) formazione di radicali liberi ,iv) sovraccarico di sodio e calcio e , v) inibizione della pompa del sodio. Nel complesso, la transizione dal danno reversibile al danno irreversibile non è probabilmente il risultato di un evento metabolico singolo ma più probabilmente si sviluppa gradualmente come un processo di interazioni di molti e diversi meccanismi.

Oltre alla normale necrosi e apoptosi che causano la "morte cardiaca" dei miociti si instaura anche un processo noto come autofagia in cui le cellule catabolizzano le proteine intracellulari per generare ATP nei periodi di "stress" come il digiuno e l'ipossia. Nuove evidenze suggeriscono che

l'autofagia ha un ruolo positivo a livello del cuore per la stessa sopravvivenza dei miociti durante i periodi di stress cellulare svolgendo una importante funzione per limitare i danni.

1.4 Danno da riperfusione (33-34-35-36-37)

Mentre la riperfusione precoce rimane il mezzo più efficace di recupero del miocardio da ischemia acuta, l'improvviso afflusso di ossigeno, paradossalmente può portare ad ulteriore necrosi, aritmie ventricolari e morte cellulare. L'entità del danno da riperfusione è stato collegato ad una cascata di reazioni infiammatorie, tra cui, l'azione di citochine, leucociti, piastrine, specie reattive dell'ossigeno (perossido di idrogeno), radicali liberi.

Anche se la riperfusione avviene durante il periodo in cui il danno è ancora reversibile il recupero della funzione contrattile può essere ritardata. Spesso, il danno da riperfusione si riferisce espressamente alla morte dei miociti che erano vivi al momento della riperfusione. Alcuni autori hanno dimostrato che i miociti che erano vitali all'inizio della riperfusione perdono la vitalità durante le prime 3 ore di riperfusione. Tuttavia la riperfusione è stata anche attribuita a cambiamenti metabolici, funzionali e strutturali che sono la conseguenza del ripristino del flusso arterioso coronarico. È stato anche dimostrato che i miociti possono subire una morte cellulare programmata attraverso il processo di apoptosi che può essere avviato dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), attraverso la riperfusione .

1.4.1 L'ipotesi dell'ossigeno paradosso (38-39-40)

Seguendo alcune osservazioni, in cui a seguito di una riperfusione si verifica spesso una fibrillazione ventricolare, alcuni autori hanno studiato i cambiamenti strutturali ed elettrofisiologici associati alla perfusione del cuore. Nello specifico la riossigenazione porta al rilascio di enzimi cardiaci e alterazioni ultrastrutturali del miocardio e da ciò si è sviluppato il concetto di "oxygen paradox" da Hearse et al, 1973, Hearse et al, 1975. Tale paradosso si riferisce al concetto che, anche se l'ossigeno è essenziale per la sopravvivenza del tessuto la sua "restituzione" ad un miocardio precedentemente ischemico può essere dannoso. Hearse et al. hanno dimostrato che la ri-ossigenazione del miocardio è caratterizzato da ipercontrattura miofibrillare e rottura del sarcolemma che si sviluppa con la riperfusione . Più recentemente alcuni hanno proposto ciò sia dovuto al ripristino dei substrati energetici dopo riperfusione.

1.4.2 Formazione dei radicali liberi (41-42)

Quando si ripristina l'apporto di ossigeno al miocardio, l'ossigeno molecolare viene sequenzialmente ridotto per formare forme reattive di ossigeno, quali l'anione superossido e radicali liberi idrossili. Un radicale libero è un atomo o molecola che ha uno o più elettroni spaiati nel suo orbitale più esterno e pertanto è relativamente instabile e altamente reattivo. Questi radicali liberi

derivati dall'ossigeno, possono interagire con i lipidi e le proteine della membrana cellulare creando ulteriori danni alle cellule del miocardio e deprimere così la funzione cardiaca. A supporto di tali tesi, Bolli e Roberts hanno dimostrato che applicando alcuni "scavengers" (sostanze che inibiscono la formazione di radicali liberi) si può migliorare il recupero della funzione contrattile dopo un insulto ischemico. A queste teorie non si è trovata ancora una unanime spiegazione tra gli studiosi della materia.

1.4.3 Il miocardio "stordito" (42-43-44-45)

In un modello canino d'ischemia miocardica acuta, Heyndricks nel 1975 dimostra che un insulto ischemico breve di 5 minuti è seguito da una depressa funzione meccanica della durata di oltre 3 ore, mentre se l'insulto ischemico aumenta a 15 min. la disfunzione aumenta a 6 ore . L'importanza della osservazione di Heyndricks, è che questi brevi periodi di ischemia non portano alla morte delle cellule e la ridotta funzione contrattile post-ischemica non è accompagnata da una compromissione del flusso sanguigno del vaso occluso precedentemente. Braunwald e Kloner nel -1982 descrivono questa come una condizione di "stordimento del miocardio", perché la funzione meccanica recupera completamente alla riperfusione, nonostante una fase di "prolungata, disfunzione post-ischemica del tessuto vitale che viene recuperato dalla riperfusione". La maggior parte delle conoscenze sul meccanismo di stordimento deriva da studi che utilizzano tessuto non ancora in necrosi e su questo, Bolli et al. hanno dimostrato che dal 50% al 70% dell'

effetto è dovuto alla breve emivita dei radicali liberi che originano da O_2 -derivati che si formano nei primi minuti della riperfusione.

Il disfunzione contrattile post-ischemica alla riperfusione che caratterizza lo "stordimento" del miocardio dopo brevi insulti ischemici può anche essere dovuto ad alterazioni dell'omeostasi del calcio, come molti autori hanno dimostrato e misurato dall'aumento dei livelli di calcio nel citosol durante le prime fasi della riperfusione post-ischemica. Una spiegazione per la correlazione tra elevata concentrazione di calcio nel citosol e miocardio stordito è che l'elevato calcio citosolico può danneggiare l'apparato contrattile compromettendo la normale risposta fisiologica al calcio. Inoltre, è stato proposto che il danno correlato al calcio e ai radicali liberi, possono essere correlati a: i) l'inibizione della pompa sodio; ii) stimolazione dello scambio Na^+ / Ca^{++} e iii) una diminuzione della velocità di inattivazione della corrente del calcio.

Come nell'ischemia, il sovraccarico di calcio durante la riperfusione può compromettere seriamente la miociti attraverso l'attivazione di una serie di proteasi, lipasi e fosfolipasi. Inoltre, l'acidosi intracellulare contribuisce al sovraccarico di Ca^{++} attraverso lo scambio Na^+ / H^+ e Ca^{++} / Na^+ .

1.4.4 Infiammazione (46-47-48-49)

Si pensa che l'infiammazione possa svolgere un ruolo importante nel danno da riperfusione. Con la somministrazione di antinfiammatori corticosteroidi, Libby et al. nel 1973 presentò la prima evidenza che l'infiammazione è

parte del danno da riperfusione, mostrando una riduzione delle dimensioni dell'infarto in un modello animale d'infarto miocardico acuto dopo somministrazione di corticosteroidi. Purtroppo, nonostante i corticosteroidi inibiscano il processo infiammatorio diminuendo il numero di leucociti infiltranti sono però anche in grado di ritardare la guarigione e la deposizione di collagene. Hill e Ward nel 1969 sono stati i primi autori a dimostrare il ruolo del complemento come una delle principali cause d'infiammazione durante la riperfusione miocardica. Il sistema del complemento avvia l'infiammazione, distrugge gli agenti patogeni e promuove l'eliminazione dei complessi immuni e rompe le membrane cellulari.

L'implicazione che l'attivazione dei neutrofili abbia un ruolo nel danno miocardico da ischemia-riperfusione è stato dedotto da molti studiosi utilizzando l'analisi istopatologica. Si è potuto osservare il rapporto diretto tra la durata di ischemia, dimensioni dell'infarto e accumulo di neutrofili nel tessuto miocardico. Su tali osservazioni, altri autori hanno dimostrato che la neutropenia (deplezione dei neutrofili) e l'inibizione dell'adesione dei neutrofili, potrebbe fornire un effetto cardioprotettivo. L'adesione e l'attivazione dei neutrofili è un processo complesso che comporta intrinsecamente il coinvolgimento dell'endotelio funzionando da matrice da quale i neutrofili migrano nel sito dell'infiammazione. L'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali postischemiche porta a ostruzione capillare e rilascio di molteplici mediatori infiammatori come gli enzimi proteolitici e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) ognuno dei quali contribuisce al fenomeno cosiddetto del "no reflow".(ostruzione al flusso).

1.4.5 Precondizionamento ischemico e cardioprotezione (50)

Una delle strategie più efficaci di protezione del miocardio consiste nell'indurre brevi periodi di ischemia e riperfusione per proteggere da più lunghi periodi di ischemia. Questo fenomeno è stato chiamato: precondizionamento ischemico (IPC). Oggi, il precondizionamento ischemico è diventato il paradigma della cardioprotezione (anche se poco applicato) su cui si basano attualmente anche alcune strategie farmacologiche. Tuttavia, il meccanismo di azione del precondizionamento ischemico rimane ancora poco conosciuto. L'adenosina è stato il primo elemento identificato nel meccanismo di protezione agendo sia come innesco che come mediatore del precondizionamento ischemico. L'adenosina agisce su diversi tipi di recettori e presenta una vasta gamma di effetti che rendono difficile la spiegazione del meccanismo di protezione. Bloccando i recettori dell'adenosina con un antagonista non selettivo (es. 8-p-sulfofenilteofillina) durante un precondizionamento, oppure un episodio ischemico prolungato si abolisce ogni effetto protettivo. Il ruolo centrale della adenosina sembra avvenire tramite accoppiamento cellulare dei recettori per l'adenosina A1 e / o A3 e PKC attraverso l'attivazione dei canali ATP-sensibili del potassio (KATP). Oltre all'adenosina, ci sono altri potenziali inneschi recettore-dipendenti ed indipendenti quali possibili vie di segnali ad effettori terminali che possono essere responsabili di una cardioprotezione indotta (Fig. 8) (Schulz et al., 2001).

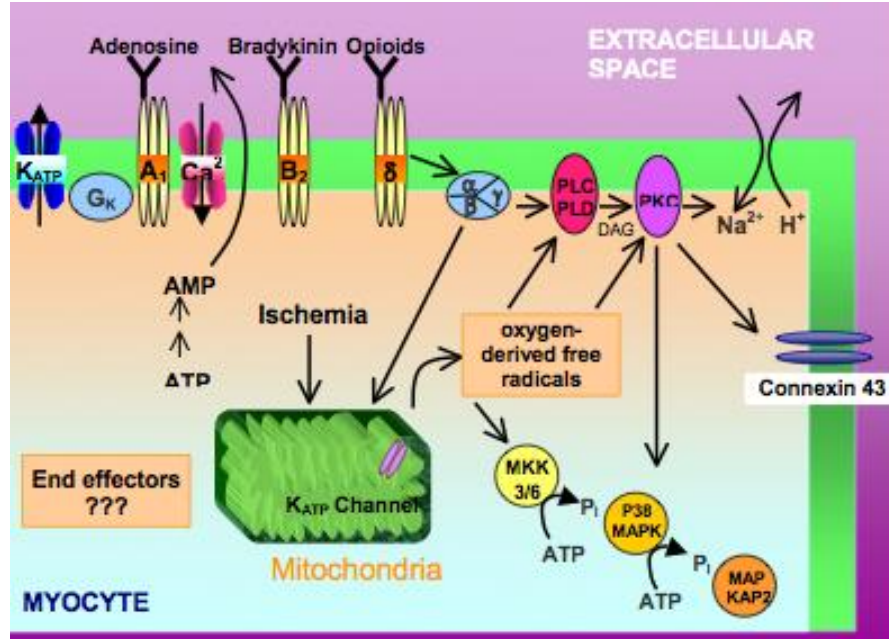


Fig. 8 Interazioni tra mitocondrio citosol, e spazio extracellulare

Gli stimoli recettore dipendenti quali: Adenosina/recettore, bradichinina, proteina G fosfolipasi, proteina chinasi, oppioidi, urocortina. Quelli invece recettore-indipendenti: radicali liberi, ossido nitrico, tirosina chinasi, e proteine chinasi attivate da mitogeni.

1.4.6 Il condizionamento farmacologico (51-52-53-54-55-56-57)

Molti sono i farmaci testati in studi sperimentali e clinici con il presupposto di preservare il miocardio durante la chirurgia cardiaca.

Il preconditionamento con un anestetico volatile quale il desflurano, in pazienti sottoposti a chirurgia coronarica elettiva, ha mostrato un minor rilascio di enzimi miocardiospecifici e una migliore preservazione della funzione contrattile post-operatoria. (Meco 2007). Vi sono inoltre studi clinici sugli effetti protettivi di altri anestetici volatili quali il sevoflurano e l'isoflurano, inoltre in esperimenti sull'animale il sevoflurano si è dimostrato ridurre il livello di apoptosi miocardica (Tempe 2011).

Anche l'adenosina si è dimostrata avere effetti cardioprotettivi nei pazienti sottoposti a rivascolarizzazione miocardica, ma quest'ultima non ha ancora raggiunto un uso clinico consolidato. Inoltre il suo effetto antiapoptotico rimane non del tutto chiarito.(Shalaby 2008).

Altre evidenze sperimentali e cliniche sulla cardioprotezione si sono avute con l'infusione di soluzioni di glucosio/insulina/potassio (GIK) in pazienti sottoposti a sostituzione valvolare aortica e rivascolarizzazione miocardica. La soluzione GIK sembra prevenire l'apoptosi almeno in un esperimento in cui si induceva una ischemia/riperfusion in un modello animale (Zhang 2004). Interessante l'uso in cardiocirurgia di un farmaco ben noto quale principale immunosoppressore nei trapianti d'organo quale la ciclosporina A.

