

Contribución de la necrosis y la apoptosis a la injuria miocárdica postisquémica

JULIANA C. FANTINELLI*, IGNACIO A. PEREZ NUÑEZ*, LUISA F. GONZALEZ ARBELAEZ†, SUSANA M. MOSCA‡

Objetivo: nuestro objetivo fue examinar la contribución de la necrosis y de la apoptosis al tamaño del infarto y a la función miocárdica postisquémica en corazones no tratados y tratados con el antioxidante mercaptopropionilglicina (MPG). **Material y método:** en corazones aislados de rata se realizó la ligadura de la arteria coronaria izquierda durante 40 min; luego el corazón fue reperfundido durante 2 horas (CI). Otros corazones recibieron durante los primeros 20 min de la reperfusión: 1) un inhibidor de la apoptosis, el ácido aurintricarboxílico (ATA) 100 μ M; 2) MPG 2 mM; 3) la combinación de MPG+ATA. Se evaluó el tamaño del infarto y la función miocárdica. **Resultados:** el ATA disminuyó el tamaño del infarto ($16 \pm 4\%$ vs $30 \pm 3\%$ en CI) y mejoró la recuperación postisquémica de la función miocárdica. El tratamiento con MPG disminuyó el tamaño del infarto ($8 \pm 3\%$) y mejoró la función miocárdica durante la reperfusión. El tratamiento combinado de MPG + ATA no modificó el efecto protector del MPG. **Conclusiones:** estos datos muestran que, en el corazón aislado de rata: 1) la necrosis y la apoptosis están contribuyendo en un porcentaje similar (aproximadamente 50%) en la determinación del tamaño del infarto; 2) el efecto cardioprotector del MPG sería mediado por una disminución en ambas formas de muerte celular.

Palabras clave: Isquemia. Reperfusión. Apoptosis. ATA. Necrosis.

La necrosis y la apoptosis son dos formas de muerte celular en el miocardio que se han asociado con la isquemia-reperfusión y la contribución relativa de ambos procesos determina la recuperación postisquémica de la contractilidad miocárdica^{1,2}.

La inducción de necrosis y apoptosis está regulada por similares intermediarios bioquímicos, tales como alteraciones en los fosfatos de alta energía, acumulación intracelular de calcio y producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs)³, desempeñando la mitocondria un papel importante. Es en esta

organela donde se producen cambios asociados con ambos tipos de muerte celular, relacionados con la formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM)⁴.

En distintos modelos experimentales de isquemia-reperfusión⁵⁻⁸, como así también en un estudio clínico⁹, se demostró que la apoptosis miocárdica es provocada o se acelera durante la reperfusión. Es así que la inhibición o interrupción de la apoptosis después de la oclusión coronaria es capaz de reducir el tamaño del infarto^{10,11}. Por otra parte, en un modelo de isquemia global¹² se demostró que la necrosis contribuye en un porcentaje mayor a la apoptosis cuando la duración de la isquemia es mayor de 20 min, y en un modelo de isquemia regional¹³, descrito en 1998, se demostró que la necrosis es la forma predominante de muerte celular.

Como se expresó anteriormente, la producción exagerada de EROs que se produce en la reperfusión es capaz de desencadenar ambos tipos de muerte celular¹⁴. Estudios previos muestran que el tratamiento con distintos antioxidantes disminuye el estrés oxidativo y también la actividad de mediadores de la apoptosis y los signos característicos de la muerte celular por necrosis¹⁵⁻¹⁹. Sin embargo, la contribución relativa de apoptosis y necrosis en los efectos del antioxidante mercaptopropionilglicina (MPG) no ha sido aún examinada.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. CCT-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

* Becarios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

† Becaria de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT).

‡ Investigador Independiente del CONICET.

Dirección postal: Susana M. Mosca. Calles 60 y 120. 1900 La Plata. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.

e-mail: smosca@med.unlp.edu.ar

Los autores de este trabajo declaran al mismo no afectado por conflictos de intereses.

Recepción del artículo: 11-MAR-2011

Recepción de las correcciones: 28-MAR-2011

Aceptación: 04-ABR-2011

La versión digitalizada de este trabajo está disponible en www.fac.org.ar

Los objetivos de nuestro trabajo fueron evaluar, utilizando el ácido aurintricarboxílico (inhibidor de la apoptosis) como herramienta, la contribución de ambos tipos de muerte celular en: 1) el daño producido por 40 min de oclusión de la arteria coronaria izquierda y 2 horas de reperfusión; 2) la acción ejercida por el MPG sobre el tamaño del infarto y la recuperación postisquémica de la función miocárdica.

