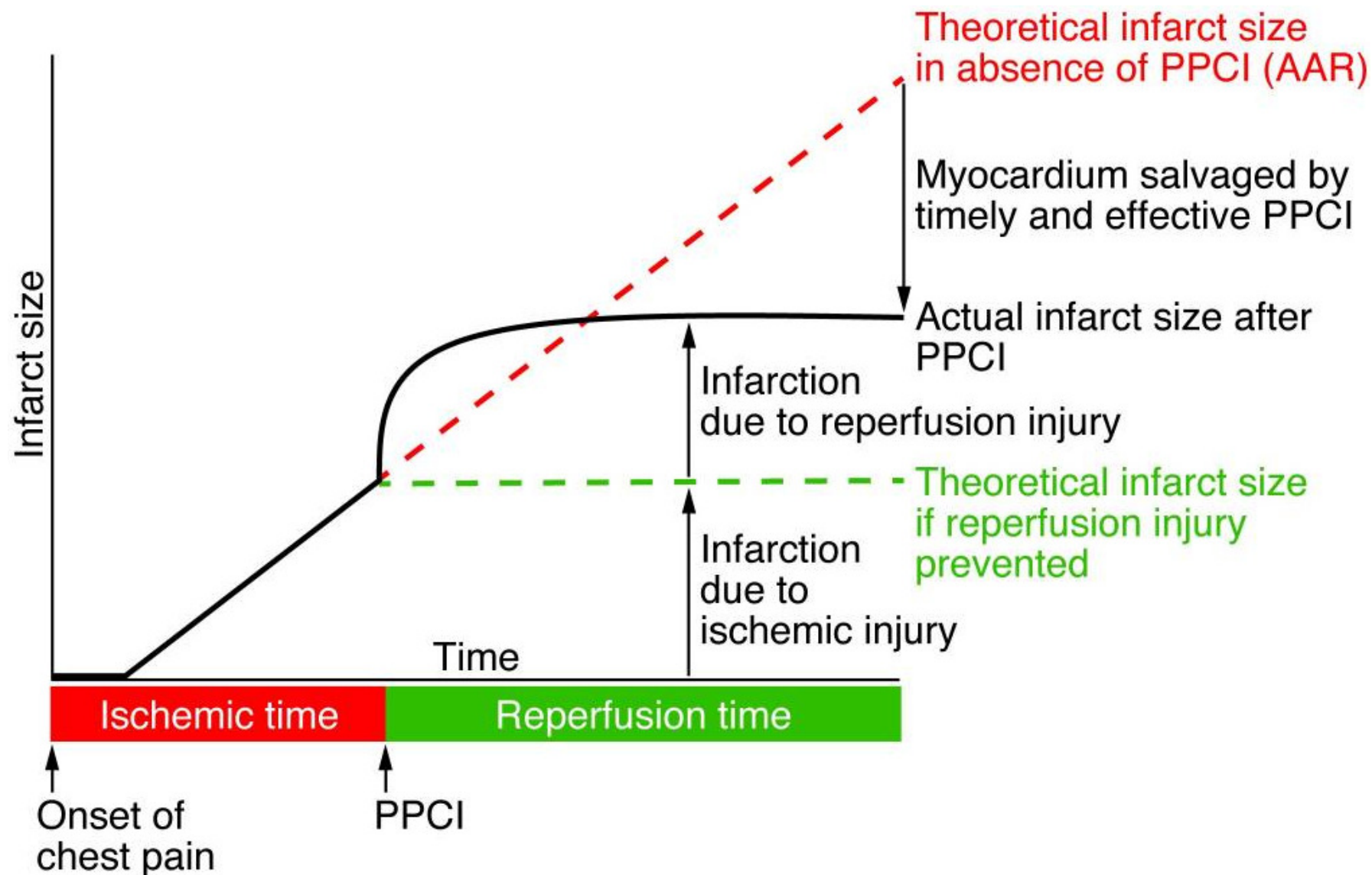




Reperfusion injury: Does it exists?

G. J. Gross and J. A. Auchamapch
J Mol Cell Cardiology 42: 12-18, **2007**

Il danno si sviluppa solo durante l'ischemia
o
la riperfusione estende il danno tessutale?

**A lungo discussa l'esistenza per difficoltà a dimostrare
l'incremento di danno rispetto a ischemia senza riperfusione**

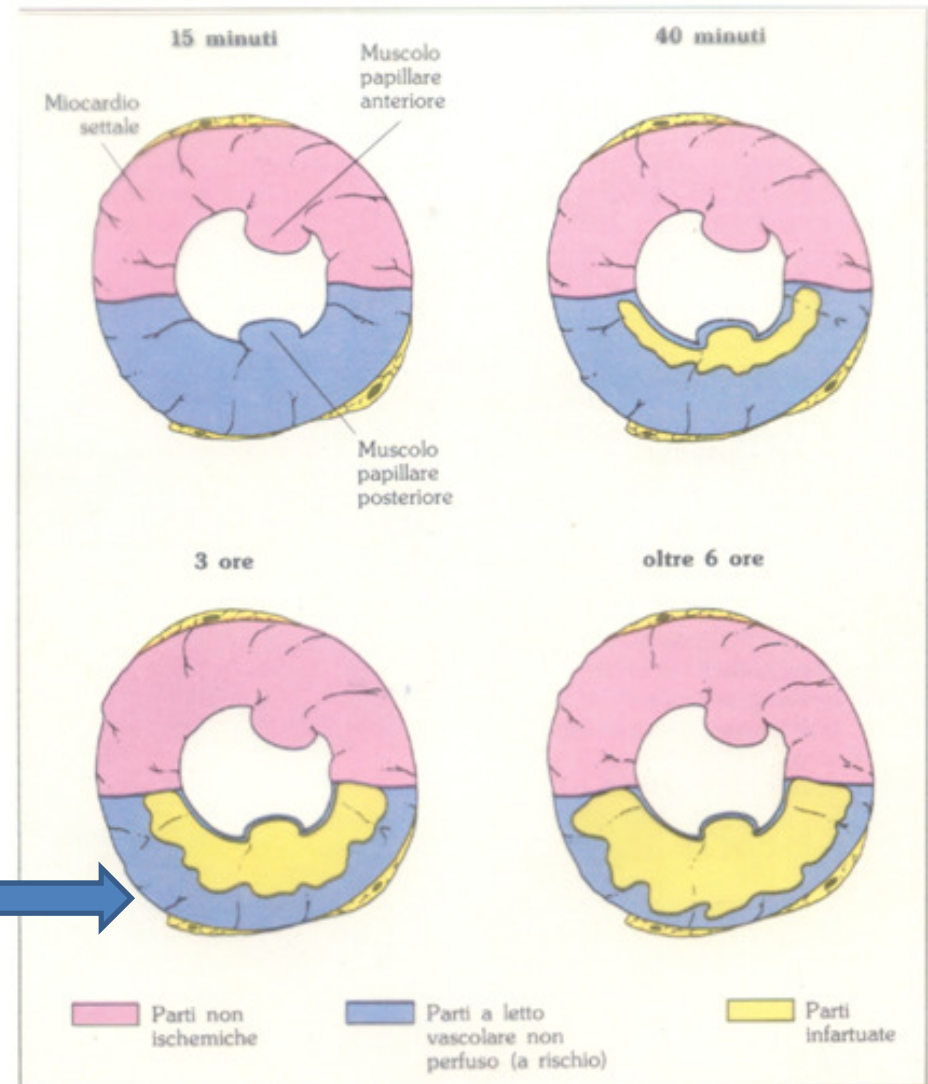
La prova:

Adenosina e ligandi di recettori oppiacei sostengono l'esistenza del danno da riperfusione, poiché se somministrati alla riperfusione riducono il danno miocardico (>60%, anche nell'uomo).

