

Université de Montréal

Anticoagulothérapie post-thrombolyse et protection myocardique post-ischémique

par
Danielle Libersan

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Août, 1997

© Danielle Libersan, 1997



W
4
U58
1998
V.035

Université de Montréal

Pharmacologie des médicaments

Dr. J. J. J.

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques
en Pharmacologie

1998



Pharmacologie des médicaments

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Anticoagulothérapie post-thrombolyse et protection myocardique post-ischémique

présentée par:

Danielle Libersan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Gilles Caillé	président du jury
Jean-Gilles Latour	directeur de recherche
Chantal Lambert	codirectrice de recherche
Gaëtan Jasmin	membre du jury
Robert Guidoin	examineur externe
Chantal Pharand	représentante du doyen

Thèse acceptée le: 16 décembre 1997

Sommaire

Afin d'améliorer l'efficacité de la reperfusion à limiter la taille de l'infarctus, nous avons étudié les effets cardioprotecteurs de certains antithrombotiques sur les lésions de reperfusion dans un modèle canin de 90 minutes d'occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante gauche suivie de 6 heures de reperfusion en présence d'une sténose critique résiduelle.

Nous avons en premier lieu déterminé l'influence d'une sténose critique sur l'accumulation des plaquettes intramyocardiques et le développement de l'infarctus en cours de reperfusion. Les résultats de cette étude démontrent que la sténose critique accentue de 55% l'accumulation des plaquettes et entraîne un accroissement de l'infarctus d'environ 40% ($P < .05$) comparativement à un groupe témoin sans sténose critique. L'induction d'une thrombocytopénie prévient cet accroissement et une neutropénie simultanée est sans effet additionnel. En l'absence de sténose, la thrombocytopénie ne modifie pas la taille ultime de l'infarctus. La présence d'une sténose critique pendant la reperfusion compromet donc la sauvegarde du myocarde post-ischémique en augmentant la taille de l'infarctus par un mécanisme impliquant les plaquettes.

Dans le même modèle, nous avons par la suite évalué les effets cardioprotecteurs de certains anticoagulants (héparine et énoxaparine) et de la streptokinase, un agent thrombolytique, sur la sauvegarde du myocarde reperfusé. Administrée 5 minutes avant la reperfusion, l'énoxaparine (2128 U anti-Xa; 380 U/h) réduit de plus de 50% la taille de l'infarctus ($P < .05$) comparativement au groupe témoin, tandis que l'héparine (2800 UI; 500 U/h) et la streptokinase (500000 UI) sont inefficaces. L'administration d'énoxaparine est aussi associée à une inhibition significative de l'accumulation des plaquettes-In^{III} et des

neutrophiles intramyocardiques. De plus, l'énoxaparine inhibe l'adhésion plaquettes-neutrophiles et la formation de rosettes *in vitro*, ce qui suggère que la réduction de la taille de l'infarctus observée dans ce groupe pourrait être en partie due à l'inhibition de la fonction de la P-sélectine.

Afin d'approfondir le rôle des plaquettes, nous avons utilisé deux antiplaquettaires: l'aspirine (ASA), couramment utilisée en post-thrombolyse coronarienne et un inhibiteur spécifique (Lamifiban) des récepteurs GPIIb/IIIa qui sont essentiels pour l'agrégation plaquettaire. Dans notre étude, l'ASA ne modifie pas l'accumulation des plaquettes ni la taille de l'infarctus, à des doses intraveineuses variant de 2 à 12 mg/Kg, malgré une diminution significative de l'accumulation des neutrophiles dans le myocarde reperfusé. Par contre, le Lamifiban (360µg/Kg;6µg/Kg/min) réduit d'environ 48% ($P<.05$) l'accumulation des plaquettes et la taille de l'infarctus, sans modifier la capture des neutrophiles. Cependant, l'association d'ASA à l'énoxaparine abolit les effets protecteurs de l'énoxaparine par des mécanismes pouvant impliquer une réduction de la synthèse de PGI_2 par le myocarde reperfusé en présence d'ASA. La présence d'une sténose critique semble donc favoriser l'activation des plaquettes par des voies indépendantes de la cyclo-oxygénase.

Nous concluons que l'administration d'énoxaparine ou de Lamifiban au moment et pendant la reperfusion protège le myocarde post-ischémique. Cet effet semble impliquer une inhibition de l'adhésion entre les plaquettes et les neutrophiles dans l'infarctus reperfusé, adhésion qui est dépendante de la P-sélectine. L'efficacité du Lamifiban à réduire l'infarctus confirme donc le rôle des plaquettes dans la progression de l'infarctus en cours de reperfusion en présence d'une sténose critique résiduelle.

Tables des matières

Sommaire	iii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1

Partie 1: Revue de littérature

Chapitre 1: Physiopathologie de l'ischémie et des lésions de reperfusion

1.1	Introduction	3
1.2	Métabolisme énergétique en cours d'ischémie	4
1.3	Altérations ultrastructurales	6
	1.3.1 Lésions myocytaires	6
	1.3.2 Lésions microvasculaires	8
1.4	Nécrose myocardique	10
	1.4.1 Perte de phosphates à haute énergie	10
	1.4.2 Surcharge calcique	11
	1.4.3 Production de radicaux libres dérivés de l'oxygène	14
1.5	Apoptose myocardique	20
1.6	Progression de l'infarctus	22
	1.6.1 Occlusion coronarienne et circulation collatérale	22
	1.6.2 Circulation collatérale et infarctus	26

1.7	Préconditionnement ischémique	27
1.8	Reperfusion myocardique	31
1.8.1	Effets bénéfiques de la reperfusion	32
1.8.2	Altérations de reperfusion (<i>reperfusion injury</i>)	32
1.8.1.1	Arythmies de reperfusion	33
1.8.1.2	Accroissement de la nécrose	35
1.8.1.3	Sidération myocardique (<i>stunning</i>)	35

Chapitre 2: Neutrophiles et plaquettes dans l'ischémie-reperfusion

2.1	Introduction	39
2.2	Rôle des neutrophiles dans l'ischémie-reperfusion	41
2.2.1	Mobilisation et activation des neutrophiles dans l'infarctus	42
2.2.2	Adhésion des neutrophiles dans l'ischémie-reperfusion	46
2.2.2.1	La famille des sélectines	48
2.2.2.2	La famille des intégrines et des immunoglobulines	51
2.2.3	Libération de médiateurs cytotoxiques	54
2.2.4	Phénomène de non reperfusion et d'hyporeperfusion (<i>no-reflow</i>)	60
2.2.5	Inhibition de la fonction des neutrophiles et protection myocardique ...	63
2.3	Rôle des plaquettes dans l'ischémie-reperfusion	66
2.3.1	Mobilisation des plaquettes dans l'infarctus	68
2.3.2	Activation et sécrétion plaquettaires	70
2.4	Interactions entre les plaquettes et les neutrophiles	75

Chapitre 3: Héparines et agents thrombolytiques dans l'ischémie-reperfusion

3.1	Introduction	79
3.2	Physiologie de la coagulation	80
3.3	Héparine et héparine de bas poids moléculaire	85
3.3.1	Mécanismes d'action des héparines	87
3.3.1.1	Antithrombine III et facteur X	87
3.3.1.2	Cofacteur II de l'héparine	88
3.3.1.3	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire	90
3.3.2	Activités extra-anticoagulantes des héparines	92
3.3.2.1	Effets sur l'hémostase	92
3.3.2.2	Effets sur l'inflammation	94
3.3.2.3	Autres effets	97
3.3.3	Modulation de l'activité anticoagulante des héparines	98
3.4	Physiologie de la fibrinolyse	99
3.5	Activateurs fibrinolytiques	101
3.6	Coagulation dans l'ischémie-reperfusion	103
3.7	Héparines et thrombolytiques dans la protection myocardique	105

Chapitre 4: Inhibiteurs plaquettaires dans l'ischémie-reperfusion

4.1	Introduction	110
4.2	Aspirine et fonction plaquettaire	111
4.2.1	Mécanismes d'action de l'aspirine sur l'hémostase	111

4.2.1.1	Inhibition de la cyclo-oxygénase	111
4.2.1.1.1	Sténose critique	115
4.2.1.2	Propriétés anti-inflammatoires	117
4.3	Inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa plaquettaire	120
4.4	Inhibition de la fonction plaquettaire et protection myocardique	123

Partie 2: Contributions originales

Chapitre 5: Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs

5.1	Résumé	127
5.2	Introduction	127
5.3	Matériel et Méthodes	128
5.4	Résultats	130
5.5	Discussion	132
5.6	Bibliographie	136

Chapitre 6: The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog

6.1	Résumé	139
6.2	Introduction	140
6.3	Matériel et Méthodes	141
6.4	Résultats	146
6.5	Discussion	150

6.6	Bibliographie	155
-----	---------------------	-----

Chapitre 7: Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog

7.1	Résumé	169
7.2	Introduction	170
7.3	Matériel et Méthodes	172
7.4	Résultats	177
7.5	Discussion	180
7.6	Bibliographie	186

Chapitre 8: Combination of aspirin with a low molecular weight heparin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog

8.1	Résumé	204
8.2	Introduction	205
8.3	Matériel et Méthodes	206
8.4	Résultats	211
8.5	Discussion	214
8.6	Bibliographie	218

Chapitre 9: GPIIb/IIIa receptor blockade at reperfusion reduces infarct size in the dog

9.1	Résumé	233
9.2	Introduction	234
9.3	Matériel et Méthodes	236
9.4	Résultats	240

9.5	Discussion	242
9.6	Bibliographie	246
	Discussion	258
	Conclusion	263
	Bibliographie	264
	Remerciements	xvi

Liste des tableaux

Tableau 1-1: Principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose	22
Tableau 5-1: Groupes à l'étude et exclusions	130
Tableau 5-2: Caractéristiques des groupes et données hémodynamiques	131
Tableau 5-3: Taille de l'infarctus et débit collatéral transmural	132
Tableau 5-4: Débits myocardiques collatéraux et régionaux	132
Tableau 6-1: Taille de l'infarctus et débits myocardiques collatéraux et régionaux . . .	166
Tableau 7-1: Caractéristiques des groupes et données hématologiques	194
Tableau 7-2: Données hémodynamiques	195
Tableau 7-3: Taille de l'infarctus et débits myocardiques collatéraux et régionaux . . .	196
Tableau 8-1: Caractéristiques des groupes et données hématologiques	228
Tableau 8-2: Données hémodynamiques	229
Tableau 8-3: Taille de l'infarctus et débits myocardiques collatéraux et régionaux . . .	230
Tableau 9-1: Caractéristiques des groupes et données hématologiques	252
Tableau 9-2: Données hémodynamiques	253

Liste des figures

Figure 3-1: Cascade de coagulation	84
Figure 5-1: Relation entre l'infarctus et le débit myocardique collatéral transmural . . .	133
Figure 5-2: Accumulation de neutrophiles-In ¹¹¹ par gramme de tissu	134
Figure 5-3: Accumulation de plaquettes-In ¹¹¹ par gramme de tissu	134
Figure 5-4: Neutrophiles circulants pendant l'occlusion et la reperfusion	135
Figure 5-5: Plaquettes circulantes pendant l'occlusion et la reperfusion	135
Figure 6-1: Relation entre l'infarctus et le débit myocardique collatéral transmural . . .	161
Figure 6-2: Accumulation de plaquettes-In ¹¹¹ par gramme de tissu	162
Figure 6-3: Accumulation de neutrophiles par gramme de tissu	163
Figure 6-4: Temps de coagulation	164
Figure 6-5: Inhibition de l'adhésion entre les plaquettes et les neutrophiles	165
Figure 7-1: Relation entre l'infarctus et le débit myocardique collatéral transmural . . .	197
Figure 7-2: Accumulation de plaquettes-In ¹¹¹ par gramme de tissu	198
Figure 7-3: Accumulation de neutrophiles par gramme de tissu	199
Figure 7-4: Index de peroxydation lipidique	200
Figure 7-5: Agrégation plaquettaire au collagène	201
Figure 7-6: Différences artérioveineuses transcardiaques de la PGF _{1α}	202
Figure 8-1: Accumulation de plaquettes-In ¹¹¹ par gramme de tissu	224
Figure 8-2: Accumulation de neutrophiles par gramme de tissu	225
Figure 8-3: Temps de coagulation	226
Figure 8-4: Différences artérioveineuses transcardiaques de la PGF _{1α}	227

Figure 9-1: Taille de l'infarctus et de la zone à risque	254
Figure 9-2: Relation entre l'infarctus et le débit myocardique collatéral transmural ...	255
Figure 9-3: Ratio d'accumulation de plaquettes-In ¹¹¹	256
Figure 9-4: Agrégation plaquettaire à l'ADP et à l'épinéphrine	257

Liste des abréviations

ADP:	Adénosine diphosphate
AINS:	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMP:	Adénosine monophosphate
ASA:	Aspirine (acide acétylsalicylique)
ATIII:	Antithrombine III
ATP:	Adénosine triphosphate
CIIH:	Cofacteur II de l'héparine
Coll.:	Collaborateurs
COX:	Cyclo-oxygénase
F:	Facteur de coagulation
FADH ₂ :	Flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
fMLP:	f-méthionine-leucine-phénylalanine
FN-κB:	Facteur nucléaire κB
FT:	Facteur tissulaire
GMPC:	Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
GP:	Glycoprotéine
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HBPM:	Héparine de bas poids moléculaire
HETE:	Acide hydroxyéicosatétraénoïque
HPETE:	Acide hydroperoxyéicosatétraénoïque
ITXS:	Inhibiteur de la thromboxane synthétase
LT:	Leucotriène

MAC:	Complexe d'attaque membranaire
NADH:	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NO:	Monoxyde d'azote
O ₂ ⁻ :	Anion superoxyde
·OH:	Radical hydroxyle
PAF:	Facteur d'activation plaquettaire
PF4:	Facteur plaquettaire 4
PG:	Prostaglandine
PGI ₂ :	Prostacycline
PKC:	Protéine kinase C
RGD:	Arginine-Glycine-Aspartate
SK:	Streptokinase
sLe ^x :	sialyl Lewis ^x
SOD:	Superoxyde dismutase
TFPI:	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale- α
TPA:	Activateur du plasminogène tissulaire
TX:	Thromboxane
vWF:	Facteur von Willebrand

Remerciements

Je tiens à remercier ceux qui ont contribué à ma formation académique et scientifique spécialement les Docteurs Jean-Gilles Latour et Chantal Lambert. Je voudrais remercier particulièrement Robert Clément, Claudette Léger-Gauthier et Duc Tran pour leur précieuse collaboration et sans qui ces travaux n'auraient pu être réalisés. Je remercie également Nicole Serruys pour la mise en page de ce document ainsi qu'Annette Prost pour la vérification du français.

Je remercie le Département de pharmacologie et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal ainsi que le laboratoire de Pathologie Expérimentale de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour leur soutien financier.

Introduction

La reperfusion précoce de l'artère coronaire thrombosée est l'intervention la plus efficace pour limiter le développement de la nécrose, préserver la fonction ventriculaire gauche et améliorer la survie du patient suite à un infarctus aigu du myocarde. Cependant, des études expérimentales et cliniques faites au cours des 25 dernières années ont clairement démontré que les effets bénéfiques de la reperfusion sur le myocarde ischémique pouvaient être atténués par un ensemble de phénomènes physiopathologiques complexes associés à la reperfusion elle-même, les lésions de reperfusion. Parmi ces phénomènes délétères, nous pourrions citer la production et la libération de médiateurs cytotoxiques tels que les radicaux libres dérivés de l'oxygène, les enzymes lysosomiales et les métabolites lipidiques. L'accumulation massive de neutrophiles et de plaquettes, la défaillance microcirculatoire associée au phénomène de non reperfusion et à la libération de substances bioactives ainsi que la perte de relaxation vasculaire peuvent compromettre la survie du myocarde post-ischémique.

La compréhension accrue des mécanismes d'action sous-jacents aux lésions de reperfusion a incité le développement de nouvelles stratégies pharmacologiques ayant pour but d'améliorer l'efficacité de la reperfusion en interférant avec l'un ou plusieurs de ces phénomènes. Ainsi, des agents pharmacologiques pouvant protéger le myocarde ischémique pendant la reperfusion pourraient s'avérer bénéfiques dans le contexte, par exemple, de la thrombolyse coronarienne, en limitant le développement de l'infarctus ainsi que la morbidité et la mortalité associées.

Outre le Lamifiban qui est un inhibiteur spécifique des récepteurs plaquettaires IIb/IIIa, les anticoagulants tels l'héparine et l'énoxaparine, la streptokinase ainsi que l'aspirine

possèdent plusieurs effets indépendants de leur activité pharmacologique connue et qui sont susceptibles d'interférer à différents niveaux sur les lésions de reperfusion, donc de protéger le myocarde post-ischémique. Des études ont, en outre, démontré l'efficacité de ces agents en tant que piègeurs de radicaux libres, inhibiteurs de la fonction des neutrophiles et des plaquettes et modulateurs de la réaction inflammatoire. L'inhibition de un ou plusieurs phénomènes impliqués dans la pathogenèse des lésions de reperfusion peut s'avérer suffisante pour atténuer de façon significative les dommages myocardiques et sauvegarder le myocarde compromis. Cependant, très peu d'études *in vivo* ont été réalisées avec ces agents dans le contexte de l'ischémie-reperfusion myocardique et aucune étude n'a encore documenté les effets cardioprotecteurs de l'énoxaparine et des inhibiteurs des GPIIb/IIIa sur la réduction de la taille ultime de l'infarctus en cours de reperfusion.

La présente étude a donc pour but de documenter, dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion, l'efficacité des anticoagulants héparine et énoxaparine, du thrombolytique streptokinase et des antiplaquettaires aspirine et Lamifiban administrés quelques minutes avant le début et pendant la reperfusion sur la réduction de la taille ultime de l'infarctus. Nous établirons leurs effets sur la séquestration des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé et nous documenterons la relation existante entre les plaquettes en circulation et la présence d'une sténose critique résiduelle sur la progression de l'infarctus en cours de reperfusion.

Partie 1: Revue de littérature

Chapitre 1

Physiopathologie de l'ischémie et des lésions de reperfusion

1.1 Introduction

L'ischémie myocardique est consécutive à l'occlusion soudaine d'une artère coronaire majeure suite à un phénomène athérosclérotique, thrombotique ou vasospastique. Si le débit sanguin coronaire, qui maintient le métabolisme myocardique en état d'équilibre, est rapidement rétabli, les cellules myocardiques retrouveront une structure et une fonction normales. Cependant, si l'ischémie est intense et persistante, les cardiomyocytes deviendront irréversiblement altérés et il y aura nécrose tissulaire. C'est notamment le cas de l'infarctus aigu du myocarde.

De nouvelles modalités thérapeutiques, comme le traitement thrombolytique et les techniques de revascularisation chirurgicale, ont permis le rétablissement rapide de l'apport sanguin au niveau du myocarde ischémique et assure, de ce fait, la survie de l'organe compromis. Cependant, bien que la reperfusion soit actuellement le seul outil efficace pour sauvegarder le tissu ischémique, celle-ci est associée à des altérations de reperfusion (lésions de reperfusion). Plusieurs études expérimentales ont démontré que le fait de reperfusion une région préalablement ischémique précipitait la formation de lésions irréversibles et de nécrose.

Les caractéristiques biochimiques, ultrastructurales et dynamiques de l'ischémie et de la reperfusion myocardique seront décrites dans ce chapitre ainsi que les principales

hypothèses soulevées pour expliquer les altérations de reperfusion.

1.2 Métabolisme énergétique en cours d'ischémie

Dans des conditions aérobiques, la principale source d'énergie provient de la phosphorylation oxydative. Environ 70% du métabolisme énergétique est dérivé des acides gras, et le glucose (de même que les acides aminés) peut aussi être utilisé pour produire de l'énergie. Ces substrats énergétiques sont transformés, par le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), en acyle-CoA qui est nécessaire à la formation de NADH et de FADH₂ pour la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Opie 1991).

Suite à une occlusion coronarienne, une cyanose épocardique se manifeste rapidement et reflète la diminution importante de la teneur en oxygène. Puisque l'oxygène agit comme accepteur final de la chaîne respiratoire, une diminution de sa concentration tissulaire aura pour conséquence d'inhiber la phosphorylation oxydative. Cependant, il existe des mécanismes compensatoires, comme la glycolyse anaérobie et la glycogénolyse, qui permettent de maintenir un niveau d'énergie suffisant pour assurer temporairement la survie des cellules ischémiques.

Les cardiomyocytes vont d'abord tenter de compenser le déficit en oxygène en favorisant une augmentation du flux glycolytique (Kloner et Braunwald 1980, Opie 1990). En état d'hypoxie, la phosphofructokinase voit son activité enzymatique stimulée par la diminution d'ATP et de créatine phosphate et par l'accumulation de produits de dégradation. La conversion plus rapide du glucose 6-phosphate en fructose 1,6 diphosphate permet de lever l'inhibition que le glucose 6-phosphate exerce normalement sur l'hexokinase, et une

plus grande quantité de glucose est phosphorylée. En outre, la perte de phosphates à haute énergie stimule la conversion de la phosphorylase b en sa forme active (phosphorylase a) qui catalyse la transformation du glycogène en glucose 6-phosphate (Jennings et Reimer 1991).

Cependant, l'activation de la glycolyse et de la glycogénolyse n'est que transitoire, car l'acidose résiduelle inhibe l'activité de la phosphofructokinase, de l'hexokinase et de la phosphorylase. Donc, malgré la présence de substrats énergétiques essentiels, la fonction glycolytique sera rapidement inhibée avec une perte accrue d'ATP (Opie 1991). De plus, les produits de dégradation de la glycolyse peuvent causer des lésions myocardiques irréversibles avant même que les réserves d'ATP n'atteignent un seuil critique (Neely et Grotyohann 1984).

Pendant l'ischémie, le métabolisme lipidique est aussi largement affecté. En outre, l'inhibition de l'activité de l'acyle-carnitine transférase (nécessaire au transport de l'acyle-CoA vers la mitochondrie) provoque une augmentation de la concentration cytosolique de métabolites lipidiques (acyle-CoA, acyle-carnitine, triglycérides) (Kloner et Braunwald 1980), ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité d'enzymes mitochondriales, de la pompe sodique et des cycles phospholipidiques. L'acide arachidonique (présent dans les membranes lipidiques) s'accumule dans le myocarde ischémique (Prinzen et coll. 1984, Chien et coll. 1984) et selon Corr et coll. (1982, 1984), la présence de lysophospholipides serait impliquée dans l'arythmogénèse de l'ischémie myocardique.

L'altération de la production d'ATP est sans contredit un élément clé de la détérioration métabolique et fonctionnelle observée pendant l'ischémie myocardique. La production énergétique compensatoire est néanmoins insuffisante pour maintenir l'intégrité

cellulaire à long terme. Ainsi, 38 ATP sont produits par molécule de glucose dans des conditions d'aérobie contre 2 ATP pendant la glycolyse anaérobie, et 3 ATP par molécule de glycogène. En fait, pour que la glycolyse produise autant d'ATP que pendant le métabolisme aérobie, elle nécessiterait une accélération environ 20 fois supérieure à celle qui est observée pendant l'ischémie (Kobayashi et Neely 1979).

Hearse et coll. (1983) ont démontré que la chute des concentrations d'ATP était directement proportionnelle à la réduction du débit coronarien ainsi qu'à la durée de l'occlusion. Des études de résonance magnétique nucléaire ont démontré qu'une diminution du débit sanguin d'environ 50% n'induit aucune dégradation d'ATP (Schaefer et coll. 1989). Cependant, une ischémie sévère (réduction du débit sanguin à moins de 20% du débit de base) provoque une perte d'ATP d'environ 65% et 90% après respectivement 15 et 40 minutes d'occlusion chez le chien (Jennings et coll. 1978).

L'ischémie transitoire fait considérablement chuter la concentration d'ATP myocardique. Plusieurs jours de reperfusion sont nécessaires pour rétablir le niveau d'ATP à des valeurs normales.

1.3 Altérations ultrastructurales

1.3.1 Lésions myocytaires

Il y a peu d'altérations ultrastructurales dans les premières minutes qui suivent l'occlusion coronarienne. Des bandes I sont présentes dans les myofibrilles, il y a réduction du nombre de granules de glycogène, et la chromatine nucléaire présente une dispersion et parfois une margination (Jennings et Ganote 1974, Jennings et coll. 1978). Ces changements

représentent la phase réversible des lésions ischémiques. Après une période de reperfusion, les myocytes retrouvent une structure et une fonction normales, et on ne relève pas de nécrose dans le territoire ischémique.

Cependant, après 20 à 40 minutes d'ischémie sévère, les lésions ischémiques deviennent irréversibles. Celles-ci sont associées à de l'œdème mitochondrial et cellulaire, à la présence, dans la matrice mitochondriale, de corps denses amorphes composés de lipides et de protéines dénaturées et à la rupture des crêtes et membranes externes (Jennings et Ganote 1974, Jennings et coll. 1975, 1978). Si le débit sanguin est alors rétabli, les dommages ultrastructuraux seront accentués par de l'œdème, le développement de bandes de contraction, et l'accumulation de calcium dans les mitochondries (Jennings et coll. 1975, 1978).

Après 60 minutes d'ischémie, l'œdème cellulaire est très apparent et provoque une rupture membranaire. Cette rupture est considérée comme un évènement létal pour la cellule, car elle altère la perméabilité membranaire et entraîne la libération d'enzymes intracellulaires, de cofacteurs et d'ions (Jennings et coll. 1986, 1990). La perte de l'intégrité membranaire serait causée, selon Jennings et coll. (1990), par la désagrégation ou la digestion protéolytique des complexes d'attachement cytosquelettique qui retiennent la sarcolemme aux bandes Z des myofibrilles sous-jacents. En l'absence de reperfusion, des traits de nécrose de coagulation apparaissent (Reimer et Jennings 1979). Entre 6 à 12 heures d'ischémie, on relève une éosinophilie sarcoplasmique et l'infiltration des polymorphonucléaires s'amorce (Fishbein et coll. 1978, Weisman et Bulkley 1984). Le tissu nécrosé sera remplacé par une lésion cicatricielle (Fox et coll. 1985).

En résumé, les deux traits caractéristiques des lésions irréversibles sont la présence de corps denses amorphes dans la matrice mitochondriale ainsi que la rupture de la membrane sarcolemmale. Ces lésions ultrastructurales représentent, et sont fonction de l'état métabolique du myocarde. Elles se manifestent lorsque le niveau de phosphates à haute énergie atteint un seuil insuffisant pour maintenir l'intégrité structurelle de la cellule (Jennings et Reimer 1981).

1.3.2 Lésions microvasculaires

L'endothélium vasculaire peut être endommagé par l'ischémie mais il demeure néanmoins structurellement intact plus longtemps que les myocytes (Kloner et coll. 1974, Armingier et Gavin 1975). L'altération endothéliale peut avoir des conséquences néfastes, car l'endothélium est impliqué dans la synthèse, le métabolisme et la libération d'un grand nombre de facteurs humoraux et hormonaux (Vanhoutte et Mombouli 1996).

Dans la phase réversible des lésions ischémiques, l'endothélium retrouve sa fonction normale en présence de reperfusion. En effet, les capillaires peuvent être soumis à une réaction hyperémique dont le débit est jusqu'à dix fois supérieur au débit de base et ce, sans signes d'hémorragies interstitielles ou de thrombose (Jennings et Reimer 1991).

Kloner et coll. (1974) ont démontré qu'après 40 minutes d'occlusion, une durée suffisante pour causer des lésions ultrastructurales, on ne décèle aucune modification microvasculaire. L'endommagement endothélial n'est apparent, principalement dans la région sous-endocardique, qu'à partir de 60 minutes d'occlusion et se manifeste par la disparition de vésicules pinocytiques, des ruptures endothéliales, des foyers d'hémorragie et des dépôts

intra- et extravasculaires de fibrine (Kloner et coll. 1980). L'altération endothéliale sera d'autant plus importante que la période ischémique est longue. Par exemple, 20% des vaisseaux présentent des lésions après 60 minutes d'occlusion contre environ 40% après 90 à 180 minutes (Kloner et coll. 1980).

Plusieurs études ont démontré que les lésions vasculaires étaient circonscrites et ne progressaient jamais à l'extérieur de la zone de nécrose, et qu'elles étaient toujours précédées par des lésions ultrastructurales (Fishbein et coll. 1980, Kloner et coll. 1980, 1983). En effet, les lésions microvasculaires sévères ne peuvent être observées qu'après 3 heures d'ischémie (Armiger et Gavin 1975, West et coll. 1978) et touchent principalement les microvaisseaux plutôt que les grosses artères coronaires (Piana et coll. 1994).

Les lésions microvasculaires ne semblent pas être la cause principale des lésions irréversibles, mais elles sont un facteur contributif à la défaillance circulatoire associée à la reperfusion (Kloner et coll. 1974). Viehman et coll. (1991) ont démontré une anomalie endothéliale fonctionnelle progressive entre 3 et 6 heures d'ischémie myocardique en l'absence d'altérations ultrastructurales. A ce propos, le groupe de Tsao (1990) n'a pu démontrer, avec des artères coronaires isolées de chat, une diminution de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine après 90 minutes d'occlusion. Cependant, après 2,5 minutes de reperfusion, la relaxation avait chuté de 75%. Cette étude révèle un fait important soit que la reperfusion provoque très rapidement une altération de la réserve coronaire vasodilatatrice, contrairement à l'ischémie qui nécessite plus de temps. Les lésions microvasculaires ischémiques ne semblent pas jouer un rôle important dans la dysfonction endothéliale à court terme, mais en présence de reperfusion, ces lésions deviennent rapidement délétères.

1.4 Nécrose myocardique

Deux types de lésions ischémiques, réversibles et irréversibles, ont été décrits précédemment. Le facteur discriminant entre ces lésions est la durée et l'intensité de la période ischémique, et il existe un phénomène de transition pouvant mener à la nécrose cellulaire. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant les causes possibles de la nécrose cellulaire, mais aucune n'a su faire l'unanimité. Les hypothèses les plus plausibles, comme le suggère Opie (1993), seront commentées dans les pages suivantes.

1.4.1 Perte de phosphates à haute énergie

L'ATP est nécessaire à l'entretien de la membrane cellulaire et à la phosphorylation de canaux et pompes membranaires qui maintiennent l'homéostasie ionique. Ainsi, une diminution de la synthèse d'ATP, telle qu'on l'observe pendant l'ischémie, se traduira par une altération de l'intégrité cellulaire.

Si toutefois l'inhibition de la synthèse d'ATP peut logiquement, à moyen et long terme, induire de la nécrose, une chute importante d'ATP peut se produire sans pour autant entraîner des lésions irréversibles comme c'est notamment le cas du cerveau et du foie (Gudbjarnason et coll. 1970). Une étude de Jennings et coll. (1983) a démontré que la chute du contenu d'ATP myocardique précédait l'augmentation de l'espace diffusible de l'inuline (un marqueur de la perméabilité membranaire), ce qui suggère qu'une faible concentration d'ATP intracellulaire n'est pas nécessairement responsable de la rupture membranaire. De même, une altération membranaire susceptible de causer la mort cellulaire peut se produire en l'absence de réduction importante d'ATP (Jennings et Reimer 1981).

Le rôle exact de la fluctuation du taux d'ATP dans la nécrose myocardique demeure incertain. La relation entre l'ATP tissulaire et la nécrose cellulaire est multifactorielle, et l'ensemble des mécanismes secondaires inhérents à la diminution de la production d'énergie sont probablement responsables de la nécrose. Comme le suggère Opie (1993), les produits de dégradation de la glycolyse anaérobie peuvent activer des lysosomes et dénaturer des protéines intracellulaires. En outre, il est possible que la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène et/ou l'inhibition de l'activité d'antioxydants naturels ainsi que l'accumulation de calcium cytosolique contribuent à la nécrose cellulaire. Donc l'ATP, malgré son rôle primordial dans la fonction cellulaire, ne semble pas être un déterminant critique dans la nécrose myocardique pendant l'ischémie.

1.4.2 Surcharge calcique

Une surcharge calcique se produit en réponse à une diminution de la production d'ATP, car la séquestration calcique mitochondriale et sarcoplasmique nécessite un apport d'énergie (Opie 1992). Malgré le peu d'observations expérimentales directes, il semble que l'accumulation de calcium intracellulaire ait au moins trois conséquences défavorables. En premier lieu, une surcharge calcique fait chuter le niveau de phosphates à haute énergie, car les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique vont amplifier leur mécanisme de séquestration (Kusuoka et coll. 1988). Pour compenser l'entrée de charges positives (calcium), la mitochondrie active un mécanisme d'extrusion qui nécessite aussi de l'ATP (Opie 1993). De plus, l'augmentation de la séquestration calcique mitochondriale induit un découplage de la phosphorylation oxydative, ce qui accentue le déséquilibre entre l'apport

et la demande d'énergie (Kusuoka et coll. 1988). Deuxièmement, un excès de calcium active nombre de protéases susceptibles de dégrader les membranes cellulaires ainsi que le cytosquelette. Steenbergen et coll. (1987) ont suggéré qu'une de ces protéases dépendantes du calcium entraînait la dénaturation de la vinculine qui est une protéine cytosquelettique. Troisièmement, une élévation du calcium intracellulaire déclenche la phosphorylation d'une variété de protéines via des protéines kinase dépendantes de la calmoduline ou de phospholipides, ce qui altère leurs fonctions respectives (Kato et coll. 1983). De même, l'activation de phospholipases (A_2 et C) risque de dégrader les membranes et de provoquer une accumulation de phospholipides cytotoxiques (Chien et coll. 1981).

Shen et Jennings (1972, 1972a) ont démontré que la reperfusion du myocarde ischémique entraînait, en outre, une accumulation importante de calcium. Il ne fait plus de doute aujourd'hui que la surcharge calcique est intimement liée à la progression des lésions de reperfusion. Cependant, les effets de l'oscillation du calcium pendant l'ischémie sont moins bien définis.

Starke et coll. (1986) ont démontré, à l'aide d'un ionophore calcique, qu'une augmentation du taux de calcium cytosolique pouvait causer des lésions létales dans des hépatocytes isolés. Marban et coll. (1987) ainsi que Steenbergen et coll. (1987a) ont été parmi les premiers à relever, par résonance magnétique nucléaire, une accumulation de calcium dans des coeurs isolés de rats et de furets au cours des premières minutes d'ischémie. Ces résultats furent reconfirmés par ces auteurs (Marban et coll. 1989, Steenbergen et coll. 1990), de même que par les études d'Allen et coll. (1988) et Kihara et coll. (1989), mais on n'a pu apporter aucune conclusion définitive quant au rôle du calcium dans la nécrose

myocardique.

Il semblerait que le taux de calcium tissulaire ne varie pas pendant l'ischémie. Cependant, le niveau de calcium mitochondrial augmente, ce qui suggère qu'il se produit une redistribution plutôt qu'une accumulation massive de calcium intracellulaire, comme c'est le cas pendant la reperfusion (Ferrari 1996). Bien que la voie (ou les voies) par laquelle le calcium pénètre dans le cytoplasme soit toujours controversée, les canaux calciques ne semblent pas impliqués (Ferrari et coll. 1986). Une hypothèse intéressante serait la stimulation de l'échangeur Na^+/H^+ en réponse à l'acidose résiduelle pendant l'ischémie. Murphy et coll. (1991) ont démontré qu'après environ 10 minutes d'ischémie, l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ causait un efflux de H^+ et un influx important de Na^+ dans la cellule. En présence d'un taux suffisant d'ATP, les ions Na^+ peuvent être transportés dans l'espace extracellulaire par l'ATPase Na^+/K^+ . Cependant, comme la disponibilité de l'ATP est très restreinte pendant l'ischémie, ce mécanisme d'extrusion devient rapidement inefficace et il en résulte une augmentation du Na^+ intracellulaire. Étant donné que le transport de Na^+ et Ca^{++} se fait principalement via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, qui est lui-même dépendant du gradient sodique, l'élévation du Na^+ intracellulaire entraîne une augmentation du Ca^{++} intracellulaire puisque 3 Na^+ intracellulaires sont échangés contre 1 Ca^{++} extracellulaire (Stone et coll. 1989, Murphy et coll. 1991).

L'échangeur Na^+/H^+ joue donc un rôle important dans l'accumulation de calcium et son inhibition est associée à une réduction des lésions irréversibles, tant pendant l'ischémie (Anderson et coll. 1990, Murphy et coll. 1991) que durant la reperfusion (Klein et coll. 1995, Hoque et coll. 1997). À la lumière de ces résultats, il y a peu de doutes que l'accumulation

de calcium intracellulaire est en partie responsable des effets délétères de l'ischémie, mais aucun consensus ne nous permet de confirmer le rôle du calcium dans le phénomène de nécrose. Cependant, le calcium a été impliqué dans la sidération myocardique (Steenbergen et coll. 1993). Ce point sera développé à la section 1.8.1.3.

1.4.3 Production de radicaux libres dérivés de l'oxygène

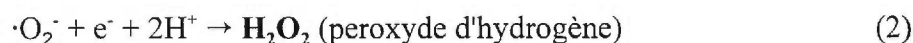
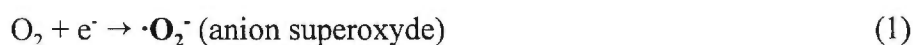
Une hypothèse largement étudiée pour expliquer le phénomène de nécrose dans le contexte d'ischémie-reperfusion est la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène. Au niveau myocardique, il a été clairement établi que la reperfusion activait la génération de radicaux libres, et certains auteurs ont suggéré que ceux-ci jouaient un rôle prépondérant dans l'étiologie de la nécrose cellulaire (Bolli et coll. 1987, 1989, Kloner et coll. 1989). De plus, l'ischémie proprement dite peut conditionner la production de radicaux libres et causer diverses altérations ou dysfonctions, dont des lésions irréversibles.

Un radical libre se définit comme tout atome ou groupe d'atomes possédant un électron non apparié sur son orbitale externe, ce qui le rend excessivement réactif et instable (Thompson et Hess 1986). Par exemple, lorsque des radicaux libres réagissent avec des molécules non radicalaires, celles-ci deviennent des radicaux grâce au partage et/ou au transfert d'un électron. Cette caractéristique liée à la réactivité rend les radicaux libres très nocifs pour la cellule si leur présence est excessive.

Selon les circonstances, les radicaux libres pourront amorcer 1) des réactions simples qui seront sans conséquence, car elles seront neutralisées par le système naturel de défense, 2) des réactions plus complexes avec l'apparition d'altérations morphologiques et

fonctionnelles, et 3) des réactions en chaîne avec une production importante de radicaux et des conséquences néfastes. Un exemple intéressant pour décrire les réactions en chaîne est la peroxydation lipidique (Kukreja et Hess 1994).

