

# Rola stresu oksydacyjnego i reaktywnych postaci tlenu w patogenezie uszkodzenia mięśnia sercowego po reperfuzji. Glutathion jako związek zapobiegający uszkodzeniom poreperfuzyjnym

## Role of oxidative stress and reactive oxygen species in pathogenesis of stunning myocardium. Glutathione as a substance which prevents stunning

Leszek Markuszewski<sup>1</sup>, Piotr Okoński<sup>2</sup>, Maciej Banach<sup>2</sup>,  
Piotr Wierzbński<sup>1</sup> i Robert Pietruszyński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Kardiologii Interwencyjnej Kardiometabologii i Rehabilitacji Kardiologicznej  
I Katedry Kardiologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup>Klinika Kardiologii i Katedry Kardiologii i Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

### Abstract

**Background:** *Excessive production of reactive oxygen species (ROS) known as oxidative stress is caused mainly by insufficiency of enzymatic antioxidant systems as well as with non-enzymatic protective substances such as reduced glutathione (GSH). Oxidative stress, in which macrophages are stimulated to ROS production, is playing an important role in myocardial ischaemia and reperfusion. Postreperfusion syndrome (serious arrhythmias such as ventricular fibrillation, systolic heart failure) is a very topical issue of interventional cardiology. This study aimed at displaying opinions about pathophysiology of postreperfusion syndrome and myocardial stunning and showing potentially beneficial chemical substances that could diminish toxic influence of postreperfusion injury.*

**Material and methods:** *Polish and foreign literature was checked for novel information concerning myocardial stunning, the role of reactive oxygen species in postreperfusion syndrome and functioning of antioxidant systems during myocardial ischaemia. Both-clinical and experimental studies were taken into consideration.*

**Conclusions:** *Despite many studies performed in this field, there was no efficient method of treatment of postreperfusion syndrome found. There is hypothesis (confirmed in animal experimental models) that GSH supplementaion, which could potentially neutralize ROS,*

---

Adres do korespondencji: Dr med. Leszek Markuszewski  
Klinika Kardiologii Interwencyjnej, Kardiometabologii  
i Rehabilitacji Kardiologicznej  
I Katedra Kardiologii i Kardiologii UM w Łodzi  
Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 2 im. WAM  
ul. Żeromskiego 113, 90–549 Łódź  
tel. (0 42) 639 35 63  
e-mail: cathlab@usk2wam.internetdsl.pl,  
kardiolog@skwam.lodz.pl

Nadesłano: 20.07.2005 r.      Przyjęto do druku: 17.10.2005 r.

*might reduce postreperfusion myocardial injury that often leads to heart failure. GSH seems safe in context of pharmacological interactions. There are still further studies necessary to prove GSH efficacy in prevention of postreperfusion myocardial stunning.* (Folia Cardiol. 2006; 13: 9–18)

## **oxidative stress, myocardial stunning, glutathione**

### **Wstęp**

Niedokrwienie mięśnia sercowego jest jedną z najważniejszych przyczyn śmiertelności i chorobowości w populacji ogólnej. Mimo wielu badań nadal w pełni nie wyjaśniono patofizjologii procesu niedokrwienia. W ciągu ostatnich 25 lat badań nad patologią niedokrwienia osiągnięto duży postęp w zakresie diagnostyki zmian w mięśniu sercowym w wyniku niedokrwienia. Odkryto nowe markery martwicy, prowadzono badania nad skutkami ostrego i przewlekłego niedokrwienia kardiomiocytów, stosując coraz to nowsze kliniczne sposoby oceny upośledzenia perfuzji mięśnia sercowego (np. ocenia się wychwyty przez mięsień sercowy talu lub technetu; prowadzi się obrazowanie serca za pomocą tomografii emisyjnej metodą pojedynczych fotonów przy zastosowaniu talu lub sesta-MIBI znakowanego technetem; stosuje się też pozytronową tomografię emisyjną przy użyciu azotu). Postęp diagnostyczny spowodował, że wypracowano nowe poglądy na niedokrwienie i poznano wiele nietypowych postaci niedokrwienia określanymi mianem nowych zespołów niedokrwieniowych.

Aktualnie w standardach nie ma zaleceń dotyczących zapobiegania ogłuszeniu mięśnia sercowego w przebiegu reperfuzji po przezskórnych interwencjach wieńcowych (PCI, *percutaneous coronary interventions*).

Celem pracy jest przedstawienie poglądów na temat patofizjologii procesu uszkodzenia poreperfuzyjnego i ogłuszenia mięśnia sercowego oraz wskazania potencjalnych związków chemicznych i miejsca ich działania, które mogą osłabić toksyczne uszkodzenie mięśnia po reperfuzji lub zapobiegać jego uszkodzeniu i skracać okres ogłuszenia.

### **Materiał i metody**

Dokonano przeglądu publikacji dotyczących ogłuszenia mięśnia sercowego, roli wolnych rodników tlenowych w uszkodzeniu poreperfuzyjnym i funkcjonowania układów antyoksydacyjnych w przebiegu zawału i innych postaci choroby niedokrwiennej serca. Uwzględniono badania kliniczne i laboratoryjne. Korzystano z piśmiennictwa

polskiego i światowego. Wybrano publikacje z ostatnich 20 lat.

### **Wyniki**

Kharb i wsp. [1] przeprowadzili badanie oceniające stężenie zredukowanego glutationu (GSH) w erytrocytach pacjentów z zawałem serca. Zmierzono stężenie GSH u 22 pacjentów z ostrym zawałem serca (AMI, *acute myocardial infraction*) oraz u 15 ochotników stanowiących grupę kontrolną. U wszystkich badanych dodatkowo oznaczono profil lipidowy. U pacjentów z AMI stężenie GSH było znacząco niższe, natomiast stężenie triglicerydów i cholesterolu całkowitego istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Sugeruje to, że u osób z ostrymi incydentami wieńcowymi występują zaburzenia powstawania wolnych rodników.