**Confermano che il danno da riperfusione esiste e che è responsabile del
50-75% delle dimensioni finali dell'infarto dopo riperfusione!!!**

Diffusione “a fronte d’onda” della necrosi ischemica dei miociti

- L'interruzione del flusso ematico coronarico comporta lo sviluppo progressivo di un danno miocardico irreversibile nello spessore della parete miocardica in f(x) della durata dell'ischemia.
- Dopo l'occlusione di una coronaria la necrosi colpisce inizialmente lo strato **subendocardico** del miocardio interessato, successivamente la necrosi si estende allo strato **mediomiocardico** ed infine allo stato **subepicardico**.
- Un'ampia zona di miocardio subepicardico (ed una parte di mediomioocardio) può essere salvata dalla riperfusione entro circa tre ore.



DANNO DA RIPERFUSIONE

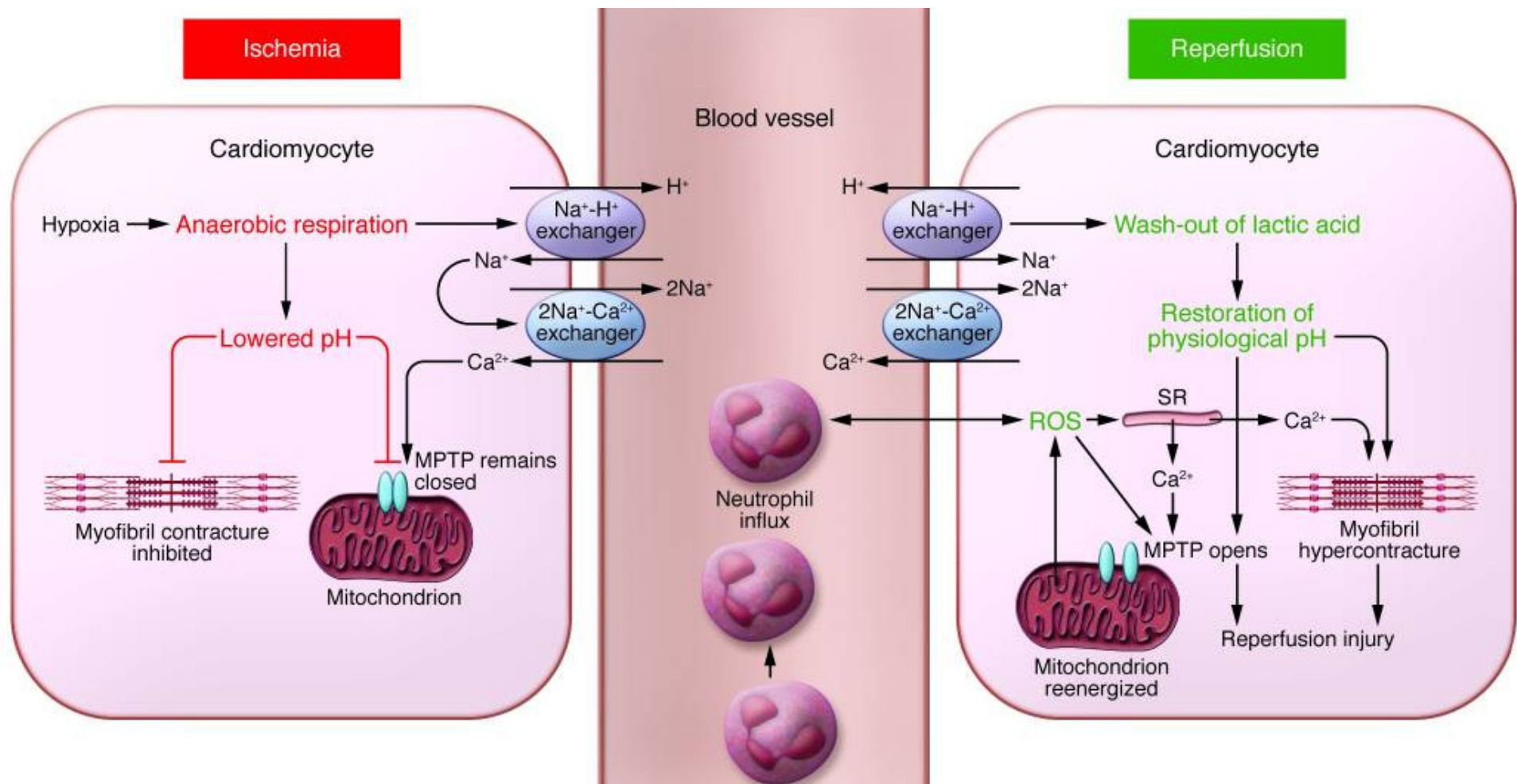
In dipendenza dell'intensità e della durata dell'ischemia un variabile numero di cellule, che alla fine dell'ischemia erano prossime al punto di non ritorno, possono morire dopo che si è ripristinato il flusso sanguigno per necrosi o per apoptosi.

Come avviene il danno da riperfusione?

Si pensa che durante la riperfusione vengano innescati **nuovi processi** in grado di provocare il danno, causando la morte di cellule che altrimenti sarebbero sopravvissute.

Diversi meccanismi sono stati proposti:

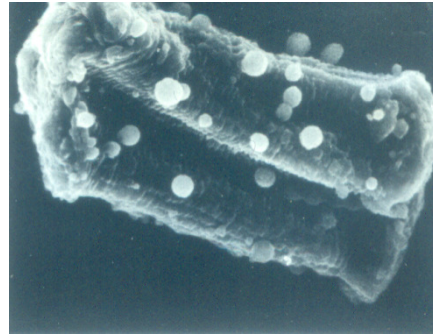
- Entrata massiccia di **Ca²⁺** → ↑ *uptake* Ca²⁺ da parte dei mitocondri → loro avvelenamento.
- Durante il processo di riossigenazione si può verificare ↑ **radicali liberi** dell'ossigeno da parte delle cellule parenchimali, endoteliali e dei leucociti.



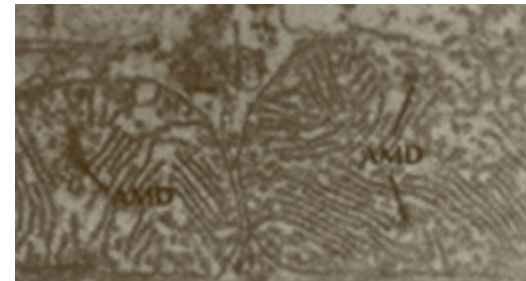
RIPERFUSIONE

Ruolo del calcio

- La riperfusione accelera la disgregazione dell'ultrastruttura dei miociti. Questi vanno incontro ad un **rigonfiamento esplosivo**.

