

Kardioproteksjon: Er proteksjon med adenosin, nicorandil og isofluran additiv?

-En studie av isolerte perfunderede rottehjerter

5.årsoppgave i Stadium IV – Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i Tromsø.

Anders Giske, MK04
Veronika Gjertsen Rypdal, MK04

Veileder: Prof. dr. med. Kirsti Ytrehus

Tromsø, 15.09.2009

Innholdsfortegnelse:

	Side
Resymè	3
1 Introduksjon	4
2 Fysiologi	6
2.1 Patofysiologi	6
2.1.1 Reperfusjonsskader	8
2.2 Kardioproteksjon	9
2.2.1 Prekondisjonering	9
2.2.2 Cellulære mekanismer i klassisk prekondisjonering	11
2.2.3 Sen fase prekondisjonering (SWOP)	18
2.2.4 Remote prekondisjonering	19
2.2.5 Postkondisjonering	19
2.2.6 Klinisk betydning av pre- og postkondisjonering	19
3 Medikamenter	20
3.1 Adenosin	20
3.1.1. Adenosinreseptorer	21
3.1.2 Terapeutisk anvendelse av adenosin	24
3.1.3 Kardioproteksjon med fokus på adenosin	24
3.1.3.1 Prekondisjonering	24
3.1.3.2 Postkondisjonering	26
3.2 Nicorandil	27
3.2.1 Terapeutisk anvendelse av nicorandil	28
3.2.2 Nicorandil og kardioproteksjon	29
3.3 Isofluran	30
3.3.1 Signaleringsvei ved prekondisjonering med inhalasjonsanestesi	30
3.3.2 Isofluran og farmakodynamiske egenskaper	31
3.3.3 Betydningen av ROS og RNS	33
3.3.4 Er proteksjon med isofluran doseavhengig?	33
3.3.5 Inhalasjonsanestesi gir kardioproteksjon via potensering av K_{ATP} -kanalåpning	33
4 Metode	34
4.1 Langendorff perfusjon	34
4.2 Anestesi og foreberedelser	35
4.3 Perfusjon	36
4.4 Dataregistrering og infarktanalyse	37
5 Protokoller	39
5.1 Protokoll varighet	40
6 Resultater	40
6.1 Trykk	43
6.2 Flow	50
6.3 Infarktstørrelse	52
7 Diskusjon	54
8 Konklusjon	57
9 Referanser	57

Resymé

Bakgrunn: Adenosin, nicorandil og isofluran har hver for seg vist å ha kardioprotektive egenskaper. I denne studien ønsker vi å finne ut om adenosin, nicorandil og isofluran gitt sammen gir en additiv effekt. Vi skal på bakgrunn av dette kombinere de ulike medikamentene for å finne ut om de potenserer hverandre og sammen gir en større beskyttelse av rottehjertet enn hva de ville gjort hver for seg.

Metode: Eksperimentene ble gjennomført etter Langendorff-metoden og var i regi av avdeling for medisinsk fysiologi og kirurgisk avdeling på UiT. Forsøkene fordelte seg over en periode på ett år; sommer 2007, høst 2007 og sommer 2008. Det ble brukt totalt 94 rotter. Hoveddelen av forsøkene ble utført på Wistar-rotter med gjennomsnittlig vekt på 279 gram ($SD \pm 31,5g$). Anestesi ble administrert intraperitonealt i form av pentobarbital 50mg/kg og tromboseprofylakse med heparin 1000 IE/kg. Rottene ble randomisert til tre ulike protokoller. Hver protokoll bestod av en stabiliseringsfase etterfulgt av global ischemi og reperfusjon. Varigheten av periodene var avhengig av protokoll. Farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin (pilotstudie): Kontroller (n=8 hannrotter, n=6 hunnrotter), adenosin og nicorandil (n=7 hannrotter, n=7 hunnrotter). Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin: Kontroller (n=12), nicorandil og adenosin (n=9), nicorandil (n=8), adenosin (n=8), og en gruppe postkondisjonering nicorandil og adenosin (n=4). Farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin: Kontroller (n=6), nicorandil, isofluran og adenosin (n=6), nicorandil (n=6) og isofluran (n=7).

Nicorandil og adenosin ble administrert i Krebs og Henseleit- buffer i konsentrasjoner på henholdsvis 0,1mmol/l og 1,2 mmol/l. Isoflurandosering: 4% med en air-flow på 700ml/min som innledningsdose. Vedlikeholdsdosen var på 2,5% med en air-flow på rundt 450ml/min og ble tilført i 30 minutter.

Konklusjon: Infarktstørrelse: Studien farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin: Nicorandil og adenosin 7,4% infarkt mot kontroller 24,1% (p-verdi= $1,0 \cdot 10^{-5}$, korrigert= $4,0 \cdot 10^{-5}$). Adenosin 10,5% infarkt (p-verdi= 0,001, korrigert= 0,004) og nicorandil 14,3% (p-verdi= 0,002, korrigert= 0,008).

Studien farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin: Isofluran, nicorandil og adenosin hadde 8,8% infarkt (p-verdi 0,005) mot kontroller 31,2%. Nicorandil 19,2% infarkt (p-verdi= 0,06). Isofluran 21,2% infarkt (p-verdi=0,10). Vi har vist at det i rottehjerter er en additiv effekt av å tilsette nicorandil og adenosin til isofluran ved bruk av infarktstørrelse som endepunkt.

1 Introduksjon

En kraftig økning i insidensen av ischemisk hjertesykdom de siste femti årene har ført til mye forskning på hvordan man kan beskytte hjertet mot ischemiske skader og følgene av disse. Positive resultater på eksperimentell ischemi på dyremodeller har ikke alltid vært like enkelt å overføre til en klinisk setting. En forutsetning for å kunne sette i gang med kliniske forsøk er at det foreligger tilstrekkelig dokumentasjon fra dyreeksperimenter. Dersom det ikke oppnås ønskede resultater på kliniske forsøk må man tilbake til dyremodeller for å forsøke å finne ut hvorfor.

Kardioproteksjon er beskyttelse eller bevaring av hjerteceller og deres funksjon under og i etterkant av en ischemisk episode. Dette involverer pre- og postkondisjonering, kardioprotektive medikamenter, temperaturforhold og modulering av ekstracellulære elektrolytter. Forskning rundt kardioproteksjon har ført til en større forståelse for mekanismene som ligger til grunn for at hjertet kan øke sin ischemitoleranse. I tillegg til utvikling av kardioprotektive medikamenter har forskningen også bidratt til utvikling innenfor hjertekirurgi, med bedret intraoperativ hjertebeskyttelse og sammensetning av kardioplegivæsker som resultat. Det er verdt å nevne at kardioproteksjon med reduksjon i celledød ikke ble relevant for humanmedisinen før reperfusjon ble teknisk mulig.

Substansene nicorandil, adenosin og isofluran har vist seg å ha kardioprotektive egenskaper. Nicorandil er et medikament som virker relakserende på glatt muskulatur i tillegg til å fungere som NO-donor. Det antas å virke på de ATP avhengige kaliumkanalene i cellemembranen og i mitokondriemembranen, som beskytter hjertet mot stunning og celledød [1, 2].

Isofluran er en gass som benyttes under vedlikehold av anestesi. Den er en halogenert eter med lav blod/gass koeffisient, noe som betyr en rask induksjon og eliminasjon av anestesen. Inhalasjonsanestesi har også vist seg å ha en kardioprotektiv effekt, blant annet ved å interagere med elektrontransportkjeden med påfølgende økning i ROS produksjonen og aktivering av cellens beskyttelsesmekanismer.

I en klinisk utprøving med nicorandil som kardioplegi uten høye kaliumløsninger ga ikke nicorandil rask arrest eller økt proteksjon [3]. I en annen studie ble det vist at

den beskyttende effekten av 300mM nicorandil ikke var tilstede ved samtidig administrasjon av isofluran og sevofluran [4]. En mulig forklaring var at isofluran, som virker kardioprotektivt via samme mekanismer som ischemisk prekondisjonering, virker inn på samme mediatorene som nicorandil og dermed hadde hentet ut effekten før nicorandil ble administrert.

Adenosin er en endogen substans med veldokumenterte kardioprotektive egenskaper [5], som også kan benyttes som farmakologisk agens.

I denne studien ønsker vi å undersøke om isofluran påvirker disse egenskapene og om det er mulig å hente ut en additiv effekt ved kombinasjon av flere kardioprotektive agens. Det er vist at den kardioprotektive effekt av isofluran ikke er mediert via adenosin 1 (A1) reseptoren [6]. Det er også påpekt at isofluran direkte aktiverer mitokondrielle ATP kanaler og ikke virker via adenosin [7]. Disse to forholdene er også karakteristisk for såkalt ischemisk prekondisjonering. Adenosin antagonister er effektive blokkere av ischemisk prekondisjonering i hjertet i mange spesies, det samme er blokkere av ATP avhengige kalium kanaler [8]. Det er derfor en mulighet for at isofluran, adenosin og ischemisk prekondisjonering deler samme cellulære signalveier og endoeffektorer for kardioproteksjon.

Hovedspørsmålet ved denne studien er om adenosin, nicorandil og isofluran gitt sammen gir en additiv effekt. Vi vet at alle tre stoffer har kardioprotektive egenskaper, men siden deres effekt oppnås via felles signaleringsveier er spørsmålet om de alltid henter ut maksimal gevinst når de gis hver for seg. Derfor har vi også til hensikt med denne studien å finne ut om nicorandil kan beskytte i hjerter som har blitt forbehandlet med isofluran. Dette er klinisk relevant fordi isofluran er et inhalasjonsanestetikum som er mye brukt ved behov for langvarig narkose, som ved hjertekirurgi. Koronar bypass innebærer at hjertet eksponeres for en annen perfusjonsløsning enn organismen for øvrig. Vi skal på bakgrunn av dette kombinere de ulike medikamentene for å finne ut om de potenserer hverandre og sammen gir en større beskyttelse av rottehjertet enn hva de ville gjort hver for seg.

2 Fysiologi

Denne oppgaven omhandler hva som skjer med myocytene under perioder med for liten tilførsel av næring og oksygen. Grunnleggende kunnskap om hjertemuskelens funksjon og oksygenmetabolisme er derfor en viktig bakgrunn for oppgaven.

Hjertemuskel pumper blod ut i system- og pulmonalkretsløpet. For å utføre et slikt arbeid behøves næring og oksygen, som tilføres via egen blodforsyning.

Koronarkretsløpet har utspring fra aortaroten, det brer seg nedover på hjertets overflate og penetrerer deretter dypere inn i myokard.

Under normale forhold koordineres kontraksjonene via et intrikat ledningssystem, hvor pacemakerceller har en sentral rolle. Dette er celler med autonom aktivitet som er uavhengige av en ekstern nevrogen stimulus for å eksiteres. Hvilket betyr at hjertets kontraktile aktivitet ikke er underlagt det sentrale nervesystemet.

Pacemakerceller er lokalisert i sinoatrialknuten (SA-knuten), atrioventrikulærknuten (AV-knuten), his bunten og purkinjefibrene. De har ulike firingfrekvenser, og det vil til enhver tid være de pacemakercellene som har hyppigst firingfrekvens som bestemmer frekvensen av hjertekontraksjonene. Under normale forhold vil det være pacemakercellene i sinoatrialknuten som bestemmer frekvensen. Disse cellene er lokalisert i høyre atrium nær innmunningen til vena cava superior, og har en firingfrekvens på om lag 60-100/minutt. I forsøk på isolerte rottehjerter ligger frekvensen på om lag 300 slag i minuttet. Dette vil da være firingfrekvensen til pacemakercellene i et rottehjerte ved in vitro forsøk. I in vivo forsøk vil hjertefrekvensen ligge noe høyere grunnet påvirkning fra det autonome nervesystemet.

2.1 Patofysiologi

En stor andel av hjerteinfarktforekomsten (ca. 80%) skyldes atherosklerotisk sykdom med påfølgende karokklusjon. Mindre hyppige årsaker er embolier, trombose i ikke-atherosklerotiske kar, koronare spasmer samt blødningssjokk og kraftige blodtrykksfall.

Rotter, i likhet med de fleste andre dyrearter vi kjenner til har ikke anlegg for atherosklerotisk sykdom. Ved eksperimenter hvor man ser på myokardskade etter induisert ischemi, dreier det seg som oftest om en akutt okklusjon av kar (for eksempel

ved at det settes en ekstravaskulær ligatur). Denne ulikheten mellom forskjellige forsøksdyr og mennesker, samt andre faktorer (grad av ischemi, medikamentbruk og komorbiditet) er en av årsakene til at oppløftende resultater på dyr ikke direkte kan overføres til mennesket .

Atherosklerose er en prosess som begynner allerede i tidlig alder, men hvor progresjonen avhenger av både arv, miljø og livsstil. Prosessen består i en fibrøs fortykning av arterieveggen med infiltrat av lipider som forkalkes. Disse kan løsne og danne tromber som ytterligere okkluderer blodgjennomstrømningen. En slik destruktiv prosess i blodkar vil føre til at endotelets egenskap til å produsere NO hemmes. Dermed vil en viktig kompensasjonsmekanisme (vasodilatasjon) bli satt ut av spill.

Når en atherosklerotisk prosess har progrediert tilstrekkelig til å okkludere karlumen slik at blodforsyningen til myocytene kompromitteres, vil dette påvirke deres metabolisme. Under normale aerobe forhold foretrekker myocytene å forbruke energi i form av frie fettsyrer (FFA), som utgjør 60-90% av substratet for ATP-syntesen. Resten skaffes til veie ved oksidasjon av pyruvat fra glykolysen og oksidering av laktat. En karokklusjon vil føre til at hjertet bytter sin energikilde og metabolismen skiftes over til anaerob glykolyse i løpet av minutter. Anaerob metabolisme gir på langt nær ikke like mye energi (ATP) som aerob glykolyse gir. Myocytene vil i en slik situasjon øke opptaket av sirkulerende glukose for å kompensere for energimangelen. Dette vil likevel ikke være tilstrekkelig og netto ATP-nivå vil synke. Lavt ATP- nivå går utover alle kanalene som er avhengig av ATP for å fungere, blant annet NaK-ATPasen. Intracellulær konsentrasjon av Na og Cl vil øke, myocytten vil fylles med væske og øke i størrelse. På grunn av dette skjer det endringer i cytoskjelettet, myofibrillene blir tynnere og skjørere samtidig som glycogen brytes ned. Dette vil i sin tur påvirker ulike membranfunksjoner og transportsystemer i sarkolemma og sarkoplasmatiske retikulum. Ca^{2+} , toksiske metabolitter og frie oksygenradikaler vil akkumulere og føre til aktivering av proteaser og fosfolipaser. Dette resulterer i aktivering av lysophosfolipider og deponering av frie fettsyrer inne i cella. Mitokondrienes funksjon påvirkes slik at det ved oksidering av pyruvat dannes laktat, noe som medfører et fall i intracellulær p_H , reduksjon av kontraktile funksjon og et økt ATP behov for å forsøke å gjenopprette Ca^{2+} -balansen. Summen av alle disse skadelige prosessene gjøre at cytoskjelettet etter hvert gir etter og cellen dør. Dette kalles onkotisk eller nekrotisk celledød.

2.1.1 Reperfusjonsskader

I tillegg til at cellene skades under selve ischemien vil de kunne utsettes for skade i det perfusjonen reetableres. Dette ble beskrevet allerede i 1960 av Jennings *et al.* hvor de så på reperfusjonsskader hos hundehjerter og dokumenterte at cellene endret morfologi ved at de ble større under reperfusjonen. Andre ting som ble påpekt var forstyrrelser i sarkolemma, kontraktur av myofibriller og utfelling av kalsiumfosfat-partikler inne i mitokondriene [9].

Skadene som myokard påføres under reperfusjonen kan deles inn i fire hovedgrupper. *Stunning* er en situasjon hvor myocyttene på tross av fravær av irreversibel skade og med reetablert perfusjon, fortsatt ikke gjenopptar sin normale funksjon. Varighet av stunning varierer fra individ til individ og i tid, avhengig av blant annet ischemitiden og grad av reperfusjon. Den andre typen reperfusjonsskader er *reperfusjonsarytmiene* som kan være potensielt livstruende. Vi kunne tydelig observere disse i en tidlig fase i reperfusjonen av rottehjertene. Den tredje typen kalles "*no reflow phenomenon*" og går ut på at mikrovaskulær blodstrøm møter en større motstand ved reetablert sirkulasjon. Den siste gruppen er *direkte skader* på myocyttene som fører til celledød. Celledød kan også skje ved apoptose (programmert celledød). I det siste er det blitt flere holdepunkter for at celledød ved reperfusjon kan skyldes apoptose.

Ulike mediatorer er med på å skape reperfusjonsskadene. For det første vil en reetablert sirkulasjon i myokard føre til at myocyttene utsettes for oksidativt stress, som i seg selv kan være skadelig. Dette utgjør en del av det som har blitt kalt oksygenparadokset som beror på at reoxygeneringen av ischemisk myokard generer en skade som faktisk overgår skadene til den forutgående ischেমiperioden. For det andre reduserer oksidativt stress endotelets egenskap til å produsere NO, som nevnt tidligere er en vasodilator med kardioprotektiv virkning.

Et annet paradoks som oppstår under reperfusjonen er kalsiumparadokset. Når myokard reperfunderes vil intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjonen øke raskt som følge av endringer i sarkolemmamembranen og dysfunksjon av sarkoplasmatiske retikulum induert av oksidativt stress. Den normale reguleringen av Ca^{2+} over cellemembranen faller bort og fører til at Ca^{2+} akkumuleres intracellulært og inne i mitokondriene. Dette skjer grunnet en økning i intracellulær H^+ som fører til at Na^+ går inn i cella i bytte for H^+ . $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ ioneveksler vil så bytte intracellulær Na^+ med ekstracellulær Ca^{2+} og det blir

et intracellulært Ca^{2+} overskudd. En større mengde kalsiumioner vil føre til induksjon av celledød på grunn av hyperkontraktur av myocytten og åpning av mitokondrielle permeability transition pore (MPTP). Åpning av disse porene vil føre til kollaps av mitokondriene og dermed forsvinner ATP-kilden til myocytten. Under ischemi er nemlig denne kanalen lukket og den åpnes først som respons på den raske økningen i Ca^{2+} eller ROS (reactive oxygen spesies) etter reperfusjon.

Et tredje paradoks som oppstår under reperfusjon er pH paradokset med mekanisme som nevnt over. pH vil falle under ischemien, men så snart sirkulasjonen er reetablert vil den raskt stige som følge av at laktat vaskes ut samtidig som Na-H^+ ioneveksler kommer i gang igjen. Når pH normaliseres fjernes den hemmende effekten som lav pH har hatt på energiforbruk og det kontraktile apparat. Denne korreksjonen av pH er for rask for myocytten og vil kunne føre til skader.

Inflammasjon er også regnet som en mediator av reperfusjonsskadene på grunn av tilstrømmingen av nøytrofile granulocytter til vevet. Disse vil kunne føre til at mindre kar tettes igjen ("no reflow phenomenon") samt at de vil frisette degenerative enzymer og reaktive oksygen forbindelser (ROS) [10].

2.2 Kardioproteksjon

2.2.1 Prekondisjonering

Fordi nicorandil, adenosin og isofluran alle er substanser som er i stand til å farmakologisk prekondisjonere hjertet, vil vi gå litt nærmere inn på selve fenomenet prekondisjonering.

Prekondisjonering kan oversettes med "forbehandling" og er en mekanisme som er med på å beskytte hjertemuskelcellene under perioder med ischemi. Denne prosessen kan settes i gang ved hjelp av kortere episoder med koronar okklusjon og ble først beskrevet av Murray *et al.* i 1986 [11]. De dokumenterte at lengre ischemi (40min) fører til at ATP lagrene ble brukt opp samtidig som toksiske katabolitter akkumulerte og virket negativt inn på hjertet. Murray *et al.* satte dermed i gang forsøk med fire 5-minuttersperioder med regional ischemi i hundehjarter avbrutt av 5 minutter med reperfusjon. De fant da ut at ATP konsentrasjonen i cellene sank under første ischemiperiode, men det som overrasket var at i de påfølgende episodene ble ATP i større grad bevart. Dette medførte en signifikant beskyttelse mot myokardnekrose under en påfølgende ischemisk episod av lengre varighet. Nettoeffekten var såpass stor

som 75% reduksjon av infarktstørrelse i forhold til kontrollgruppen. Murray *et al.* la med dette grunnlaget for en økt interesse innenfor kardioproteksjon og spesielt prekondisjonering.