Kupatt i wsp. [2] w swoim badaniu zastosowali glutation oraz kariporid (inhibitor wymiennika sodowo-protonowego) jako potencjalne związki, które mogą zapobiec uszkodzeniu mięśnia sercowego w wyniku reperfuzji. Badanie to przeprowadzono na miokardiocytach szczura, wywołując 8-godzinny hipoksję, a następnie godzinny reoksygenację z dodaniem nadtlenu wodoru oraz z dodaniem lub nie GSH w ilości 10 mg/ml. Natomiast u świni dokonano okluzji gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (LAD, *left anterior descending*) na ok. 60 min. Badanym świniom podawano glutation (250 mg/kg) oraz kariporid (1 mg/kg). Związki te stosowano ok. 5 min przed planowanym udrożnieniem LAD, drogą retroinfuzji do żyły przedniej serca drenującej niedokrwiony obszar. Siedem dni później metodą sonomikrometrii oceniono kurczliwość podwiersiowych segmentów. Rozmiar zawału określono poprzez barwienie błękitem metylenowym, natomiast za pomocą tetrazolium wybarwiono ten obszar mięśnia, który znajdował się w strefie zagrożenia niedokrwieniem. Miokardiocyty inkubowane z GSH w obecności nadtlenu wodoru przeżyły dłużej w okresie reoksygenacji i reperfuzji niż w grupie kontrolnej. U świń, którym nie podawano GSH i kariporidu, obszar zawału nie różnił się znacząco w porównaniu z grupą, której podawano te leki osobno. Natomiast infuzja GSH i kariporidu jednocześnie

spowodowała istotne zmniejszenie obszaru zawału. Kurczliwość warstwy podwsierdziowej poprawiła się tylko po kombinowanym podaniu tych dwóch związków. Wyniki tego badania pokazują, że podanie glutationu jako „zmiatacza wolnych rodników” oraz kaptoprilu jako związku regulującego lokalną gospodarkę jonową może odgrywać rolę w zapobieganiu uszkodzeniu miokardium w wyniku reperfuzji. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dalszych badań.

Uważa się, że stężenie GSH w osoczu może być dobrą zmienną służącą do oceny wydolności układu antyoksydacyjnego organizmu. Wydaje się, że jako substancja czynna podawana pacjentom mógłby on zapobiegać lub opóźniać rozwój choroby wieńcowej, a w szczególności zapobiegać poreperfuzyjnym uszkodzeniom miokardium. W badaniach Shimizu i wsp. [3] próbowano potwierdzić, czy niskie stężenie glutationu wiąże się z nasileniem choroby niedokrwiennej serca. Przebadano 135 pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, dokonując u nich pomiaru stężenia glutationu w osoczu. Średnie stężenie GSH było niższe w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną (3,06 vs. 3,71  $\mu\text{mol/l}$ ). Znacznie niższe niż w grupie kontrolnej było stężenie GSH u pacjentów z udarem mózgu (2,51 vs. 3,43  $\mu\text{mol/l}$ ) oraz z krwawieniem do ośrodkowego układu nerwowego (2,51 vs. 3,43  $\mu\text{mol/l}$ ). Podobne wyniki uzyskano u osób, u których stwierdzono krwawienie podpajecznikowe oraz zawał serca. W tej grupie chorych średnie stężenie GSH w osoczu wyniosło 3,65  $\mu\text{mol/l}$  i było niższe niż w grupie kontrolnej (3,77  $\mu\text{mol/l}$ ), lecz różnica nie była istotna statystycznie. Sugeruje to, że zmniejszone stężenie glutationu może być jednym z czynników ryzyka rozwoju zmian miażdżycowych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie związanych z małymi naczyniami mózgowymi. Udary lakunarne powstające w wyniku zmian niedokrwienych w obrębie małych naczyń mogą być przyczyną otępienia wielozawałowego. Natomiast w przypadku zmian w naczyniach wieńcowych niskie stężenie GSH wydaje się nie być tak istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju zmian miażdżycowych i zawału serca.

Iqbal i wsp. [4] oceniali natomiast stężenie glutationu w erytrocytach pacjentów z AMI, porównując je ze stężeniem GSH w populacji zdrowych osób. Stężenie GSH w erytrocytach zmierzono u 163 pacjentów (131 mężczyzn i 45 kobiet). Grupę kontrolną stanowiło 95 zdrowych osób. Stężenie GSH było w badanej grupie wyższe niż w grupie kontrolnej. Sugeruje to wzrost aktywności układów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na zwiększone stężenie reaktywnych postaci tlenu w przebiegu niedokrwienia mięśnia sercowego.

Zaburzenia przepływu wieńcowego (*no-reflow phenomenon*), obserwowane u części chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych za pomocą PCI, można wiązać się z toksycznym oddziaływaniem reaktywne formy tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) na mikrokążenie wieńcowe. Matsumoto i wsp. [5] przebadali 26 pacjentów leczonych za pomocą angioplastyki naczyń wieńcowych, u których przed zabiegiem pobrano z zatoki wieńcowej osocze w celu pomiaru w nim stężeń witamin o potencjalnym działaniu antyoksydacyjnym: witaminy E, C i  $\beta$ -karotenu. Zmierzono też aktywność zewnątrzkomórkowej peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Stężenie kwasu askorbinowego, tokoferolu oraz aktywność peroksydazy glutationowej (przed PCI) była niższa u chorych, u których wystąpiły zaburzenia przepływu wieńcowego w porównaniu z pacjentami bez tego powikłania. Wyniki badania istotnie sugerują udział ROS w patogenezie tego zjawiska.

Ohsawa i wsp. [6] dokonali pomiarów stężenia glutationu we krwi tętniczej u chorych z zawałem serca, u których wystąpiła pozawałowa dysfunkcja lewej komory. Pacjentów podzielono na dwie grupy — z poprawą kurczliwości lewej komory oraz bez poprawy funkcji serca. Stosunek zredukowanego glutationu do utlenowanego we krwi tętniczej u pacjentów bez poprawy kurczliwości lewej komory serca był znacząco niższy niż w grupie osób, u których występowała poprawa funkcji lewej komory. Sugeruje to, że we krwi chorych z AMI, u których po reperfuzji kurczliwość lewej komory jest upośledzona, stężenie reaktywnych postaci tlenu jest większe niż u pacjentów bez dysfunkcji mięśnia sercowego. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, które potwierdzą, czy pomiary stężenia glutationu w osoczu krwi osób z AMI będą dobrym predyktorem upośledzenia kurczliwości lewej komory po reperfuzji.