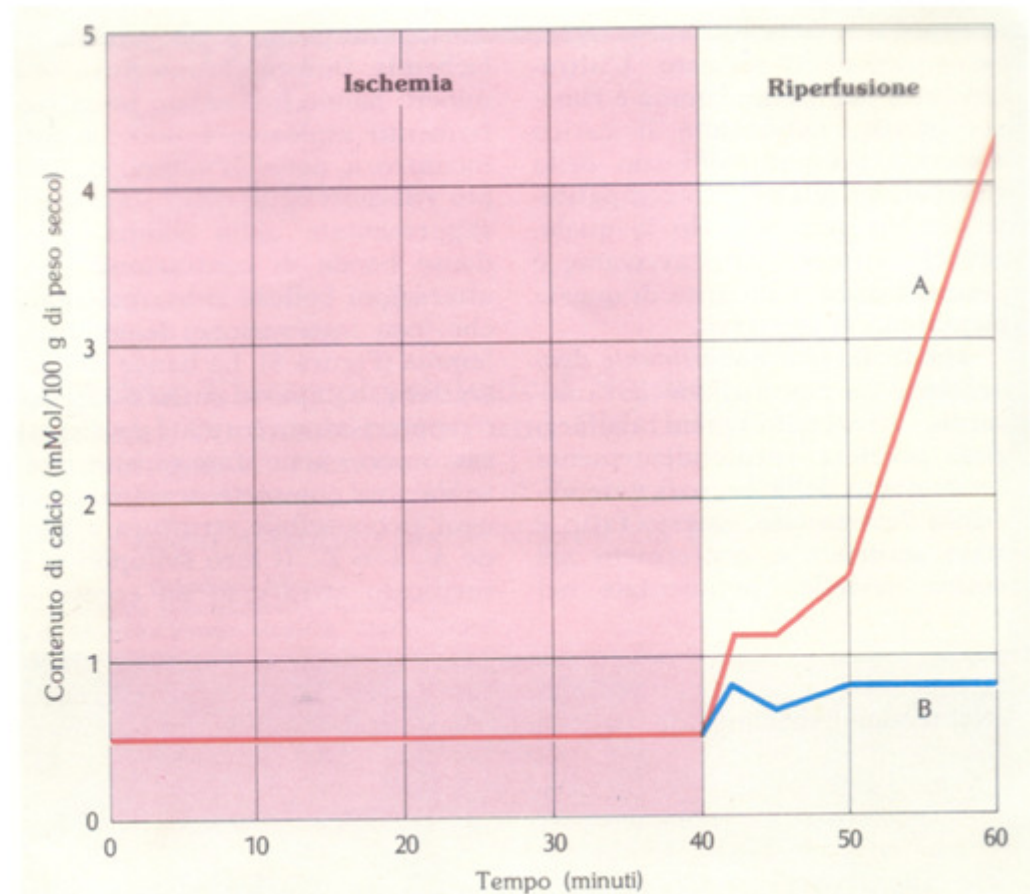


- La necrosi (ma anche apoptosi) si manifesta per la **perdita omeostasi calcica**.
- Parte del calcio si accumula sottoforma di accumuli granulari densi di fosfato di calcio (**sostanza amorfa=AMD**) nei mitocondri che appaiono rigonfi.



RIPERFUSIONE: Ruolo del calcio

- Un **sovraccarico miocardico di calcio** si stabilisce **soltanto** durante il periodo di **riperfusione** e non durante il periodo di danno ischemico irreversibile
- Sembra che il calcio affluisca nei miociti in conseguenza di alterazioni strutturali e funzionali del sarcolemma, che si sviluppano durante l'ischemia.
- **Con la riperfusione il calcio che diffonde nel tessuto iperemico costituisce una fonte illimitata di calcio capace di passare nelle cellule.**
- **Una parte dello ione intracellulare in eccesso si deposita nei mitocondri.**



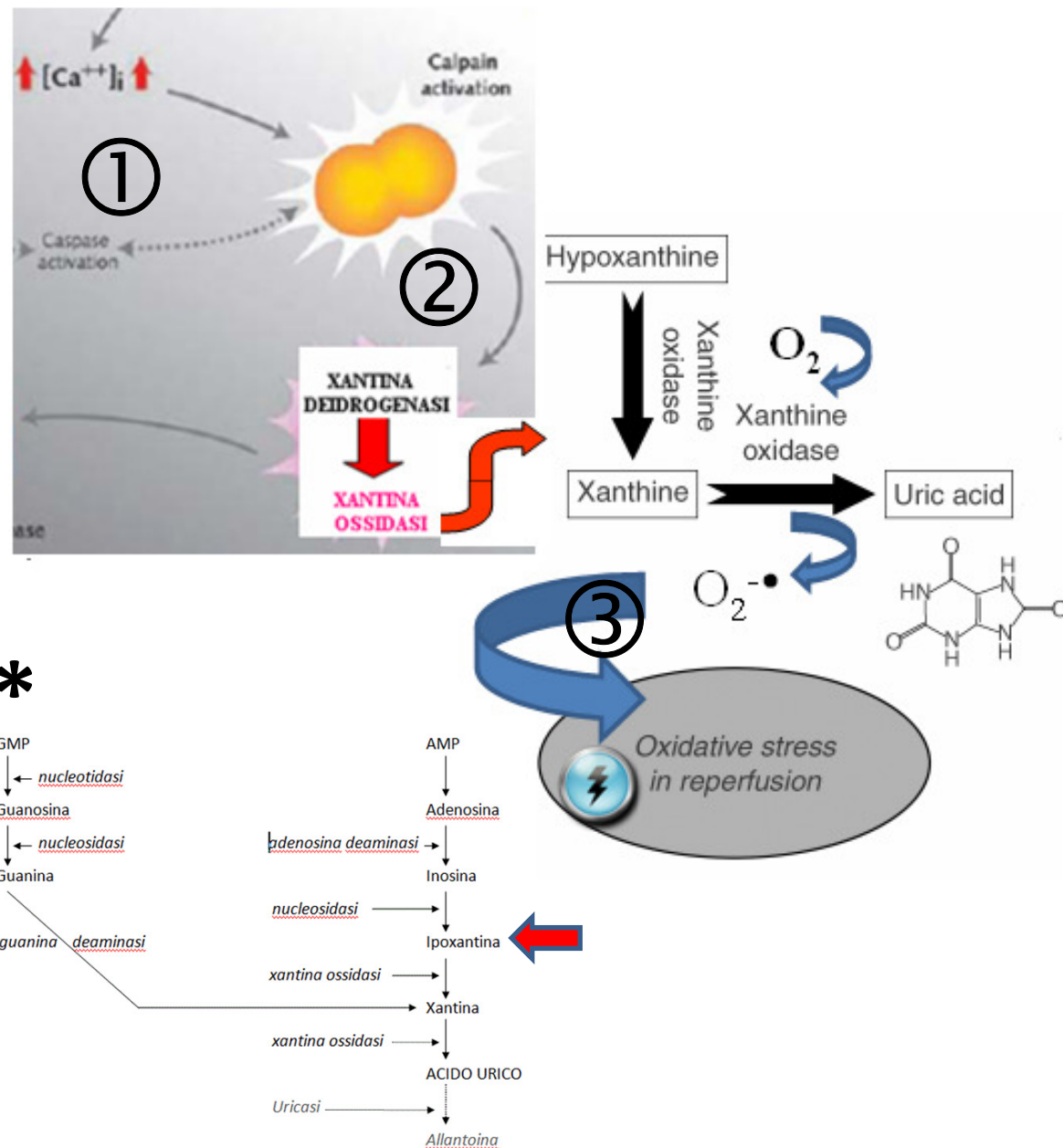
RIPERFUSIONE

Ruolo dei radicali liberi

Durante il processo di riossigenazione si può verificare **↑ radicali liberi** dell'ossigeno da parte delle cellule **parenchimali, endoteliali e dei leucociti**, in seguito a:

- Sistema **xantina-xantina ossidasi**: dal metabolismo dell'ATP viene prodotta ipoxantina, ad opera delle proteasi calcio dipendenti una xantina deidrogenasi viene trasformata in xantina ossidasi e in presenza di ossigeno **dalla xantina produce acido urico e O^{2-}** .
- Riduzione incompleta dell'ossigeno da parte dei mitocondri danneggiati (**disfunzione mitocondriale**) e compromissione dei sistemi antiossidanti cellulari possono essere compromessi dall'ischemia;
- Metabolismo ossidativo delle cellule infiammatorie, i tessuti colpiti mostrano spesso **un'infiltrazione di neutrofili**, richiamati da citochine e dalla > espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali e parenchimali ipossiche.