MATERIAL Y METODO

Los animales fueron tratados, en todos los experimentos, de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el Instituto Nacional de Salud de EEUU (NIH Publication N° 85-23, revisada en 1996), y con las normas establecidas por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Modelo de corazón aislado

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Se abrió rápidamente el tórax, se aisló la aorta, se colocó una cánula en dicha arteria, y por intermedio de ella el corazón fue colocado en un sistema de perfusión según la técnica de Langendorff. La composición del Ringer fue: ClNa 118 mM, Cl₂Ca 1,35 mM, ClK 5,9 mM, SO₄Mg 1,2 mM, CO₃HNa 20 mM y dextrosa 11,1 mM, el cual fue termostatzado a 37°C y equilibrado con una mezcla de 95%O₂-5% CO₂, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7,40. Se produjo bloqueo auriculoventricular, dañando con una fina aguja el tejido conductivo del septum auricular, y se suturaron dos electrodos al ventrículo derecho para estimular al corazón y mantener así la frecuencia cardíaca en un valor de 280 ± 10 lat/min. Se colocó un balón de látex atado a un tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral; el extremo opuesto del tubo fue conectado a un transductor de presión Statham P23XL que nos permitió medir la presión del ventrículo izquierdo. El globo de látex se llenó

con solución acuosa hasta lograr una presión diastólica final (PDF) de 8-12 mmHg, y se mantuvo este volumen constante durante todo el experimento. La presión de perfusión coronaria (PPC) fue monitoreada en el punto de canulación de la aorta y ajustada a aproximadamente 60-70 mmHg. El flujo coronario (FC), controlado por una bomba peristáltica, fue de aproximadamente 10 mL/min en todos los grupos experimentales. La presión ventricular izquierda (PVI) y su primera derivada (dP/dt) fueron registradas por un sistema de adquisición de datos (Power Lab 410) conectados a una computadora.

Protocolos experimentales

El infarto de miocardio fue inducido después de 20 min de estabilización por la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior a 3-4 mm desde su origen durante 40 minutos seguida de 2 horas de reperfusión.

Los protocolos experimentales que se realizaron se muestran en la **Figura 1**.

1) Control isquémico (CI) (n = 8). Los corazones fueron reperfundidos con la solución preisquémica.

2) ATA (n = 8). Un inhibidor de la apoptosis, el ácido aurintricarboxílico (ATA) a una dosis de 100 µM fue administrado durante los primeros 20 minutos de la reperfusión.

3) MPG (n = 6). Para examinar los efectos de un antioxidante en la reperfusión, se administró mercapto-propionilglicina (MPG) a una dosis de 2 mM durante los primeros 20 min de la reperfusión.

4) MPG + ATA (n = 6). Ambas drogas fueron combinadas y administradas durante los primeros 20 minutos de la reperfusión.

Medición del tamaño del infarto

Al término del período de reperfusión, la arteria fue ligada y el corazón perfundido con una solución de azul de Evans al 0,1% durante 1 min. Luego el corazón fue desmontado del sistema de perfusión y el ventrícu-