## Dyskusja

Bierze się pod uwagę wiele patologicznych czynników powodujących uszkodzenie mięśnia sercowego w przebiegu upośledzenia perfuzji. Istnieje koncepcja wolnorodnikowa wskazująca, że w wyniku niedokrwienia serca dochodzi do zaburzenia funkcji endogennych układów antyoksydacyjnych w komórce. Powoduje to nasilenie toksycznego działania ROS na kardiomiocyty.

Głównym źródłem ROS w organizmie jest mitochondrialny łańcuch oddechowy. Nadmierne wytwarzanie ROS, nazywane stresem oksydacyjnym (*oxidative stress*), występuje przede wszystkim w przypadku obniżenia sprawności katalitycznej

łańcucha oddechowego oraz niewydolności układów antyoksydacyjnych.

W przebiegu przenoszenia elektronów z NADH i FADH<sub>2</sub> wytworzonych w procesach glikolizy, oksydacji kwasów tłuszczowych oraz cyklu kwasu cytrynowego na tlen cząsteczkowy dochodzi do syntezy wysokoenergetycznego ATP, który jest źródłem energii dla komórki. Proces ten zachodzi w łańcuchu oddechowym. W jego skład wchodzi 3 pompy protonowe oraz 2 ruchome przenośniki elektronów. Te uszeregowane układy białkowe nazywa się kompleksami. Jedynie kompleks II (dehydrogenaza bursztynianowa) nie pompuje protonów. Natomiast w warunkach fizjologicznych w wyniku przecieku elektronów w obrębie kompleksu I (oksydoreduktaza NADH — koenzym Q) oraz w mniejszym stopniu kompleksu III (oksydoreduktaza ubichinon — cytochrom C) powstaje anionorodnik ponadtlenkowy (*superoxide radical*). Anionorodnik ponadtlenkowy stanowi główne pierwotne źródło ROS w komórce. Innym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego są reakcje katalizowane przez oksydazę ksantynową, dehydrogenazę aldehydową, dioksygenazę tryptofanową oraz przez enzymy układu cytochromu P-450. Również oksydaza NADPH, która znajduje się w makrofagach i granulocytach obojętnochłonnych, aktywowana w wielu stanach patologicznych, jest źródłem anionorodnika ponadtlenkowego.

Intensywny metabolizm tlenowy, który zachodzi w komórkach mięśnia sercowego, powoduje, że miokardium narażone jest na toksyczne działanie tlenu. Uważa się, że narażenie na przewlekły stres oksydacyjny przy niewydolności mechanizmów antyoksydacyjnych może być przyczyną przedwczesnej śmierci komórki w wyniku apoptozy oraz w przebiegu reperfuzji. Również wiele jest doniesień na temat nieprawidłowego funkcjonowania enzymów antyoksydacyjnych w wielu innych chorobach (np. zaburzeniach psychicznych).

Anionorodnik ponadtlenkowy w wyniku uprotonowania przechodzi w rodnik wodoronadtlenkowy, który spontanicznie może reagować z innym anionem nadtlenkowym, co prowadzi do powstania nadtlenku wodoru. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje natomiast przekształcenie dwóch anionorodników ponadtlenkowych w nadtlenek wodoru i tlen cząsteczkowy:  $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Innym, ale mniej istotnym źródłem nadtlenku wodoru w ośrodkowym układzie nerwowym są reakcje katalizowane przez oksydazę L-aminokwasów, monoaminooksydazę i oksydazę glikolanową.

Inne wolne rodniki, które mogą działać toksycznie na komórki, to rodnik hydroksylowy (OH<sup>•</sup>)

powstający z O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w wyniku reakcji Habera-Weissa:  $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$

Najważniejszym źródłem OH<sup>•</sup> jest reakcja Fentona kationów metali grup przejściowych (głównie żelaza) z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$

Stężenie nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego jest utrzymywane w organizmie na niskim poziomie dzięki enzymatycznym układom antyoksydacyjnym (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa) oraz nieenzymatycznym antyutleniaczom, do których zalicza się tokoferol, glutation i koenzym Q.

Katalaza, białko zawierające hem, katalizuje reakcję dysmutacji nadtlenku wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego. Jest więc ona kolejnym elementem układu antyoksydacyjnego, który skutecznie zmniejsza stężenie nadtlenku wodoru wytworzone w wyniku działania dysmutazy ponadtlenkowej.

Glutation zawierający grupę hydrosulfidową jest wyróżniającym się tripeptydem pełniącym ważne funkcje. Jedną z nich jest ochrona erytrocytów przed uszkodzeniem w wyniku działania aktywnych form tlenu. Pierwszym etapem syntezy glutationu jest utworzenie wiązania peptydowego między grupą γ-karboksyłową glutaminianu i grupą aminową cysteiny w reakcji katalizowanej przez syntetazę γ-glutamylcysteinową. Warunkiem utworzenia tego wiązania jest aktywacja grupy γ-karboksyłowej przy użyciu energii z ATP. Powstały związek pośredni amino-acylofosforan jest z kolei atakowany przez grupę aminową cysteiny. Reakcja ulega inhibicji przez glutation na zasadzie sprzężenia zwrotnego. W drugim etapie katalizowanym przez syntetazę glutationową ATP aktywuje grupę karboksyłową cysteiny, aby umożliwić jej kondensację z grupą aminową glicyny.

Glutation obecny w komórkach zwierzęcych w dużym stężeniu (ok. 5 mM) pełni rolę buforu hydrosulfidowego. Działa w tiolowej formie zredukowanej (GSH) oraz w utlenionej (GSSG), które ulegają cyklicznym wzajemnym przekształceniom. W formie utlenionej dwa tripeptydy zostają połączone wiązaniem dwusiarczkowym. Glutation w formie utlenionej przy udziale reduktazy glutationowej zostaje przekształcony w zredukowany GSH. Jest to flawoproteina, która wykorzystuje NADPH jako źródło elektronu. W większości komórek ilość GSH jest 500 razy większa niż GSSG.

Glutation odgrywa więc kluczową rolę w odtruwaniu, reagując z nadtlenkiem wodoru i nadtlenkami organicznymi, które są szkodliwymi ubocznymi produktami przemian tlenowych.



Powyższą reakcję katalizuje perosydaza glutationowa. Posiada ona przyłączony atom seleny. Miejsce aktywne enzymu zawiera analog selenowy cysteiny, w którym siarka została zastąpiona selenem. Forma E-Se<sup>-</sup> tej reszty redukuje nadtlenek do alkoholu, a sama zostaje utleniona do kwasu E-SeOH. Następnie w reakcję wchodzi glutation i tworzy związek addycyjny — selenosiarczek (E-SeS-G). Potem drugi glutation regeneruje aktywną formę enzymu, atakując selenosiarczek i powstaje utleniony glutation.