Questo farmaco agisce quale specifico inibitore dell'apertura dei pori mitocondriali (MPP) e quindi agire come farmaco antiapoptotico attraverso l'azione della bradichinina. Antiossidanti e calcio antagonisti (nicardipina) e antinfiammatori quali i corticosteroidi hanno tutti dimostrato effetti protettivi in sperimentazioni cliniche (Dhalla 2000),. In modelli sperimentali, l'infusione intracoronarica di Insulin- like growth factor (IGF II) sembra prevenire l'apoptosi e la dismissione di enzimi miocardiospecifici quali la troponina I. La minociclina, un antibiotico della famiglia delle tetracicline, e alcuni peptidi della famiglia delle Urocortine si sono dimostrati avere efficaci attività antiapoptotiche in modelli sperimentali (Lawrance 2004, Scarabelli 2004).

CAPITOLO 2

2.1 La famiglia delle Urocortine nei meccanismi di cardioprotezione (58-59-60-61-62-63)

Le Urocortine sono peptidi di 40 aminoacidi della "famiglia" del fattore di rilascio della corticotropina (CRF). Le Urocortine sono ampiamente espresse nel cuore, sistema nervoso centrale, intestino, muscolo scheletrico, pelle, sistema immunitario e hanno ruoli nell' infiammazione, motilità intestinale, appetito, attività neuronale e sistema cardiovascolare. Ci sono tre forme di Urocortina; urocortina I (Ucn1), urocortin 2,(Ucn2o stresscopina 2) e urocortin 3 (Ucn 3 stresscopina 3 [SCP]). Le azioni delle urocortine sono mediate attraverso due proteine G accoppiate ai recettori CRF-R1 e CRF-R2; Ucn1 si lega ad entrambi i recettori, mentre l'Ucn2 e l'Ucn3 si legano solo al recettore CRF-R2.

2.2 Le Urocortine e lo scompenso cardiaco (64-65)

L'espressione di Ucn1 nel cuore è aumentata durante l'ipossia e l'ipertrofia e i livelli di Ucn1 circolanti sono elevati nei pazienti affetti da scompenso cardiaco. Una infusione di Ucn1 nell'uomo porta ad un aumento dei livelli di ACTH e di cortisolo e gli effetti della Ucn1 sul sistema cardiovascolare includono vasodilatazione, aumento del flusso sanguigno, aumento della

frequenza cardiaca e aumento dell' inotropismo. La somministrazione di Ucn1 ha effetti benefici nello scompenso cardiaco sperimentale, tra cui aumento della portata cardiaca, riduce le resistenze vascolari periferiche e diminuisce i livelli circolanti degli ormoni vasocostrittori quali l'angiotensina II, la vasopressina e l'endotelina-1 (Rademaker et al., 2002). L'Ucn1 abbassa anche la pressione arteriosa media e i livelli circolanti di ANP e BNP ritardando significativamente l'insorgenza d'insufficienza cardiaca (Rademaker et al., 2005, 2007). Anche le Ucn1 e 2 e 3 hanno effetti benefici sull'attività cardiovascolare. L'Ucn2 aumenta la contrattilità nei miociti ventricolari di coniglio e riduce la pressione diastolica aumentando la frazione di eiezione e la gittata cardiaca in modelli di topo con insufficienza cardiaca, al contrario questi effetti non sono evidenziabili nei modelli murini Knock-out per il CRF-R1. Allo stesso modo, l'Ucn3 aumenta la gittata cardiaca e le resistenze periferiche nello scompenso cardiaco nei modelli ovini (Rademaker et al., 2005). Il blocco del recettore CRF-R2 in un modello ovino con insufficienza cardiaca porta ad un aumento della pressione arteriosa e delle resistenze periferiche, nonché un aumento dei livelli di renina e di aldosterone, suggerendo che l'urocortina endogena può svolgere una funzione utile durante l'insufficienza cardiaca stessa.(Rademaker et al., 2005).

2.3 Urocortine ed ischemia

Oltre ad avere ruoli nello scompenso cardiaco, le urocortine hanno dimostrato di essere utile nelle lesioni da I / R. Il nostro gruppo ha dimostrato che Ucn1 è in grado di proteggere colture di miociti cardiaci da un danno da I / R in vitro e ridurre la dimensione infartuale e migliorare la funzione cardiaca ex vivo (Scarabelli et al., 2002). Soprattutto, l'Ucn1 può proteggere il cuore quando questo peptide venga somministrato appena prima della riperfusione, rendendolo quindi attraente come possibile ausilio terapeutico specialmente in cardiocirurgia alla riperfusione dopo il clampaggio aortico. (Schulman et al., 2002). L'Ucn1 riduce il rilascio di CPK diminuendo il numero di cellule caspasi-3 positive e contribuisce a mantenere le riserve di fosfati ad alta energia durante l'I / R (Scarabelli et al., 2002). L'Ucn1 ha effetti ipotensivi in vivo, tuttavia, la somministrazione di urocortina durante la sperimentazione in vivo di I / R riduce la dimensione dell'infarto, abbassa la pressione arteriosa e riduce l'incidenza di tachicardia e fibrillazione ventricolare (Schulman et al., 2002, Liu et al., 2005). Il trattamento dei miociti cardiaci con le urocortine porta all'attivazione delle vie MEK1/2-ERK1/2 e PI(3)K-Akt entrambe necessarie per la cardioprotezione. Interessante da notare, che la sintesi proteica è necessaria per la cardioprotezione dalle urocortine, suggerendo inoltre che le proteine a valle delle vie ERK1 / 2 e Akt mediano la cardioprotezione. (Lawrence et al., 2002.) Molti di questi mediatori a valle

delle vie sopracitate sono state recentemente identificate. Ucn1 "upregulates" l'espressione della subunità dei canali del potassio 6,1 Kir e l' inibizione di K(ATP) abroga l'effetto protettivo dell' urocortina, l'urocortin "downregulates" anche l'enzima fosfolipasi A2 calcio-insensitive (Lawrence et al., 2002, 2003). Traslocazione mitocondriale di PKC appare anche necessaria per la cardioprotezione mediata da UCN-I. La co-somministrazione di un inibitore della traslocazione di PKC abroga la possibilità dell' urocortina di mantenere l'integrità della membrana mitocondriale e proteggere dall' apoptosi durante l'I / R (Lawrence et al., 2004, 2005).

CAPITOLO 3

Il ruolo cruciale del microcircolo coronarico nella perfusione coronarica è oggi sempre più riconosciuto in quanto l'80% del flusso miocardico si basa sulla integrità del microcircolo. (Fig.9)

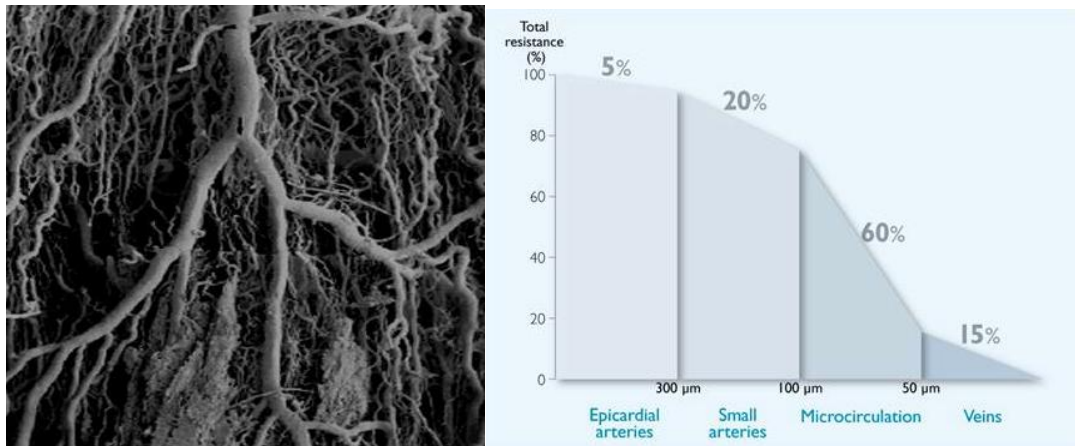


Fig.9 (mod da Chilian WM J Nucl Cardiol 2001;8:599)

3.1 Ischemia perioperatoria

L'ischemia perioperatoria o addirittura l'infarto durante o dopo intervento cardiocirurgico, si verificano più spesso di quanto riconosciuto. L'incidenza riportata varia a seconda dell'intervento chirurgico e la presenza o meno di fattori di rischio ma anche dalle modalità di rilevazione dell'ischemia miocardica, con definizioni e criteri diagnostici che cambiano in modo dinamico. (Priebe 2004, Priebe 2005). Nella chirurgia non cardiaca (chirurgia vascolare maggiore, addominale e toracica) alcuni dei fattori di rischio

preoperatori individuati per complicanze cardiache perioperatorie, tra cui l'infarto del miocardio sono: la cardiopatia ischemica, lo scompenso cardiaco congestizio, la malattia cerebrovascolare, la terapia insulinica e un elevato valore della creatinina sierica (Lee 1999). Nei pazienti di sesso maschile con malattia coronarica (CAD) sottoposti a chirurgia elettiva non cardiaca, Mangano ha riscontrato un'incidenza del eventi ischemici intraoperatori del 25% associati a variazioni dell' ECG e una incidenza postoperatoria di ischemia all'ECG del 41% (Mangano 1990). Episodi di ischemia miocardica perioperatoria aumentano quindi il rischio di infarto miocardico spesso con esito infausto. La maggior parte dei pazienti che sopravvivono ad un evento ischemico perioperatorio mostrano successivamente aree vaste di infarto miocardico agli esami di imaging. Alcuni studi sul rilascio di enzimi miocardiospecifici nel periodo perioperatorio, hanno dimostrato che tanto più elevato è il rilascio di Troponina I tanto più vasto è il danno al miocardio e tanto più sfavorevole è la prognosi a distanza. Durante gli interventi di rivascolarizzazione miocardica (CABG), episodi perioperatori di ischemia possono verificarsi con una frequenza intorno al 50% già prima del bypass cardiopolmonare (CPB), e nel 60% circa entro 8 ore dalla rivascolarizzazione (Tupper-Carey 2000). Il verificarsi di questi episodi ischemici è sempre associato ad un aumento dei livelli di troponina I postoperatoria, anche in assenza di diagnosi elettrocardiografica o ecocardiografica di infarto miocardico (Tupper-Carey 2000).

3.2 Diabete e protezione miocardica

Il Diabete mellito (DM) è un ben noto fattore di rischio per morbilità e mortalità associate alla circolazione extracorporea (OPC) .Sebbene i pazienti affetti da DM siano circa il 30 per cento di tutti i pazienti che vengono sottoposti a bypass aorto-coronarico (CABG) , questi pazienti, presentano percentuali di morbilità e mortalità post-operatoria maggiori della popolazione senza diabete con livelli di mortalità dal 50 al 90% superiore . Morbidity cardiache quali l'infarto del miocardio seguita dall'ictus, sono tra le cause più comuni di mortalità tardiva dopo CABG nei pazienti con DM . Rispetto ai non-DM questi pazienti, presentano una più elevata morbilità postoperatoria con percentuali più elevata di più elevate di re-interventi 7, infezioni 2, 8, maggiore incidenza di complicanze neurologiche post-operatorie e periodi più lunghi di ospedalizzazione. È stato inoltre riportato che il bypass cardiopolmonare (CPB) induce maggiore stress ossidativo nei pazienti con DM rispetto a quelli senza DM, con un'induzione di espressione genica (sia in termini quantitativi che qualitativi) indotti dalla circolazione extracorporea e dalla somministrazione di cardioplegia potenzialmente responsabile delle diverse reazioni infiammatorie in questi 2 gruppi di patients 10. Inoltre, sia la mortalità precoce che tardiva 2,7-9 2 ,4-9, 11,12 è sicuramente maggiore nei pazienti con DM.

L'arresto cardioplegico (che esamineremo di seguito), e la successiva riperfusione inevitabilmente espongono il cuore ad una ischemia / riperfusione iatrogena (I/R). Abbiamo precedentemente riportato che la

somministrazione di cardioplegia ematica calda nei pazienti non diabetici (NDMP) è associata ad un aumento della espressione endogena nei miociti di Urocortin (UCN) e che i miociti che risultano positivi alla colorazione vitale per l'UCN sono vitali, mentre quelli negativi presentano tracce di apoptosi

13. Inoltre, una maggiore espressione mitocondriale della PKC- ϵ è stata osservata nei miociti vitali UCN-positivi dopo arresto cardioplegico. 14. L'espressione della PKC- ϵ nei mitocondri è stata osservata nei miociti Ucn positivi (vitali) dopo arresto cardioplegico, tuttavia, l'espressione della PKC δ , è stata implicata nell'apoptosi in diversi sistemi cellulari, tra cui il cuore (recensione in 3), e l'iperglicemia si è dimostrata in grado di aumentare sia la PKC- δ che l'apoptosi in miociti ventricolari di ratto in esperimenti in vitro 4.