Senere ble det også vist at prekondisjonering beskytter hjertet på andre måter, blant annet ved å beskytte mot reperfusjonsskader som stunning og ventrikulære arytmier. Det er også vist effekt på energimetabolismen, som i tidlige faser av ischemien senkes, samt en beskyttende effekt på endotelet i koronarkar. Generelt gjør prekondisjonering myocytene mer motstandsdyktige mot hypoksiske skader. For at denne effekten skal kunne avdekkes er det nødvendig med reperfusjon i etterkant av prekondisjoneringen. Det er stadig flere som mener den beskyttende effekten av prekondisjonering først kommer til uttrykk ved reperfusjonen, da i form av antiapoptotiske stimuli og redusert apoptose.

Effekten av prekondisjonering har blitt demonstrert i flere dyrestudier (kanin, rotter, mus og gris). Det finnes også bevis på at myokard i menneskehjerter kan prekondisjoneres og at den ischemiske prekondisjoneringen kan være et ledd i naturlig forekommende ischemiske syndromer. Yellon *et al.* har i kliniske forsøk vist at kortere perioder med avklemminger av aorta under by-pass kirurgi prekondisjonerer venstre ventrikkel og bevarer ATP-konsentrasjonen. Andre kliniske forsøk hvor prekondisjonering er funnet kardioprotektivt er i pasienter som har gjennomgått perkutan transluminal koronar angioplastikk. Repeterte okklusjoner, hver episode fra 60-90 sek, ved hjelp av inflasjon av ballong førte til redusert ST-elevasjon på EKG, mindre brystmerter, samt mindre produksjon av laktat. Disse fenomenene er observert uavhengig av eksistensen til kollateraler [12].

Tidsaspektet er viktig ved prekondisjonering, da det er vist at proteksjon kan induseres ved en ischemitid på 3-5 minutter etterfulgt av reperfusjon [11], mens en periode på 1-2 minutter med påfølgende reperfusjon ikke har noen beskyttende effekt. I tillegg til varigheten av den første ischemien er også reperfusjonsintervallene viktige. En 5-minutters ischemitid etterfulgt av opp til 60 minutters reperfusjon før en ny ischemiperiode gir kardioproteksjon. Dersom ischemiperioden kommer 1-4 timer etter den første, vises ingen effekt. Men påføres ny ischemi 24-96 timer etter den initiale, observeres effekten på nytt. Denne er ikke like kraftig som den første beskyttelsen, men

er av lengre varighet og har fått navnet sen-prekondisjonering eller second window of protection (SWOP), mens den første delen av effekten kalles klassisk prekondisjonering.

Varigheten av beskyttelsen ved prekondisjonering har dermed en bifasisk form. Den første perioden oppstår omtrent umiddelbart etter prekondisjoneringen har funnet sted, men dette er en ganske kortvarig effekt som forsvinner etter en til to timer. Omtrent 24 timer senere oppstår en ny beskyttende effekt som varer i 3 dager til. Det er ulik patofysiologi og sannsynligvis skiller også mekanismene de to formene for prekondisjonering. Vi starter derfor med å diskutere cellulære mekanismer innenfor den klassiske prekondisjoneringen for deretter å gå inn på SWOP.

2.2.2 Cellulære mekanismer i klassisk prekondisjonering

De eksakte mekanismene bak prekondisjonering er ennå ikke kjent. Et antall teorier har blitt nøye gjennomgått og testet. I de siste år har det blitt forsket mye på de cellulære mekanismene bak prosessen og man har avdekket nye substanser og signalveier. Det foreligger nå dokumentasjon på at flere endogene parakrine mediatorer som frisettes under perioder med ischemi, spiller en viktig rolle i prosessen og vi skal nå se nærmere på disse. Mekanismene kan videre inndeles i utløsende effekter (trigger mekanismer), mediatorer (signalveier og substrater) og til slutt ende-effektorer.

A. Trigger mekanismer

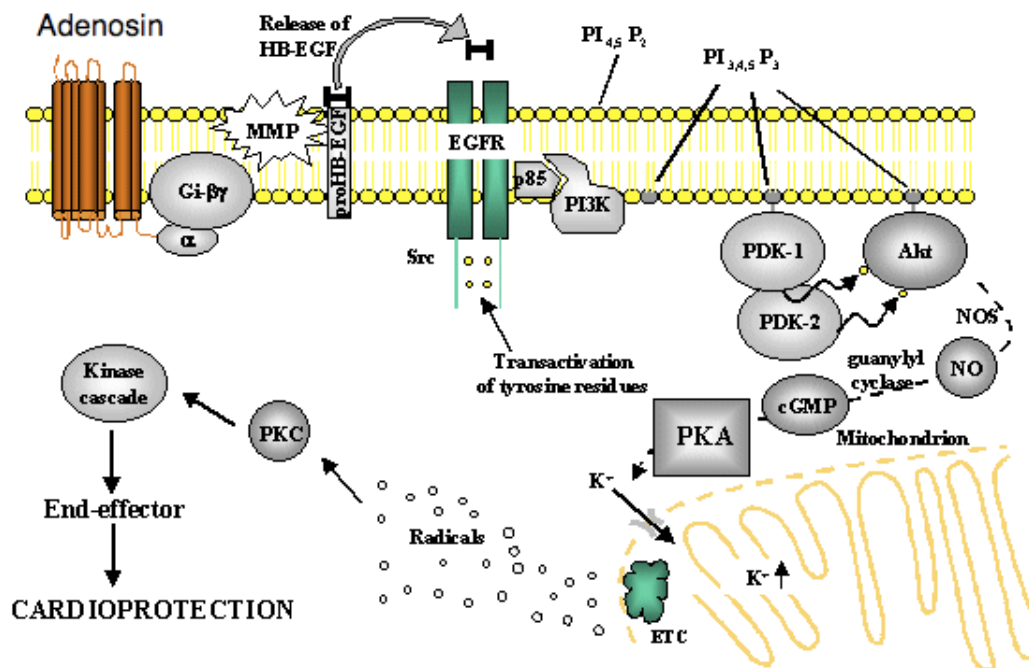
I 1991 viste Downey *et al.* [13] i studier på kanin at mekanismen bak prekondisjonering var reseptormediert og blant annet involverte adenosin. Adenosin er et nedbrytningsprodukt av ATP og dannes i høyere konsentrasjoner i ischemisk vev. De fant ut at adenosin A₁ reseptoren trigger den ischemiske prekondisjoneringen i kaninhjertet. Blokkere av denne reseptoren medførte at effekten forsvant. Kort tid etterpå dokumenterte Banerjee *et al.* en liknende situasjon med noradrenalin gjennom α -reseptorer i rottehjertet [14], men disse funnene har vist seg vanskelig å reproducere. Gross *et al.* har vist at stimulering av opioidreseptorer kan indusere kardioproteksjon [15]. Lochner *et al.* viste at β adrenerg stimulering med isoprenalin fungerer som en trigger mekanisme [16]. Nå er det generell konsensus om at enhver prosess som involverer G_i/G_q-koblede reseptorer har potensialet til å utøve en prekondisjonerende effekt og at multiple reseptorer deltar i prosessen.

Når det gjelder triggere av prosessen er flere substanser involvert og noen av disse er reseptoravhengige mekanismer mens andre er uavhengige av reseptorer. Triggere som hører til den første gruppen er adenosin, bradykinin, katekolaminer, opiater, angiotensin II og endothelin. I den siste gruppen tilhører frie oksygenradikaler, NO og kalsium. Felles for begge grupper er at de frisettes i større eller mindre grad fra ischemisk myokard og er med på å utløse prekondisjonering. NO sin rolle er noe omdiskutert. Det ser ut som NO i en tidlig fase av prekondisjoneringen er med på å senke terskelen for at effekten settes i gang, men regnes ikke som en direkte trigger av prosessen [13]. Fordi eksogen NO (ikke endogen) har blitt vist å trigge prekondisjonering i både kanin- og musehjerter hvor effekten av NO synthase (enzymet som produserer NO) er blokkert, tyder dette på at den distale signalveien som involverer NO likevel har en viktig rolle.

B. Mediatorer

1. PKC

Konsentrasjonen av adenosin øker under ischemi og vil binde til reseptorer på myocyttene. Dette vil igjen stimulere protein kinase C (PKC), et viktig effektormolekyl i prosessen. PKC er blant annet en regulator av cellens proteiner og kan slå av eller på ulike prosesser ved å fosforylere dem. Protein kinase C finnes som flere isoenzymer i hjertets celler. Ved aktivering av disse enzymene skjer det en intracellulær translokering som kan tenkes å ha betydning for den foreslåtte beskyttende effekten og PKC ϵ anses som den viktigste mediatoren. Det er nærliggende å tro at enhver prosess som stimulerer aktivering av PKC vil ha potensial til å utøve en kardioprotektiv effekt via prekondisjonering. PKC sin rolle i prekondisjonering ble først beskrevet av Ytrehus og kolleger [17] i 1994. Det ble her vist at blokkering av PKC eliminerer proteksjonen i et prekondisjonert hjerte, mens blokkering har ingen effekt i et hjerte som ikke har blitt prekondisjonert. På samme måte viste det seg at aktivering av PKC ved bruk av phorbol estere har en prekondisjonerende effekt.



Figur 2.1. Modifisert etter James Downey og Michael Cohen [18].

Etter at et ligandmolekyl (for eksempel adenosin) har bundet til en overflatereseptor på myocytten, fører dette til at G-proteiner aktiveres som i sin tur stimulerer en metalloprotease i membranen. Dette enzymet frisetter vekstfaktorer som aktiverer spesifikke reseptorer gjennom en prosess kalt transaktivering. Deretter følger en autofosforylering av reseptor tyrosin kinaser og reaksjonen eskaleres. Src tyrosin kinase og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) festes til signalleringsmolekylet, og fosfolipider i membranen metaboliseres slik at 3-fosfoinositid-avhengige kinaser aktiveres. Dette fører til at Akt, også kalt PKB, (som er en del av reperfusjon salvage kinase signalleringsvei) stimulerer NO synthase med frisetting av NO som resultat. NO aktiverer guanylyl cyclase og medfører fosforylering av protein kinase A. Mitokondrielle K^{-ATP}-kanaler åpnes og fører til frisetting av ROS som stimulerer PKC og andre tyrosin kinaser, og setter i gang en kaskadereaksjon. Åpning av tilsvarende kanaler i sarkolemma reduserer aksjonspotensialet i myocytten med redusert influx av Ca²⁺. Dersom man administrerer hemmere av de mitokondrielle kaliumkanalene (for eksempel glibenklamid [19]), slik at de ikke åpnes, avtar den kardioprotektive effekten av prekondisjonering noe som beviser at K^{-ATP}-kanalene bidrar til beskyttelsen.

2. Tyrosin kinaser og mitogenaktiverte protein kinaser(MAPK)

Ved å benytte seg av genistein, en bredspektret tyrosin kinase inhibitor viste Maulik *et al.* at effekten av prekondisjonering kunne blokkeres og foreslo derfor at minst en tyrosin kinase er med i signaleringen. Senere har det kommet fram at involveringen av tyrosin kinase kommer etter PKC i signalveien, men enkelte studier på gris og rotte hevder at de også er parallelle med PKC. Ved en mild prekondisjoneringstimulus som for eksempel en enkelt 5-minutters koronar okklusjon, vil ikke en PKC eller en tyrosin kinase blokker på egenhånd hemme prosessen. Dette tyder på at begge signalveiene må aktiveres for at effekten skal kunne utløses. Ved en kraftigere stimulus vil proteksjonen oppstå selv om man benytter en av blokkerne, noe som tyder på at begge signalveiene er beskyttende bare den initiale stimulusen er kraftig nok [20].

3. Fosfatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)

PI3-kinase har også vist seg som en mediator av prekondisjonering. Tong *et al.* var først ute med å vise at PI3-kinase hemmeren wortmannin kunne blokkere effekten av prekondisjonering [21]. De benyttet seg av kontraktile dysfunksjon som endepunkt i studiet. Dette ble senere bekreftet av MoCanu *et al.* som brukte infarktstørrelse som endepunkt [22].

C. Mitokondrielle ATP sensitive kalium-kanaler(K_{ATP} -kanaler)

Det eksisterer to subtyper av K_{ATP} -kanaler, den ene befinner seg i sarkolemma og den andre i mitokondrienes indre membran. Begge bidrar til prekondisjonering, men det kan se ut som om mitokondrielle K_{ATP} -kanaler begrenser celledød, mens sarkolemma K_{ATP} -kanaler har større betydning når det kommer til å redusere stuning [23]. Begge fungerer på samme måte, ved en ATP-sensitiv styring av ionestrømmer over membranen. Under normale forhold er disse kanalene inhibert (stengt) ved at ATP binder direkte og hindrer K^+ strøm gjennom kanalen. Denne inhiberingen opphører når ATP synker under et visst nivå (1mmol/L) og kanalen åpnes. Åpning av K_{ATP} -kanalen vil medføre at kalium strømmer inn i mitokondriene på grunn av den elektrokjemiske gradienten. En kalium/hydrogen ioneveksler i mitokondrienes indre membran tillater et bytte mellom intramitokondrielt kalium og ekstramitokondrielt H^+ . Innstrøm av H^+ frikobler i teorien mitokondriene fordi den går utenom F1 komplekset i

elektrontransportkjeden og kan eventuelt reduserer dermed ATP produksjonen dersom oksygentilgjengelighet er dårlig. Det er sannsynligvis en annen mekanismer som via åpning av K_{-ATP} kanaler bidrar kardioproteksjon. Dette er endringer av mitokondrienes volum som følge av ioneforflytninger etter K_{-ATP} åpning, lett svelling er assosiert med lett økning av ROS produksjon. Det eksisterer også andre teorier, blant annet at åpning av kanalen fører til redusert influx av Ca^{2+} gjennom L-type kalsiumkanaler samtidig som Na/Ca -ioneveksler stimuleres slik at Ca^{2+} efflux øker. Dette vil føre til en lavere intracellulær konsentrasjon av kalsium, noe som er gunstig for energiforbruket til det ischemiske myokard. Det har blitt vist av flere grupper at farmakologisk eller endogen induksjon fører til en tidligere og mer omfattende åpning av kanalene, og at dette før en påfølgende ischemiperiode er med på å redusere infarktstørrelse og celledød. De ATP-sensitive kaliumkanalene kan påvirkes ved administrering av ulike farmaka.

Glibenklamid er nevnt som en av blokkerne, men det finnes også stoffer som er med på å åpne disse kanalene, bl.a. nicorandil, pinacidil, cromakalim, sevofluran og isofluran. Det har blitt utført studier som viser at ikke-spesifikke kaliumkanal-åpnere som nicorandil og pinacidil øker kardioproteksjon når de brukes alene, men effekten er ikke tilstede dersom de koadministreres med kardioplegi [20].

D. Mulige ende-effektorer

Hva som til slutt er den utløsende årsaken til at myocyttten blir mer tolerant mot ischemi er foreløpig ikke fastslått. Det er enighet om at det sannsynligvis eksisterer flere endeeffektorer. Yellon og Downey [20] har laget en liten oversikt over mulige endeeffektorer, vi skal nevne noen av disse og begynner med den eldste teorien.

1. Metabolske effekter

Murry *et al.* foreslo at en gunstigere energibalanse i det prekondisjonerte myokard kunne være en mulig årsak til beskyttelsen [11], ved hemming av mitokondriell ATP-ase. Senere har imidlertid denne teorien blitt noe svekket da det i enkelte protokoller har blitt vist at energibalansen ikke er gunstig nok til å overvinne den primære skaden som prekondisjonering medfører.

2. Mitokondrielle K_{ATP} -kanaler

Det er slått fast at K_{ATP} kanaler spiller en viktig rolle i prosessen, men er de også den utløsende effektoren? Kanalen må åpnes under den første ischemiperioden, mens det er i første fase av reperfusjonen at endeeffektoren utøver sin effekt. Hvordan en åpning av kanalene i den initiale ischemiske episoden gjør cellen i stand til å bli mer motstandsdyktig mot en forutstående ischemisk episode, er noe uklart. En mulig teori er at åpning av mK_{ATP} -kanaler forhindrer åpning av mitokondriell transition pore under ischemi og dermed beveger vi oss over på den tredje mulige endeeffektoren.

3. Mitokondrielle permeability transition pore (mPTP)

Dette er en kanal som sitter i mitokondrienes indre membran. Ved reperfusjon åpnes denne irreversibelt og fører dermed til at membranpotensialet til mitokondriene faller bort. Uten dette potensialet kan ikke oksidativ fosforylering skje, mitokondriene får ikke produsert ATP og cellen dør.

Studier av Cromptons gruppe var de første til å vise den mulige involveringen av mPTP i forbindelse med reoksygeneringsskader i hjertet [24]. Dette var basert på at mPTP i mitokondrier i rottehjerter var sensitive for kalsium, oksidativt stress, fosfat og ADP. Disse er alle tilstede under ischemi og reperfusjon. Nyere studier viser at både farmakologisk og genetisk behandling rettet mot å hindre mPTP åpning, er i stand til å redusere infarktstørrelse med 30-50%. Ved å administrere en enkeltdose av den kjente mPTP hemmeren, Cyclosporine A, rett før primær PCI reduserte man i et klinisk forsøk infarktstørrelsen med 30-40% hos pasienter med akutt myokard infarkt [25]. Dermed er det nærliggende å tro at hemming av mPTP spiller en viktig rolle som mediator og/eller effektor av prosessen. Nøyaktig hvordan denne hemmingen skjer er uklart, men i en oversiktsartikkel fra 2009 har Yellon og kolleger fremsatt flere mulige teorier[24] hvor de gjør en inndeling etter indirekte og direkte inhibisjon. Når det gjelder det første er de innom intracellulær regulering av kalsium, oksidativt stress, ATP konsentrasjon og intracellulær regulering av pH. Videre foreslås prosesser som sannsynligvis har en direkte hemmende effekt, hvor man finner aktører som PKG, PKC, mK_{ATP} -kanaler, Akt og Erk1/2 (komponenter i RISK, se avsnitt "postkondisjonering"). Andre mulige mekanismer omfatter regulering av NO og morfologisk endring av mitokondriene.

Nøkkel punkter for mitokondrie teorien er intramitokondrielt kalsiuminnhold, mitokondriell permeabilitet transition pore, depolarisering av

mitokondriemembranen, dannelsen av ROS og til slutt endringer i frisettingen av cytokrom C. Økt frisetting av cytochrome C gir apoptose, hemming av denne prosessen ved reperfusjon vil være mekanismen for reduksjon av infarktstørrelse.

4. Na^+/H^+ ioneveksler

Xaio og Allen mente at Na/H^+ ioneveksler muligens var endoeffektoren i ischemisk prekondisjonering og at hemming av denne kan medføre at hjertet beskyttes[26]. Det har tidligere blitt vist at farmakologisk hemming av denne ioneveksleren er en av de mest potente beskytterne av det ischemiske hjertet. De fant ut at Na/H^+ ioneveksleren så ut til å blokkeres ved reperfusjon etter at rottehjerter hadde blitt prekondisjonert først. Tilsetning av en selektiv blokker av ioneveksleren, HOE 642, rett før reperfusjonen i et ikke-prekondisjonert hjerte bevarte postischemisk funksjon i nesten like stor grad som man fant ved prekondisjonering. Det viste seg samtidig at denne blokkeren ikke hadde en additiv effekt dersom den ble administrert før reperfusjonen i et prekondisjonert hjerte. Et motargument mot denne hypotesen er at PKC, som har en viktig rolle i prekondisjoneringen, aktiverer Na/K^+ ioneveksleren[27]. Bugge *et al.* viste imidlertid en additiv effekt av Na^+/H^+ blokade og prekondisjonering i en infarktmodell[28].