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), responsable de la dégradation des phospholipides membranaires, est généré à partir de l'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon les réactions suivantes :



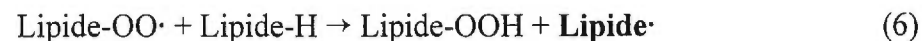
Le $\cdot\text{OH}$ produit (équation 3) pourra attaquer les lipides membranaires insaturés selon l'équation 4 :



Après un recombinaison moléculaire, il y aura formation de radicaux lipidiques peroxydes (réaction 5)



Ce sont les radicaux peroxydes qui sont responsables de la propagation de la réaction en chaîne en enlevant un atome d'hydrogène à une autre molécule d'acide gras (réaction 6)



Les peroxydes lipidiques (Lipide-OOH) pourront réagir avec des substrats organiques présents dans les membranes cellulaires pour produire des radicaux alkoxydes ($\text{Lipide-O}\cdot$) ou alkylperoxydes ($\text{Lipide-OO}\cdot$) en présence de métaux de transition comme le fer et le cuivre.

La peroxydation lipidique est excessivement importante, car elle provoque des

altérations structurelles ainsi qu'une augmentation de la perméabilité, de la fluidité et de l'intégrité membranaires. Ce phénomène n'est pas propre au myocarde; des études ont démontré la présence de radicaux libres au niveau du cerveau (Chan 1996, Watson et coll. 1996) et du foie (Arora et Gores 1996), suite à la thrombolyse (Chen et coll. 1995, Pucheu et coll. 1995) et chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Díaz-Vélez et coll. 1996).

Le myocarde contrôle la présence de radicaux libres dans le milieu environnant grâce à des mécanismes naturels de défense qui comprennent les enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathione peroxydase en plus de nombreux piègeurs endogènes dont les vitamines A et E, la β -carotène et la cystéine (Bast et coll. 1991, Nakazawa et coll. 1996).

L'inactivation de l'anion superoxyde se fait par la SOD qui catalyse sa dismutation en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Plusieurs isoformes de la SOD ont été caractérisées (Southorn 1988), dont une SOD unique de haut poids moléculaire liée à l'héparan sulfate présent à la surface des cellules endothéliales (Marklund et coll. 1982). La SOD augmente la constante de dismutation spontanée par un facteur de 10^4 (Fridovich 1983), ce qui assure qu'aucun anion superoxyde ne réagit avec d'autres formes radicalaires. La présence de SOD à l'intérieur de nombreux compartiments permet la dismutation rapide et efficace de l'anion superoxyde à tous ses sites de formation. Le métabolisme du peroxyde d'hydrogène se fait au moyen de la glutathione peroxydase et de la catalase. De faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène sont inactivées par la forme réduite de la glutathione pour former de la glutathione oxydée et de l'eau (Lawrence et Burk 1978). Cette réaction peut utiliser comme substrat une grande variété de peroxydes en raison de son peu de spécificité (Ursini et

coll.1986). Si toutefois de grandes concentrations de peroxyde d'hydrogène sont présentes, la catalase pourra agir de concert avec la glutathione peroxydase.

Les sources de radicaux libres dans le myocarde ischémique comprennent 1) la respiration mitochondriale, 2) le métabolisme des catécholamines et de l'acide arachidonique, 3) les neutrophiles, 4) la xanthine oxydase et 5) le monoxyde d'azote (*nitric oxide*; NO) (Kukreja et Hess 1992, Nakazawa et coll. 1996).

Les mitochondries sont la source majeure de radicaux libres et environ 2% de l'oxygène utilisé dans le transport des électrons peut s'échapper sous forme d'anions superoxyde (Boveris et Chance 1973). Dans des conditions physiologiques, la SOD peut facilement neutraliser ces radicaux, car leur production est très faible. Cependant, l'ischémie est associée à une diminution des piègeurs radicalaires (Meerson et coll. 1982) et la détérioration du métabolisme oxydatif mitochondrial favorise une plus grande production de radicaux libres. Donc, le stress oxydatif peut excéder les mécanismes naturels de défense et contribuer aux dommages cellulaires.

Pendant l'ischémie myocardique, il se produit une libération accrue de catécholamines dont la concentration extracellulaire peut être de 100 à 1000 fois supérieure à la concentration plasmatique normale (Muntz et coll. 1984, Holmgren et coll. 1985). L'oxydation des catécholamines génère des anions superoxydes susceptibles de produire des lésions comparables à celles que l'on observe pendant la reperfusion.

L'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires pendant l'ischémie et la reperfusion (probablement en raison de la peroxydation lipidique ou d'une surcharge calcique) et métabolisé en prostaglandines et leucotriènes. L'oxygénation de l'acide

arachidonique par la cyclo-oxygénase ou la lipoxygénase produit des radicaux hydroxyles et peroxyles (Kuehl et coll. 1977) et la conversion de la prostaglandine G_2 en prostaglandine H_2 génère des anions superoxydes en présence de NADH ou NADPH (Kukreja et coll.1986). Cependant, la production radicalaire via cette voie est assez faible (Shimokawa et Smith 1991). La production secondaire de leucotriène B_4 (LTB_4) et du facteur d'activation plaquettaire (*platelet activating factor*; PAF) serait indirectement responsable de la production de radicaux libres car il s'agit de puissants facteurs chimiotactiques et activateurs des neutrophiles (Nakazawa et coll 1996).

De nombreux travaux ont confirmé le rôle des neutrophiles dans les altérations tissulaires associées à la séquence ischémie-reperfusion. Les neutrophiles possèdent un complexe enzymatique, l'oxydase NADPH, qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (Morel et coll. 1991). Un processus subséquent de dégranulation libère de la myéloperoxydase qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, produit de l'acide hypochlorique, un oxydant très puissant. Donc, les neutrophiles sont d'importants producteurs de radicaux libres impliqués dans la nécrose cellulaire ischémique et ils seront d'autant plus importants pendant la période de reperfusion. Cet aspect sera discuté à la section 2.2.

Selon McCord (1985), le système xanthine oxydase serait une source potentielle de radicaux libres dans l'ischémie-reperfusion. Les études d'ischémie intestinale faites par Granger et coll. (1981) avaient démontré la dégradation protéolytique de l'enzyme constitutive, la xanthine déshydrogénase, en xanthine oxydase. Pendant l'ischémie, l'ATP est décomposé en ADP puis en AMP, adénosine, inosine et hypoxanthine (Reimer et coll. 1983).

La xanthine déshydrogénase, largement présente et particulièrement abondante dans les cellules endothéliales (Adachi et coll. 1993), est convertie en xanthine oxydase par des protéases dépendantes du calcium. Lorsque le tissu est reperfusé, l'hypoxanthine réagit avec l'oxygène moléculaire et, en présence de xanthine oxydase, forme de la xanthine qui sera elle-même convertie (sous l'effet de la xanthine oxydase) en acide urique et anions superoxyde (Parks et Granger 1986).

Des études faites chez le chien ont démontré qu'après 30 minutes d'occlusion coronarienne, la concentration de xanthine oxydase dans le territoire ischémique augmentait de 300% (Chambers et coll. 1985). Ces résultats et ceux de Linas et coll. (1990) suggèrent fortement que la conversion de la xanthine déshydrogénase en oxydase est un phénomène précoce dans l'ischémie et d'autant plus important pendant la reperfusion. Des études récentes (Varani et Ward 1994) ont démontré que la libération d'élastase des neutrophiles activés pouvait entraîner la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase et augmenter l'adhérence des neutrophiles via le CD11/CD18 (Wakabayashi et coll. 1995). De même, les cellules endothéliales exposées à la xanthine oxydase stimulent la liaison des neutrophiles via la L-selectine (Sellak et coll. 1994). La xanthine oxydase inhibe la transduction de signaux membranaires calciques (Wesson et Elliott 1994), ce qui peut représenter un nouveau mécanisme de dysfonction endothéliale.

Avant de conclure sur l'implication des radicaux libres dans la nécrose cellulaire, il convient de mentionner le rôle d'une autre forme radicalaire, le NO. Ce dernier possède un électron non apparié sur son orbitale externe, ce qui lui confère une fonction de radical. De façon générale, le NO est peu réactif, mais en présence d'anions superoxyde, il est converti

en peroxy-nitrite, un oxydant excessivement réactif (Szabó 1996). Pendant l'ischémie, la production de NO augmente rapidement grâce à l'activation de la NO synthétase constitutive (Node et coll. 1995, 1996, Kitakaze et coll. 1996, Depré et coll. 1997) et, étant donné la production excessive d'anions superoxyde concomitante, ceux-ci réagissent avec le NO pour former l'anion peroxy-nitrite (Pryor et Squadrito 1995). Ce phénomène a été démontré dans plusieurs organes (foie, rein, intestin, poumon et cerveau), dont le coeur. La réduction de la formation d'anions peroxy-nitrite par l'inhibition de la synthèse du NO prévient les lésions de reperfusion et améliore la performance cardiaque (Kitakaze et coll. 1996, Node et coll. 1996). De plus, des études ont démontré que le peroxy-nitrite peut générer des radicaux hydroxyles (Pou et coll. 1995), ce qui contribue aux dysfonctions observées pendant l'ischémie et la reperfusion.

1.5 Apoptose myocardique

Les mécanismes physiopathologiques menant à la nécrose cellulaire ont été décrits en détail dans les pages précédentes, mais nous pouvons aussi considérer, à la lumière de récents résultats expérimentaux, que la mort cellulaire peut se produire par un autre processus distinct : l'apoptose.

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire accidentelle et non spécifique, tandis que l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus physiologique hautement spécifique qui consiste en une série d'évènements biochimiques et moléculaires sous contrôle génétique strict (Majno et Joris 1995, Yeh 1997). Les principales caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose sont résumées dans le tableau 1.

Quelques études expérimentales *in vitro* ont démontré le rôle de l'apoptose dans la dégénérescence des cardiomyocytes isolés de rats exposés à une période hypoxique (Tanaka et coll. 1994) et dans le muscle papillaire soumis à un surétirement (Cheng et coll. 1995). *In vivo*, la présence d'apoptose a été documentée pendant l'ischémie-reperfusion (Gottlieb et coll. 1994, Fliss et Gattinger 1996), et elle excédait par un facteur de 6 la nécrose myocytaire dans le développement de l'infarctus (Kajstura et coll. 1996). La contribution relative de l'apoptose par rapport à la nécrose pendant la reperfusion reste encore à déterminer, mais Fliss et Gattinger (1996) ont démontré qu'une période d'ischémie plus courte (45 minutes) suivie de reperfusion (1 heure) accélérât le développement de l'apoptose myocardique.

Les mécanismes sous-jacents de l'apoptose dans la séquence ischémie-reperfusion sont encore très mal connus. Selon Allbritton et coll. (1988) et Ray et coll. (1993), l'augmentation du taux de calcium intracellulaire pourrait être à l'origine de l'apoptose. Le récepteur transmembranaire Fas peut stimuler l'apoptose (Yonehara et coll. 1989), et il est surexprimé suite à l'hypoxie (Tanaka et coll. 1994) dans plus de 50% des cellules du territoire ischémique (Kajstura et coll. 1996). Dans un modèle d'ischémie-reperfusion hépatique, Schlossberg et coll. (1996) ont établi que l'expression de l'oncogène *c-jun* était en corrélation avec la présence de l'apoptose. De plus, Yang et coll. (1996) ont soulevé l'hypothèse que l'élastase libérée par les neutrophiles pendant l'inflammation pouvait provoquer des lésions endothéliales en stimulant l'apoptose.

L'apoptose est un phénomène dégénératif impliqué dans plusieurs modèles expérimentaux (Brömme et Holtz 1996) et cliniques, dont l'infarctus du myocarde (Saraste et coll. 1997), l'hypertension (Hamet et coll. 1996), l'insuffisance cardiaque (Narula et coll.

1996) et l'athérosclérose (Björkerud et Björkerud 1996).

Tableau 1.1 Principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose

Apoptose	Nécrose
Cellules individuelles	Cellules contiguës
Margination de la chromatine importante	Margination de la chromatine peu importante
Fragmentation de l'ADN \approx 180pb	Fragmentation aléatoire de l'ADN
Condensation cellulaire	Œdème cellulaire
Préservation de l'intégrité membranaire	Perte de l'intégrité membranaire
Corps apoptotiques	Rupture cellulaire
Phagocytose	Lyse cellulaire
Inflammation peu importante	Inflammation intense

Adapté de Ueda et Shah. *J Lab Clin Med* 1994;124:169-177 et Yeh. *Circulation* 1997;95:782-786

1.6 Progression de l'infarctus

Les caractéristiques biochimiques et morphologiques associées à l'évolution de la nécrose pendant l'ischémie myocardique ont été décrites précédemment. Les déterminants critiques de la progression spatiale et temporelle de l'infarctus seront présentés dans les pages suivantes. Des notions de reperfusion seront introduites, car celle-ci modifie l'évolution de l'infarctus.

1.6.1 Occlusion coronarienne et circulation collatérale

La progression transmurale de la nécrose de l'endocarde vers l'épicarde est influencée par la durée et la sévérité de la période ischémique ainsi que par l'importance de la

circulation collatérale.

Le groupe de Jennings (1960) ainsi que Reimer et coll. (1977) ont été parmi les premiers à démontrer, en utilisant un modèle canin d'occlusion coronarienne, que la nécrose cellulaire ne se développait pas aussitôt après le début de l'ischémie, et qu'elle était en corrélation directe avec la durée de l'occlusion et la présence d'une circulation collatérale de suppléance (Reimer et Jennings 1979).

Chez le chien anesthésié par exemple, une occlusion temporaire de l'artère coronaire ou circonflexe d'une durée inférieure à 15 minutes ne produit aucune lésion. Les cellules ischémiques retrouvent une fonction normale après une période de reperfusion. Par contre, 20 minutes d'ischémie produisent des foyers diffus de nécrose endocardique (Jennings et coll. 1960). Une occlusion artérielle de 40 à 60 minutes est caractérisée par une nécrose sous-endocardique et, si la période ischémique est prolongée à 3 heures, des lésions irréversibles se développent dans les régions mésomyocardique et sous-épicardique (Reimer et coll. 1977, Reimer et Jennings 1979). Entre 6 et 24 heures d'occlusion, la nécrose est typiquement transmurale, sans aucune possibilité de sauvegarde, même après une période de reperfusion prolongée (Reimer et coll. 1977).

De façon générale, une occlusion supérieure à 3 heures ne permet de sauver qu'une très faible proportion du myocarde, même en présence de reperfusion, car les lésions dues à l'ischémie sont trop importantes (Chatelain et coll. 1987). Cela semble se vérifier chez l'homme, et une étude très récente suggère que plus la durée des symptômes (période d'ischémie) avant le début du traitement thrombolytique est courte, plus l'infarctus est restreint (Raitt et coll. 1996). Ces auteurs ont démontré que chaque 30 minutes d'ischémie

supplémentaire correspondait à une augmentation de l'infarctus équivalente à 1% du myocarde. Cependant, une autre étude suggère que la sauvegarde myocardique peut se faire jusqu'à 9 heures après le début des symptômes (Hasche et coll. 1995). La divergence entre ces résultats peut s'expliquer par la difficulté clinique à déterminer avec exactitude la durée de la période ischémique. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats démontre la nature progressive de l'infarctus et la relation directement proportionnelle qui existe entre la quantité de cellules irréversiblement atteintes et la durée de l'ischémie.

L'évolution spatiale et temporelle de la nécrose cellulaire peut être décrite comme une onde de progression (*wavefront phenomenon*); les lésions se développent en premier lieu dans la région la plus ischémique, soit le sous-endocarde. Si le niveau d'ischémie est maintenu, les lésions s'étendent graduellement à travers la paroi myocardique jusqu'au sous-épicaire (Reimer et Jennings 1979). La vulnérabilité du sous-endocarde à l'ischémie peut s'expliquer par la circulation collatérale et la demande métabolique endocardique.

La circulation collatérale consiste dans le débit sanguin coronaire résiduel qui alimente le territoire ischémique via des artères alternatives fonctionnelles de suppléance. Pendant une période d'ischémie aléatoire ou provoquée, la perfusion myocardique se fait par de petites artères musculaires pénétrantes qui prennent naissance dans les gros vaisseaux épicaïriques de surface (Factor 1990). L'apport sanguin, entre 10 et 30% du débit normal (Maxwell et coll. 1987), est suffisant pour assurer la survie des couches médianes et supérieures du myocarde. Cependant, la circulation collatérale ne peut compenser l'occlusion coronaire dans les couches les plus profondes, d'où nécrose sous-endocardique. Une augmentation de la pression intramyocardique sous-endocardique (Kirk et Honig 1964)

comprime les artères de suppléance et limite le débit sanguin (Downey et coll. 1974). En effet, des études réalisées chez le chien ont démontré qu'il s'établissait un gradient de circulation collatérale de l'endocarde vers l'épicarde, le sous-endocarde recevant environ de 30 à 50% du débit sous-épicaire (Reimer et coll. 1977, Reimer et Jennings 1979).

La vulnérabilité endocardique à l'ischémie relève aussi d'autres mécanismes physiologiques indépendants du débit collatéral, car chez les espèces animales qui ne possèdent pas de circulation collatérale, l'infarctus progresse sous forme d'onde de nécrose (Fujiwara et coll. 1982, Crozatier et coll. 1978, Lavallée et Vatner 1984). Il existe un gradient transmural du métabolisme oxydatif dans la paroi ventriculaire et la plus grande utilisation d'énergie se fait dans la région sous-endocardique (Griggs et coll. 1972, Eng et coll. 1987). Cette variation dans le métabolisme énergétique associée à la distribution du débit sanguin collatéral peut expliquer la progression de l'infarctus de l'endocarde vers l'épicarde.

Tout comme chez le chien, la région sous-endocardique du myocarde humain est beaucoup plus sensible à l'ischémie. Cette vulnérabilité anatomique a été décrite chez des patients qui, malgré l'absence d'une onde Q prédominante à l'électrocardiogramme, présentaient des signes de nécrose endocardique (Scheidt 1985). L'être humain possède un système d'anastomoses artérielles (Fulton 1963) qui se développe progressivement suite à des périodes d'ischémie récurrentes (Schaper et Ito 1996). La circulation collatérale est insuffisante pour éviter la nécrose endocardique, mais suffisante pour préserver les couches supérieures du myocarde (Christian et coll. 1995). Donc, le modèle canin représente assez bien l'état pathologique de l'homme vieillissant atteint de maladies des artères coronaires. Par contre, pour représenter un infarctus chez le jeune adulte, qui ne possède pas ce système de

suppléance, un modèle animal comme le porc ou le lapin, où la circulation collatérale est inexistante serait plus conforme.

1.6.2 Circulation collatérale et infarctus

Chez le chien anesthésié par exemple, la ligature permanente de l'artère coronaire antérieure descendante gauche ne provoque pas d'infarctus transmural (Reimer et Jennings 1979), et approximativement 30% du territoire irrigué par cette artère reste viable (Chatelain et coll. 1987). Cette zone sauvegardée est très variable d'une espèce à l'autre en raison de la présence de circulation collatérale dans le territoire ischémique. En fait, on observe une relation inverse entre l'intensité de la circulation collatérale et l'étendue du territoire ischémique (Reimer et Jennings 1979, Reimer et coll. 1985), et l'infarctus sera directement proportionnel à ces deux facteurs. Par contre, certaines espèces comme le porc et le primate ne possèdent pas d'anastomoses collatérales substantielles (Maxwell et coll. 1987) et, suite à une occlusion coronarienne, le débit sanguin est presque nul dans toute la région ischémique. En l'absence de reperfusion, la taille de l'infarctus pourra se rapprocher de la taille de la zone à risque (Klein et coll. 1984, Lavallée et Vatner 1984). Inversement, le cobaye ne présente aucune zone d'hypoperfusion après l'occlusion permanente d'une artère coronaire majeure, car le débit collatéral est excessivement élevé (Maxwell et coll. 1987).

Chez l'humain, l'infarctus myocardique semble aussi dépendre des mêmes déterminants (Wagdy et Christian 1996). Lee et coll. (1981) ont démontré dans des études post-mortem qu'il existait une relation linéaire entre la taille d'infarctus et le lit vasculaire ischémique, et Feiring et coll. (1987) ont mentionné l'importance du territoire à risque dans

la survie des patients. A ce propos, les patients ayant un débit collatéral adéquat dans la zone à risque développent de plus petits infarctus et présentent une meilleure fonction ventriculaire que ceux sans débit collatéral (Christian et coll. 1992, Clements et coll. 1993).

1.7 Préconditionnement ischémique

Initialement, l'on croyait que l'ischémie récurrente produisait des lésions cumulatives, et que le myocarde était plus susceptible à d'autres épisodes ischémiques. Cependant, des études menées par Neely et Grotyohann (1984) ont démontré, dans des coeurs isolés de rats, que 10 à 15 minutes d'hypoxie améliorait la fonction ventriculaire suite à 30 minutes d'ischémie ultérieure. En ce sens, Murry et coll. (1986) ont été les premiers à suggérer, dans un modèle canin, que de brèves périodes d'ischémie myocardique (4 cycles de 5 minutes d'occlusion séparés par 10 minutes de reperfusion) réduisaient la perte de phosphates à haute énergie et la taille ultime de l'infarctus suite à une période d'ischémie prolongée. Ils ont nommé ce phénomène paradoxal: preconditionnement ischémique.

Le preconditionnement ischémique peut se définir comme une adaptation endogène prenant forme suite à une agression ischémique brève et réversible et conférant à l'organe ischémié un état de tolérance à une agression ischémique ultérieure de nature irréversible. Ce phénomène est important car le degré de protection est de beaucoup supérieur à toute autre forme d'intervention thérapeutique avec des réductions de 75% de la taille d'infarctus (Millar et coll. 1996). De plus, des études récentes semblent indiquer que le preconditionnement ischémique peut conférer de la résistance à des tissus qui n'ont jamais été soumis à un épisode ischémique (Przyklenk et coll. 1993, Gho et coll. 1996).

Les effets bénéfiques du préconditionnement ont été observés chez le chien (Murry et coll. 1986), le porc (Schott et coll. 1990) et le rat (Li et coll. 1992) ainsi que chez l'homme (Deutsch et coll. 1990, Yellon et coll. 1993, Tomai et coll. 1994). Cependant, il existe des différences significatives dans les mécanismes sous-jacents selon l'espèce animale à l'étude. En outre, la séquence ischémie brève/reperfusion intermédiaire/ischémie prolongée s'inscrit dans un temps relativement précis selon l'espèce animale (Parratt 1994). Chez le chien, par exemple, Murry et coll. (1986) ont démontré que la taille de l'infarctus était réduite après 40 minutes d'occlusion, mais non après 180 minutes. Nao et coll. (1990) ont suggéré que la fenêtre de protection pouvait s'étendre à 60 minutes d'occlusion, mais ne pouvait excéder 90 minutes. Le préconditionnement ne prévient pas la lésion ischémique; il retarde simplement le début de la nécrose et il ne s'agit que d'une protection temporaire.

Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer la protection conférée par le préconditionnement ischémique, et à ce jour, l'hypothèse la plus probable serait l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'ischémie myocardique mène à la translocation de la PKC du cytosol à la membrane cellulaire des myocytes où elle peut être phosphorylée et moduler la fonction de divers médiateurs cellulaires libérés pendant l'ischémie (Strasser et coll. 1992). Plusieurs observations expérimentales appuient cette hypothèse, car l'inhibition de la PKC par la staurosporine, la polymixine B et la colchicine abolit les effets bénéfiques du préconditionnement (Millar et coll. 1996). Cependant, la translocation de la PKC ne semble pas jouer un rôle important dans le modèle canin, car le groupe de Przyklenk et coll. (1995) n'a pu mettre en évidence ce phénomène.

Le médiateur endogène le plus étudié dans le préconditionnement est l'adénosine

(Millar et coll. 1996). Dans des coeurs isolés de lapins, les antagonistes non spécifiques des récepteurs de l'adénosine abolissent les effets bénéfiques du préconditionnement (Liu et coll. 1991, Downey et coll. 1993) tandis que le prétraitement avec des agonistes des récepteurs A_1 (mais non A_2) réduit autant la taille de l'infarctus que si ces coeurs avaient été préconditionnés (Downey et coll. 1993, Tsuchida et coll. 1992). De même, l'acadosine (qui contrôle le niveau d'adénosine) augmente la protection due au préconditionnement (Mullane 1993). Les récepteurs A_2 seraient impliqués dans le préconditionnement des cellules endothéliales bovines via une activation de la PKC (Zhou et coll. 1996). Selon Parratt (1994), plusieurs mécanismes interviendraient dans la cardioprotection de l'adénosine pendant le préconditionnement, dont l'inhibition de la libération de la noradrénaline et de l'endothéline, la vasodilatation coronarienne, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et l'activation des neutrophiles, ainsi que le maintien du statut énergétique.

Les récepteurs adrénérgiques ont été proposés dans le préconditionnement, car l'activation des récepteurs α_1 -adrénérgiques par la phényléphrine protège le myocarde contre les lésions ischémiques, et cette protection est inhibée par la clonidine (Tsuchida et coll. 1994). De même, les antagonistes des récepteurs β -adrénérgiques, comme la réserpine et l'aténolol, inhibent la cardioprotection induite par le préconditionnement (Vander Heide et coll. 1995). D'autres médiateurs possibles comprennent la bradykinine (Brew et coll. 1995), et l'endothéline, bien qu'une étude très récente rejette son implication (Erikson et Velasco 1996) ainsi que la prostaglandine E_1 (Hide et coll. 1995). Cependant, selon Li et Kloner (1992), il est peu probable que les prostaglandines soient importantes dans le préconditionnement, car les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase n'atténuent pas ses effets

bénéfiques. Par contre, l'inhibition de la voie de la lipoxycgénase élimine la cardioprotection du préconditionnement (Murphy et coll. 1995)

Les mécanismes par lesquels la PKC confère une protection sont encore incertains. L'ouverture des canaux potassiques dépendants d'ATP serait une hypothèse probable. En hyperpolarisant la membrane, l'influx de calcium est réduit, ce qui peut contribuer au maintien des réserves énergétiques lors d'épisodes d'ischémie subséquents (Menasché 1996). L'activation des canaux potassiques apparaît comme une conséquence potentiellement importante de l'activation de la PKC sans pour autant exclure l'implication d'autres effecteurs (Millar et coll. 1996).

Un concept récent qui contraste avec l'effet précoce du préconditionnement, tient à sa nature aussi tardive. Marber et coll. (1993) et Kuzuya et coll. (1993) ont mentionné qu'il se développait une tolérance à une agression ischémique 24 heures après le préconditionnement. De fait, ces auteurs ont démontré chez le lapin (Marber et coll. 1993) que 4 cycles de 5 minutes d'occlusion coronarienne réduisaient l'infarctus de 44% suite à 30 minutes d'ischémie 24 heures après le préconditionnement. En utilisant un protocole similaire chez le chien, Kuzuya et coll. (1993) ont noté une diminution de 46% de la taille de l'infarctus. Des études récentes indiquent que la cardioprotection peut se maintenir même 72 heures après le préconditionnement (Yellon et Baxter 1995), et quelle est bénéfique sur la sidération myocardique (Sun et coll. 1995) et les arythmies de reperfusion (Vegh et coll. 1994). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore élucidés, mais il semble que la synthèse de nouvelles protéines comme les protéines de stress (*heat shock proteins*) y joue un certain rôle (Millar et coll. 1996). En fait, le contenu myocardique des HSP70 est élevé

24 heures après le préconditionnement, donc lorsque la tolérance ischémique est observée (Marber et coll. 1993, Yang et coll. 1996a).

La protection myocardique par le préconditionnement est très pertinente, car elle peut être applicable à l'homme (Kloner et Yellon 1994, Jenkins et coll. 1995). Par exemple, de brèves périodes de clampage aortique préviennent la perte d'ATP et améliorent la fonction myocardique (Yellon et coll. 1993). Par ailleurs, le préconditionnement ischémique pourrait aussi modifier le développement de certaines maladies des artères coronaires. Kloner et coll. (1995) et Ottani et coll. (1995) ont démontré que la zone de nécrose était beaucoup plus petite chez des patients présentant des symptômes d'angine immédiatement avant un infarctus. De même, une meilleure préservation de la fonction ventriculaire a été observée (Nakagawa et coll. 1995). L'identification des médiateurs et le développement de modulateurs pharmacologiques du préconditionnement pourraient ouvrir de nouvelles voies dans le traitement des syndromes ischémiques. Selon Speechly-Dick et coll. (1995), le préconditionnement humain se ferait grâce à l'activation de la PKC et des canaux potassiques.

1.8 Reperfusion myocardique

Nous avons vu dans les pages précédentes les conséquences de l'ischémie sur l'intégrité et la survie des cardiomyocytes. Pour tenter de minimiser les effets délétères de l'ischémie myocardique, la perfusion doit être rétablie le plus rapidement possible. Lorsque les myocytes présentent des lésions irréversibles, la reperfusion ne peut prévenir la nécrose. D'autre part, si les myocytes sont altérés réversiblement, la reperfusion peut précipiter la

transformation de ces lésions en lésions irréversibles. Ce phénomène paradoxal associé à la reperfusion porte le nom de lésions de reperfusion. Les effets bénéfiques et délétères de la reperfusion sur la sauvegarde myocardique seront décrits dans les pages suivantes.

1.8.1 Effets bénéfiques de la reperfusion

Il n'y a plus de doute aujourd'hui que la reperfusion pharmacologique ou chirurgicale est nécessaire à la survie myocardique. Plusieurs études multicentriques ont démontré l'impact du traitement thrombolytique sur la fonction ventriculaire gauche et la réduction de la mortalité à court et moyen terme (GUSTO 1993, Huber et coll. 1996). Une reperfusion plus tardive est aussi bénéfique, mais par des mécanismes différents de ceux qui sont impliqués dans la reperfusion précoce (Richard et coll. 1995, Alhaddad et coll. 1995). Néanmoins, la reperfusion est responsable du développement de lésions qui n'étaient pas apparentés pendant l'ischémie. Le concept des lésions de reperfusion est excessivement important, car il est associé à la détérioration du myocarde ischémié.

1.8.2 Altérations de reperfusion (*reperfusion injury*)

Le moyen le plus efficace de limiter la progression de l'infarctus est la reperfusion. Cependant, un grand nombre d'études expérimentales ont démontré que la reperfusion était responsable de l'apparition de traits de nécrose malgré l'apparence saine des myocytes au microscope optique. Les altérations de reperfusion peuvent être considérées comme des lésions cellulaires qui se produisent pendant la reperfusion du tissu préalablement ischémié, et provoquent une aggravation de la nécrose qui est normalement imputable à

l'ischémie seule.

Les altérations de reperfusion ont pour origine l'étude de Tennant et Wiggers (1935) qui a démontré une incidence marquée de fibrillation ventriculaire pendant la reperfusion. Par la suite, Jennings et coll. (1960) ont observé que des altérations ultrastructurales étaient associées à la reperfusion. Bulkley et Hutchins (1977) ont noté, au cours d'études post-mortem sur des coeurs revascularisés, la présence de nécrose en bandes de contraction caractéristique de la reperfusion. De plus, Hearse et coll. (1978) ont indiqué, dans des coeurs isolés de rats, que la réoxygénation induisait une perte importante d'enzymes (créatine kinase) dans les premiers instants de la reperfusion en plus de lésions ultrastructurales.

Toutefois, le concept d'altérations de reperfusion n'a pu être pleinement apprécié qu'à partir des travaux de Rosenkranz et Buckberg (1983) lorsqu'ils ont démontré que la fonction myocardique pouvait être grandement améliorée en modifiant la composition des solutions cardioplégiques au moment de la reperfusion. Néanmoins, il existe toujours une controverse au sujet de l'existence des lésions de reperfusion (Braunwald et Kloner 1985). Les altérations de reperfusion les plus importantes, soit les arythmies de reperfusion, la nécrose accélérée et la sidération myocardique, seront décrites dans les pages qui suivent.

1.8.1.1 Arythmies de reperfusion

Une conséquence délétère de la reperfusion est l'apparition d'arythmies, principalement au début de la reperfusion. Elles sont caractérisées par des battements ventriculaires prématurés, un rythme idioventriculaire accéléré susceptible d'entraîner des tachycardies et des fibrillations ventriculaires (Manning et Hearse 1984). Ces arythmies sont

déTECTABLES seulement quelques secondes après le début de la reperfusion (Manning et Hearse 1984), et prépondérantes après 10 à 25 minutes d'occlusion (Sommers et Jennings 1972, Hearse 1992). Les arythmies de reperfusion ont été observées chez toutes les espèces animales ainsi que chez l'homme (Goldberg et coll. 1983).

Plusieurs mécanismes interviendraient dans la genèse des arythmies de reperfusion. Ils comprennent la stimulation excessive des récepteurs adrénergiques et l'élévation de l'AMP cyclique (Sheridan et coll. 1980), une altération du métabolisme lipidique et la formation de lysophosphatides (Corr et coll. 1987), une perte de l'homéostasie du calcium et du potassium (Opie et Coetzee 1987) et la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Manning et Hearse 1984). Ce dernier mécanisme a été le sujet de nombreuses études qui ont démontré qu'un stress oxydatif au niveau des membranes lipidiques favorisait la perte de potassium et la redistribution du calcium. Le rôle des radicaux libres dans l'arythmogénèse est renforcé par l'utilisation d'antioxydants tels la SOD, la catalase ou la desferroxamine qui réduisent l'incidence de fibrillation ventriculaire pendant la reperfusion (Opie 1989). Inversement, l'exposition du coeur à des systèmes générant des radicaux libres induit des arythmies (Bernier et coll. 1986, Hearse et coll. 1989).

Si toutefois les arythmies de reperfusion sont fréquemment observées chez les patients pendant le traitement thrombolytique, on a souvent constaté que le coeur humain était moins sensible à ce type d'altération de reperfusion que celui des autres espèces animales (Opie 1989). Plusieurs explications ont été proposées, notamment le fait que la thrombolyse est caractérisée par une reperfusion graduelle et non brusque comme dans la majorité des modèles expérimentaux (Hearse 1992). De plus, le traitement thrombolytique

est instauré plusieurs heures après le début des symptômes ischémiques, donc pendant une période où l'incidence des arythmies de reperfusion est plus faible (Hearse et Manning 1984).

1.8.1.2 Accroissement de la nécrose

L'accroissement de la taille de l'infarctus pendant la reperfusion est toujours controversée, car il est difficile de vérifier si les cellules qui ont subi des lésions réversibles pendant l'ischémie survivent pendant la reperfusion. L'approche la plus stratégique pour étudier ce phénomène est l'utilisation d'outils pharmacologiques qui permettent de réduire la taille de l'infarctus de façon plus marquée que si la reperfusion se faisait sans aucune intervention. Ce type de protocole expérimental nécessite l'administration de l'agent pharmacologique tout juste avant le début de la reperfusion pour caractériser son effet sur la reperfusion, et non sur l'ischémie. Ainsi, de très nombreuses études (Opie 1989, Rousseau et coll. 1991, 1994) ont pu mettre en évidence la présence de lésions de reperfusion en modulant pharmacologiquement la reperfusion de sorte que la taille des infarctus des animaux traités était réduite comparativement à celle de leurs témoins respectifs. Un phénomène comparable semble exister chez l'homme (Forman et coll. 1991).

1.8.1.3 Sidération myocardique (*stunning*)

Le tissu reperfusé après une courte période d'ischémie (< 20 minutes) finit par retrouver sa fonction normale. Le fait que plusieurs heures soient nécessaires à la récupération de la fonction contractile du myocarde post-ischémique est devenu la pierre angulaire de très nombreuses études expérimentales et cliniques. La sidération myocardique

a été décrite comme une dysfonction contractile prolongée (mais transitoire) du myocarde reperfusé en l'absence de lésions cellulaires irréversibles (Heyndrickx et coll. 1975, Braunwald et Kloner 1982). Par exemple, 15 minutes d'ischémie coronarienne ne suffisent pas à provoquer un infarctus chez le chien, mais une dépression contractile est observée pendant environ 24 heures (Bolli et coll. 1988).

Le délai de la récupération fonctionnelle du myocarde après un épisode ischémique de courte durée a fait l'objet de nombreuses études expérimentales (Bolli 1992). Il semble que la durée de la sidération myocardique dépend du modèle animal utilisé (éveillé ou anesthésié), de l'intensité et la durée de l'ischémie préalable, et de la région myocardique étudiée (sous-endocarde, mésomyocarde, sous-épicarde). Après une ischémie de 5 à 15 minutes, la durée de la sidération myocardique varie de plusieurs heures à quelques jours (Bolli et coll. 1988), mais en cas de nécrose sous-endocardique, la récupération fonctionnelle du sous-épicarde est retardée pendant plusieurs jours ou semaines (Théroux et coll. 1976, Lavallée et coll. 1983, Matsuzaki et coll. 1983).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la sidération myocardique, dont la perte des réserves d'ATP, une perturbation de l'homéostasie calcique, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'activation et l'accumulation de leucocytes. Comme pour les arythmies de reperfusion, les deux mécanismes les plus plausibles demeurent la production de radicaux libres pendant les premiers instants de la reperfusion ainsi que l'altération de l'homéostasie calcique.

L'aspect temporel de la dysfonction contractile et l'importance du traitement antioxydant dans les premières heures de reperfusion ont été principalement développés par

le groupe de Bolli (Myers et coll. 1985, 1986, Bolli et coll. 1987, 1988, 1990). Chez le chien, ces auteurs ont démontré qu'après 15 minutes d'occlusion coronarienne, la récupération de la fonction myocardique post-ischémique était améliorée de façon marquée en présence de SOD et de catalase (Myers et coll. 1985, Koerner et coll. 1991), mais que l'administration individuelle de l'un ou de l'autre de ces piègeurs était inefficace (Jeroudi et coll. 1990). Ces résultats suggèrent que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène contribuent à la sidération myocardique, et que l'administration combinée de SOD et de catalase est la plus efficace.

Toutefois, il est possible que le radical hydroxyle issu de la réaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène puisse aussi être responsable de la sidération. De fait, le diméthylthiourée (un piègeur spécifique du radical hydroxyle) améliore la fonction contractile du myocarde post-ischémique (Bolli et coll. 1987, Carrea et coll. 1991). Ces résultats suggèrent que le radical hydroxyle est le médiateur de la dysfonction contractile et que la SOD et la catalase ont un effet bénéfique, probablement en inhibant la synthèse du radical hydroxyle.

Les études mentionnées précédemment n'ont pas mesuré la présence de radicaux libres. Des études en résonance paramagnétique utilisant le piègeur α -phényl *N-tert*-butyl nitron ont démontré, de façon directe, la génération de radicaux libres dans le myocarde sidéré, et l'inhibition de leur synthèse se traduit par une amélioration de la dysfonction ventriculaire. Cependant, si le traitement intervient 1 minute après le début de la reperfusion, on observe aucun effet bénéfique, ce qui suggère que les effets délétères des radicaux libres se produisent dès le premiers instants de la reperfusion (Bolli et coll. 1989a, 1990a). En

résumé, le radical hydroxyle semble jouer un rôle important dans la sidération myocardique, mais l'ensemble des métabolites de l'oxygène semble aussi contribuer à la dysfonction post-ischémique. Le mécanisme précis par lequel les radicaux libres dépriment la fonction ventriculaire demeure toujours incertain.