I meccanismi attraverso i quali il DM aumenta la morbilità e la mortalità nella rivascolarizzazione miocardica sono ancora poco conosciuti. La gravità del DM, definito dai livelli di glucosio nel sangue, sembra giocare un ruolo importante, dal momento che ne è stata evidenziata la sua influenza sulla sopravvivenza a lungo termine dopo CABG in uno studio pubblicato da Lawrie et al 3. Sia la glicemia preoperatoria 3,22 che l'iperglicemia post-operatoria 23 sono stati segnalati importanti fattori predittivi di mortalità tardiva dopo bypass coronarico. Un recente articolo di Voisine et al. ha mostrato chiaramente le differenze qualitative e quantitative dei profili di espressione genica di miociti cardiaci nei pazienti affetti da DMP rispetto a quelli non diabetici NDMP, in particolare quelli relativi alla risposta infiammatoria e stress ossidativo dopo circolazione extracorporea e arresto cardioplegico. 10. Tuttavia, i meccanismi molecolari attivati nel paziente

diabetico DM dopo arresto cardioplegica che contribuiscono a peggiorare l'esito peri-procedurale è ancora poco conosciuto. I meccanismi molecolari riportati nel nostro studio clinico (80) può forse contribuire ad una migliore comprensione e gestione dei pazienti con DM e valutare la risposta del cuore all'arresto cardioplegico.

L'iperglicemia pre e post intervento cardiocirurgico, oltre ad indurre stress ossidativo e un inotropismo negativo nel cuore (24), è stata vista provocare una disfunzione mitocondriale, rilascio di citocromo c e apoptosi (25). L'iperglicemia è anche un potente segnale di attivazione degli isoenzimi PKC, che a loro volta sono associati con la modulazione dell'apoptosi (24). In colture primarie di miociti di ratto "fasting" l'iperglicemia induce morte cellulare, che viene attenuata con la somministrazione di peptidi inibitori delle PKC beta-1/beta-2 e zeta, non PKC-ε (epsilonV1-2). Per contro, l'attivatore per la traslocazione PKC-ε (psi epsilon RACK) abolisce l'apoptosi indotta dall'iperglicemia, suggerendo fortemente il ruolo cardioprotettivo della PKC-ε. (24).

L'attivazione della PKC-δ, un'altra isoforma delle PKC, è stato riportata in miociti ventricolari sotto condizioni di iperglicemia (16). In miociti ventricolari di ratto adulto, un trattamento con glucosio in grado di creare uno stato di iperglicemia (16,5 mM) per 24 ore ha determinato una triplicazione dell'apoptosi rispetto ai controlli.

La bassa espressione di UCN nei cuori dei pazienti diabetici è associata ad una bassa espressione di base della PKC-ε, che non si trasloca dopo arresto cardioplegico, ma purtroppo da una sovraespressione di PKC-δ, la cui

traslocazione post-cardioplegica è stato vista nei nuclei di miociti apoptotici . Quindi, una bassa espressione di UCN basale nei miociti dei pazienti diabetici e l'incapacità di aumentare la loro espressione dopo l'arresto cardioplegico, può contribuire a rendere i cuori dei pazienti diabetici più suscettibili all'apoptosi, e quindi a contribuire a risultati chirurgici più negativi. Da questi studi si può postulare l'integrazione nelle soluzioni cardioplegiche di UCN esogena con lo scopo di migliorare i meccanismi intrinseci cardioprotettivi del cuore nel diabetico, riducendo così il rischio postchirurgico di disfunzione cardiaca.

Un limite potenziale del nostro studio è stato l'uso di tessuto atriale piuttosto che ventricolare. Tuttavia, la scelta del tessuto atriale è stata dettata da vincoli etici, legati alla procedura chirurgica che non consentiva il prelievo di biopsie dai ventricoli. Sebbene il miocardio atriale differisca dal miocardio ventricolare relativamente alla percentuale di elementi miocitari, endotelio, connettivo, ed elementi neurali, tutti questi tipi di cellule sono comunque presenti anche nel tessuto ventricolare ed è quindi possibile che simili cambiamenti possano avvenire anche a livello ventricolare in cui oltre a quanto esposto è stato dimostrato che anche i profili di espressione genica sono simili sia nel tessuto atriale che ventricolare prima e dopo arresto cardioplegico. 10.

CAPITOLO 4

4.1 Metodi di protezione miocardica in cardiocirurgia (soluzioni cardioplegiche)

Le soluzioni cardioplegiche sono state introdotte nell'uso clinico già negli anni '50, l'uso come un induttore dell'arresto cardiaco e protettore del miocardio durante la fase di intraoperatoria ha cominciato però a diventare sempre più popolare negli anni '70. L'uso della cardioplegia oggi, può essere considerato oggi una "punto fermo" in cardiocirurgia (Baviera et al 2010). L'idea di base della soluzione cardioplegia è quello di raggiungere l'arresto cardiaco proteggendo il miocardio durante le varie fasi dell'intervento chirurgico al cuore attraverso: 1) una rapida induzione dell'arresto cardiaco in diastole, con agenti depolarizzanti quali potassio o ripolarizzanti quali adenosina/magnesio e lidocaina , 2) rallentare i processi degenerativi e metabolici utilizzando l'ipotermia come adiuvante 3) prevenire così l'ischemia del miocardio indotta durante l'arresto. Diversi studi clinici hanno confrontato i vari tipi di cardioplegia (Tab. I) (fredda cristalloide/ ematica calda/fredda etc.), e i dati attuali sembrano indicare con maggior frequenza che cardioplegia ematica fredda sia quella da preferire. (Martin et al.1994Braathen et al 2010). Tuttavia, l'evidenza non è pienamente convincente (Ovrum et al. 2004 e 2010). Quando si confrontano soluzioni cardioplegiche cristalloidi fredde con ematiche fredde, almeno in alcuni studi si dimostra un rilascio di enzimi miocardiospecifici postoperatori inferiore e minor sindromi da bassa gittata

con cardioplegia ematica fredda, senza però differenze significative dell'evento morte. (Guru et al. 2006, Braathen et al., 2010). Con soluzioni cardioplegiche iperkaliemiche, l'arresto cardiaco si raggiunge attraverso la depolarizzazione indotta dall'aumento del potassio extracellulare, mentre il cloridrato di procaina è utilizzato come stabilizzatore della membrana cellulare e l'acetato come sistema tampone (Chambers et al 1999 e 2010). La cardioplegia fredda cristalloide può anche essere somministrato in singole dosi, con un risultato paragonabile (Scrascia et al. 2011). Questa soluzione nota con il nome del suo inventore Bretschneider-HTK (istidina-triptofan-ketoglurate, Custodiol[®], tabella 1) ha dimostrato di proteggere il miocardio in maniera efficace, negli interventi sulla valvola aortica, valvola mitrale e in chirurgia pediatrica soprattutto nei casi con lunghi tempi di ischemia. (Modi et al. 2003, Braathen et al 2011, Scrascia et al. 2011). Con la soluzione di Bretschneider l'arresto è indotto da una concentrazione pari a zero di calcio e bassa concentrazione di sodio (Chambers et al. 1999), l'aggiunta di istidina (buon potere tampone,) e del triptofano che protegge il miocita stabilizzando la membrana e il ketoglurato come substrato energetico (Fridell et al. 2009). Il mannitolo è aggiunto alla soluzione per ridurre la quantità di derivati perossidici (ROS). In modelli di cuore ex-vivo la soluzione di Bretschneider si è dimostrata utile nel prevenire l'apoptosi.

1 litro di cardioplegia	St.Thomas II	Cardioplegia ematica	HKT (Custodiol)
Potassio(K ⁺) mmol/l	19,6	21,5	9 (KCl)
Magnesio (Mg ²⁺) mmol/l	16,7	18,2	4 (MgCl ₂)
Calcio (Ca ²⁺) mmol/l	2,0	2,2	0,015 (CaCl ₂)
Sodio (Na ⁺) mmol/l	128	145,1	15 (NaCl)
Procaina HCl mmol/l	1	1,1	-
Acetato mmol/l	29,4	6,5	-
Cloro (Cl ⁻) mmol/l	154,9	154,9	-
pH	6,3	7,3-7,4	7,02-7,2
Temperatura °C	4-8	4-8	8-12
Bicarbonato mmol/l	-	28,9	-
Istidina IstidinaHCl mmol/l	-	-	18/180
Triptofano	-	-	2
K ⁺ /Chetoglutarato mmol/l	-	-	1
Mannitolo mmol/l	-	-	30

Tab.I Tipi di cardioplegia

4.2 Vie di somministrazione delle soluzioni cardioplegiche

La somministrazione delle soluzioni cardioplegiche può essere fatta per via anterograda o retrograda. (Fig.9)

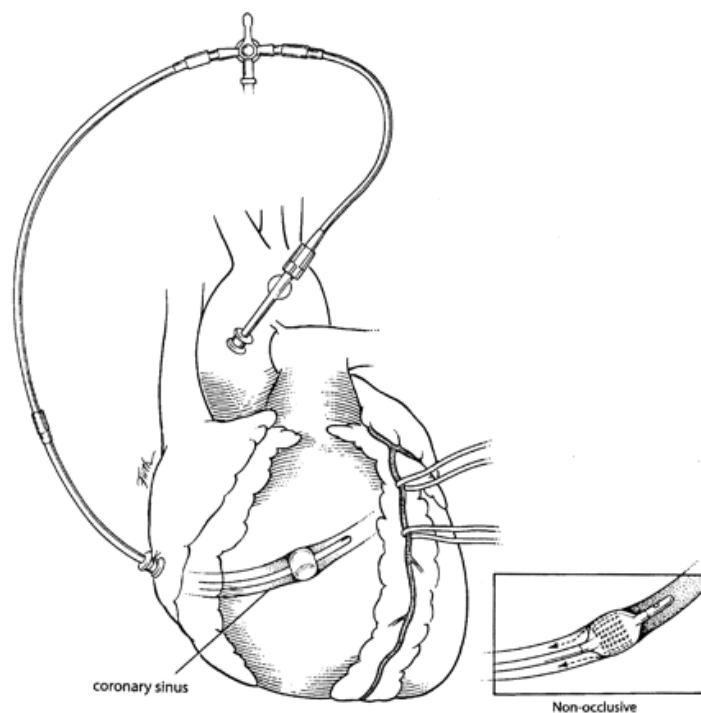


Fig.9 Vie di somministrazione della cardioplegia

Per via retrograda la soluzione cardioplegica viene somministrata nel sistema venoso del cuore ma se usata come unica via, è associata ad una inadeguata perfusione del miocardio e protezione rispetto alla somministrazione per via anterograda. (Winkelmann et al. 1995, Allen et al.

1995, Tian et al. 2003), parete libera ventricolare destra e setto interventricolare sono solo parzialmente perfusi. (Winkelmann et al. 1995). Il motivo principale per le differenze di perfusione tra via anterograda e perfusione retrograda sta nelle differenze anatomiche della circolazione venosa rispetto a quella arteriosa. In studi sperimentali di I/R, la somministrazione di cardioplegia retrograda ha dimostrato di indurre più apoptosi miocitaria nel ventricolo destro rispetto alla somministrazione della cardioplegia anterograda (Vähäsilta et al. 2005).

4.3 Altre strategie di protezione miocardica

In sintesi, possiamo descrivere altri due tipi principali di tecniche finalizzate alla protezione del miocardio durante gli interventi di cardiocirurgia.

Queste tecniche comprendono: 1) la tecnica del clampaggio aortico intermittente, in cui si interrompe il flusso coronarico non oltre i 20 minuti, interponendo periodi di riperfusione, tenendo in considerazione che in questo intervallo di tempo i cambiamenti in atto sulle cellule miocardiche sono reversibili e che per periodi relativamente brevi di ischemia ciò possa indurre un effetto sulle cellule miocardiche rendendole in grado di essere più tolleranti per un secondo periodo di ischemia (vedi preconditionamento), 2) ipotermia e induzione di fibrillazione ventricolare; ciò ha come effetto la riduzione dell'attività metabolica attraverso l'ipotermia e il minor consumo di ossigeno durante la fibrillazione ventricolare.

CAPITOLO 5

5.1 Modelli sperimentali

Molti sono i modelli utilizzabili per studi di cardioprotezione. Si possono utilizzare modelli in vivo, modelli ex-vivo e preparazioni in vitro di biopsie miocardiche.

i) modelli in vivo

Molti sono i modelli in vivo descritti in letteratura per lo studio del miocardio, generalmente sono costituiti da diverse specie animali, poste in circolazione extracorporea e inducendo un'ischemia regionale mediante l'occlusione temporanea di una o più arterie coronarie.