5. Osmotisk volumøkning

Under ischemi brytes ATP ned til AMP og to komponenter med uorganisk fosfat. Dette fører til en større intracellulær osmotisk gradient. Samtidig bryter membranpumpene sammen, noe som fører til at natrium lekker inn i cellen og fører til membransvikt og celledød. Under ischemi er det en innadrettet strøm av væske i cellen, men fordi ekstracellulærvæsken (ECV) konsentreres begrenses den osmotiske volumøkningen av cellen. Problemet oppstår under reperfusjonen, da konsentrert ekstracellulærvæske erstattes av isoton væske som strømmes inn i cellen.

Armstrong *et al.* viste at prekondisjonering gjør myocytene motstandsdyktige mot membransvikt dersom man benytter hypotone perfusjonsvæsker [29]. I ischemiske prekondisjonerte rotte- og grisehjerter begrenses intracellulær volumøkning samtidig som infarktstørrelse reduseres. Endringer i kanaler som involverer regulering av cellevolum er derfor muligens involvert i kardioproteksjonen som oppnås ved ischemisk prekondisjonering.

I tillegg til de nevnte punkter er det foreslått at en forsterkning av cytoskjelettet, økt antiapoptotisk effekt, gap junctions, frie radikaler og TNF- α alle er mulige endeeffektorer av ischemisk prekondisjonering[20].

2.2.3 Sen fase prekondisjonering (SWOP)

”Sen fase” prekondisjonering ble først beskrevet av to uavhengige grupper i 1993. Senere ble det vist at effekten av prekondisjonering i kaninhjerter strakk seg over 3 døgn, fra 24 timer etter selve prekondisjoneringen til omtrent 96 timer. Ulikt fra klassisk prekondisjonering beskytter ”sen fase” i større grad mot stunning, som er en reduksjon i kontraktilitet relatert til akutt ischemi. Denne formen for prekondisjonering har blitt vist i flere dyreforsøk, men også i forsøk med myocytter fra mennesker[30].

A. Triggere av SWOP

Denne delen av prekondisjonering kan trigges av flere stimuli som kan deles inn i farmakologiske og ikke-farmakologiske. Til den første gruppa tilhører endotoxiner, NO donorer (for eksempel nicorandil), adenosin agonister, opioid agonister og TNF α . Ikke-farmakologiske triggere omfatter varmebehandling (”heat-shock”), kortvarige perioder med rask (stimulert) hjerterefrekvens og fysisk trening.

B. Mediatorer og endeeffektorer av SWOP

Da effekten oppstår såpass sent er det nærliggende å tro at den er relatert til forandringer i proteinsyntese og gentranskripsjon. Heat shock proteiner(HSP) er en gruppe proteiner som produseres i en varmebehandlet myocytt. Noen studier har vist at økt nivå av HSP-72 i myokard er forbundet med økt motstand mot myokardskade og infarkt[31], mens andre forsøk har mislykkes i å vise det samme. NO ser ut til å spille en viktig rolle i SWOP, men selve mekanismen er ikke kjent. Videre er antioxidant enzymer, COX2 og cytokiner mulige mediatorer og/eller endeeffektorer av prosessen.

2.2.4 Remote prekondisjonering

Hittil har vi lagt vekt på den delen av prekondisjonering hvor kortere perioder med ischemi i myokard virker lokalt beskyttende. I tillegg bør det nevnes at det eksisterer en

annen form, nemlig remote prekondisjonering hvor iskemiske perioder i andre organer enn hjertet kan gi en indirekte kardioproteksjon [32].

2.2.5 Postkondisjonering

På samme måte som prekondisjonering, er postkondisjonering funnet å begrense skade på myokard etter perioder med ischemi. Postkondisjonering innebærer kortere okklusjoner av blodtilførsel under reperfusjon etter en lengre ischemisk episode.

Zhao *et al.* viste at kortere perioder med ischemi under reperfusjonen virket beskyttende på myokard. Med 30 sekunders reperfusjon avbrutt av nye 30 sekunder med ischemi fordelt på tre runder påviste de reduksjon av infarktstørrelse i hundehjarter fra 47% til 11%. Andre dyreforsøk har vist at postkondisjonering synes å være nesten like effektivt som prekondisjonering [33, 34]. Mekanismen er foreløpig lite kartlagt, men det antas at mange av mediatorene som er involvert i prekondisjonering også deltar i postkondisjonering. Blant annet reduseres oksidativt stress, intracellulær akkumulering av Ca^{2+} hindres, endotelets funksjon bedres og apoptose nedreguleres. Det antas at særlig den antiapoptotiske effekten spiller en viktig rolle ved postkondisjonering. I tillegg dempes den inflammatoriske responsen ved at tilstrømmingen av nøytrofile granulocytter reduseres. Den raske justeringen av pH som nevnt under forrige kapittel bremses også, slik at nøytral pH oppnås på en mer skånsom måte for myocytten.

Postkondisjonering aktiverer i tillegg RISK-pathway (reperfusion injury salvage kinase). Dette er en gruppe av protein kinaser som aktiveres under reperfusjonen og som er med på å hindre reperfusjonsskader blant annet ved å hindre åpning av mitokondrielle PTP kanaler [35, 36].

2.2.6 Klinisk betydning av pre- og postkondisjonering.

Når det gjelder overgang fra forskning på dyrehjarter til menneskehjarter oppstår det med en gang etiske begrensninger. På tross av disse har det blitt vist at det menneskelige myokard kan prekondisjoneres. In vitro forsøk med humane ventrikulære myocytter og atrietrabekler, samt kliniske forsøk på pasienter med forskjellige iskemiske syndromer har vist positiv effekt av prekondisjonering. Det er også utført studier på pasienter som gjennomgår akutt myokardinfarkt med påfølgende

revaskularisering som PCI og by-pass operasjoner. Disse forsøkene har demonstrert at det menneskelige myokard kan prekondisjoneres, og at prekondisjonering oppstår som en naturlig del av enkelte iskemiske syndromer (for eksempel angina pectoris).

Postkondisjonering har et større potensial når det kommer til behandling av akutte koronare tilstander fordi det er mulig å benytte seg av dette i forbindelse med reperfusjonen. De første oppløftende resultater på postkondisjonering på mennesker kom i 2006 da Yellon *et al.* utførte forsøk hvor de først kartla endotelfunksjonen i arteria brachialis ved hjelp av ultralyd [37]. Deretter fulgte en 20 minutter ishemiperiode før postkondisjonering. Tre sykluser med reperfusjon etterfulgt av ischemi i 10-30 sekunder viste at postkondisjonering hadde en beskyttende effekt på endotelcellene i forhold til vanlig reperfusjon. Dette gjaldt så lenge denne ble satt i gang i løpet av det første minuttet etter ischemi.

I tillegg har effekten av postkondisjonering blitt vist i forbindelse med primær PCI i tre randomiserte forsøk. Disse pasientene fikk utført en vellykket PCI på bakgrunn av akutt myokardinfarkt. Gruppene som mottok postkondisjonering kontra de som fikk reperfusjon alene viste oppløftende resultater. Det ble dokumentert en større tilbakegang av ST-segmentet på EKG, forbedret koronar flow [38], signifikant reduksjon i infarktstørrelse (beregnet ved utslipp av CK over 72 timer) og en markant økning i myokard blush grade (markør for myokard reperfusjon) [39]. Det ble også registrert en reduksjon av infarktstørrelse etter 6 måneder, samt forbedret EF ved 1 år [40].

Postkondisjonering har på langt nær blitt forsket like mye på som prekondisjonering. For å kunne anbefale dette til pasienter som gjennomgår primær PCI bør det foreligge mer dokumentasjon fra dyreforsøk og et større pasientmateriale fra kliniske studier. Dette for å utarbeide en optimal protokoll, og for å følge pasientene opp i etterkant for å se på langtidseffektene.

3 Medikamenter

3.1 Adenosin

Adenosin $C_{10}H_{13}N_5O_4$ er et purin nukleosid bygd opp av et adeninmolekyl. Det er en viktig bestanddel i nukleotidene adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP) og

adenosin monofosfat (AMP). Foruten dens rolle i energimetabolismen har adenosin en rekke andre funksjoner, blant annet i intracellulær signalering som cyklisk adenosin monofosfat (cAMP) og som en viktig trigger og mediator av kardioproteksjon [41]. Adenosin finnes fritt i cytosolen til alle celler, og dannes kontinuerlig både intracellulært og i ekstracellulærvæske (ECV). Intracellulær nedbrytning av ATP til adenosin er katalysert av adenosin kinase, hvor siste steg i nedbrytingen er defosforylering av AMP. Adenosin blir normalt tatt opp i cellen og frigjort til ECV via spesifikke membrantransportere. Når konsentrasjonen av adenosin er høy i ECV blir den transportert inn til cellen og fosforylert til AMP ved adenosin kinase, eller degradert til inosin av adenosin deaminase. Adenosin elimineres gjennom fosforylering i blodet og endotelceller til AMP, videre til ADP og ATP, men også gjennom deaminering til inosin (IMP). Ved hypoksi og lav pH i hjertemuskulaturen inhiberes adenosin kinase, og dermed hemmes reopptak av adenosin. Dette er én årsak til at adenosin nivået øker under perioder med ischemi og oksygenmangel [41]. Andre årsaker er en direkte lekkasje av adenosin (fra cytosol) og ATP (lagret i vesikler) til interstitiet. ATP frigjort fra cellen vil raskt defosforyleres til adenosin ekstracellulært. Det er vist eksperimentelt at infusjon av adenosin deaminase kan blokkere prekondisjonering [42]. Dette indikerer at en økning av adenosin konsentrasjon er nødvendig for prekondisjonering.

3.1.1 Adenosinreseptorer

Cellulær signalering skjer via fire forskjellige adenosin reseptorer: A1, A2A, A2B og A3. Adenosin reseptorene er G-proteinkoblede reseptorer som har adenosin som sin endogene ligand.

Reseptorene er klassifisert etter hvorvidt de stimulerer eller inhiberer adenylat cyklase. A2A og A2B reseptorene er koblet til Gs-protein. De stimulerer adenylat cyklase og en økning i cAMP. A1 og A3 er koblet til Gi/Gq -protein og inhiberer adenylat cyklase aktivitet, med reduksjon i cAMP produksjon [43]. A3 og A1 er de to reseptorene som antas å være involvert i signaleringsvei som gir kardioproteksjon ved prekondisjonering med adenosin [44]. Gq antas å være direkte koblet til fosfolipase C, mens Gi går veien via inhibering av adenyl cyclase. Selve kardioproteksjonen oppnås ved aktivering av PKC, og nedstrøms aktivering av mitokondrielle ATP -sensitive K⁺-kanaler. Åpning av ATP-følsomme K⁺-kanaler i den indre mitokondriemembranen antas som nevnt å være en av

endeeffektorene for prekondisjonering. Det fører til metabolske omstillinger som øker cellens sjanse til å overleve etter ischemi[44]. A1 virker i tillegg inhiberende på Ca^{2+} frigjøringen, og adenosin kan slik hindre ischemi-indusert Ca^{2+} -overload i hjertemuskelceller(se avsnitt 2.1.1).

Etter at adenosin binder til sin reseptor splittes Gi/Gq-proteinet til subenheter. Disse aktiverer fosfolipase C og/eller D. Fosfolipase C katalyserer hydrolyse av fosfolipider. PI4,5 (fosfatidyinositol 4,5-bifosfat) hydrolyseres til IP3 (inositol trifosfat) og DAG (diacylglycerol). Denne reaksjonen skjer raskt, og gir en kortvarig DAG produksjon. Dette antas å være mekanismen bak klassisk prekondisjonering (figur 2.1). Fosfolipase D degraderer fosfatidylcholin til cholin og fosfatsyre som metaboliseres til DAG. Dette er en langsommere reaksjon som gir langvarig produksjon av DAG, og dermed forlenget aktivering av PKC (forsinket/sen prekondisjonering) [43]. Resultatet blir aktivering og translokasjon av PKC til mitokondriemembranen. Økning i IP3 og DAG må skje via transaktivering når signalering skjer via Gi-protein. Gq-proteinet fører derimot til en direkte aktivering av fosfolipase C, som gir økning i PIP2 og DAG, som deretter aktiverer PKC. Tilførsel av DAG-analog før en ischémiepisode er vist å være like beskyttende mot infarkt som IPC, mens blokkering av PKC hindrer proteksjon [17]. Dette tyder på at signaleringsvei som involverer PKC er nødvendig for å oppnå en beskyttende effekt

1) A1 adenosin reseptor

A1 reseptoren finnes i hele kroppen. I hjertet spiller A1 reseptoren en rolle i regulering av oksygenforbruk og koronar flow. Aktivering av A1 reseptoren fører til binding av Gi/Gq -protein, inhibering av adenylat cyklase aktivitet, reduksjon i cAMP nivå og direkte aktivering av fosfolipase C. Resultatet blir en økning i IP3, PIP2, DAG og aktivering av PKC [43]. I atriene er A1 koblet til K-ACh-kanaler, og ved stimulering reduseres hjertefrekvensen og overledning av elektriske impulser. Dette skyldes økt K^{+} -efflux fra celler i atriene, sinusknuten og AV-knuten slik at disse hyperpolariseres og hjertets automatisitet reduseres. Adenosin administrert raskt intravenøst har en kardiodepressiv effekt med reduksjon i kontraksjonskraft og forbigående blokkering av impulsoverledning gjennom AV-knuten. Denne effekten medieres via A1 reseptoren.

Farmakologisk prekondisjonering med tilførsel av A1 -adenosin agonist har vist seg like beskyttende som IPC, med reduksjon i infarktstørrelse i blant annet kaninhjarter. Den infarktbegrensende effekten blir blokkert ved tilførsel av ikke-selektive adenosin antagonister [45].

2) A2A adenosin reseptor

Aktiviteten til A2A reseptoren medieres via Gs-protein og fører til en rekke responser som felles kan betegnes som antiinflammatoriske. Inflammasjon antas å bidra til celledød som inntreer senere i forløpet (6-24 timer etter ischemi) [46]. Derfor kan man i praksis se bort fra dette bidraget ved eksperimenter med kort reperfusjonstid. A2A, i likhet med A1, spiller også en rolle i reguleringen av hjertets oksygenforbruk og blodforsyning. Det er rikelig med A2A reseptorer i glatt muskulatur i blodkar. Ved stimulering av reseptoren skjer det en vasodilatasjon av koronarkar (hovedsakelig arterioler), som resulterer i økt perfusjon av myokard. Det antas at adenosin bidrar til reaktiv hyperemi, som er en forbigående økning i blodstrøm etter en relativt kort periode med ischemi. Dette skyldes at adenosin som dannes i ischemisk vev frigjøres under reperfusjonen og bidrar sammen med andre substanser (NO, K⁺, CO₂, prostaglandiner) til vasodilatasjon. Adenosin virker i tillegg hemmende på plateaggregering, mediert via denne reseptoren.

3) A2B adenosin reseptor

A2B reseptoren er ikke en trigger-reseptor, men en lavaffinitetsreseptor som utøver sin funksjon via Gs. Aktivert PKC stimulerer til binding av disse reseptorene under reperfusjonen. A2B-reseptorens interaksjoner med PKC antas å øke reseptorens affinitet for adenosin som akkumuleres under ischemi. Reseptoren anses som nødvendig i postkondisjonering da tilførsel av A2B-agonist i reperfusjon har vist seg å begrense infarktstørrelse, mens eksperimentell selektiv blokkering av A2B hindrer proteksjon ved postkondisjonering [44].

4) A3 adenosin reseptor

Dette er en reseptor med inhibitorisk effekt, via kobling til Gi/Gq. A3 reseptor aktiverer fosfolipase D direkte, som igjen aktiverer PKC [43]. Stimulering av denne reseptoren medierer forlenget kardioprotektiv effekt.

3.1.2 Terapeutisk anvendelse av adenosin

Adenosin har vist seg å være nyttig både diagnostisk og terapeutisk. Ved supraventriulær tachykardi (SVT) kan adenosin brukes til å indusere kortvarig AV-blokk for å identifisere og lokalisere aksessoriske ledningsbaner. Re-entry arytmier som involverer AV-knuten kan behandles med adenosin ved at impulsoverføringen gjennom AV-knuten inhiberes. Atrietachykardi kan også i noen tilfeller respondere på adenosin, ved at hjertefrekvensen reduseres på grunn av induksjon av midlertidig AV-blokk. Det er derimot ikke mulig stoppe atrieflimmer/flutter med adenosin, da denne arytmien ikke omfatter AV-knuten som del av sin aberrante ledningsbane. Generelt kan man si at hvis AV-knuten ikke er involvert i re-entry sirkelen så vil slike arytmier ikke la seg konvertere med adenosin. Ved bradykardi kan adenosin føre til asystoli på grunn av redusert kronotropi. Adenosin har kort halveringstid (under 10 sekunder), slik at eventuelle bivirkninger ved administrasjon vil bli kortvarige. De vanligste anvendelsesområdene for adenosin i klinisk praksis er ved behandling av paroksysmal SVT, for diagnostisk eller terapeutisk induksjon av kortvarig AV-blokk og for provokasjon av myokardischemi i forbindelse med scintigrafi eller ekko når A-EKG ikke er egnet.

3.1.3 Kardioproteksjon med fokus på adenosin

3.1.3.1 Prekondisjonering

Ved ischemi skjer det en økt frisetting av adenosin, bradyknin og NO. Adenosin frigjort av myocytter utsatt for ischemi antas å trigge ischemisk prekondisjonering (IPC).

Adenosin frigjort av ischemiske hjertemuskelceller bindes til adenosinreseptorer (A1 og A3) og trigger intracellulær signalering via Gi/Gq til aktivering av PKC. Nedstrøms

involveres ATP-sensitive K^+ -kanaler i den indre mitokondriemembranen. Det er funnet at PKC- ϵ i isolerte mitokondrier fra rotter er involvert i åpning av disse kanalene [47]. Åpning av kanalene fører til metabolske omstillinger som øker cellens sjanse til å overleve og gjør at mitokondriefunksjon under ischemi og reperfusjonen bevares bedre. Siden ATP hovedsaklig hydrolyseres i mitokondriene vil en ved å bevare mitokondrienes integritet opprettholde oksidativ fosforylering og energiproduksjon i cellen [48]. IPC ser også ut til å inhibere åpning av permeable porer i mitokondriemembranen (MPTP) under reperfusjonen. En åpning av disse porene skader mitokondriene og leder til nekrotisk celledød og apoptose [49]. Ved å unngå åpning av MPTP vil myocytterne beskyttes mot nekrose. Farmakologisk prekondisjonering med adenosin uten ischemistimuli virker kardioprotektivt på samme måte som adenosin ved IPC.

Adenosin er som nevnt ikke eneste endogene trigger av IPC. De tre autacoider frigjort av ischemisk vev; adenosin, bradykinin og opioder virker parallelt som triggere [48]. Hvis en av disse tre autacoider blokkeres behøves mer prekondisjoneringsstimuli til for å nå terskelverdi for proteksjon. Autacoidene har det til felles at de er koblet til G-proteiner, stimulerer fosfolipaser og aktiverer PKC. Forskjellen er at adenosin aktiverer PKC direkte, mens de to andre autacoider har en mer kompleks aktiveringsvei. Den involverer først åpning av $K\text{-ATP}$ -kanaler i mitokondria, K^+ -strøm inn til mitokondria, reduksjon i transmembranpotensialet og alkalisering. Dette leder til dannelse av reaktive oksygen forbindelser (ROS) [47]. ROS virker som sekundær budbringer og aktiverer PKC. Det skjer likevel også en økning i ROS produksjonen via adenosin sin signaleringsvei, men den er sannsynligvis stimulert av selve ischemien.