W erytrocytach glutation jest redukowany z formy dwusiarczkowej glutationu do formy hydrosulfidowej w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową przy użyciu NADPH. Zredukowany glutation, tripeptyd zawierający grupy hydrosulfidowe, służy jako bufor hydrosulfidowy utrzymujący reszty cysteinowe hemoglobiny i innych białek krwinki w formie zredukowanej. Zredukowana forma glutationu odgrywa kluczową rolę w detoksykacji organizmu, reagując z nadtlenkami organicznymi i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zredukowany glutation jest niezbędny do utrzymania prawidłowej struktury czerwonych krwinek i do utrzymania hemoglobiny w formie nieutlenowanej. Komórki bez dostatecznej ilości glutationu ulegają hemolizie. Leki przeciwmalaryczne (np. prymachina), powodując niedobór zredukowanego glutationu oraz wywołując odkształcenia na powierzchni erythrocyta, prowadzą do zmniejszenia ich trwałości. Takie leki powodują też powstawanie dużej ilości toksycznych nadtlenców, które w obecności zredukowanego glutationu są prawidłowo eliminowane. Przy niedoborze dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w krwinkach z powodu zahamowania szlaku pentozofosforanowego nie wytwarza się NADPH, który bierze udział w redukcji glutationu. Powoduje to niszczenie krwinek.

Wzrost stężenia reaktywnych postaci tlenu w komórce jest przyczyną uszkodzenia wielu struktur komórkowych. Niezwykle istotny jest proces peroksydacji lipidów. Prowadzi to do uszkodzenia błon biologicznych zarówno mitochondrialnych, jak i komórkowych upośledzającego transport przez błony oraz zaburzające funkcje kanałów jonowych. Produkty peroksydacji lipidów, głównie 4-hydroksynonenal, są silnie toksyczne. Mogą zmieniać konformacje wielu białek, inaktywować centra aktywne enzymów. Wykazano, że 4-hydroksynonenal oddziałuje na proteasomy, wpływając pośrednio na procesy cięcia proteolitycznego różnych białek. Zmiana właściwości błony mitochondrialnej w wyniku peroksydacji lipidów ją budujących powoduje zmniejszenie gradientu protonowego istniejącego w poprzek wewnętrznej błony, który jest główną

siłą napędową syntezy ATP w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej. Dalsze uszkodzenie błony mitochondrialnej powoduje uwolnienie do cytoplazmy cytochromu C, który jest silnym czynnikiem proapoptotycznym, oraz wielu prokaspaz, a także czynnika indukującego apoptozę (AIF, *apoptosis inducing factor*). Wolne rodniki mogą przyczyniać się również do powstawania mutacji.

Wiele układów antyoksydacyjnych chroni komórki przed wszystkimi tymi niekorzystnymi procesami związanymi z produkcją ROS. Podstawowym enzymem antyoksydacyjnym jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, *superoxide dismutase*), która znajduje się we wszystkich organizmach tlenowych. W organizmie ssaków zlokalizowane są 3 izoenzymy dysmutazy: cytosolowa CuZnSOD (SOD-1), mitochondrialna MnSOD (SOD-2) oraz pozakomórkowa ECSOD (SOD-3). W miejscu aktywnym enzymu znajdującego się w cytoplazmie znajduje się jon miedzi i cynku. Oba wiążą się koordynacyjnie z łańcuchem bocznym histydyny. Dysmutaza mitochondrialna MnSOD umiejscowiona w macierzy mitochondrialnej jest homotetramerem o masie 96 kDa. Dysmutaza cytosolowa CuZnSOD jest homodimerem o masie 32 kDa.

Odkryta w 1982 r. zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa zlokalizowana jest głównie w tkankach (90–99%). W naczyniach krwionośnych znajduje się ok. 1% tego enzymu. Dysmutaza pozakomórkowa ECSOD umiejscowiona jest w płucach, wątrobie mózgu, sercu, łożysku, ale również w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego. Stosunkowo najwięcej tego enzymu znajduje się w sercu, trzustce, płucach i łożysku, co wyraża się dużą ekspresją mRNA ECSOD w tych narządach.

Gen ECSOD zlokalizowany jest na chromosomie 4 i zbudowany jest z 5900 par zasad. Zawiera 3 eksony oraz 2 introny. Region kodujący enzymu zlokalizowany jest w całości w 3. eksonie. W regionie promotorowym znajdują się miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych białka aktywującego 1 (AP-1, *activating protein*) oraz czynnika jądrowego κβ (NF-κβ, *nuclear factor kappa beta*) [3, 4]. Uważa się, że NF-κβ zapobiega apoptozie komórek nerwowych oraz ulega aktywacji w związku z plastycznością synaps. Stres oksydacyjny oraz wzrost stężenia wapnia wewnątrz komórki są szczególnie ważnymi induktorami aktywacji czynnika jądrowego. Aktywacja tego czynnika może przerwać biochemiczną kaskadę reakcji proapoptotycznych na wczesnym etapie, zanim nastąpi dysfunkcja mitochondriów i wzrostu stężenia ROS.

W regionie promotorowym genu SOD nie występują sekwencje TATA oraz CAAT, ale znajdują

się tu sekwencje bogate w puryny. W regionie 5' genu zlokalizowane są sekwencje regulatorowe — elementy odpowiedzi na glukokortykoidy, ksenobiotyki, antyoksydanty, metale ciężkie oraz estry forbolu. Gen ECSOD jest w 60% homologiczny z genem dla CuZnSOD. Z genem dla MnSOD wykazuje niewielką homologię. Gen dla MnSOD znajduje się na chromosomie 6 (6q25). Region promotorowy pozbawiony jest sekwencji TATA i CAAT, natomiast zawiera dużą liczbę par GC oraz miejsca wiążące czynniki SP-1 i AP-2.