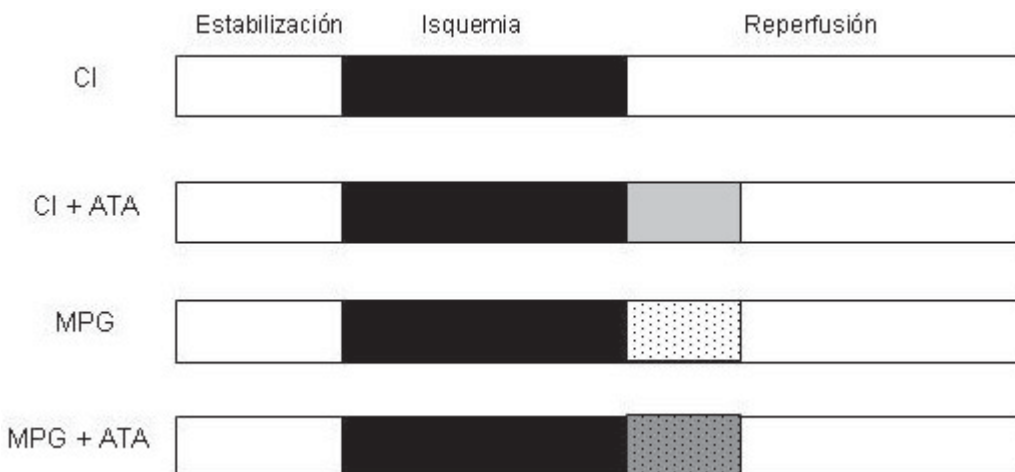


Figura 1. Representación esquemática de los distintos protocolos experimentales.

lo izquierdo (VI) fue congelado a -20°C durante una hora. Al cabo de este tiempo, el VI fue cortado en trozos de 2 mm de espesor a lo largo del eje mayor, desde la punta a la base, pesado e incubado con una solución al 1% de trifeniltetrazolio (TTC) en buffer fosfato pH = 7,4 durante 20 min²⁰. Al término de ese período, los trozos fueron conservados en formalina al 10% en solución salina por 24 horas. Con el primer colorante se delimita el área de riesgo, mientras que con el segundo las zonas viables se tiñen de color rojo brillante y el tejido muerto no se colorea, permitiendo así la diferenciación del tejido infartado. Posteriormente, los trozos fueron escaneados y utilizando un programa de computadora (Scion Image 1.62) se determinaron las áreas de infarto, las áreas de riesgo y las áreas totales de cada trozo. Los pesos de infarto fueron calculados como $(A1 \times P1) + (A2 \times P2) + (A3 \times P3) + (A4 \times P4) + (A5 \times P5) + (A6 \times P6)$, donde A es el área de cada trozo y P es el peso respectivo. Los pesos de las áreas de riesgo y los pesos totales fueron calculados de la misma forma, tomándose las áreas y pesos correspondientes de cada trozo. Luego el peso del infarto de cada corazón fue expresado como porcentaje del peso del área de riesgo²¹.

Función sistólica y diastólica miocárdicas

La contractilidad del miocardio se evaluó a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), obtenida restando a los valores máximos de la PVI los valores de PDF y de la máxima velocidad de desarrollo de la PVI ($+dP/dt_{\text{max}}$). Los datos fueron expresados como porcentaje de los respectivos valores preisquémicos. La función diastólica se evaluó a través de la PDF.

RESULTADOS

Después de 40 min de oclusión coronaria y 2 horas de reperfusión, el tamaño del infarto en los corazones controles isquémicos (CI) fue de $30 \pm 3\%$. El tratamiento con una dosis máxima de ATA redujo significativamente el tamaño del infarto a un valor de $16 \pm 4\%$. El antioxidante MPG disminuyó significativamente el tamaño del infarto hasta un valor de $8 \pm 3\%$, que representa el 50% del valor obtenido con ATA solo. Por lo tanto, si tenemos en cuenta que a la dosis utilizada el ATA debería eliminar por completo la apoptosis, el efecto del MPG tendría que ser antiapoptótico y antinecrótico. El tratamiento combinado de ATA + MPG no modificó el tamaño del infarto obtenido con MPG solo ($6 \pm 2\%$) (Figura 2). Cabe destacar que no pudieron ser obtenidas disminuciones mayores ni por nosotros ni por otros autores^{22,23}. De manera que podríamos decir que con MPG y con MPG + ATA alcanzamos el máximo de protección posible.

Respecto de la recuperación de la función miocárdica, en los corazones CI y al final del período de reperfusión la PDVI fue de $46 \pm 7\%$ respecto de los valores preisquémicos. La $+dP/dt_{\text{max}}$ alcanzó valores similares ($45 \pm 8\%$). El tratamiento al inicio de la reperfusión con ATA mejoró significativamente la recuperación de la función sistólica miocárdica. Al final del período de reperfusión, la PDVI fue de $70 \pm 5\%$ con respecto a los valores preisquémicos. La $+dP/dt_{\text{max}}$ alcanzó valores similares ($72 \pm 5\%$). El tratamiento con MPG mejoró significativamente la recuperación de la función sistólica miocárdica. Al final de las 2 horas de reperfusión, los valores de PDVI y de $+dP/dt_{\text{max}}$ fueron $83 \pm 5\%$ y $85 \pm 8\%$ respectivamente. El tratamiento combinado de ATA + MPG no modificó la protección otorgada por