ROS har vist seg å være beskyttende i små mengder, da den stimulerer cellen til å initiere syntese av kardioprotektive gener som beskytter hjertet mot påfølgende ischemi. Selv om det skjer en beskjeden økning av ROS under signaleringsvei med adenosin, så er adenosin kjent for å virke antioksiderende og bekjempe frie radikaler, som i store mengder er skadelig for cellen

Adenosin ser ut til å bedre hjertets funksjon under reperfusjon også via andre mekanismer enn adenosinreseptorsignalering. Adenosin er substrat for ATP, ADP og AMP, og er viktig for å bevare ATP etter ischemi. Ved å bevare ATP hindres forstyrrelser i regulering av ATP-sensitive- K^+ -kanaler og andre ATPaser, i tillegg til at normal

metabolisme opprettholdes. Normal metabolisme gjør cellen mer rustet til å motstå de skadelige effekter av ischemi.

En annen viktig effekt av adenosin er at den hemmer Ca^{2+} akkumulering i hjertemuskelceller som følger av ischemi. Økt intracellulær Ca^{2+} er som nevnt en årsak til stuning, og forhindring av dette vil beskytte mot denne typen reperfusjonsskader (se avsnitt 2.1.1).

3.1.3.2 Postkondisjonering

En del eksperimenter har vist at det er nødvendig med adenosintrigger før den lange ischemiperioden for at adenosin tilførsel skal virke kardioprotektivt [45, 50]. Dvs den adenosinen som dannes i store mengder under ischemi er ikke i stand til å trigge kardioproteksjon. Andre studier viser at adenosin ikke trenger å være tilstede før ischemien for å oppnå proteksjon men kan erstattes av annen trigger, fordi det er vist at PKC aktivitet i begynnelsen av reperfusjonen medierer protektiv effekt [51, 52]. Adenosin kan også være viktig i reperfusjonsfasen. Overraskende nok ble det etter hvert vist at adekvat stimulering i reperfusjonsfasen kan utløse proteksjon. Fordelen med postkondisjonering er som nevnt at den er mer klinisk anvendbar da den kan brukes til å begrense infarktstørrelsen etter at koronarokklusjonen har funnet sted.

A₂B reseptoren antas å spille en større rolle i mediering av kardioprotektiv effekt i postkondisjonering enn tidligere antatt [44]. Denne lavaffinitetsreseptoren aktiveres under reperfusjonen etter at PKC er aktivert (vanligvis aktiveres adenosinreseptoren først). Etter en periode med koronarokklusjon er konsentrasjonen av adenosin i vevet mye høyere enn normalt. Denne konsentrasjonen er likevel ikke høy nok til å binde nok A₂B reseptorer som har lav affinitet for adenosin. Der fungerer PKC som en mediator ved å øke hjertets sensitivitet ovenfor adenosin, slik at reseptoren bindes i høy nok konsentrasjon for aktivering. Via A₂B reseptorsignalerer aktiveres kinasene PI3K og ERK som hindrer dannelse av MPTP [53].

Eksperimenter har vist at reseptoren må bindes i minimum 30 minutter i reperfusjon for å være effektiv, for kort reperfusjonstid kan dermed gjøre at den kardioprotektive effekten ved postkondisjonering faller bort [54]. En rekke eksperimenter med adenosin tilførsel i reperfusjonen har likevel ikke vist proteksjon i form av reduksjon i

infarktstørrelse. Det er blant annet gjort to store kliniske studier av adenosin gitt i reperfusjon på pasienter hvor det ikke var mulig å demonstrere protektiv effekt av adenosin i reperfusjonen [55, 56].

3.2 Nicorandil

Nicorandil ($C_8H_9N_3O_4$) er en K^+ -kanal åpner som virker på ATP-sensitive K^+ -kanaler i celle- og mitokondriemembranen. I strukturen er nicorandil lik nitrater og har derfor nitratlignende egenskaper i tillegg til å være en K^+ -kanal åpner. Nicorandil virker relakserende på glatt muskulatur i blodkar via en dual virkningsmekanisme.

Nicotinamidenheten virker som en åpner av de ATP-sensitive K^+ -kanalene, og fører til dilatasjon av koronare motstandskar (hovedsakelig arterioler). NO_2 -gruppen gir nicorandil dens nitrategenskaper. Ved donering av NO -gruppen skjer det en vasodilatasjon av de store koronarkarene på både venøs og arteriell side. Dilatasjonen skjer via aktivering av enzymet guanylat cyklase som fører til videre aktivering av GMP, og relaksasjon av vaskulær glatt muskulatur [57].

Forskjellige typer ATP-sensitive K^+ -kanaler er identifisert i hjertemuskelcellene, glatt muskulatur, β -cellene i pancreas, neuroner og mitokondriene. I hjertemuskelcellene finner vi dem i cellemembranen (sarkolemma) og mitokondrienes indre membran. K_{ATP} -kanalen spiller en viktig rolle ikke bare i regulering av koronarperfusjon, men også i beskyttelse av celler mot ischemi og reperfusjonsskader. Åpning av denne kanalen antas å være et viktig steg i både ischemisk og farmakologisk prekondisjonering.

I hjertemuskelceller er det intracellulær ATP som normalt lukker de ATP-sensitive K^+ -kanalene med det resultatet at cellen depolariseres. Legemidler som aktiverer K^+ -kanaler (for eksempel nicorandil), reduserer kanalens sensibilitet for dens fysiologiske inhibitor (ATP) ved å antagonisere kanalens virkning, slik at denne åpnes og K^+ -ioner strømmer ut [58]. Slik økes membranens permeabilitet for K^+ -ioner, cellemembranen hyperpolariseres og glatt muskulatur relakseres. Samme situasjon sees i hjertemuskelcellen, man får en hyperpolariseres og cellens eksitabilitet reduseres. Økning av K^+ efflux er i tillegg ledsaget av en redusert tilgjengelighet for intracellulær Ca^{2+} , og inaktivering av spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler. Nicorandil fører derfor til en reduksjon av Ca^{2+} konsentrasjon og gir en relakserende effekt.

Den andre måten nicorandil relaxerer glatt muskulatur i koronarkar er som nevnt ved å donere NO. NO stimulerer aktivering av enzymet guanylat cyklase som aktiverer cGMP, og nivået av cGMP øker intracellulært. Dette resulterer i vasodilatasjon både på arteriell og venøs side, men effekten er mer uttalt på venesiden og gir dermed redusert preload.

Eksperimenter med tilførsel av glibenclamid (K_{ATP} -kanal hemmer) har vist hemmende effekt på vasodilatasjonen. Det tyder på at både aktivering av K_{ATP} -kanalen og NO-donor komponenten begge er av betydning for den relaxerende effekten nicorandil har på glatt muskulatur. Det ser ut som cGMP bidraget til relaksasjon er doseavhengig da eksperimenter har vist at jo større dose nicorandil som tilføres, jo større del av vasodilatasjonen kan tilskrives guanylat cyklase. Dermed kan det tenkes at dose nicorandil er av betydning for hvor stor del av effekten som medieres via henholdsvis K_{ATP} -kanalen og cGMP komponenten [59]. Dosen nicorandil er også av betydning for hvilken K_{ATP} -kanal som aktiveres. Hvor lave doser (0,1 mM) aktiverer mito K_{ATP} -kanalen mens høyere doser også aktiverer kanaler i sarkolemma [59].

3.2.1 Terapeutisk anvendelse av nicorandil

Nicorandil regnes for å være en balansert koronar og perifer vasodilator, som reduserer både preload og afterload, samt øker koronar flow. Reduksjon i preload skyldes vasodilatasjon på veneside med økt venøs kapasitans. Endediastolisk volum (EDV) og trykk (EDP) reduseres som resultat av dette. Denne effekten tilegnes nitrategenskapen. Aktivering av K_{ATP} -kanaler antas å føre til dilatasjon på arteriesiden som gir redusert motstand i koronar- og systemkretsløpet med redusert afterload som resultat. Dermed reduseres arbeidsbelastningen på hjertet samtidig som koronarsirkulasjon bedres [60]. Nicorandil er derfor brukt i klinikken mot angina, da særlig ved refraktær angina som ikke har respondert på optimal behandling. Hjerterefrekvensen kan øke forbigående på grunn av reduksjon i systemisk vaskulær motstand. Dette skyldes sympatikusmediert refleks tachykardi via påvirkning av baroreseptorer. Denne effekten er av mindre betydning ved eksperimenter på isolerte rottehjerter.

Nylige kliniske studier har vist at en kombinasjon av PCI eller annen reperfusjonsterapi med infusjon av nicorandil forbedrer venstre ventrikkelfunksjon hos pasienter med akutt myokard infarkt. I tillegg gir langvarig behandling med nicorandil bedre prognose

hos høyrisiko-pasienter med angina. Disse kliniske effektene av nicorandil kan tilskrives den cytoprotektive effekten (via åpning av K_{ATP} -kanalen) og ikke NO komponenten. Kardioproteksjonen antas også å være årsaken til reduksjonen i kardiovaskulære hendelser når nicorandil blir gitt i tillegg til et spesifikk anti-angina legemiddel i anginastudier[61].

3.2.2 Nicorandil og kardioproteksjon

Ut fra en rekke eksperimenter på isolerte perfunderede dyrehjerter og isolerte mitokondrier er det blitt konkludert med at kardioproteksjonen som oppnås ved administrasjon av en mK_{ATP} -kanal åpner skyldes at ATP tapet som vanligvis skjer under ischemien reduseres [4]. Dermed er det nok energi igjen tilstede for at nødvendige cytoprotektive prosesser under reperfusjonen kan gjennomføres. Resultater som reduksjon i infarktstørrelse uten at hjertefunksjonen påvirkes, tyder på at bevart energimetabolisme er en viktig mekanisme nicorandil utøver for å gi protektiv effekt [62].

Årsaken til at åpning av mK_{ATP} -kanalen fører til en kardioprotektiv effekt er blant annet at mitokondriemembranens integritet opprettholdes fordi reguleringen av mitokondrievolumet og elektrontransporten bevares. Slik beholder mitokondria sin opprinnelige funksjon. Dette gjør at adenin nukleotider bevares bedre under ischemiperioden og transport av nødvendig energi i reperfusjonen foregår mer optimalt.

Kardioproteksjonen oppnås ved aktivering av myokardets iboende evne til å motstå ødeleggende effekter induisert av ischemi. Den cytoprotektive effekten av nicorandil tilskrives som nevnt ovenfor åpning av K_{ATP} kanalen [63, 64], hovedsakelig kanalene i mitokondria. Det er fortsatt uklart hvordan åpning av mK_{ATP} -kanaler medierer kardioproteksjon, men hemming av mito- Ca^{2+} -uniporter, redusert dannelse av frie radikaler og endringer i glykolysen kan være noen mekanismer. Aktivering av K_{ATP} -kanalen i hjertemuskelceller forkorter aksjonspotensialets varighet og dette ble antatt å være en måte cellen reduserer sitt energibehov på [65]. Det har etter hvert blitt klart at effekten på cellemembranen (sarkolemma) har liten betydning for celledød/ infarkt.

En gunstigere metabolisme gjør cellen mer motstandsdyktig ovenfor ischemi og reperfusjonsskader. Studier har vist at ekstraksjonsratio av hypoxanthin, ammonium , og

laktat (avfallsprodukter) er høyere ved nicorandil tilførsel [61]. Disse ekstraksjonsratioene er indirekte mål på cellulær energimetabolisme, og indikerer at myokardets energimetabolismen er bedre bevart ved nicorandil [66].

Det er ikke helt avklart om menneskets myokard responderer på IPC slik som vist ved dyremodeller, men en person som har gjennomgått myokardinfarkt har mindre "no-reflow" fenomen (se avsnitt 2.1.1) i etterkant dersom de har hatt angina forut for infarkt [67]. I dyremodeller har aktivering av K_{ATP} -kanaler i mitokondriene vist å redusere myokardnekrose og postischemisk dysfunksjon (reduert kontraktilitet, stunning) hvis nicorandil tilføres før ischemiepisoden. Den infarktbegrensende effekten er i noen studier vist seg å være uavhengig av hemodynamiske effekter, noe som indikerer at nicorandil har direkte effekt på myokardet. Blokkering av kanalen forverrer nekrosen og no-reflow fenomen med økning i infarktstørrelse. Noen studier viser også at ventrikkelfunksjon bevares bedre med en reduksjon i ende diastolisk volum [61].

3.3 Isofluran

Isofluran ($C_3H_2ClF_5O$) er en halogenert eter som har lav løselighet i blodet og liten grad av akkumulasjon i fettvev. Isofluran induserer raskt anestesi og elimineres raskt etter endt anestesi. Den anvendes vanligvis ikke til induksjon av søvn fordi den virker irriterende på respirasjonssystemet, og er derfor mest anvendt til å vedlikeholde anestesen.

For å indusere søvn virker isofluran ved å binde seg til GABA -reseptorer, glutamat -reseptorer og glycin- reseptorer. Den har en inhiberende effekt på ionestrømmen gjennom aktiverte K^+ -kanaler, aktiverer CaATPaser og binder enzymene ATP syntase og NADH dehydrogenase. Dette resulterer i en reduksjon i tiden hvor gap junctions er åpnet og virkningen blir en generell inhiberende effekt på sentralnervesystemet.

3.3.1 Signaleringsvei ved prekondisjonering med inhalasjonsanestesi

Farmakologisk prekondisjonering med inhalasjonsanestesi og IPC gir kardioproteksjon via felles signaleringsvei [68]. Prekondisjonering med inhalasjonsanestesi bevarer mitokondrie funksjonen, opprettholder ATP nivået og reduserer Ca^{2+} akkumuleringen. Slik opprettholdes cellulær homeostase med det resultatet at infarktstørrelse og kontraktil dysfunksjon etter reperfusjonen reduseres [41, 69, 70].

Sentralt i signaleringsveien som fører til kardioproteksjon er aktivering av G-protein koblede reseptorer, protein kinaser og K_{ATP} -kanaler i sarkolemma og mitokondriene.

Isofluran virker på adenosin A1 reseptoren, direkte på mitokondrielle K_{ATP} -kanaler (mK_{ATP}) hvor den stimulerer elektrontransportkjeden til produksjon av ROS og ved å aktivere NOS som stimulerer til dannelse av NO. Alle disse fører til slutt til aktivering av PKC og endeeffektoren for isofluran som antas å være mK_{ATP} -kanalen. ATP sensitive kanaler i sarkolemma (sK_{ATP} -kanaler) kan likevel ikke helt avskrives, det antas at den også til en viss grad medierer proteksjon induisert av inhalasjonsanestesi. Når det gjelder isofluran er det vist at den virker inhiberende eller ikke har noen effekt overhodet på sK_{ATP} -kanalene [41]. Den har derimot effekt på mK_{ATP} -kanalen. Åpning av mK_{ATP} -kanaler gir cytoproteksjon ved å redusere Ca^{2+} overload i cytosol og mitokondria og ved å bevare energiproduksjonen. Protektiv virkning av isofluran blokkeres ved tilførsel av adenosin antagonist, PKC blokker eller K_{ATP} -kanal antagonist (glibenclamid) [71, 72].

Isofluran trigger til økt ROS produksjon og ischemien i seg selv induserer frigjøring av ROS. ROS blir overført via PKC og NF- κ B til cellekjernen hvor de starter transkripsjon av kardioprotektive gener og aktivering av mK_{ATP} -kanalen. Den umiddelbare kardioprotektive effekten av inhalasjonsanestetika skyldes triggering av økt ROS produksjon som aktiverer PKC- ϵ , og denne protektive effekten blir blokkert av PKC inhibitor [73, 74]. Den forsinkede proteksjonen skyldes at denne prosessen ender med transkripsjon av protektive gener.

3.3.2 Isofluran og farmakodynamiske egenskaper

Hos hjertemuskelceller utsatt for ischemi skjer det blant annet økt Ca^{2+} opptak av mitokondria [75]. Isofluran ser ut til å hindre akkumulering av Ca^{2+} i mitokondria via en delvis depolarisering av mitokondriemembranen i rottehjerter. En økt aktivitet av mK_{ATP} -kanaler er relatert til endring i mitokondriemembranpotensialet. Det kan tyde på at mK_{ATP} aktivering leder til økt K^{+} -influx som leder til depolarisering [76]. Partiell depolarisering av mitokondriemembranen reduserer influx av Ca^{2+} , dermed unngås mitokondriell Ca^{2+} overload og de ugunstige effekter av dette. Denne frikoblingseffekten viser seg også å være tilstede etter at isofluran er fjernet [76]. Depolariseringen trigget under prekondisjonering blir altså opprettholdt etter fjernet stimuli.

Isofluran har en umiddelbar beskyttende effekt mot stuning og infarkt via klassisk prekondisjonering [70], men gir også en forsinket kardioproteksjon hos rotter. Mekanismen er sannsynligvis triggering av ROS og RNS (reaktive nitrogen forbindelser) produksjon. Inhalasjonsanestesi antas derfor å beskytte mot peri-og postoperativ myokardinfarkt som kan oppstå den første tiden etter anestesi og kirurgi [77]. Pasienter med hjerte/kar sykdom med behov for kirurgisk behandling, har stor risiko for postoperativ myokard infarkt. Risikoen er størst 48 timer postoperativt. Isofluran har derfor klinisk relevans ved å kunne gi en forsinket beskyttelse hos slike pasienter.

På dyreeksperimenter er det funnet resultater som reduksjon i infarktstørrelse og bedret postischemisk LVDP [77]. Tilførsel av isofluran før ischemi er også vist å redusere insidensen av postischemiske ventrikulære arytmier, dette særlig hos små dyr [41].

3.3.3 Betydningen av ROS og RNS

Isofluran og andre inhalasjonsanestetika er vist å interagere med elektrontransportkjeden med påfølgende økning i ROS produksjonen. En liten økning i ROS nivå har en gunstig effekt ved å stimulere til aktivering av cellens beskyttelsesmekanismer. ROS økningen trigger prekondisjonering ved å virke på PKC og mK_{ATP} -kanalen [77, 78].

Under ischemi og reperfusjon er produksjon av store mengder ROS forbundet med en økning i mitokondriell membranpotensial. Mitokondriell frikobling induisert av prekondisjonering med isofluran kan motvirke denne store oppbygningen av membranpotensialet og slik hindre altfor store mengder ROS i å dannes, da store mengder ROS er skadelig for cellen. ROS er derivert fra superoksider og da elektrontransportkjeden er en kilde til superoksider blir den dermed også en kilde til ROS. RNS (for eksempel NO) virker også som trigger av kardioproteksjonen. NO dannes av NOS (NO syntase) eller kommer fra ekstracellulære kilder NOS er også en kilde til superoksider (dermed kilde til ROS). Både ROS og NO kan aktivere PKC, som igjen virker på K_{ATP} -kanalen i mitokondria. De kan også initiere syntese av kardioprotektive gener som beskytter hjertet mot påfølgende ischemi (forsinket kardioproteksjon)[79]. Superoksid scavanger eller NOS inhibitor, sammen med isofluran prekondisjonering er vist å hindre kardioproteksjon. Dette tyder på at isofluran gir beskyttelse blant annet via aktivering av ROS og RNS (triggering av oksidativ stress). Økt superoksid produksjon etter

isofluran behandling hemmes også av en inhibitor av kompleks III i elektrontransport kjeden og av NOS inhibitor. Dette indikerer at mitokondria er kilde til isofluranindusert superoksid produksjon [77].

3.3.4 Er proteksjon med isofluran doseavhengig?

Det er blitt gjort en rekke eksperimenter som antyder at beskyttelse med isofluran er en doseavhengig effekt. En studie på in vivo hunder viste at lave doser isofluran virker ved å redusere infarkt størrelsen. Ved denne studien var dette tilfelle så lenge det var koateral sirkulasjon tilstede. Ved høyere MAC (mean alveolar concentration) var en reduksjon i infarktstørrelse tilstede uansett [41].

Et annet eksperiment på myocytter fra marsvin, hvor det ble brukt høy dose isofluran (mer en 2 MAC) var det liten effekt på mK_{ATP} -kanalen sammenlignet med andre prekondisjonerende legemidler. Dette kunne skyldes at høye doser isofluran også kan virke toksisk på oksidativ fosforylering [41].