Questi modelli hanno il grande vantaggio di essere più vicini alla pratica clinica permettendo estrapolazioni dei risultati più pertinenti anche in contesti clinici. Tuttavia, lo svantaggio principale è che effetti secondari sistemici di tipo neuronale ed endocrini possono complicare i risultati rendendo a volte difficile l'interpretazione dei risultati. In aggiunta, la complessità nell'allestimento di questi modelli ne impedisce il loro uso in molti ambienti.

ii) i preparato di cuore isolato

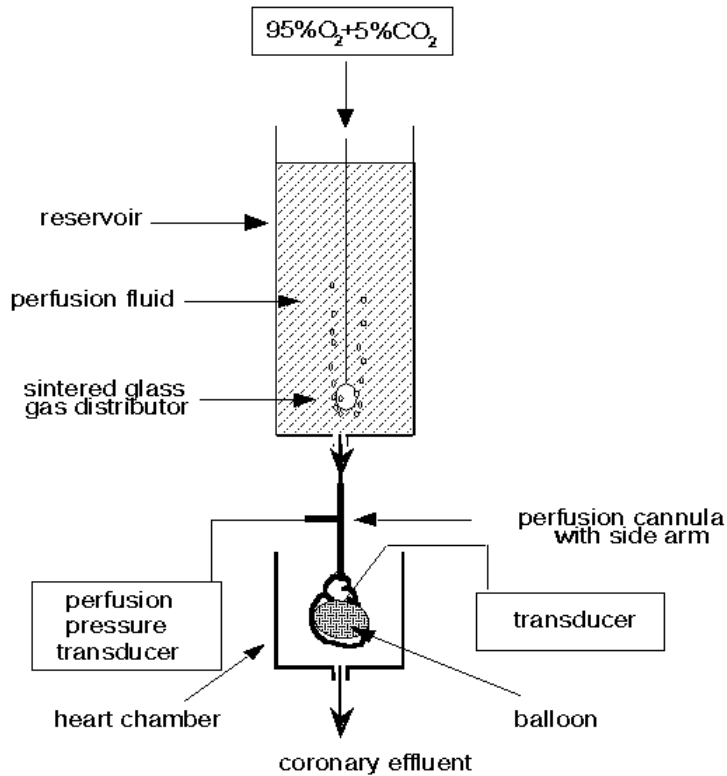
Nel 1893 Langendorff per studiare l'assorbimento di glucosio e di altri substrati energetici nel cuore dei mammiferi, progettò uno dei primi sistemi di

cuore isolato, in vitro ampiamente utilizzato ancora oggi. Per una preparazione efficace è necessario fornire il cuore isolato di un adeguato apporto di ossigeno, mantenere corrette condizioni ioniche e di pH. Per i motivi appena citati, il modello di Langendorff ha visto la sua definitiva applicazione solo nel 1932, quando Krebs e Henseleit descrissero la prima dettagliata composizione del sangue dei mammiferi. La soluzione tamponata con bicarbonato di Krebs-Henseleit assomiglia molto al sangue umano (senza la parte corpuscolata) ed è oggi usata quale soluzione standard nelle preparazioni di cuore isolato.

I preparati isolati di cuore sec. Langendorff sono comunque considerati preparazioni in vitro, ma diversamente dalle preparazioni con frammenti/biopsie di cuore, il cuore è perfuso dalle coronarie e soggetto alle variazioni della frequenza cardiaca e inotropismo. Queste preparazioni sono ampiamente utilizzate perché gli effetti di vari trattamenti non risentono le interferenze da parte di fattori sistemici.

Si possono comunque distinguere due tipi di modelli: quello di Langendorff (non working) in cui la soluzione di K-H viene somministrata attraverso l'aorta ed in cui il ventricolo sinistro non essendo riempito non esegue nessun tipo di lavoro. Il secondo modello di Langendorff (working heart) prevede invece l'infusione della soluzione di K-H in atrio sinistro in modo da far riempire il ventricolo sinistro secondo una circolazione molto simile a quella fisiologica.(Fig 10)

Fig.10
Langendorff



5.2 Sviluppo e disegno di un circuito extracorporeo

Un circuito miniaturizzato per la CPB è costituito (Figura 11) da un serbatoio venoso, una pompa a rulli, (Fig.11a) un ossigenatore a membrana (Fig.11b), appositamente progettato, una siringa per il riempimento del circuito e l'eventuale sostituzione di volume, un tubo sterile con un diametro interno di 4 mm per la linea venosa e 1,6 mm per la linea arteriosa

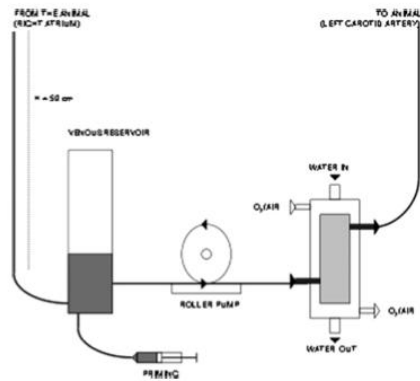


Fig.11a Circuito



Fig.11b Ossigenatore

Per la validazione delle performance dell'ossigenatore e del circuito, sono stati utilizzati per gli esperimenti, ratti adulti maschi Wistar (250-350 g, Charles River, Zurigo, Svizzera). Tutte le procedure sono state conformi ai "Principi di cura per animali da laboratorio" (NIH Publication No. 86-23, riveduta 1985). Il protocollo sperimentale è stato preventivamente approvato dal Comitato Etico locale. Gli animali sono stati acclimatati nelle nostre strutture di ricerca sperimentale all'interno di gabbie abitative per almeno 3 giorni prima dell'intervento ed alimentati regolarmente prima dell'intervento chirurgico. Per tutte le procedure l'anestesia veniva indotta con isoflurano 5%, in un Box e continuata con isoflurano facciale 2% e 40% O₂. Dopo l'induzione dell'anestesia si procedeva all'intubazione orotracheale e a ventilazione meccanica (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA). Il trattamento farmacologico intraoperatorio e postoperatorio comprendeva la somministrazione di analgesici quali la bu-prenorphine (0,05 mg / kg, sc, Temgesic).

I ratti sono stati posti in posizione supina su un tavolo riscaldato per mantenere la temperatura rettale a 37°C durante la procedura chirurgica.

Il monitoraggio comprendeva elettrocardiogramma (ECG) continuo e pressione arteriosa cruenta attraverso un catetere inserito nell'arteria femorale sinistra. Dopo sternotomia previa eparinizzazione completa, la cannula venosa (diametro esterno 1,8 mm) veniva collocata nell'atrio destro attraverso la vena cava superiore, approccio che consentiva il miglior drenaggio venoso sistemico, mentre l'arteria carotide comune veniva cannulata con un catetere 18-G e avanzata nell'arco aortico e collegata alla linea di perfusione arteriosa del circuito di CPB.

5.3 Il nostro modello sperimentale

Il bypass cardiopolmonare (CPB) è un componente essenziale in chirurgia cardiaca, con interazioni tra dispositivo/paziente ancora poco conosciute. Per valutare la risposta emodinamica biochimica, infiammatoria al CPB, , come pure interazioni termo-farmacodinamiche un ossigenatore miniaturizzate per circolazione extracorporea con specifiche controllate e standardizzate è stato sviluppato dal nostro gruppo di ricerca (80) parallelamente a a una tecniche microchirurgiche che ne permettessero l'uso negli animali di piccola taglia. Questo ha aperto nuove potenzialità per l'istituzione di vari protocolli di studio correlati alla circolazione extracorporea, simulando nell'animale di piccola taglia quello che avviene nei soggetti umani sottoposti ad intervento cardiocirurgico.

CAPITOLO 6

6.1 Materiali e metodi e protocollo di studio

Dopo l'approvazione del comitato istituzionale (CIRSAL -Università di Verona) per la cura degli animali da laboratorio, 10 ratti Sprague Darley (400-450 g, Harlan, Udine, Italia), 5 ratti Zucker con mutazione genica non diabetici (600 gr) , 9 ratti Zucker con diabete (400-600 gr) ,alloggiati secondo i criteri e condizioni standard di laboratorio, sono stati anestetizzati con isoflorano 5%con una miscela del 50% di O₂ (pentobarbital sodio, 30 mg / kg intraperitonally) e intubati attraverso l'orofaringe con una cannula 14G. Sono quindi stati sottoposti a ventilazione meccanica con un respiratore per roditori (Harvard Ventilator Modello 687 Apparatus Inc, Holliston, Mass). Il volume corrente era di 7 mL / kg con una frequenza respiratoria compresa tra 50 e 60 atti / min, con una miscela aria-ossigeno (frazione di ossigeno ispirato pari al 50%). La ventilazione è stata adeguata per tenere una tensione arteriosa di anidride carbonica tra i 35 e i 45 mm Hg. L'anestesia è stata mantenuta con isofluorano 2%e 2mg/kg di pancuronium–bromuro per ottenere il completo rilassamento muscolare.I ratti sono stati posti in posizione supina per la procedura chirurgica. L'EEG è stato monitorizzato con derivazione degli arti. Una microsonda a termocoppia è stata inserita nel retto per la misurazione continua della temperatura. L'arteria femorale destra è stata cannulata con un catetere in teflon eparinizzato 24G di calibro per il monitoraggio della

pressione arteriosa sistemica.

Attraverso una sternotomia mediana longitudinale, previa eparinizzazione totale mediante somministrazione di eparina 500 UI/kg, una cannula venosa 16-Gauge modificata con 4 ulteriori fori è stata avanzata nell'atrio destro attraverso la vena giugulare destra consentendo un ottimo drenaggio venoso mediante anche l'applicazione di una pressione negativa (-30mmH₂O) sul circuito venoso. L'arteria carotide comune di sinistra è stata cannulata con un catetere Angiocath 18- Gauge avanzato nell'arco aortico e collegata alla linea di perfusione arteriosa del circuito per circolazione extracorporea (CEC).(Fig.12-12a)

Per la CEC, è stata utilizzata una pompa Roller, un circuito di 1,6 mm di diametro interno, collegato ad un reservoir venoso della capacità di 5 ml. L'ossigenatore a fibre cave utilizzato (Sorin, Mirandola, Italia) è stato appositamente studiato nel nostro laboratorio e fabbricato con criteri standardizzati, (80) con un volume di riempimento totale di 3 ml e una superficie di scambio dei gas di 450 cm², e superficie di scambio termico di 15,8 cm². Il volume totale di riempimento del circuito extracorporeo compreso l'ossigenatore, è stato di 9 ml e costituito da soluzione colloide e ringer lattato. Si avvia la CEC mantenendo dei flussi di portata compresi tra gli 80-100 ml/kg e e registrazioni di pressione arteriosa media di 70-90mmHg. Dopo stabilizzazione della circolazione e dei parametri emodinamici per alcuni minuti, si procedeva al clampaggio aortico e alla somministrazione per caduta (altezza 100cm H₂O) nel bulbo aortico di 2ml di soluzione cardioplegica St

Thomas II per i ratti del gruppo "Controllo", mentre nel gruppo di studio con le stesse modalità venivano infusi 2ml di cardioplegia addizionata ad Urocortina 10(-8)M. durante il clampaggio aortico standardizzato in ambedue i gruppi per 15 minuti in arresto cardiaco, venivano monitorizzati pressione, temperatura e i parametri gas analitici con macchina GEM. Sono state eseguite quattro registrazioni (prima della Cec, durante la Cec, fine della Cec e prima dell'eutanasia) per ogni animale per i parametri Ph, Po₂, PCo₂ HCO₃, Hb e Lattati (TAB II) che venivano modificati a seconda dell'esigenza per ottenere una fisiologia il più possibile vicina alle condizioni normali di attività metabolica. Nel caso in cui la temperatura corporea scendeva si procedeva a riscaldamento attraverso l'utilizzo di una lampada a raggi infrarossi riscaldante, per mantenere stabile la temperatura.

N°	Tempo CEC	Tempo Clamp.	Cardioplegia	RPM/Flussi	Priming	P.A.	Flussi Gas	T°	Peso	Ph	pCO2	PO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Glu	Lat	SO2	BE		
1C		15'			9cc	100		36	550	7,63	19	625	25,9	13,3	134	1,15	4,2	22,9	3,9	100	-1,1		
		5				70/50	1 -45%	33		7,54	18	124	20	6,5	138	0,97	3,7	25,1	4,1	99	-7,1		
		10					85 0,5-50%	33															
		15	2cc S.Th				60 0,5-50%	30															
		20						42 0,5-50%	31														
		25					50 0,5-50%	34		7,42	22	123	17,7	5,3	137	1,18	4,3	27,6	9,1	99	17,7		
		30					60 0,5-50%	33,9															
		35																					
		fuori CEC									7,38	21	259	15,8	5	137	1,19	4,5	26,3	10,9	100	-12,7	
2C		15'			8 cc	160			450	7,58	18	542	22,6	11,2	134	0,94	3,2	27,8	5,6	100	-5		
		5				50 0,5-50%	36,4																
		10				90 0,5-50%	35,7			7,41	22	217	17,7	8,4	130	1,09	4,1	27,8	10,3	100	-10,7		
		15	2cc S.Th				80 0,5-50%	33															
		20						78 0,5-50%	33														
		25					95 0,5-50%	33															
		30					50 0,5-50%	33		7,26	19	273	11,7	5,6	133	1,21	4,4	27,8	14,2	100	-18,6		
		35					62 0,5-50%	32,7															
		40					60	32															
									7,15	21	149	9,6	4,7	135	1,25	4,7	27,8	>15	99	-21,6			
3C		15'			9 cc	140			370	7,68	12	524	22,6	11,8	137	0,91	2,8	13,2	5	100	-6,1		
		5				60 1- 45%	29,2																
		10				50 1- 45%	28			7,22	30	170	14	5,6	138	1,07	3,8	27,8	11,6	99	14		
		15	2cc S.Th				60 1-55%	28															
		20						55 1-55%	27														
		25					60 1-55%	28,7															
		30					60	30		7,22	30	170	14	5,6	138	0,99	3,8	27,8	11,6	99	-15,4		
		35						31															
										7,28	12	393	-21,1	4,7	138	1,09	4,8	27,8	>15	100	-21,1		
4 C		15'			9 cc	175		36	600	7,57	27	4,18	27,7	12,1	136	1,2	3,9	15,5	2,4	100	27,7		
		5					1-50%	36,8															
		10					1-50%	35,4															
		15	2 cc S.Th							7,28	22	55	13	5,9	139	1,19	4,6	26,3	13	84	-16,4		
		20						1-60%	35,4														
		25					1-50%	35,4															
		30				4 cc di sangue da donatore	1-55%	35,4															
		35						35,4		7,15	26	208	10,8	7,1	138	1,2	4,6	26,4	>15	100	-19,8		
		40						35,4															
	45								7,09	19	85	7,6	7,4	140	1,22	6,4	19	>15	91	-24			
Sham						150		34	500	7,59	10	257	16,7	7,1	134	0,36	1,3	4,8	1,1	100			