Plusieurs études ont mentionné l'importance des perturbations du métabolisme calcique intracellulaire dans la physiopathologie de la sidération myocardique. Kusuoka et coll. (1987) ont démontré, dans des coeurs isolés de furets perfusés avec une solution pauvre en calcium, une amélioration significative de la fonction ventriculaire suite à 15 minutes d'ischémie globale. Inversement, l'exposition de coeurs isolés normaux à une surcharge calcique provoque une dysfonction contractile semblable à celle que l'on retrouve dans les protocoles de sidération myocardique (Kitakaze et coll. 1988).

Les antagonistes du calcium ont été utilisés pour déterminer le rôle de la fluctuation du calcium sur la sidération myocardique. En effet, la vérapamil, le diltiazem et la nifédipine améliorent la fonction contractile du myocarde sidéré (Lamping et Gross 1985, Przyklenk et Kloner 1988, Taylor et coll. 1990). Cependant, il est difficile d'interpréter ces résultats, car la protection peut être due à un effet intrinsèque de ces agents ou à la modulation de paramètres hémodynamiques, ce qui pourrait avoir une incidence favorable sur le myocarde sidéré. L'effet bénéfique de la nifédipine, infusée après 30 minutes de reperfusion, a été démontré en absence de modification hémodynamique (Przyklenk et coll. 1989). Cependant, il est difficile d'évaluer la pertinence de cette observation car la sidération myocardique est considérée comme le résultat d'une surcharge calcique dès le début de la reperfusion.

Chapitre 2

Neutrophiles et plaquettes dans l'ischémie-reperfusion

2.1 Introduction

La relation entre l'inflammation et l'infarctus aigu du myocarde a été mise en évidence il y a plus de 50 ans par Mallory et coll. (1939) lorsqu'ils ont démontré que la zone de nécrose était infiltrée par des leucocytes polymorphonucléaires 24 heures après le début de l'ischémie. A partir d'un modèle canin d'ischémie-reperfusion myocardique, Sommers et Jennings (1964) ont démontré une infiltration rapide des neutrophiles vers le territoire ischémique pendant la reperfusion. Ces résultats supposent donc une implication des neutrophiles tant, pendant l'ischémie que durant la reperfusion.

La cinétique des neutrophiles pendant la reperfusion a été décrite en utilisant des techniques histologiques (Engler et coll. 1983), et enzymatiques (Mullane et coll. 1985), et par marquage radioactif (Romson et coll. 1982). Ainsi, Dreyer et coll. (1991) ont observé que l'accumulation de neutrophiles dans le territoire ischémique était multipliée par un facteur de 6 dans la première heure de reperfusion pour s'atténuer graduellement entre 18 et 24 heures. Chatelain et coll. (1987) ont indiqué que la séquestration de neutrophiles se manifestait principalement dans la région sous-endocardique du myocarde reperfusé. Les premières heures de la reperfusion semblent jouer un rôle important dans l'accumulation de neutrophiles (de Lorgeril et coll. 1990) et celle-ci a été associée à la présence de facteurs chimiotactiques dans la lymphe qui draine le myocarde reperfusé (Dreyer et coll. 1989).

Le rôle potentiel des neutrophiles dans les lésions de reperfusion a été notamment

mentionné par de Lorgeril et coll. (1989). Ces auteurs ont démontré qu'une neutropénie réduisait la taille de l'infarctus de 35% chez le chien anesthésié, suite à 2 heures d'occlusion. Des résultats comparables ont été obtenus par Litt et coll. (1989) en utilisant des filtres anti-neutrophiles au moment de la reperfusion. Ces études confirment donc que l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde reperfusé amplifie le développement des lésions irréversibles.

Le rôle des plaquettes dans la production de lésions de reperfusion est moins bien connu que celui des neutrophiles. L'accumulation de plaquettes dans le myocarde reperfusé a été démontrée expérimentalement (Laws et coll. 1983, Bednar et coll. 1985), et la cinétique de l'accumulation semble comparable à celle que l'on observe pour les neutrophiles. Cependant, des études réalisées chez des chiens thrombocytopéniques n'ont pu démontrer une réduction de la taille d'infarctus (Jolly et coll. 1985, Mullane et McGiff 1985) laissant donc supposer que les plaquettes ne jouent pas un rôle essentiel dans l'ischémie-reperfusion. En outre, des études utilisant l'aspirine, un agent antiplaquettaire, se sont avérées négatives (Mullane et Fornabaio 1988).

Certaines conditions cliniques (Dinerman et Mehta 1990) et expérimentales (Golino et coll. 1988, Folts 1991) comme la présence d'une sténose critique sévère sont associées à une activation plaquettaire importante. Or, tel que rapporté dans le chapitre 5, nous avons démontré (Rousseau et coll. 1993) que la présence d'une sténose critique résiduelle en cours de reperfusion augmente la taille ultime de l'infarctus, et qu'une thrombocytopénie réduit la nécrose de façon significative indiquant un rôle clé des plaquettes sous cette condition. D'autre part, une étude récente de Barrabés et coll. (1996) conclut également que des lésions

endothéliales au site d'occlusion activent les plaquettes, ce phénomène se traduit par une augmentation de la taille de l'infarctus. Donc, ces études suggèrent que les plaquettes jouent effectivement un rôle important dans la production de lésions de reperfusion dans des conditions permettant une activation plaquettaire.

Au cours de ce chapitre, le rôle des neutrophiles et des plaquettes dans la production de lésions de reperfusion sera décrit, de même que les interactions qui existent entre ces deux éléments sanguins.

2.2 Rôle des neutrophiles dans l'ischémie-reperfusion

Le rôle des neutrophiles dans la genèse de lésions de reperfusion ne fait plus de doute aujourd'hui (Hansen 1995). Deux approches ont été utilisées pour le mettre en évidence, soit 1) l'utilisation d'agents pharmacologiques (Mullane et coll. 1984, Rousseau et coll. 1991, 1994) ou de sérums anti-neutrophiles (de Lorgeril et coll. 1989, Litt et coll. 1989), et 2) l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés vers les molécules d'adhésion endothéliales et leucocytaires (Chen et coll. 1994, Hartman et coll. 1995). Ces études ont révélé une corrélation positive entre la présence de neutrophiles et l'étendue de la nécrose. L'utilisation d'anticorps monoclonaux est une approche très prometteuse, car ces derniers interfèrent avec les premières étapes de la migration des neutrophiles. Nous examinerons dans les pages suivantes les mécanismes de l'activation et de la mobilisation des neutrophiles dans le myocarde post-ischémique.

2.2.1 Mobilisation et activation des neutrophiles dans l'infarctus

Des études cliniques ont démontré une infiltration massive de leucocytes dans le territoire nécrosé entre 24 et 96 heures après l'infarctus du myocarde (Mallory et coll. 1939, Fishbein et coll. 1978). Les études de Thakur et coll. (1979, 1982) sur la cinétique de la réaction inflammatoire ont permis de confirmer une accumulation marquée de neutrophiles dans le sous-épicaarde après 24 heures d'ischémie, mais une accumulation maximale dans le sous-endocarde n'a été observé qu'après 72 heures. Cette disparité peut s'expliquer par la présence d'un débit collatéral de suppléance plus important dans la région sous-épicaardique, ce qui favorise la migration leucocytaire.

En présence de reperfusion, la cinétique de l'accumulation des neutrophiles dans le myocarde post-ischémique est très différente de celle que l'on observe pendant l'ischémie (Chatelain et coll. 1987). Engler et coll. (1986) ont démontré une augmentation de la densité de neutrophiles de 25% dans le sous-endocarde après 5 minutes de reperfusion. A ce propos, de Lorgeril et coll. (1990) ont décrit une infiltration accentuée de neutrophiles pendant les 6 premières heures de reperfusion, et en relation étroite avec la zone de nécrose (principalement dans la portion externe de l'infarctus). Donc, la reperfusion permet un mouvement plus rapide des neutrophiles vers les régions nécrosées que dans le cas d'un infarctus non reperfusé. Une accumulation plus importante dans la région externe de l'infarctus suggère que ces cellules contribuent aux lésions de reperfusion. De plus, la libération importante de facteurs chimiotactiques pendant l'ischémie assure une migration plus intense des neutrophiles vers le foyer ischémique.

Le système du complément a été impliqué dans l'activation des neutrophiles pendant

l'ischémie-reperfusion. Le rôle du complément dans l'infarctus du myocarde fut mis en évidence par Hill et Ward (1971) lorsqu'ils ont démontré, après 3 heures d'ischémie chez le rat, la présence d'une protéase tissulaire capable d'activer la fraction C3 du complément. Pinckard et coll. (1973, 1975) ont suggéré, ce que Kagiya et coll. (1989) ont confirmé, que des fractions cellulaires myocardiques riches en mitochondries pouvaient activer les voies classique et alternative du complément. En désactivant le système du complément avec le facteur venin de cobra, Maroko et coll. (1978) ainsi que Crawford et coll. (1988) ont pu démontrer une réduction de l'étendue de l'infarctus ainsi que l'accumulation de neutrophiles. A cet égard, Rossen et coll. (1985) ont observé que la protéine de liaison C1q pouvait être localisée dans le myocarde post-ischémique, et que sa présence était en corrélation avec l'infiltration de neutrophiles. De plus, les fractions C3, C4 et C5 s'accumulent à la périphérie de la zone nécrosée (Pinckard et coll. 1980, McManus et coll. 1983). Ces résultats semblent indiquer que le complément joue un rôle dans la migration des neutrophiles pendant l'ischémie-reperfusion.

L'anaphylatoxine C5a a été impliquée dans le chimiotactisme et l'adhésion des neutrophiles, la production de radicaux libres, la libération d'enzymes lysosomiales et l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique (Homeister et Lucchesi 1994). De plus, la C5a interagit directement avec les cellules endothéliales pour convertir la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase (Friedl et coll. 1989). Cependant, les effets de la C5a dans l'activation des neutrophiles pendant l'ischémie-reperfusion sont moins bien définis. Amsterdam et coll. (1995) ont démontré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé sur la C5a réduisait la taille de l'infarctus, mais sans modifier l'accumulation de neutrophiles.

Ces auteurs ont suggéré que l'atténuation de l'agrégation et de la dégranulation des neutrophiles ainsi que la production de superoxyde pouvaient expliquer ces effets bénéfiques. De plus, l'infusion de C5a dans une artère coronaire provoque une réduction du débit coronarien régional et atténue l'activité contractile par la formation de thromboxane A₂ (TXA₂) et de leucotriènes (Ito et coll. 1989, 1990), indépendamment de sa capacité à séquestrer les neutrophiles (Del Balzo et coll. 1993). Donc, la C5a semble impliquée dans les lésions de reperfusion par deux phénomènes distincts, soit la production de substances vasoactives qui peuvent intensifier l'ischémie et par la séquestration de neutrophiles (Shandelya et coll. 1993).

Une autre composante du complément est le complexe d'attaque membranaire (*membrane attack complex*; MAC). Le complément agit principalement par la formation et l'insertion du MAC (ou complexe C5b-9) dans les membranes cellulaires, ce qui entraîne la perte du contrôle osmotique et la lyse cellulaire (Kilgore et coll. 1994). Plusieurs observations cliniques ont démontré la formation du MAC pendant l'infarctus du myocarde (Langlois et Gawryl 1985, Yasuda et coll. 1990), et l'utilisation d'anticorps anti-MAC a permis de le localiser avec précision dans la zone de nécrose (Schäfer et coll. 1986, Rus et coll. 1987). En outre, certaines composantes intracellulaires libérées par les cellules nécrosées activent le complément et la formation du MAC (Pinckard et coll. 1973, Schäfer et coll. 1986). Mathey et coll. (1994) ont observé que le complexe C5b-9 s'accumulait plus rapidement dans les coeurs reperfusés que dans les coeurs non reperfusés. Des études menées par Homeister et coll. (1992, 1993) ont mis en évidence que l'activation du MAC provoquait une dépression de la fonction ventriculaire et de la perfusion coronarienne au moment de la

reperfusion, et que l'administration d'un inhibiteur du C5b-9 prévenait cette détérioration (Shandelya et coll. 1993a). Bien que ces observations caractérisent indirectement les lésions de reperfusion, elles dénotent néanmoins que le MAC y joue un rôle primordial. Une étude très récente de Ito et coll. (1996) démontre que le complexe C5b-9 entraîne une augmentation de la taille d'infarctus après une courte période d'ischémie (30 minutes) suivie de reperfusion, et que l'ischémie prolongée (2 heures) est associée à une intensification du phénomène de non-reflot. De plus, Kilgore et coll. (1996) ont observé que des concentrations sous-lytiques de MAC sur des cellules endothéliales ombilicales humaines provoquaient une sécrétion séquentielle de facteurs chimiotactiques des neutrophiles, comme l'interleukine 8. Il s'agit là d'une constatation intéressante, car Kukielka et coll. (1995) ont suggéré que la reperfusion amorce une stimulation rapide de la synthèse de l'interleukine 8 dans le myocarde post-ischémique, ce qui favorise l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. De plus, les neutrophiles activés stimuleraient le complément par la libération de myéloperoxydase (Vogt 1996). Il semble donc exister un phénomène de rétroaction où le complément active les neutrophiles et, qu'en retour, ceux-ci accentuent l'activation du complément.

Une hypothèse intéressante a été développée ces dernières années en ce qui concerne l'effet du complément sur la fonction endothéliale. Une étude récente de Stahl et coll. (1995) suggère que la formation du MAC atténue la relaxation dépendante de l'endothélium par l'inhibition de la libération de NO produite par la NO synthétase constitutive. En fait, l'activation de la cascade du complément, et principalement la formation du MAC, permet l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium en suscitant une translocation rapide de la P-sélectine des corps de Weibel-Palade endothéliaux (Hattori et coll. 1989). Ce phénomène a

aussi été constaté en présence de C5a par Foreman et coll. (1994). Selon Mulligan et coll. (1992) ainsi que Ma et coll. (1993), l'inhibition de la synthèse de NO induit une surexpression de la P-sélectine. Il convient de noter que l'induction de l'expression de la P-sélectine pendant l'ischémie-reperfusion intestinale favorise le dépôt du complexe C5b-9 (Gibbs et coll. 1996). De même, les CD11b/CD18 de la famille des β_2 intégrines agissent comme récepteurs du complément (Vercellotti et coll. 1991). A cet égard, Buerke et coll. (1995) ont démontré qu'un inhibiteur du C1 inhibait également l'interaction entre les neutrophiles et l'endothélium, ce qui préservait la fonction endothéliale et diminuait la nécrose. Nous verrons dans les prochaines pages le rôle des sélectines et des intégrines dans la mobilisation des neutrophiles.

2.2.2 Adhésion des neutrophiles dans l'ischémie-reperfusion

L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium est absolument nécessaire pour assurer leur migration transpariétale vers les tissus ischémiques. On a constaté une progression très rapide ces dernières années dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'adhésion leucocytaire autant dans des conditions physiologiques que pathologiques (Kansas 1996, Hillis et MacLeod 1996). Un phénomène qui a reçu beaucoup d'attention est l'ischémie-reperfusion (Lefter et al. 1994, Lefter et Lefter 1996). Des études réalisées en microscopie intravitale et par cytométrie de flux ont permis d'élaborer un modèle intégrant plusieurs étapes impliquées dans la coordination de la migration des neutrophiles à travers l'endothélium (Butcher 1991, Springer 1994).

Le processus de recrutement pendant l'inflammation se déroule selon une séquence

bien précise et hautement régulée. Dans un premier temps, les neutrophiles vont adhérer (capture) à l'endothélium des veinules post-capillaires et y entreprendre un mouvement de roulement. Les neutrophiles seront activés par la présence de chimiokines, ce qui entraînera un ralentissement progressif du roulement, l'arrêt et l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium, puis leur migration (von Andrian et coll. 1991, Ley et coll. 1991). Ces différentes étapes sont sous le contrôle de deux familles de molécules d'adhésion; la capture et le roulement sont modulés par la famille des sélectines, soit la E-sélectine, la L-sélectine et la P-sélectine, tandis que l'adhésion ferme et la migration transpariétale sont régies par la famille de intégrines (CD11/CD18) et des immunoglobulines (ICAM, PECAM, VCAM).

Les lésions de reperfusion impliquent, en outre, deux phénomènes distincts, mais interdépendants, soit l'activation endothéliale et le recrutement des neutrophiles. Nous savons aujourd'hui que l'un des premiers événements responsables de la dysfonction endothéliale pendant la reperfusion est la perte de la libération constitutive de NO (Mehta et coll. 1989) de 2,5 à 5 minutes après le rétablissement de la circulation sanguine (Tsao et coll. 1990, Lefler et Ma 1991). Cette dysfonction endothéliale revêt une importance toute particulière, car elle est provoquée une séquence d'évènements qui permet le recrutement et la mobilisation des leucocytes via l'expression de P-sélectine (Davenpeck et coll. 1994, Weyrich et coll. 1995). Le recrutement des neutrophiles est régulé par la libération de facteurs chimiotactiques endogènes qui stimulent l'expression des CD11/CD18 (Granger et Kubes 1994). Ainsi, les neutrophiles activés pourront libérer leurs médiateurs cytotoxiques dans la microcirculation où ils pourront diffuser à travers l'endothélium jusqu'aux cardiomyocytes (Buerke et coll. 1994), ou bien les neutrophiles quitteront la microcirculation pour migrer et

adhérer à la matrice extracellulaire ou à des cellules cibles (Smith et coll. 1991).

Il existe 6 grandes familles de molécules d'adhésion qui règlent les interactions entre cellules, ou entre les cellules et la matrice extracellulaire (Jang et coll. 1994). Trois de ces familles sont directement impliquées dans la coordination des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales, soit la famille des sélectines, des intégrines et des immunoglobulines. Nous examinerons dans les pages suivantes les molécules qui régissent l'adhésion et la migration des neutrophiles; principalement pendant l'ischémie-reperfusion.

2.2.2.1 La famille des sélectines

La famille des sélectines comprend trois lectines, soit la E-sélectine (Lawrence et Springer 1993), la L-sélectine (von Andrian et coll. 1992) et la P-sélectine (Doré et coll. 1993) dépendantes du calcium, et qui entraînent l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium ou aux plaquettes activées.

La L-sélectine (CD62L, LAM-1, LECAM-1, PADGEM), présente de façon constitutive à la surface des leucocytes (principalement les neutrophiles et les lymphocytes), détermine le roulement initial des neutrophiles sur l'endothélium activé.

La P-sélectine (CD62P, GMP-140, PADGEM) se retrouve dans les granules alpha des plaquettes et dans les corpuscules de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Elle est rapidement redistribuée et exprimée à la surface des plaquettes et de l'endothélium suite à la libération d'activateurs humoraux comme la thrombine, l'histamine, le peroxyde d'hydrogène et les fractions du complément (Zimmerman et coll. 1992). La P-sélectine est exprimée de façon optimale et maximale 10 à 20 minutes après stimulation, et plusieurs études l'ont

considérée comme un médiateur nécessaire au roulement des leucocytes sur la surface endothéliale et aux interactions avec les plaquettes (McEver 1991, Weyrich et coll. 1995).

La E-sélectine (CD62E, ELAM-1) est responsable du roulement plus tardif des leucocytes (Kishimoto et coll. 1991). Elle est exprimée sur la surface endothéliale, mais seulement 4 à 6 heures après stimulation par les cytokines interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale- α (*tumor necrosis factor*; TNF- α) par un processus qui nécessite une synthèse protéique *de novo* (Bevilacqua et coll. 1987). Le rôle de la E-sélectine dans les lésions de reperfusion est incertain mais une étude d'occlusion cérébrale menée chez le singe démontre la présence de E-sélectine dans les régions non-ischémiques (Haring et coll. 1996) ce qui suggère la possibilité que des sites éloignés du foyer ischémique puissent être le siège de lésions inflammatoires via l'expression de E-sélectine.

La P- et la E-sélectine se lient à des contre-récepteurs contenant un tétrasaccharide fucosylé comme le sialyl Lewis^x (SLe^x), à des polysaccharides sulfatés comme l'héparine, et à la fucoïdine (Kansas 1996). C'est ainsi que l'administration d'un analogue du SLe^x réduit la taille de l'infarctus par l'atténuation de l'adhésion et de l'accumulation des neutrophiles (Buerke et coll. 1994a, Lefer et coll. 1994a, Murohara et coll. 1995). La L-sélectine serait liée à des glycoprotéines endothéliales ressemblant à des mucines (Kansas 1996).

La structure du ligand spécifique de la P-sélectine, le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) a été récemment clonée chez la souris (Yang et coll. 1996b), et l'on considère qu'il est à l'origine du roulement des neutrophiles sur la P-sélectine (Moore et coll. 1995, Norman et coll. 1995). Bargatze et coll. (1994) ont démontré que les neutrophiles roulent directement sur l'endothélium activé, mais aussi sur les neutrophiles qui y adhèrent. Walcheck et coll.

(1996) ont confirmé ces résultats tout en observant que le PSGL-1 des neutrophiles est aussi un ligand important de la L-sélectine. L'affinité de la L-sélectine pour le PSGL-1 permet aux neutrophiles qui roulent sur la P-sélectine de capturer d'autres neutrophiles ce qui amplifie leur recrutement.

La L-sélectine semble moduler la liaison des neutrophiles à la P- et la E-sélectine (Picker et coll. 1991). La L-sélectine, exprimée exclusivement et de façon constitutive à la surface des leucocytes, joue un rôle crucial dans la capture des neutrophiles, car leur roulement initial sur la P-sélectine peut être inhibé par des anticorps anti-L-sélectine (Ley et coll. 1991, Pizcueta et Luscinskas 1994). Les études de Ma et coll. (1993a) et de Buerke et coll. (1994b) dans des modèles félins d'ischémie-reperfusion ont démontré de manière conclusive que l'administration d'un anticorps anti-L-sélectine préservait la fonction endothéliale, inhibait l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde reperfusé et réduisait la taille de l'infarctus.

L'implication de la E-sélectine dans l'ischémie-reperfusion est moins bien définie. Celle-ci est exprimée à la surface endothéliale 4 à 6 heures après stimulation par des cytokines (Bevilacqua et coll. 1987). L'adhésion des neutrophiles dépendante de la E-sélectine peut être inhibée avec des anticorps anti-L-sélectine, ce qui indique qu'une partie de la liaison de la E-sélectine au SLe^x peut être exprimé sur la L-sélectine (Carlos et Harlan 1994). Dans le contexte d'ischémie-reperfusion, l'administration d'un anticorps anti-E-sélectine réduit l'étendue de la nécrose et l'accumulation de neutrophiles (Altavilla et coll. 1994) tandis que l'effet comparable observé après l'administration d'un analogue du SLe^x implique l'inhibition de la P- et de la E-sélectine endothéliale (Lefer et coll. 1994a, Silver et

coll. 1995). Il semble qu'il existe un chevauchement entre la P- et la E-sélectine, car il y a absence de synergisme lorsqu'un anticorps anti-E-sélectine est administré en présence d'un anticorps anti-P-sélectine (Bosse et Vestweber 1994). A l'aide de souris déficientes en E-sélectine, Labow et coll. (1994) ont démontré un recrutement normal de leucocytes dans différents modèles d'inflammation. Cependant, l'administration d'un anticorps spécifique à la P-sélectine inhibe la migration des leucocytes. Ces fonctions conjointes peuvent s'expliquer par une liaison plus efficace de la P-sélectine sur le PGSL-1 des neutrophiles que celle de la E-sélectine.

Les premières étapes de la migration des neutrophiles vers les sites d'inflammation se fait par l'intermédiaire de molécules d'adhésion qui font partie de la famille des sélectines. L'adhésion ferme des neutrophiles est sous le contrôle des intégrines, et la transmigration sous celui de la superfamille des immunoglobulines.

2.2.2.2 La famille des intégrines et des immunoglobulines

L'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium est modulée par la famille des β_2 intégrines qui sont des glycoprotéines hétérodimériques spécifiques aux leucocytes. Elles sont composées d'une chaîne commune β_2 (CD18) associée à l'une des trois chaînes α (CD11a, CD11b, CD11c). En se liant au contre-récepteur endothélial ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (Diamond et al. 1991), le CD11b/CD18 ou MAC-1 assure l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire (Arfors et coll. 1987). Le CD11a/CD18 ou LFA-1 a pour ligand l'ICAM-1 (Dustin et Springer 1988) et l'ICAM-2 (Stauton et coll. 1989) exprimés de manière constitutive par l'endothélium. Ces ligands sont rapidement

surexprimés en présence de cytokines (Dustin et coll. 1986) ou suite au décapage de la L-sélectine, et assurent l'adhésion endothéliale des neutrophiles (Kishimoto et coll. 1989, Jutila et coll. 1989).

La modulation pharmacologique de l'activité des intégrines est pertinente dans le contexte de l'ischémie-reperfusion, car la cardiotoxicité des neutrophiles est en grande partie dépendante de la liaison CD18/ICAM-1. De plus, Youker et coll. (1994) ont confirmé la localisation de l'ICAM-1 dans le territoire ischémique, plus particulièrement entre la zone de nécrose et les cellules viables. Selon ces auteurs, la transcription de l'ICAM-1 dans les premières heures de reperfusion pourrait rendre les cellules de cette zone plus sensibles aux lésions de reperfusion causées par les neutrophiles. L'expression accrue des CD11/CD18 et de l'ICAM-1 a aussi été relevée dans l'angine instable (Mazzone et coll. 1993, de Servi et coll. 1996), l'infarctus du myocarde (Haught et coll. 1996), l'accident vasculaire cérébral (Lindsberg et coll. 1996) et suite à l'angioplastie (Inoue et coll. 1996).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les CD11/CD18 ou l'ICAM-1 chez le chat (Ma et coll. 1992) et le chien (Hartman et coll. 1995) a clairement démontré une diminution de l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde post-ischémique et, par conséquent, une réduction de l'étendue de la nécrose. Ces résultats ont été récemment confirmés chez des souris génétiquement déficientes en ICAM-1 (Kelly et coll. 1996). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-CD18 atténue la dysfonction contractile du myocarde post-ischémique (Lefter et coll. 1993, Arai et coll. 1996) ainsi que la vasorelaxation dépendante de l'endothélium (Ma et coll. 1991). Cependant, il existe certaines divergences à propos de la cardioprotection associée à l'utilisation de ces anticorps. Le groupe de Reimer (Tanaka et

coll. 1993) n'a pu mettre en évidence une réduction de la taille de l'infarctus malgré l'atténuation de la séquestration de neutrophiles dans le territoire ischémique et l'augmentation du débit sanguin régional. Une explication possible serait que la durée de la reperfusion n'était que de 3 heures, et on a déjà établi que l'infarctus croît d'environ 40% entre 3 et 6 heures de reperfusion (de Lorgeril et coll. 1990).

Un autre membre de la superfamille des immunoglobulines est la PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) présente de manière constitutive à la surface des plaquettes, des leucocytes et des cellules endothéliales (Muller et coll. 1993). Au niveau des jonctions intercellulaires endothéliales, 1×10^6 PECAM-1 sont exprimées, et elles semblent être en étroite relation avec la migration transendothéliale des leucocytes (Muller et coll. 1993). En outre, ces auteurs ont démontré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la PECAM-1 empêchait la migration des monocytes et des neutrophiles. Etant donné la position stratégique de la PECAM-1, plusieurs groupes ont suggéré qu'elle contribuait aux lésions de reperfusion. A ce propos, Gumina et coll. (1996) ont démontré que l'inhibition de la fonction de PECAM-1 par des anticorps réduisait l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde post-ischémique et l'étendue de l'infarctus. Murohara et coll. (1996) ont confirmé ces résultats en indiquant que les anticorps anti-PECAM-1 inhibaient spécifiquement la migration transendothéliale des neutrophiles.

Il y a donc un grand nombre de molécules d'adhésion impliquées dans la coordination des interactions entre les leucocytes et la paroi endothéliale. La capture initiale et le roulement progressif des leucocytes sur la surface endothéliale se font par l'intermédiaire de la famille des sélectines. L'activation des leucocytes pendant le roulement nécessite

l'expression de facteurs chimiotactiques associés à l'endothélium pour la liaison des intégrines (CD11/CD18) à leurs ligands respectifs (ICAM-1 et 2).

2.2.3 Libération de médiateurs cytotoxiques

L'activation des neutrophiles mène à la synthèse et la libération d'une grande variété de médiateurs cytotoxiques. Libérés dans la microcirculation, ceux-ci pourront diffuser librement à travers l'endothélium jusqu'aux cellules parenchymateuses. Si les neutrophiles ont préalablement migré vers les tissus, ils pourront adhérer aux cellules cibles et les altérer directement. Le potentiel cytotoxique des neutrophiles se manifeste principalement par la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène et l'exocytose d'enzymes protéolytiques, dont les protéases élastase et cathepsine G, les métabolites de l'acide arachidonique et le PAF.

Suite à la libération de stimuli pro-inflammatoires, comme les fractions du complément (C5a), la LTB₄, le PAF ou d'autres cytokines (Weiss 1989), le complexe enzymatique de la NADPH oxydase des neutrophiles (normalement inactif dans les cellules non stimulées), provoque une explosion respiratoire caractérisée par la formation d'anions superoxyde (Babior et coll. 1973), de peroxyde d'hydrogène (Root et Metcalf 1977) et de radicaux hydroxyles (Tauber et Babior 1977). Dans des conditions physiologiques, les anions superoxyde sont dismutés spontanément en peroxyde d'hydrogène par le piègeur endogène SOD. Cependant, le superoxyde peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène, selon une réaction de type Haber-Weiss, pour former des radicaux hydroxyles qui sont hautement réactifs et toxiques. La majorité des stimuli qui favorisent la synthèse du superoxyde libèrent également

de la myéloperoxydase contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles (Hansen 1995). Cette enzyme catalyse l'interaction entre le peroxyde d'hydrogène et les dérivés halogénés (principalement l'ion chlorure) pour former de l'acide hypochlorique, qui est un oxydant très puissant (Weiss 1989). L'interaction entre l'acide hypochlorique et les amines primaires (ou l'ammoniaque) peut générer des chloramines qui possèdent, elles aussi, un pouvoir oxydant appréciable. L'acide hypochlorique est considéré comme le principal responsable de la cytotoxicité des radicaux libres générés par les neutrophiles (Badwey et Karnovsky 1980, Weiss 1989).

La toxicité des radicaux libres dérivés des neutrophiles a été largement démontrée dans des modèles d'ischémie-reperfusion (Buerke et coll. 1994) et les cellules endothéliales en culture (Varani et coll. 1989, Kuzuya et coll. 1991, Hansen et Stawski 1994). Un aspect important de cette toxicité est l'apparition d'une dysfonction endothéliale caractérisée par une vasoconstriction intense (Tsao et coll. 1990, Ma et coll. 1991, 1993). Cette dysfonction serait due à la diminution de la libération de NO (Tsao et coll. 1990) et elle est renversée par l'infusion d'un donneur de NO pendant la reperfusion (Pabla et coll. 1996). L'inactivation progressive du NO endothélial par la libération concomittante d'anions superoxyde a été proposée pour expliquer la vasoconstriction produite par les neutrophiles activés (Gryglewski et coll. 1986, Rubanyi et Vanhoutte 1986, McCall et coll. 1989). Rimele et coll. (1988) ainsi que McCall et coll. (1989) ont souligné la capacité des neutrophiles à libérer du NO pour produire une rétroaction négative sur la NADPH oxydase (Clancy et coll. 1992). Cependant, la production de NO d'origine neutrophilaire ne serait pas suffisante pour maintenir l'intégrité endothéliale. Les mécanismes de la modulation du tonus vasomoteur par les neutrophiles

semblent très complexes et ils n'ont pas tous été élucidés.

Les constituants des granules azurophiles des neutrophiles sont aussi une source d'agents cytotoxiques susceptibles de propager les lésions tissulaires (Mehta et coll. 1988). La dégranulation des neutrophiles libère dans le milieu extracellulaire plusieurs enzymes protéolytiques dont l'élastase et la cathepsine G (Weiss 1989). L'élastase est, en réalité, l'un des principaux médiateurs cytotoxiques des neutrophiles (Janoff 1985). Elle convertit la xanthine déshydrogénase des cellules endothéliales en xanthine oxydase (Varani et Ward 1994) tout en hydrolysant des protéines de la matrice extracellulaire (élastine, fibronectine et collagène de type III et IV) et certains facteurs plasmatiques (protéines du complément, facteurs de coagulation) (Janoff 1985, Mainardi et coll. 1980, Inauen et coll. 1990). L'élastase inhibe la fonction plaquettaire grâce à la protéolyse des récepteurs de la thrombine (Brower et coll. 1985) et la synthèse de la prostacycline (PGI_2) (Weksler et coll. 1989), et accélère la fibrinolyse en inactivant l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Wu et coll. 1995).

Certains auteurs ont démontré le rôle de l'élastase chez des patients atteints d'une maladie coronarienne (Mehta et coll. 1989a, Dinerman et coll. 1990, Amaro et coll. 1995), de même que dans le contexte d'ischémie-reperfusion (Inauen et coll. 1990, Zimmerman et Granger 1990, Mehta et coll. 1994). Des études *in vitro* ont démontré que l'élastase jouait un rôle dans la genèse des lésions endothéliales de cellules en culture (Inauen et coll. 1990) et dans les cardiomyocytes isolés (Buerke et coll. 1994). Dans des modèles *in vivo* d'ischémie-reperfusion intestinale (Zimmerman et Granger 1990) ou myocardique (Mehta et coll. 1994, Delyani et coll. 1996), l'inhibition pharmacologique de l'élastase atténue l'infiltration des neutrophiles (Zimmerman et Granger 1990), préserve la réserve coronaire et la fonction

myocardique (Mehta et coll. 1994) et réduit la taille de l'infarctus (Delyani et coll. 1996).

Dans une étude d'ischémie-reperfusion hépatique chez le rat, Yamaguchi et coll. (1997) ont signalé que l'inhibition de la libération de cytokines par le ONO-5046 (un inhibiteur de l'élastase) entraînait une réduction de la séquestration des neutrophiles. Selon ces auteurs, l'activation de la cascade de coagulation serait en partie responsable de l'accumulation de neutrophiles, étant donné qu'un prétraitement avec de l'héparine ou de l'antithrombine III potentialise l'inhibition des cytokines. L'administration d'antithrombine III pendant l'ischémie-reperfusion hépatique améliore le statut énergétique, augmente la synthèse de la PGI₂, et réduit la nécrose (Okano et coll. 1996). L'implication de la cascade de coagulation dans les lésions de reperfusion demeure incertaine de même que le rôle cardioprotecteur éventuel des agents anticoagulants et thrombolytiques. Cet aspect de l'ischémie-reperfusion sera examiné dans le chapitre 3.

La cathepsine G, libérée des granules azurophiles des neutrophiles, est un agoniste puissant de l'agrégation plaquettaire en stimulant l'exposition des complexes GPIIb/IIIa pour la liaison du fibrinogène (Molino et coll. 1993). L'altération de veines ombilicales humaines par la cathepsine G a été récemment démontré par Kolpakov et coll. (1994) et Iacoviello et coll. (1995), et son inhibition par le LEX-032 pendant l'ischémie-reperfusion myocardique s'est avérée bénéfique (Murohara et coll. 1995a, Delyani et coll. 1996). Cependant, comme le LEX-032 inhibe simultanément l'élastase et la cathepsine G, nous ne sommes pas en mesure de discerner les effets potentiellement délétères imputables à la cathepsine G dans ce contexte.

Le PAF est un médiateur pro-inflammatoire très puissant; il est synthétisé suite à

l'activation de la phospholipase A_2 par une grande variété de cellules dont les cellules endothéliales (Whatley et coll. 1990) et les neutrophiles (Lynch et coll. 1979, Lotner et coll. 1980). Le PAF stimule l'agrégation et la dégranulation des neutrophiles (Snyder 1990, Bates et coll. 1992), leur adhésion (Ingraham et coll. 1982), le chimiotactisme (Håkansson et Venge 1990), ainsi que la synthèse d'anions superoxyde (Ingraham et coll. 1982, Kato et coll. 1993) et de leucotriènes (Chilton et coll. 1982, McDonald et coll. 1994). Le PAF est aussi un agoniste puissant de l'agrégation plaquettaire (Benveniste et Chignard 1985, Golino et coll. 1993). Son rôle dans l'activation plaquettaire sera décrit à la section 2.3.2.

De nombreuses études ont démontré que les concentrations tissulaires et/ou veineuses de PAF étaient élevées suite à la reperfusion de tissus ischémiques. A ce propos, Montrucchio et coll. (1989) ont établi que la reperfusion de coeurs de lapins, contrairement à l'ischémie, se traduisait par une libération accrue de PAF, soit une augmentation d'environ 300%, dans l'effluent coronaire. Des résultats comparables ont été observés suite à l'occlusion-reperfusion d'une artère mésentérique chez le chat (Kubes et coll. 1990).

Le rôle du PAF dans l'infiltration des neutrophiles pendant l'ischémie-reperfusion ressort des observations suivantes : 1) l'administration de PAF exogène provoque une accumulation de neutrophiles et une dysfonction microvasculaire aussi importantes que durant l'ischémie-reperfusion (Kubes et coll. 1990a, 1990b), et 2) l'utilisation d'antagonistes des récepteurs du PAF atténue la réponse inflammatoire associée à la reperfusion (Kubes et coll. 1990, Ma et coll. 1992). Ces derniers auteurs ont démontré que l'adhésion et la migration des neutrophiles au niveau des veinules mésentériques diminuaient de 37% et 72% respectivement suite à l'administration de WEB 2086 ou de BN 52021. Ces résultats

suggèrent donc que le PAF joue un rôle primordial dans les interactions entre les neutrophiles et l'endothélium par un mécanisme dépendant des CD11/CD18 (Kubes et coll. 1990a, Zimmerman et coll. 1990), et leur migration vers le territoire post-ischémique (Montrucchio et coll. 1993).

La phospholipase A_2 active le métabolisme de l'acide arachidonique via la voie de la cyclo-oxygénase pour générer des prostaglandines et de la TXA_2 (Goldstein et coll. 1977), ou par celle de la lipoxygénase pour générer des leucotriènes comme la LTB_4 (Borgeat et Samuelsson 1979). Les neutrophiles possèdent les enzymes nécessaires à l'activation des voies de la 5-, 12- et 15-lipoxygénase impliquées dans la synthèse des leucotriènes (Borgeat et Samuelsson 1979) et autres dérivés de nature lipidique, dont le HPETE, le HETE (Spector et coll. 1988) et les lipoxines (Serhan 1994).