Det kan virke som om inhalasjonsanestetika har et smalt prekondisjoneringsvindu, det vil si at dosen som gir optimal kardioproteksjon ligger i ett snevert område og avhenger også av forsøksdyret som benyttes. Ved liten eller manglende påvisning av proteksjon kan dosen inhalasjonsanestesi være årsaken. En dose-respons undersøkelse før eksperimentet vil fjerne denne usikkerhetsfaktoren.

3.3.5 Inhalasjonsanestesi gir kardioproteksjon via potensering av K_{ATP} -kanalåpning

Forbehandling med opioid agonist potenserer effekten av en K_{ATP} -kanal åpner i åpning av ATP-sensitive kanaler, med additiv kardioproteksjon som resultat. Proteksjonen er bedre når opioid agonist og inhalasjonsanestesi blir gitt i kombinasjon enn hver for seg [80].

Forbehandling med isofluran før koadministrasjon med en K_{ATP} -kanal åpner (nicorandil) er vist å gi signifikant reduksjon i infarktstørrelse. Kun tilførsel av isofluran gir en moderat kardioproteksjon i forhold til koadministrasjon [80]. Kombinasjon av opioid og isofluran gir også reduksjon i infarktstørrelse, en effekt som blokkeres av glibenclamid (K_{ATP} -kanal blokker). Dette indikerer at inhalasjonsanestesi gir kardioproteksjon via modulering av K_{ATP} -kanal aktivitet, og kombinasjon av terapi som virker på K_{ATP} -kanalen antas derfor å potensere K_{ATP} -kanal åpning og kardioproteksjon. Ved

administrasjon av K^+ -kanal åpner, isofluran og opioider hver for seg er det kun vist moderat proteksjon.

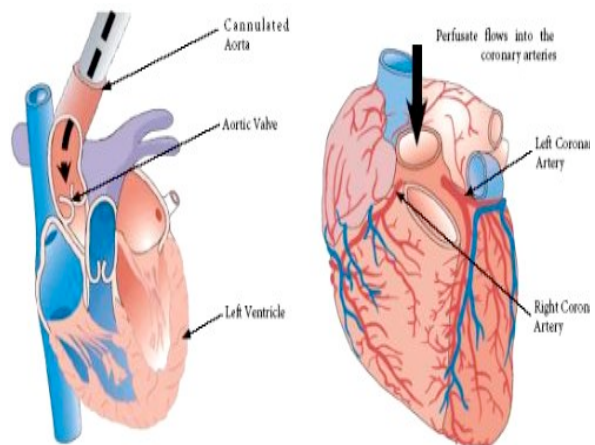
Når adenosin trigger kardioproteksjon antas åpning av mitokondria K_{ATP} -kanalen å medieres av PKC. Isofluran deler mye av virkningsmekanismen på myocytterne med adenosin, men det er usikkert om effekten av inhalasjonsanestesi (derunder isofluran) er reseptorspesifikk eller mediert via effektormolekyler. Eksperimenter har vist at aktiviteten til K^+ -kanal åpner blir forsterket ved tilførsel av adenosin eller annen aktivator av PKC. Det kan antas at isofluran modulerer K_{ATP} -kanal aktivitet via aktivering av mediatorer som PKC ved binding til G-proteinkoblede reseptorer og/eller har direkte effekt på mitokondria med dannelse av ROS. Blokkering av G-proteiner hemmer kardioproteksjon med isofluran. På bakgrunn av dette antas K_{ATP} -kanal å være både mediator og endeffektor for kardioproteksjon ved isofluran også [80].

4 Metode

4.1 Langendorff perfusjon

Metoden som vi brukte for å perfundere rottehjertene, ble først presentert av Oskar Langendorff [81] på slutten av 1800-tallet. Han utviklet et oppsett for å kunne utføre forsøk på isolerte rottehjerter. Metoden kan i prinsippet anvendes på alle typer hjerter, men de

mest brukte er rotter, mus, kanin, hamster og marsvin. Det er også blitt gjort forsøk på isolerte hjerter fra større dyr og mennesker [82], men dette er langt mindre kostnadseffektivt enn forsøk på mindre dyr. Langendorff er en utmerket modell for å studere hjertefunksjon hvor ulike intervensjoner kan utføres på forhånd in vivo, eller ex vivo under selve



Figur 4.1: Metoden innebærer kanylering av aorta. Kanylen er festet til en rigg som inneholder temperert perfusjonsvæske. Denne væsken holder et konstant trykk på mellom 60 og 100 mmHg, men man kan også administrere væsken med konstant flow ved hjelp av en pumpe. Perfusjonsvæsken går retrograd og vil dermed føre til at aortaklaffen lukkes. Videre vil perfusjonsvæsken ta veien inn i koronarostiene og forsyne myokard før den dreneres til høyre atrium gjennom sinus coronarius.

perfusjonen. Hjertet vil ved ex vivo forsøk være uten nervøs kontroll, påvirkning fra nevrohormonelle faktorer og blodbårne celler (ved perfusjon med buffer er ikke røde – og hvite blodlegemer tilstede). En annen fordel er at pumpevikt eller arytmier ikke medfører at man trenger å avbryte forsøket, noe som ville være nødvendig i in vivo forsøk.

Det er mulig å benytte seg av både regional- og global ischemi. Ved global ischemi avstenges hele tilførselen til hjertet slik at det oppstår en "no flow" situasjon. Regional ischemi utføres ved hjelp av ekstravaskulær ligatur, slik kan man påvirke hvor stort området som skal gjøres ischemisk. Våre forsøk foregår under global ischemi. Rotter er mye brukt ved slik forskning grunnet liten variasjon i anatomi mellom individene. Denne likheten kan på en annen side være en forklaring på at det ikke alltid har vært mulig å gjenskape de samme resultatene ved overgang til kliniske forsøk. Dette skyldes at variasjonene hos mennesker er langt større, og faktorer som komorbiditet, medikamenter og miljøpåvirkninger spille en større rolle. Hos mennesker gir kollateralsirkulasjon store variasjoner, dette til forskjell fra rottehjerter som ikke har kollateralsirkulasjon. Hos rotter har hver arterie sitt kapillærnettverk og arteriene har ikke grener til hverandre, de har derfor ikke evnen til å utvikle kollateraler som respons på ischemi. Rottene kan sammenlignes med et ungt menneske som får et akutt myokard infarkt og derfor heller ikke har utviklet kollateraler.

4.2 Anestesi og forberedelser

I våre forsøk ble det brukt brunrotter av begge kjønn i pilotstudien. Hovedgrunnen til at piloten ble utført var at rottene skulle avlives fordi dyreavdelingen måtte stenges. Disse rottene var krysning av Fisher rotter og *Rattus norvegicus*, de var innavlet og derfor genetisk homogene. Hunnrottene hadde en vekt på gjennomsnittlig 159 gram ($SD \pm 38g$) og hannrottene på 206 gram ($SD \pm 51g$). Etter pilotstudien ble det kun benyttet Wistar hannrotter. Deres vekt var på gjennomsnittlig 279 gram ($SD \pm 31,5g$).

Anestesi ble induisert med pentobarbital 50 mg/kg. Denne ble administrert intraperitonealt sammen med heparin 1000 IE/kg for å redusere sannsynligheten for trombedannelse i tiden fra hjertet var tatt ut til det ble reperfundert. Tilstrekkelig anestesi ble bekreftet ved fravær av cornea- og fotrefleks hos rotten.

Gruppen som fikk isofluran anestesi ble først lagt i en boks tilknyttet et anesthesiapparat (Univentor 400 Anesthesia Unit). 1 MAC for rotter av denne størrelsen

ligger på rundt 1,5% for isofluran [83]. Innledningsdosen ble satt til 4% med en air-flow på 700ml/min. Disse innstillingene ble stående til dyret hadde sovnet inn, deretter ble det tatt ut av boksen og lagt på en maske. Vedlikeholdsdosen var på 2,5% med en air-flow på rundt 450ml/min og ble tilført i 30 minutter. Etter 30 minutter på isofluran fikk også denne gruppen pentobarbital i tilsvarende dose som de andre gruppene, slik at forutsetningene mellom gruppene skulle være så lik som mulig.

Når tilstrekkelig anestesi var oppnådd ble dyret veid, lagt på en plate og thorakotomert. Hjertet fjernes fra dyret og legges i en kald buffer (4°C) for å hindre ischemisk skade før perfusjonen reetableres. Bufferen er identisk med den som brukes til å perfundere hjertene og består av (mM): NaCl 118.5, NaHCO₃ 25.0, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glukose 11.0 og CaCl₂ 2,5. Den ble utviklet av Kreps og Henseleit [84] på 1930-tallet og har i etterkant blitt noe tilpasset slik at ionesammensetningen i størst mulig grad skal tilsvare interstitiell væske. Løsningen inneholder både kalsium og fosfationer som gir økt risiko for utfelling av kalsiumfosfat partikler. Dette er ugunstig da det vil kunne okkludere koronarkarene. Derfor blir ny filtrert buffer (filterstørrelse 5 mikrom) laget foran hvert forsøk og kalsiumkomponenten er den siste som tilsettes løsningen. pH i bufferen ligger på 7,4 ved 37 C. Denne pH verdien oppnås ved gassing med 5% CO₂ i 95% O₂, og gjøres før kalsium tilsettes.

4.3 Perfusjon

Rett før hjertet blir kanylert, kjøres det perfusjonsvæske gjennom systemet for å forhindre eventuelle luftembolier i å finne veien inn i koronarårene. Ved hjelp av to pinsetter henges hjertet opp ved å tre aorta over perfusjonskanylen og fiksere denne midlertidig med en klemme. Hvis hjertet tres for langt opp, kan kanylen okkludere for koronarostiene eller skade aortaklaffen. Straks hjertet er hengt opp åpnes det opp for perfusjonsvæsken slik at hjertet får reetablert sin sirkulasjon. En suturtråd brukes tilslutt til å feste aorta godt til kanylen og overflødig bindevev, samt rester fra lungene fjernes.

For å kunne gjøre målinger av den kontraktile funksjonen til hjertet brukes en latexballong forbundet til en trykkmåler. Venstre aurikkel fjernes. En deflatert latexballong føres ned i venstre ventrikkel via venstre atrium og mitralklaffen for så å inflateres med vann til trykket er mellom 0 og 10 mmHg. Temperaturproben plasseres i truncus pulmonalis.

Da lungearterene er fjernet vil perfusjonsvæsken renne ned i høyre ventrikkel fra sinus coronarius og forlate høyre ventrikkel via truncus pulmonalis, for så å renne ned langs overflaten av hjertet mot apex. Fra apex drypper perfusjonsvæsken av hjertet, disse dråpene samles opp i en målesylinder og utgjør koronar flow. Noe av den koronare sirkulasjonen vil dreneres direkte til venstre ventrikkel via thesebian veins, denne drenasjen kan bli forstyrret dersom ballongen ikke står i vegg, og slik etterlater seg en spalte hvor væsken kan samles opp. Det kan bli nødvendig å legge et snitt i truncus pulmonalis for å gi utløp for flow hvis hjertet er rotert slik at truncus okkluderes.

4.4 Dataregistrering og infarktanalyse

Vi har foretatt dataregistrering hvert 5. minutt av trykk (systolisk, diastolisk og venstre ventrikkel utviklede trykk, LVDP) temperatur og koronar flow. Hjertefrekvens og data på hjerterytmene er ikke presentert, dataene finnes i innsamlede filer men de må analyseres.

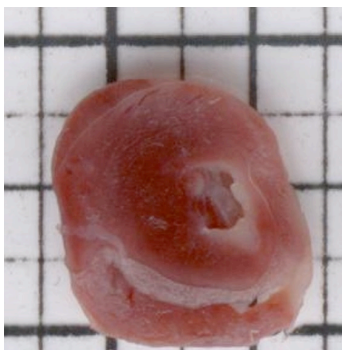
Trykkmålingene ble registrert og analysert av programmer laget av Knut Steines ved medisinsk fysiologisk avdeling (programmeringsverktøy: lab view). Programmet PhysAcq ble brukt under registrering av data og PhysAna for analysering av målingene. Koronar flow ble målt manuelt. For å måle infarktstørrelse anvendte vi farging med 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC). Denne teknikken bygger på at enzymer i det aktuelle vevet (i dette tilfellet myokard) reagerer med salter i tetrazolium og det dannes en pigmentering som er synlig for det blotte øyet [85]. Fremgangsmåten var som følger: Etter endt forsøk ble hjertet dekantert, veid og pakket inn i aluminiumsfolie for konservering i fryseren i ca ett døgn. Deretter ble det frosne hjertet snittet opp i skiver på ca 2 millimeter fra apex opp mot basis. Dette utgjorde i de fleste tilfeller rundt 5 til 6 skiver per hjerte. Skivene ble så lagt i et begerglass med en 50 ml bufferløsning som inneholdt 1g TTC per dl bikarbonatbuffer (pH =7,4). Hjertebitene ble inkubert i 20 minutter i denne løsningen med 37 grader under omrøring med magnetrører. Deretter ble bitene fiksert på formalin i minimum ett døgn. Formalinfikseringen er med på å øke kontrasten mellom friskt og nekrotisk vev og forenkler infarktanalysen. Vitalt vev farges dyp rødt, mens infarkt områder får en blek/hvit farge.

Etter fiksering på formalin ble hjertebitene skannet inn i Corel Photo Paint. Med dette programmet ble bildene av hver bit forstørret opp til 200% før et omriss ble

tegnet. Dette omrisset ble så forminsket med 40% og konvertert fra jpg. til bmp. fil slik at vi kunne bruke et analyseprogram (Planimetry) for å beregne infarktstørrelsen. Programmet benytter seg av forhåndsdefinerte innstillinger for beregninger av den totale infarktstørrelsen. Gitt skivenes tykkelse samt areal av friskt og dødt vev kan det totale infarktvolumet regnes ut. Omrisset av de skannede hjertebitene kopieres inn i programmet og det gis en fargekode til friskt og dødt vev (henholdsvis grønn og rød). Da har programmet de verdiene som trengs for å utføre en beregning av infarktvolum i prosent av friskt vev.



Figur 4.2. Her har vi tegnet av omrisset av 6 tversnitt av et hjerte fra apex til basis. Deretter har vi lagt på farger tilsvarende friskt(grønt) og infarsert(rød) vev. Hvit farge tilsvarer lumen. Ved å forstørre opp hjertene blir avtegningen mer nøyaktig. Ved hjelp av et program analyseres pikslene og gir deretter en verdi for hjertets friske og infarserte volum.



Figur 4.3

Forstørrelse av et enkelt tversnitt. Friskt myokard har en dypere rød farge mens infarsert område får en lys/blek farge.

5 Protokoller

De eksperimentelle forsøkene var i regi av avdeling for medisinsk fysiologi og kirurgisk avdeling på UiT, og fordelte seg over en periode på ett år. Forsøkene ble utført i tre perioder; sommer 2007, høst 2007 og sommer 2008. Det ble brukt i alt 94 dyr fordelt på følgende protokoller:

Pilotstudien: Farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin.

Utført på brunrotter av begge kjønn. Det ble gjort totalt 28 forsøk. Stabiliseringstiden var 25 minutter, med målinger hvert 5 minutt fra og med 15 minutter. Etterfulgt deretter av 30 minutter global ischemi, og 30 minutter reperfusjon med måling fra og med det 55 minuttet.

Nicorandil og adenosin ble gitt de første 10 minuttene i reperfusjonen. Total varighet på protokollen var 85 minutter.

Gruppe/tidsintervall	25 minutter	30 minutter	30 minutter	
Kontroll(n=8*6)	Stabilisering	Global ischemi	Reperfusjon	
nicorandil, adenosin(n=7*7)	Stabilisering	Global ishcemi	N+A	Reperfusjon

Disse forsøkene ble brukt til å bli kjent med prosedyren og for å lære oss teknikken i å henge opp hjertene, samt avdekke eventuelle forskjeller mellom kjønnene. Rottene som ble brukt denne perioden var av noe mindre størrelse enn de som ble brukt senere.

Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin.

Denne studien ble utført på Wistar hannrotter. Det ble gjort 41 forsøk i denne perioden med 35 minutter stabilisering, med målinger fra 15 minutter. Ved prekondisjonering ble medikamenter gitt de siste 10 minuttene i stabiliseringen, rett før 35 minutter med ischemi. Deretter fulgte 30 minutter reperfusjon, med målinger fra 70 minutter. Total varighet på denne protokollen var 100 minutter.

Gruppe/tidsintervall	35 minutter		35 minutter	30 minutter
Kontroll(n=12)	Stabilisering		Global ischemi	Reperfusjon
nicorandil, adenosin(n=9)	Stabilisering	N+A	Global ishcemi	Reperfusjon
nicorandil(n=8)	Stabilisering	N	Global ischemi	Reperfusjon
adenosin(n=8)	Stabilisering	A	Global ischemi	Reperfusjon
nicorandil, adenosin(n=4)	Stabilisering		Global ischemi	N+A Reperfusjon

Farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin.

Ved postkondisjonering (4 rotter), ble medikamenter gitt de første 10 minuttene i reperfusjonen. Total varighet på denne protokollen var også 100 minutter.

Farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin.

Det ble utført totalt 25 forsøk og protokollen besto av 10 minutter stabilisering, hvor det ble gitt medikamenter i disse 10 minuttene. Deretter fulgte 45 minutter global ischemi og 35 minutter reperfusjon med måling fra det 55 minutt. Total varighet var 90 minutter.

Gruppe/Tidsintervall	10 minutter	45 minutter	35 minutter
<i>Kontrol(n=6)</i>	Stabilisering	Global ischemi	Reperfusjon
<i>nicorandil, isofluran, adenosin(n=6)</i>	N+I+A	Global ischemi	Reperfusjon
<i>nicorandil (n=6)</i>	N	Global ischemi	Reperfusjon
<i>isofluran(n=7)</i>	I	Global ischemi	Reperfusjon

Nicorandil og adenosin ble tilsatt i bufferen, mens isofluran ble administrert på forhånd som beskrevet tidligere. Mengde medikament tilført 1 liter buffer var : Nicorandil 0,02 gram og for adenosin 0,32 gram. Dette utgjorde en konsentrasjon i bufferen på henholdsvis 0,1mmol/l nicorandil og 1,2 mmol/l adenosin.

5.1 Protokoll varighet

For å oppnå tilstrekkelig med infarktforandringer på kontrollene måtte vi øke ischemitiden fra 35 minutter i protokollen der vi testet farmakologisk prekondisjonering med adenosin og nicorandil, til 45 minutter i neste protokoll der vi også kombinerte med isofluran. Dette fordi vi hadde hentet ut en nesten maksimal effekt med nicorandil og adenosin på 35 minutter ischemitid. For å se på eventuelle additive effekter av isofluran, måtte derfor ischemitiden økes noe og stabiliseringstiden ble kortet ned.

6 Resultater

I den statistiske analysen av resultatene ser vi på de tre eksperimentelle protokollene hver for seg da det ble gjort endringer i reperfusjonsvarighet ved overgang mellom

protokoller. Dette gjør at en direkte sammenligning mellom de ulike protokollene ikke er mulig. I tillegg ble de gjennomført i forskjellig tidsrom og med dyr av forskjellig stammer.

For trykk og flow analyserer vi data for hvert måletidspunkt for seg. Nullhypotesen (H0) er likhet mellom medikamenter og kontroller, mens den alternative hypotesen (H1) er at det er forskjell mellom medikamentgruppene og kontrollene. På bakgrunn av dette ble tosidig t-test valgt for å utføre analysen. For hvert tidspunkt stilles det altså like mange nullhypoteser som antall medikamentgrupper. Siden vi kun har en kontrollgruppe per eksperimentell periode, må vi gjøre en Bonferroni korreksjon som korrigerer for dette i de protokollene hvor det er flere medikamentgrupper. Ved bruk av Bonferroni innebærer det at p-verdiene som beregnes via en tosidig t-test må multipliseres med antall medikamentgrupper i protokollen. Bonferronis metode er designet for å være helt sikker på å ikke ta med signifikante verdier dersom de ikke er signifikant, men har ulempen at den er relativt streng når det gjelder å påvise signifikante forskjeller. Vi har i denne studien satt grensen for signifikante funn til p-verdier som er $< 0,05$ nivå. For systolisk trykk, LVDP og flow ser vi på den relative endringen i forhold til stabiliseringsfasen. For diastolisk trykk ga dette midlertidig veldig høye verdier, og derfor er den absolutte endringen i forhold til stabiliseringsfasen mer egnet.