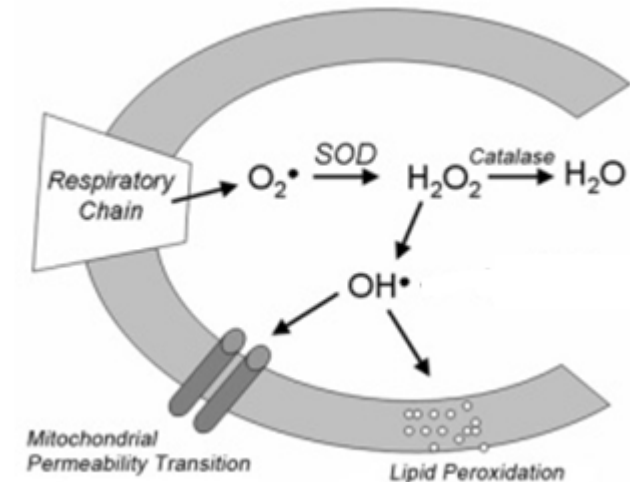
RIPERFUSIONE- Ruolo dei radicali liberi - SISTEMA XANTINA-XANTINA OSSIDASI



- ① L'accumulo di calcio citosolico porta all'attivazione di numerosi enzimi calcio-dipendenti (fosfolipasi, proteasi, endonucleasi).
- ② Tra gli enzimi attivati vi è la calpaina, una proteasi, che taglia irreversibilmente l'enzima xantina-deidrogenasi trasformandolo nell'isoforma xantina-ossidasi.
- ③ Quest'ultimo enzima ossida la ipoxantina (prodotta dalla degradazione dell'adenosina a sua volta derivante dal catabolismo dell'ATP*) ad acido urico usando come substrato l'ossigeno e producendo nel corso della reazione anione superossido, importante fonte di radicali liberi dell'ossigeno.

Disfunzione mitocondriale:

- danni alla membrana mitocondriale (causati dalle fosfolipasi), sommati agli
 - squilibri della concentrazione del calcio
- determinano disfunzioni alla catena di trasporto degli elettroni, con aumentata instabilità mitocondriale.



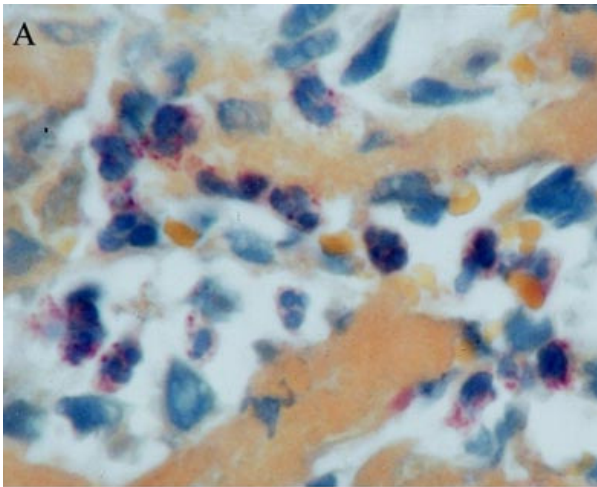
- Come risultato viene
 - aumentata la produzione di ROS mentre
 - si riduce la sintesi di ATP e
 - viene favorita l'apertura dei pori di transizione di permeabilità mitocondriale (PTP),
 - *con l'innesco della via intrinseca dell'apoptosi.*

Ruolo dei radicali liberi: cellule infiammatorie

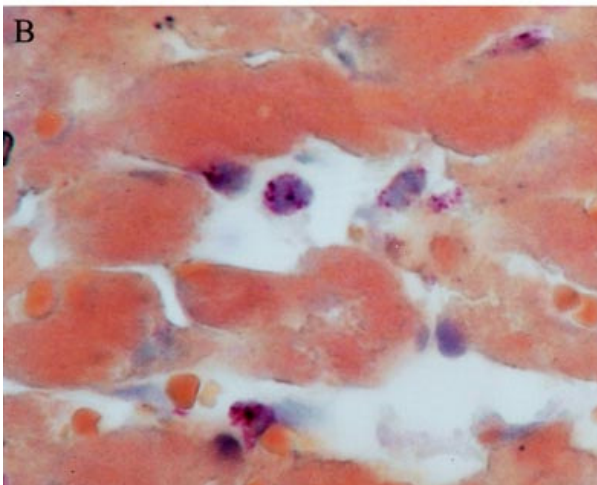
Article

Antibody Binding to Fas Ligand Attenuates Inflammatory Cell Infiltration and Cytokine Secretion, Leading to Reduction of Myocardial Infarct Areas and Reperfusion Injury

Hirokazu Shiraishi, Tetsuya Toyozaki, Yoshiaki Tsukamoto, Toshihiro Saito, Yoshiaki Masuda, Kenzo Hiroshima, Hidemi Ohwada, Nobuyuki Kobayashi and Michiaki Hiroe⁴. Lab Invest 2002, 82:1121–1129



- A) Cellule infiammatorie infiltrano il miocardio dopo la riperfusione.



- B) Se trattiamo con un “bloccante” dell’infiltrazione leucocitaria il numero di cellule si riduce notevolmente e di conseguenza anche la quantità di ROS da essi prodotta.

DANNO DA RIPERFUSIONE

TERAPIA

- Per ridurre il danno da ipossia: somministrazione di ATP.
- Per ridurre il danno da riperfusione (es. nei trapianti, nel congelamento, angioplastica...):

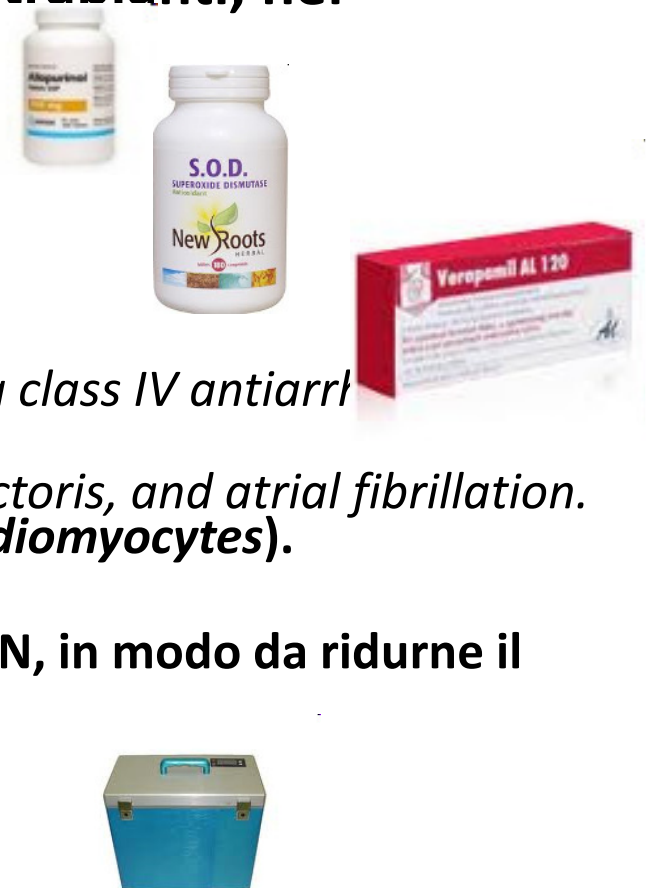
-ALLOPURINOLO, un inibitore della xantina ossidasi;

-SOD (converte il superossido ad H_2O_2);

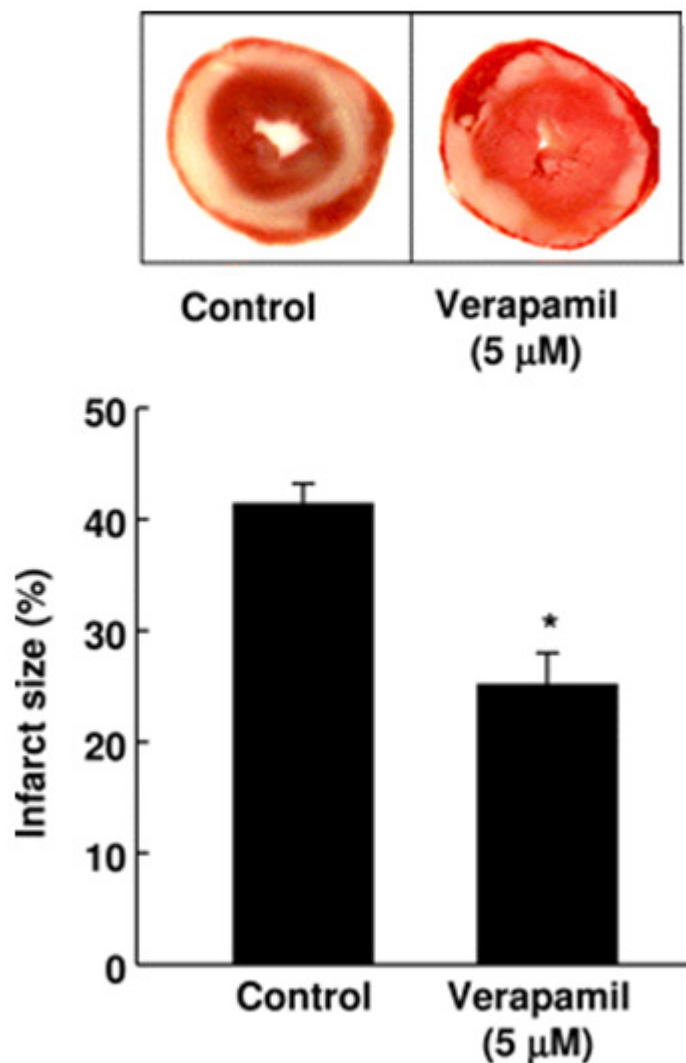
-Farmaci che bloccano l'influsso di calcio (**VERAPAMIL** a class IV antiarrhythmic agent and **a potent calcium channel blocker**.
It is used in the treatment of hypertension, angina pectoris, and atrial fibrillation. Verapamil prevents excessive calcium influx into cardiomyocytes).