La LTB_4 est un facteur chimiotactique très puissant qui favorise l'adhésion et la migration transendothéliale des neutrophiles, ainsi que l'augmentation de la perméabilité membranaire (Dahlén et coll. 1981, Gimbrone et coll. 1984, Kubes et coll. 1991a). Le rôle de la LTB_4 dans l'ischémie-reperfusion ressort de l'observation que les concentrations veineuses et/ou tissulaires de LTB_4 sont anormalement élevées dans ce contexte (Klausner et coll. 1989, Lehr et coll. 1991). Mangino et coll. (1989) ont démontré que l'ischémie n'altère pas la concentration tissulaire de LTB_4 , mais que la reperfusion augmente sa concentration de 687% dans la muqueuse intestinale. De plus, Klausner et coll. (1989a) ont signalé qu'une neutropénie atténuait nettement cette augmentation, ce qui suggère que les neutrophiles séquestrés dans le territoire post-ischémique sont une source importante de LTB_4 . L'administration d'un inhibiteur de la synthèse de la LTB_4 (MK-886) prévient

l'augmentation de sa concentration tissulaire, et atténue l'adhésion des neutrophiles et la perméabilité microvasculaire (Lehr et coll. 1991).

D'autres médiateurs lipidiques de la voie de la lipoxigénase dont les HETE ont été impliqués dans les altérations de reperfusion. McCluskey et coll. (1985) ont démontré, dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion myocardique, la production d'une grande quantité de 12-HETE dans le foyer de nécrose 24 heures après la reperfusion. Quant aux peptido-leucotriènes (LTC_4 et LTD_4), elles favoriseraient une augmentation de la perméabilité microvasculaire (Dahlén et coll. 1981, Lehr et coll. 1991), et stimuleraient l'expression de la P-sélectine (Datta et coll. 1995) et le roulement des neutrophiles à la surface endothéliale (Kanwar et coll. 1995).

2.2.4 Phénomène de non reperfusion et d'hyporeperfusion (*no-reflow*)

Là non reperfusion se définit comme le rétablissement incomplet du débit sanguin dans les régions ischémiques du réseau capillaire et artériolaire. Ce phénomène est aussi observé chez l'homme suite au traitement thrombolytique (Schofer et coll. 1985, Maes et coll. 1995) ou à l'angioplastie (Ito et coll. 1992).

Dans une étude classique, Kloner et coll. (1974) ont utilisé de la thioflavine S (un traceur fluorescent endothélial) pour déterminer la distribution de la perfusion coronarienne dans le myocarde post-ischémique. Les résultats de cette étude ont démontré que la non reperfusion se produisait dans la région de nécrose, mais seulement après une période prolongée d'ischémie (> 90 minutes), ce qui indique que la non reperfusion n'est pas la cause principale de la nécrose, mais plutôt un évènement secondaire survenant après la mort

cellulaire (Kloner et Przyklenk 1992). L'observation que les lésions myocytaires irréversibles précèdent toujours les lésions microvasculaires (Kloner et coll. 1980) vient renforcer cette hypothèse. La reperfusion peut accentuer le développement de la non reperfusion puisque celle-ci est souvent localisée dans des régions de nécrose en bandes de contraction (Ambrosio et coll. 1989, Jeremy et coll. 1990).

La non reperfusion est le résultat d'une série complexe de réactions menant à une insuffisance microvasculaire; les mécanismes sous-jacents peuvent varier d'un territoire à l'autre selon la sévérité de l'ischémie et la nature des lésions endothéliales (Latour 1992). Les lésions microvasculaires semblent jouer un rôle primordial dans ce phénomène (Reimer et Przyklenk 1992), mais il semble que d'autres facteurs y contribuent comme la formation d'œdème et de radicaux libres, la libération d'enzymes protéolytiques par les neutrophiles et la surcharge calcique (Latour 1992).

Une hypothèse qui a reçu beaucoup d'attention est la formation de bouchons de neutrophiles dans le système capillaire (*neutrophil plug*). Engler et coll. (1986, 1986a) ont suggéré que la présence de neutrophiles dans les capillaires de la zone de non reperfusion, et l'accumulation subséquente d'érythrocytes pouvaient causer des obstructions et compromettre la perfusion sanguine. Cette hypothèse est soutenue par l'utilisation d'agents pharmacologiques qui, en modifiant l'activité des neutrophiles, atténuent l'ampleur de la non reperfusion (Forman et coll. 1987, Olafsson et coll. 1987, Litt et coll. 1989). En outre, Engler et coll. (1986) ont remarqué que, chez des animaux leucopéniques, plus de 95% des capillaires du territoire ischémique étaient reperfusés, ce qui suggère l'implication des neutrophiles.

Si ces résultats font état du rôle des neutrophiles dans la non reperfusion, certaines études suggèrent que leur présence ne serait pas absolument nécessaire au développement de ce phénomène. A partir de coeurs isolés de rat, Reynolds et McDonagh (1989) ont démontré que, malgré l'absence de neutrophiles dans le perfusé, la densité des capillaires reperfusés était réduite et la résistance vasculaire légèrement augmentée. Des résultats semblables ont aussi été observés avec des solutions cardioplégiques exemptes de cellule sanguine (Humphrey et coll. 1980, Alanen et coll. 1980). Si les neutrophiles ne semblent pas nécessaires à l'apparition de la non reperfusion *in vitro*, leur présence est primordiale *in vivo* et impliquerait un mécanisme qui nécessite l'activation des CD11/CD18 (Jerome et coll. 1993).

Parmi les autres mécanismes proposés, il convient de noter une modification de la déformabilité des érythrocytes, ce qui faciliterait la formation de rouleaux et l'occlusion capillaire (Kloner et Przyklenk 1992), l'œdème et la compression vasculaire (Kloner et coll. 1974, Jerome et coll. 1994), la contracture myocardique (Ambrosio et coll. 1989) et les microthromboses. Ces dernières sont peu probables, car la streptokinase (Kloner et Alker 1984) et l'activateur du plasminogène tissulaire (Kloner et coll. 1989a) ne peuvent prévenir la non reperfusion.

La production de substances vasoactives participe à la genèse de la non reperfusion. Par exemple, l'endothéline libérée pendant l'ischémie et la reperfusion a été impliquée dans la chute progressive du débit sanguin microvasculaire (Velasco et coll. 1994). La présence simultanée de plaquettes et de neutrophiles favorise la production d'agents vasoconstricteurs, comme les leucotriènes, le PAF et la TXA₂. La perte de l'intégrité endothéliale inhibe la

libération de NO et de PGI₂ accentue l'effet vasopresseur (Latour 1992). L'activation du complément serait aussi impliquée dans la non reperfusion (Ito et coll. 1996).

Le phénomène d'hypoperfusion découle de la non reperfusion, et se définit comme une réduction modérée de la perfusion sanguine pendant la reperfusion (Kloner et Alker 1984). L'hypoperfusion est détectable après de brèves périodes d'ischémie (< 90 minutes) (Heyndrickx et coll. 1978, Bolli et coll. 1990) ou dans des régions exemptes de nécrose et elle serait une manifestation de la sidération microvasculaire ou de la détérioration de la réserve coronaire. Selon Nicklas et Gips (1989), l'altération de la réactivité artériolaire ou capillaire serait responsable de l'hypoperfusion. Ces résultats ont, par ailleurs, été confirmés par Bolli et coll. (1990).

La perte graduelle de substances vasorelaxantes pendant la reperfusion et la présence de neutrophiles et de plaquettes dans le système capillaire semblent les hypothèses les plus plausibles pour expliquer le phénomène de non reperfusion.

2.2.5 Inhibition de la fonction des neutrophiles et protection myocardique

L'activation des neutrophiles dans le myocarde post-ischémique est en grande partie responsable de la progression de l'infarctus. Ainsi, la modulation de la fonction des neutrophiles peut s'avérer très efficace pour freiner le développement des lésions de reperfusion. Les principales méthodes expérimentales utilisées pour évaluer le potentiel cardioprotecteur de l'inhibition des neutrophiles seront examinées dans les pages suivantes.

Plusieurs études expérimentales ont démontré les effets bénéfiques de la neutropénie sur les lésions de reperfusion. Celle-ci diminue l'incidence d'arythmies de reperfusion (de

Lorgeril et coll. 1989, Kofsky et coll. 1991), et atténue le phénomène de non reperfusion (Engler et coll. 1986, Litt et coll. 1989) ainsi que la perméabilité microvasculaire (Sheridan et coll. 1991, Svendsen et coll. 1993).

Romson et coll. (1983) ont observé que l'administration d'un sérum anti-neutrophiles (réduction de 77% des neutrophiles circulants) se traduisait par une réduction simultanée de la taille de l'infarctus de 43%. Des résultats comparables ont été obtenus par Jolly et coll. (1986). Ces résultats confirment l'hypothèse que l'accumulation et/ou l'activation des neutrophiles influent sur le développement de l'infarctus pendant la reperfusion. Cependant, le potentiel cardioprotecteur de la neutropénie n'est apparent que si la durée de l'occlusion est inférieure à 3 heures. En effet, ce traitement s'est avéré inefficace chez les animaux soumis à une ischémie de plus longue durée (Jolly et coll. 1986, Chatelain et coll. 1987). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une ischémie de plus de 3 heures favorise le développement d'un infarctus presque transmural ne permettant qu'une très faible sauvegarde du myocarde pendant la reperfusion.

La thérapie antioxydante a reçu beaucoup d'attention puisque les radicaux libres sont impliqués dans la physiopathologie des lésions de reperfusion. Jolly et coll. (1984) ont été les premiers à évaluer les effets de l'administration simultanée de SOD et de catalase pendant l'ischémie-reperfusion. Les résultats de leur étude indiquent que l'infusion de ces piègeurs avant le début de la reperfusion diminue significativement la taille de l'infarctus. Cette étude a été rapidement suivie par celles de Chambers et coll. (1985) et de Wrens et coll. (1985) qui ont signalé l'effet bénéfique de la SOD en l'absence de catalase. L'anion superoxyde jouerait donc un rôle plus important que le peroxyde d'hydrogène. D'autres études ont démontré que

l'infusion de SOD et de catalase limitait la taille de l'infarctus chez les lapins (Downey et coll. 1987) et les porcs (Näslund et coll. 1986). Cependant, ces résultats demandent à être confirmés. Uraizee et coll. (1987) n'ont pu démontrer les effets cardioprotecteurs de la SOD et de la catalase dans leur modèle canin tout comme Nejima et coll. (1989). L'absence de mesure systématique du débit collatéral, donc l'introduction d'un biais lors de l'analyse statistique des tailles d'infarctus a été proposée pour tenter d'expliquer ces divergences. Le débit collatéral n'a pas été mesuré dans les deux études qui se sont avérées positives (Jolly et coll. 1984, Chambers et coll. 1985), contrairement à celles de Uraizee et coll. (1987) et Nejima et coll. (1989). Cependant, cet argument ne peut s'appliquer aux lapins (Downey et coll. 1987) ou aux porcs (Näslund et coll. 1986), car ces espèces ne possèdent pas de circulation collatérale. L'effet cardioprotecteur de la thérapie antioxydante demeure encore très controversé.

L'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique a permis d'établir que la réduction de la taille de l'infarctus s'effectuait par une atténuation concomitante de l'accumulation de neutrophiles. C'est notamment le cas du BW755C qui est un inhibiteur des voies de la cyclo-oxygénase et lipoxygénase (Jolly et Lucchesi 1983, Mullane et coll. 1984, Freed et coll. 1989). Cependant, il semble que l'inhibition des neutrophiles ne soit pas nécessaire à l'expression de la cardioprotection du BW755C. En fait, cet agent inhibe le métabolisme oxydatif, la dégranulation des neutrophiles et la production de LTB_4 et de HETE (Jolly et Lucchesi 1983).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), comme l'ibuprofène, réduisent la taille de l'infarctus et l'accumulation de neutrophiles (Romson et coll. 1980, 1982) alors que

d'autres AINS, malgré leur capacité d'altérer la fonction des neutrophiles *in vitro*, ne possèdent pas d'effets *in vivo* (Jugdutt et coll. 1979). Une explication possible serait que les AINS inhibent simultanément la synthèse de PGI₂ et de TXA₂. Par contre, les inhibiteurs spécifiques de la synthétase de la TXA₂ atténuent l'accumulation de neutrophiles et réduisent la taille de l'infarctus (Mullane et Fornabaio 1988). Il en va de même des analogues stables de la PGI₂ comme l'iloprost et le taprostène (Simpson et coll. 1987, 1987a).

En résumé, de nombreux agents ont été développés pour prévenir l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde post-ischémique, et réduire par la même occasion l'étendue de l'infarctus. L'inhibition de la fonction des neutrophiles est un moyen efficace d'améliorer la fonction du myocarde post-ischémique.

2.3 Rôle des plaquettes dans l'ischémie-reperfusion

Il se manifeste un intérêt croissant pour les phénomènes plaquettaires dans l'ischémie-reperfusion. À la lumière de récents résultats expérimentaux, il semble que les plaquettes jouent un rôle beaucoup plus important qu'on le croyait jusqu'à présent. Cependant, peu d'études ont été consacrées à la cinétique des plaquettes dans les altérations de reperfusion.

La mobilisation des plaquettes dans le myocarde post-ischémique a été décrite dans quelques études expérimentales (Laws et coll. 1983, Bednar et coll. 1985). Leur distribution initiale est semblable à celle des neutrophiles, quoique leur vitesse d'accumulation soit quelque peu retardée (Bednar et coll. 1985). Cependant, le rôle des plaquettes dans les lésions de reperfusion est moins bien défini. Des études d'ischémie-reperfusion menées chez des lapins et des rats thrombocytopéniques ont révélées des réductions significatives de

l'étendue de la nécrose (Chakrabarty et coll. 1991, Kanayama et coll. 1992). Par contre, Mullane et McGiff (1985) ainsi que Jolly et coll. (1985) ont conclu à l'absence d'un rôle important des plaquettes chez des chiens thrombocytopéniques. Cette divergence peut s'expliquer par une variation inter-espèce et une approche expérimentale différente.

La présence d'une sténose critique sur l'artère reperfusée a mis en évidence l'implication des plaquettes pendant l'ischémie-reperfusion myocardique. Dans un modèle porcin avec lésions endothéliales au site d'occlusion, Barrabés et coll. (1996) ont démontré que les plaquettes sont le principal médiateur de l'accroissement de l'infarctus pendant la reperfusion. On peut donc considérer que la présence de plaquettes dans le myocarde reperfusé est en partie responsable des effets délétères associés à la reperfusion, et que celles-ci jouent un rôle plus important qu'on le pensait. Il est possible que l'augmentation, par la sténose, des forces de cisaillement et la libération massive d'agents vasoactifs engendrent une plus grande activation des plaquettes. L'accumulation de plaquettes dans l'infarctus est aussi grandement augmentée en cas d'hypercholestérolémie. Dans cette condition, la thrombocytopénie réduit l'étendue de la nécrose et améliore le phénomène de non reperfusion (Golino et coll. 1987). Ici encore, les plaquettes semblent agir comme médiateur dans l'établissement de lésions de reperfusion.

La présence de plaquettes dans un foyer d'inflammation peut être conditionnée par les neutrophiles; ceux-ci accentuent l'agrégation et l'activation des plaquettes qui favorisent à leur tour l'accumulation de neutrophiles (Issekutz et coll. 1983, Bednar et coll. 1985). Une grande complicité existe donc entre ces deux éléments. Les pages suivantes feront le point sur les connaissances acquises à l'égard du rôle des plaquettes dans l'ischémie-reperfusion.

2.3.1 Mobilisation des plaquettes dans l'infarctus

L'accumulation de plaquettes a été observée dans plusieurs situations expérimentales. Par exemple, Golino et coll. (1987) ont remarqué, dans leur modèle d'ischémie-reperfusion avec des lapins hypercholestérolémiques, une augmentation de 429% de la séquestration myocardique des plaquettes. Dans un modèle de choc endotoxique, Sigurdsson et coll. (1994) ont estimé que l'accumulation de plaquettes dépassait 102% dans le poumon et le foie. Kuroda et Shiohara (1996) ont démontré en simulant une cholestase que la leucopénie et la thrombocytopénie atténuaient nettement les effets délétères de ce phénomène. Ces auteurs n'ont pas évalué l'accumulation de plaquettes, mais ils ont observé une diminution du ratio $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$, ce qui indique une implication des plaquettes. Des résultats comparables ont aussi été obtenus dans leur modèle d'ischémie-reperfusion hépatique.

Une des premières études expérimentales réalisées pour évaluer l'accumulation spatiale et temporelle des plaquettes dans le myocarde post-ischémique a été celle de Leinberger et coll. (1979). Suite à une occlusion permanente de 6 heures, ces auteurs ont remarqué une augmentation de 214% des plaquettes dans l'infarctus contre 695% dans le groupe reperfusé. Bien que la localisation de l'infarctus n'ait été déterminée que par des modifications du segment ST, ces résultats suggèrent une potentialisation de l'accumulation de plaquettes dans la région nécrosée en présence de reperfusion.

Le groupe de Laws (1983) a précisé ce phénomène tout en observant que l'accumulation de plaquettes dans le territoire ischémique était inversement proportionnelle au débit sanguin régional, et maximale dans le sous-endocarde après 24 heures de reperfusion. Bednar et coll. (1985) ont remarqué que 90 minutes d'occlusion ne permettait

qu'une accumulation restreinte de plaquettes intramyocardiques, la reperfusion étant par contre associée à une progression rapide et linéaire de la séquestration plaquettaire, au moins 10 fois supérieure à l'accumulation observée à la fin de l'ischémie. Ces résultats révèlent, comme ceux de Romson et coll. (1982), l'importance de la reperfusion en ce qui a trait à la capture de plaquettes par le foyer ischémique. De plus, Chintala et coll. (1994) ont mentionné que la séquestration des plaquettes était aussi directement proportionnelle à la durée de l'ischémie. Par exemple, l'occlusion d'une artère rénale de rat pendant 20, 40 et 60 minutes est associée à une augmentation des plaquettes de 100, 300 et 600% respectivement dans le rein post-ischémique. Donc, la reperfusion accentue l'accumulation des plaquettes et cette accumulation varie aussi selon la durée de la période ischémique.

L'étude de Bednar et coll. (1985) est intéressante puisqu'elle laisse supposer que l'accumulation des plaquettes serait dépendante de l'accumulation préalable de neutrophiles dans le myocarde post-ischémique. Ces auteurs ont en effet démontré que la neutropénie entraînait une diminution de la séquestration des plaquettes dans toutes les régions étudiées. Cependant, Issekutz et coll. (1983) ont démontré dans un modèle d'inflammation localisée que l'accumulation des plaquettes était étroitement associée à la présence de neutrophiles, car aucune séquestration plaquettaire n'a été observée chez des animaux neutropéniques. Ces auteurs ont conclu que le dépôt des plaquettes allait de pair avec la migration transendothéliale des neutrophiles. Les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles seront examinées à la section 2.4.

2.3.2 Activation et sécrétion plaquettaires

L'agrégation plaquettaire au site d'une lésion athéromateuse, par exemple, peut mener à la thrombose, l'angine instable et l'infarctus aigu du myocarde (Davies et coll. 1986). En exacerbant l'ischémie et l'arythmogénèse (Parratt 1988), en augmentant la libération de médiateurs vasoactifs comme la TXA₂ et la sérotonine (Golino et coll. 1989) et par la présence de variations cycliques du débit coronarien (Folts et coll. 1976), la présence d'agrégats plaquettaires peut compromettre la reperfusion et la survie du myocarde ischémique.

Lorsque la lumière d'une artère coronaire est rétrécie mécaniquement au foyer d'un dénudement endothélial, on observe une réduction cyclique du débit coronarien avec un retour spontané du débit à sa valeur de base (Folts et coll. 1982). La présence d'agrégats plaquettaires au niveau de la sténose, et une agrégation plus importante à l'ADP ont été signalées chez ces animaux. Ces résultats suggèrent donc une hypersensibilité des plaquettes en présence d'une sténose critique.

Les variations cycliques du débit coronarien sont observées, entre autres, chez des patients ayant subi une angioplastie (Anderson et coll. 1994). On a constaté que l'efficacité d'un traitement avec de l'aspirine (un inhibiteur de la cyclo-oxygénase) variait selon la nature et la sévérité de la sténose sous-jacente (Folts et coll. 1976, Yao et coll. 1991, Mickelson et coll. 1993, Maalej et Folts 1996). Par contre, les inhibiteurs du facteur von Willebrand (*von Willebrand factor*; vWF) (McGhie et coll. 1994) et de la glycoprotéine membranaire plaquettaire IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) (Anderson et coll. 1994) préviennent efficacement les chutes de débit. Ces résultats indiquent que les réductions cycliques du débit coronarien engendrent

l'activation et l'agrégation plaquettaires, mais par des mécanismes indépendants de la voie de la cyclo-oxygénase.

Les interactions entre les plaquettes et la paroi vasculaire sont divisées en plusieurs étapes : 1) l'adhésion plaquettaire, 2) l'activation et la sécrétion plaquettaires et 3) l'agrégation plaquettaire (Packham 1994, Wu 1996).

L'adhésion plaquettaire au site d'une lésion endothéliale superficielle dépend essentiellement du collagène exposé et des glycoprotéines plaquettaires Ia-IIa (GPIa-IIa). Par contre, au point de rupture d'une plaque athéromateuse, le vWF (présent dans la matrice extracellulaire) se lie aux glycoprotéines plaquettaires Ib-IX (GPIb-IX) ancrant fermement les plaquettes à la matrice (Sakariassen et coll. 1979, Meyer et Girma 1993). Cette liaison est d'autant plus importante en présence de forces de cisaillement élevées, car l'adhésion plaquettaire en dépend (Roth 1991, Ruggeri et Ware 1993). Les plaquettes adhérentes développent des pseudopodes qui sont nécessaires à leur étalement sur la surface endothéliale. Celles-ci seront activées et synthétiseront de la TXA_2 tout en sécrétant le contenu de leurs granules de storage pour recruter et activer les plaquettes au site de lésion (Packham 1994).

La thrombine produite pendant la cascade de coagulation est un agoniste très puissant de l'activation plaquettaire. Le récepteur de la thrombine est activé grâce au clivage de sa queue amino-terminale qui permet d'exposer une nouvelle séquence servant de ligand (Vu et coll. 1991). Cette séquence amino-terminale serait semblable à un peptide de 6 acides aminés, le SFLLRN (Vassallo et coll. 1992, Chao et coll. 1992). La thrombine active les plaquettes selon différentes voies mettant en jeu au moins deux types de protéines G (Van

Obberghen-Schilling et Pouyssegur 1993). La protéine G_p favorise l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse le phosphatidyl inositol biphosphate et le convertit en deux seconds messagers, l'inositol triphosphate stimule la libération de calcium par le système tubulaire dense et le diacylglycérol active la protéine kinase C (Rink et Sage 1990). Le synergisme entre ces deux seconds messagers permet la formation de pseudopodes et l'étalement plaquettaire ainsi que l'agrégation et la sécrétion du contenu granulaire (Packham 1994). L'augmentation du calcium intracellulaire permet aussi l'activation de la phospholipase A_2 qui catalyse le métabolisme de l'acide arachidonique pour former la TXA_2 (Kroll et Schafer 1989). Le récepteur de la thrombine est aussi associé à une protéine G_i qui inhibe l'activation de l'adénylate cyclase (Hung et coll. 1992). Comme l'augmentation de l'AMPc inhibe la fonction plaquettaire, une réduction de l'AMPc par l'inhibition de l'adénylate cyclase potentialisera l'activation plaquettaire (Wu 1996).

L'activation des plaquettes permet la sécrétion du contenu des granules endogènes. Les granules alpha, qui sont les plus abondants, contiennent différentes protéines comme le fibrinogène, la fibronectine, le vWF, le facteur plaquettaire 4, la β -thromboglobuline, la thrombospondine, des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion (P-sélectine) et des facteurs de coagulation (Mruk et coll. 1990). Les granules denses stockent le calcium, la sérotonine et l'ADP. Les constituants des granules jouent un rôle important dans la migration et la prolifération des muscles vasculaires lisses, ainsi que les interactions homo- (plaquettes-plaquettes) et hétérotypiques (plaquettes-neutrophiles) (Wu 1996).

L'activation des plaquettes s'accompagne d'une modification de la conformation des récepteurs membranaires IIb-IIIa, qui sont des récepteurs à haute affinité pour le fibrinogène

(Bennett et Vilaré 1979, Marguerie et coll. 1980). La liaison entre les GPIIb-IIIa et le fibrinogène, mécanisme fondamental de l'agrégation plaquettaire induite par tous les agonistes physiologiques, permet la formation de ponts entre les plaquettes activées (Phillips et coll. 1988). On a identifié les régions du fibrinogène qui servent de ligands aux récepteurs GPIIb-IIIa : il s'agit des séquences RGDF et RGDS (Packham 1994). Il semble qu'en formant des ponts entre deux plaquettes adjacentes, le fibrinogène lie six sites au total, soit trois complexes GPIIb-IIIa sur chaque plaquettes, ce qui permet la formation d'un réseau très dense d'agrégats plaquettaires (Hawiger et coll. 1989). La structure et le rôle des GPIIb-IIIa seront décrits dans le chapitre 4.

La molécule d'adhésion P-sélectine, libérée des granules alpha, est surexprimée à la surface des plaquettes activées chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde et d'angine instable (Ikeda et coll. 1995, Langford et coll. 1996), ou suite à un vasospasme (Kaikita et coll. 1995). Son implication dans l'adhésion endothéliale des neutrophiles a été décrite en détail à la section 2.2.2.1. Cependant, son rôle dans les phénomènes de nature plaquettaire reste à déterminer.

Les forces de cisaillement sont des agonistes très puissants de l'agrégation plaquettaire (Kroll et coll. 1996). Des forces de cisaillement de plus de 50 dynes/cm², au niveau d'une plaque athéromateuse par exemple, stimulent l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaires (Moake et coll. 1986, Peterson et coll. 1986). Dans ce cas, les mécanismes sous-jacents sont différents de ceux qui entrent en jeu en ce qui a trait aux agonistes physiologiques.

Dans des conditions normales (faibles forces de cisaillement), la liaison du

fibrinogène aux GPIIb-IIIa est nécessaire à l'agrégation plaquettaire, alors qu'en présence de forces de cisaillement élevées, la liaison du vWF aux GPIIb-IIIa est le mécanisme prédominant (Ruggeri 1993). En premier lieu, le vWF se lie aux GPIb-IX (Moake et coll. 1986, Ikeda et coll. 1991), et l'activation plaquettaire subséquente favorise un changement de conformation des GPIIb-IIIa pour assurer leur liaison au vWF (Peterson et coll. 1986). Les multiples séquences RGDS du vWF sont considérées comme les sites de liaison des GPIIb-IIIa (Ruggeri 1993). Donc, en présence de forces de cisaillement élevées, le fibrinogène et le vWF agissent de concert pour développer le réseau d'agrégats plaquettaires (Wu 1996).

Ces observations s'appliquent aux modèles d'ischémie-reperfusion myocardiques, si l'on considère que la présence d'une sténose critique résiduelle pendant la reperfusion augmente les forces de cisaillement et conditionne l'activation plaquettaire (Maalej et Folts 1996). Cette différence technique nécessite une intervention pharmacologique appropriée, car l'agrégation plaquettaire s'effectue par des voies indépendantes de la cyclo-oxygénase (Ruggeri 1993, Barstad et coll. 1996). Cela explique pourquoi l'aspirine est inefficace dans plusieurs protocoles expérimentaux où les plaquettes sont impliquées (Mickelson et coll. 1993, Maalej et Folts 1996). En présence de forces de cisaillement élevées, les inhibiteurs des GPIIb-IIIa semblent beaucoup plus efficaces (Konstantopoulos et coll. 1995, Turner et coll. 1995). Le rôle des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase sera décrit au chapitre 4.

L'adhésion et l'agrégation plaquettaires sont sous le contrôle de modulateurs endogènes, le NO et la PGI₂. Dans les modèles expérimentaux *in vitro* et *ex vivo*, l'agrégation plaquettaire est inhibée par le NO (Radomski et coll. 1987, Moncada et coll. 1991), et le mécanisme sous-jacent implique une augmentation des niveaux de GMPc intraplaquettaires

(Radomski et coll. 1987a, 1990). Pour produire un effet inhibiteur, la PGI_2 nécessite l'activation d'un récepteur spécifique associé à une protéine G_s qui stimule l'adénylate cyclase et augmente l'AMPc intraplaquettaire (Hopkins et Gorman 1981). L'élévation de l'AMPc par la PGI_2 , et celle du GMPc par le NO expliquerait leur synergisme (Radomski et coll. 1987b).

L'agrégation plaquettaire est un phénomène potentiellement important dans le contexte de l'ischémie-reperfusion, et il le sera d'autant plus en présence d'une sténose critique résiduelle pendant la reperfusion. Les forces de cisaillement élevées au site de la sténose activent les plaquettes par des mécanismes indépendants des agonistes physiologiques et de la cyclo-oxygénase.

2.4 Interactions entre les plaquettes et les neutrophiles

Les plaquettes et les neutrophiles sont en étroite association dans les sites d'inflammation (Issekutz et coll. 1983), l'infarctus du myocarde et l'angine instable (Ott et coll. 1996) ou suite à l'angioplastie (Mickelson et coll. 1996, Neumann et coll. 1996). Les plaquettes sont une source très importante de médiateurs qui modulent l'activité des neutrophiles. Inversement, certains facteurs libérés par les neutrophiles influent sur la fonction plaquettaire (Siminiak et coll. 1995). Les principales interactions entre les plaquettes et les neutrophiles seront décrites dans les paragraphes suivants.

La TXA_2 , qui est le principal eicosanoïde libéré par les plaquettes activées, augmente l'adhésion des neutrophiles (Spagnuolo et coll. 1980) et favorise leur diapédèse en surexprimant les molécules d'adhésion CD18 (Goldman et coll. 1991). Plusieurs études ont démontré l'efficacité des inhibiteurs de la synthétase du TXA_2 (Mullane et Fornabaio 1988)

et des antagonistes du récepteur du TXA₂ (Grover et Schumacher 1989, Ohmuro et coll. 1992) à réduire la taille de l'infarctus en prévenant l'accumulation de neutrophiles. Ceux-ci sont aussi une source de TXA₂ aux foyers d'inflammation (Higgs et coll. 1983) et, en collaboration avec les plaquettes, modulent le tonus vasculaire (Kaul et coll. 1994).

Le 12-HETE, d'origine plaquettaire, et son précurseur, le 12-HPETE, sont des facteurs chimiotactiques puissants qui stimulent la production de radicaux libres et favorisent l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Goetzl et coll. 1977, Maclouf et coll. 1982). Ces médiateurs semblent particulièrement importants dans l'activation des neutrophiles en présence de forces de cisaillement élevées (Rhee et coll. 1986). De même, les dérivés de l'acide arachidonique peuvent être transformés par les plaquettes en de nouveaux composés. Par exemple, la co-incubation de plaquettes et de neutrophiles mène à une augmentation de la synthèse de LTB₄, de 5-HETE, de 5s,12s diHETE et de triHETE (Maclouf et coll. 1982, Marcus et coll. 1982). Si toutefois les plaquettes sont préalablement stimulées par le collagène ou la thrombine et incubées en présence de neutrophiles, un nouveau dérivé est produit: 12,20 diHETE (Wong et coll. 1984). La stimulation du métabolisme de la LTA₄ par la voie de la 12-lipoxygénase plaquettaire mène à la formation de lipoxines (Serhan et Sheppard 1990). Cependant, le rôle de ces médiateurs dans le contexte d'ischémie-reperfusion demeure imprécis.

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes et le facteur plaquettaire 4 (*platelet factor 4*; PF4), sécrétés par les granules alpha plaquettaires, sont des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles et les monocytes (Deuel et coll. 1982). Ces facteurs peuvent diriger les neutrophiles vers les sites de lésions vasculaires (Deuel et coll. 1981) et stimuler la libération

d'élastase (Lonky et Wohl 1981). La sérotonine libérée des granules denses favorise l'adhésion endothéliale des neutrophiles (Boogaerts et coll. 1982). Finalement, les plaquettes stimulées par la thrombine libèrent deux variantes du peptide activateur de neutrophiles (*neutrophil-activating peptide*) qui activent les neutrophiles et amplifient les interactions plaquettes-neutrophiles pendant la thrombose et l'inflammation (Piccardoni et coll. 1996).

Les plaquettes peuvent aussi exercer des effets inhibiteurs sur les neutrophiles en libérant de l'adénosine (Goldman et coll. 1991). De plus, les plaquettes stimulent la synthèse d'adénosine des neutrophiles, activant ainsi un mécanisme d'autorégulation négatif sur la fonction des neutrophiles (Bengtsson et coll. 1996). Ces phénomènes pourraient, en partie, expliquer la cardioprotection de l'adénosine observée dans les modèles d'ischémie-reperfusion (Forman et coll. 1993).

Plusieurs facteurs dérivés des neutrophiles influent sur la fonction plaquettaire. Par exemple, la formation de radicaux libres prévient l'agrégation plaquettaire probablement par la libération de peroxyde d'hydrogène, car la catalase inhibe ce phénomène (Levine et coll. 1976). Cependant, l'anion superoxyde agit en synergie avec la thrombine pour stimuler la libération de sérotonine des plaquettes (Handin et coll. 1977).

A une concentration physiologique, l'élastase inhibe l'agrégation plaquettaire et la libération de sérotonine via la protéolyse des récepteurs de la thrombine et le clivage de la glycoprotéine Ib plaquettaire (Brower et coll. 1985). Par contre, de faibles concentrations d'élastase favorisent l'expression, à la surface des plaquettes, des récepteurs du fibrinogène, ce qui se traduit par une agrégation spontanée en présence de fibrinogène (Koeneci et coll. 1986). La cathepsine G est aussi un puissant agoniste plaquettaire (Cerletti et coll. 1995)

ainsi que la myéloperoxydase qui stimule les plaquettes par la formation d'acide hypochlorique (Clark et Klebanoff 1979). Les plaquettes activées par la cathepsine G expriment de la P-sélectine, ce qui favorise la formation de complexes neutrophiles-plaquettes (Maugeri et coll. 1994). Ces complexes facilitent le métabolisme transcellulaire de l'acide arachidonique pour produire du TXB₂ et de la LTC₄.

Le PAF, libéré par les neutrophiles et l'endothélium, joue un rôle crucial dans les interactions neutrophiles-plaquettes au niveau du myocarde ischémié (Alloatti et coll. 1992). Par exemple, l'infusion de plaquettes dans des coeurs isolés provoque une dysfonction mécanique et électrique aggravée en présence de neutrophiles. D'autre part, la synthèse *de novo* de PAF par les neutrophiles stimule l'agrégation plaquettaire (Chignard et coll. 1979) et la co-incubation des plaquettes et des neutrophiles leur permet de générer deux fois plus de PAF que si on les incubait séparément (Coëffier et coll. 1990).

En conclusion, les plaquettes et les neutrophiles sont des sources importantes de médiateurs susceptibles d'influencer la fonction et l'intégrité du myocarde. Le synergisme entre ces deux éléments du sang est probablement en partie responsable des effets délétères de la reperfusion.

Chapitre 3

Héparines et agents thrombolytiques dans l'ischémie-reperfusion

3.1 Introduction

La reperfusion précoce d'une artère coronaire occlue restreint l'étendue de la nécrose, préserve la fonction ventriculaire gauche, et améliore la survie à court et moyen terme (Christian et coll. 1991, GUSTO 1993). Le développement de la thérapie thrombolytique a pris appui sur les observations suivantes soit : 1) l'infarctus aigu du myocarde est associé à une thrombose coronaire aiguë (DeWood et coll. 1980) et 2) le développement de la nécrose suite à une occlusion est un phénomène temporel qui atteint son développement maximal après environ 6 heures d'ischémie, et qui peut être limité par la reperfusion précoce (Reimer et coll. 1977).

L'héparine est utilisée pendant le traitement thrombolytique afin de prévenir la réocclusion de l'artère recanalisée (Becker et Gore 1993). L'héparine possède aussi plusieurs actions susceptibles d'atténuer les effets délétères de la reperfusion dans le contexte d'ischémie-reperfusion. Des concentrations supratherapeutiques d'héparine réduisent la taille de l'infarctus (Saliba et coll. 1976), par un mécanisme qui semble indépendant de son activité anticoagulante (Black et coll. 1995). Cependant, son potentiel hémorragique en limite son utilisation.

De nouvelles générations d'héparine ont été développées ces dernières années pour pallier à ces effets secondaires. Les héparines de bas poids moléculaires (HBPM), comme l'énoxaparine, possèdent sensiblement les mêmes effets que l'héparine, mais avec une

tendance moins prononcée au saignement. Une seule étude a évalué l'effet de l'HBPM fragmine pendant l'ischémie-reperfusion (Hasdai et coll. 1996). Les résultats obtenus n'appuient pas le potentiel cardioprotecteur de cet agent pharmacologique. Cependant, le choix du modèle expérimental et des critères de finalité utilisés pour caractériser la nécrose myocardique sont discutables.

Les fibrinolytiques comme la streptokinase (SK) et l'activateur du plasminogène tissulaire (*tissue plasminogen activator*; TPA) sont utilisés pour lyser le thrombus intracoronaire responsable de l'infarctus du myocarde. Quelques études expérimentales ont suggéré les effets bénéfiques de ces agents sur la réduction de la taille d'infarctus (Darius et coll. 1986, Smith et coll. 1991a). Cependant, ce ne sont pas toutes les études qui ont conclu ainsi (Kloner et Alker 1984, Kloner et coll. 1989a). Tout comme l'héparine, les thrombolytiques sont associés à des complications hémorragiques importantes.

Ce chapitre tentera d'évaluer l'implication de la coagulation et de la fibrinolyse dans le contexte d'ischémie-reperfusion. Les effets cardioprotecteurs potentiels de l'héparine et des agents thrombolytiques sur le myocarde post-ischémique seront discutés.

3.2 Physiologie de la coagulation

A l'origine, la coagulation sanguine était décrite comme une cascade enzymatique, où la conversion protéolytique des différents facteurs de coagulation menait à la formation de thrombine (MacFarlane 1964, Davie et Ratnoff 1964). Cette définition c'est précisée en considérant l'importance des phospholipides membranaires, des cofacteurs et des ions (Davie et coll. 1991, Furie et Furie 1992). La cascade de coagulation est représentée à la figure 3.1

et la nomenclature suivante a été utilisée dans le texte: le F suivi de caractères romains désigne un facteur de coagulation tandis que le "a" spécifie la forme active du facteur.

Il existe deux systèmes d'activation de la coagulation, soit les voies intrinsèque et extrinsèque. La liaison entre le FXII et une surface électronégative initie la voie intrinsèque (Colman et coll. 1994). L'activation du FXII nécessite la présence du kininogène à haut poids moléculaire ainsi que la prékallikréine (Davie et coll. 1991) pour transformer le zymogène FXI en sa forme active, le FXIa (la seule réaction indépendante du calcium). Le FXIa active le FIX, et en présence du FVIIIa, de phospholipides plaquettaires et de calcium, il y a activation du FX en FXa. Cette réaction est accélérée par la présence de phospholipides ou par l'activation du FVIII par la thrombine ou le FXa.