Protokoll 1: Pilotstudien					
		Hannrotter		Hunnrotter	
		kontroll (n = 8)	nic.+aden. (n = 7)	kontroll (n = 6)	nic.+aden. (n = 7)
	Kroppsvekt (g)	228 ± 61	182 ± 26	149 ± 41	164 ± 43
	Hjertevekt (g)	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2
	Temp. stab.fase (°C)	37.2 ± 0.5	36.6 ± 0.6	36.1 ± 1.1	37.2 ± 0.3
	Temp. glob. isch. (°C)	31.2 ± 1.2	33.1 ± 1.4	33.3 ± 2.4	32.2 ± 0.9
	Temp. reperf. (°C)	36.5 ± 0.8	36.7 ± 1.2	36.0 ± 1.0	36.7 ± 0.5
	Infarkt vol (%)	1.6 ± 1.9	2.9 ± 1.5	1.3 ± 0.7	3.6 ± 2.8
Stabiliserings- perioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	129 ± 38	93 ± 21	99 ± 24	96 ± 25
	Diast. (mmHg)	6 ± 5	8 ± 7	4 ± 3	4 ± 3
	LVDP (mmHg)	123 ± 40	85 ± 24	95 ± 23	93 ± 25
	Flow (ml/min)	12 ± 3	7 ± 2	7 ± 2	8 ± 3
Periode med medikament- tilførsel (pre- eller post)	Syst. (mmHg)	97 ± 36	93 ± 22	94 ± 21	88 ± 29
	Diast. (mmHg)	38 ± 22	46 ± 20	31 ± 11	43 ± 16
	LVDP (mmHg)	58 ± 41	46 ± 34	62 ± 27	44 ± 37
	Flow (ml/min)	10 ± 4	6 ± 2	5 ± 2	5 ± 2
Reperfusjons- perioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	102 ± 31	81 ± 13	86 ± 23	82 ± 23
	Diast. (mmHg)	28 ± 17	36 ± 22	21 ± 9	22 ± 15
	LVDP (mmHg)	74 ± 46	45 ± 30	65 ± 29	60 ± 27
	Flow (ml/min)	9 ± 3	5 ± 3	5 ± 1	6 ± 3

Tabell 6.1: Viser en oversikt for resultatene i pilotstudien. Resultatene er angitt som gjennomsnittsverdier og usikkerhetsintervall som strekker seg ett standardavvik i hver retning.

Tabell 6.2

Viser en oversikt for resultatene i studien: Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin. Resultatene er angitt som gjennomsnittsverdier og usikkerhetsintervall som strekker seg ett standardavvik i hver retning.

<i>Protokoll 2: Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin</i>					
		Prekondisjonering			
		kontr. (n=12)	nic. (n = 8)	aden. (n = 8)	nic. + aden. (n = 9)
	Kroppsvekt (g)	260 ± 12	272 ± 20	269 ± 12	275 ± 24
	Hjertevekt (g)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	Temp. stab.fase (°C)	37.2 ± 0.2	37.3 ± 0.2	37.6 ± 0.5	37.6 ± 0.4
	Temp. glob. isch. (°C)	37.0 ± 0.4	36.7 ± 0.2	37.0 ± 0.2	36.9 ± 0.3
	Temp. reperf. (°C)	36.8 ± 0.5	36.9 ± 0.5	36.0 ± 0.5	36.7 ± 0.6
	Infarkt vol (%)	24.1 ± 7.7	14.3 ± 6.1	10.5 ± 8.1	7.4 ± 5.0
Stabiliseringsperioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	116 ± 25	116 ± 39	116 ± 25	123 ± 38
	Diast. (mmHg)	8 ± 7	7 ± 2	5 ± 2	5 ± 4
	LVDP (mmHg)	106 ± 19	108 ± 32	110 ± 26	118 ± 28
	Flow (ml/min)	11 ± 2	11 ± 2	12 ± 2	12 ± 2
Periode med medikamenttilførsel (pre- eller post)	Syst. (mmHg)	108 ± 30	135 ± 31	131 ± 120	100 ± 107
	Diast. (mmHg)	8 ± 3	5 ± 2	7 ± 3	9 ± 5
	LVDP (mmHg)	98 ± 29	129 ± 30	124 ± 122	92 ± 110
	Flow (ml/min)	11 ± 3	16 ± 2	14 ± 3	13 ± 4
Reperfusjonsperioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	106 ± 22	98 ± 22	103 ± 25	95 ± 20
	Diast. (mmHg)	80 ± 26	64 ± 21	60 ± 17	69 ± 23
	LVDP (mmHg)	26 ± 23	33 ± 27	43 ± 27	25 ± 23
	Flow (ml/min)	6 ± 1	9 ± 3	7 ± 2	6 ± 3

Tabell 6.3

Viser en oversikt for resultatene i studien: Farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin. Resultatene er angitt som gjennomsnittsverdier og usikkerhetsintervall som strekker seg ett standardavvik i hver retning.

<i>Protokoll 2: Liten gruppe farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin</i>			
		Postkondisjonering	
		kontroll (n = 12)	nic.+aden. (n = 4)
	Kroppsvekt (g)	-	247 ± 10
	Hjertevekt (g)	-	0.8 ± 0.1
	Temp. stab.fase (°C)	-	37.3 ± 0.4
	Temp. glob. isch. (°C)	-	36.9 ± 0.6
	Temp. reperf. (°C)	-	37.1 ± 0.8
	Infarkt vol (%)	-	10.1 ± 4.0
Stabiliseringsperioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	112 ± 28	114 ± 33
	Diast. (mmHg)	8 ± 5	3 ± 2
	LVDP (mmHg)	101 ± 26	111 ± 34
	Flow (ml/min)	11 ± 3	13 ± 2
Periode med medikamenttilførsel (postkondisjonering)	Syst. (mmHg)	102 ± 26	101 ± 17
	Diast. (mmHg)	85 ± 31	72 ± 28
	LVDP (mmHg)	17 ± 24	29 ± 27
	Flow (ml/min)	6 ± 1	7 ± 2
Reperfusjonsperioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	109 ± 19	107 ± 16
	Diast. (mmHg)	76 ± 21	75 ± 16
	LVDP (mmHg)	30 ± 21	32 ± 24
	Flow (ml/min)	6 ± 1	9 ± 2

<i>Protokoll 3: Farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin</i>					
		kontroll (n=6)	Iso.+nic.+aden. (n=6)	Iso. (n=7)	nic. (n=6)
	Kroppsvekt (g)	285 ± 41	305 ± 13	337 ± 22	280 ± 35
	Hjertevekt (g)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	Temp. stab.fase (°C)	37.1 ± 0.5	36.8 ± 0.8	37.5 ± 0.5	36.8 ± 0.4
	Temp. glob. isch. (°C)	37.0 ± 0.5	36.4 ± 0.3	36.5 ± 0.3	36.8 ± 0.1
	Temp. reperf. (°C)	35.8 ± 0.6	36.5 ± 0.7	36.5 ± 0.9	36.7 ± 0.3
	Infarkt vol (%)	31.2 ± 11	8.8 ± 3.2	21.2 ± 3.5	19.2 ± 5.4
Stabiliserings- perioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	-	-	-	-
	Diast. (mmHg)	-	-	-	-
	LVDP (mmHg)	-	-	-	-
	Flow (ml/min)	-	-	-	-
Periode med medikament- tilførsel (pre- kondisjonering)	Syst. (mmHg)	117 ± 20	144 ± 60	103 ± 38	126 ± 21
	Diast. (mmHg)	6 ± 3	6 ± 3	5 ± 2	5 ± 2
	LVDP (mmHg)	112 ± 19	138 ± 59	98 ± 39	122 ± 21
	Flow (ml/min)	15 ± 2	17 ± 4	12 ± 5	17 ± 2
Reperfusjons- perioden uten tilførsel av medikament	Syst. (mmHg)	99 ± 23	85 ± 21	105 ± 23	107 ± 26
	Diast. (mmHg)	95 ± 25	61 ± 19	89 ± 21	97 ± 21
	LVDP (mmHg)	5 ± 12	24 ± 19	16 ± 23	10 ± 20
	Flow (ml/min)	4 ± 2	7 ± 3	5 ± 2	6 ± 2

Tabell 6.4:

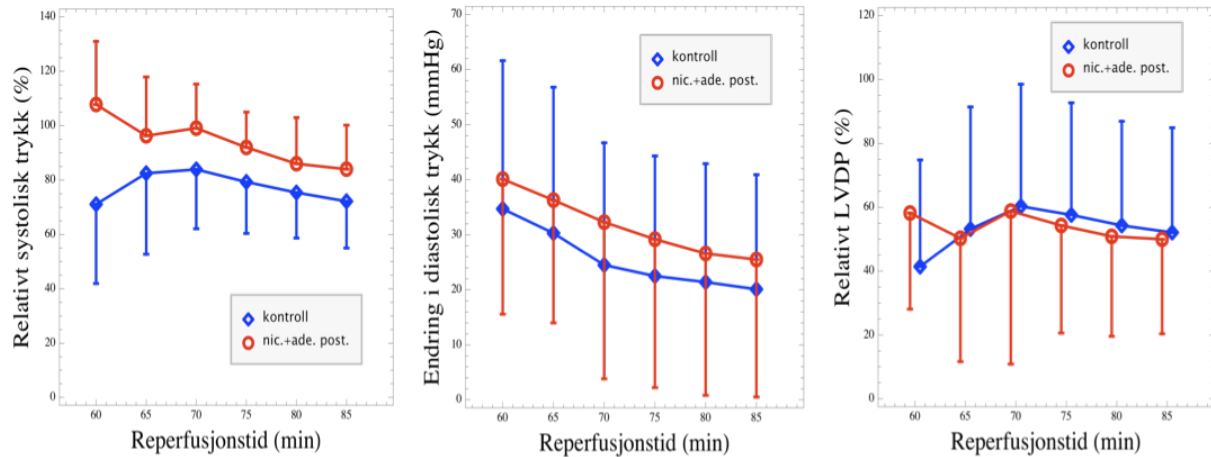
Viser en oversikt for resultatene i studien: Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil, adenosin og isofluran. Resultatene er angitt som gjennomsnittsverdier og usikkerhetsintervall som strekker seg ett standardavvik i hver retning.

6.1 Trykk

Pilotstudien: Postkondisjonering med nicorandil og adenosin.

I dette pilotprosjektet ble eksperimentene utført på brunrotter, og begge kjønn var inkludert i studien. Det var kun en behandlingsgruppe, hvor nicorandil og adenosin ble administrert sammen i de første minuttene av reperfusjonen.

Hannrottene



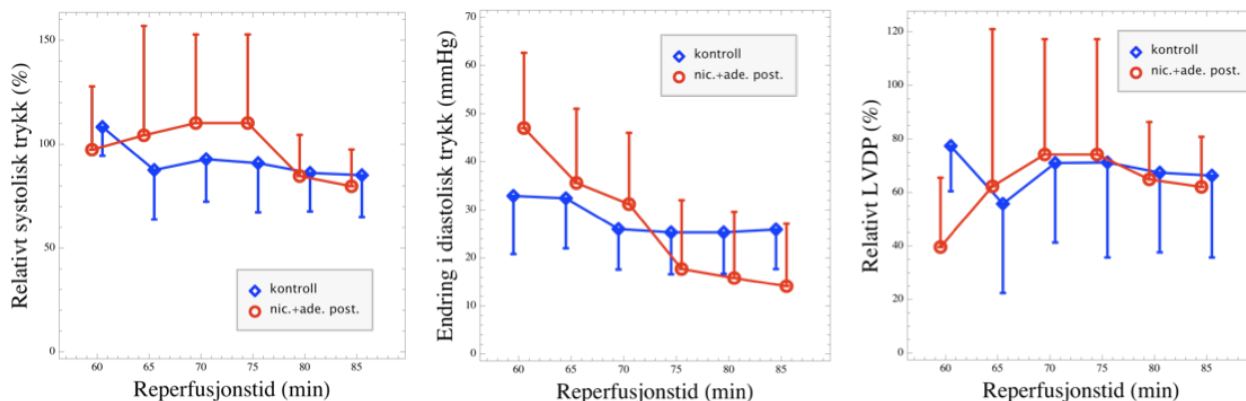
Figur 6.1: Hannrotter. Viser utviklingen av relativt systolisk trykk gjennom reperfusjonen.

For hannrotter er det en tendens at relativ systolisk trykk for gruppen nicorandil- og adenosin postkondisjonering er høyere enn for kontrollene gjennom hele reperfusjonen. Det systoliske trykket etter 60 minutter reperfusjon skiller seg fra de påfølgende målingene. Isolert T- test med sammenligning av medikamentgruppen mot kontrollgruppen ved 60 minutter gir en p-verdi på 0,02. Dermed er systolisk trykk signifikant bedre for medikamentgruppen i forhold til kontrollene ved dette måletidspunktet.

Når det gjelder diastolisk trykk er det størst endring i trykk for medikamentgruppen, som gjennom hele reperfusjonen har en endring som ligger høyere enn kontrollenes. Dette er ikke en signifikant forskjell.

Det er helleringen påvisbar signifikant forskjell i LVDP mellom medikamentgruppen og kontrollene, og det er vanskelig å si noe om mulige forskjeller da de ligger meget nært hverandre i reperfusjonen. Det ser likevel ut som om trenden er at LVDP % flater ut mot slutten av reperfusjonen for medikamentgruppen.

Hunnrottene



Figur 6.2: Viser utviklingen av relativt trykk gjennom reperfusjonen

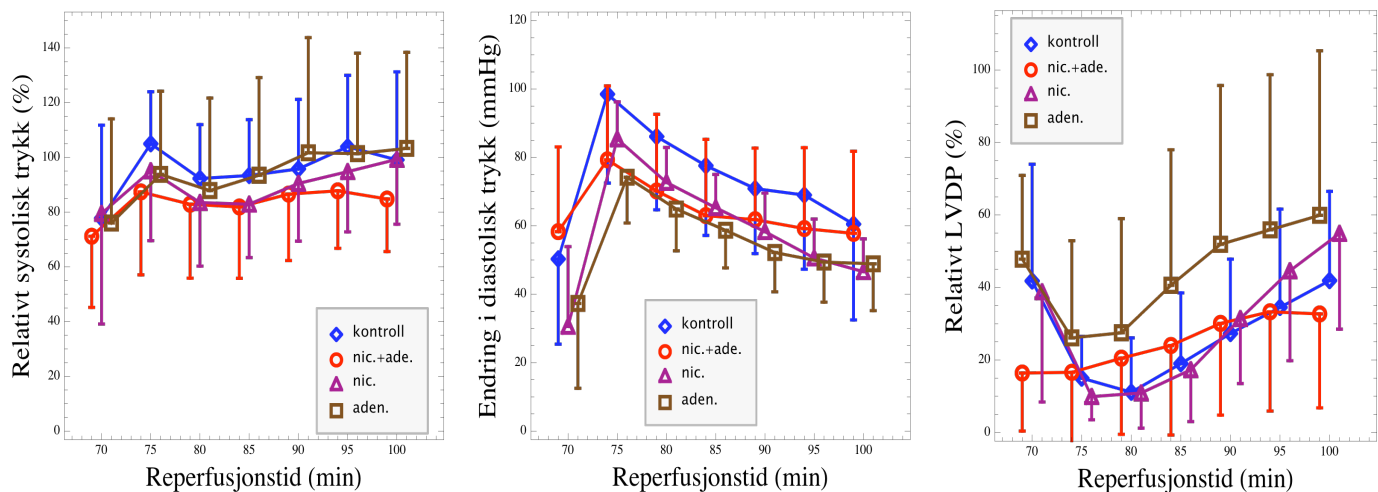
Relativt systolisk trykk er høyere for nicorandil- og adenosingruppen fra 65 minutter til 75 minutter i reperfusjonen, men denne forskjellen er ikke signifikant på 0,05 nivå.

Nicorandil- og adenosingruppen hos hunnrottene har et høyere diastolisk trykk de første 15 minuttene i reperfusjonen sammenlignet med hunnkontrollene. Det ser likevel ut til at diastolisk trykk faller fra midten av reperfusjonen og holder seg lavere enn kontrollenes trykk resten av reperfusjonen, noe som tyder på at medikamentgruppen har et større fall i Ca overload enn kontrollene.

Når det gjelder LVDP for hunnrotter er det ved 60 minutter funnet at dette er signifikant bedre på 0,01 nivå for kontrollene sammenlignet med medikamentgruppen. Denne forskjellen er vanskelig å si noe om utover i reperfusjonen, da medikamentgruppen og kontrollgruppen ligger samlet. I tillegg ses det en økning i LVDP fra 60 til 70 minutter, som viser at trykket bedres. Derfor kan vi egentlig ikke konkludere med at kontrollene har bedre LVDP hvis vi ser på hele reperfusjonen samlet.

Farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin

I denne perioden og neste ble forsøkene utført på Wistar hannrotter. Den eksperimentelle protokollen ble endret fra postkondisjonering til hovedsakelig prekondisjonering. I tillegg ble både stabiliserings- og ischemitiden begge økt til 35 minutter. Totalt var det fire behandlingsgrupper, hvorav tre var prekondisjonering i de siste 10 minuttene av stabiliseringsfasen. I den ene gruppe ble det gitt nicorandil og adenosin sammen, og i de to andre gruppene ble nicorandil og adenosin gitt hver for seg.



Figur 6.3: Linjediagram som viser utvikling av relativt systolisk trykk gjennom reperfusjonen

Systolisk trykk

Det ble ikke påvist noen signifikant forskjell i systolisk trykk mellom hver medikamentgruppe sett i forhold til kontrollgruppen. I starten av reperfusjonen ser man at det systoliske trykket for de fire gruppene ligger ca. 10-30% lavere enn trykket i stabiliseringsfasen. Videre er den generelle trenden for alle gruppene at det systoliske trykket har en topp 5 minutter etter åpning av buffertilførselen som kan antas å skyldes en reaktiv hyperemi, for så å falle igjen. Deretter øker det systoliske trykket gradvis mot slutten av reperfusjonen, til et nivå som er høyere enn i starten av reperfusjonen.

Diastolisk trykk

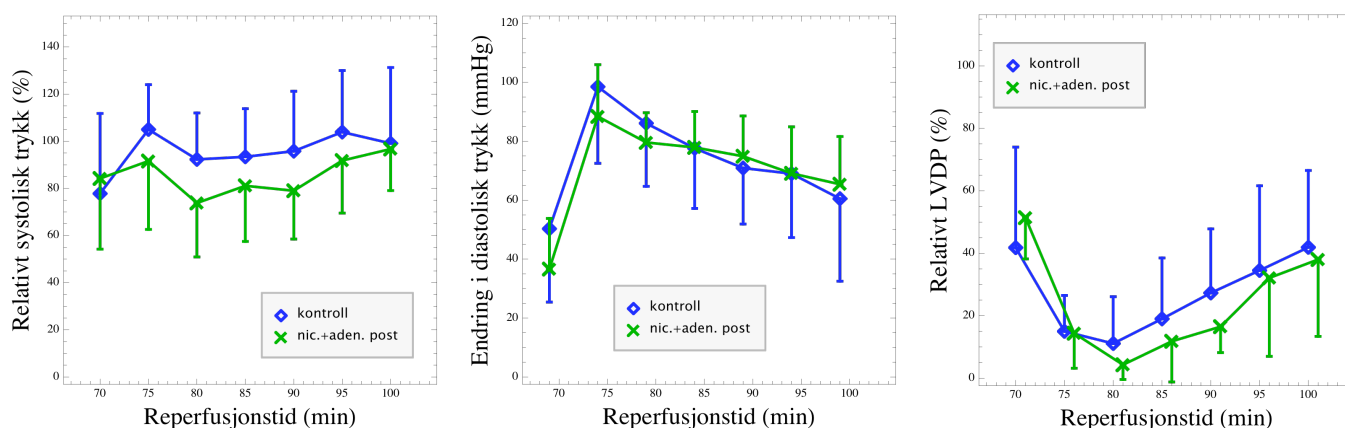
For diastolisk trykk så skjer det en rask økning opp mot 75 minutter for alle gruppene, høyest hos kontrollene. Deretter faller det diastoliske trykket gradvis utover i reperfusjonen. Endring i diastolisk trykk ser ut til å være større for kontrollgruppen enn medikamenter, men det ser ikke ut til å være noen signifikant forskjell.