Dysmutaza pozakomórkowa ECSOD powoduje zmniejszenie stężenia anionorodnika ponadtlenkowego w macierzy pozakomórkowej, przestrzeniach międzykomórkowych oraz w naczyniach krwionośnych. Dysmutaza pozakomórkowa ECSOD, tak jak CuZnSOD, wykazuje aktywność peroksydazową. W piśmiennictwie wskazuje się również, że właściwe działanie ECSOD i CuZnSOD jest zapewniane przez fizjologiczne stężenia kwasu moczowego w osoczu, który hamuje inaktywację tych enzymów. Prozapalne cytokiny: interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) oraz interleukina 1 (IL-1) zwiększają ekspresję mRNA i białek dysmutaz, podczas gdy czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*) oraz IL-1 $\alpha$  zmniejszają stężenie mRNA. Heparyna i siarczan heparanu w sposób znaczący podnoszą poziom aktywności ECSOD. Większość czynników wzrostowych zmniejsza ekspresję dysmutaz poprzez interakcje z receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej. Estrogeny i hormon folikulotropowy zwiększają ekspresję dysmutaz. W tym można też upatrywać ochronnej roli estrogenów na naczynia krwionośne. Wysokie ciśnienie parcjalne tlenu, selen, jony żelaza, miedzi, cynk, hydrochinon również oddziałują na aktywność dysmutaz ponadtlenkowych.

Anionorodnik ponadtlenkowy jako główna reaktywna postać tlenu produkowana w mitochondriach może wchodzić w interakcję z tlenkiem azotu i przekształcać go w toksyczny nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>), który może uszkadzać komórki poprzez aktywację peroksydacji lipidów błonowych, nitrozowanie reszt tyrozynowych białek, co prowadzi do ich uszkodzenia i zaburza ich funkcje.

Reaktywne postacie tlenu ogrywiają dużą rolę podczas hipoksji i niedokrwienia mięśnia sercowego. W 1974 r. Stern i Tzivoni [7] opisali zjawisko niemego niedokrwienia. Rok później Heyndrickx i wsp. [8] opublikowali pracę, na podstawie której Braunwald i Kloner [9] opisali pojęcie ogłuszenia (*stunning*). W 1984 r. Rahimtoola [10] opisał hibernację mięśnia sercowego. Dwa lata później Murry i wsp. [11] wprowadzili i opisali pojęcie hartowania (*preconditioning*) mięśnia sercowego.

W zawale serca dochodzi do martwicy określonego obszaru mięśnia. Dzięki szybkiemu leczeniu można zmniejszyć obszar martwicy lub nie dopuścić do jej powstania. Oprócz fibrynolizy coraz powszechniejszy staje się dostęp do szybkiego leczenia interwencyjnego metodą przezskórnej angioplastyki wieńcowej. Wraz z rozpowszechnieniem tego zabiegu pojawiły się nowe problemy związane z restenozą, powikłaniami po zabiegach chirurgicznych, z reperfuzją i ogłuszeniem mięśnia sercowego.

W 1975 r. Heyndrickx i wsp. [8] zaobserwowali, że po 5-minutowym niedokrwieniu serca u psa występuje u niego 3-godzinne upośledzenie czynności mechanicznej mięśnia sercowego. Na podstawie tych badań Braunwald i Kloner w 1982 r. [9] nazwali opóźniony powrót czynności skurczowej ogłuszeniem mięśnia sercowego. Pojęcie to wprowadzono w celu opisanego zjawiska wydłużającej się dysfunkcji rozkurczowej lewej komory po epizodzie zamknięcia naczynia wieńcowego. Czas trwania całkowitego niedokrwienia, po którym ogłuszenie jest całkowicie odwracalne wynosi 15–20 min [12]. Niecałkowity powrót czynności skurczowej miokardium nazwano okaleczeniem mięśnia sercowego [13].

Mięsień sercowy jest zależny od metabolizmu tlenowego, który zachodzi w mitochondriach. W kardiomiocycie zajmują one ok. 30–40% objętości. Występuje w nich metabolizm kwasów tłuszczowych, aminokwasów i glukozy z uwolnieniem dużej ilości energii, która magazynowana jest w wysokoenergetycznych wiązaniach fosforanowych.

W momencie ustania perfuzji dochodzi najpierw do zużycia energii z wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych. W ciągu kilku skurczów mięśnia zasoby fosfokreatyny zużywają się. Maleje stężenie ATP, a wzrasta stężenie mleczanów. Metabolizm kardiomiocytu staje się beztlenowy. Zwiększa się stężenie jonów wodorowych, pojawia się kwasica i zwiększa się ładunek osmotyczny. Brak wysokoenergetycznych związków powoduje zahamowanie pracy układów pomp jonowych. Zmniejsza się potencjał czynnościowy, ponieważ otwierają się kanały potasowe wskutek wzrostu stężenia ADP i adenyzy powstających z rozpadu ATP. Kanały potasowe zależne od ATP ( $K_{ATP}$ ) licznie występują w miocytach i ich aktywność jest regulowana przez wewnątrzkomórkowe stężenie ATP. Ulegają one szybkiemu otwarciu w okresie hipoksji, niedokrwienia oraz kiedy zmienia się stężenie ADP do ATP. Sugeruje się, że otwarcie kanałów potasowych w czasie niedokrwienia, skracając czas trwania potencjału czynnościowego, ogranicza napływ wapnia do komórki, działając w ten sposób kardioprotekcyjnie.

Istotnym zaburzeniem w okresie niedokrwienia jest napływ jonów wapnia do komórki. W warunkach fizjologicznych napływ jonów wapnia do miocytu zachodzi w fazie wstępnej szybkiej repolaryzacji, w fazie *plateau* potencjału czynnościowego (powolnej repolaryzacji) oraz szybkiej repolaryzacji, kiedy powolny dośrodkowy prąd wapniowy wygasa. Jony wapniowe wpływają do komórki poprzez kanały wapniowe w wyniku dużej różnicy stężeń wapnia po obu stronach błony komórkowej. Napływ wapnia pobudza uwolnienie większych jego ilości z retikulum endoplazmatycznego. Wapń łączy się z troponiną C (TnC, 18kDa) — białkiem silnie wiążącym jony wapnia. Powoduje to rozpoczęcie się tworzenia mostków aktynowo-miozynowych i powstanie skurczu. Relaksacja zachodzi w warunkach odwyfundowania jonów wapniowych od troponiny C i zniesienia połączenia między aktyną i miozyną w wyniku zmniejszenia się jonów wapniowych w cytoplazmie. Zmniejszenie się stężenia wapnia jest procesem aktywnym, zachodzącym dzięki energii zawartej w ATP, którą zużywają pompy jonowe:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza w sarkolemie i retikulum endoplazmatycznym oraz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ATP-aza, która utrzymuje niskie wewnątrzkomórkowe stężenie sodu w miocycie konieczne do eliminacji wapnia.