Lorsque l'intégrité vasculaire est altérée, le FVII plasmatique vient en contact avec le facteur tissulaire (FT) présent dans la matrice extracellulaire (Spicer et coll. 1987) et à la surface des leucocytes (Rickles et coll. 1995, Higure et coll. 1996). Le complexe FT/FVIIa qui en résulte initie la voie extrinsèque de la coagulation; beaucoup plus rapide que la voie intrinsèque. Le complexe FT/FVIIa active le FIX qui en retour active la voie commune de la coagulation impliquant le FXa (Rao et Rapaport 1988). Cette voie stimule la libération de thrombine et la formation du caillot de fibrine en quelques secondes seulement et elle n'est limitée que par la quantité de FT libéré et la disponibilité des facteurs V, VII et X.

L'activation du FX par les complexes FT/FVIIa ou FIXa/FVIIIa stimule la voie commune de la coagulation (Colman et coll. 1994). Sur la surface des plaquettes, le FXa en présence de calcium, du FV et de phospholipides membranaires, active la transformation du FII (prothrombine) en thrombine. Celle-ci convertit le FI plasmatique (fibrinogène) en

fibrine. La protéolyse limitée du fibrinogène forme des monomères de fibrine et des fibrinopeptides. Les monomères de fibrine sont polymérisés spontanément, liés entre eux par des ponts hydrogène et stabilisés par des liens covalents en présence du FXIII, de la thrombine et du calcium (Blombäck 1996).

Afin de prévenir la thrombose intravasculaire disséminée, la cascade de coagulation est modulée par au moins 3 systèmes d'anticoagulants naturels protéiniques (Esmon 1993). Le plus important de ces inhibiteurs est l'antithrombine III (ATIII) qui voit son activité potentialisée par l'héparine. La thrombomoduline (une protéine endothéliale), les protéines C et S et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (*tissue factor pathway inhibitor*; TFPI) possèdent aussi un potentiel anticoagulant. L'ATIII et le TFPI seront discutés en fonction de l'héparine à la section 3.3.1.

La protéine C plasmatique inactive les FVIIIa et FVa circulants (Walker et coll. 1979, Fulcher et coll. 1984). La thrombine formée au site d'une lésion vasculaire diffuse librement et forme un complexe réversible avec la thrombomoduline (Esmon et Owen 1981). Ce complexe active la protéine C et en présence de son cofacteur, la protéine S, elle forme un complexe sur la membrane des plaquettes (Harris et Esmon 1985) ou à la surface endothéliale (Stern et coll. 1986) pour inactiver le FVa (Bakker et coll. 1992) et le FVIIIa (Fay et coll. 1991). La protéine C est elle-même inactivée par le α -1-antitrypsine ou inhibiteur de la protéine C (Heeb et coll. 1989), et cette réaction est potentialisée par l'héparine et autres glycosaminoglycanes (Pratt et Church 1992).

Les plaquettes ont une activité pro-coagulante importante, car l'exposition de phospholipides membranaires comme la phosphatidylsérine est nécessaire à l'amplification

de la cascade de coagulation (Zwaal et Schroit 1997). Cependant, puisque les plaquettes ne contiennent pas de FT, elles ne peuvent initier la coagulation. L'activation des plaquettes permet la libération du FV de leurs granules alpha (Ittyerah et coll. 1981), et la liaison du FV à la membrane plaquettaire permet d'accélérer la transformation de la prothrombine en thrombine (Miletich et coll. 1977) en favorisant l'expression de sites de liaison à haute affinité pour le FXa (Esmon 1993). L'activation optimale de la prothrombine est déterminée par le nombre de sites de liaison présents à la surface plaquettaire (Esmon 1993), et l'expression de ces sites est dépendante de la nature de l'agoniste plaquettaire (Sims et coll. 1989). Les plaquettes expriment aussi des sites de liaisons pour l'activation du FVIII (Nesheim et coll. 1988) et du FIX qui participe à l'activation du FX (Ahmad et coll. 1989).

L'activation des plaquettes pendant l'infarctus du myocarde est associée à la libération de microvésicules plaquettaires qui peuvent lier et activer les neutrophiles (Jy et coll. 1995). De plus, Malhotra et coll. (1996) ont démontré que la molécule d'adhésion L-sélectine liait la phosphatidylsérine plaquettaire. Ces observations suggèrent donc un lien étroit entre l'inflammation et l'hémostase, et l'activation des plaquettes au site de lésion favorise l'activation de la coagulation mais aussi le recrutement des leucocytes. En retour, les leucocytes peuvent amplifier la cascade de coagulation (Altieri 1993) en permettant la liaison du FX à leurs récepteurs CD11b/CD18. Ceci favorise la libération de protéases leucocytaires dont la cathepsine G qui clive et active le FX fixé à la surface des leucocytes à un site distinct de celui reconnu par le complexe FT/FVIIa (Plescia et Altieri 1996).

L'activation de la cascade de coagulation joue donc un rôle primordial en réponse aux lésions vasculaires par la formation d'agrégats de plaquettes et de caillots de fibrine. La

coagulation est aussi impliquée dans l'inflammation via la synthèse de kinines, et dans la fibrinolyse et la cascade du complément en activant la plasmine.

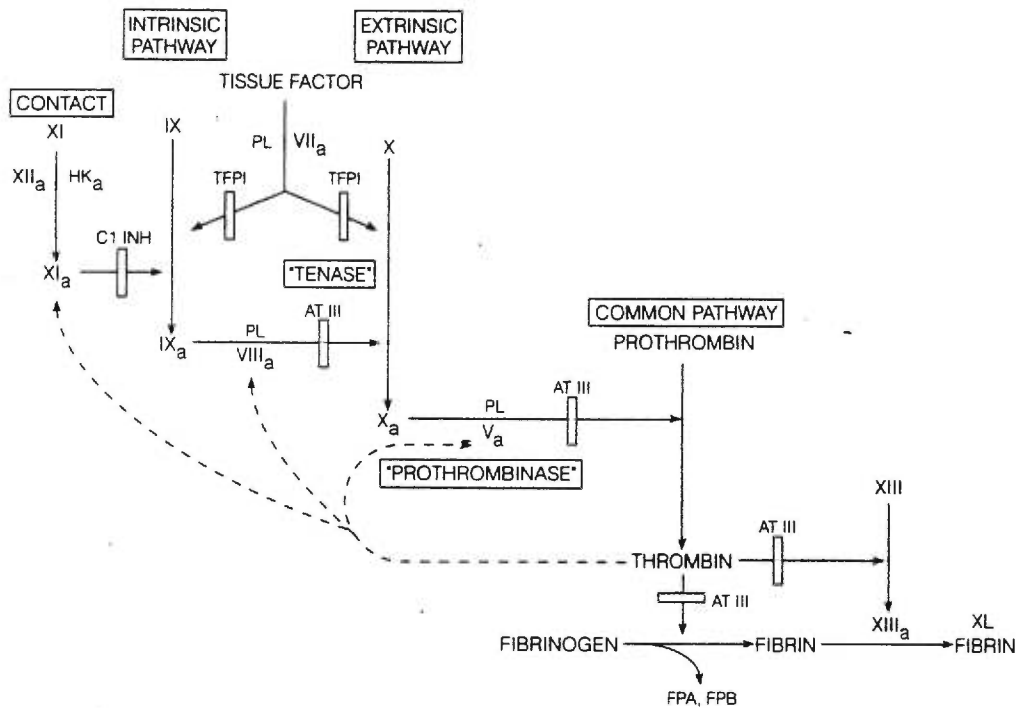


Figure 3.1 Cascade de coagulation

TF: facteur tissulaire; PL: phospholipides plaquettaires; Hka: kininogène de haut poids moléculaire; FPA: fibrinopeptide; XL: liens covalents entre différentes molécules de fibrine; C1 INH: inhibiteur du C1; TFPI: inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.

Lignes continues: mécanisme d'accélération par la thrombine

Tiré de Colman et coll. (1994) *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994;3-18.

3.3 Héparine et héparine de bas poids moléculaire

L'héparine et les HBPM sont des glycosaminoglycanes constituées d'un mélange de chaînes polysaccharidiques hétérogènes où alterne les résidus de D-glucosamine et d'acide uronique (soit l'acide gluconique ou iduronique) (Rodén 1989). Le poids moléculaire varie entre 5000 et 30000 daltons; le poids moyen se situant entre 12000 et 15000 (Andersson et coll. 1979, Fareed et coll. 1996). L'activité anticoagulante de l'héparine est dépendante de la présence d'un pentasaccharide unique qui lui confère une grande affinité pour la serpine ATIII (Rosenberg et Lam 1979, Choay et coll. 1983). Le troisième résidu du pentasaccharide, le 3-O-glucosamine sulfate, est responsable de la liaison entre l'héparine et l'ATIII, et il n'est présent que dans les séquences liant l'ATIII (Lindahl et coll. 1984). Environ un tiers des molécules d'héparine contiennent ce pentasaccharide, et sa distribution le long des chaînes apparaît aléatoire (Lindahl et coll. 1984, Thunberg et coll. 1982). Les autres chaînes sont pratiquement dépourvues d'activité anticoagulante à concentration thérapeutique, mais de fortes doses catalysent l'effet antithrombine d'un second cofacteur plasmatique, le cofacteur II de l'héparine (CIIH) (Ofosu et coll. 1986).

Une caractéristique physico-chimique propre à l'héparine est sa polyanionité et sa forte densité de charge. En effet, chaque disaccharide porte de trois à quatre charges négatives provenant des groupements sulfatés et de la fonction carboxylique de l'acide uronique. La présence d'une grande quantité d'acide iduronique confère à l'héparine une flexibilité conformationnelle particulière que ne possèdent pas les autres macromolécules polyanioniques (Lormeau 1991). Ces caractéristiques font en sorte que l'héparine se lie facilement et fortement à une série de constituants biologiques plasmatiques ou tissulaires

portant des charges positives : polypeptides, protéines, lipoprotéines, phospholipides. Ce faisant, l'héparine modifie leur fonctionnalité biologique initiale.

Les chaînes polysaccharidiques de l'héparine peuvent être fractionnées selon différents procédés chimiques et enzymatiques (Holmer 1989). Les HBPM qui en résultent possèdent des propriétés originales qui les distinguent de l'héparine non fractionnée (Hirsh et Levine 1992) avec un poids moléculaire variant entre 4000 et 6500 daltons (Fareed et coll. 1988). La dépolymérisation de l'héparine mène invariablement à une perte partielle de son activité catalytique (Danielsson et coll. 1986). Les HBPM ont une capacité réduite à catalyser l'inhibition de la thrombine alors que leur inhibition du facteur Xa reste sensiblement intacte (Andersson et coll. 1979, Thunberg et coll. 1979), car l'inactivation de la thrombine est dépendante du poids moléculaire (Lindahl et coll. 1984). Les HBPM possèdent le pentasaccharide nécessaire à la liaison spécifique à l'ATIII mais dans une proportion beaucoup plus faible que contenu dans la molécule mère (Jordan et coll. 1982). Donc, comparées à l'héparine standard, qui par définition possède un ratio anti-FXa/anti-IIa de 1:1, les différentes HBPM possèdent des ratios entre 4:1 et 2:1 (Hirsh et Levine 1992).

Les propriétés les plus intéressantes des HBPM sont une demi-vie environ deux fois plus longue que l'héparine, une meilleure absorption et biodisponibilité (Frydman 1996), et un effet anticoagulant faible. En fait, pour un effet antithrombotique équivalent à l'héparine, les HBPM produisent moins d'hémorragies (Carter et coll. 1982, Bergqvist et coll. 1985).

Nous verrons dans les pages suivantes, les mécanismes d'action anticoagulants de l'héparine et des HBPM, leurs propriétés extra-anticoagulantes et la modulation de leur activité par le milieu environnant.

3.3.1 Mécanismes d'action des héparines

3.3.1.1 Antithrombine III et facteur X

Suite à la découverte de l'héparine par McLean (McLean 1916), Brinkhous et coll. (1939) ont démontré que l'héparine nécessitait un cofacteur plasmatique pour son activité anticoagulante; l'ATIII (Abildgaard 1968). Les mécanismes sous-jacents ont été élucidés par Rosenberg et coll. (1979) et Lindahl et coll. (1979) lorsqu'ils ont démontré que la sérine en position centrale de la thrombine et de certains facteurs de coagulation était inhibée par l'arginine en position centrale de la molécule d'ATIII. L'héparine se lie aux récepteurs de la lysine sur l'ATIII ce qui favorise des changements de conformation au niveau de l'arginine. Ainsi, l'ATIII qui est normalement un inhibiteur lent, est transformée en un inhibiteur très rapide (Rosenberg et Bauer 1994). L'ATIII se lie de façon covalente à la sérine de l'héparine et des facteurs de coagulation pour, par la suite, se dissocier du complexe ternaire pour être réutilisée (Rosenberg et Bauer 1994). Le site sur la molécule d'héparine qui lie l'ATIII et potentialise son activité contient une unité glucosamine (Lindahl et coll. 1979, Rosenberg et coll. 1979) et une séquence pentasaccharidique (Choay et coll. 1983). L'héparine, en elle-même, est dépourvue d'activité anticoagulante.

Le complexe héparine/ATIII inactive un grand nombre de facteurs de coagulation incluant la thrombine et les facteurs Xa, XIIa, XIa et IXa (Rosenberg et Bauer 1994). La thrombine est beaucoup sensible à l'héparine que le FXa (Ofosu et coll. 1986). L'héparine potentialise l'inactivation de la thrombine en servant de patron où l'ATIII et la thrombine se lient pour former un complexe ternaire (Danielsson et coll. 1986). L'inactivation accélérée du FXa ne nécessite pas la formation de ce complexe mais requiert la liaison de l'héparine

à l'ATIII (Choay et coll. 1983). Les molécules d'héparine qui possèdent moins de 18 résidus de saccharide (PM < 5400) ne peuvent lier simultanément la thrombine et l'ATIII et ne peuvent donc catalyser l'inactivation de la thrombine. Cependant, les petits fragments d'héparine qui possèdent la séquence pentasaccharidique de haute affinité peuvent catalyser l'inactivation du FXa par l'ATIII (Lane et coll. 1984, Lindahl et coll. 1984).

Les HBPM possèdent le pentasaccharide nécessaire à la liaison spécifique de l'ATIII, mais dans une proportion plus faible qu'observée pour l'héparine (Jordan et coll. 1982). Les HBPM développés commercialement ont un poids moléculaire se situant entre 4000 et 6500 daltons (Fareed et coll. 1988), et leur capacité de catalyser l'inactivation de la thrombine est réduite par rapport à leur capacité d'inhiber le FXa, car l'inactivation de la thrombine est critiqueusement dépendante du poids moléculaire (Lindahl et coll. 1984).

3.3.1.2 Cofacteur II de l'héparine

L'activité anticoagulante de l'héparine s'exerce aussi par l'intermédiaire d'un second cofacteur plasmatique; le cofacteur II de l'héparine décrit par Briginshaw et Shanberge (1974, 1974a) et confirmé par Tollefsen et Blank (1981). La purification et la caractérisation du CIIH ont démontré qu'il était distinct de l'ATIII et des autres inhibiteurs de cette protéase (Tollefsen et coll. 1982).

Le CIIH et l'ATIII sont des protéines plasmatiques possédant des mécanismes d'action semblables. Cependant, il existe des différences importantes entre ceux deux inhibiteurs considérant que: 1) le CIIH est spécifique à la thrombine et n'altère pas les autres facteurs de coagulation; l'ATIII inhibe toutes les protéases de la voie intrinsèque de la coagulation y

compris la thrombine (Tollefsen 1989), 2) le dermatan sulfate active spécifiquement le CIIH; l'héparine et l'héparan sulfate activent autant le CIIH que l'ATIII (Tollefsen et coll. 1986), et 3) la capacité des fibroblastes et des muscles vasculaires lisses, mais non des cellules endothéliales, à activer le CIIH suggère que ce dernier serait un inhibiteur de la thrombine dans l'espace extravasculaire plutôt qu'intravasculaire (Olson et Björk 1992).

Le CIIH est une glycoprotéine possédant une chaîne polypeptidique unique d'un poids moléculaire variant entre 62000 et 66000 daltons (Tollefsen et coll. 1982). Le CIIH forme un complexe équimolaire avec la thrombine (Tollefsen et coll. 1982); la thrombine attaque le site actif du CIIH entre la Leu-444 et la Ser-445 au niveau sa queue C-terminale pour y former des liens covalents (Griffith et coll. 1985). En présence d'héparine, l'interaction entre le CIIH et la thrombine est catalysée par un facteur de 1000 (Tollefsen et coll. 1982); une accélération semblable à celle observée pour l'ATIII. La spécificité du CIIH est beaucoup plus restrictive que celle observée pour l'ATIII. Un substrat de reconnaissance macromoléculaire, présent spécifiquement sur la thrombine, expliquerait l'action du CIIH sur cette protéase (Hortin et coll. 1989).

Le potentiel anticoagulant du CIIH est spécifique à la thrombine et ne nécessite pas le pentasaccharique unique à la liaison de l'ATIII. Cependant, la chaîne d'héparine doit posséder un minimum de 24 unités de monosaccharides (7200 daltons) pour catalyser l'activation du CIIH (Maimone et Tollefsen 1988). Cette spécificité peut expliquer pourquoi les HBPM ne possèdent que très peu d'effets sur le CIIH, car leur poids moyen varie entre 4000 et 6500 daltons (Fareed et coll. 1988). En retour, ceci explique le potentiel hémorragique moindre des HBPM. Un autre avantage des HBPM consiste en leur plus faible

inactivation par le PF4 (Lane et coll. 1984). Lors de la coagulation, les plaquettes libèrent le PF4 qui est un inhibiteur puissant de l'héparine (Lane et coll. 1986) mais non des HBPM (Lane et coll. 1984). Le PF4 inhibe donc l'effet catalyseur de l'héparine dans la formation du complexe CIIH/thrombine (Tollefsen et Pestka 1985), ce qui suggère un mécanisme de protection de la thrombine au site d'activation plaquettaire. Cette propriété fait en sorte que les HBPM peuvent être des anticoagulants plus efficaces que l'héparine.

3.3.1.3 Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) est un inhibiteur vasculaire du facteur Xa et du complexe FT/FVIIa (Broze 1995). Cette glycoprotéine possède 3 domaines distincts à fonction inhibitrice (Wun et coll. 1988); le domaine Kunitz-1 inhibe l'activité catalytique du complexe FT/FVIIa tandis que le domaine Kunitz-2 agit spécifiquement sur le FXa (Girard et coll. 1989). Le domaine Kunitz-3 n'a pas de rôle défini dans la coagulation (Hamamoto et coll. 1993), mais il pourrait favoriser une liaison plus efficace entre l'héparine et le FXa (Jeske et coll. 1996). Une étude de Petersen et coll. (1992) suggère que le domaine Kunitz-3 inhiberait, à différents degrés, les enzymes trypsine, élastase et cathepsine G.

L'inhibition du complexe FT/FVIIa est entièrement dépendante du FXa; le TFPI se lie en premier lieu au FXa, et le complexe TFPI/FXa favorise la formation d'un complexe quaternaire avec le FT/FVIIa pour neutraliser son activité catalytique (Broze et coll. 1988). Cependant, des études suggèrent que la liaison entre le FXa et le FT peut se faire en absence de TFPI et que celui-ci peut aussi lier et neutraliser directement le complexe FT/FXa/FVIIa (Broze 1995). Donc, à des concentrations physiologiques, le TFPI produit une rétroaction

négative sur le complexe FT/FVIIa, mais il ne peut inhiber l'activité de ce complexe sans la présence du FXa (Sandset et Abildgaard 1991).

La première observation démontrant une interaction entre le TFPI et l'héparine fait suite à l'étude de Sandset et coll. (1988) lorsqu'ils ont remarqué des concentrations élevées de TFPI dans le sang de patients préalablement héparinés lors de chirurgies vasculaires. Le TFPI plasmatique voit son activité augmentée par un facteur de 2 à 4 (Sandset et coll. 1988, Broze et coll. 1988) et atteint un seuil maximal après 5 à 10 minutes (Sandset et coll. 1988). Puisque l'augmentation de l'activité du TFPI dépend de la concentration d'héparine qui circule dans le lit vasculaire, il a été suggéré que la libération de TFPI originait du pool endothélial (Sandset et Abildgaard 1991).

La redistribution du TFPI vers la circulation systémique contribue à l'effet anticoagulant de l'héparine et des HBPM (Sandset et coll. 1988). Lorsque la voie extrinsèque de la coagulation est activée, le TFPI et l'ATIII plasmatiques en sont les modulateurs. L'héparine catalyse la formation du complexe FT/FVIIa/FXa/TFPI (Broze et coll. 1988) en plus de catalyser l'inactivation des protéases de coagulation par l'ATIII. Le TFPI est un inhibiteur faible de la voie du facteur tissulaire mais en présence d'héparine, l'inhibition du FXa est grandement potentialisée car le TFPI possède une fonction de cofacteur pour l'héparine (Wun 1992, Jesty et coll. 1996). En présence de TFPI et d'héparine, un synergisme est rapidement apparent (Lindahl et coll. 1991, Wun 1992) et d'autant plus important en présence d'HBPM (Wun 1992).

La libération de TFPI en présence d'héparine et d'HBPM contribue à leurs potentiels anticoagulants ainsi qu'à leurs effets antithrombotiques. La supériorité des HBPM

impliquerait peut-être une différence dans l'association du TFPI aux lipoprotéines. Cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée.

3.3.2 Activités extra-anticoagulantes des héparines

L'héparine et les HBPM sont des anticoagulants et antithrombotiques efficaces. Si toutefois ces effets sont la principale raison de leur utilisation clinique, ces molécules possèdent aussi plusieurs autres effets pharmacologiques indépendants de leur activité anticoagulante et susceptibles d'être bénéfiques dans la maladie coronarienne et ses complications (Lormeau 1991, Lindahl et coll. 1994). Les principales actions extra-anticoagulantes des héparines seront discutées à dans les sections suivantes.

3.3.2.1 Effets sur l'hémostase

Les complications hémorragiques associées à l'utilisation de l'héparine sont en partie dues à une altération de l'hémostase primaire qui, en retour, est fonction des plaquettes. Cependant, un effet paradoxal de l'héparine est sa nature pro-thrombotique qui serait aussi le résultat d'une interaction directe avec les plaquettes.

L'héparine possède une activité bimodale sur l'activation plaquettaire. A faibles concentrations, celle-ci stimule l'agrégation à l'ADP (Messmore et coll. 1989), au collagène (Chen et coll. 1992) et autres agonistes (Salzman et coll. 1980, Noris et coll. 1993) tandis qu'à plus fortes concentrations, l'héparine possède un pouvoir inhibiteur (Messmore et coll. 1989). Les études de Sobel et Adelman (1988) ainsi que Horne (1988) ont permis de démontrer la liaison saturable, spécifique et réversible de l'héparine aux plaquettes.

Une propriété qui semble nécessaire pour l'inhibition de l'agrégation plaquettaire est un poids moléculaire élevé, car les HBPM et les héparinoïdes ne possèdent qu'un potentiel inhibiteur minimal sauf si présents en concentrations très élevées. Dans cette situation, la présence d'une quantité suffisante de molécules de haut poids moléculaire peut inhiber l'agrégation (Fernandez et coll. 1986, Messmore et coll. 1989). Si toutefois, la grande affinité de l'héparine pour l'ATIII est nécessaire pour son activité anticoagulante, cette liaison ne semble pas impliquée dans ce phénomène, car les héparines de faible et haute affinité pour l'ATIII inhibent l'agrégation au collagène (Fernandez et coll. 1986, Messmore et coll. 1989). Le statut ionique (densité de charge) et le degré de sulfatation semblent importants puisque les polysaccharides synthétiques hautement sulfatés déplacent l'héparine de ses sites de liaison plaquettaire (Horne 1988, Sobel et Adelman 1988). Selon Messmore et coll. (1991), il est probable que la désulfatation de l'héparine enlèverait toute capacité à lier les plaquettes.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les effets divergents de l'héparine et des HBPM dans l'activation plaquettaire. Les HBPM possèdent une activité plaquettaire très faible; le potentiel activateur disparaît lorsque le poids moléculaire est inférieur à 3000 daltons (Doutremepuich et coll. 1992). L'énoxaparine (une HBPM) favorise la formation de beaucoup moins d'agrégats plaquettaires que des concentrations comparables d'héparine dans le plasma (Brace et Fareed 1985). Mirshahi et coll. (1992) ont démontré que l'énoxaparine stimulait faiblement l'expression des récepteurs du fibrinogène à la surface plaquettaire. Ceci peut en partie expliquer l'effet moins important des HBPM sur l'agrégation.

L'énoxaparine inhibe la génération de thrombine dans le plasma riche en plaquettes comparativement à l'héparine qui n'est efficace que dans du plasma pauvre en plaquettes.

Ceci suggère une susceptibilité moindre de l'énoxaparine au PF4 libéré des plaquettes activées (Walenga et coll. 1985). Il semblerait que les fractions de faible poids moléculaire de l'énoxaparine neutralisent le PF4 en s'y liant pour assurer une plus grande disponibilité des fractions à haut poids moléculaire qui inhibent la thrombine (Béguin et coll. 1989). De plus, les HBPM sont des activateurs beaucoup moins puissants de la lipoprotéine lipase que l'héparine (Kakkar et coll. 1982). A ce propos, une concentration élevée d'acides gras non estérifiés est associée à une diminution de la stabilité et la synthèse de PGI₂. Ainsi, en présence d'HBPM, la production de PGI₂ n'est que peu modifiée en raison de leur potentiel lipophile faible (Doutremepuich et coll. 1992). Une relation étroite existe entre l'activité des lipases et le potentiel hémorragique de l'héparine, et il est possible que cette interaction puisse impliquer la fonction plaquettaire (Barrowcliffe et coll. 1988). Il est aussi intéressant de noter que les HBPM ne stimulent pas la libération de TXA₂ (Landolfi et coll. 1994), un agent vasoconstricteur puissant et agoniste de l'agrégation plaquettaire.

3.3.2.2 Effets sur l'inflammation

Plusieurs études ont démontré le rôle de l'héparine et des glycosaminoglycanes dans la modulation de l'activité d'un grand nombre de cellules inflammatoires. Cette section considérera spécifiquement l'influence de l'héparine et de ses dérivés sur la fonction des neutrophiles. L'héparine est aussi un inhibiteur puissant de l'activation de la cascade du complément. Un article intéressant a été écrit à ce sujet par Edens et coll. (1993).

La liaison de l'héparine aux leucocytes est rapide, spécifique, saturable et réversible, et les leucocytes expriment plus de $7,7 \times 10^6$ sites de liaison par cellule (Léculier et coll.

1992). Ces auteurs ont proposé que l'interaction entre l'héparine et les leucocytes se fait via une protéine de surface par un mécanisme dépendant du calcium, car la liaison est inhibée en présence d'EDTA. Plusieurs études *in vitro* ont démontré l'inhibition de l'activation et du chimiotactisme des leucocytes stimulés par le fMLP en présence d'héparine et d'HBPM (Laghi Pasini et coll. 1984, Matzner et coll. 1984, Freischlag et coll. 1992). L'inhibition spécifique de l'élastase (Walsh et coll. 1991) et de la myéloperoxydase (Léculier et coll. 1993) libérés des neutrophiles a aussi été démontré. Le potentiel inhibiteur de l'héparine et des HBPM sur l'activation des neutrophiles semble indépendant de leur activité anticoagulante et de leur poids moléculaire, car les héparines de moins de 2000 daltons inhibent la libération d'enzymes des granules azurophiles ainsi que l'agrégation homotypique des neutrophiles (Walsh et coll. 1991, Bazzoni et coll. 1993). L'efficacité de l'héparine et de ses dérivés serait directement proportionnelle au contenu de sulfate (Matzner et coll. 1984, Cerletti et coll. 1994). Cependant, ce ne sont pas toutes les études qui en sont venues à cette conclusion. L'héparine possède une activité bimodale sur les neutrophiles. De faibles doses accentuent la production d'anions superoxyde et la libération de myéloperoxydase tandis qu'à plus fortes doses, les effets opposés sont observés (Léculier et coll. 1993, Itoh et coll. 1995) en plus de l'inhibition de l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Silvestro et coll. 1994). Contrairement à l'héparine, les HBPM inhibent l'activité des neutrophiles d'une manière dépendante de la dose (Léculier et coll. 1993, Itoh et coll. 1995).

Les anions superoxyde peuvent être neutralisés indirectement par l'héparine via son association avec la SOD. Ōyanagui et Sato (1990) ont démontré, dans un modèle murin d'œdème, que l'administration intraveineuse d'héparine augmentait l'activité plasmatique de

la SOD par un facteur de 2.5. La libération de SOD extracellulaire de type C présente à la surface endothéliale a été démontré par Karlsson et Marklund (1987) et il semble que se soit la fraction V de la SOD qui est libérée après l'administration d'héparine (Adachi et coll. 1995). La concentration de SOD diminue graduellement en fonction de l'élimination de l'héparine pour être réabsorbée par les cellules endothéliales (Adachi et coll. 1995).

Plusieurs études expérimentales indiquent que l'héparine et les glycosaminoglycanes inhibent aussi l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire et leur transmigration vers les tissus (Carlos et Harlan 1994). L'héparine et les HBPM servent de ligands à la L-sélectine ainsi qu'à la P-sélectine (Nelson et coll. 1993), et cette liaison nécessite la présence du calcium mais est indépendante de l'acide sialique (Norgard-Sumnicht et coll. 1993). Par exemple, les HBPM peuvent moduler l'influx des neutrophiles après l'induction d'une péritonite expérimentale (Nelson et coll. 1993). Dans ce type de modèle, la migration des neutrophiles est complètement abolie par l'administration combinée d'anticorps anti-P et anti-L-sélectine (Bosse et Vestweber 1994), ce qui suggère une interaction directe entre les HBPM et les sélectines.

Les polysaccharides sulfatés et l'héparine inhibent efficacement le roulement des leucocytes dans les veinules mésentériques de lapins (Tangelder et Arfors 1991, Ley et coll. 1991a). Pendant la phase de roulement, les leucocytes interagissent avec des facteurs chimiotactiques spécifiques qui sont exprimés, en outre, par l'héparan sulfate présent à la surface des cellules endothéliales (Tanaka et coll. 1993a). L'inhibition du roulement est réversible et augmente en fonction de la densité de sulfates (Ley et coll. 1991a, Tangelder et Arfors 1991, Silvestro et coll. 1994). Donc, les régions de l'héparan sulfate contenant une

grande densité de sulfate peuvent être des ligands efficaces de la L-sélectine (Tyrrell et coll. 1995). Cependant, aucune analyse structurale de ces régions hautement sulfatés impliquées dans le roulement des leucocytes n'a encore été faite.

Tanaka et coll. (1993a) ont proposé un modèle décrivant les mécanismes par lesquels l'héparan sulfate participerait à l'activation des leucocytes. Des chimiokines comme l'interleukine 8 sont séquestrées à la surface endothéliale par l'intermédiaire de l'héparan sulfate. L'interaction entre la chimiokine emprisonnée et les leucocytes permettrait leur activation et leur adhésion ferme à l'endothélium. Donc, la modulation de l'expression de l'héparan sulfate à la surface des cellules endothéliales pourrait possiblement influencer directement l'adhésion des leucocytes. De plus, les voies de signalisation des chimiokines dans différentes sous-population de leucocytes pourrait dépendre de l'interaction entre les chimiokines et certains domaines spécifiques de l'héparan sulfate (Lindhal et coll. 1994). L'héparine exogène et les dérivés d'héparine avec une faible activité anticoagulante peuvent potentiellement déplacer les chimiokines attachées à l'héparan sulfate (Tyrrell et coll. 1995). L'identification de dérivés de l'héparine avec une grande affinité pour les chimiokines pourrait s'avérer des inhibiteurs puissants de l'adhésion endothéliale des leucocytes.

3.3.2.3 Autres effets

Les cellules endothéliales vasculaires captent, fixent et internalisent l'héparine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Bârzu et coll. 1985). Cette propriété est dépendante de la densité de charge et du poids moléculaire; les fragments d'héparine de faible poids moléculaire n'ont qu'une faible affinité pour les cellules endothéliales (Bârzu et coll. 1986). L'héparine présente

sur l'endothélium vasculaire, d'origine endogène ou exogène, participe à la non-thrombogénicité de cette surface et au maintien de son intégrité (Hiebert et coll. 1993). L'héparine (Kohno et coll. 1994, Yokokawa et coll. 1994) et les HBPM (Reantragoon et coll. 1994) modulent la libération et l'activité de l'endothéline par des mécanismes inhibant la voie de signalisation de la protéine kinase C (Yokokawa et coll. 1992, Imai et coll. 1993). Ces observations, en association avec les études démontrant une augmentation de la production de NO (Li et coll. 1996) et de PGI₂ (Kaji et coll. 1991), peuvent expliquer l'effet hypotenseur de l'héparine (Vasdev et coll. 1994, Mandal et coll. 1995).

Les autres activités pharmacologiques non anticoagulantes de l'héparine comprennent la potentialisation de l'effet mitogène des facteurs de croissance (Bârzu et coll. 1989), la libération de lipoprotéines lipases (Braun et Severson 1993), l'inhibition de la prolifération des muscles vasculaires lisses (Clowes et Clowes 1986) et la stimulation de l'angiogenèse (Norrby 1993).

3.3.3 Modulation de l'activité anticoagulante des héparines

Il est bien connu que l'héparine se lie à une variété de protéines plasmatiques autres que l'ATIII (McKay et Laurell 1980, Lane 1989). Tandis que la liaison entre l'héparine et l'ATIII nécessite la présence d'un pentasaccharide unique (Lindahl et coll. 1979), la liaison non spécifique de l'héparine aux autres protéines plasmatiques apparaît dépendante de son poids moléculaire et de sa nature anionique (Andersson et coll. 1979).

Parmi les protéines plasmatiques liant l'héparine, celles-ci comprennent les glycoprotéines riches en histidine (Lane et coll. 1986), le PF4 (Rucinski et coll. 1990), la

vitronectine (Preissner et Müller-Berghaus 1987), la fibronectine (Mosesson et Amrani 1980) et le facteur von Willebrand (Sobel et coll. 1991). Ces liaisons ont pour conséquence la neutralisation de l'activité anticoagulante de l'héparine (Hirsh et Levine 1992), une plus faible biodisponibilité ainsi qu'une plus grande variabilité de la réponse anticoagulante à des doses fixes (Young et coll. 1992). Les HBPM ont une affinité moindre (de l'ordre de 10 à 30%) pour les protéines plasmatiques (Lane et coll. 1986, Young et coll. 1994). Cette propriété explique en partie leur biodisponibilité supérieure à faibles doses (Bara et coll. 1985). La modulation de l'activité anticoagulation de l'héparine par les protéines plasmatiques a été décrite en détail par Lane (1989).

3.4 Physiologie de la fibrinolyse

La conversion du fibrinogène en fibrine représente la seconde étape de l'hémostase. La thrombine, qui est générée pendant l'activation de la cascade de coagulation, se lie au domaine central du fibrinogène pour libérer les fibrinopeptides A et B résultant ainsi en la formation de mono- et polymères de fibrine (Blombäck 1996, Doolittle et coll. 1996). La polymérisation de la fibrine nécessite la présence du facteur XIIIa (activé par la thrombine) pour la formation de liens covalents entre les différentes unités de fibrine. Le facteur XIIIa procure aussi au bouchon hémostatique une résistance à la plasmine en liant l'inhibiteur α_2 -antiplasmine (Colman et coll. 1994).

L'activation du système fibrinolytique plasminogène/plasmine permet de dissoudre le caillot de fibrine. La fibrinolyse s'apparente à la cascade de coagulation en ce sens qu'elle implique une série de conversions enzymatiques, de mécanismes de rétroaction et la présence

d'inhibiteurs naturels. Le système fibrinolytique comprend deux composantes : une composante plasmatique et une composante cellulaire (Colman et coll. 1994).

A la base de la fibrinolyse est la conversion du plasminogène en sa forme active, la plasmine, via une protéolyse limitée par les activateurs du plasminogène; le TPA et l'activateur du plasminogène de type urokinase (Collen et Lijnen 1991). Un équilibre très précaire est maintenu entre la formation et la dissolution du caillot de fibrine. Par exemple, les plaquettes et les cellules endothéliales libèrent des inhibiteurs du TPA pour faciliter la formation de fibrine (Plow et Collen 1981) mais aussi du TPA (Levin et coll. 1984) pour transformer le plasminogène (principalement le plasminogène lié à la fibrine) en plasmine (Lijnen et Collen 1982). La plasmine hydrolyse le fibrinogène et la fibrine (le substrat physiologique) pour dissoudre le caillot (Colman et coll. 1994). Les cellules inflammatoires sont attirées vers le bouchon hémostatique par les facteurs chimiotactiques produit par les plaquettes et la fibrine elle-même, et l'élastase libérée des neutrophiles activés contribue au potentiel fibrinolytique endogène (Plow 1982). Des produits de dégradation de la fibrine sont libérés dans la circulation sous forme de D-dimères (Doolittle et coll. 1996).

Les plaquettes et les leucocytes jouent des rôles importants dans la physiologie de la fibrinolyse. Les plaquettes contiennent la majorité des protéines impliquées dans la fibrinolyse (Devine et Carter 1995, Kamat et Schafer 1995). Dans l'hémostase normale, les plaquettes possèdent une activité antifibrinolytique en libérant l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 et α_2 -antiplasmine de ses granules alpha (Braaten et coll. 1994, Robbie et coll. 1993). Cependant, les plaquettes peuvent aussi promouvoir la fibrinolyse en accélérant la transformation du plasminogène en plasmine par le TPA (Stricker et coll. 1986, Vaughan

et coll. 1989). L'équilibre entre les effets anti- et pro-fibrinolytiques des plaquettes *in vivo* est probablement dépendant de la nature du processus thrombotique et du lit vasculaire impliqué (Coller 1990). Les leucocytes peuvent participer à la fibrinolyse (Heiden et coll. 1996) en activant le TPA de type urokinase via la cathepsine G (Drag et Petersen 1994) ainsi qu'en activant une voie alterne de fibrinolyse (Plow 1982).

3.5 Activateurs fibrinolytiques

La thérapie fibrinolytique consiste en l'administration exogène d'activateurs du plasminogène pour dissoudre le thrombus occlusif. Ce traitement doit être instauré le plus rapidement possible, car les thrombi riches en fibrine nouvellement formée sont plus sensibles aux fibrinolytiques que les thrombi plus âgés et riches en plaquettes (Jang et coll. 1989). De nouvelles générations de fibrinolytiques avec une plus grande spécificité pour la fibrine ont été développées ces dernières années afin d'atténuer la fibrinogénolyse systémique associée à ces agents (Collen 1996, Cannon et coll. 1997). Si toutefois ces agents semblent prometteurs, les fibrinolytiques couramment employés ne peuvent discriminer entre la fibrine du thrombus et la fibrine incorporée dans le bouchon hémostatique. Les paragraphes suivants décriront brièvement deux fibrinolytiques grandement utilisés dans le traitement de l'infarctus aigu du myocarde: la streptokinase (SK) et le TPA.