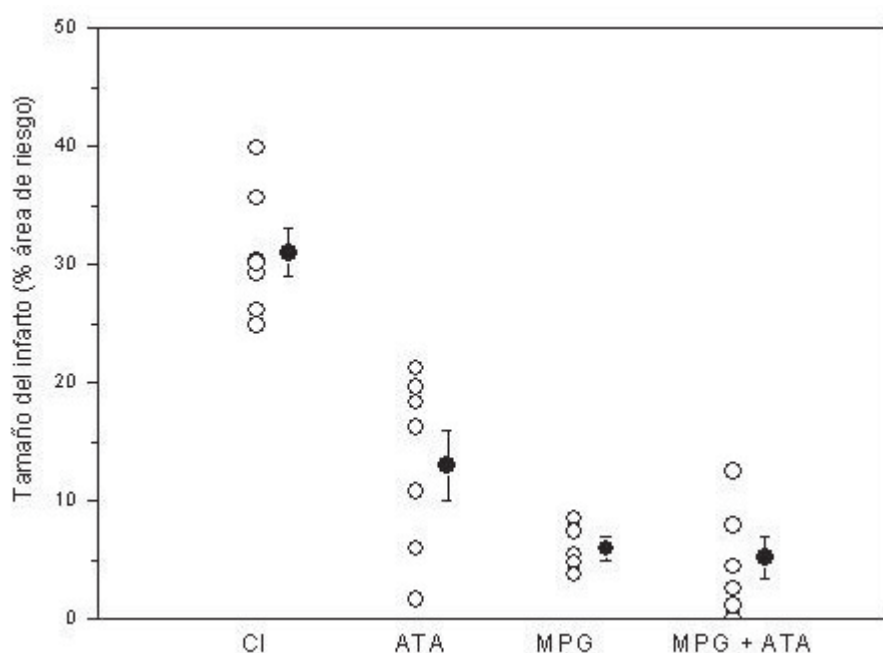


Figura 2. Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo, en los corazones controles isquémicos (CI), y tratados con el ácido aurintricarboxílico (ATA, inhibidor de endonucleasas), o con mercaptopropionilglicina (MPG, atrapante de EROs), o con la combinación MPG + ATA. Todos los tratamientos mostraron una disminución del tamaño del infarto obtenido en el grupo CI. *: $p < 0,05$.