W niedokrwieniu i hipoksji stężenie wapnia w cytozolu rośnie. W okresie reperfuzji lub reoksygenacji również dochodzi do wzmożonego wychwytu wapnia. Istnieje hipoteza mówiąca o potencjalnej roli ROS w zwiększonym napływie jonów wapnia do komórki w okresie niedokrwienia i reperfuzji [14–16].

Reaktywne formy tlenu powodują wzrost stężenia jonów wapnia w kilku złożonych mechanizmach. Nasilając peroksydację lipidów, powodują uszkodzenie struktury błon komórkowych, głównie fosfolipidów błonowych, rozluźniając ich strukturę. W okresie reperfuzji, kiedy dochodzi do reoksygenacji, w uszkodzonych mitochondriach wytwarza się jeszcze więcej ROS w wyniku niewydolności układów enzymatycznych łańcucha oddechowego. Ponadto niewydolność mitochondriów zmniejsza zasoby ATP w komórce. Obecność ATP jest konieczna do prawidłowego działania pomp jonowych, które regulują stężenie wapnia w cytozolu podczas rozkurczu. Zmniejszenie stężenia ATP w miocycie powoduje jego przykurcz. Odpowiadać to może za powstanie rozkurczowej sztywności komory. Ponieważ ATP warunkuje oddysocjowanie aktyny od miozyny, powodując relaksację miofilamentów, zmniejszenie stężenia ATP hamuje ten proces.

Duże stężenie reaktywnych postaci tlenu w cytozolu, uszkadzając błony lipidowo-białkowe, pośrednio toksycznie oddziałują na kanały wapniowe.

Hamują wychwyty wapnia przez siateczkę sarkoplazmatyczną. Reaktywne formy tlenu wpływają też hamująco na pompę sodową, a zwiększona ilość protonów z narastającą kwasicyą w przebiegu niedokrwienia i następczej reoksygenacji pobudza wymiennik sodowo-wapniowy. Ponadto dochodzi do zmniejszenia szybkości inaktywacji prądu wapniowego [17]. Wszystkie te patologiczne procesy wiążą się ze wzrostem stężenia ROS w komórce i stanowią jedną z kilku przyczyn przeładowania wapniem komórki podczas reperfuzji. Ma to zasadnicze znaczenie w rozwoju urazu poreperfuzyjnego. Od wielu lat sądzi się, że podczas reperfuzji dochodzi do dalszego uszkodzenia mięśnia sercowego w wyniku przywrócenia drożności naczynia wieńcowego. Kloner [18] podał 4 główne postaci urazu poreperfuzyjnego. Zaliczył do nich śmiertelny uraz reperfuzyjny, uraz naczyniowy, okaleczenie mięśnia sercowego oraz poreperfuzyjne zaburzenia rytmu. Koncepcja śmiertelnego urazu reperfuzyjnego, budząca wiele kontrowersji, mówi o powstaniu martwicy po ponownym ukrwieniu mięśnia. Z powodu niewydolności układów antyoksydacyjnych ROS działają toksycznie, powodując śmierć komórek mięśniowych. Uraz naczyniowy po reperfuzji wiąże się z uszkodzeniem naczyń krwionośnych po przywróceniu przepływu. Objawami tego uszkodzenia jest poszerzenie strefy, w której nie ma przepływu oraz zmniejszenie się rezerwy wieńcowej. Uszkodzenie naczyń wiąże się z martwicą komórek śródbłonna, zwyrodnieniem wodniczkowym tych komórek i zwiększaniem się odległości między komórkami endotelium [19]. Brak ponownego napływu krwi po udrożeniu naczynia nazwano zaburzeniem przepływu wieńcowego. Okaleczenie mięśnia sercowego (*maimed myocardium*) jest to niepełny powrót czynności mechanicznej serca po okresie ogłuszenia, spowodowany nieodwracalnym uszkodzeniem miocytów, często z obumarciem określonego obszaru tkanki. Poreperfuzyjne zaburzenia rytmu często występujące pod postacią częstoskurczu komorowego lub migotania komór pojawiają się w kilka sekund lub minut po przywróceniu perfuzji. Zaburzenia te występują po krótkim okresie zamknięcia tętnicy wieńcowej, który nie spowodował martwicy mięśnia sercowego. Rzadko zaburzenia rytmu po reperfuzji występują u pacjentów leczonych trombolitycznie i często wiążą się z okaleczeniem miokardium.

W codziennej praktyce klinicznej istotne jest zapobieganie skutkom reperfuzji. Od wielu lat prowadzi się badania mające na celu farmakologiczne oddziaływanie na patologiczne zjawiska zachodzące podczas reperfuzji. Poznana rola jonów wapnia

w patologii ogłuszenia zaowocowała wieloma badaniami na temat stosowania inhibitorów kanałów wapniowych w zapobieganiu uszkodzeniu mięśnia sercowego w przebiegu reperfuzji. Du Toit i Opie [12] podawali nisoldypinę w przypadku ogłuszenia mięśnia sercowego u szczura, która zmniejszyła ogłuszenie. Ehring i wsp. [20] stwierdzili, że nisoldypina działa tylko wówczas, jeśli poda ją się przed reperfuzją. Badacze ci jednak podawali nisoldypinę po 4–6 minutach reperfuzji, natomiast stężenie wapnia w cytozolu normalizuje się w pierwszych minutach reperfuzji [21]. Sheiban i wsp. [22] stwierdzili korzyść z dowieńcowego podania nisoldypiny podczas przeprowadzania zabiegu angioplastyki w przebiegu ostrego zawału serca. W badaniu DEFIANT [23] wykazano korzyść ze stosowania antagonisty kanałów wapniowych u pacjentów z pozawałową dysfunkcją rozkurczową serca. Mimo wielu badań wciąż nie do końca poznano rolę wapnia i związków oddziałujących na gospodarkę wapnia w komórce, dlatego konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

Kolejnym miejscem potencjalnego działania ochronnego na komórki miokardium jest zablokowanie powstawanie wolnych rodników. Zgodnie z hipotezą z Cape Town reaktywne postacie tlenu stanowią jedną z przyczyn przeładowania wapniem komórki. Mogą odpowiadać też za śmierć kardiomiocytów w przebiegu silnego narażenia na stres oksydacyjny.