La SK est l'activateur du plasminogène le plus utilisé. D'un poids moléculaire de 47000 daltons, celle-ci est isolée de la souche bactérienne streptococcus (Brogden et coll. 1973). La SK ne possède aucune activité enzymatique; elle forme un complexe stochiométrique 1 : 1 avec le plasminogène endogène (McClintock et Bell 1971). C'est ce

complexe activateur qui catalyse la conversion du plasminogène en sa forme active, la plasmine (Cederholm-Williams et coll. 1979). L'activation presque instantanée du plasminogène par la SK stimule la dégradation immédiate et complète du fibrinogène et par conséquent, l'accumulation de grandes quantités de produits de dégradation (Marber et Sherry 1988, 1988a). Ces métabolites peuvent substituer le fibrinogène pendant le processus de polymérisation et perturber la formation du réseau de fibrine durant l'hémostase secondaire. En plus du fibrinogène, les facteurs de coagulation V, VIII et la prothrombine sont aussi dégradés par la SK (Marber et Sherry 1988). L'urokinase est une protéase de type trypsine qui active directement le plasminogène pour dégrader le fibrinogène et la fibrine (Gulba et coll. 1996). L'urokinase est employée principalement chez les patients présentant une hypersensibilité à la SK.

Le TPA est une protéase de la sérine d'un poids moléculaire de 70000 daltons qui active directement le plasminogène en plasmine (Gulba et coll. 1996). Le TPA ne possède qu'une faible affinité pour le plasminogène circulant librement et la réaction catalytique est accélérée par un facteur de 100 lorsque le plasminogène est lié à la fibrine ou à ses fragments (Zamarron et coll. 1983). Donc, le TPA démontre une sélectivité pour la fibrine (Bringmann et coll. 1995) et possède l'avantage de lyser la fibrine sans accentuer la dégradation d'autres protéines comme le fibrinogène. Cette propriété contraste avec la SK et l'urokinase qui agissent sur le plasminogène libre et induisent un état thrombolytique systémique. La spécificité du TPA pour la fibrine implique la formation d'un complexe ternaire entre celui-ci, le plasminogène et la fibrine ce qui favorise la dissolution du thrombus à partir de sa surface externe (Gulba et coll. 1996).

3.6 Coagulation dans l'ischémie-reperfusion

La rupture d'une plaque athéromateuse, par exemple, active la cascade de coagulation et mène à la thrombose de l'artère coronaire. Ce phénomène est associé à une génération de thrombine reflétée par la concentration plasmatique élevée de fibrinopeptide A (Eisenberg et coll. 1985). De même, le nombre de complexes thrombine/ATIII augmente pendant la phase aigue de l'infarctus du myocarde (Gulba et coll. 1991), ce qui suggère une libération massive de thrombine. Ainsi, l'utilisation d'anticoagulants et de thrombolytiques peut s'avérer bénéfique pour contrer les effets délétères de la thrombine.

Peu d'études ont évalué l'implication de la cascade de coagulation dans le contexte d'ischémie-reperfusion. MacDonald et coll. (1995) ont démontré, dans un modèle canin, que l'inhibiteur de la thrombine LY293435 réduisait la taille de l'infarctus de 36% sans interférer avec l'infiltration de neutrophiles. Dans le muscle squelettique de rat, Hartsock et coll. (1989) ont démontré que la coagulation intravasculaire diminuait l'apport en oxygène et favorisait l'accumulation de produits de dégradation cytotoxiques pendant la reperfusion. L'administration d'héparine ou d'urokinase limite la nécrose du muscle gracilis post-ischémique (Hobson et coll. 1988, Belkin et coll. 1989) et l'analyse du débit sanguin régional indique une reperfusion complète même après 5 heures d'ischémie (Forrest et coll. 1989). Ceci suggère que la thrombose, dans le muscle gracilis, n'est pas responsable de lésions importantes. Il est possible cependant que des plages de thrombose microvasculaire se développent pendant la reperfusion et contribuent à la réocclusion capillaire et au phénomène de non reperfusion (Rubin et coll. 1996).

Le rôle d'inhibiteurs spécifiques de protéases de la coagulation a été évalué

récemment sur la fonction hépatique post-ischémique de rats. Okano et coll. (1996) ont démontré que l'administration d'ATIII, 30 minutes avant le début de l'ischémie, améliorait le statut énergétique et la perfusion microvasculaire en plus d'atténuer les altérations ultrastructurales. Ces auteurs ont suggéré que la stimulation de la production de PGI₂ par l'ATIII était un des mécanismes impliqués dans la cytoprotection observée; l'ATIII stimule la production de PGI₂ des cellules endothéliales aortiques bovines via une interaction avec les glycosaminoglycanes présentes sur la surface cellulaire (Yamauchi et coll. 1989). Cependant, l'administration d'ATIII avant la période ischémique ne nous permet pas de discerner si la protection observée est due à une modulation de l'ischémie ou de la reperfusion. Il est possible que l'ATIII, en libérant de la PGI₂, puisse atténuer l'intensité de l'ischémie. En utilisant le même modèle, Hisama et coll. (1996) ont démontré que l'héparine, l'ATIII ou le DEGR-Xa (un inhibiteur compétitif du facteur Xa) atténuait l'accumulation de neutrophiles et la libération de cytokines dans le foie post-ischémique.

L'expression du facteur tissulaire est stimulée par l'hypoxie (Herbert et coll. 1996), le complexe d'attaque membranaire du complément (Saadi et coll. 1995), l'interleukine 1 et le facteur de nécrose tumorale (Crossman et coll. 1990) ainsi que par la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Golino et coll. 1996). Ces observations peuvent donc expliquer le potentiel protecteur du TFPI (Koudsi et coll. 1996) bien qu'aucun mécanisme d'action précis n'a pu être mis en évidence. De même, la protéine C est activée dans la microcirculation coronaire après une agression ischémique très brève (Snow et coll. 1991, Serebruany et coll. 1996). Considérant le rôle important de la protéine C comme anticoagulant naturel, ces auteurs ont suggéré son potentiel cytoprotecteur. Cependant, une

étude récente de Hahn et coll. (1996) n'a pu confirmer cette hypothèse dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion; les tailles d'infarctus du groupe témoin et traité étant les mêmes (respectivement 35 et 33%).

A la lumière des résultats présentés précédemment, le rôle de la cascade de coagulation demeure toujours incertain. La cardioprotection associée aux inhibiteurs de protéases semblent impliquer des mécanismes d'action qui sont indépendants du potentiel anticoagulant de ces agents.

3.7 Héparines et thrombolytiques dans la protection myocardique

Les héparines et les agents thrombolytiques comme la SK et le TPA possèdent plusieurs effets susceptibles d'améliorer la survie de l'organe post-ischémique. Saliba et coll. (1976) ont été parmi les premiers à évaluer le potentiel cardioprotecteur de l'héparine dans ce contexte. Ces auteurs ont démontré que l'administration d'une dose supratherapeutique d'héparine atténuait la perte de créatine phosphokinase et préservait l'intégrité tissulaire. Bien qu'aucun mécanisme d'action précis n'a pu être établi, ils ont suggéré que la protection myocardique conférée par l'héparine pouvait être indépendante de son activité anticoagulante. Ces résultats ont été confirmés par le groupe de Lucchesi (Friedrichs et coll. 1994, Black et coll. 1995) dans des modèles d'ischémie-reperfusion myocardique *in vitro* (lapin) et *in vivo* (chien). Ces études suggèrent que la cardioprotection de l'héparine et du *N*-acétyl héparine (une molécule semblable à l'héparine mais dépourvue d'activité anticoagulante) implique l'inhibition du complément et non un effet anticoagulant, car le *N*-acétyl héparine est aussi efficace que l'héparine. De plus, l'absence de protection en présence d'hirudine, un inhibiteur

spécifique de la thrombine, vient appuyer cette hypothèse (Friedrichs et coll. 1994).

Si toutefois l'héparine possède une activité anti-complément importante (Weiler et coll. 1992, Edens et coll. 1993), plusieurs autres mécanismes peuvent expliquer son potentiel cytoprotecteur. Par exemple, l'administration d'héparine réduit la nécrose du muscle squelettique et atténue la perméabilité endothéliale (Hobson et coll. 1988, 1989, Wright et coll. 1988). Puisque l'héparine est fortement anionique, elle peut s'incorporer à l'endothélium pour maintenir son électronégativité (Jaques et Hiebert 1989).

La protection de la fonction endothéliale par l'héparine a été étudié plus en détail par Sternbergh et coll. (1993, 1995). Il a déjà été établi que la vasodilatation dépendante de l'endothélium est rapidement inhibée après la séquence ischémie-reperfusion (Tsao et coll. 1990), ce qui suggère une dysfonction endothéliale importante. Cependant, l'administration de doses thérapeutiques d'héparine ou d'héparinoïdes à faible activité anticoagulante préserve la capacité vasodilatatrice de l'endothélium (Sternbergh et coll. 1993, 1995). Ces résultats suggèrent que l'héparine augmente l'activité de la GMP cyclique en stimulant la libération de NO endothélial. Light et coll. (1993) ont obtenu des résultats comparables semblables au niveau de l'endothélium régénéré. L'effet stabilisateur endothélial de l'héparine a aussi été soulvé par Li et coll. (1995).

Les autres mécanismes d'action potentiels de l'héparine comprennent des effets anti-inflammatoires (Carr 1979, Slungaard et coll. 1990), la libération de SOD endothéliale (Nilsson et coll. 1993, Becker et coll. 1994), l'inhibition de l'activation des leucocytes (Bazzoni et coll. 1993) et de la libération de l'élastase (Redini et coll. 1988, Walsh et coll. 1991).

L'inhibition de la fonction des leucocytes est très pertinente à l'ischémie-reperfusion. Deux études de Yanaka et coll. (1996, 1996a) ont démontré, dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale chez le rat, que l'héparine atténuait significativement l'accumulation de leucocytes dans le tissu ischémique, réduisait la taille de l'infarctus et améliorait la fonction neuronale. Les mécanismes d'action sous-jacents demeurent incertains, mais une étude de Nelson et coll. (1993) a démontré que l'héparine inhibait l'interaction entre la P- et la L-sélectine et les neutrophiles pendant le roulement initial sur l'endothélium. Ainsi, il est possible que l'héparine atténue la séquestration des neutrophiles en inhibant la fonction des sélectines. De plus, Ley et coll. (1991a) ont démontré que l'administration intraveineuse de polysaccharides sulfatés (dont l'héparine) inhibait la mobilisation des neutrophiles. La cardioprotection de ces agents pourrait être attribuable au degré de sulfatation, car ils peuvent compétitionner avec les ligands endothéliaux comme le sialyl Lewis^x pour les sites de liaisons sur les leucocytes (Yanaka et coll. 1996). L'héparine peut aussi atténuer l'accumulation de leucocytes via une interaction avec leurs récepteurs CD11b/CD18 (Bevilacqua et coll. 1994). Puisque l'héparine est un ligand des CD11b/CD18 (Diamond et coll. 1995), une inhibition de la fonction de cette intégrine pourrait être possible. Donc, les effets protecteurs de l'héparine sur la fonction post-ischémique pourrait être dépendante d'une inhibition des sélectines et/ou intégrines.

Très peu d'études ont été réalisées pour évaluer le potentiel cardioprotecteur des HBPM pendant l'ischémie-reperfusion. Ces fragments d'héparine possèdent des propriétés pouvant être bénéfiques contre les altérations de reperfusion considérant 1) elles n'altèrent pas la perméabilité vasculaire (Blajchman et coll. 1989), 2) elles ne stimulent pas les

plaquettes et la libération de TXA_2 (Landolfi et coll. 1994) ainsi que la production de superoxyde (Itoh et coll. 1995), 3) elles stimulent la libération de PGI_2 des cellules endothéliales (Kaji et coll. 1991) et 4) elles se lient aux leucocytes (Harenberg et coll. 1996) et inhibent les sélectines (Nelson et coll. 1993).

L'administration d'un fragment d'héparine (2000 daltons) par voie intraveineuse ou sous-cutanée avant une période d'ischémie brève (5 minutes) atténue l'incidence de tachycardies et de fibrillations ventriculaires (Guarini et coll. 1995). Cependant, ces auteurs n'ont établi aucun mécanisme d'action précis. Une autre étude d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez le rat (Hasdai et coll. 1996) ne démontre aucune réduction de la taille d'infarctus et de l'accumulation de neutrophiles dans le groupe traité. Ces auteurs suggèrent que les propriétés anti-inflammatoires des HBPM ne sont pas assez importantes pour atténuer l'inflammation pendant l'infarctus. Si toutefois cette étude s'est avérée négative, le choix du modèle expérimental et des critères de finalité indirects (perte de créatine phosphokinase tissulaire) pour quantifier la taille de l'infarctus est discutable.

Quelques études d'ischémie-reperfusion myocardique ont démontré l'effet cardioprotecteur de la SK et du TPA indépendamment de la recanalisation de l'artère occlue. Dans des coeurs isolés de lapins (Fung et Rabkin, 1984, Mickelson et coll. 1988) et de rats (Puckett et coll. 1984), ces auteurs ont démontré que l'infusion de SK améliorait la fonction ventriculaire gauche pendant la reperfusion. Cette cardioprotection exprimée en terme de réduction de l'étendue de l'infarctus a été signalée dans les études de Kopia et coll. (1988) et de Chakrabarty et coll. (1994) et aussi pour le TPA (Darius et coll. 1986, Egashira et coll. 1992). Smith et coll. (1991a) ont suggéré que la réduction de la taille de l'infarctus était en

partie due à l'atténuation parallèle de l'accumulation de neutrophiles. De plus, Mickelson et coll. (1998) suggère que la cardioprotection de la SK se ferait en piégeant les radicaux libres dérivés de l'oxygène. La propriété antioxydante de la SK et des thrombolytiques en général a été décrite chez l'humain (Bell et coll. 1990, Riesenberber et coll. 1995).

Malgré ces études positives, aucun consensus n'a encore été atteint à l'égard de la cardioprotection post-ischémique par la SK. Des modèles canins d'ischémie-reperfusion n'ont pu démontrer de cardioprotection avec la SK (Kloner et Alker 1984, Higginson et coll. 1987, Mickelson et coll. 1989) et des résultats comparables ont aussi été obtenus avec le TPA (Kloner et coll. 1989a). Ces résultats contrastent avec les études animales citées précédemment de même qu'avec les études multicentriques qui ont clairement démontré l'efficacité de la SK et du TPA à lyser le thrombus occlusif, rétablir le débit sanguin antérograde, améliorer la fonction ventriculaire gauche et réduire la mortalité (GISSI 1987, ISIS-2 1988, Van de Werf et Arnold 1988).

La protection du myocarde post-ischémique par la SK et le TPA est très variable dans les modèles expérimentaux animaux et peu d'explications ont été suggérées. Des différences au niveau du désign expérimental comme, par exemple, l'utilisation de modèles *in vitro* vs *in vivo*, des animaux conscients vs anesthésiés, des modèles aigus vs chronique, une occlusion thrombotique vs occlusion mécanique, l'infusion de l'agent par voie intraveineuse vs intracoronaire et l'utilisation de différentes espèces animales peuvent en partie expliquer ces divergences. D'autres études sont nécessaires pour établir dans un modèle unique la pertinence de ce traitement sur la sauvegarde myocardique post-ischémique.

Chapitre 4

Inhibiteurs plaquettaires dans l'ischémie-reperfusion

4.1 Introduction

Nous avons décrit, à la section 2.3, l'implication des plaquettes dans l'ischémie-reperfusion. Les plaquettes jouent, sans contredit, un rôle primordial dans ce contexte; un rôle qui sera d'autant plus important s'il y a présence d'une sténose critique résiduelle sur l'artère coronaire reperfusée.

L'aspirine (acide acétylsalicylique; ASA) est utilisée principalement pour prévenir la réocclusion de l'artère recanalisée et l'apparition de même que la sévérité de nouveaux épisodes ischémiques ainsi que pour réduire la mortalité et la morbidité des patients souffrant d'un infarctus aigu du myocarde (ISIS-2 1988, Roux et coll. 1992, Garcia-Dorado et coll. 1995). Cependant, dans les modèles animaux d'ischémie-reperfusion, l'ASA possède des effets mitigés. Mullane et McGiff (1985) ainsi que Jolly et coll. (1985) ont démontré que la thrombocytopénie était inefficace pour réduire l'étendue de l'infarctus de même que l'utilisation de faibles (Mullane et Fornabaio 1988) et fortes doses d'ASA (Grover et Schumacher 1989). Par contre, dans un modèle porcin avec lésions intinales au site d'occlusion, Barrabés et coll. (1996) ont démontré la capacité de l'ASA à réduire la taille ultime de l'infarctus en cours de reperfusion. Comme il sera décrit à la section 4.2.1.1.1, la présence d'une sténose critique sur l'artère reperfusée pourrait expliquer ces différents résultats.

Les inhibiteurs des β_2 intégrines plaquettaires (GPIIb-IIIa) inhibent la voie commune

de l'agrégation en interférant avec la liaison entre les récepteurs GPIIb-IIIa et le fibrinogène indépendamment de l'agoniste (Coller 1995, Frishman et coll. 1995, Lefkovits et coll. 1995). En présence d'une sténose critique (thrombotique ou mécanique), un inhibiteur plaquettaire qui est indépendant de la cyclo-oxygénase pourrait s'avérer très efficace.

A l'intérieur de ce chapitre, nous verrons les mécanismes d'action de l'ASA et des inhibiteurs des GPIIb-IIIa ainsi que leurs rôles potentiels dans la protection du myocarde post-ischémique. L'influence d'une sténose critique résiduelle sur l'artère reperfusée sera aussi évaluée.

4.2 Aspirine et fonction plaquettaire

Il s'est fait, au cours des 10 dernières années, un progrès considérable dans la compréhension des mécanismes d'action de l'ASA (Mehta et Mehta 1993, Roth et Calverley 1994). Chez les patients atteints de maladie coronarienne, le rôle antithrombotique principal de l'ASA est d'inhiber la fonction plaquettaire en acétylant irréversiblement l'enzyme cyclo-oxygénase (COX). L'ASA et son métabolite actif, le salicylate, possèdent aussi des effets pharmacologiques qui sont indépendants de la fonction plaquettaire. Le potentiel anti-inflammatoire de l'ASA et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) en général est bien connu. Les principaux mécanismes d'action de l'ASA seront décrits dans cette section.

4.2.1 Mécanismes d'action de l'aspirine sur l'hémostase

4.2.1.1 Inhibition de la cyclo-oxygénase

L'administration d'ASA par voie orale ou intraveineuse induit une dysfonction

plaquettaire irréversible détectable par une prolongation du temps de saignement. Vane (1971) ainsi que Smith et Willis (1971) ont été les premiers à démontrer de manière conclusive que l'ASA inhibait la synthèse des prostaglandines (PG) à partir de l'acide arachidonique dans les homogénats de poumon de cobayes mais aussi dans les plaquettes. Cependant, administrés à forte dose, l'ASA et les AINS peuvent agir selon des voies indépendantes des PG.

L'enzyme clé de la synthèse des PG est la PGH synthétase qui possède une activité COX (pour transformer l'acide arachidonique en PGG_2) et une activité peroxydase (pour réduire la PGG_2 en PGH_2) (Roth et coll. 1981). Deux isoenzymes de la COX ont été décrites (Pairet et Engelhardt 1996, Vane et Botting 1996); le type 1 est exprimé de manière constitutive dans la majorité des tissus ainsi que dans les plaquettes et il est responsable de la synthèse des PG et de la TXA_2 (Feng et coll. 1993, O'Neill et Ford-Hutchinson 1993). La seconde isoenzyme (type 2) est exprimée de manière inductible en réponse aux facteurs de croissance et à certains médiateurs inflammatoires (Xie et coll. 1991). L'ASA inhibe la synthèse des PG exclusivement en bloquant irréversiblement la fonction COX de la PGH synthétase (Smith et Lands 1971). Contrairement à l'ASA, les autres AINS (indométhacine, ibuprofène) produisent une inhibition réversible de la COX en compétitionnant avec le substrat biologique (acide arachidonique) pour le site actif de l'enzyme (Vane et coll. 1990). L'inhibition des PG dans les différents tissus est probablement responsable de la grande variété d'effets pharmacologiques de l'ASA (Vane 1971).

L'ASA acétyle sélectivement le groupement hydroxyle d'un résidu de la sérine en position 530 dans la chaîne polypeptidique de la PGH synthétase plaquettaire prévenant ainsi

la conversion de l'acide arachidonique en PG et TXA₂ (Roth et Majerus 1975, Roth et coll. 1975, DeWitt et Smith 1988). Bien que l'ASA soit hautement spécifique pour la COX-1, une dose plus élevée pourra acétyler la sérine 516 de la COX-2 mais permettra néanmoins à l'enzyme de métaboliser l'acide arachidonique en 15-HETE (Meade et coll. 1993).

L'acétylation de la COX dépend des propriétés chimiques intrinsèques de l'ASA et de son affinité pour le site actif de l'enzyme (Roth et coll. 1983). Puisque la fraction acétyle de l'ASA est très réactive, elle est susceptible (à des concentrations millimolaires) de réagir avec plusieurs substrats non spécifiques comme des protéines, des lipides et des acides aminés (Pinckard et coll. 1968). Par contre, l'acétylation de la COX plaquettaire ne nécessite que des concentrations micromolaires (Roth et Majerus 1975, Roth et coll. 1975). Cette spécificité pour les plaquettes reflète l'affinité de l'ASA pour la Ser 530 présente à l'intérieur du site actif de la COX (Roth et coll. 1983). Le salicylate, le métabolite actif de l'ASA, est beaucoup moins puissant que sa molécule mère en terme d'inhibition de la COX-1 et -2 (Preston et coll. 1989, Vane et Botting 1996). Ceci explique son inefficacité sur la fonction plaquettaire (Vargaftig 1978).

Les plaquettes sont excessivement sensibles à l'ASA; une dose orale de 100 mg réduit la concentration plasmatique de TXB₂ (le métabolite stable de la TXA₂) de 98% 60 minutes après l'absorption du médicament (Patrono et coll. 1980, Patrignani et coll. 1982). L'inhibition de l'agrégation plaquettaire peut être apparente avant même qu'il n'y ait une concentration détectable d'ASA dans la circulation systémique. Administrée par voie orale, l'ASA subit un effet de premier passage important et les plaquettes qui circulent dans les capillaires hépatiques sont exposées à des concentrations très élevées d'ASA et inactivées

immédiatement (Pedersen et FitzGerald 1984). L'effet antiplaquettaire de l'ASA est donc indépendant de sa biodisponibilité systémique. De plus, les plaquettes, qui sont anuclées, ne peuvent synthétiser de protéines *de novo*. Ainsi, l'effet antiplaquettaire de l'ASA persiste pendant toute la vie des plaquettes (8 à 10 jours) et l'activité de la COX réapparaît lentement en fonction du renouvellement du pool de plaquettes (Burch et coll. 1978, Patrignani et coll. 1982). Ces observations expliquent pourquoi l'ASA, qui possède une demi-vie de 20 minutes, est un agent antiplaquettaire efficace même administrée une fois par jour.

L'inactivation irréversible de la COX plaquettaire résulte en l'inhibition de la synthèse de TXA₂. Celle-ci est libérée des plaquettes en réponse à une variété de stimuli (thrombine, collagène, ADP) et stimule l'agrégation plaquettaire (Hamberg et coll. 1975, FitzGerald 1991). Cependant, le pouvoir antithrombotique de l'ASA est limité par l'inhibition concomitante de la synthèse de PGI₂ endothéliale (Kelton et coll. 1978), un agent vasodilatateur et un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Moncada et coll. 1976, Moncada et Vane 1979). Dans des conditions *in vivo*, l'inhibition de la COX plaquettaire est environ 10 fois plus sensible à l'ASA que les autres types de cellules (Roth et Calverley 1994). Contrairement aux plaquettes, l'endothélium vasculaire peut resynthétiser la COX (Preston et coll. 1981). Ceci explique pourquoi l'inhibition de la PGI₂ nécessite des doses d'ASA beaucoup plus élevées que pour l'inhibition de la TXA₂ (Patrignani et coll. 1982). Néanmoins, un chevauchement existe entre ces deux effets et aucune dose d'ASA ne peut inhiber complètement la formation de TXA₂ sans affecter la production de PGI₂ (Mehta et coll. 1984). La sensibilité différentielle de la PGI₂/TXA₂ à l'ASA demeure toujours incertaine mais les hypothèses suivantes ont été proposées par Jaffe et Weksler (1979) soit, 1) la

capacité relative des cellules cibles à resynthétiser la cyclo-oxygénase, 2) l'exposition des cellules cibles à l'ASA dans la circulation hépatique vs la circulation systémique et 3) le rôle physiologique des prostanoïdes dans les cellules cibles.

Le maintien de l'équilibre $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ est primordial pour obtenir un effet antithrombotique optimal. Afin de maximiser l'inhibition de la TXA_2 et préserver la synthèse de PGI_2 , l'utilisation de la plus faible dose possible d'ASA est préconisée. Weksler et coll. (1983) ont démontré que de faibles doses d'ASA (40 à 80 mg) inhibaient l'agrégation plaquettaire et la synthèse de TXA_2 tout en maintenant la production de PGI_2 . Des résultats comparables ont été obtenus par Clarke et coll. (1991) avec 75 mg d'ASA à libération contrôlée. Cependant, aucun consensus n'a été atteint à l'égard de la dose optimale d'ASA à utiliser (Fuster et coll. 1993, Patrono 1994, Hirsh et coll. 1995). Il est à noter que des études récentes du groupe de Doutremepuich (1994, 1996, Lalanne et coll. 1992) ont démontré que des doses d'ASA aussi faibles que 334×10^{-11} mol/ml avaient un potentiel thrombogène. Ces auteurs ont suggéré que cet effet était dû à une réactivité endothéliale accrue mais ils n'ont pu définir, avec précision, aucun mécanisme d'action.

4.2.1.1.1 Sténose critique

Une sténose est un rétrécissement de la lumière d'un vaisseau en raison de la présence d'une plaque athéromateuse. Une sténose résiduelle significative est présente chez plus de 75% des patients ayant subi une thrombolyse (Van Lierde et coll. 1990), mais son rôle dans l'artère recanalisée demeure toujours incertain.

Sur le plan expérimental, il a été démontré que la sténose critique (réduction de la

lumière du vaisseau d'environ 70%) abolissait la réponse hyperémique mais sans modifier le débit de base (Gallagher et coll. 1978) et diminuait l'incidence d'hémorragies intramyocardiques et d'arythmies pendant la reperfusion (Lucchesi et coll. 1976). Les premières études avec des modèles canins d'ischémie-reperfusion myocardique indiquent que la présence d'une sténose critique n'a pas d'effet significatif sur la taille de l'infarctus (Lefkowitz et coll. 1988). Cependant, dans cette étude, la période de reperfusion n'était que de 4 heures, et puisque la progression de l'infarctus est toujours apparente entre la troisième et la sixième heure de reperfusion (de Lorgeril et coll. 1990), il est difficile de conclure à partir de ces résultats. A ce propos, Myears et coll. (1988) ont observé une augmentation de la taille de l'infarctus après 24 heures de reperfusion en présence d'une sténose critique. De même, les études de Schmidt et coll. (1986) ainsi que Wilson et coll. (1988) ont aussi démontré une augmentation de la nécrose. Cependant, ces deux dernières études ont utilisé une sténose hypercritique qui réduit le débit de base de respectivement 30 et 50%. Donc, l'augmentation de la taille de l'infarctus pourrait être due à la sévérité de la sténose et à une diminution du débit sanguin pendant la reperfusion. Schmidt et coll. (1986) n'ont pas mesuré le débit mais l'étude de Wilson et coll. (1988) a confirmé une réduction du débit endocardique dans la portion centrale de l'infarctus. Cette diminution du débit sanguin pourrait expliquer l'accroissement de l'étendue de la nécrose.

Un aspect important de la sténose critique est la possibilité d'une activation des éléments sanguins (plaquettes, neutrophiles, érythrocytes) lors de leur passage au site de sténose. Les études de Folts et coll. (1976, 1982) ont démontré que l'ASA était efficace pour prévenir les variations cycliques du débit qui sont le résultat de la formation de thrombi

plaquettaires au niveau de la sténose. Ce phénomène a été décrit à la section 2.3.2. Cependant, lorsque la sténose est plus prononcée, l'ASA s'avère beaucoup moins efficace pour neutraliser les variations du débit.

La présence d'une sténose critique sévère (réduction de la lumière du vaisseau > 70%) augmente les forces de cisaillement. Maalej et Folts (1996) ont déterminé que la réduction de la lumière du vaisseau de 80% augmentait les forces de cisaillement de 56% comparativement à une sténose de 70%. Dans leur modèle, l'ASA ne possède aucun pouvoir antithrombotique. Les forces de cisaillement sont un agoniste puissant de l'activation plaquettaire (Ruggeri 1993) via des mécanismes qui sont insensibles à l'ASA (Barstad et coll. 1996). De plus, l'altération des érythrocytes circulants peut favoriser la libération d'ADP et l'élévation de la concentration des catécholamines dans la circulation potentialise l'agrégation plaquettaire et renverse les effets antithrombotiques de doses thérapeutiques d'ASA (Folts et Rowe 1988, Larsson et coll. 1994, Goto et coll. 1996).

Les forces de cisaillement élevées au site de la sténose activent les plaquettes par des voies indépendantes de la COX. L'utilisation d'agents qui bloquent les récepteurs GPIIb-IIIa plaquettaires ou les récepteurs du facteur von Willebrand semblent être plus efficaces dans cette situation (Anderson et coll. 1994, Turner et coll. 1995, McGhie et coll. 1994). Les inhibiteurs des glycoprotéines membranaires GPIIb/IIIa des plaquettes seront discutés à la section 4.3.

4.2.1.2 Propriétés anti-inflammatoires

Les leucocytes polymorphonucléaires font partie intégrante de l'inflammation. Ceux-

ci migrent et s'accumulent aux foyers d'inflammation en réponse à un gradient de facteurs chimiotactiques libérés dans la circulation. Il est bien connu que l'ASA et les AINS possèdent une activité anti-inflammatoire en inhibant la synthèse des PG (Vane 1971). Cependant, des études expérimentales suggèrent que l'inhibition de l'activation des neutrophiles serait le principal mécanisme d'action des AINS (Altman 1990, Ip et coll. 1990). Les paragraphes suivants décriront les principales hypothèses de l'altération de la fonction des neutrophiles par l'ASA et les AINS. La fonction des neutrophiles a été décrite à la section 2.2.

L'ASA et les AINS modulent la fonction des leucocytes (Cronstein et coll. 1994, Hasçelik et coll. 1994), l'expression de molécules d'adhésion (Díaz-González et coll. 1995, González-Alvaro et coll. 1996) et le stress oxydatif (Kukreja et coll. 1986, Haynes et coll. 1993). Abramson et coll. (1991, 1994) ont suggéré que le salicylate et le piroxicam (un AINS) inhibent l'activation des neutrophiles en s'insérant dans la membrane plasmique. Ainsi, les AINS interfèrent avec des processus dépendants de protéines G nécessaires à la transduction des voies de signalisation pour l'activation des neutrophiles. Cronstein et coll. (1994) ont proposé que le salicylate (mais non les autres AINS) inhibent l'activation et l'adhésion des neutrophiles en favorisant l'hydrolyse de l'ATP, qui en retour, stimule la libération d'adénosine dans le milieu extracellulaire. L'activation des récepteurs de l'adénosine présents sur les neutrophiles induit le découplage de récepteurs pour les facteurs d'activation chimiotactiques (Cronstein et coll. 1990). Cependant, les mécanismes d'action sous-jacents demeurent toujours incertains.

Plusieurs études suggèrent la possibilité d'un effet direct des AINS sur les molécules d'adhésion au niveau des neutrophiles et de l'endothélium. A ce propos, Díaz-González

(1995) ainsi que González-Alvaro (1996) ont démontré que l'ASA et les AINS inhibaient l'adhésion des neutrophiles aux cellules ombilicales humaines en culture via un mécanisme qui favorise un décapage rapide de la molécule d'adhésion L-sélectine de la surface des neutrophiles. Aucun mécanisme n'a été précisé, mais une hypothèse plausible impliquerait l'inhibition du facteur de transcription nucléaire- κ B (FN- κ B). La translocation du FN- κ B mène à l'expression de gènes pro-inflammatoires dont ceux de la famille des molécules d'adhésion (Thanos et Maniatis 1995). Donc, les agents qui inhibent l'activation et la translocation du FN- κ B peuvent interférer avec plusieurs voies d'inflammation tant au niveau des leucocytes que des cellules endothéliales.

Des études récentes suggèrent que de fortes doses de salicylate inhibent l'activité du FN- κ B dans les cellules lymphoïdes (Kopp et Ghosh 1994). Dans les cellules endothéliales, l'ASA inhibe l'induction des molécules d'adhésion VCAM-1 et E-sélectine dépendante du FN- κ B (Weber et coll. 1995). Des résultats comparables ont été obtenus par Zhou et coll. (1996a) en démontrant que le tepoxalin (un inhibiteur de la COX et de la lipoxgénase) inhibait l'expression de CD11b/CD18 et de E-sélectine ainsi que la migration des neutrophiles vers les tissus inflammés. Pierce et coll. (1996) ont précisé le mécanisme d'action des AINS dans ce phénomène lorsqu'ils ont démontré que le salicylate inhibait la translocation du FN- κ B induite par le TNF- α en prévenant la phosphorylation et la dégradation subséquente de l'inhibiteur naturel du FN- κ B, le I κ B- α . Ceci résulte en une diminution des niveaux d'ARNm des molécules d'adhésion et, par conséquent, de l'expression du VCAM-1 et de l'ICAM-1. De plus fortes doses sont nécessaires pour inhiber l'expression de la E-sélectine (Pierce et coll. 1996). L'inhibition du facteur transcriptionnel

nucléaire- κ B semble une voie importante dans le potentiel anti-inflammatoire des AINS.

Les AINS possèdent aussi des propriétés antioxydantes. Encore ici, les mécanismes d'action ne sont pas bien définis. Les études de Kukreja et coll. (1986) ainsi que celles d'Armstead et coll. (1988) ont démontré que l'inhibition de la COX par l'ASA atténuait la production d'anions superoxyde et Umeki (1990) a suggéré un phénomène semblable au niveau des neutrophiles activés. Cet effet pourrait expliquer l'inhibition de la peroxydation lipidique observée par Wang et Walsh (1995) ainsi que Kirkova et coll. (1995). Selon Haynes et coll. (1993), l'ASA serait une pro-drogue qui libère du salicylate qui possède un pouvoir antioxydant. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par Kuhn et coll. (1995, 1996) chez des volontaires sains. Un autre mécanisme proposé par Shacter et coll. (1991) est l'inhibition de la formation d'acide hypochlorique, l'oxydant le plus puissant produit par les neutrophiles activés. Kettle et Winterbourn (1991) ont suggéré que les AINS favorisaient la formation du composé II (un intermédiaire inactif de la myéloperoxydase) incapable de catalyser la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion chlorure pour former l'acide hypochlorique.

Ces évidences expérimentales suggèrent donc que l'ASA agit à travers plusieurs voies qui sont indépendantes de la COX. L'inactivation de la fonction des neutrophiles peut s'avérer très pertinente dans le traitement des maladies des artères coronaires. D'autres études seront nécessaires pour préciser les mécanismes sous-jacents.

4.3 Inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa plaquettaire

La glycoprotéine IIb/IIIa plaquettaire est le principal médiateur de l'agrégation

plaquettaire. L'activation des plaquettes par différents agonistes favorise une modification de la conformation des plaquettes permettant ainsi la liaison du fibrinogène (ou du facteur vWF en présence de forces de cisaillement élevées) aux récepteurs GPIIb/IIIa. Contrairement à l'ASA, les inhibiteurs GPIIb/IIIa inhibent l'agrégation plaquettaire indépendamment de la voie d'activation (Phillips et coll. 1988, Kieffer et Phillips 1990).

GPIIb/IIIa est une molécule d'adhésion de la famille des intégrines (Jang et coll. 1994). Son récepteur est constitué d'une sous-unité α de 136-kd (Poncz et coll. 1987) et d'une sous-unité β de 92-kd présentant une chaîne polypeptidique simple, une courte queue cytoplasmique, une région transmembranaire et un domaine extracellulaire (Phillips et coll. 1988). Ces deux sous-unités sont liées entre elle par des liens non covalents et nécessite la présence du calcium pour maintenir la structure hétérodimérique (Fujimura et Phillips 1983). La GPIIb/IIIa est l'intégrine la plus abondante sur la surface des plaquettes avec approximativement 80000 récepteurs par cellules (Wagner et coll. 1996).

La liaison du fibrinogène aux récepteurs GPIIb/IIIa est responsable de l'agrégation plaquettaire (Parise et Phillips 1985), mais d'autres glycoprotéines se lient aussi à ces récepteurs comme la fibronectine, le facteur vWF et la vitronectine (Plow et coll. 1985). Ces ligands semblent jouer un rôle dans l'adhésion des plaquettes aux structures sous-endothéliales (Phillips et coll. 1988). L'interaction entre le facteur vWF et les GPIIb/IIIa est particulièrement importante dans l'agrégation plaquettaire en présence de grandes forces de cisaillements (Weiss et coll. 1989). Cet aspect a été décrit à la section 2.3.2.

La reconnaissance spécifique du récepteur GPIIb/IIIa est sous la dépendance de deux séquences peptidiques distinctes. La séquence Arg-Gly-Asp (RGD) a été identifiée en

premier sur la fibronectine (Pierschbacher et Ruoslahti 1984) mais elle est aussi présente sur le fibrinogène, le facteur vWF et la vitronectine (Lefkovits et coll. 1995), et elle est reconnue par plusieurs intégrines (D'Souza et coll. 1991). Il demeure toujours incertain si la séquence RGD est elle-même impliquée dans la liaison du fibrinogène aux récepteurs GPIIb/IIIa ou si elle mime un autre site de liaison à l'intérieur de la molécule de fibrinogène (Lefkovits et coll. 1995). Néanmoins, les peptides possédant la séquence RGD sont des inhibiteurs puissants de l'interaction entre les récepteurs GPIIb/IIIa et le fibrinogène (Plow et coll. 1987), et l'insertion du RGD dans des protéines confère à celles-ci des propriétés adhésives (Yamada et coll. 1993).

La séquence Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val présente sur la portion carboxyle terminale de la chaîne γ du fibrinogène est aussi impliquée dans la liaison aux GPIIb/IIIa (Kloczewiak et coll. 1983, 1984). Cette séquence n'est présente que sur la molécule de fibrinogène et elle est probablement le site prédominant de liaison aux récepteurs GPIIb/IIIa (Farrell et coll. 1992). Plow et coll. (1992) ont suggéré que la présence de ces deux séquences assurait la haute affinité du fibrinogène pour les récepteurs GPIIb/IIIa.