-Anticorpi anti-citochine e molecole di adesione dei PMN, in modo da ridurre il reclutamento;

-Basse temperature (sfavoriscono il movimento ionico).



Infarcted (white) and **noninfarcted (red)** regions following I/R injury in hearts (rat) treated with verapamil following 30 min of global ischemia and 120 min of reperfusion.



0022-3566/07/2231-119-127\$20.00
THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS
Copyright © 2007 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
JPEP 223:119-127, 2007

Vol. 223, No. 1
127167/2230301
Printed in U.S.A.

N-Hydroxy-pyrroline Modification of Verapamil Exhibits Antioxidant Protection of the Heart against Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiac Dysfunction without Compromising Its Calcium Antagonistic Activity

Rajarsi Mandal, Vijay Kumar Kutala, Mahmood Khan, Iyyapu K. Mohan, Saradhadevi Varadharaj, Arun Sridhar, Cynthia A. Carnes, Tamás Kálai, Kálmán Hideg, and Periannan Kuppusamy

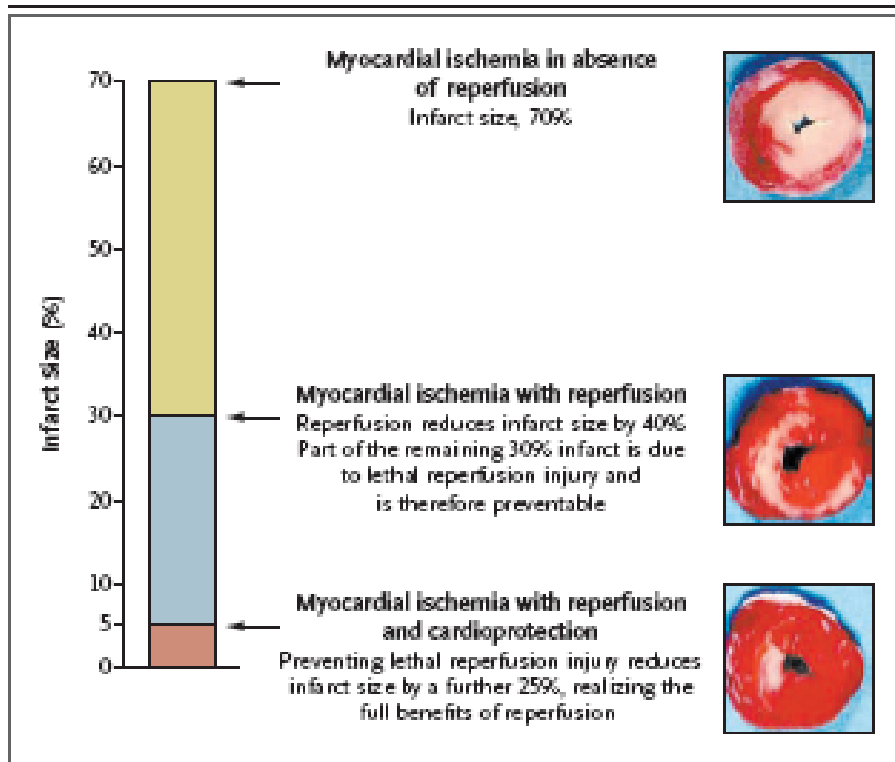


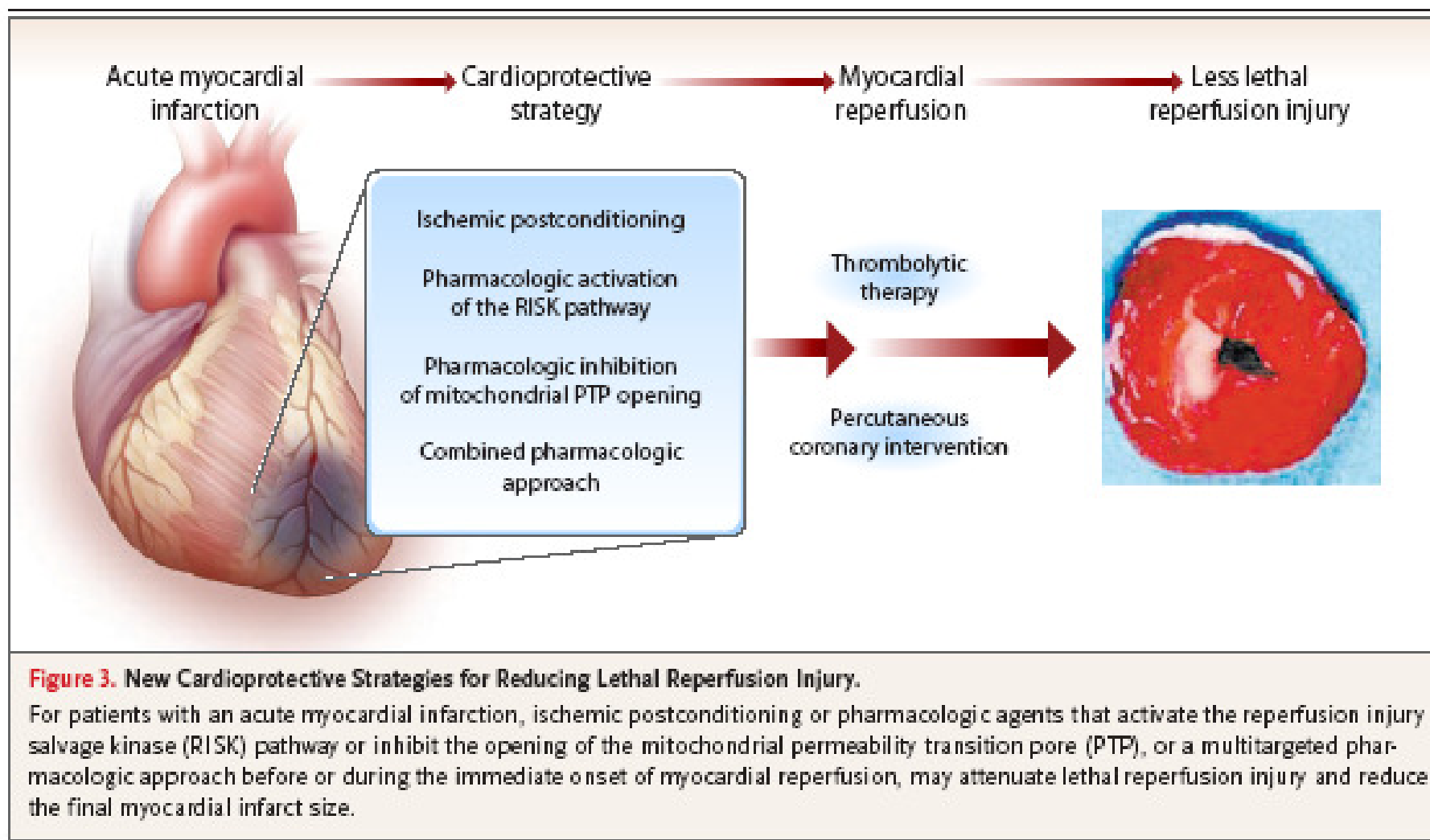
Figure 1. Contribution of Lethal Reperfusion Injury to Final Myocardial Infarct Size.