W przebiegu niedokrwienia i reperfuzji na zwiększone stężenie wolnych rodników komórka reaguje wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wzrasta więc stężenie katalazy oraz dysmutazy nadadtlenkowej. Wzrost aktywności tych enzymów jest jednak niewystarczający, dlatego sądzi się, że stosowanie związków mających właściwości antyoksydacyjne może w istotny sposób zapobiegać powstawaniu urazom poreperfuzyjnym.

Prowadzi się badania dotyczące potencjalnej protekcyjnej roli antyoksydantów w zapobieganiu ogłuszenia. Doświadczenia przeprowadzane na zwierzętach jednoznacznie nie wyjaśniają, czy leki antyoksydacyjne zapobiegają ogłuszeniu [24]. Kha-per i wsp. [25] stwierdzili wzrost metabolizmu tlenowego oraz obniżenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych na podstawie stężeń mRNA oraz stężenia białek dla enzymów oksydacyjnych: dysmutazy nadadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i katalazy. Autorzy wywoływali zawał u szczurów poprzez zamknięcie lewej tętnicy wieńcowej i analizowali wspomniane parametry w 1., 4. i 16. tygodniu po incydencie. Ponadto podawali losartan

w dawce 2 mg/ml włączony w 4. tygodniu po zawa-le. Stężenie mRNA dla SOD zmniejszyło się o 40% w pierwszym tygodniu, w następnych tygodniach było podobne jak w grupie kontrolnej, a następnie w 16. tygodniu po incydencie zmniejszyło się o ok. 73%. Stężenie mRNA dla peroksydazy glutationowej nie zmieniło się przez cały okres obserwacji. Stężenie mRNA dla katalazy tylko w 16. tygodniu obserwacji znacząco obniżyło się. Stężenie białka MnSOD, CuZnSOD oraz peroksydazy glutationowej istotnie nie różniło się w porównaniu z grupą kontrolną. Jednakże stężenie białek katalazy zwiększyło się w grupie kontrolnej oraz w grupie leczonej losartanem. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych koreluje więc ze stężeniem mRNA, natomiast nadal do końca nie poznano mechanizmu wzrostu aktywności układów antyoksydacyjnych u chorych leczonych losartanem. Być może wiąże się to z patofizjologią dotyczącą jonów wapnia w przebiegu ogłuszenia.

Daga i wsp. [26] ocenili antyoksydacyjny wpływ esmololu w zapobieganiu uszkodzeniu mięśnia sercowego w ostrym zawałe serca. W randomizowanej, kontrolowanej podwójnie ślepej próbie zbadano 30 pacjentów z AMI leczonych trombolitycznie. Piętnastu osobom podano esmolol, pozostali stanowili grupę kontrolną. U chorych dokonano pomiaru stężenia malonyldialdehydu oraz oceniono aktywność dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej. Malonyldialdehyd należy do reaktywnych produktów kwasu tiobarbituranowego (TBA, *tiobarbituric acid*), które można dość łatwo zmierzyć w osoczu badanych pacjentów i które można wykorzystać jako zmienne dobrze korelujące z poziomem aktywności reaktywnych form tlenu w danym organizmie.

W procesie peroksydacji lipidów pod wpływem ROS powstają krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, alkohole, węglowodory alifatyczne, cykliczne endonadtlenki i aldehydy, w tym dialdehyd malonowy (MDA, *malondialdehyde* COH-CH<sub>2</sub>-COH). W materiale biologicznym często jest oznaczany ze względu na reakcję zachodzącą w środowisku kwaśnym w temperaturze wrzenia z TBA. Produkty reakcji aldehydów (w tym MDA) z TBA określa się jako produkty TBA-reaktywne i uważa się je za marker peroksydacji lipidów. Na przykład stwierdza się wyższe stężenie produktów TBA-reaktywnych u pacjentów palących tytoń w porównaniu z niepalącymi. U chorych z AMI stwierdzono prawie 5-krotny wzrost stężenia MDA w porównaniu ze zdrową populacją. U osób otrzymujących esmolol stwierdzono znacznie mniejsze stężenie MDA oraz podwyższoną aktywność peroksydazy glutationowej w porównaniu z grupą kontrolną. Badania



przeprowadzono przy przyięciu do szpitala, w 2. godzinie oraz w 24. godzinie hospitalizacji. Sugeruje to istotne antyoksydacyjne działanie  $\beta$ -blokerów. Niestety mechanizm tego działania wciąż pozostaje niejasny i wymaga dalszych badań.

## Wnioski

Wyda się, że reaktywne postacie tlenu powstające w wyniku wielu nieprawidłowych procesów związanych z niedotlenieniem i reperfuzyją mają istotny udział w patogenezie ołuszenia mięśnia sercowego i innych uszkodzeń poreperfuzyjnych. Mimo że przeprowadzono wiele badań, nie znaleziono

skutecznej metody leczenia urazów poreperfuzyjnych. Dlatego zwrócenie uwagi na funkcjonowanie układów antyoksydacyjnych w organizmie danego pacjenta jest istotne z perspektywy potencjalnego zastosowania leków o działaniu zmniejszającym stężenia ROS. Glutation wydaje się być dobrym związkiem zmiatającym wolne rodniki. Jako endogenny prawdopodobnie nie jest szkodliwy dla organizmu. Potencjalny brak działań niepożądanych podczas stosowania glutationu jest niewątpliwie zaletą tej terapii. Wciąż jednak zbyt mało wiadomo na ten temat i potrzebne są dalsze badania dotyczące zastosowania glutationu w prewencji ołuszenia mięśnia sercowego po reperfuzyji.