Sur le plan expérimental, l'utilisation d'antagonistes des GPIIb/IIIa prévient les variations cycliques du débit (Mousa et coll. 1996) et la réocclusion suite à la thrombolyse (Rote et coll. 1993, Roux et coll. 1993, Sudo et coll. 1995), et inhibe la génération de thrombine dépendante de l'activation du facteur tissulaire en présence de plaquettes (Reverter et coll. 1996). L'évaluation clinique des inhibiteurs des GPIIb/IIIa a démontrée que chez des patients souffrant d'angine instable, le lamifiban (un inhibiteur non peptidique du GPIIb/IIIa) atténuait l'incidence d'épisodes ischémiques récurrents ainsi que la mortalité à court terme

(Théroux et coll. 1996, Lefkovits et Topol 1996). De même, l'inhibition des récepteurs GPIIb/IIIa chez les patients ayant subi une angioplastie s'est avérée bénéfique (Topol 1995, Lefkovits et Topol 1996).

L'utilisation des inhibiteurs des récepteurs des GPIIb/IIIa semble prometteur pour contrer le rôle délétères des plaquettes dans les maladies des artères coronaires. Ces agents sont plus avantageux que l'ASA en ce sens qu'ils inhibent l'agrégation plaquettaire indépendamment de la nature de l'agoniste. Aucune étude n'a encore évalué le potentiel cardioprotecteur de ces agents dans le contexte d'ischémie-reperfusion.

4.4 Inhibition de la fonction plaquettaire et protection myocardique

Des études réalisées chez des patients décédés des suite d'un infarctus aigu du myocarde ont mis en évidence l'accumulation de plaquettes dans le territoire nécrosé. Contrairement aux neutrophiles, peu de travaux expérimentaux ont été effectués pour élucider l'implication des plaquettes dans la progression de l'infarctus pendant la reperfusion. Les résultats de ces études seront énoncés dans les paragraphes suivants.

Dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion, Jolly et coll. (1985) ainsi que Mullane et McGiff (1985) ont évalué le rôle des plaquettes sur la taille ultime de l'infarctus. Ces deux études ont démontré que la thrombocytopenie était inefficace pour réduire la taille de l'infarctus en cours de reperfusion. Ces auteurs ont donc conclu que les plaquettes ou des médiateurs d'origine plaquettaire n'influencaient pas la taille de l'infarctus dans ce type de modèle. En ce sens, Bednar et coll. (1985) ont démontré que la neutropénie inhibait l'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé suggérant que la séquestration de

plaquettes est un évènement secondaire qui se produit en réponse à l'accumulation de neutrophiles. Cependant, chez des lapins hypercholestérolémiques, Golino et coll. (1987) ont signalé une accumulation importante de plaquettes dans l'infarctus et que l'administration d'antisérum antiplaquettaire réduisait significativement la taille de l'infarctus. Par contre, l'administration du même antisérum chez des lapins normaux ne modifie pas la taille de l'infarctus. Ces résultats suggèrent que dans certaines conditions pathologiques, la présence des plaquettes entraîne un effet délétère sur le myocarde post-ischémique.

Bien que les plaquettes ne semblent pas contribuer à l'accroissement de la nécrose, Mullane et Fornabaio (1988) ont évalué le rôle de la TXA_2 , un médiateur d'origine plaquettaire, en administrant des inhibiteurs de la thromboxane synthétase (ITXS). Les résultats de cette étude démontrent que les ITXS réduisent la taille de l'infarctus impliquant ainsi la TXA_2 dans la physiopathologie de l'infarctus. Un point intéressant de l'étude de Mullane et Fornabaio (1998) concerne le fait que l'administration simultanée d'ITXS pendant la thrombocytopenie résulte dans la disparition de la cardioprotection précédemment observée. Donc, l'effet cardioprotecteur des ITXS nécessite la présence des plaquettes. De plus, l'administration d'ASA avec ou sans ITXS ne réduit pas la taille de l'infarctus. L'enzyme COX apparaît donc nécessaire à l'expression complète de la cardioprotection des ITXS. Des résultats comparables ont aussi été obtenus par Golino et coll. (1993a). L'effet cardioprotecteur des ITXS se ferait vraisemblablement par une redirection des endoperoxydes (PGG_2 et PGH_2) vers des métabolites cytoprotecteurs comme la PGD_2 , la PGE_2 et la PGI_2 (Mullane et Fornabaio 1988, Golino et coll. 1993a). La redirection de la synthèse de PG pourrait aussi être responsable de l'atténuation de la séquestration de

neutrophiles observée par Mullane et Fornabaio (1988). Les inhibiteurs des récepteurs de la TXA_2 se sont avérés aussi bénéfiques dans le contexte d'ischémie-reperfusion (Grover et Schumacher 1989) mais par des mécanismes d'action différents, car l'administration concomitante d'ASA ne modifie pas la cardioprotection observée (Grover et coll. 1991).

Les plaquettes ne semblent pas jouer un rôle important dans le contexte d'ischémie-reperfusion sauf s'il y a présence d'une sténose critique sur l'artère reperfusée. Dans ce cas, il est fort probable que la turbulence causée par la sténose active les plaquettes par des voies indépendantes de la COX avant même que celles-ci n'atteignent la zone nécrosée. L'importance des plaquettes dans l'accroissement de la taille de l'infarctus en présence d'une sténose critique est développée au chapitre 5.

Partie 2: Contributions originales

**Chapitre 5: Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion
in the presence of residual coronary stenosis in dogs**

**Chapitre 6: The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct
size at reperfusion in the dog**

**Chapitre 7: Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size
in the dog**

**Chapitre 8: Combination of aspirin with a low molecular weight heparin
at reperfusion does not reduce infarct size in the dog**

**Chapitre 9: GPIIb/IIIa receptor blockade at reperfusion reduces infarct
size in the dog**

Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs

Residual coronary stenosis is common after successful thrombolysis for acute infarction. We investigated the role of platelets and the influence of a residual critical stenosis during early reperfusion in survival of reperfused myocardium. The left anterior descending coronary artery was occluded for 90 minutes and reperfused for 6 hours in 5 groups of dogs, 3 with a residual critical stenosis (groups 1 through 3) and 2 without (groups 4 and 5). Thrombocytopenia was produced by an antiserum in groups 2, 3, and 5; group 3 was also made neutropenic by another antiserum. Platelets (groups 1 and 4) and neutrophils (groups 1, 2, 4, and 5) labeled with indium 111 were reinjected at occlusion. Collateral flow was estimated with radioactive microspheres and was statistically similar among groups. Infarct size (percentage of area at risk), revealed by triphenyltetrazolium, was more severe ($49.4\% \pm 4.0\%$; $p < 0.05$) with stenosis (group 1) than without stenosis (group 4: $29.5\% \pm 4.6\%$). Platelet depletion reduced infarct size in group 2 ($28.6\% \pm 6.3\%$; $p < 0.05$ vs group 1) with stenosis, but not in group 5 without stenosis ($24.5\% \pm 6.2\%$ vs group 4: $29.5\% \pm 4.6\%$). Neutropenia (group 3) did not decrease infarct size in thrombocytopenic dogs. Neutrophil accumulations in reperfused myocardium were similar among groups, but platelets accumulated in greater numbers in reperfused infarcts with stenosis (group 1: $338,581 \pm 52,857/\text{gm}$; $p < 0.05$) than without stenosis (group 4: $153,445 \pm 23,949/\text{gm}$). Therefore a critical stenosis at reperfusion compromises myocardial salvage and increases infarct size by means of a platelet-mediated mechanism. (AM HEART J 1993;125:1553.)

Guy Rousseau, MSc, Daniel Hébert, BSc, Danielle Libersan, MSc,
Ahmad Khalil, MD, Gilles St-Jean, BSc, and Jean-Gilles Latour, PhD
Montreal, Quebec, Canada

Reperfusion of ischemic myocardium after thrombolytic therapy salvages jeopardized myocardium, improves ventricular function, and increases survival.¹⁻³ However, residual coronary stenosis still persists in >75% of the patients with successful thrombolysis,⁴ and the influence of thrombolysis on survival of jeopardized reperfused myocardium is not known. Animal models of myocardial ischemia and reperfusion often include a critical stenosis during reperfusion to limit myocardial hemorrhage and ar-

rhythmias, but it is usually left in place for short periods of time during reperfusion.^{5,6} Whether a residual stenosis reduces salvage of myocardium by reperfusion after a brief ischemia or compromises the benefits of therapeutic interventions aimed at limiting infarct size is not clinically nor experimentally known. So far, animal studies have led to conflicting results,^{7,8} but with prolonged reperfusion the extent of infarction appears to be greater in the presence of a residual stenosis. Blood perfusion in the post-ischemic territory may be altered by residual critical coronary stenosis in a way similar to that of a hypercritical stenosis, which otherwise produces larger experimental infarcts.^{9,10}

It has been assumed that platelets play no major role in reperfusion injury occurring in the absence of a sustained critical stenosis during reperfusion.^{6,11,12} However, platelet activation occurring at a severe coronary stenosis is responsible for cyclic coronary flow variations¹³ and could initiate platelet aggregation in the reperfused microvasculature. Para-

From the Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute and the Department of Pathology, University of Montreal. Guy Rousseau is a bursar of the Canadian Heart Foundation. Supported by grants from the Quebec Heart Foundation and the Montreal Heart Institute Research Foundation.

Received for publication October 20, 1992; accepted for publication December 1, 1992.

Reprint requests: Jean-Gilles Latour, PhD, Experimental Pathology Laboratory, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. East, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8.

Copyright © 1993 by Mosby-Year Book, Inc.
0002-8703/93/\$1.00 + .10 4/1/45422

doxically, the effects of such a coronary stenosis on platelet embolization and accumulation in the post-ischemic reperfused myocardium is unknown. Neutrophils play a key role in myocardial reperfusion injury¹⁴ by releasing cytotoxic and vasoactive materials¹⁵; platelet-leukocyte interactions¹⁶⁻¹⁸ may exacerbate neutrophil mobilization, activation and production of free oxygen radicals¹⁹ and leukotrienes²⁰ and permit new active metabolites of arachidonic acid to be formed.²¹ Also, platelet-released products (serotonin, thromboxane A₂, etc.) may further interact with neutrophils and microvascular reperfusion. Our study investigates the influence of a critical stenosis and the role of platelets on infarct size and postischemic myocardial injury.

METHODS

Ischemia and reperfusion. Our study adhered to the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Care and was approved by a local committee. Mongrel dogs of either sex weighing 18 to 30 kg were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg intravenously), intubated, and ventilated mechanically with room air. Catheters were placed in the femoral vein and artery. Lead II electrocardiogram was monitored continuously. After pancuronium bromide (0.1 mg/kg) was injected, a left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the heart suspended in a pericardial cradle. Catheters were introduced into the left ventricle through the left atrial appendage for pressure monitoring and into the left atrium for microsphere injection and blood sampling. The left anterior descending (LAD) coronary artery was isolated distal to the first diagonal branch and an electromagnetic flow probe fitted to measure coronary flow. Five minutes before occlusion a micrometer occluder was adjusted in allocated groups to produce a critical coronary stenosis abolishing the hyperemic response after release of a 10-second occlusion without changing basal blood flow in the coronary. The LAD coronary artery was then occluded for 90 minutes in all dogs and followed by reperfusion for 6 hours in the presence (groups 1 through 3), or absence (groups 4 and 5) of a critical stenosis. At the time of reperfusion in groups without a critical stenosis, blood flow was gradually and completely restored over 30 minutes to avoid reactive hyperemia. Dogs with ventricular fibrillation were excluded.

Experimental design. Animals were allocated at random into one of the five groups the day before the experiment. A control group (group 1) was reperfused in the presence of critical stenosis. Group 2 was made thrombocytopenic by injection of a rabbit antiserum

after the induction of the anesthesia. Group 3 was made thrombocytopenic and neutropenic by injecting a combination of platelet and neutrophil antisera. A critical stenosis was left in place throughout reperfusion in groups 2 and 3. Group 4 was another control group, with reperfusion made in absence of a critical stenosis. Group 5 was made thrombocytopenic in the same way as group 2, but was reperfused in the absence of a critical stenosis. Groups 1 and 4 were divided evenly into two subgroups: autologous neutrophils were labeled with indium 111 in one and platelets in the other to investigate the effect of a critical stenosis on platelet and neutrophil accumulations in reperfused myocardium.

Platelets isolation and ¹¹¹In-labeling. After anesthesia in groups 1 and 4, two samples of blood (34 and 18 ml) were drawn from a femoral vein into 6 ml of acid-citrate dextrose and 2 ml in sodium citrate, respectively. After centrifugation (10 min, 225g), 10 ml of platelet-rich plasma was added to 10 ml of a tyrode solution and recentrifuged (10 min, 1000g). The platelet pellet was then washed four times with tyrode solution before incubation for 1 minute at 37° C with 500 μCi ¹¹¹In-oxine (Amersham, Oakville, Ontario, Canada). Platelet-poor supernatant (18 ml) was then added to bind free ¹¹¹In-oxine and was discarded by centrifugation. The platelets were finally resuspended in 5 ml of citrated platelet-poor plasma. A small sample (0.5 ml) was kept to prepare standards and to test aggregation; the remaining was injected intravenously 5 minutes after coronary occlusion.

After the injection blood was collected at different times to study ¹¹¹In-platelet kinetics in the circulation and the circulating pool. The equation used was platelet pool = No. of platelets in RS × (BS - PS) × 75 × BW kg × radioactivity counts of the standard,⁻¹ where RS is Reference standard, BS is the blood sample (1 ml) count, PS is the plasma sample count, and BW is body weight. Blood volume was assumed to be 75 ml/kg of body weight.²²

Isolation and ¹¹¹In-labeling of neutrophils. Methods used to isolate and label neutrophils have been described in detail elsewhere.²³ Briefly, after anesthesia in groups 1, 2, 4, and 5, two samples of blood (42.5 and 20 ml) were drawn from the femoral vein into 7.5 ml of acid-citrate dextrose and 400 U of heparin, respectively. After sedimentation in dextran 4% the leukocyte-rich plasma was washed with Hanks' balanced salt solution (HBSS) and the cells suspended in HBSS containing bovine albumin 1%. After centrifugation on double-layer Percoll (Pharmacia Canada, Montreal, Quebec, Canada) gradients (1.072 and 1.087 gm/ml), the neutrophils were col-

lected at the interface of the two layers, washed with HBSS, and incubated for 1 minute at 37° C with 500 μ Ci 111 In-oxine. Platelet-poor plasma prepared from the heparinized blood was added to eliminate free 111 In-oxine and the autologous-labeled neutrophils resuspended in 5 ml of citrated platelet-poor plasma. A 300 μ l sample was saved for reference standards, and the remaining sample was injected intravenously 5 minutes after coronary occlusion. Blood samplings and calculations for determination of circulating 111 In-neutrophil pool were similar as for platelets as described earlier.

Platelet depletion. Rabbit antiserum was prepared as follows. Four samples (60 ml) of venous blood from four different dogs were collected in 9 ml of acid-citrate dextrose. After centrifugation (10 minutes, 225g), the platelet-rich plasma was collected and pooled. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 1 ml, 1.6% in sodium chloride 0.66% and dextrose 1%) was added to the platelet-rich plasma and centrifuged (18 minutes, 1000g). After discarding the platelet-poor plasma the platelets were washed with 10 ml of pH 5.5 calcium-free Tyrode's solution (sodium chloride 0.8%, potassium chloride 0.02%, sodium bicarbonate 0.1%, sodium acid phosphate 0.005%) containing 0.2% EDTA. Platelets were recovered after centrifugation (1000g, 10 minutes) and washed a second time with the Tyrode's solution free of EDTA. The platelets were recovered by centrifugation and resuspended in 4 ml of HBSS. The suspension was then layered over a continuous Percoll gradient, centrifuged (250g, 15 minutes), recovered, and washed twice with HBSS. The platelet-pure suspension was then homogenized in complete Freund's adjuvant and injected intradermally in rabbits on two occasions at an interval of 10 days. Each rabbit received 3×10^9 platelets on first immunization and 3×10^8 platelets on second immunization. Ten days later the rabbits were bled and the antiserum inactivated by heating at 56° C for 40 minutes. On the day the experiment was performed, after initial blood cell counting, 4 ml of antiserum was injected intravenously at the time of anesthesia and 1 ml 30 minutes later if necessary.

Neutrophil depletion. Dog neutrophil rabbit antiserum was prepared as previously described.²³ The neutrophil suspensions were collected by peritoneal lavage 18 hours after injecting 500 ml sterile casein solution (6%). The suspension was washed and resuspended in HBSS and layered over Percoll as described earlier. After centrifugation (30 minutes, 900g), the neutrophils were collected at the interface and washed twice. Neutrophils were then homogenized in complete Freund's adjuvant and injected

intradermally on two occasions at an interval of 10 days. Each rabbit received 1×10^8 neutrophils on first immunization and 1×10^7 on second immunization. Ten days later the rabbits were bled and the antiserum inactivated at 56° C for 40 minutes. After an initial blood cell count, the antiserum was injected intravenously, 4 ml at the time of anesthesia and 2 ml 1 hour later. Thereafter 1 ml of antiserum was given every 30 minutes for the duration of the study.

Infarct sizing. At 6 hours of reperfusion, heparin (10,000 U) was injected intravenously and the animals killed with an overdose of sodium pentobarbital. The heart was rapidly excised and infarct size quantified, as reported previously. Cannulation of the LAD at the site of the occlusion and cannulation of the aorta above the coronary ostia was followed by perfusion at both regions with cold saline solution (0.9%) for 5 minutes. Subsequently, the aorta was perfused with Evans blue (0.5%) dye and the LAD with saline solution (0.9%) at a constant pressure of 100 mm Hg for 5 minutes. The left heart was then embedded in polyurethane foam (MIA Chemicals, Montreal, Quebec, Canada) and cut with a commercial meat slicer in 7 mm thick transverse slices. The slices were immersed in triphenyltetrazolium chloride (TTC) 1.5% in TRIS buffer (2.4%, pH 7.8) for 10 minutes at 37° C. The normally perfused myocardium (Evans blue positive), the area at risk (Evans blue negative), and the necrotic myocardium (Evans blue negative and TTC negative) were measured by planimetry on each slice. The area at risk was expressed as a percentage of the left ventricle, and the infarct size related to both the left ventricle and the area at risk.

Platelet and neutrophil quantifications. Infarcted and noninfarcted myocardium were dissected and samples weighed and counted in a gamma counter for 5 minutes. Samples were also taken from the normal nonischemic myocardium of the opposite free wall. After correction for the background and spillover of other radioactive isotopes, the labeled-cell counts were calculated by reporting values over that of the standards and estimated per gram of tissue in each region.

Measurement of collateral myocardial blood flow. Collateral blood flow was measured after 15 minutes of coronary occlusion with 15 μ m diameter microspheres labeled with scandium 46 or gadolinium 53 (Dupont Canada, Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Approximately 3 to 4 million microspheres adequately dispersed in a 1 ml suspending medium containing 0.01% Tween 80 were injected into the left atrium over 20 seconds and simultaneously flushed with 20 ml of saline solution. A reference arterial

Table I. Animal studies and exclusions

Groups	Treatment	Critical stenosis	Total	Ventricular fibrillation			Technical and surgical problems	Dogs included
				Occlusion	Reperfusion	Nonischemic		
1	Control	+	34	6	4	5	2	17
2	Thrombocytopenia	+	31	6	10	5	2	8
3	Thrombocytopenia + neutropenia	+	28	2	5	3	7	11
4	Control	-	34	4	8	5	1	16
5	Thrombocytopenia	-	13	1	2	2	2	6
TOTAL			140	19	29	20	14	58

blood flow sample was collected from the aortic catheter at a constant rate for 150 seconds starting 15 seconds before microsphere injection. For regional myocardial blood flow analysis the two central slices of the left ventricle were divided into nonischemic and ischemic regions. The nonischemic area was selected from the wall opposite the area at risk. Sections from the central ischemic and nonischemic reference zones were divided into three equal subepicardial, midwall, and subendocardial portions, weighed, and counted in a gamma counter at selected energy windows. After correction for background and spilling by ^{111}In , regional myocardial blood flow was calculated and expressed in milliliters per minute per gram of tissue. The following equation was used for blood flow calculations: $Q_m = Q_r \times C_m / C_r$ where Q_m is myocardial blood flow (milliliters per minute), Q_r is reference blood flow (milliliters per minute), C_m is counts per minute in the myocardial sample, and C_r is counts per minute in the reference sample.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. A one-way analysis of variance was used to investigate treatment differences. A Newman-Keuls test was then used to compare mean differences between treated and corresponding control groups. Hemodynamic and hematologic intragroup comparisons were analyzed by a one-way analysis of variance for repeated measures. A covariance analysis between infarct size (dependent variable) and collateral flow (covariate) was done to control the variability in infarct size as a result of collateral flow among groups. A χ^2 test was applied to the incidence of ventricular fibrillation. The critical t value for group comparisons of labeled-neutrophil and platelet counts between infarcted, salvaged, and normal myocardium was chosen at $N_1 + N_2 - 3$ degree of freedom to account for the slope estimated for covariate (circulating ^{111}In -neutrophil and platelet counts at the onset of reperfusion) adjustment. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Group characteristics. One hundred forty dogs underwent surgery. Details for each group are summarized in Table I. Forty-eight dogs were lost because of ventricular fibrillation and 14 were lost to surgical and technical complications. Ventricular fibrillation occurred at <20 minutes of occlusion or within the first hour of reperfusion; the incidences at occlusion and reperfusion were statistically similar among groups. Significant ischemia did not develop in 20 dogs with subendocardial collateral blood flow >0.15 ml/min/gm, and those dogs were excluded from the analysis. Thus 58 dogs were included in this study.

Hematologic and hemodynamic data are presented in Table II. Body weight and hematologic data obtained before anesthesia were similar between groups. Before occlusion and during experimentation, heart rate, peak systolic pressure, pressure-rate product, and LAD coronary flow were similar among the groups except for control group 4, which had a lower peak systolic pressure than control group 1 at hour 6 of reperfusion, and thrombocytopenic group 5, which had a lower systolic pressure than control group 4 after 3 and 6 hours of reperfusion.

Intragroup comparisons indicate significant reduction of pressure-rate product in control group 1 in the course of reperfusion. A similar pattern was observed in control group 4, in addition to a reduction in heart rate. In control groups 1 and 4, LAD flow decreased after 3 and 6 hours of reperfusion. Thrombocytopenic and neutropenic group 3 had higher peak systolic pressure at occlusion and early reperfusion, but no differences were seen after 3 and 6 hours of reperfusion. Finally, systolic pressure at 3 and 6 hours of reperfusion was reduced in thrombocytopenic group 5. Details of the hemodynamic variations are presented in Table II.

Infarct size and collateral flow. The myocardial area at risk was identical between groups and involved approximately 40% of the left ventricle (Tables III

Table II. Group characteristics and hemodynamic data

	Group 1: Control	Group 2: Thrombocytopenia	Group 3: Thrombocytopenia + neutropenia	Group 4: Control	Group 5: Thrombocytopenia
Stenosis	+	+	+	—	—
n	17	8	11	16	6
¹¹¹ In-platelets	5	—	—	6	—
¹¹¹ In-neutrophils	10	7	—	7	6
Weight	23.8 ± 0.9	22.5 ± 1.0	20.6 ± 0.4	22.8 ± 0.8	21.9 ± 1.3
Hematocrit	46.4 ± 1.1	44.3 ± 2.2	47.6 ± 1.3	48.8 ± 1.2	45.1 ± 1.7
Hemoglobin	16.1 ± 0.4	15.3 ± 0.7	16.8 ± 0.5	16.9 ± 0.4	15.4 ± 0.7
Platelets	323 ± 22	354 ± 36	284 ± 12	321 ± 30	365 ± 34
Leukocytes	12.4 ± 0.7	12.7 ± 1.3	12.5 ± 0.9	13.5 ± 0.7	12.7 ± 1.3
Hemodynamic data before occlusion					
Heart rate	153.4 ± 5.3	156.3 ± 4.4	163.1 ± 5.0	164.4 ± 5.6	166.2 ± 11.9
LV systolic pressure	131.2 ± 4.8	115.4 ± 7.6	119.9 ± 4.1	128.6 ± 3.7	117.0 ± 10.6
Pressure-rate product	202.9 ± 12.2	179.9 ± 12.4	195.6 ± 9.0	211.4 ± 9.5	198.5 ± 30.4
LAD flow	29.9 ± 2.4	18.9 ± 1.6	20.8 ± 2.6	27.2 ± 4.7	15.3 ± 1.6
90-minute occlusion					
Heart rate	145.9 ± 6.9	159.3 ± 4.4	153.4 ± 3.9	157.6 ± 5.3	151.3 ± 6.7
LV systolic pressure	129.2 ± 5.2	130.9 ± 6.3	133.6 ± 2.9*	119.5 ± 3.1	104.7 ± 9.3
Pressure-rate product	190.3 ± 13.7	207.9 ± 10.4	205.2 ± 7.4	188.3 ± 7.9*	159.6 ± 17.7
1 hour of reperfusion					
Heart rate	141.6 ± 6.1	151.0 ± 5.3	150.5 ± 5.2	152.8 ± 4.4*	161.7 ± 9.1
LV systolic pressure	125.6 ± 5.2	120.9 ± 6.1	135.4 ± 4.0*	123.8 ± 1.9	115.0 ± 12.3
Pressure-rate product	178.7 ± 11.9*	182.4 ± 11.6	205.1 ± 11.8	189.4 ± 7.1*	189.1 ± 27.4
LAD flow	27.4 ± 3.1	20.6 ± 1.0	21.8 ± 4.0	32.9 ± 4.3*	17.8 ± 0.9
3 hours of reperfusion					
Heart rate	138.9 ± 5.8*	148.5 ± 10.7	150.9 ± 7.1	148.1 ± 4.2*	153.0 ± 7.8
LV systolic pressure	124.2 ± 3.3	119.3 ± 3.2	125.4 ± 4.7	120.3 ± 3.4	99.7 ± 6.6‡
Pressure-rate product	171.4 ± 9.1*	178.2 ± 15.8	191.5 ± 14.4	178.2 ± 7.8*	150.6 ± 6.7
LAD flow	21.0 ± 1.9*	17.6 ± 1.9	17.5 ± 2.1	20.4 ± 3.0*	12.5 ± 1.5
6 hours of reperfusion					
Heart rate	141.9 ± 6.6	151.6 ± 12.2	140.8 ± 8.4*	146.2 ± 7.4*	158.1 ± 10.0
LV systolic pressure	123.9 ± 4.6	110.5 ± 4.1	122.0 ± 5.2	106.5 ± 3.1*†	85.0 ± 6.8*‡
Pressure-rate product	174.0 ± 8.7*	167.4 ± 14.9	179.9 ± 15.4	159.6 ± 10.3*	132.1 ± 8.1*
LAD flow	19.2 ± 1.4*	17.6 ± 1.8	15.0 ± 2.4	19.6 ± 2.8*	12.0 ± 0.9

*p < 0.05 vs before occlusion.

†p < 0.05 vs control group with stenosis (group 1).

‡p < 0.05 vs control group without stenosis (group 4).

and IV; Fig. 1). Infarct size as a percentage of the area at risk showed a marked reduction, averaging 40% in groups 2, 3, and 4 as compared with control group 1. There was no statistical difference between groups 4 and 5. Transmural collateral flow was similar in the five groups and averaged 0.11 ml/min/gm. In the nonischemic region transmural blood flow was also statistically similar among the five groups in spite of the trend for lower values in thrombocytopenic animals (groups 2 and 5).

Analysis of covariance confirmed that infarct size in control group 1 with a critical stenosis is greater (p < 0.05) than that of corresponding animals made thrombocytopenic (group 2), thrombocytopenic and neutropenic (group 3), and from group 4 reperfused without residual critical stenosis. However, in ab-

sence of critical stenosis, thrombocytopenic group 5 had infarct size similar to matching control group 4. Fig. 1 illustrates the correlation between infarct size and transmural collateral blood flow between experimental groups.

Neutrophil and platelet accumulations. As we reported previously,²³ myocardial neutrophil counts correlated with the number of labeled cells circulating at onset of reperfusion (r = 0.77; p < 0.0001), permitting the use of the mean circulating cell count at onset of reperfusion calculated by pooling data from groups 1, 2, 4, and 5 (10.8 ± 1.8 × 10⁶), to normalize labeled cell counts in myocardial tissue, for each dog. Normalized neutrophil accumulations in the different groups and regions of the left ventricle are presented in Fig. 2.

Table III. Myocardial area at risk, infarct size, and transmural collateral blood flow

Groups	n	Area at risk (% of left ventricle)	Infarct size (% of area at risk)	Transmural collateral blood flow (ml/min/gm)
1 Control	17 (5)	39.7 ± 1.1 (40.5 ± 1.4)	49.4 ± 4.0 (53.8 ± 2.6)	0.092 ± 0.012 (0.069 ± 0.020)
2 Thrombocytopenia	8	41.6 ± 1.7	28.6 ± 6.3*	0.113 ± 0.025
3 Thrombocytopenia + neutropenia	11	37.8 ± 1.8	28.4 ± 6.0*	0.113 ± 0.024
4 Control	16 (6)	40.9 ± 1.9 (40.2 ± 3.3)	29.5 ± 4.6* (27.6 ± 8.5)	0.113 ± 0.021 (0.108 ± 0.043)
5 Thrombocytopenia	6	37.9 ± 2.4	24.5 ± 6.2	0.123 ± 0.034

Values in brackets represent dogs with ¹¹¹In-platelets.

*p < 0.05 vs group 1.

Table IV. Collateral and regional myocardial blood flow (ml/min/gm)

Groups	1	2	3	4	5
Ischemic region					
Endocardium	0.057 ± 0.010	0.069 ± 0.020	0.076 ± 0.017	0.061 ± 0.012	0.065 ± 0.018
Mesocardium	0.072 ± 0.010	0.087 ± 0.021	0.091 ± 0.020	0.086 ± 0.017	0.101 ± 0.027
Epicardium	0.145 ± 0.023	0.185 ± 0.040	0.172 ± 0.036	0.191 ± 0.039	0.203 ± 0.065
Transmural	0.092 ± 0.012	0.113 ± 0.025	0.113 ± 0.024	0.113 ± 0.021	0.123 ± 0.034
Nonischemic					
Endocardium	1.424 ± 0.106	0.969 ± 0.140	1.247 ± 0.179	1.290 ± 0.130	0.748 ± 0.099
Mesocardium	1.380 ± 0.074	0.944 ± 0.138	1.252 ± 0.184	1.233 ± 0.137	0.794 ± 0.160
Epicardium	1.268 ± 0.080	0.864 ± 0.118	1.111 ± 0.157	1.045 ± 0.113	0.807 ± 0.124
Transmural	1.357 ± 0.082	0.926 ± 0.128	1.203 ± 0.171	1.189 ± 0.124	0.783 ± 0.126

¹¹¹In-neutrophil tissue accumulations were higher in the thrombocytopenic groups as compared with that of control groups, but differences were not statistically significant. The salvaged tissue in the area at risk and the normal myocardium contained low counts of labeled neutrophils as compared with the infarcted area in all groups ($p < 0.05$). As we observed previously with neutrophil counts, numbers of circulating platelets at onset of reperfusion correlated with accumulating counts in the myocardium ($r = 0.71$, $p < 0.025$). Therefore the mean circulating platelet counts just before reperfusion were calculated by pooling data from control groups 1 and 4 ($1.045 \pm 0.148 \times 10^9$ platelets) and used as described earlier to normalize myocardial tissue counts between each dog.

Platelet accumulations in the infarcts of controls (group 1) with stenosis (Fig. 3) exceeded that seen in group 4 without stenosis ($338,581 \pm 52,857$ vs $153,445 \pm 23,949$ /gm; $p < 0.05$). Values in salvaged myocardium in group 4 were also less smaller than those in control group 1, but differences were not statistically significant ($77,872 \pm 14,240$ vs $43,669 \pm 8,567$ /gm; $p = 0.061$). Because ¹¹¹In-platelet counts in normal myocardium tended to be greater in group 1 as compared with group 4 ($77,257 \pm 17,211$ vs $22,142 \pm 3,573$ /gm; $p = 0.007$), values obtained in the normal myocardium were deducted from that of

the corresponding measures in the infarcted and salvaged areas for each dog; yet ¹¹¹In-platelet counts were significantly higher ($131,303 \pm 23,901$ vs $261,324 \pm 46,645$ /gm; $p = 0.028$) in dogs reperfusing with stenosis (group 1) than without a critical stenosis (group 4).

Neutrophil and platelet blood counts. The platelet antiserum produced severe platelet depletion (90%, $p < 0.05$) without altering circulating neutrophil counts (Figs. 4 and 5). Platelet counts remained <20% normal throughout the reperfusion period. The groups not given antiserum had statistically similar and stable platelet counts during the whole study that differed statistically from thrombocytopenic groups ($p < 0.05$). The neutrophil antiserum produced an 85% ($p < 0.05$) reduction in circulating neutrophils that was maintained throughout reperfusion. Apart from neutropenics, remaining groups had statistically similar circulating neutrophil counts during the study. Neutrophils were slightly depressed after anesthesia and surgery in all groups, but they gradually recovered during reperfusion in normal dogs.

DISCUSSION

Despite the high frequency of residual stenoses after successful thrombolytic therapy for acute myocardial infarction, little is known about their influ-

ence on infarct size during reperfusion. If experimental studies are consistent regarding the observation that hypercritical stenosis reduces delivery of blood to the reperfused territory and increases infarct size,^{9,10} studies with a residual critical stenosis on reperfusion injury and ultimate infarct size have led to conflicting results.^{7,8}

We found that reperfusing with a critical stenosis for 6 hours compromises myocardial salvage and results in a significant increment of infarct size. These results contrast with those of Lefkowitz et al.,⁷ who failed to document an increase of infarct size with a similar stenosis. Discrepancies between the two studies may arise from limitation of reperfusion to only 4 hours in the latter study because experiments have demonstrated that infarcts double their size between the 3rd and 6th hour of reperfusion before they stabilize.²⁴ Therefore the use of a reperfusion time of <6 hours does not permit a full estimate of the myocardial damage occurring at reperfusion after a brief period of ischemia, including that associated with presence of a critical stenosis. This conclusion is further supported by Myears et al.,⁸ who observed greater infarcts in dogs reperfused for 24 hours with a residual critical stenosis.

Another factor that may have helped to discriminate the detrimental effects of the stenosis on infarct size is our approach to restoring flow over a 30-minute period to avoid excessive hyperemia in groups reperfusing without residual stenosis. In previous studies^{7,8} flow was restored abruptly by removing the stenosis. Controlled myocardial reperfusion is known to limit the postischemic damage and infarct size that occur with sudden complete revascularization.²⁵⁻²⁷ Also, controlled reperfusion may have some clinical relevance in the setting of coronary thrombolytic therapy, with thrombolysis proceeding gradually over time.

Our results indicate that platelets mediate the myocardial damage associated with the presence of a residual stenosis during reperfusion. Platelet accumulation in the reperfused myocardium is increased by critical stenosis, and thrombocytopenia that was otherwise ineffective to limit infarct size in the group without stenosis reduced infarct size in the stenosis group to that observed in dogs without residual stenosis. Thus the increased platelet accumulation associated with the stenosis is apparently deleterious to reperfused myocardium and results either from more extensive vascular damage or platelet activation associated with presence of the stenosis. Also, these results indicate that platelets are involved at the time of reperfusion and not during ischemia. On the other hand, our observation that thrombocytopenia

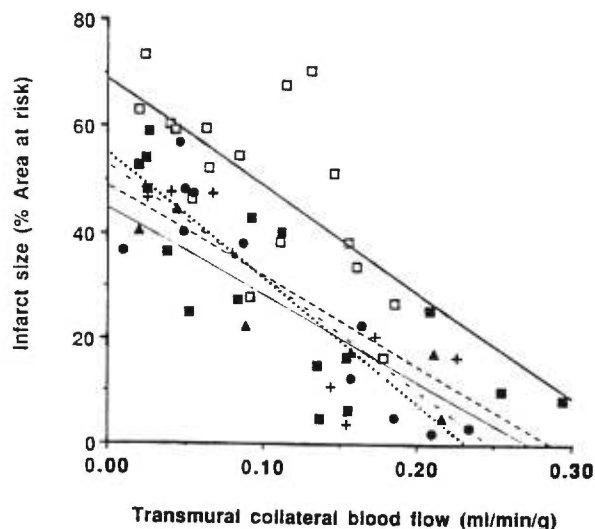


Fig. 1. Relationship between infarct size (percentage of area at risk) and transmural collateral blood flow in control group 1 with stenosis (\square ; —, $r = 0.66$), thrombocytopenic group 2 with stenosis (+; ---, $r = 0.84$), thrombocytopenic and neutropenic group 3 with stenosis (\bullet ; ..., $r = 0.92$), control group 4 without stenosis (\blacksquare ; - · - ·, $r = 0.78$), and thrombocytopenic group 5 without stenosis (\blacktriangle ; —, $r = 0.92$). Analysis of covariance confirms that infarct size is smaller in groups 2, 3, and 4 as compared with group 1. Groups 4 and 5 are statistically similar.

has failed to reduce infarct size in dogs reperfusing without sustained presence of a stenosis is in agreement with published reports.^{6,11,12} However, our results raise an important issue concerning the pharmacologic studies aimed at limiting infarct size and reperfusion injury and that use experimental models with or without a critical stenosis for variable periods of time. Possibly presence or absence of a critical stenosis may have influenced their outcome and conclusions.

It is not clear why platelets influence infarct size only when a stenosis is present, but platelet activation with secondary release of platelet products and aggregation at the critical stenosis^{28,29} could explain the phenomenon. The link between activated platelets and development of myocardial damage has been previously demonstrated by Golino et al.,³⁰ who used cholesterol feeding in rabbits to increase platelet sensitivity³¹ before coronary occlusion and reperfusion. Hypercholesterolemic animals developed larger infarcts than normal controls, and thrombocytopenia totally prevented the increment in infarct size produced by the diet. Formation of platelet aggregates and the release of vasoactive agents such as thromboxane A₂ (TxA₂) and serotonin by platelets could compromise reperfusion, exacerbate ischemia and

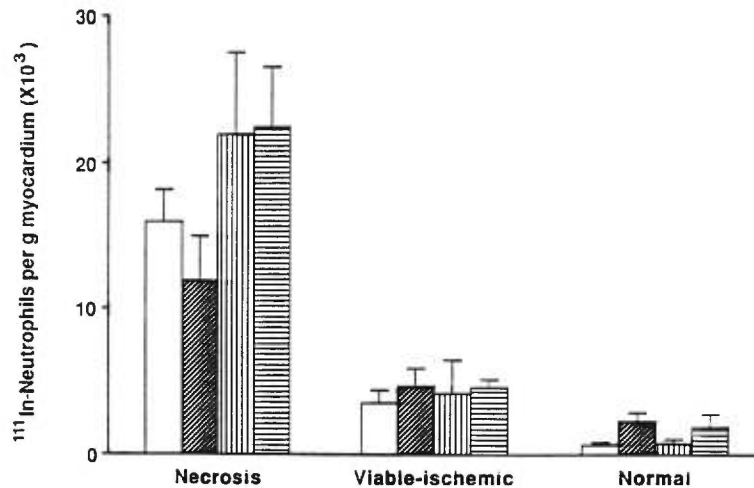


Fig. 2. ^{111}In -neutrophil accumulation per gram of infarcted, salvaged viable-ischemic and normal nonischemic myocardium in control group 1 with stenosis (\square), thrombocytopenic group 2 with stenosis (\square), control group 4 without stenosis (\square), and thrombocytopenic group 5 without stenosis (\square). Neutrophil accumulations were statistically similar between groups; neutrophils were localized mainly ($p < 0.05$) in infarct as compared with viable-ischemic and normal myocardium in each group.