This hypothetical scheme shows the large reduction in myocardial infarct size obtained by early and successful myocardial reperfusion after a sustained episode of acute myocardial ischemia. The full benefits of myocardial reperfusion are not realized because of the presence of lethal reperfusion injury, which diminishes the magnitude of the reduction in infarct size elicited by myocardial reperfusion. This concept is revealed by the further reduction in myocardial infarct size obtained by preventing lethal reperfusion injury with the administration of a cardioprotective intervention at the beginning of myocardial reperfusion. Infarcted myocardium is depicted in pink, and the viable, at-risk myocardium is stained red. Infarct size is expressed as a percentage of the volume of myocardium at risk for infarction.

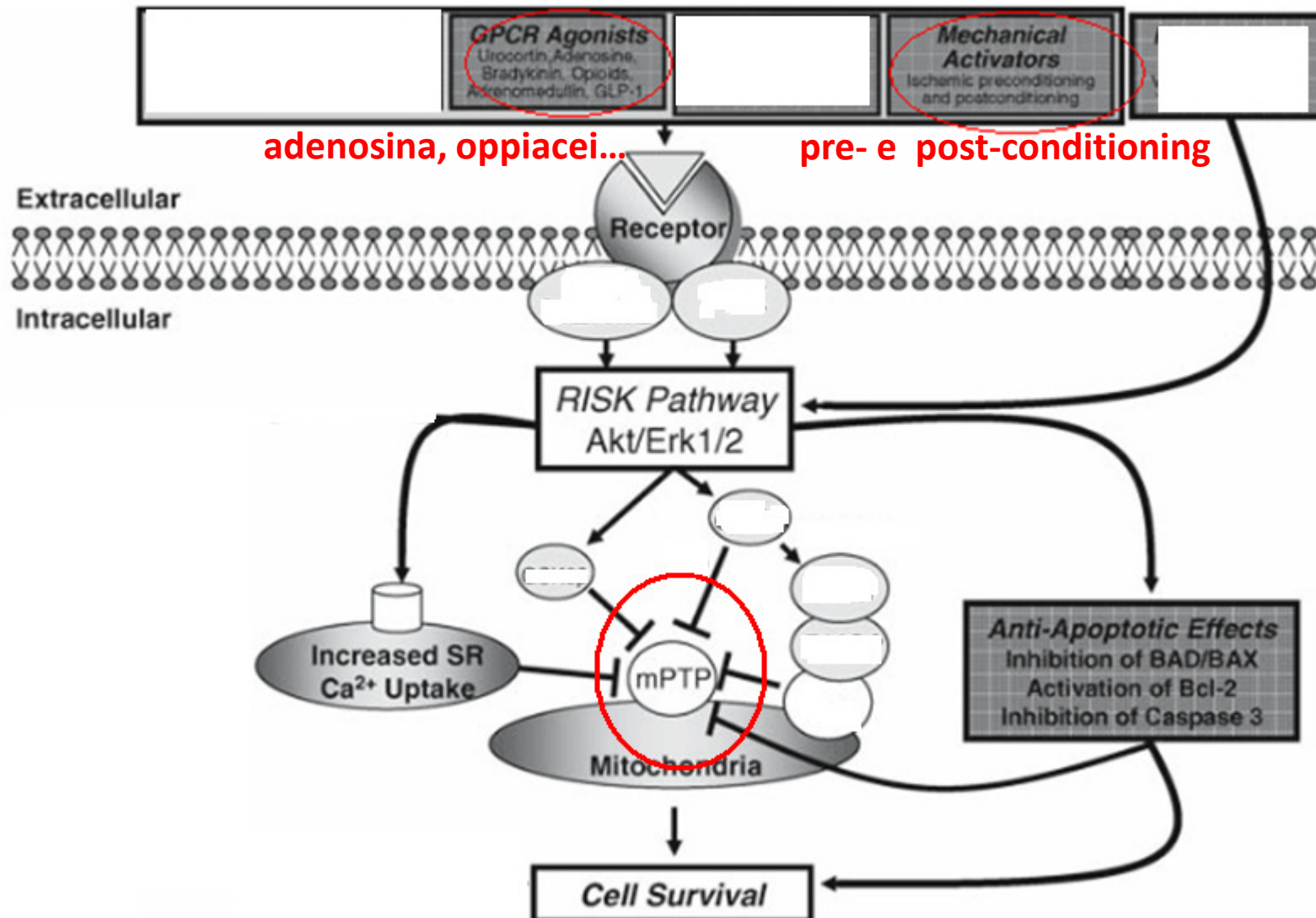
➤ Reperfusion injury is **responsible for 50% of infarct size**, so it became the target of research on cardiac protection.

➤ The concept of **pre-conditioning** (1969) establishes that multiple brief episodes of ischemia may protect the heart from a subsequent prolonged infarction.

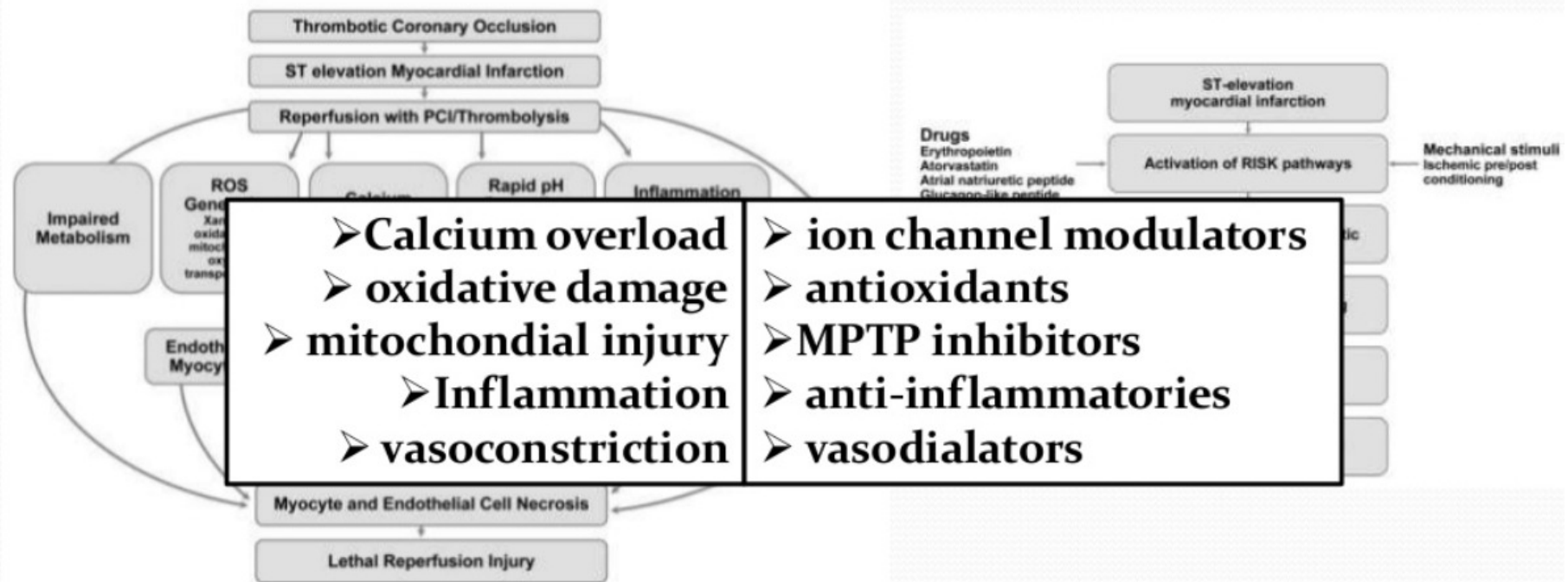
➤ Multiple repeated episodes of ischemia, in the beginning of reperfusion, would attenuate the reperfusion injury (2002). This technique, called **post-conditioning**, was used in patients in 2005, with beneficial short and long-term results.



Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection



Pharmacological cardioprotection



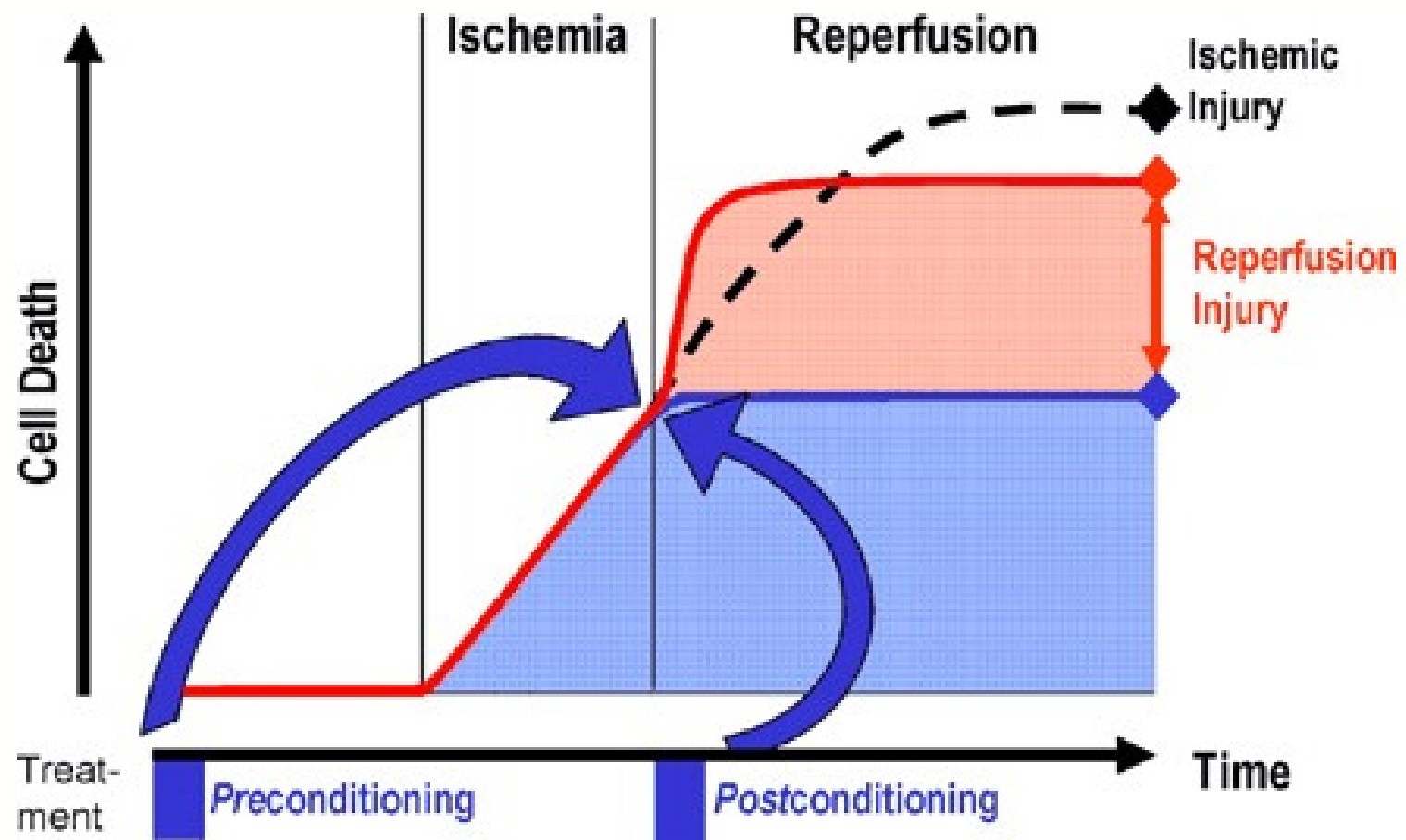
Mechanical therapeutic interventions for preventing myocardial reperfusion injury in patients undergoing PPCI

Table 1

Mechanical therapeutic interventions for preventing myocardial reperfusion injury in patients undergoing PPCI

Study	N	Therapeutic intervention	Result
IPost			
Staat et al. 2005 (66)	30	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon	Reduction of MI size by 36% (72-hr AUC CK); improved myocardial blush grade
Thibault et al. 2008 (94)	38	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon	Reduction of MI size by 40% (72-hr AUC CK); reduction of MI size by 39% at 6 mo, as assessed with SPECT; 7% increase in EF, as assessed with ECG, at one year
Lonborg et al. 2010 (95)	118	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon	Reduction of MI size by 19% at 3 mo, as assessed with CMR; 31% increase in myocardial salvage index
Sorensson et al. 2010 (96)	76	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon	No difference in 48-hr AUC CK-MB or Trop-T; no difference in myocardial salvage, as assessed with CMR, on days 7–9; significant increase in myocardial salvage in patients with large AAR (>30% of LV)
Tarantini et al. 2012 (97)	78	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon; IPost protocol delivered in stent	Trend toward increased MI size; increased adverse events
Freixa et al. 2012 (98)	79	Four 60-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon; IPost protocol delivered in stent	Worse myocardial salvage; no difference in MI size
Engstrom et al. 2012 (99); DANAMI-3	2,000	Four 30-s cycles of low-pressure inflation/deflation of angioplasty balloon	Ongoing phase 3 study investigating the effect of IPost on death and HHF
RIC			
Botker et al. (77, 100)	142	Four 5-min cycles of inflation/deflation of cuff placed on upper arm, in the ambulance	Increase in myocardial salvage index from 0.55 to 0.75; patients with anterior STEMI with occluded arteries showed most benefit
Rentoukas et al. 2010 (101)	92	Three 4-min cycles of inflation/deflation of cuff placed on upper arm, delivered at hospital prior to PPCI	Less STR and smaller Trop-I peak; additive effect with i.v. morphine
Therapeutic hypothermia			
Gotberg et al. 2010 (102); RAPID-MI-ICE	20	Cooling to 35°C prior to PPCI by i.v. infusion of 1–2 liters of cold saline and cooling with Philips InnerCool RTx Endovascular System	Reduction in MI size as % of AAR, as assessed with CMR at 4 days (30% vs 48%); 43% reduction in peak and cumulative Trop-T release
Erlinge et al. 2012 (103); CHILL-MI	120	Cooling to 35°C prior to PPCI by i.v. infusion of 1–2 liters of cold saline and cooling with Philips InnerCool RTx Endovascular System	Ongoing multicenter study investigating whether cooling prior to PPCI reduces MI size (as a % of AAR) on CMR at 4 days
Therapeutic hyperoxemia			
O'Neill et al. 2007 (78); AMIHOT I	269	IC hyperbaric hyperoxemic reperfusion started after PPCI and continued for 90 min	No difference in 14-day MI size as assessed with SPECT; patients with anterior STEMI <6 h showed improvements ^a
Stone et al. 2009 (104); AMIHOT II	281	IC hyperbaric hyperoxemic reperfusion started after PPCI and continued for 90 min	No difference in 14-day MI size as assessed with SPECT ^a

^aPooled analysis of the results from AMIHOT I/II suggested beneficial effects on MI size. CMR, cardiac MRI; EF, ejection fraction; HHF, hospitalization for heart failure; STR, ST-segment resolution. CK, creatine kinase; CK-MB, CK (muscle and brain iso-enzyme); IC, intracoronary; Trop-T, troponin-T; Trop-I, troponin-I.



Take home message

Currently no treatment proven for myocardial reperfusion injury

Ischemic conditioning and pharmacological cardioprotections

Proof of concept clinical studies showed mixed results

Preservation solutions for solid organ transplantation.