## Streszczenie

**Wstęp:** *Nadmierne wytwarzanie reaktywnych postaci tlenu (ROS), zwane stresem oksydacyjnym, wiąże się z niewydolnością enzymatycznych układów antyoksydacyjnych (katalaza, peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa), a także z niedoborem nieenzymatycznych antyutleniaczy, do których należy m.in. zredukowany glutation (GSH). Zjawisko stresu oksydacyjnego, w którym fagocyty są stymulowane do syntezy ROS zwiększających uszkodzenie na poziomie tkankowym, odgrywa ważną rolę w niedokrwieniu i reperfuzyji. Zespoły poreperfuzyjne (groźne zaburzenia rytmu, włącznie z migotaniem komór, skurczowa niewydolność miokardium) stanowią aktualny problem kardiologii interwencyjnej. Celem pracy jest przedstawienie poglądów na temat patofizjologii procesu uszkodzenia poreperfuzyjnego i ołuszenia mięśnia sercowego oraz wskazania potencjalnych związków chemicznych i miejsca ich działania, które mogą osłabić toksyczne uszkodzenie mięśnia po reperfuzyji lub zapobiegać jego uszkodzeniu i skracać okres ołuszenia.*

**Materiał i metody:** *Dokonano przeglądu publikacji polskich i zagranicznych dotyczących ołuszenia mięśnia sercowego, roli wolnych rodników tlenowych w uszkodzeniu poreperfuzyjnym i funkcjonowania układów antyoksydacyjnych w przebiegu zawału i innych postaci choroby niedokrwiennej serca. Uwzględniono zarówno badania kliniczne, jak i eksperymentalne.*

**Wnioski:** *Mimo że przeprowadzono wiele badań, nie znaleziono skutecznej metody leczenia urazów poreperfuzyjnych. Istnieje hipoteza (potwierdzona na modelu zwierzęcym), że podanie egzogenego GSH, który ma potencjał neutralizujący wolne rodniki tlenowe, może ograniczyć uraz poreperfuzyjny w mięśniu sercowym i jego uszkodzenie prowadzące do niewydolności serca. Zredukowany glutation wydaje się preparatem bezpiecznym, w piśmiennictwie nie ma danych o jego interakcjach. Wciąż jednak zbyt mało wiadomo na ten temat i potrzebne jest przeprowadzenie dalszych badań dotyczących zastosowania glutationu w prewencji ołuszenia mięśnia sercowego po reperfuzyji. (Folia Cardiol. 2006; 13: 9–18)*

**stres oksydacyjny, uszkodzenie mięśnia sercowego po reperfuzyji, glutation**

## Piśmiennictwo

1. Kharb S. Low blood glutathione levels in acute myocardial infarction. *Ind. J. Med. Sci.* 2003; 57: 335–357.
2. Kupatt C., Hinkel R., Horstkotte J., Deiss M., von Bruhl M.L., Bilzer M., Boekstegers P. Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates

- myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 530–537.
3. Shimizu H., Kiyohara Y., Kato I. i wsp. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke* 2004; 35: 2072–2077.
  4. Iqbal M.P., Ishaq M., Mehboobali N. Increased levels of erythrocyte glutathione in acute myocardial infarction: an antioxidant defence. *J. Pak. Med. Assoc.* 2004; 54: 254–258.
  5. Matsumoto H., Inoue N., Takaoka H. i wsp. Depletion of antioxidants is associated with no-reflow phenomenon in acute myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* 2004; 27: 466–470.
  6. Ohsawa M., Tsuru R., Hojo Y. i wsp. Relationship between redox state of whole arterial blood glutathione and left ventricular function after acute myocardial infarction. *Cardiol.* 2004; 44: 141–146.
  7. Stern S., Tzivoni D. Early detection of silent ischaemic heart disease by 24-hour electrocardiographic monitoring of active subjects. *Br. Heart J.* 1974; 36: 481–486.
  8. Heyndrickx G.R., Millard R.W., McRitchie R.J., Maroko P.R., Vatner S.F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* 1975; 56: 978–985.
  9. Braunwald E., Kloner R.A. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146–1149.
  10. Rahimtoola S.H. The hibernating myocardium. *Am. Heart J.* 1989; 117: 211–221.
  11. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136.
  12. Du Toit E.F., Opie L.H. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolation rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ. Res.* 1992; 70: 960–967.
  13. Boden W.E., Brookes W.W., Conrad C.H. Incomplete, delayed functional recovery late after reperfusion following acute myocardial infarction: “maimed myocardium”. *Am. Heart. J.* 1995; 130: 922–932.
  14. Bolli R. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation* 1992; 86: 1671–1692.
  15. Bolli R., Patel B.S., Jeroudi M.O. Demonstration of free radical generation in stunned myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tertiary butyl nitron. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 476–485.
  16. Opie L.H. Chronic stunning: the new switch in thought. *Basic Res. Cardiol.* 1995; 90: 303–304.
  17. Du Toit E.F., Opie L.H. Inhibitors of  $Ca^{2+}$ -ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994; 13: 678–684.
  18. Kloner R.A. Does reepfusion injury exist in humans? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993; 21: 723–738.
  19. Engler R.L., Schmid-Schonbein G.W., Pavelec R.S. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am. J. Pathol.* 1983; 111: 98–111.
  20. Ehring T., Boehm M., Heusch G. The calcium antagonist nisoldipine improves the functional recovery of reperfused myocardium only when given before ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 20: 63–74.
  21. Park S.W., Tang X.-L., Qui Y. Nisoldipine attenuates myocardial stunning induced by multiple coronary occlusions in conscious pigs and this effects is independent of changes in hemodynamics or coronary blood flow. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 655–666.
  22. Sheiban I., Tonni S., Chizzoni A., Marini A., Trevi G. Recovery of left ventricular function following Elary reperfusion In acute myocardial infarction: a potential role for the calcium antagonist nifedipine. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; 11: 5–16.
  23. DEFIANT (Doppler Flow and Echocardiography in Functional Cardiac Insufficiency: Assessment of Nisoldipine Treatment) Research Group. Improved diastolic function with the calcium antagonist nisoldipine (coat-core) in patients post myocardial infarction: results of the DEFIANT study. *Eur. Heart J.* 1992; 13: 678–967.
  24. Bolli R., Mcay P.D. Use of spin traps in intact animals undergoing myocardial ischemia/reperfusion: a new approach to assessing the role of oxygen radicals in myocardial “stunning”. *Fre. Radic. Res. Commun.* 1990; 9 (3–6): 169–180.
  25. Khaper N., Kaur K., Li T., Farahmand F., Singal P.K. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol. Cell Biochem.* 2003; 251: 9–15.
  26. Daga M.K., Chaudhary M., Dharma B. i wsp. Effect of esmolol on oxidant status and antioxidant activity In acute myocardial infarction. *J. Assoc. Physicians India* 2003; 51: 677–680.