LVDP

Fra grafen observeres en reduksjon i LVDP i forhold til stabiliseringsverdien hos alle gruppene. Adenosingruppen er den med minst fall i LVDP. Når reperfusjonen kommer i gang faller LVDP tilsvarende for alle gruppene etter første måling, for gradvis å øke igjen utover reperfusjonen. Adenosingruppen ser ut til å virke gunstig da det er den gruppen

som har mest økning i LVDP gjennom reperfusjonen. Denne gruppen har ved en rekke målinger lave p-verdier, uten at de er signifikante. Hvis man gjør en t-test som sammenligner adenosin og kombinasjonsbehandling med nicorandil og adenosin prekondisjonering, får man signifikant bedre LVDP ($p\text{-verdi}=0,01$) for adenosin kontra kombinasjonsbehandlingen ved 70 minutter. Denne forskjellen ser ut til å vedvare utover i reperfusjonen uten signifikant påvisning. Når det gjelder nicorandil alene kontra kombinasjonsbehandling er det ikke signifikant forskjell.

Farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin



Figur 6.4: Utvikling av trykk i reperfusjonen

Nicorandil og adenosin postkondisjonering skiller seg ikke nevneverdig fra kontrollene når det gjelder systolisk trykk. Det kan se ut som medikamentgruppen ligger lavere enn kontrollgruppen, men det er ingen signifikant forskjell.

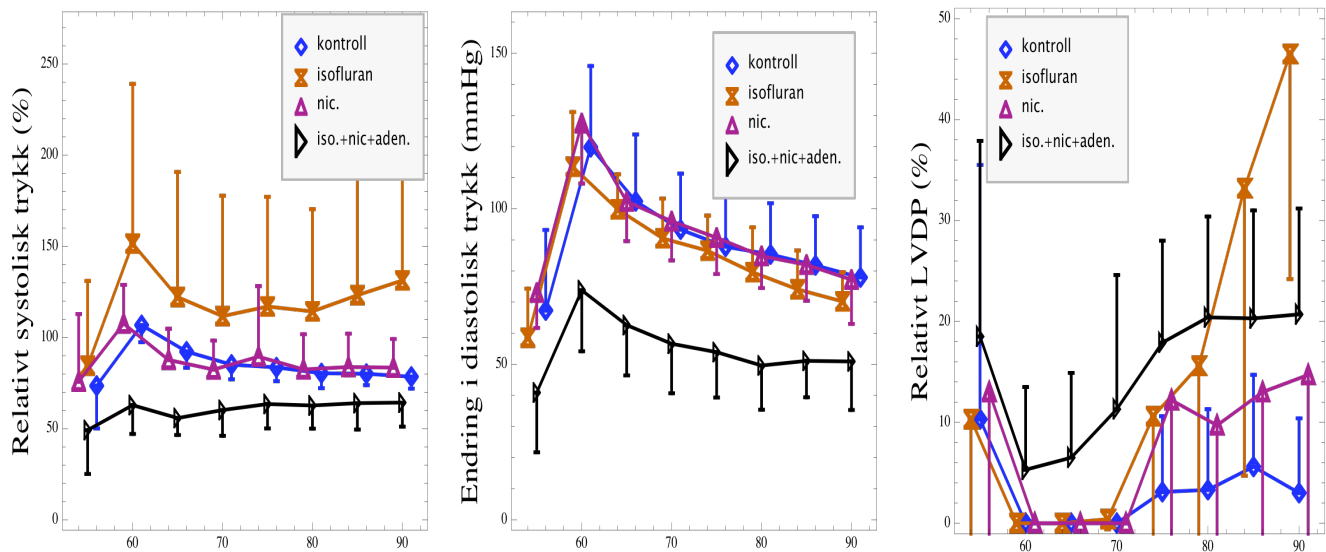
Når det gjelder diastolisk trykk i postkondisjoneringen er det ikke mulig å se noen åpenbar forskjell mellom kontroll og medikamenter. Begge stiger bratt de første 5 minuttene i reperfusjonen for deretter å falle gradvis.

LVDP for gruppen nicorandil og adenosin postkondisjonering er lavere enn kontrollene, og har mindre økning mot slutten av reperfusjonen.

Da var kun 4 dyr i denne gruppa og det kan være noe av forklaringen til at det er vanskelig å få frem noen forskjell mellom medikamentgruppen og kontrollene.

Farmakologisk prekonisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin

I denne perioden ble den eksperimentelle protokollen endret. Stabiliseringstiden ble forkortet til 10 minutter på grunn av isofluran forbehandling, mens global ischemi ble økt fra 35 minutter til 45 minutter. Reperfusjonen ble økt med 5 minutter til totalt 35 minutter. Hovedfokuset i denne perioden var på infarktstørrelse, og det var på bakgrunn av dette at ischemitiden ble økt. Det var tre behandlingsgrupper; isofluran, nicorandil og adenosin sammen, nicorandil alene og isofluran alene.



Figur 6.5 : Viser utviklingen i trykk gjennom reperfusjonen.

Systolisk trykk

Medikamentgruppen med isofluran, nicorandil og adenosin hadde signifikant lavere systolisk trykk sammenlignet med kontroller. P- verdier fra 60 minutter til 90 minutter etter Bonferroni korreksjon var: $1,2 \cdot 10^{-3}$, $1,2 \cdot 10^{-4}$, 0,02, 0,03, 0,06 og 0,15.

Isofluran alene er den gruppen som har høyest systolisk trykk over hele perioden med lave p- verdier fra 75 minutter og utover (p-verdier 0,19- 0,07), men ingen signifikante på 0,05 nivå.

Nicorandilgruppen følger kontrollene, og det er ikke mulig å påvise noen forskjell.

Hvis man ser på Trippelbehandlingen versus enkeltkomponentene finner vi at isofluran gitt alene gir et signifikant bedre systolisk trykk ved 60, 65, 80, og 90 minutter (p-verdier= 0,04, 0,04, 0,05 og 0,03) , og nicorandil alene gir signifikant bedre trykk ved 60, 70 og 90 minutter (p-verdier= 0,002, 0,004 og 0,04) sammenliknet med trippelbehandlingen.

Diastolisk trykk

Isofluran, nicorandil og adenosin gruppen er den som klart skiller seg fra de andre gruppene med et signifikant lavere diastolisk trykk under hele og en rekke signifikante p-verdier på 0,05 nivå (p-verdier= 0,07, 0,01, $7,0 \cdot 10^{-3}$, 0,01, 0,01, 0,01, 0,01 og 0,10).

Etter Bonferroni korreksjon har trippelbehandlingen fortsatt signifikant bedre diastolisk trykk ved 60, 65, 70, 75, 80 og 85 minutter (p-verdier= 0,03, 0,03, 0,02, 0,03, 0,03 og 0,03).

I tillegg viser det seg at trippelbehandling versus enten nicorandil eller isofluran alene gir signifikant lavere diastolisk trykk gjennom hele reperfusjonen.

Dette tyder på at disse tre medikamenter administrert sammen har additiv, gunstig effekt på det diastoliske trykket.

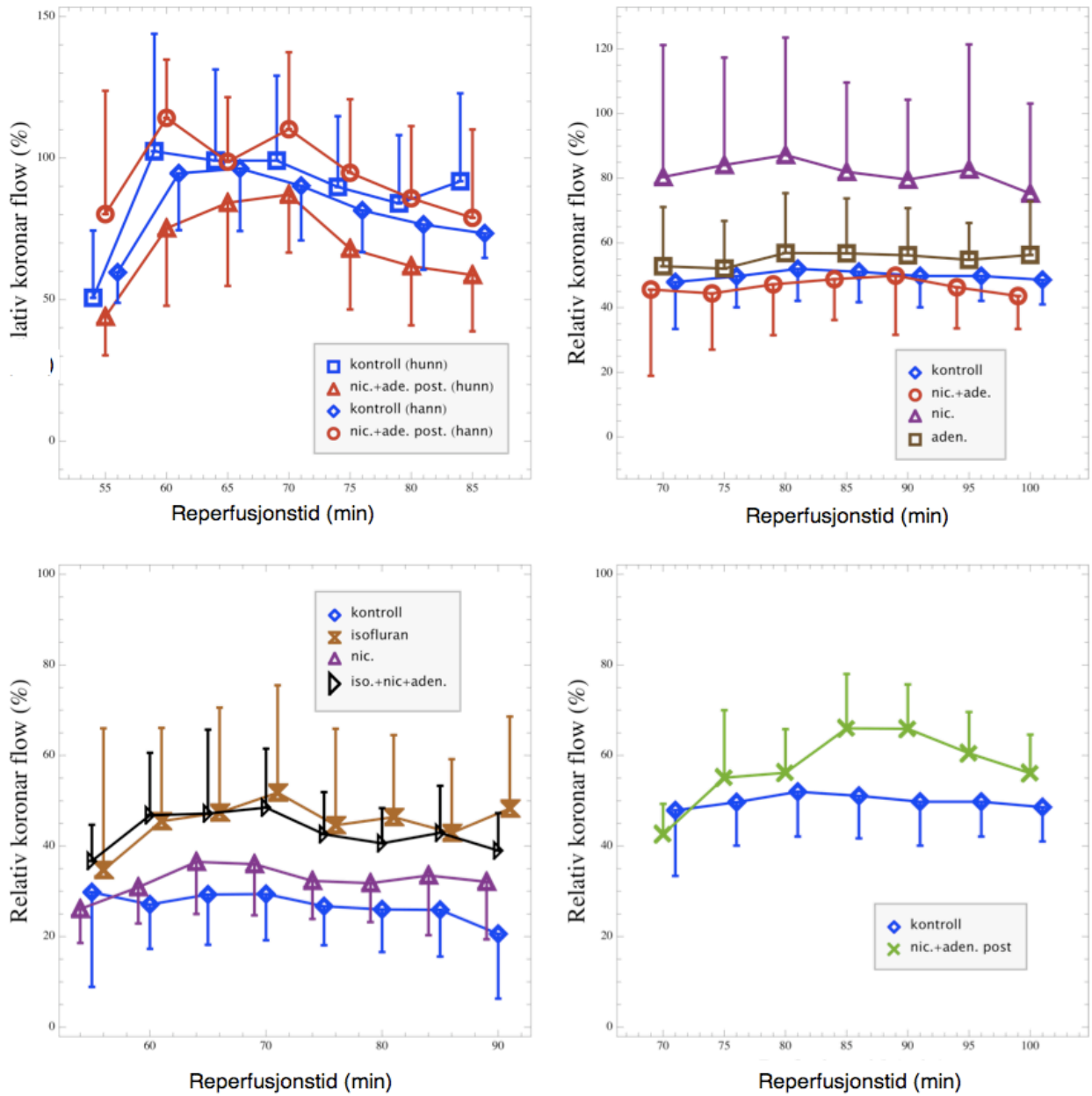
For medikamentgruppene med isofluran og nicorandil hver administrert for seg er det ingen signifikant forskjell fra kontrollgruppene.

LVDP

I reperfusjonen var det flere hjerter som ikke utviklet LVDP på grunn av asystoli. Det er lave p-verdier for LVDP fra 75 – 90 minutter (p-verdier = 0,02, $8,0 \cdot 10^{-3}$, 0,03 og $8,0 \cdot 10^{-3}$) for medikamentgruppen hvor de tre medikamentene blir gitt samtidig i forhold til kontrollene. Signifikant bedre LVDP er påvist ved det 80. og 90. minutt (p-verdi 0,02 med Bonferroni korreksjon).

Isofluran alene gir også signifikant bedre LVDP senere i reperfusjonen, med lave p-verdier de siste to målingene i reperfusjonen (p-verdier= 0,03 og $8,0 \cdot 10^{-3}$, korrigert: 0,09 og 0,02). På slutten av reperfusjonen har isoflurangruppen signifikant bedre LVDP enn trippelgruppen. Nicorandilgruppen ligger nærmest kontrollene, og er ikke signifikant bedre enn disse, og ser generelt ut til å ha liten effekt på trykket.

6.2 Flow



Figur 6.6: Viser utviklingen i relativ koronar flow gjennom reperfusjonen

Flow i pilotstudien

I pilotstudien ble det ikke påvist noen signifikant forskjell mellom postkondisjonering med nicorandil og adenosin kontra kontrollgruppen. Flow for hannrottene er ved 60 og 70 minutter økt i forhold til stabiliseringsverdien, og den ligger ellers over kontrollene sin flow. Det ser ut som om kontrollene hos hunnrottene har bedre flow enn medikamentgruppen under hele reperfusjonen, men den forskjellen er ikke signifikant på 0,05 nivå.

Flow i studien farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin

Her kan det virke som administrasjon av nicorandil alene som prekondisjonering kan ha gunstig effekt på flow. Nicorandil har en rekke lave p-verdier fra 75 til 100 minutter (p-verdier= 0,02, 0,03, 0,02, 0,01, 0,05, 0,03) (Bonferroni korreksjon: p=0,08, 0,12, 0,08, 0,04, 0,20, 0,12)

Prekondisjonering med nicorandil og adenosin gav derimot ikke en slik effekt på flow som nicorandil alene. Denne gruppen ligger lavest i flow sammen med kontrollene. Det kan tenkes at dette skyldes adenosin, men gruppen hvor adenosin blir gitt alene ser ut til å ligge noe høyere i flow enn når den koadministreres med nicorandil. Det er likevel ikke mulig å påvise noen signifikant forskjell for hverken nicorandil og adenosin sammen eller adenosin alene.

Flow i studien farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin.

Nicorandil og adenosin postkondisjonering hadde ved 90 minutter en p-verdi på 0,04, (korrigert til 0,16). Medikamentgruppen ser ut til å ha en høyere flow enn kontrollene i det meste av reperfusjonen.

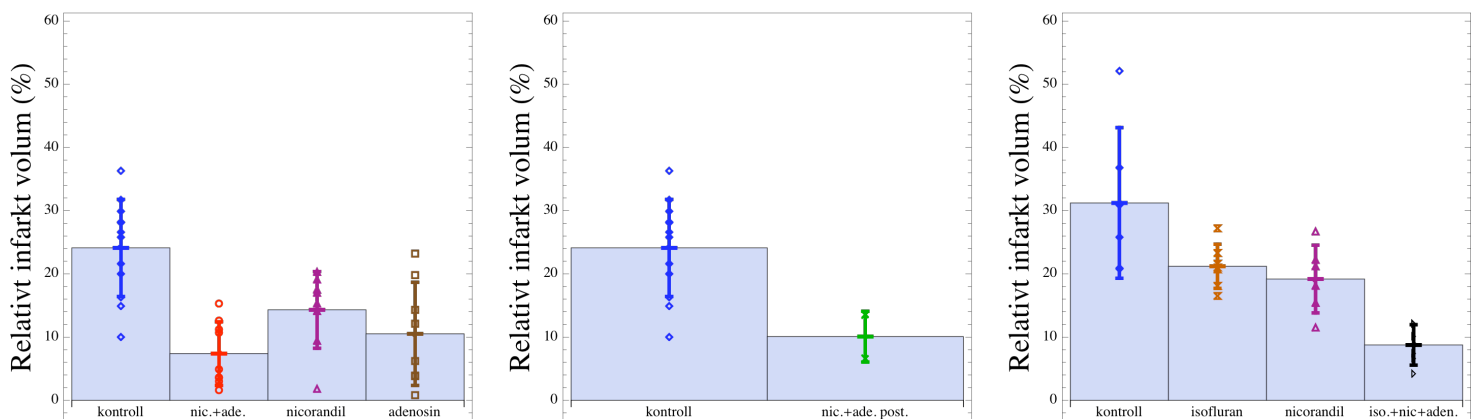
Flow i studien farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin.

Her er den generelle trenden at medikamentgruppene har høyere flow enn kontrollene. Isofluran, nicorandil og adenosin gruppen ser ut til å være bedre enn kontrollene ved alle målingene i reperfusjonen med unntak av målingen ved 65 minutter (p-

verdier=0,02, 0,02, 0,01, 0,02, 0,02, 0,03. Etter Bonferroni korreksjon: 0,06, 0,06, 0,03, 0,06, 0,06 og 0,09. Der er også betydelig bedre flow for isofluran gitt alene med lave p-verdier i hele reperfusjonen (p-verdi 0,04 og 0,02, korrigert: 0,12 og 0,06) mot slutten av reperfusjonen. Nicorandil er ved denne protokollen ikke signifikant forskjellig fra kontrollene.

Det er ikke mulig å direkte sammenligne dette funnet med funnene i pilotprotokollen fordi den eksperimentelle protokollen er forskjellig, men noen synspunkter kan poengteres som årsak til denne forskjellen. Stabiliseringstiden er forkortet fra 35 minutter til 10 minutter i denne perioden. Nicorandil administreres derfor umiddelbart, det kan dermed tenkes at karsengen i disse hjertene var maksimalt dilatert som følge av ischemien under organuttaket. I tillegg var ischemitiden økt fra 35 minutter til 45 minutter og reperfusjonen med 5 minutter. Lengre ischemitid og reperfusjon kan tenkes å være to av årsakene til at nicorandil i den siste perioden ikke ga slik signifikant bedre flow slik som det ble påvist i tidligere protokoll.

6.3 Infarktstørrelse



Figur 6.7: Viser relativt infarkt volum

Infarktstørrelse i pilotstudien

I den første perioden ble det ikke påvist noen signifikant forskjell i infarktstørrelse mellom medikamentgruppen og kontroller. Det er en rekke punkter som kan være årsak til manglende påvisning av forskjell mellom medikamentgruppene og kontrollene.

I pilotstudien hadde vi kun 30 minutter ischemitid og temperaturen var ikke tilstrekkelig regulert og sank betydelig under ischemitiden.

I tillegg var metoden vi brukte for å markere infarktstørrelse ikke nøyaktig nok til å avdekke små forskjeller som var tilfellet i pilotstudien (infarkter på kun 10%).

Når det gjelder forskjeller i vekt mellom kontroller og medikamentgrupper var hannrottene mindre i medikamentgruppen, og hadde signifikant mindre hjerte (p-verdi kroppsvekt= 0,08, p-verdi hjertevekt= 0,04). Ingen signifikant forskjell ble påvist hos hunnene som kunne forklare funnene.

Kort ischemitid, lave temperaturer under ischemi, mindre hjerter hos hannrottene og unøyaktig metode for å skille mellom friskt og nekrotisk vev kan være noen av årsakene til manglende påvisning av signifikante forskjeller i pilotstudien.

Infarktstørrelse i studien farmakologisk prekondisjonering med nicorandil og adenosin

Her kommer det klart fram at kontrollene som gruppe har større infarkt enn medikamentgruppene hver for seg.

Gruppen med nicorandil og adenosin prekondisjonering var den som hadde tydelig minst infarkt med 7,4% infarkt versus kontroller med 24,1% infarkt (p-verdi= $1,0 \cdot 10^{-5}$, korrigeret= $4,0 \cdot 10^{-5}$). Denne gruppen hadde signifikant (p-verdi= 0,01) større hjerter enn kontrollene, og likevel hadde de mindre infarkt. De andre gruppene hadde ingen signifikant forskjell i kropps- og hjertevekt sammenliknet med kontrollene.

Adenosin hadde 10,5% infarkt (p-verdi= 0,001, korrigeret= 0,004) og nicorandil 14,3% (p-verdi= 0,002, korrigeret= 0,008).

Infarktstørrelse i studien farmakologisk postkondisjonering med nicorandil og adenosin.