	tempo CEC	Tempo clamp	cardio plegia	flussi	Priming	P.A.	Flussi Gas	T°	Peso	Ph	pCO2	pO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Gluc	Lat	SO2	BE
1 Uroc		15			9 cc	non		34,8	554	7,61	13	/	13,1	9,3	146	0,71	2,4	/	3,9	/	-8,3
	5			25		registrata	1-80%					/									
	10			25		per	1-80%			7,52	20	/	/	8,4	140	1,05	3,1	/	7,8	/	-6,6
	15		2cc s.Th+	22		problemi	1-80%					/									
	20		Urocortin a	22		con	1-80%					/									
	25			22		millar	1-80%					/									
	30			25						7,2	25	/	/	6,5	142	1,16	3,7		> 15		-18,2
	35			20			1-70%	31,3				/									
	40			15			1-70%					/									
	45			33			1-70%	32				/									
							120			7,2	19	/		6,2	135	1,18	4,1		> 15		-20
2 Uroc		16			8 cc		120	34,2	600	7,62	19	554	25,1	11,8	137	1	3,8	/	/	100	-1,7
	5			30		90	1-80%														
	10			30		78	1-80%	34,3													
	15		2cc s.Th+ 5- 0-15				1-80%														
	20		Urocortin a	22	2 cc	87				6,88	43	466	6,3	9	191	0,68	3,8			100	-25
	30			16	bicarbonato	83	1-50%	34,5													
	35			15		61	1-50%	34,5		7,28	33	229	17	5,9	149	1,04	3,7			100	-11
	40			15		65	1-50%														
	45			15		75	1-50%	34,5													
										7,31	27	581	15,9	4,7	141	1,02	4,1			100	-12
3 Uroc		15			9 cc		120	34,5	450	7,62	14	405	21,3	9,9	148	0,77	3,1	/	4,6	100	-6,8
	5		2cc s.Th+ Urocortin a	15		70	1-70%														
	10			24-30		80	1-50%	33		7,32	41	465	21,4	6,2	138	1,12	3,5	/	4,2	100	-5
	15			25			1,5-40%														
	20			25		90		33,5													
	25			25		85		34													
	30			22		70	1,5-45%	34,6													
	35									7,15	59	490	18,8	7,4	143	1,24	4,7	/	4,1	100	-8,3
							130/75														
4 Uroc		15'			8cc		120	34,5	420	7,55	27	569	26,6	11,2	134	0,72	4,1	21,9	1,8	100	1,2
	5			15-20		50	1-70%														
	10		2cc s.Th+	26		40	1-100%														
	15		Urocortin a	30						7,37	42	529	24,3	5,9	136	1,25	4,4	>27,8	4,5	100	-1

	20							31,2															
	25						1,5-80%																
	30					30		30		7,52	23	107	22	6,5	132	1,26	5,6	>27	6,8	100	-4,1		
	35					40	1-90%																
	40					22																	
										7,67	7	485	8,1	6,2	133	1,1	6,7	23,2	12,7	100	-12		
5 Uroc	15'					9cc		110		36,2	4,95	7,53	28	569	26,1	11,2	136	1,23	4	22,3	4,4	100	0,7
	5	2cc s.Th+				27	1-80%	55															
	10	Urocortina				27	1-80%	55		33,5		7,25	49	38	20,4	6,2	138	1,28	4,2	27,7	7	62	-5,7
	15					27	1-100%			34		7,24	36	530	16,4	7,4	140	1,35	4,4	23,5	10,4	100	-12
	20					27				35,2													
	25					26						7,28	66	47	27,7	6,2	145	1,2	4,2	>27,8	9,8	77	4,3
	30					26	1-100%	60															
	35					26				35,5		7,22	39	492	16,6	6,5	145	1,22	4,5	>27,8	10,7	100	-11,7
								110/60															
1 Z Uroc	tempo CEC	Tempo clamp	cardio plegia	flussi	Priming	P.A.	Flussi gas	T°	Peso	Ph	pCO2	pO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Gluc	Lat	SO2	BE		
		15			9 cc				350	7,02	33	66	8,5	11,5	135	1,39	7,3	19,7	15	79	-22,5		
	5	2cc s.Th+			19	40	1-100%	34															
	10	Urocortina			2 cc	44		44		6,89	51	464	9,8	< 5	146	1,23	5,3	10,7	> 15	100	-23		
	15				22																		
	20				20			33															
	25							45		6,92	45	509	7,1	< 5	147	1,34	5,3	9,5	> 15	100	-23,4		
	30				19			43															
										7,09	21	3,43	8,1	< 5	148	1,4	7,1	7,4	> 15	100	-23		
2 Z Uroc																							
		15			9 cc	70		35	350	7,53	23	498	23,4	11,5	134	1,3	3,7	26,4	5,2	100			
	5	2cc s.Th+			19	25	1-80%	34															
	10	Urocortina			45					7,8	7	404	?	6,5	138	1,15	3,4	21,6	6,9	?	?		
	15				45	57	1-60%																
	20				20					7,05	38	58	10,3	6,2	140	1,32	4,2	19,4	14,2	74	-20		
	25					75	1-80%	32,3															
	30				20	60	1-60%																
	35																						
3 Z	tempo CEC	Tempo clamp	cardio plegia	flussi	Priming	P.A.	Flussi gas	T°	Peso	Ph	pCO2	pO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Gluc	Lat	SO2	BE		
		15			9 cc	75	1-90%	34	350	7,5	8	452	13,8	8,7	154	0,71	1,5	6,5	3,9	100	13,6		
	5	2cc S. Th			18			33															
	10					50		32		7,3	16	577	11,7	6,5	152	1,19	3,8	10,7	10,3	100	-18,5		
	15				161 cc	50	1-80%																
	20					60																	
	25				23	50				7,34	16	487	12,7	5,6	144	1,21	4,2	10	12	100	-17		
	30							33,4															

	35			23																	
4 Z		15		9 cc	75	1-90%	35	350	7,7	16	58	26,7	12,4	133	1,15	3,8	20,5	4,9	100	-0,1	
	5	2 cc s.Th		30	70																
	10			40	67		31,6		7,24	38	583	17	6,8	146	1,18	3,3	18,4	7	100	-11	
	15			50	50	1-75%	31,8		7,17	39	116	14,7	5,9	141	1,29	4,2	16	10,1	97	-14	
	20			50																	
	25			25	80		32,5														
	30			30																	
	35				80		33,5														
5 Z Uroc		15		9cc	60	1-90%	35	350	7,37	23	58	16,9	13	140	1,28	5	10,9	7,3	89	-12	
	5	2cc s.Th+		20	50		34,9														
	10	Urocortin		23	45	1-80%			7,18	25	445	11,4	7,4	155	1,21	4	6,5	9,1	100	-19	
	15	a			75	1-70%	33														
	20			32	50				7,12	23	126	9,4	5,3	148	1,18	5	4,9	11,1	98	-21,8	
	25						32														
	30			19	40																
									7,21	15	191	9,3	4,7	149	1,18	5,2	4,3	11,6	99	-21	
	35																				
	tempo	Tempo	cardiople		Priming	P.A.	Flussi gas	T°	Peso	Ph	pCO2	pO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Gluc	Lat	SO2	BE
1 D Uroc	CEC	clamp	gia	flussi																	
					13 cc	50			550	7,16	29	195	11,7	13	118	1,42	10	>27	10,6	99	10,6
	5	2cc s.Th+		19	60	1-70%	31,9														
	10	Urocortin		29	50		30,8		6,8	93	154	?	5,9	133	1,29	9,6	>28	12,8	?	?	
	15	a		29	50	1-90%	29,9														
	20			23		1-100%	30		6,81	52	586	6,4	5,9	130	1,19	10,5	>28	>15	100	-23	
	25				80	1-80%															
	30				50																
	35			22			31														
									7,17	10	505	7,5	?	126	1,49	12	>28	>15	100	-22	
2 D uroc				9cc	100		35	550	7,42	28	176	20,9	9,6	138	1,1	4,1	20,8	5,8	100	-5,3	
	5	2cc s.Th+		25	?	1-80%															
	10	Urocortin		44	?		34,5		7,27	36	428	17,7	6,5	134	1,28	4,5	26,6	10,4	100		
	15	a		35	?	1-70%															
	20			30	?		33														
	25			29	?		32		7,13	39	151	13,2	8,4	140	1,35	4,6	24,5	11	99	-15	
	30						33,6														
	35																				
3D Sham																					

	tempo CEC	Tempo clamp	cardio plegia	flussi	Priming	P.A.	Flussi gas	T°	Peso	Ph	pCO2	pO2	HCO3	Hb	Na	Ca	K	Gluc	Lat	SO2	BE	
4 d					7cc		70	1-90%	36,5	500	7,39	34	543	22,2	14,6	138	1,27	4,6	19,9	4,7	100	-4,4
		5	2cc s.Th+	31			45															
		10	Urocortin a	42							7,7	7	563	18	8,4	135	1,08	5,3	22,8	8,4	100	-11
		15		46		50	1-70%	34,9														
		20		45				35,5														
		25		22						6,8	74	119	?	?	135	1,21	8,1	>27,8	>15	?	?	
		30		30		60		34														
		35		22				33,5														

Tab.II

Dopo il declampaggio, si procedeva a riperfusione per 20 minuti sempre con la monitorizzazione di tutti i parametri funzionali . con una buona cinetica cardiaca, si procedeva allo svezzamento dalla CEC e si procedeva alla registrazione dei parametri emodinamici misurati con un 2-Ve microtip pressione-volume (PV) catetere conduttanza (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX) inserito nel carotide destra e avanzate nel ventricolo sinistro. I segnali sono stati registrati a una frequenza di campionamento di 1000 campioni / s utilizzando un sistema di conduttanza PV (MPVS-400, Millar Instruments), memorizzati e visualizzati su un personal computer dal PowerLab Grafico 5 del software di sistema (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Le Relazioni P-V loop sono state misurate con transitoria occlusione della vena cava inferiore (riduzione del precarico) sotto il diaframma legando un laccio di sutura intorno alla vena, i valori sono stati calcolati e corretti secondo utilizzando le calibrazioni dei volumi PVAN con software 11. La pendenza (Ees) del ventricolo sinistro telesistolico P-V rapporto (ESPVR- end systolic pressure volume relation ship) e precarico recruitable SW (PRSW -pre load reclutabile stroke work) sono stati calcolati come indici di carico indipendenti di contrattilità del ventricolo sinistro. La pendenza della telediastolica ventricolare rapporto P-V sinistra (EDPVR) è stata calcolata come indice affidabile ventricolare stiffness.

Dopo eutanasia (pentothal) veniva prelevato il cuore e altri organi congelati snap-frozen e , conservati a -80 ° C e utilizzati per l'analisi.

6.2 Caratteristiche tecniche dell'ossigenatore

MK mouse Oxygenator*



Technical Specifications

Oxy Module

- Priming volume: <3 ml
- Membrana Surface Area: 0,044 m²
- Maximum blood flow: 100 ml/min
- Pressure drop @ 50 ml/min: <10 mmHg
- PaO₂ @ 50 ml/min (AAMI std conditions): 315 mmHg