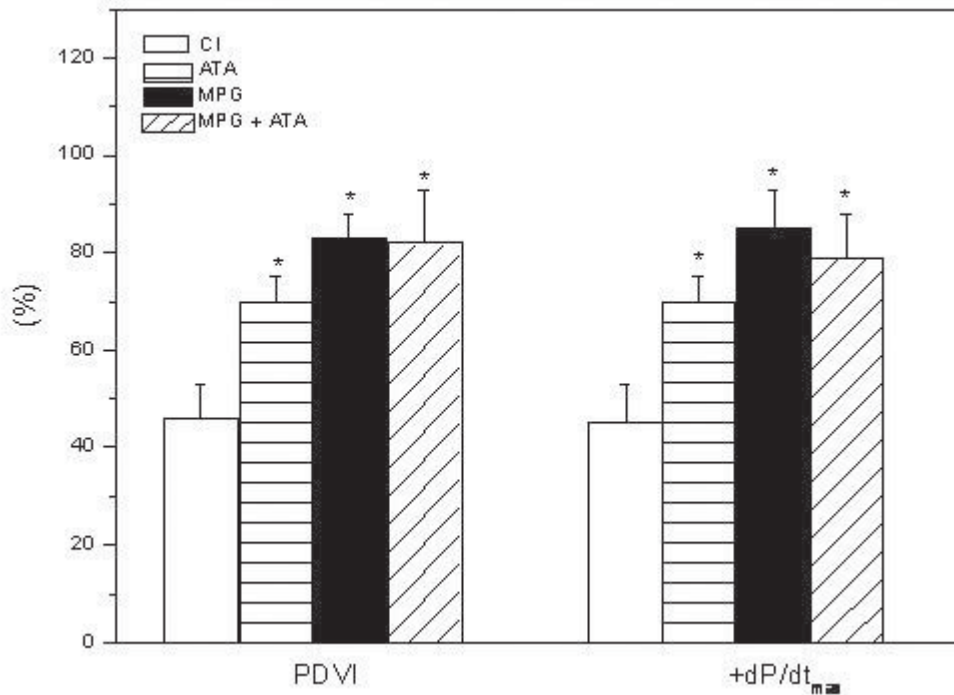


Figura 3. Valores de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y de la máxima velocidad de desarrollo de la presión ($+dP/dt_{max}$) al final de las 2 horas de reperusión en todos los grupos experimentales. Se observa que la infusión al comienzo de la reperusión del ácido aurintricarboxílico (ATA), de la mercaptopropionilglicina (MPG) o del tratamiento combinado (MPG + ATA) mejoró la recuperación postisquémica de la función sistólica miocárdica con respecto a la obtenida en los corazones no tratados.

el MPG solo, manteniéndose la mejoría observada en la función miocárdica postisquémica obtenida con el antioxidante. Al final del período de reperusión, la PDVI fue de $82 \pm 11\%$ y la $+dP/dt_{max}$ de $79 \pm 9\%$ (Figura 3).

Durante el período de estabilización, la PDF fue de aproximadamente 10 mmHg en todos los grupos experimentales. Durante la reperusión, la PDF aumentó en el grupo CI, alcanzando al final del período un valor de 28 ± 6 mmHg. Este aumento no se observó en el grupo de corazones tratados con MPG, siendo al final de la reperusión de 11 ± 4 mmHg pero se mantuvo después del tratamiento con ATA (33 ± 5 mmHg) o con MPG + ATA (33 ± 7 mmHg).

DISCUSION

Utilizando un modelo de isquemia regional, en este trabajo demostramos que la administración de una dosis máxima de ácido aurintricarboxílico (ATA, inhibidor de la apoptosis), al comienzo de la reperusión, reduce el tamaño del infarto observado en corazones no tratados aproximadamente en un 50%. Este resultado sugiere que la necrosis y la apoptosis estarían contribuyendo en partes iguales al daño irreversible presente en nuestro modelo experimental.

Si bien en trabajos previos se propone que ambos tipos de muerte celular (apoptosis y necrosis) serían los responsables del tamaño del infarto^{8,24-26}, la contribución relativa de cada una es diferente según el modelo experimental usado. Podemos citar dos ejemplos: uno en un modelo de isquemia global en conejos¹², en el que la contribución de la necrosis es mayor cuando el período de isquemia es mayor de 20 min, y otro en un

modelo de isquemia regional en ratas¹³, en el que se concluye que la necrosis es la forma predominante de muerte celular.

Con respecto al uso del ATA en estudios *in vivo*, se mostró que la administración de esta droga antes de la isquemia reduce el tamaño del infarto en el cerebro después de la oclusión transitoria bilateral de la arteria carótida²⁷, y retrasa la apoptosis de células de la retina cuando este compuesto se administró 6 horas después de la isquemia²⁸. En un modelo de isquemia regional en perros²⁹ se obtuvo el efecto cardioprotector con el ATA, sugiriendo la participación de la apoptosis en la muerte celular. Nuestros datos están de acuerdo con esta conclusión. Sin embargo, los autores obtuvieron una disminución del tamaño del infarto menor que la que obtuvimos en este trabajo (30% vs 50%), lo cual podría atribuirse a diferencias en el protocolo experimental y en la especie.

Además de disminuir el tamaño del infarto, el tratamiento con ATA mejoró la recuperación de la función contráctil postisquémica, lo que sugiere que la apoptosis contribuye a la alteración de la función miocárdica observada durante la reperusión. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos realizados en animales, y con estudios clínicos que demuestran que la apoptosis y la función cardíaca se correlacionan, observándose un aumento de la respuesta contráctil postisquémica cuando la apoptosis es inhibida^{30,31}.

En cuanto a los mecanismos responsables de la cardioprotección ejercida por el ATA, esta droga inhibe diferentes subtipos de endonucleasas endógenas que llevan a la fragmentación del ADN internucleosomal y

la formación de cuerpos apoptóticos, y también puede regular la síntesis de proteínas implicadas en la apoptosis³⁰⁻³². Por lo tanto, estas acciones podrían ser las responsables de la acción beneficiosa del ATA observada en nuestro trabajo.