Resultatene med nicorandil og adenosin postkondisjonering indikerte reduksjon i infarktstørrelse ut fra grafen (statistisk beregning ikke utført grunnet lite antall i medikamentgruppen).

Infarktstørrelse i studien farmakologisk prekondisjonering med isofluran, nicorandil og adenosin.

Alle medikamentene gir mindre infarkt enn kontrollene. Minst infarkt har gruppen som fikk isofluran, nicorandil og adenosin sammen med 8,8% infarktstørrelse (p-verdi 0,005) versus kontroller med 31,2% infarkt.

Nicorandilgruppen hadde 19,2% infarkt (p-verdi= 0,06), men denne gruppen inkluderte signifikant tyngre rotter enn kontrollene.

Isoflurangruppen hadde 21,2% infarkt (p-verdi=0,10) sammenliknet med kontrollgruppen.

Dette er en klar indikasjon på additiv effekt og beskyttelse mot celledød ved bruk av trippelbehandlingen i forhold til behandling med kun ett av medikamentene.

7 Diskusjon

Et av hovedmålene med denne studien var å finne ut om man kunne få ytterligere effekt av å tilsette adenosin og nicorandil i rottehjerter som var forbehandlet med isofluran. Det finnes rikelig og veldokumentert materiale på de kardioprotektive egenskapene til adenosin. Det finnes også dokumentasjon på at både nicorandil og isofluran har kardioprotektive egenskaper. I tillegg er det vist at det er en additiv effekt å legge til nicorandil i hjerter som har blitt behandlet med isofluran [86]. Det finnes foreløpig ingen data som går på eventuelle additive effekter av alle tre medikamentene.

Infarktanalysen viser at hjertene som fikk alle tre medikamentene hadde en gjennomsnittlig infarktstørrelse på 8,8% mot kontrollene som lå på 31,2%. Man ser også en trend ved administrering av kun nicorandil, men denne effekten forsterkes når man tilsetter adenosin. Adenosin har veldokumenterte kardioprotektive egenskaper og dette er grunnen til at vi i den siste protokollen har unnlatt å gjøre en testgruppe med

kun adenosin. Vi har imidlertid bekreftet effekten i protokollen med global ischemi av 35 minutters varighet, hvor både adenosin og nicorandil hver for seg viste signifikant reduksjon i celledød.

Når det gjelder funksjon har vi ikke de samme signifikante forskjellene mellom kontroll- og medikamentgrupper. Da kan man spørre seg hvorfor det ikke ser ut til å være en sammenheng mellom funksjon og graden av celledød. Dette kan blant annet forklares med at en celle som er skadet og ikke død, ikke nødvendigvis klarer å opprettholde sin funksjon (for eksempel kontraktilitet). Vi vil dermed ha en situasjon hvor cellen ikke fungerer tilstrekkelig til å utføre kontraksjoner, men den er ikke død og vi får derfor ikke fargeutslag ved farging med TTC da denne krever infarserte celler for å slå ut. I tillegg spiller postischemiske arytmier og stunning en rolle da disse påvirker funksjon i negativ retning uten at det foreligger celledød.

På en måte kan man derfor hevde at infarktstørrelse er mer håndfast som endepunkt i forhold til registreringer av funksjon. Deler av myokard som har blitt nekrotisk vil ikke gjenoppta tidligere funksjon, mens et område som er påvirket av for eksempel stunning vil være forbigående. Dette betyr at vi ikke kan si noe om hvordan de funksjonelle dataene hadde utviklet seg dersom vi hadde operert med en lengre reperfusjonstid. Vi kan kun se en positiv trend, men dette gjelder både for medikamentgrupper og kontroller.

Vi fant likevel forskjeller i siste protokoll da gruppen som fikk isofluran hadde et signifikant bedre systolisk trykk gjennom større deler av reperfusjonen. I samme protokoll har vi registrert en signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og gruppen som fikk alle tre medikamentene hvor sistnevnte har dårligere systolisk trykk. Likevel kommer denne gruppen bedre ut totalt sett med et signifikant bedre LVDP grunnet et gunstigere diastolisk trykk. Her ser man av grafen at denne gruppen har en positiv trend mot slutten av reperfusjonen hvor systolisk trykk ser ut til å øke samtidig som diastolisk trykk faller tilsvarende. Dette gjelder også gruppen som fikk isofluran som mot slutten av reperfusjonstiden gir signifikant bedre LVDP enn både kontrollgruppen og gruppen som i tillegg fikk adenosin og nicorandil. Det bør nevnes at vi har operert med ganske kort reperfusjonstid i våre protokoller (fra 30 til 35 minutter).

I en studie ble det vist at nicorandil forbedret postischemisk funksjon via åpning av K_{ATP} kanaler og reduksjon av hydroxylradikaler [87]. Her har man operert med 60

minutters reperfusjonstid. Det er derfor mulig at vi med å forlenge reperfusjonstiden hadde sett en større forskjell mellom kontroll- og medikamentgrupper når det gjelder funksjon.

I den første tiden etter reperfusjon er det en større forekomst av reperfusjonsarytmier og dette vil naturlig nok virke negativt inn på hjertets funksjon. Med en lengre reperfusjonstid vil arytmiene avta og man vil sannsynligvis få en bedret funksjon. Men i en studie ble det vist at anestetisk prekondisjonering av isolerte rottehjerter med isofluran ikke hadde noen innvirkning på varigheten av reperfusjonsarytmiene så lenge disse oppstod, men insidensen av arytmier avtok [88]. Dersom dette er riktig vil det for vår del bety at isofluranhjertene som utviklet postischemiske arytmier sannsynligvis ikke ville bedret seg nevneverdig med en lengre reperfusjonstid sammenliknet med kontroller. Ut fra vår protokoll er det vanskelig å si noe om akkurat dette, men gruppen som fikk isofluran hadde som sagt et signifikant bedre LVDP mot slutten av reperfusjonen sammenliknet med kontroller, noe som faktisk kan tyde på en innvirkning på varigheten av arytmiene.

En annen faktor som kan påvirke postischemisk funksjon er konsentrasjonen av de ulike medikamentene. For adenosin brukte vi en konsentrasjon på 1,2 mmol, samme konsentrasjonen som ble benyttet av Jakobsen *et al.* De viste at man ved å benytte adenosin som substitutt for høye konsentrasjoner av kalium i kardioplegivæsker, fikk bedre bevart funksjon av venstre ventrikel og mindre celledød [48]. Mentzer *et al.* viste i et klinisk forsøk at en høy konsentrasjon (2mM) i tillegg til hyperkalemisk blodkardioplegi ga bedre proteksjon enn en lav konsentrasjon (500mikromol) [89].

Ved å benytte seg av perfusjonsvæske basert på krystalloider istedenfor blod, unngår vi å måtte ta hensyn til den raske nedbrytningen av adenosin i blod (halveringstid på 0,6 sekunder). I studier hvor man benytter større forsøksdyr og studerer effekten *in vivo* er man nødt til å ta hensyn til de systemiske effektene av adenosin. Det er derfor en mulighet at vi hadde oppnådd ytterligere kardioproteksjon ved å øke konsentrasjonen av adenosin til for eksempel 2mM.

Når det gjelder nicorandil brukte vi konsentrasjoner på 0,1 mM. Også her er konsentrasjonen av stor betydning da man i tidligere *ex vivo* forsøk på papillemuskler fra marsvin har vist at nicorandil under normotermie forhold og i konsentrasjoner

>0,5mM faktisk virker negativt inotrop [62]. Vi valgte derfor en konsentrasjon godt under denne grensen.

Konsentrasjonen av isofluran ble bestemt ut fra tidligere forsøk hvor man har dokumentert kardioproteksjon ved bruk av isofluran som prekondisjonering [90]. Den opprinnelige planen var å administrere denne rett i bufferen, men det viste seg problematisk da isofluranen reagerte med enkelte plastkomponenter i riggen. I tillegg gikk den over i gassform og ville sannsynligvis dannet gassebolier som ville ført til okklusjoner i koronarsengen.

I en klinisk utprøving med nicorandil ga ikke denne like effektiv kardioproteksjon som forventet. En hypotese som ble framsatt var at isofluran, som har felles virkningsmekanisme med nicorandil når det gjelder prekondisjonering, hentet ut denne gevinsten på forhånd. Vi har her vist at det i rottehjerter er en additiv effekt av å tilsette nicorandil til isofluran ved bruk av infarktstørrelse som endepunkt. En del av denne effekten kan tilskrives adenosin, men ut fra protokollene vi har brukt er det ikke mulig å fastslå hvor stor denne er.

8 Konklusjon

Vi har funnet at i alle testprotokollene vi har forsøkt har kombinasjon av to eller flere kardioprotektive agens framfor bruk av bare et agens vært gunstig når infarkt ble brukt som endepunkt. Med hensyn til hjertenes funksjon er det kun små forskjeller mellom behandlede og ikke behandlede hjerter.

9 Referanser

1. Steensrud, T., et al., *Replacing potassium with nicorandil in cold St. Thomas' Hospital Cardioplegia improves preservation of energetics and function in pig hearts*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(4): p. 1391-7.
2. Steensrud, T., et al., *Superior myokardial protection with nicorandil Cardioplegia*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **23**(5): p. 670-7.
3. Steensrud, T., et al., *CliniCal testing of nicorandil supplemented normokalemic Cardioplegic solution*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2006. **5**(5): p. 521-5.
4. Furuya, A., S. Kashimoto, and T. Kumazawa, *Effects of nicorandil on myokardial function and metabolism in the post-ischaemic reperfused heart with or without inhalation anaesthetics*. Acta Anaesthesiol Scand, 2002. **46**(1): p. 24-9.

5. Vinten-Johansen, J., et al., *Broad-spectrum Cardioprotection with adenosine*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1942-8.
6. Yao, L., R. Kato, and P. Foex, *isoflurane-induced protection against myocardial stunning is independent of adenosine 1 (A₁) receptor in isolated rat heart*. Br J Anaesth, 2001. **87**(2): p. 258-65.
7. Nakae, Y., et al., *Intracellular mechanism of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activation with isoflurane*. Anesth Analg, 2003. **97**(4): p. 1025-32, table of contents.
8. Ravingerova, T., et al., *Preconditioning against contractile dysfunction in guinea pig papillary muscle depends on the opening of K_{ATP}-sensitive channels*. Exp Clin Cardiol, 1998: p. 184-1851. Steensrud, T., et al., *Replacing potassium with nicorandil in cold St. Thomas' Hospital cardioplegia improves preservation of energetics and function in pig hearts*. Ann Thorac Surg, 2004. **77**(4): p. 1391-7.
9. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
10. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
11. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
12. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
13. Downey, J.M. and M.V. Cohen, *Signal transduction in ischemic preconditioning*. Z Kardiol, 1995. **84 Suppl 4**: p. 77-86.
14. Banerjee, A., et al., *Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism*. Circ Res, 1993. **73**(4): p. 656-70.
15. Gross, E.R., A.K. Hsu, and G.J. Gross, *Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 960-6.
16. Lochner, A., et al., *Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 958-66.
17. Ytrehus, K., Y. Liu, and J.M. Downey, *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1145-52.
18. Downey, J.M., A.M. Davis, and M.V. Cohen, *Signaling pathways in ischemic preconditioning*. Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 181-8.
19. Tan, H.L., et al., *Ischaemic preconditioning delays ischaemia induced cellular electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP sensitive potassium channels*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(4): p. 644-51.
20. Yellon, D.M. and J.M. Downey, *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology*. Physiol Rev, 2003. **83**(4): p. 1113-51.
21. Tong, H., et al., *Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C*. Circ Res, 2000. **87**(4): p. 309-15.
22. Mocanu, M.M., R.M. Bell, and D.M. Yellon, *PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(6): p. 661-8.
23. Gross, G.J. and J.N. Peart, *KATP channels and myocardial preconditioning: an update*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H921-30.

24. Hausenloy, D.J., S.B. Ong, and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning*. Basic Res Cardiol, 2009.
25. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
26. Xiao, X.H. and D.G. Allen, *Activity of the Na(+)/H(+) exchanger is critical to reperfusion damage and preconditioning in the isolated rat heart*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(2): p. 244-53.
27. Kandasamy, R.A., et al., *Plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29209-16.
28. Bugge, E. and K. Ytrehus, *Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart--a protective additive to ischaemic preconditioning*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(2): p. 269-74.
29. Armstrong, S., J.M. Downey, and C.E. Ganote, *Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(1): p. 72-7.
30. Pagliaro, P., et al., *Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection*. Life Sci, 2001. **69**(1): p. 1-15.
31. Marber, M., Latchman DS, Walker JM et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. Circ J, 1993.
32. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(3): p. 377-86.
33. Argaud L, G.-R., O, Raissy, O, et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. Circulation, 2005.
34. Zhao, Z.Q., Corvera, JS, Halkos, ME, et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003.
35. Balakumar, P., A. Rohilla, and M. Singh, *Pre-conditioning and postconditioning to limit ischemia-reperfusion-induced myocardial injury: what could be the next footstep?* Pharmacol Res, 2008. **57**(6): p. 403-12.
36. Mockford, K.A., H.R. Girn, and S. Homer-Vanniasinkam, *Postconditioning: current controversies and clinical implications*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2009. **37**(4): p. 437-42.
37. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm*. Circulation, 2006. **113**(7): p. 1015-9.
38. Laskey, W.K., *Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **65**(3): p. 361-7.
39. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
40. Vinten-Johansen, J., D.M. Yellon, and L.H. Opie, *Postconditioning: a simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2085-8.
41. Zaugg, M., et al., *Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms*. Br J Anaesth, 2003. **91**(4): p. 551-65.

42. Schulz, R., et al., *Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine*. Pflugers Arch, 1995. **430**(2): p. 273-82.
43. Mubagwa, K. and W. Flameng, *Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(1): p. 25-39.
44. Cohen, M.V. and J.M. Downey, *Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(3): p. 203-15.
45. Thornton, J.D., et al., *Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction*. Circulation, 1992. **85**(2): p. 659-65.
46. Zhao, Z.Q., et al., *Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion*. J Surg Res, 2000. **94**(2): p. 133-44.
47. Costa, A.D., et al., *Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria*. Circ Res, 2005. **97**(4): p. 329-36.
48. Jakobsen, O., et al., *Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution improves cardioprotection*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **32**(3): p. 493-500.
49. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
50. Liu, G.S., et al., *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart*. Circulation, 1991. **84**(1): p. 350-6.
51. Kuno, A., 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**(3): p. 262-71.
52. Penna, C., et al., *Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(2): p. 180-9.
53. Hausenloy, D.J., et al., *Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H841-9.
54. Xu, Z., J.M. Downey, and M.V. Cohen, *Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart*. Heart Dis, 2003. **5**(6): p. 368-71.
55. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.
56. Mahaffey, K.W., et al., *Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(6): p. 1711-20.
57. O'Rourke, S.T., *KATP channel activation mediates nicorandil-induced relaxation of nitrate-tolerant coronary arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **27**(6): p. 831-7.
58. Frampton, J., M.M. Buckley, and A. Fitton, *Nicorandil. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in angina pectoris*. Drugs, 1992. **44**(4): p. 625-55.
59. Kukovetz, W.R., S. Holzmann, and G. Poch, *Molecular mechanism of action of nicorandil*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 3**: p. S1-7.
60. Haager, P.K., et al., *Effect of nitroglycerin and nicorandil on regional poststenotic quantitative coronary blood flow in coronary artery disease: a combined digital*

- quantitative angiographic and intracoronary doppler study.* J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(1): p. 126-34.
61. Markham, A., G.L. Plosker, and K.L. Goa, *Nicorandil. An updated review of its use in ischaemic heart disease with emphasis on its cardioprotective effects.* Drugs, 2000. **60**(4): p. 955-74.
 62. Steensrud, T., et al., *Contractile recovery of heart muscle after hypothermic hypoxia is improved by nicorandil via mitochondrial K(ATP) channels.* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **30**(2): p. 256-62.
 63. Mizumura, T., K. Nithipatikom, and G.J. Gross, *Infarct size-reducing effect of nicorandil is mediated by the KATP channel but not by its nitrate-like properties in dogs.* Cardiovasc Res, 1996. **32**(2): p. 274-85.
 64. Geshi, E., et al., *The role of ATP-sensitive potassium channels in the mechanism of ischemic preconditioning.* J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(3): p. 446-53.
 65. Edwards, G. and A.H. Weston, *Pharmacology of the potassium channel openers.* Cardiovasc Drugs Ther, 1995. **9 Suppl 2**: p. 185-93.
 66. Horn, M., et al., *Mechanisms of the effects of nicorandil in the isolated rat heart during ischemia and reperfusion: a 31P-nuclear magnetic resonance study.* J Cardiovasc Magn Reson, 2001. **3**(4): p. 349-60.
 67. Ito, H., et al., *Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(3): p. 654-60.
 68. Cason, B.A., et al., *Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits.* Anesthesiology, 1997. **87**(5): p. 1182-90.
 69. Deyhimy, D.I., et al., *Anesthetic preconditioning combined with postconditioning offers no additional benefit over preconditioning or postconditioning alone.* Anesth Analg, 2007. **105**(2): p. 316-24.
 70. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase.* Anesthesiology, 1997. **87**(2): p. 361-70.
 71. Kersten, J.R., et al., *Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels.* Anesthesiology, 1996. **85**(4): p. 794-807; discussion 27A.
 72. Kersten, J.R., et al., *Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection.* Anesthesiology, 1997. **86**(5): p. 1128-39.
 73. Novalija, E., et al., *Reactive oxygen species precede the epsilon isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade.* Anesthesiology, 2003. **99**(2): p. 421-8.
 74. Uecker, M., et al., *Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning.* Anesthesiology, 2003. **99**(1): p. 138-47.
 75. Miyamae, M., et al., *Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺]_m overload in rat hearts.* Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2145-53.
 76. Nakae, Y., et al., *Isoflurane activates rat mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels reconstituted in lipid bilayers.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1865-71.
 77. Shi, Y., et al., *Delayed cardioprotection with isoflurane: role of reactive oxygen and nitrogen.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H175-84.

78. Tanaka, K., et al., *Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species*. *Anesthesiology*, 2003. **98**(4): p. 935-43.
79. Das, D.K., et al., *Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart*. *Mol Cell Biochem*, 1999. **196**(1-2): p. 59-67.
80. Patel, H.H., et al., *Delta opioid agonists and volatile anesthetics facilitate cardioprotection via potentiation of K(ATP) channel opening*. *FASEB J*, 2002. **16**(11): p. 1468-70.
81. Langendorff, O., *Untersuchungen am uberlebenden Saugethierherzen*. *Pflugers Archives fur die Gesamte Physiologie des Menschen and der Tiere*. 1895: p. 291-332.
82. Nanthakumar, K., et al., *Optical mapping of Langendorff-perfused human hearts: establishing a model for the study of ventricular fibrillation in humans*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(1): p. H875-80.
83. Mazze, R.I., S.A. Rice, and J.M. Baden, *Halothane, isoflurane, and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats*. *Anesthesiology*, 1985. **62**(3): p. 339-41.
84. Henseleit., H.K.a.K., *Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologie Chemie*, 1932: p. 33-36.
85. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. **41**(6): p. 613-27.
86. Piriou, V., et al., *Beneficial effect of concomitant administration of isoflurane and nicorandil*. *Br J Anaesth*, 1997. **79**(1): p. 68-77.
87. Lu, C., et al., *Nicorandil improves post-ischemic myocardial dysfunction in association with opening the mitochondrial K(ATP) channels and decreasing hydroxyl radicals in isolated rat hearts*. *Circ J*, 2006. **70**(12): p. 1650-4.
88. Kevin, L.G. and E. Novalija, *Anesthetic preconditioning decreases arrhythmias and improves regional conduction in isolated hearts*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2008. **22**(2): p. 217-24.
89. Mentzer, R.M., Jr., et al., *Adenosine myocardial protection: preliminary results of a phase II clinical trial*. *Ann Surg*, 1999. **229**(5): p. 643-9; discussion 649-50.
90. Kehl, F., et al., *Is isoflurane-induced preconditioning dose related?* *Anesthesiology*, 2002. **96**(3): p. 675-80.