 **SORIN** | CARDIOPULMONARY

Curva di caratterizzazione delle resistenze di MKmouse

Caduta di pressione vs flusso sangue

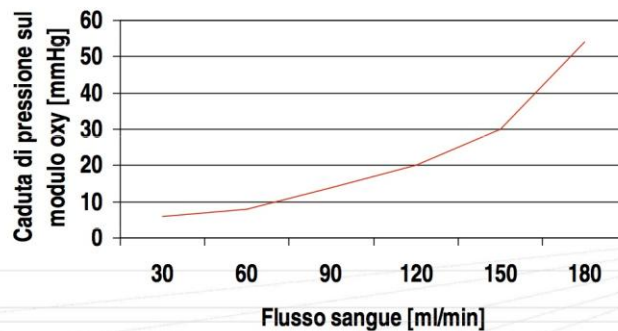


FIG. 12 Caratteristiche tecniche dell'ossigenatore

Trans-membrane Pressure drop in MKmouse Oxygenator

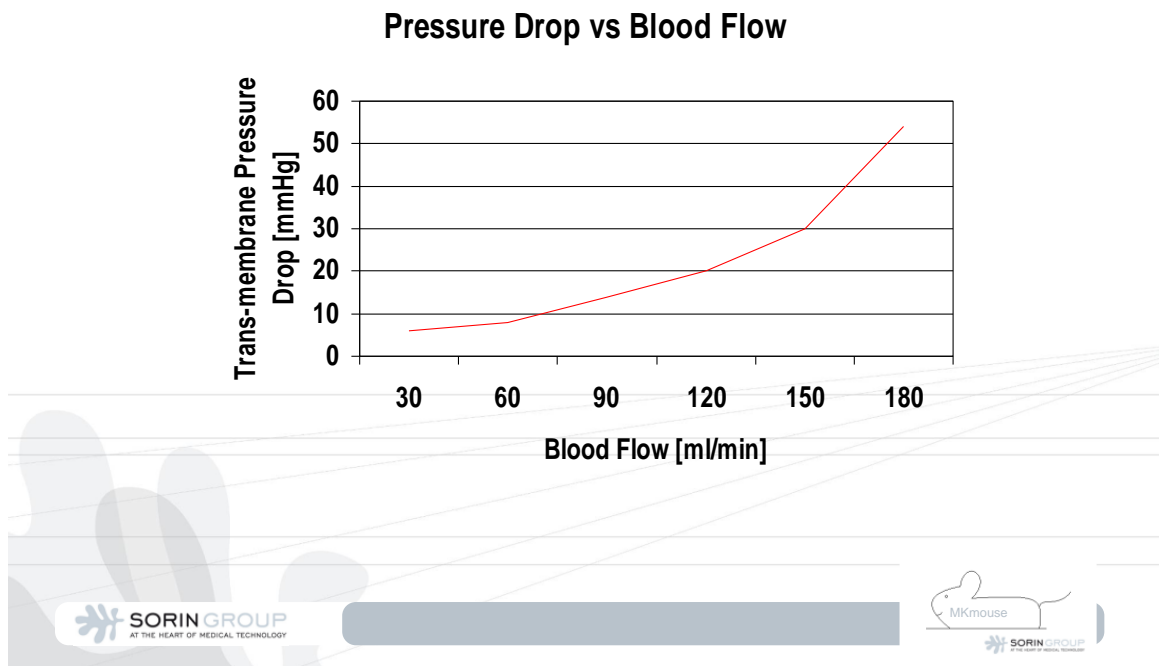


FIG.12a

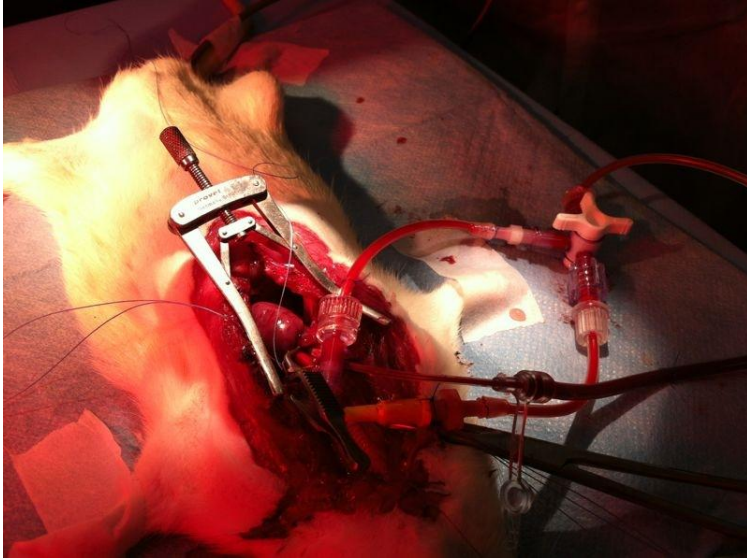


Fig.13 Sternotomia e cannulazione CEC ratto Sprague Dawley

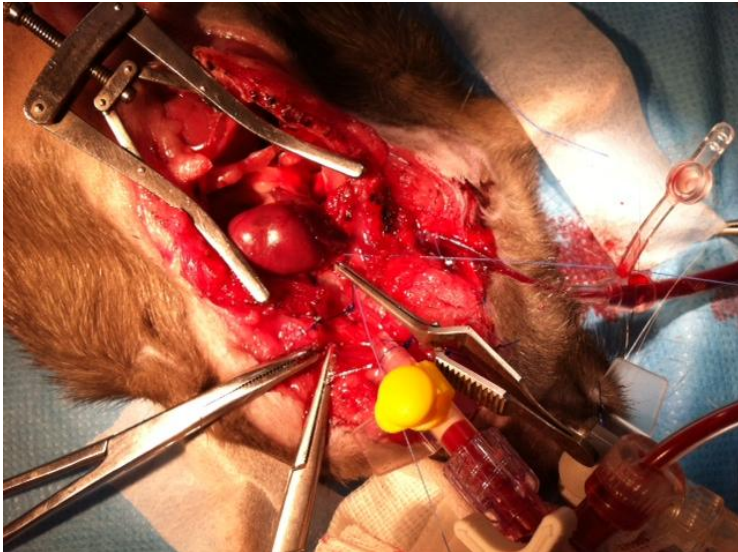


Fig. 13 Sternotomia e cannulazione ratto Zucker diabetico

6.3 Immunoistochimica

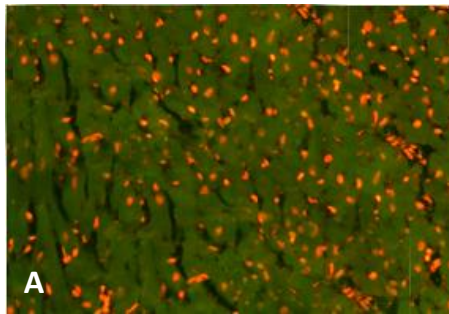
Gruppi sperimentali trattati

1. Ratti non-diabetici esposti a circolazione extracorporea con soluzione cardioplegica convenzionale
2. Ratti diabetici esposti a circolazione extracorporea con soluzione cardioplegica convenzionale
3. Ratti non-diabetici esposti a circolazione extracorporea con aggiunta di urocortina alla soluzione cardioplegica
4. Ratti diabetici esposti a circolazione extracorporea con aggiunta di urocortina alla soluzione cardioplegica

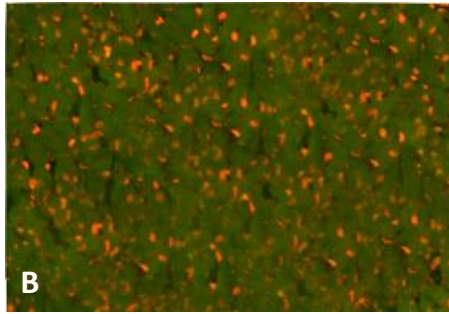
QUANTIFICAZIONE DELLA MORTE CELLULARE APOPTOTICA E USO DELLA COLORAZIONE DI TUNEL.

Dopo rimozione del cuore dal torace dei ratti trattati, il ventricolo sinistro e' stato isolato, lavato in soluzione fisiologica a 4 gradi centigradi ed immediatamente fissato in formaldeide 4% fino ad un massimo di 48 ore alla temperatura di 4 gradi centigradi. Al termine del processo di fissazione, i ventricoli sono stati incastonati in paraffina per valutazione istologica. Sezioni seriali di 5 micron in numero compreso tra 10 e 15 sono state tagliate mediante un microtomo e montate su vetrini siliconizzati. Dopo asciugatura

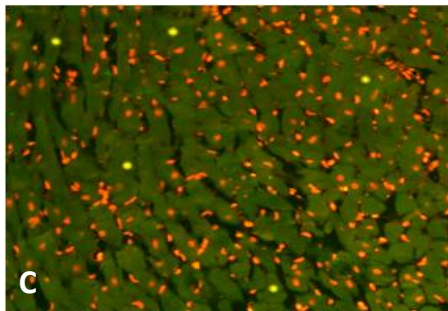
dei vetrini, seguita da rimozione della cera mediante immersione in xilene e riidratazione in bagni decrescenti di etanolo, le sezioni miocardiche sono state pretrattate con tripsina e calcio cloruro. La colorazione TUNEL è stata eseguita utilizzando un kit commerciale (in situ Cell Death Detection Kit, fluoresceina, Boehringer Mannheim; Lewes, Sussex UK) con le seguenti modifiche al protocollo consigliato. Una volta che l'area intorno alla sezione era asciutta, 50 microlitri di miscela TUNEL, contenente TdT e dUTP, sono stati pipettati su ogni sezione. Nella nostra esperienza l'uso di coprivetrini per garantire una diffusione omogenea della miscela TUNEL in sezioni non è strettamente necessario ed è stato evitato anche per prevenire danneggiamenti alle sezioni tissutali. I vetrini sono stati successivamente incubati in una camera umidificata per 60 minuti a 37 gradi centigradi al buio, prima di essere risciacquati per 3 volte in TBS. I controlli positivi sono stati generati incubando campioni dai cuori di controllo a temperatura ambiente per 10 min con DNase I, al fine di indurre rottura del doppio filamento di DNA. I controlli negativi sono stati prodotti incubando le sezioni tissutali con la miscela TUNEL in assenza di TdT. Infine, un eccesso di ciascuna sezione tissutale prima del montaggio dei coprivetrini, i campioni istologici sono stati esaminati mediante microscopia confocale fluorescente. (Fig.14)



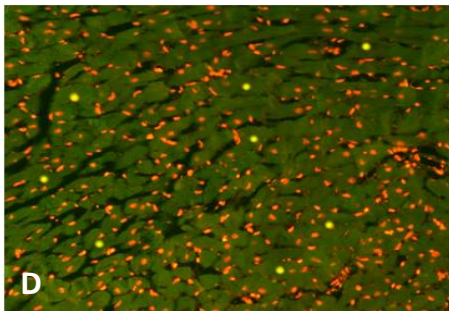
Cuori non-diabetici di controllo



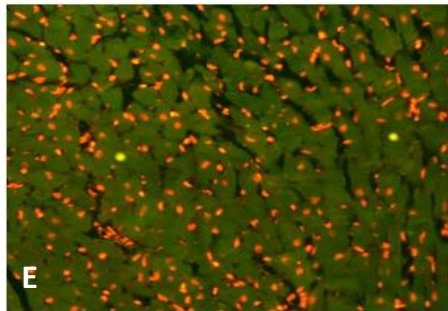
Cuori diabetici di controllo



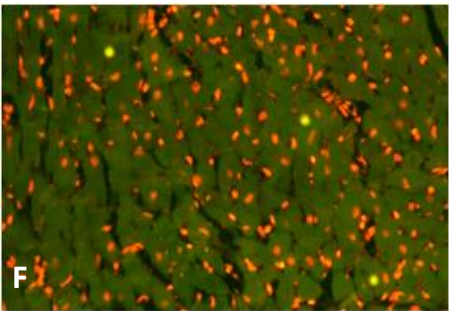
Cuori non-diabetici esposti a cardioplegia convenzionale



Cuori diabetici esposti a a cardioplegia convenzionale

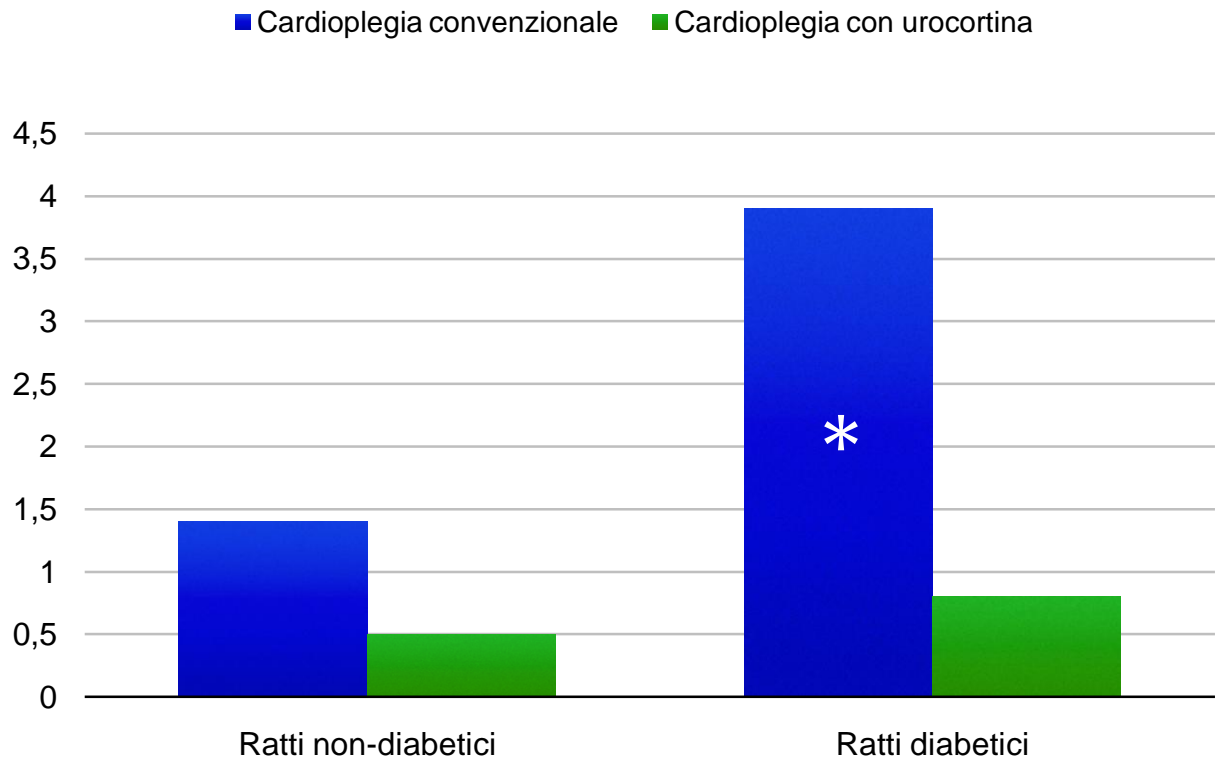


Cuori non-diabetici esposti a cardioplegia con urocortina



Cuori diabetici esposti a a cardioplegia con urocortina

Fig 14 microscopia confocale fluorescente



* $P < 0.05$

TAB. III

Risultati immunostochimica

Nei campioni miocardici prelevati da ratti non-diabetici esposti a circolazione extracorporea (CEC) con soluzione cardioplegica convenzionale la percentuale dell'apoptosi miocitaria, valutata mediante conteggio dei nuclei a fluorescenza verde, e' dell'ordine di $1.4\pm 0.3\%$. Il numero di miociti apoptotici appare quasi triplicato nei campioni di cuore prelevati da ratti diabetici esposti a CEC con soluzione cardioplegica convenzionale ($3.9\pm 1.1\%$). La supplementazione con urocortina della cardioplegia, in accordo con i dati funzionali, ha ridotto significativamente l'occorrenza dell'apoptosi miocitaria. In particolare, nei ratti non-diabetici che hanno ricevuto urocortina congiuntamente alla soluzione cardioplegica, i nuclei apoptotici sono passati da $1.4\pm 0.3\%$ a $0.5\pm 0.2\%$. La riduzione dell'apoptosi e' apparsa ancora piu' marcata nei ratti diabetici dove l'aggiunta di urocortina alla cardioplegia ha ridotto di oltre quattro volte la percentuale di nuclei apoptotici, il cui numero e' diminuito da $3.9\pm 1.1\%$ a $0.8\pm 0.5\%$. L'occorrenza della morte cellulare apoptotica in ratti diabetici e non-diabetici con e senza aggiunta di urocortina alla soluzione cardioplegica. I dati della TAB. III sono espressi come media percentuale di 12-15 campi microscopici ad alta risoluzione. (* $p < 0.05$.)