Otro hallazgo de nuestra investigación es que el tratamiento con el MPG, un *scavenger* o atrapante de EROs, disminuyó el tamaño del infarto y mejoró la recuperación postisquémica de la contractilidad. Analizando los datos observamos que con MPG el tamaño del infarto disminuyó un 50% respecto del obtenido con ATA ($8 \pm 3\%$ vs $16 \pm 4\%$). Sin embargo, cuando el MPG fue administrado en presencia de ATA, el efecto beneficioso de este antioxidante no fue modificado, no mostrando evidencias de un efecto aditivo de ambos tratamientos. Este resultado podría interpretarse como que la disminución lograda con MPG llegó a un máximo y que ninguna intervención (el ATA, en este caso) podría modificar significativamente ese valor. Por lo tanto el MPG estaría atenuando los mecanismos implicados en la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis. Estos datos concordarían con los de estudios previos¹⁵⁻¹⁷ que muestran que los antioxidantes son capaces de inhibir la apoptosis.

Según investigaciones previas, la mitocondria cumple un papel importante en el proceso de isquemia-reperusión. En esta organela se forman las EROs que, en condiciones fisiológicas, son eliminadas por los sistemas antioxidantes endógenos³³, manteniéndose la función mitocondrial gracias a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna. Sin embargo en condiciones patológicas, especialmente durante la reperusión postisquémica, la repentina llegada de oxígeno a la cadena respiratoria mitocondrial conduce a una explosión de EROs³⁴, que sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes, y se produce el estrés oxidativo. Esta exagerada producción de EROs lleva a la formación del PPTM⁴, que permite la salida hacia el citosol de sustancias, tales como el citocromo C, capaces de activar vías apoptóticas. Por lo tanto, si tenemos en cuenta que el MPG es un atrapante de EROs, en nuestras condiciones tendríamos una menor cantidad de estas especies reactivas que llevaría a una menor apertura del PPTM, una menor salida de citocromo C y una atenuación de la cascada apoptótica. O sea que la disminución de EROs puede ser un mecanismo de protección de los miocitos contra la apoptosis. Sin embargo las EROs generadas durante la reperusión precoz, a través de la activación del PPTM, son capaces no sólo de producir apoptosis³⁵ sino también de favorecer la necrosis³⁶. Por lo tanto, ambos procesos de muerte celular podrían estar atenuados en presencia de MPG.

Por otro lado, el exceso de EROs causa daños no específicos a los lípidos, proteínas y ADN mitocondrial. El ataque a los lípidos determina que la membrana celular pierda su integridad, signo patognomónico de la

necrosis. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostramos que el MPG disminuye la peroxidación lipídica provocada por las EROs, lo cual estaría indicando una atenuación de la necrosis. Es decir que datos previos y los que estamos presentando aquí avalan una acción antinecrótica y antiapoptótica del MPG como medio de disminuir la muerte celular.

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que, en el corazón aislado de rata sometido a 40 min de oclusión coronaria y 2 horas de reperusión, la necrosis y la apoptosis contribuyen con un porcentaje similar en la determinación del tamaño del infarto y en la recuperación de la función miocárdica postisquémica. Estos resultados sugieren que el uso combinado de agentes antiapoptóticos y antinecróticos, o una droga, como la mostrada en este trabajo (MPG), que pueda ejercer ambos efectos ofrecería las mayores ventajas en la terapia cardioprotectora contra la injuria por reperusión.

SUMMARY

CONTRIBUTION OF NECROSIS AND APOPTOSIS TO THE POSTISCHEMIC MYOCARDIAL INJURY

Objective. Our objective was to examine the contribution of necrosis and apoptosis to the infarct size and postischemic myocardial function in hearts untreated and treated with the antioxidant mercaptopropionylglycine (MPG).

Material and method. We use isolated rat hearts in which left coronary artery was occluded for 40 min and then the hearts were reperfused for 2 hs (IC). Other groups of hearts received during the first 20 min of reperfusion: 1) an inhibitor of apoptosis, aurintricarboxylic acid (ATA) 100 μ M; 2) MPG 2 mM; and 3) the combination MPG + ATA. Infarct size was assessed by staining with tetrazolium salt and expressed as a percentage of risk area. Myocardial function was also assessed.

Results. ATA significantly reduced infarct size ($16 \pm 4\%$ vs $30 \pm 3\%$ in IC) and improved the postischemic recovery of myocardial function. The treatment with MPG decreased infarct size ($8 \pm 3\%$) and improved myocardial function. The combined treatment of MPG + ATA did not alter the protective effect of MPG.