[Wilson CH](#), [Brook NR](#), [Talbot D](#).

Mini Rev Med Chem. 2006 Oct;6(10):1081-90

Table 2. Potential Clinical Viability of Human Organs for Transplantation After Storage at 4°C with no Primary Warm Ischaemia (Abridged from [131])

Organ	Number of Hours (approx.)
Heart	6
Lung	8
Small Bowel	12
Liver	20
Pancreas	20
Kidney	72



Spesso i potenziali donatori “non-heart beating donors”.

Questa *warm ischaemia* riduce notevolmente il periodo di conservazione e spesso rende l'organo inutilizzabile.



Ogni **minuto** di *warm ischaemia* equivale ad un **ora** di *cold ischaemia*.

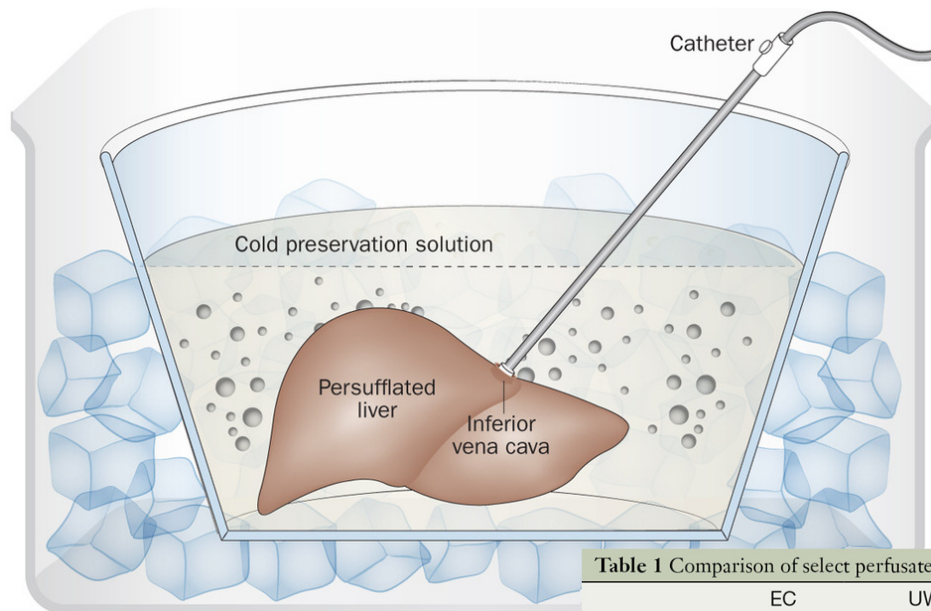


Table 1 Comparison of select perfusate solutions

	EC	UW	HTK	CEL	PER	Papworth	Plegisol
Study	Aziz (8)	Roskott (9)	Roskott (9), 't Hart (10)	Roskott (9), 't Hart (10)	Aziz (8)	Marasco (11), Divisi (7)	Chambers (6)
IC/EX	IC	IC	EX	EX	EX	EX	EX
Na ⁺	10	25	15	100	138	115	120
K ⁺	115	120	10	15	6	3	16
Impermeant/ colloid	Glucose	LactoB, raffinose, HES	Mannitol	LactoB, mannitol	Dextran	Mannitol, albumin	–
Buffer	Phos, bicarb	Phos	Histidine	Histidine	Phos	–	Bicarb
Antioxidant	–	AlloP, GSH	Trp, mannitol	GSH, mannitol	–	Mannitol	–
Osmolarity (mOsm/L)	375	330	310	320	292	440	320
Ca ²⁺	–	–	0.02	0.25		Und	1.2
Mg ²⁺	–	5	4	13	0.8	–	16
Cl [–]	15	20	32	–	142	Und	160
Glucose	180	–	–	–	5	–	–
Others			α -KG		SO ₄ ^{2–} 0.8, dextran 40 g/L	Donor blood heparin	–

All units expressed in mmol/L unless otherwise indicated. Abbreviations: IC, intracellular; EX, extracellular; EC, Euro Collins; UW, University of Wisconsin; HTK, histidine-tryptophan-ketoglutarate; CEL, Celsior; PER, Perfadex; Und, undetermined; LactoB, lactobionate; HES, hydroxyethyl starch; Phos, phosphate; Bicarb, bicarbonate; GSH, glutathione; AlloP, allopurinol; Trp, tryptophan; α -KG, ketoglutarate.

Lo scopo della **conservazione d'organo è quello di **prevenire il danno da I/R** impiegando adeguati interventi biochimici, farmacologici, ormonali e immunologici durante l'espanto, il trasporto, l'impianto e la riperfusione dell'ospite.**

IPOTERMIA

Sopprime (10°C) attività di molti enzimi e movimenti ionici.

RAPPORTO TRA I CATIONI

K elevato concepito per ridurre lavoro della pompa sodio/potassio, il principale enzima cellulare *ATP consuming*, ma determina depolarizzazione della membrana (associata a disfunzione endoteliale)

SUBSTRATI ENERGETICI

Tuttavia molte soluzioni contengono substrati energetici per permettere la rapida rigenerazione di ATP alla riperfusione.

pH

Il pH ottimale è di 7.2 o leggermente acido.

ANTI-OSSIDANTI:

Allopurinolo, glutatione ridotto, destrano, lactobionato..., SOD (clinical trials riduce stress oxi endot dopo impianto), **vitamina E**....

CALCIO

La rimozione totale si è dimostrata deleteria, la tendenza è quella di mantenere il calcio nelle soluzioni di conservazione, ma in concentrazione inferiore a quella sierica.

Inoltre bloccanti di un canale del calcio (**verapamil**) non hanno dimostrato alcun effetto in trial umani, ma in trapianto sperimentale si (???)

ALTRI ADDITTIVI

Vasodilatatori, anti-coagulanti (eparina), aminoacidi, steroidi, fattori di crescita.

Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade

Edgardo E. Guibert** Alexander Y. Petrenko** Cecilia L. Balaban** Alexander Y. Somov**
Joaquin V. Rodriguez** Barry J. Fuller**

Table 1. Composition of preservation solutions^a

Component	Euro-Collins	UW (Viaspan®)	Celsior®	Custodiol®	IGL-1®
NaCl	10.0	–	–	15.0	–
KCl	108.0	–	15.0	9.0	–
Potassium hydrogen 2-ketoglutarate	–	–	–	1.0	–
Lactobionate	–	100.0	80.0	–	100.0
PEG 35,000	–	–	–	–	0.08
MgCl ₂ 6 H ₂ O	–	–	13.0	4.0	–
NaCO ₂ H	10.0	–	–	–	–
NaOH	–	25.0	100	–	*
KOH	–	100.0	–	–	–
MgSO ₄	–	5.0	–	5.0	5.0
Glutamic acid	–	–	20.0	–	–
Glutathione	–	3.0	3.0	–	3.0
Glucose	180.0	–	–	–	–
Histidine HCl H ₂ O	–	–	30.0	18.0	–
Histidine	–	–	–	180.0	–
Adenosine	–	5.0	–	–	5.0
Allopurinol	–	1.0	–	–	1.0
Tryptophan	–	–	–	2.0	–
Mannitol	–	–	60.0	30.0	–
Raffinose	–	30.0	–	–	30.0
CaCl ₂ 2 H ₂ O	–	–	0.25	0.015	0.08
Pentafraction (HES), g/l	–	50.0	–	–	–
Phosphate	60.0	25.0	–	–	25.0
Insulin, U/l	–	40.0	–	–	–
Dexamethasone, mg/l	–	16.0	–	–	–
Penicillin G, U/l	–	200,000	–	–	–
Na ⁺	10.0	25.0	100.0	15.0	125.0
K ⁺	115.0	125.0	15.0	10.0	30.0
pH	7.30 (0 °C)	7.40 (25 °C)	7.30 (20 °C)	7.02–7.20 (25 °C)	7.40 (25 °C)
Osmolality, mosmol/kg H ₂ O	340	320	242–368	310	320