6.4 Emodinamica

Risultati

Le misurazioni effettuate tramite catetere a conduttanza Pressione-Volume hanno evidenziato un miglior recupero della funzione sistolica dopo arresto cardioplegico e successiva riperfusione. In particolare la ESPVR ha dei valori di pendenza (Ees) medi maggiori nel gruppo trattato con uro cortina rispetto al controllo (2.46 ± 0.61 vs 0.85 ± 0.57 rispettivamente; $p < 0.001$). (Figura 14).

Allo stesso modo il PRSW risulta significativamente maggiore nel gruppo con urocortina (78.6 ± 9.8 mmHg) rispetto al controllo (58.5 ± 10.1 mmHg) ($p < 0.001$).

Nella coorte di ratti diabetici si è confermata una migliore funzione sistolica nel gruppo trattato con urocortina. Il valore medio di Ees nel gruppo trattato con urocortina (2.96 ± 0.61) è stato significativamente maggiore rispetto al controllo (0.92 ± 0.33 mmHg/ μ L) ($p < 0.001$) (Figura 15).

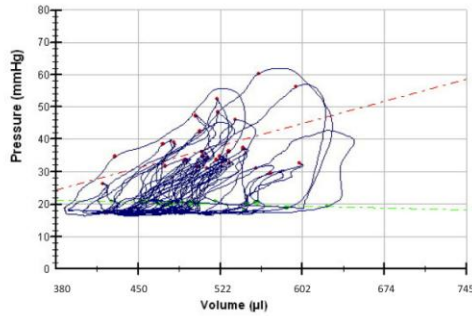
Il PRSW ha confermato tale andamento (67.6 ± 8.8 mmHg vs 44.8 ± 10.1 mmHg; $p < 0.001$).

Per quanto concerne la funzione diastolica, nella coorte di ratti non diabetici la EDPVR non ha dimostrato differenze statisticamente significative nei due gruppi di trattamento. Il valore massimo di Ees nel gruppo trattato con urocortina (0.07 ± 0.12 mmHg/ μ L) è simile al controllo (0.06 ± 0.09 mmHg/ μ L) ($p = 0.3$).

Nella coorte di soggetti diabetici l'urocortina risulta in un miglioramento della funzione diastolica. L'EDPVR nel gruppo trattato risulta essere significativamente minore rispetto al controllo (0.04 ± 0.05 mmHg/ μ L vs 0.12 ± 0.07 mmHg/ μ L; $p < 0.01$), dimostrando un miglioramento della compliance ventricolare (o riduzione della stiffness). (Figura 15).

La comparazione per gli effetti del trattamento rispetto al controllo nelle due coorti di soggetti (diabetici e non) è riportata in Figura 16 e Figura 17

CONTROLLO



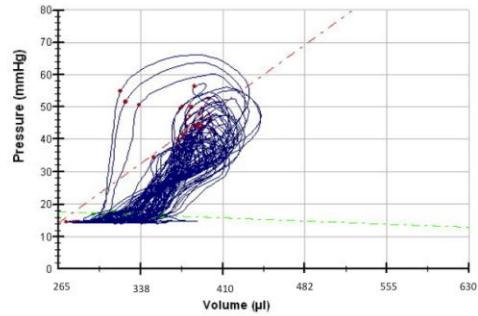
ESPVR (Ees or Emax)

0.85 ± 0.57 mmHg/ μ L

EDPVR

0.07 ± 0.12 mmHg/ μ L

UROCORTINA



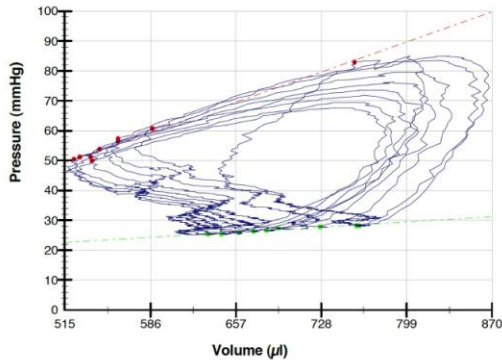
2.46 ± 0.61 mmHg/ μ L $P < 0.001$

0.06 ± 0.09 mmHg/ μ L $P = 0.3$ (n.s.)

Valori espressi come media \pm ES. Significatività calcolata con test della varianza ANOVA e/o da un t-test con correzione di Bonferroni per comparazioni multiple

Figura 14: PV loops registrati durante l'occlusione cavale dopo arresto cardioplegico e riperfusione in due casi esemplificativi nel gruppo urocortina e controllo. Si dimostrano L'ESPVR (in rosso) e l'EDPVR (in verde). I valori mediani \pm ES dei casi studiati sono riportati. La significatività statistica è dimostrata per l'Ees (maximal slope value ESPVR) ma non per l'EDPVR.

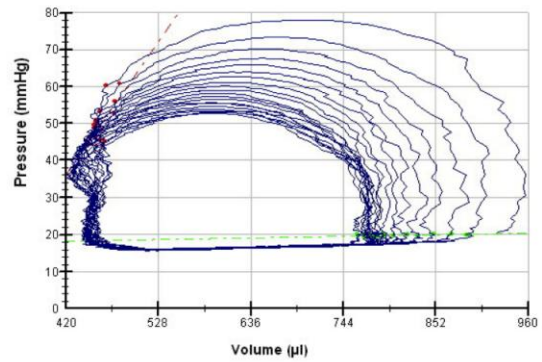
**DIABETICI
CONTROLLO**



--- ESPVR (Ees or Emax)
 0.92 ± 0.33 mmHg/ μ L

--- EDPVR
 0.12 ± 0.07 mmHg/ μ L

**DIABETICI
UROCORTINA**



2.96 ± 0.61 mmHg/ μ L $P < 0.001$

0.04 ± 0.05 mmHg/ μ L $P < 0.05$

Valori espressi come media \pm ES. Significatività calcolata con test della varianza ANOVA e/o da un t-test con correzione di Bonferroni per comparazioni multiple

Figura 15 PV loops registrati durante l'occlusione cavale dopo arresto cardioplegico e riperfusione in due casi esemplificativi nel gruppo urocortina e controllo nella coorte di ratti diabetici. Si dimostrano L'ESPVR (in rosso) e l'EDPVR (in verde). I valori mediani \pm ES dei casi studiati sono riportati. La significatività statistica è dimostrata sia per l'Ees (maximal slope value ESPVR) che per l'EDPVR.

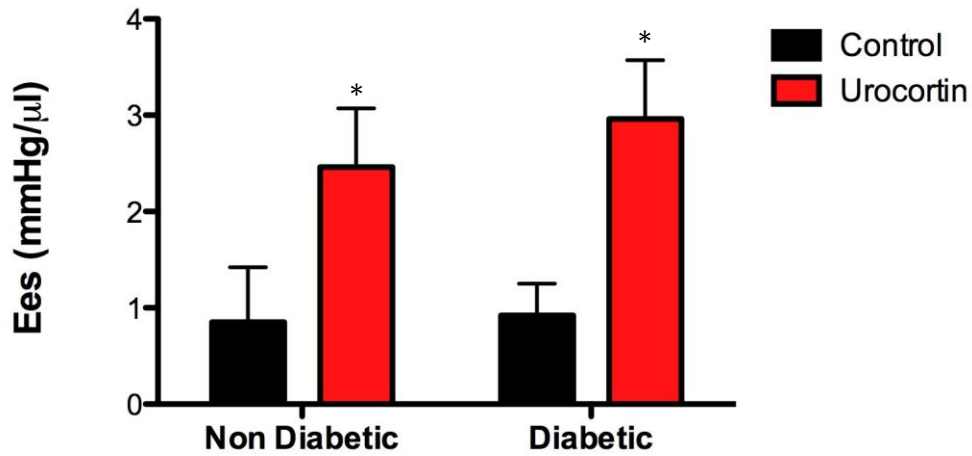


Figura 16 Comparazione degli effetti dell'urocortina rispetto al controllo sulla funzione sistolica (Ees) nelle due coorti di soggetti studiati. Valori espressi come media \pm es. * P < 0.05

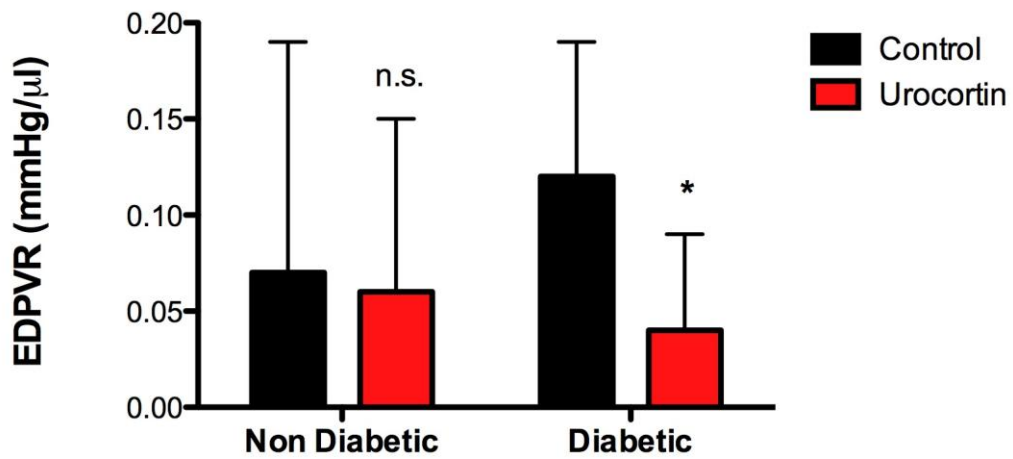


Figura 17 Comparazione degli effetti dell'urocortina rispetto al controllo sulla funzione diastolica (EDPVR) nelle due coorti di soggetti studiati. Valori espressi come media \pm es. * P < 0.05

DISCUSSIONE

La protezione del miocardio in cardiocirurgia sarà sempre uno dei punti più importanti e di preoccupazione del chirurgo nel momento in cui decide di sottoporre un paziente ad intervento al cuore. Tenendo sempre presente che tale procedura dovrebbe mirare a migliorare la qualità di vita del paziente, specialmente in coloro che mostrano, già prima dell'intervento, un certo grado di deficit contrattile del muscolo cardiaco.

I risultati contrastanti degli studi sperimentali nell'ultimo decennio sollevano ancora molti dubbi sulla loro reale efficacia in ambito clinico. Una soluzione alla controversia può solo derivare da una migliore comprensione dei concetti fondamentali sul metabolismo del muscolo cardiaco e sui danni da ischemia e riperfusione durante l'arresto cardioplegico. La ricerca di base è quindi, non solo utile, ma necessaria e indispensabile per cercare di risolvere questi dubbi applicando modelli sperimentali che siano il più vicino possibile alla realtà clinica, come avvenuto nel nostro modello sperimentale.

Studi recenti hanno evidenziato una certa attività metabolica cellulare anche durante l'arresto cardiaco indotto con la soluzione cardioplegica, dimostrando così la necessità di addizionare alle soluzioni standard cardioplegiche adeguati substrati atti a migliorare la protezione stessa. Altri studi hanno anche dimostrato la superiorità della cardioplegia ematica rispetto a quella

cristalloide soprattutto per le sue caratteristiche più fisiologiche. Per quanto riguarda la temperatura e le vie di somministrazione per indurre l'arresto cardiaco rimane ancora a discrezione del chirurgo.

Abbiamo dimostrato che l'arresto cardioplegico induce overexpression di UCN endogena e l'aggiunta di Ucn nella soluzione cardioplegiaca infusa nel ratto diabetico versus controllo induce probabilmente sia a livello di mRNA sia a livello proteico una colocalizzazione di PKCepsilon e traslocazione mitocondriale inducendo la sopravvivenza dei miociti contro la morte cellulare per apoptosi. Considerando che la perdita e/o la compromissione funzionale dei miociti dopo l'arresto cardioplegico è causa nota di riduzione della contrattilità cardiaca e con conseguente maggiore mortalità e morbilità, i dati funzionali misurati con catetere a conduttanza sembrano ridurre l'entità della disfunzione cardiaca se contrapposta al gruppo di controllo che aveva ricevuto una cardioplegia priva di UCN. La strategia proposta di supplementazione delle soluzioni cardioplegiche con UCN esogena sembra essere promettente per ridurre il rischio di disfunzione cardiaca post-chirurgica in pazienti esposti al danno da I / R associato all'arresto cardioplegico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fleckenstein, A. (1971) Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of the heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In *Calcium and the Heart*, (Eds, Harris, P. and Opie, L. H.) Academic, New York, pp. 135-188.
- 2) Babbit, D., Virmani, R. and Formann, M. B. (1989) Intracoronary adenosine administered after reperfusion limits vascular injury after prolonged ischemia in the canine model. *Circulation*, **80**, 1388-1399
- 3) Bak, M. I. and Ingwall, J. S. (1994) Acidosis during ischemia promotes adenosine triphosphate resynthesis in post-ischemic rat hearts. *J Clin Invest*, **93**, 40-49.
- 4) Nees, S. (1989) The adenosine hypothesis of metabolic regulation of coronary flow in the light of newly recognized properties of the coronary endothelium. *Zeitschrift Kardiol*, **78**, 42-49.
- 4) Smolenski, R.T., Kochan, Z., McDouall, R., Page, C. and Seymour, A. M. L. (1994) Endothelial nucleotide catabolism and adenosine production. *Cardiovasc Res*, **28**, 100-104.
- 5) Smolenski, R. T., Sutters, A. and Yacoub, M. H. (1992) Adenine nucleotide catabolism and adenosine formation in isolated human cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **24**, 91-96.
- 6) Nees, S., Herzog, V., Becker, B. F., Bock, M., Des Rosiers, C. and Gerlach, E. (1985) The coronary endothelium: a highly active metabolic barrier for adenosine. *Basic Res Cardiol*, **80**, 515-529.
- 7) Kroll, K., Decking, U. K. M., Dreikorn, K. and Schrader, J. (1993) Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in guinea-pig heart. *Circ Res*, **73**, 846-856.
- 8) Kroll, K., Kelm, M. K. M., Burrig, K. F. and Schrader, J. (1989) Transendothelial transport and metabolism of adenosine and inosine in the intact rat aorta. *Circ Res*, **64**, 1147-1157.