Conclusions. These data demonstrate that in the isolated rat heart: 1) necrosis and apoptosis are contributing about 50% in the determination of infarct size obtained after 40 min of coronary occlusion and 2 h of reperfusion; 2) the cardioprotective effects of MPG would be mediated by a reduction in both forms of cell death.

Key words: Ischemia. Reperfusion. Apoptosis. ATA. Necrosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue solventado, en parte, por el subsidio PICT 1046 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT). Directora: Dra. Susana M. Mosca.

BIBLIOGRAFIA

1. Haunstetter A, Izumo S: Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res* **2000**; 86: 371-376.
2. Buja LM, Entman ML: Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* **1998**; 98: 1355-1357.
3. McConkey DJ: Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* **1998**; 99: 157-168.
4. Crompton M: The mitochondrial transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **1999**; 341: 233-249.
5. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al: Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* **2000**; 45: 651-660.
6. Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, et al: Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* **1994**; 94: 1621-1628.
7. Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al: Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *JACC* **2000**; 32: 197-208.
8. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al: Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* **2001**; 6: 279-290.
9. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H: Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* **1997**; 28: 485-492.
10. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al: Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* **1998**; 97: 276-281.
11. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM: Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* **2000**; 130: 197-200.
12. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, et al: Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2004**; 286: H1923-H1935.
13. Kajstura J, Liu Y, Baldini A, et al: Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol* **1998**; 82: 30K-41K.
14. Venardos KM, Perkins A, Headrick J, et al: Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem* **2007**; 14: 1539-1549.
15. Harsdorf R, Li PF, Dietz R: Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* **1999**; 99: 2934-2941.
16. Oskarsson HJ, Copepy L, Weiss RM, et al: Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **2000**; 45: 679-687.
17. Ambrosio G, Zweier JL, Becker LC: Apoptosis is prevented by administration of superoxide dismutase in dogs with reperfused myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* **1998**; 93: 94-96.
18. Casey TM, Arthur PG, Bogoyevitch MA: Necrotic death without mitochondrial dysfunction-delayed death of cardiac myocytes following oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1773: 342-351.
19. Jadeja RN, Thounaojam MC, Patel DK, et al: Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice supplementation attenuates isoproterenol-induced cardiac necrosis in rats. *Cardiovasc Toxicol* **2010**; 10: 174-180.
20. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ: Triphenyltetrazolium staining of irreversible injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* **1985**; 121: 522-530.
21. Suzuki M, Sasaki N, Miki T, et al: Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* **2002**; 109: 509-516.
22. Kuno A, Critz SD, Cui L, et al: Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **2007**; 43: 262-271.
23. Philipp S, Cui L, Ludolph B, et al: Desferoxamine and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate protect myocardium by activating NOS and generating mitochondrial ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**; 290: H450-H457.
24. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al: Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res* **2000**; 94: 1-12.
25. Tomei LD, Umansky SR: Apoptosis and the heart: a brief review. *Ann N Y Acad Sci*. **2001**; 946: 160-168.
26. Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al: Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* **1994**; 28: 2005-2016.
27. Rosenbaum DM, D'Amore J, Llena J, et al: Pretreatment with intraventricular aurointricarboxylic acid decreases infarct size by inhibiting apoptosis following transient global ischemia in gerbils. *Ann Neurol* **1998**; 43: 654-660.
28. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta A, et al: Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurointricarboxylic acid. *Vision Res* **1997**; 37: 3445-3451.
29. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al: Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* **2003**; 59: 132-142.
30. Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC, et al: Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *JACC* **2000**; 36: 1698-1705.
31. Schmitt JP, Schröder J, Schunkert H, et al: Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* **2002**; 73: 1229-1235.
32. Lam TT, Fu J, Hrynewycz M: The effect of aurointricarboxylic acid, an endonuclease inhibitor, on ischemia/reperfusion damage in rat retina. *J Ocul Pharmacol Ther* **1995**; 11: 253-259.
33. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* **2005**; 70: 200-214.
34. Zweier JL: Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* **1988**; 263: 1353-1357.
35. Chen HW, Chien CT, Yu SL, et al: Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *Br J Pharmacol* **2002**; 137: 771-781.
36. Zweier JL: Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* **1988**; 263: 1353-1357.