- 10) Paterson, A. R. P. and Oliver, J. M. (1971) Nucleoside transport II Inhibition by p-nitrobenzylthioguanosine and related compounds. *Can J Biochem*, **49**, 271-274.
- 11) Basso C, Carturan E, Pilichou K, Rizzo S, Corrado D, Thiene G. Sudden cardiac death with normal heart: molecular autopsy. *Cardiovasc Pathol*. 2010 Nov-Dec;**19**(6):321-5.
- 12) Dobson, G. P. (2003) On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. *Clin and Exp Pharm Physiol*, **30**, 590-597.
- 13) Bishop, S. P. (1984) How well can we measure coronary flow, risk zones, and infarct size? In *Therapeutic approaches to myocardial infarct size limitation*. (Eds, Hearse, D. J. and Yellon, D. M.) Raven press, New York, pp. 139-162.
- 14) Baxter, G. F. (2002) Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium. *Cardiovasc Res*, **55**, 483-494.
- 15) Baxter, G. F. and Ferdinandy, P. (2001) Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. *Basic Res Cardiol*, **96**, 329-344.
- 16) Baxter, G. F., Goma, F. M. and Yellon, D. M. (1997) Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: time-course and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol*, **92**, 159-167.
- 17) Taggart, P. and Yellon, D. M. (2002) Preconditioning and arrhythmias. *Circulation*, **106**, 2999-3001.
- 18) Whitman, G., Kieval, R., Wetstein, L., Seeholzer, S., McDonald, G. and Harken, A. H. (1983) The relationship between global myocardial redox state, and high energy phosphate profile. A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study. *J. Surg. Res.*, **35**, 332-339.
- 19) Neely, J. R., Rovetto, M. J., Whitmer, J. T. and Morgan, H. E. (1973) Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. *Am J Physiol*, **225**, 651-658.

- 20) Morgan, H. E., Henderson, M. J., Regen, D. M. and Park, C. R. (1959) Regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan diabetic rats: Effects of insulin, growth hormone, cortisone and anoxia. *Ann N Y Acad Sci*, **82**, 387- 402.
- 21) Tanaka, M., Brooks, S., Richard, V., Fitzharris, G., Stoler, R., Jennings, R. B., Arfors, K. and Reimer, K. A. (1993) Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation*, **87**, 526-535.
- 22) Deussen, A., Bjorst, M., Kroll, K. and Schrader, J. (1988a) Formation of S- adenosylhomocysteine in the heart. II: A sensitive index of regional myocardial underperfusion. *Circ Res*, **63**, 250-261.
- 23) Deussen, A., Lloyd, H. G. E. and Schrader, J. (1989) Contribution of S- adenosylthomocysteine to cardiac adenosine formation. *J Mol Cell Cardiol*, **21**, 773- 782.
- 24) Deussen, A., Moser, G. and Schrader, J. (1986) Contribution of coronary endothelial cells to cardiac adenosine production. *Pflugers Arch*, **406**, 608-614.
- 25) Deussen, A., Moser, G. and Schrader, J. (1988b) Formation of S- adensylhomocysteine in the heart. I An index of free intracellular adenosine. *Circ Res*, **63**, 240-249.
- 26) Deussen, A. and Schrader, J. (1991) Cardiac adenosine production is linked to myocardial pO₂. *J Mol Cell Cardiol*, **23**, 495-
- 27) Moser, G. H., Schrader, J. and Deussen, A. (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*, **256**, C799-C806.
- 28) Di Marco, J. P., Sellers, T. D., Lerman, B. B., Greenberg, M. L., Berne, R. and Bellardinelli, L. (1985) Diagnostic and therapeutic use of adenosine in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, **6**, 417-425.
- 29) Jennings, R. B., Schaper, J., Hill, M. L., Steenbergen, C., Jr.

and Reimer, K. A. (1985) Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res*, **56**, 262

30) Jennings, R. B., Sebbag, L., Schwartz, L. M., Crago, M. S. and Reimer, K. A. (2001) Metabolism of preconditioned myocardium: Effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, **33**, 1571-1588.

31) Jones, R., Reimer, K. A., Hill, M. L. and Jennings, R. B. (1982) Effect of hypothermia on changes in high energy phosphate production and utilization in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, **14**, 123-130.

32) Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem*. 2012 Jan 26;3(1):1-6

33) Hochmann, J. and Choo, H. (1987) Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation*, **75**, 299-306.

34) Covell, J. W., Pool, P. E. and Braunwald, E. (1967) Effects of acutely induced ischemic heart failure on myocardial high energy phosphate stores. *Proc Soc Exp Biol Med*, **124**, 126-131.

35) Morgan, H. E., Henderson, M. J., Regen, D. M. and Park, C. R. (1959) Regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan diabetic rats: Effects of insulin, growth hormone, cortisone and anoxia. *Ann N Y Acad Sci*, **82**, 387- 402.

36) Jolly, S. R., Kane, W. J., Bailie, M. B. and Lucchesi, B. R. (1984) Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circulation*, **54**, 277-285.

37) Matsumura, K., Jeremy, R., Schaper, J. and Becker, L. C. (1998) Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*, **97**, 795-804.

38) Bernier, M., Hearse, D. J. and Manning, A. S. (1986) Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free

radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res*, **58**, 331-340.

39) Kolocassides, K. G., Seymour, A. L., Galinanes, M. and Hearse, D. J. (1996) Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, **28**, 1045-1057.

40) Richard, V., Murry, C. E., Jennings, R. B. and Reimer, K. A. (1990) Oxygen- derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: Therapeutic implicatons. *Fundam Clin Pharmacol*, **4**, 85-103.

41) Bolli, R., Patel, B. S., Jeoudi, M. O., Lai, E. K. and McCay, P. B. (1988) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.*, **82**, 476-485.

42) Bolli, R., Zhu, W. X. and Hartley, C. J. (1987) Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthioera. *Circulation*, **76**, 458-468.

43) Heyndrickx, G. R., Baig, H., Nellens, P., Leusen, I., Fishbein, M. C. and Vatner, S. F. (1978) Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusion. *Am J Physiol*, **234**, H653-H659.

44) Heyndrickx, G. R., Millard, R. W., McRitchie, R. J., Maroko, P. R. and Vatner, S. F. (1975) Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in concious dogs. *J. Clin. Invest.*, **56**, 978-985.

45) Braunwald, E. and Kloner, R. A. (1982) The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, **66**, 1146-1149.

46) Libby, P., Maroko, P. R., Bloor, C. M., Sobel, B. E. and Braunwald, E. (1973) Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J Clin Invest*, **3**, 599-607.

47) Hill, J. H. and Ward, P. A. (1969) C3 leukotactic factors

produced by a tissue protease. *J Exp Med*, **130**, 505-518.

48) Frangogiannis, N. G., Smith, C. W. and Entman, M. L. (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, **53**, 31-47.

49) Litt, M. R., Jeremy, R., Weisman, H. F., Winkelstein, J. A. and Becker, L. C. (1989) Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes ischemia. *Circulation*, **80**, 1816-1827.

50) Belosjorow, S., Schulz, R., Dorge, H., Schade, F. U. and Heusch, G. (1999) Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF- α concentration and myocardial infarct development in rabbits. *Am J Physiol*, **277**, H2470-H2475.

51) Meco M, Cirri S, Gallazzi C, Magnani G, Cosseta D. Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double blind, randomised and placebo-controlled study. *Eur J Cardiothoracic Surg*. 2007;32:319-25.

52) Tempe DK, Dutta D, Garg M, Minhas H, Tomar A. Myocardial protection with isoflurane during off pump coronary artery bypass grafting: a randomised trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth*.2011;25:59-65.

53) Shalaby A, Rinne T, Järvinen O, Saraste A, Laurikka J, Porkkala H, Saukko P, Tarkka M. Initial results of a clinical study: adenosine enhanced cardioprotection and its effect on cardiomyocytes apoptosis during coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2008;33:639-44.

54) Quinn DW, Pagano D, Bonser RS, Rooney SJ, Graham TR, Wilson IC, Keogh BE, Townend JN, Lewis ME, Nightingale P. study investigators. Improved myocardial protection during coronary artery surgery with glucose-insulin-potassium: a randomized controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:34-42.

55) Zhang HF, Fan Q, Qian XX, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Gao F. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and

reperfusion. *Apoptosis*;2004;9:777-83.

56) Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*;2000;47:446-56.

57) Scarabelli TM, Gottlieb RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death Differ*. 2004 Dec;11 Suppl 2:S144-52.

58) Barry SP, Ounzain S, McCormick J, Scarabelli TM, Chen-Scarabelli C, Saravolatz LI, Faggian G, Mazzucco A, Suzuki H, Thiernemann C, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Enhanced IL-17 signalling following myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*. 2013 Mar 10;163(3):326-34.

59) Barry SP, Lawrence KM, McCormick J, Soond SM, Hubank M, Eaton S, Sivarajah A, Scarabelli TM, Knight RA, Thiernemann C, Latchman DS, Townsend PA, Stephanou A. New targets of urocortin-mediated cardioprotection. *J Mol Endocrinol*. 2010 Aug;45(2):69-85.

60) Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, Barry SP, Knight R, Saravolatz SF, Saravolatz LD, Ulgen BO, Scarabelli GM, Faggian G, Mazzucco A, Saravolatz L, Scarabelli TM. Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Aug 30;325(1-2):1-7.

61) Chen-Scarabelli C, Faggian G, Yuan Z, Tessari M, Rungtatscher A, Di Rezze J, Scarabelli GM, Abounit K, McCauley R, Saravolatz L, Mazzucco A, Scarabelli TM. Warm-blood cardioplegic arrest induces selective mitochondrial translocation of protein kinase Cepsilon followed by interaction with 6.1 inwardly rectifying potassium channel subunit in viable myocytes overexpressing urocortin. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Nov;138(5):1213-21

62) Kuizon E, Pearce EG, Bailey SG, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, Abounit K, McCauley RB, Saravolatz L, Faggian G, Mazzucco A,

Townsend PA, Scarabelli TM. Mechanisms of action and clinical implications of cardiac urocortin: a journey from the heart to the systemic circulation, with a stopover in the mitochondria. *Int J Cardiol.* 2009 Nov 12;137(3):189-94

63) Knight RA, Chen-Scarabelli C, Yuan Z, McCauley RB, Di Rezze J, Scarabelli GM, Townsend PA, Latchman D, Saravolatz L, Faggian G, Mazzucco A, Chowdrey HS, Stephanou A, Scarabelli TM. Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury. *FEBS Lett.* 2008 Mar 19;582(6):984-90

64) Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, Fisher S, Frampton CM, Kirkpatrick CM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Richards AM, Vale WW. Beneficial hemodynamic, endocrine, and renal effects of urocortin in experimental heart failure: comparison with normal sheep. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Oct 16;40(8):1495-505.

65) Schulman D, Latchman DS, Yellon DM Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Oct;283(4):H1481-8.

66) Gustafsson AB and Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol.* 2003;23: 447-459.

67) Fulda S and Debatin K-M. Signaling through death receptors in cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology* 2004;4: 327-332.

68) Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; 16: 139-144.

69) Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: R577-595.

70) Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J. Histochem Cytochem* 2004; 52: 821-831.

71) Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23: 2861-2874.

72) Adrain C and Martin CJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 390-397.

73) Adams JM and Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 715-720.

74) Green DR and Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Cell Biol.* 1998; 8: 267-271.

75) Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036

76) Decker RS and Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol.*1980; 98: 425-444.

77) Liu X, Van Vleet T and Schnellmann RG. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 349-370.

78) Van Cruchten S and Van der Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*2002; 31: 214-223.

79) Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY and Melino G. (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci*, 113:1661-1670.

80) Cresce GD, Walpoth BH, Mugnai D, Innocente F, Rungatscher A, Luciani GB, Zaniboni A, Battistuzzi G, Tessari M, Kalangos A, Mazzucco A, Faggian G. *ASAIO J.* 2008 54(5):514-8.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va al Prof. Giuseppe Faggian e al Prof. Tiziano Scarabelli, Dr. Alessio Rungatscher, Dr.ssa Carol Chen Scarabelli, Dr. Tiziano Menon a tutta l'equipe del Laboratorio di Scienze Cardiovascolari (Dr. Daniele Linardi e la Dr.ssa Elisabetta Milani) per il contributo attivo alla stesura degli esperimenti senza i quali questo progetto non sarebbe stato possibile.