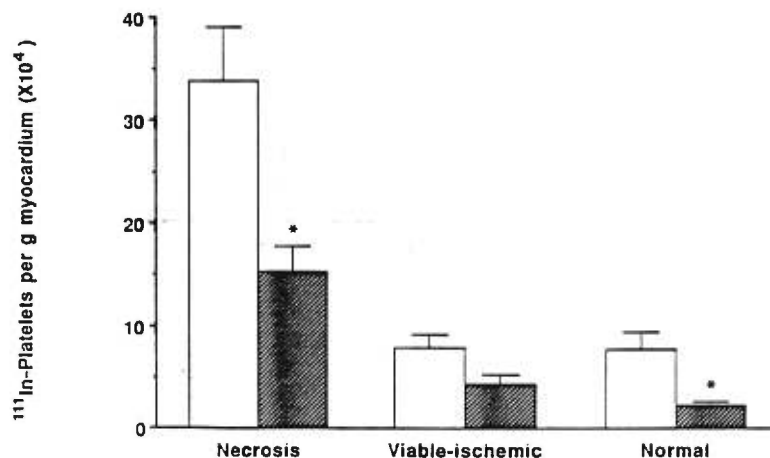


Fig. 3. ^{111}In -platelet accumulation per gram of infarcted, salvaged viable-ischemic and normal nonischemic myocardium in control group 1 with stenosis (\square) and control group 4 without stenosis (\square). Accumulation in group 1 was greater ($*p < 0.05$) as compared with group 4 for each region. Accumulation predominates ($p < 0.05$) in infarct as compared with viable-ischemic and normal myocardium in both groups.

no-reflow,^{29,32} and jeopardize survival of reperfused myocardium. Also, these platelet products could mediate vessel reocclusion as seen after successful thrombolysis.³² Involvement of TxA_2 in reperfusion injury is suggested by reduction of infarct size by TxA_2 -receptor antagonists.³³⁻³⁴ However, limitation of infarct size by thromboxane synthetase inhibitors¹² likely involves the recycling of platelet endoperoxides into prostacyclin by endothelium. Administration of prostacyclin (PgI_2) analog is known to limit infarct size by interfering with neutrophil

adhesion and activation in the reperfused myocardium.³⁵

There is a growing body of evidence that platelets and neutrophils interact in many ways and that some of these interactions could be deleterious for jeopardized myocardium. Exchange of eicosanoids between platelets and neutrophils is well documented, and cocubation of platelets with neutrophils leads to enhanced production of LTB_4 , 5(s)-12(s)diHETE and 5-HETE^{20,21,36} by neutrophils and formation of a new metabolite, 12,20-diHETE, which is not pro-

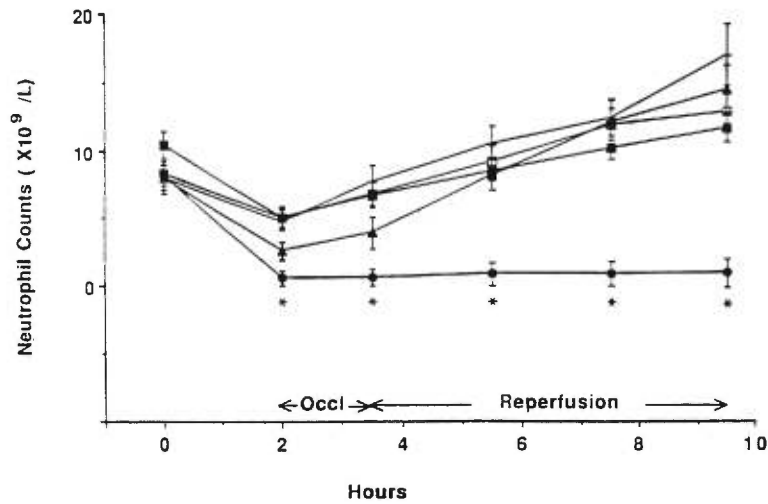


Fig. 4. Effect of occlusion (*Occl*), reperfusion, and neutrophil or platelet antisera on circulating neutrophil counts. Only neutrophil antiserum produced and maintained severe neutropenia throughout experiment (group 3: ●). Neutrophilia was evident after 6 hours of reperfusion in other groups. Asterisk, $p < 0.05$ vs group 1.

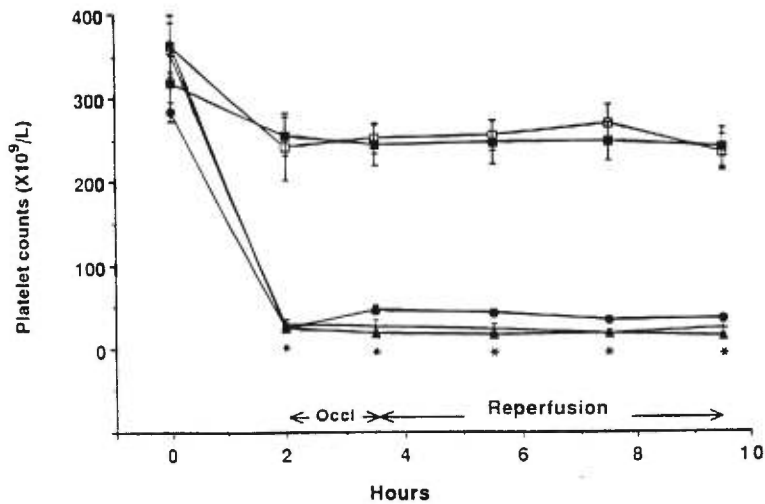


Fig. 5. Effect of occlusion (*Occl*), reperfusion, and platelet or neutrophil antisera on circulating platelet counts. Platelet antiserum produced and maintained severe thrombocytopenia throughout experiment in group 2 (+), group 3 (●), and group 5 (▲). Neutrophil antiserum in group 3 (●) had no influence on thrombocytopenia produced by platelet antiserum. Platelet blood counts were stable and within normal range during occlusion and reperfusion in groups 1 (□) and 4 (■). Asterisk, $p < 0.05$ vs control groups.

duced by either element alone. Therefore lipoxigenase by-products are increased by platelet-neutrophil complicity, and the interactions may be at the basis of the observed benefits of lipoxigenase inhibitors on infarct size limitation.³⁷ In addition, a platelet-derived product would enhance superoxide production by neutrophils³⁸ and some other platelet factor or reaction would have inhibitory effects,³⁹ suggest-

ing that an imbalance could theoretically occur between these opposite reactions. Therefore in spite of the controversy about efficacy of free oxygen radicals scavenging to limit infarct size,⁴⁰ it remains possible that platelet depletion could have beneficial effects through this pathway; however, our confirmation that thrombocytopenia does not afford protection to myocardium in absence of stenosis lessens

the importance of this mechanism under such conditions.

Another cooperation between platelets and neutrophils concerns platelet-activating factor (PAF) formation. Coëffier et al.⁴¹ showed that the cocubation of activated-platelets and activated-neutrophils produced twice the amount of PAF than separate cell systems. The phenomenon depends on a platelet-derived soluble factor, possibly lyso-PAF-acether, and this reaction may represent another pathway for platelet involvement in reperfusion injury because PAF-receptor inhibitors can limit infarct size in animal models of ischemia and reperfusion.⁴²

Neutrophil depletion in thrombocytopenic dogs did not afford better myocardial protection than thrombocytopenia alone. On the other hand, neutrophil accumulations in reperfused myocardium were increased, although not significantly, in platelet-depleted dogs. Because neutrophils are a key element in reperfusion injury,^{14, 15} a greater accumulation of activated neutrophils could be detrimental for the reperfused myocardium. However, in spite of this increment in neutrophils in thrombocytopenic dogs, significant reduction of infarct size persisted in groups reperfusing with a critical stenosis. Therefore in the presence of a critical stenosis, platelets have a major role on infarct size and reperfusion injury that may be additive to that of the neutrophils. This conclusion is supported by our observation that critical stenosis had no influence on neutrophil accumulation in the reperfused myocardium, supporting and extending the study of Richard et al.,⁴³ who reported no increment in neutrophil counts by critical stenosis in postischemic myocardium.

Clinical implications. Our results indicate that a critical coronary stenosis compromises salvage of reperfused myocardium and that platelets are mediating the pathophysiologic process. Therefore patients with early successful coronary thrombolytic therapy presenting a critical residual stenosis at reperfusion are at risk of having more severe reperfusion injury. Development of adjuvant antiplatelet therapeutic measures should improve myocardial salvage in these patients.

We thank Claudette Léger-Gauthier, PhD, Robert Clément, BSc, Duc C. Tran, MD, André Grenier, BSc, and Patrick Provost, BSc, for their assistance, and Canada Fiberglass for the free supply of polyurethane foam.

REFERENCES

1. Sheehan FH, Braunwald E, Canner P, Dodge HT, Gore J, Van Natta P, Passamani ER, Williams DO, Zaret B, and co-investigators. The effect of intravenous thrombolytic therapy on left ventricular function: a report on tissue type plasminogen activator and streptokinase from the Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI phase I) trial. *Circulation* 1987; 75:817-29.
2. Gruppo italiano per lo studio della streptochinasi nell'infarto miocardico (GISSI). Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *Lancet* 1986;1:397-401.
3. Simoons ML, Serruys PW, van den Brand M, Res J, Verheugt FWA, Krauss XH, Remme WJ, Bär F, de Zwaan C, Van der Laarse A, Vermeer F, Lubsen J, and the working group on thrombolytic therapy in acute myocardial infarction of the Netherlands Interuniversity Cardiology Institute. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:717-28.
4. Rutsch W, Schartl M, Mathey D, Kuck K, Merx W, Dorr R, Rentrop P, Blanke H. Percutaneous transluminal coronary recanalization: procedure, results, and acute complications. *AM HEART J* 1981;102:1178-81.
5. Jolly SR, Abrams GD, Romson JL, Bailie MB, Lucchesi BR. Effects of lodoxamide on ischemic reperfused myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:441-8.
6. Mullane KM, McGiff JC. Platelet depletion and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:733-8.
7. Lefkowitz CA, Pace DP, Gallagher KP, Buda AJ. The effects of a critical stenosis on myocardial blood flow, ventricular function, and infarct size after coronary reperfusion. *Circulation* 1988;77:915-26.
8. Myears DW, Nohara R, Abendschein DR, Saffitz JE, Sobel BE, Bergmann SR. Compromise of beneficial effects of reperfusion on myocardium supplied by vessels with critical residual stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1078-86.
9. Schmidt SB, Varghese PJ, Bloom S, Yackee JM, Ross AM. The influence of residual coronary stenosis on size of infarction after reperfusion in a canine preparation. *Circulation* 1986;73:1354-9.
10. Wilson JL, Ramanathan KB, Ingram LA, Mirvis DM. Effects of residual stenosis on infarct size and regional transmural myocardial blood flow after reperfusion. *AM HEART J* 1988; 116:1523-9.
11. Jolly SR, Schumacher WA, Kunkel SL, Abrams GD, Liddicoat J, Lucchesi BR. Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1985;80:269-79.
12. Mullane KM, Fornabaio D. Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct by a platelet-dependent, aspirin-sensitive mechanism. *Circ Res* 1988;62:668-78.
13. Folts JD, Crowell EB, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976;54:365-70.
14. de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour JG. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *AM HEART J* 1989;117:523-32.
15. Werns SW, Lucchesi BR. The role of the polymorphonuclear leukocyte in mediating myocardial reperfusion injury. In: Singal PK, ed. *Oxygen radicals in the pathophysiology of heart disease*. Boston/Dordrecht/Lancaster: Kluwer Academic Publishers, 1988:123-44.
16. Clark RA, Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-mediated-platelet release reaction. *J Clin Invest* 1979;63:177-83.
17. Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* 1979;279:799-800.
18. Boogaerts MA, Yamada O, Jacob HS, Moldow CF. Enhancement of granulocyte-endothelial cell adherence and granulocyte-induced cytotoxicity by platelet release products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:7019-23.
19. Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, Phan SH, Powell J, Johnson KJ. Platelet enhancement of O₂ responses in stimulated human neutrophils: identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 1988;58:37-47.

20. Marcus AJ, Broekman MJ, Safier JB, Ullman HL, Islam N. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:130-7.
21. Maclouf J, Fruteau De Lacroix B, Borgeat P. Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. *Proc Acad Sci U S A* 1982;79:6042-6.
22. Rapaport E, Kuida H, Haynes FW, Dexter L. Pulmonary red cell and plasma volumes and pulmonary hematocrit in the normal dog. *Am J Physiol* 1956;185:127-32.
23. Rousseau G, St-Jean G, Latour JG, Merhi Y, Nattel S, Waters D. Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1991;25:319-29.
24. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Latour JG. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-54.
25. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:613-620.
26. Mrak RE, Carry MM, Murphy ML, Peng CF, Straub KD. Reperfusion injury in ischemic myocardium: protective effect of controlled reperfusion. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:217-24.
27. Peng CF, Murphy ML, Clowell K, Straub KD. Controlled versus hyperemic flow during reperfusion of jeopardized ischemic myocardium. *AM HEART J* 1989;117:515-22.
28. Golino P, Ashton JH, Buja M, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT. Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo: thromboxane A₂ and serotonin are possible mediators. *Circulation* 1989;79:154-66.
29. Wright L, Homans DC, Laxson DD, Dai XZ, Bache RJ. Effect of serotonin and thromboxane A₂ on blood flow through moderately well developed coronary collateral vessels. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:687-93.
30. Golino P, Maroko PR, Carew TE. Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of hypercholesterolemia on infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion. *Circulation* 1987;76:173-80.
31. Carvalho AC, Colman RW, Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med* 1974;290:434-8.
32. Golino P, Ashton JH, Glas-Greenwalt P, McNatt J, Buja LM, Willerson JT. Mediation of reocclusion by thromboxane A₂ and serotonin after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in a canine preparation of coronary thrombosis. *Circulation* 1988;77:678-84.
33. Grover GJ, Parham CS, Schumacher WA. The cardioprotective effects of the thromboxane receptor antagonist SQ 30,741 are not reversed by aspirin. *Basic Res Cardiol* 1991;86:99-106.
34. Grover GJ, Schumacher WA. Effect of the thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 on myocardial infarct size in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;11:29-35.
35. Simpson PJ, Mickelson JK, Fantone JC, Gallagher KP, Lucchesi BR. Iloprost inhibits neutrophil function in vitro and in vivo and limits experimental infarct size in canine heart. *Circ Res* 1987;60:666-73.
36. Marcus AJ, Safier LB, Ullman HL, Broekman MJ, Islam N, Oglesby TD, Gorman RR. 12s,20 dihydroicosatetraenoic acid: a new icosanoid synthesized by neutrophils from 12s-hydroxyicosatetraenoic acid by thrombin- or collagen-stimulated platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:903-7.
37. Mullane K, Hatala MA, Kraemer R, Sessa W, Westlin W. Myocardial salvage induced by REV-5901: an inhibitor and antagonist of the leukotrienes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;10:398-406.
38. Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, Phan SH, Powell J, Johnson KJ. Platelet enhancement of O₂ responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 1988;58:37-47.
39. McGarrity ST, Stephenson AH, Hyers TM, Webster RO. Inhibition of neutrophil superoxide anion generation by platelet products: role of adenine nucleotides. *J Leukoc Biol* 1988;44:411-21.
40. Reimer KA, Murry CE, Richard VJ. The role of neutrophils and free radicals in the ischemic-reperfused heart: Why the confusion and controversy? *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:1225-39.
41. Coëffier E, Delautier D, Le Couedic JP, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for PAF-Acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol* 1990;47:234-43.
42. Ma XL, Weyrich AS, Krantz S, Lefer AM. Mechanisms of the cardioprotective actions of WEB-2170, a platelet activating factor antagonist, in myocardial ischemia and reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;260:1229-36.
43. Richard VJ, Brooks SE, Jennings RB, Reimer KA. Effect of critical stenosis on myocardial neutrophil accumulation during ischemia and early reperfusion in dogs. *Circulation* 1989;80:1805-15.

The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog

Danielle Libersan^{a,b}, Ahmad Khalil^a, Pierre Dagenais^a, Eric Quan^a, Fernand Delorme^d, André Uzan^e, Jean-Gilles Latour^{a,c,*}

^aLaboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute

^bDepartment of Pharmacology, Université de Montréal, Canada

^cDepartment of Pathology, Université de Montréal, Canada

^dRhône-Poulenc Rorer Montreal, Canada

^eRhône-Poulenc Rorer Recherche-Développement, Vitry-Alfortville, France

* Corresponding author: Jean-Gilles Latour, director, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8. Tel: (+ 1-514) 376-3330 #3610; fax (+ 1-514) 376-1441

Abstract:**The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog. Danielle Libersan, Ahmad Khalil, Pierre Dagenais, Eric Quan, Fernand Delorme, André Uzan, Jean-Gilles Latour**

Objective: Heparin (HEP) is used in the post-thrombolytic state to prevent vessel reocclusion, thereby aiding myocardial salvage. Side effects limit its benefits, but beside anticoagulant activity HEP has diffuse actions that may be potentially beneficial to jeopardized reperfused myocardium. This study compares the effect of HEP to enoxaparin (ENOX), a low molecular weight heparin, and to streptokinase (SK), on infarct size. **Methods:** The left anterior descending coronary artery was occluded in dogs for 90 min, followed by 6 hours of reperfusion with a residual critical stenosis in place. Five min before reperfusion, HEP (2800 IU) was injected IV, and perfused at 500 IU/hr until sacrifice in group 2, while groups 3 and 4 received ENOX (2128 anti-Xa IU IV) followed by 380 anti-Xa IU/hr. Group 4 was also given 500,000 IU SK over 30 min before reperfusion beginning at 55 min of occlusion (ENOX + SK), while group 5 received only SK. Controls (CON: group 1) received saline. P-selectin mediated platelet-neutrophil rosettes formation was also tested in vitro in the presence of HEP and ENOX. **Results:** The area at risk delimited by dye perfusion was statistically similar among groups. Covariance analysis between infarct size (% of area at risk) delimited with triphenyltetrazolium and collateral flow measured with radioactive microspheres confirmed that groups given ENOX ($21.6 \pm 5.5\%$) and ENOX+SK ($24.9 \pm 3.9\%$) developed smaller infarcts ($P < .05$) than CON ($48.1 \pm 4.5\%$), as opposed to HEP ($32.2 \pm 3.6\%$) and SK ($46.8 \pm 3.4\%$) groups. ^{111}In -platelet counts in the infarct were reduced significantly by 64% in the ENOX group as compared to CON, and to a lesser extent (42%; NS) in ENOX+SK group, but were not reduced by HEP and SK treatments. Neutrophil accumulation in the infarcts was decreased significantly and by more than 75% in ENOX and ENOX+SK groups versus CON, but not in HEP and SK groups. Also, only ENOX (10-100 $\mu\text{g/mL}$) inhibited significantly platelet-neutrophil rosettes formation in a plasmatic milieu. **Conclusions:** ENOX, as opposed to HEP, reduces myocardial platelet and neutrophil accumulations, and limits infarct size when given just before and during reperfusion. Benefits of ENOX on infarct size were not modified by SK, and may be related, at least in part, to an interaction with P-selectin-mediated cell adhesion.

Keywords: Low molecular weight heparin; Streptokinase; Stenosis; Reperfusion; Myocardial infarction; Platelets; Leukocytes; Dog.

1. Introduction

Early coronary reperfusion salvages jeopardized myocardium, but overall benefits may be limited by reperfusion injury [1]. Reperfusion injury is a complex pathophysiologic process involving production and release of cytotoxic materials such as free oxygen radicals, lysosomal enzymes, or lipid metabolites derived from neutrophils, platelets and ischemic tissue, and microcirculatory failure associated with leukocyte microcirculatory plugging, vasoactive agents or impaired vascular relaxation that compromise reflow and survival of reversibly injured myocytes [2].

Presence of a residual stenosis in the infarct-related artery during early reperfusion exacerbates tissue injury and increases infarct size by a platelet dependent mechanism [3]. These observations are clinically relevant, because angiographically significant residual stenosis has been documented in >75% of patients following thrombolysis [4], and that platelet activation occurring at severe coronary stenosis is responsible for cyclic flow variations [5], and could initiate platelet-related phenomena in the reperfused vasculature.

In addition to therapies aimed at preventing thrombotic reocclusion, drugs protecting reperfused myocardium would be beneficial in the set up of coronary thrombolysis in extending reduction of infarct size and associated morbidity and mortality. Heparin is used clinically with thrombolytics to prevent thrombotic reocclusion of the recanalized vessel [6], and pharmacologic doses of heparin at reperfusion reduce infarct size in the dog by a mechanism independent of its anticoagulant activity [7]. Heparins could be beneficial on postischemic jeopardized myocardium by modulating the activity of enzymes such as elastase [8] and complement components [9], by interacting with leukocyte and platelet adhesion molecules [10,11], or by exerting antioxidant activity [12].

Low molecular weight heparins (LMWHs), such as enoxaparin, retain most of the properties of unfractionated heparin, and could represent a valuable alternative to unfractionated heparin in the context of coronary thrombolytic therapy. A lesser propensity for bleeding complications, such as reported in animal experiments [13], would be advantageous because intramyocardial hemorrhage is frequent in reperfused infarcts [14], and a worsening by anticoagulants could be potentially

detrimental to salvaged myocardium. LMWHs have other potential advantages over unfractionated heparin that may be useful to limit reperfusion injury. LMWHs, as opposed to unfractionated heparin, do not increase vessel permeability [15], and therapeutic concentrations do not activate platelets [16] nor neutrophil superoxide production [17]. In addition, LMWHs exhibit less nonspecific binding to plasma proteins providing stable activity levels [18].

This study investigates the potential benefits of heparins (unfractionated and LMWH) and streptokinase on postischemic myocardial preservation and infarct size in a non-thrombotic model of ischemia to avoid the situation of vessel reocclusion, but with reperfusion in the presence of a residual critical stenosis in the dog.

2. Methods

2.1 Ischemia and reperfusion.

Mongrel dogs of either sex weighing 18 to 28 kg were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg IV), intubated and ventilated mechanically with room air. Blood gases and pH were measured and kept within normal limits. Lead II electrocardiogram was monitored and catheters were inserted in the femoral vein and artery for blood sampling. After injecting pancuronium bromide (0.1 mg/kg), a left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space, and the heart suspended in a pericardial cradle. Catheters were introduced in the left ventricle through the left atrial appendage for pressure monitoring and into the left atrium for radioactive microsphere injection.

As described previously [3], the left anterior descending coronary artery (LADCA) was isolated distal to its first diagonal branch, and an electromagnetic flow probe was installed to measure coronary blood flow. Five minutes before occlusion, a micrometer occluder was adjusted on the LADCA to produce an eccentric critical coronary stenosis. The stenosis was sufficient to abolish the hyperemic response after the release of a 10-second occlusion, without affecting basal blood flow of the coronary. The LADCA was then occluded for 90 minutes and reperfused for 6 hours with the critical stenosis left in place. Dogs presenting refractory ventricular fibrillation were excluded from the study. Also, animals that failed to develop persistent epicardial cyanosis and ST segment changes (<0.1 mV) after 10 minutes of occlusion were discarded.

Studies adhered to the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian

Council on Animal Care, and were approved by a local committee.

2.2 *Experiments*

Animals were assigned at random to groups 1 to 4 the day before the experiment; group 5 was carried out just after completing groups 1 to 4 study. Control group 1 (CON) received an intravenous perfusion of physiologic saline throughout the experiment, beginning 5 minutes before reperfusion. Group 2 received a bolus injection of 2800 IU unfractionated porcine heparin (HEP; Leo Laboratories, Canada) intravenously 5 minutes before reperfusion, followed by an intravenous perfusion of 500 IU/hr until sacrifice. Groups 3 and 4 were treated like group 2 but received a bolus dose of 2128 anti-Xa IU and a perfusion of 380 anti-Xa IU/hr of the low molecular weight heparin enoxaparin (ENOX; Rhône-Poulenc Rorer, Canada). Streptokinase (SK) 500,000 U (Hoechst, Canada) was perfused intravenously over 30 minutes, beginning at 55 min of occlusion in group 5, and also in group 4 treated with ENOX.

The HEP dose used in the present study was derived from clinical studies assessing the benefits of HEP along with thrombolytics [6], after adjustment for body weight, and doubling the aPTT in early reperfusion. A total of 5800 IU HEP was used in each dog and corresponded to 4408 anti-Xa units of ENOX. The dose of ENOX was within the clinical range [19].

2.3 *Infarct sizing*

As described previously [20], the site of occlusion on the LADCA and the aorta above the coronary ostia were cannulated and perfused with saline (0.9%) for 5 minutes, and subsequently, the aorta was perfused with Evans blue (0.5% in saline; Sigma, Canada) and the LADCA with saline (0.9%), at a constant pressure of 100 mmHg for 5 minutes. The left heart was sliced in 7 mm thick transverse sections, the slices weighed and immersed in triphenyltetrazolium chloride (Sigma, Canada) 1.5% in Tris buffer (2.4%, pH 7.8) for 10 minutes at 37°C. The normally perfused myocardium, the area at risk of ischemia, and the necrotic myocardium were delineated, and respective areas estimated on each slice by computerized planimetry. The area at risk was expressed in percentage of the left ventricle, and infarct size in percentage of the area at risk.

2.4 *Regional and collateral myocardial blood flow*

Regional and collateral blood flow were measured as described previously [20], using 15 μ m diameter microspheres labeled with ⁴⁶Sc (NEN Dupont Inc, Canada), 15 minutes after coronary

occlusion. Briefly, 3 to 4 million microspheres were injected into the left atrium, and a reference arterial blood sample collected from the aortic catheter at a constant rate. For regional blood flow analysis, three to four central slices were dissected into non-ischemic and ischemic parts. Sections from the central ischemic and the non-ischemic wall opposite to the area at risk were divided into three equal subepicardial, mesomyocardial, and subendocardial portions. Each sample was weighed and counted in a gamma counter. After correcting for background and spillover between isotopes, blood flow was calculated and expressed in milliliters of blood per minute per gram of tissue.

2.5 Platelet isolation and ¹¹¹In-labeling

The procedure for platelet isolation and labeling, preserving platelet aggregation, has been described elsewhere in details [3]. Venous blood from each dog was centrifuged to obtain platelet-rich plasma. After four successive washings with tyrode, the platelets were incubated with approximately 150 μCi ¹¹¹Indium-oxine (Amersham, Canada) for 1 minute at 37°C. Radiolabeling efficiency ranged between 83.9% and 94.2%. The labeled platelets were finally suspended in 4.5 mL of citrated platelet-poor plasma and counted; 0.5 mL was saved to prepare standards for gamma counting, and the remaining (mean: $1.96 \pm 0.14 \times 10^9$) was injected intravenously a few minutes before occlusion. Venous blood was collected just before reperfusion to estimate the pool of ¹¹¹In-platelets in the circulation, assuming a blood volume of 75 mL/kg of body weight.

2.6 Isolation and ⁵¹Cr-labeling of red blood cells

Intramyocardial hemorrhages were estimated by tissue counting of ⁵¹Cr-labeled autologous red blood cells (RBC) [14]. The cells were isolated by centrifuging (10 min, 275g) four 15 mL venous blood samples collected into 2.25 mL acid-citrate-dextrose. Hank's balanced salt solution (HBSS) was added to the RBC pellet to a final volume of 15 mL in each tube and centrifuged (30 min, 1700g) over 10 mL Percoll 71% (1.121 g/mL; Pharmacia, Canada). The RBC were washed twice in HBSS, and incubated with approximately 250 μCi of ⁵¹Cr (⁵¹Na-chromate, Amersham, Canada). The suspension was incubated at room temperature and mixed gently every 5 minutes; unbound ⁵¹Cr was then eliminated by two successive washings in 15 mL HBSS. ⁵¹Cr-RBC labeling efficiency was 94.1%. ⁵¹Cr-RBC were finally suspended into 30 mL of platelet-poor-plasma and injected intravenously before occlusion.

2.7 *Platelet and red blood cell accumulations*

Infarcted and non-infarcted myocardium samples from the area at risk and the normal non-ischemic myocardium from the opposite free wall were dissected, weighed and counted in a gamma counter for 5 minutes. The labeled-cell counts were determined by reporting the values obtained over the standards (1×10^6 platelets or 1×10^9 RBC), and accumulations were calculated per gram of tissue. As variable amounts of cells were injected, these values were normalized between dogs by using the mean labeled cell counts circulating just prior to reperfusion from all experiments [3].

2.8 *Neutrophil accumulation in myocardial tissue*

Neutrophil counts in myocardial tissue were estimated as previously [20] by measuring neutrophil-specific myeloperoxidase (MPO) activity using *O*-dianisidine (Sigma, Canada) and hydrogen peroxide as substrates. To establish a reference curve in each dog between MPO activity and neutrophil counts, blood neutrophils were isolated from the same blood sample as used for RBC isolation. The neutrophils obtained from the second cell layer were washed twice. Contaminating RBC were eliminated by hypotonic hemolysis. Suspensions containing 1×10^6 to 4×10^6 neutrophils were prepared, and the cell pellets frozen at -70°C for later use.

Myocardial tissue was obtained from a central ventricular transversal slice rapidly frozen on a stainless steel plate kept at -70°C . Samples of about 100 mg were taken systematically from the central ischemic area, two from the salvaged viable area (one at 2 mm above the infarct and one underneath the epicardium), and two from the infarct (one from the subendocardial layer, and the other from the outer edge of the infarct just below the salvaged-live myocardium). One additional sample was taken from non-ischemic myocardium of the wall opposite to the area at risk.

Neutrophils and cardiac tissue samples were treated as reported by Bednar et al. [21]. MPO was assayed by adding to a 0.1 mL of sample, 2.9 mL of phosphate buffer containing $8.35 \times 10^{-3} \%$ *O*-dianisidine dihydrochloride, and H_2O_2 0.3%. Absorbency was read at 460 nm over 3 min. Values measured on the infarcted samples, or those of the viable area at risk were respectively averaged and results expressed in 10^6 neutrophils/g of wet tissue, by referring to the neutrophil reference curve constructed for each dog by using MPO measurements of blood neutrophil concentrates.

2.9 Serum creatine phosphokinase

Serum creatine phosphokinase levels were estimated directly on serum by use of an automatic analyzer (Hitachi 717, Boehringer Mannheim, Canada) according to the recommended procedure.

2.10 Blood coagulation assays

Venous blood (9 parts) was collected at 84 min occlusion, just before injecting heparin or enoxaparin, and after 2, 4 and 6 hours of reperfusion, into 3.8% sodium citrate (1 part). After 30 min centrifugation (1000g) at 4°C, plasma was kept frozen at -70°C until assayed.

The activated partial thromboplastin time (aPTT) was tested with phospholipid reagent Neothromtin (Behringwerke AG, Germany) on a Coag-a-Mate automate (General Diagnostics, USA). The thrombin time (TT) was measured by automated photodensitometry in an ACL-200 (Fisher Scientific, USA) system according to suggested methodology. TT greater than 100 sec were considered incoagulable. Anti-factor Xa plasma activity was determined with the Coatest heparin kit (Kabivitrum, Sweden), and a spectrophotometer equipped for kinetic studies.

The anti-Xa activity of HEP used in dog studies (group 2) was estimated over a reference anti-Xa curve of ENOX at concentrations ranging between 0.3 and 0.7 units per mL, so to obtain curve responses as closely parallel as possible [22]. Curve slopes were respectively 0.71 for HEP and 0.79 for ENOX. By referring the HEP curve values over the ENOX curve, we found that one international unit of HEP showed a mean activity of 0.76 anti-Xa unit.

2.11 Platelet-neutrophil adhesion assay

In a separate series of studies, the effects of HEP and ENOX on P-selectin mediated platelet-neutrophil adhesion were tested *in vitro* on rosette formation. Platelets and neutrophils were isolated from normal dog blood collected in ACD. After three successive centrifugations and washings, the platelets were suspended in tyrode pH 7.4 ($500 \times 10^6/\text{mL}$) activated with thrombin (0.1U/mL) to elicit P-selectin expression, and fixed in 1% paraformaldehyde [23]. After neutralization of the fixative and three washings, the platelets were finally resuspended ($400 \times 10^6/\text{mL}$) in phosphate buffered saline (PBS) containing Ca^{++} and Mg^{++} or in plasma anticoagulated with 133U/mL hirudin (Sigma, Canada). Isolated neutrophil suspensions ($10 \times 10^6/\text{mL}$) were also prepared in a similar media.

Platelet samples were incubated with HEP (Sigma, Canada) or ENOX at concentrations of 0, 10,

50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ for 30 min at room temperature under constant mixing before adding to neutrophils for rosette formation. The rosette formation and platelet quantification on neutrophils were performed according to Spagenberg [24].

2.12 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SE for each group. A one-way analysis of variance (Anova) was used to investigate treatment differences and a Bartlett's test carried out to verify the homogeneity of variances. A Bonferroni multiple comparison ($n=5$) test was used for mean comparison between control (1) and each treated groups (2 to 5) and between groups 4 and 5. Intragroup hemodynamic data comparisons were analyzed by a one-way analysis of variance for repeated measures followed by a Bonferroni test between time values and values at baseline. A covariance analysis between infarct size (dependent variable) and collateral blood flow (covariate) was used in controlling the variability in infarct size due to collateral blood flow; the level of significance was set at $P<0.01$. A two-tail Fisher exact test was applied to the incidence of ventricular fibrillation and sex distribution. A "t" test or an alternate Welch test between control and each treated groups, and also between groups 4 and 5 was used for comparisons of ^{111}In -platelet and neutrophil accumulations in the respective myocardial tissue areas. As five comparisons were made, the level of significance was set at $P<0.01$. An Anova for repeated measures was followed by a paired Dunnet's test for intragroup comparison of coagulation tests, and by an unpaired Bonferroni multiple ($n=5$) comparison test as above for intergroup comparisons. Differences were considered statistically significant when $P<.05$ or otherwise specified.

3. Results

3.1 Group characteristics and hematologic data

Seventy-one dogs were used in the study. Three dogs were excluded because of technical problems (2 CON; 1 ENOX+SK). Non-ischemic dogs (2 CON; 1 HEP; 1 ENOX; 1 ENOX+SK and 2 SK) with collateral subendocardial blood flow $> 0.15 \text{ mL/g/min}$ developing insignificant infarcts were deleted [3]. Twenty-six dogs died of refractory ventricular fibrillation, 9 at occlusion, before initiating experimental treatments, and 17 at reperfusion (2 CON; 1 HEP; 3 ENOX; 4 ENOX+SK; 7 SK); differences in the incidence of refractory ventricular fibrillation between groups were not statistically significant. Thus, 35 dogs, 7 in each group, were used in

the final analysis. There were no significant differences between groups for gender distribution, hematocrit (44.6 ± 1.8 to $48.1\pm 1.8\%$), hemoglobin (150.4 ± 6.2 to 168.1 ± 6 g/L), leukocyte (11.1 ± 0.8 to $15.1\pm 0.9 \times 10^9/L$) and platelet (304 ± 18 to $376\pm 376\pm 40 \times 10^9/L$) counts. However, body weights differed slightly but significantly in groups 2 (24.3 ± 1 kg) and 5 (24.1 ± 1.5 kg) versus group 1 (19.7 ± 0.7 kg).

3.2 Hemodynamic data

Differences in heart rate, peak left ventricular pressure, pressure-rate product and LADCA flow were not statistically significant between compared groups at any time during the study. However, during the course of the experiments, the pressure-rate product (heart rate \times left ventricular pressure/100) decreased to a statistical level ($P<.05$) in all groups (CON: 208.7 ± 16.3 to 127.3 ± 10.4 ; HEP: 258.7 ± 26.9 to 174.0 ± 13.7 ; ENOX: 219.6 ± 16.9 to 117.1 ± 9.5 ; ENOX+SK: 239.7 ± 18 to 125.5 ± 17.5) at 6 hours reperfusion, with the exception of the SK group (189.7 ± 22.8 to 176.8 ± 26.7). These changes were associated with significant reductions in heart rate in CON (153.6 ± 7.8 to 122.1 ± 14.9), ENOX (164.6 ± 7.4 to 117.9 ± 8.2) and ENOX+SK (167.9 ± 8.6 to 119.6 ± 10.6) groups and with significant decreases in left-ventricular pressure in HEP (153.1 ± 8.8 to 115.1 ± 5.9), ENOX (133.7 ± 9.7 to 99.7 ± 5.8), ENOX+SK (142.3 ± 5.9 to 103.4 ± 7.5), and SK (125.9 ± 7.9 to 110.3 ± 8.6) groups. LAD flow decreased in all groups after 6 hours of reperfusion (CON: 20.1 ± 2.7 to 15.7 ± 2.1 ; HEP: 21.7 ± 3.9 to 15.7 ± 2.7 ; ENOX: 17.1 ± 2.5 to 13.0 ± 4.4 ; ENOX+SK: 16.4 ± 2.4 to 11.2 ± 1), but changes reached statistical significance only in the SK group (28.4 ± 4.44 to 15.1 ± 4.3).

3.3 Infarct size, and collateral blood flow (Table 1 and Fig. 1)

The area at risk was similar between groups and involved approximately 40% of the left ventricle (Table 1). However, infarct size expressed as a percentage of the area at risk was reduced ($P<.05$) by about 50% in ENOX (21.6 ± 5.5) and ENOX+SK (24.9 ± 3.9) groups, but results in HEP (32.2 ± 3.6) and SK (46.8 ± 3.4) groups were not statistically different from CON group (48.1 ± 4.5). Infarct size in the ENOX+SK group was smaller ($P<.05$) than the SK group.

Transmural and regional collateral blood flows were not statistically different between groups (Table 1), and correlation between infarct size and transmural collateral flow in the ventricular wall is illustrated in Figure 1. Covariance analysis confirmed that only ENOX and ENOX+SK groups

developed smaller ($P<.05$) infarcts than the CON group; the ENOX+SK group also differed statistically from the SK group.

Regional myocardial blood flow in the non-ischemic area was statistically lower in subendocardium in the ENOX+SK versus CON and SK groups, and in the mesomyocardium as compared to the SK group. Differences between compared groups in subepicardial and transmural flow were not otherwise statistically significant.

3.4 *Creatine phosphokinase (CK)*

CK serum levels increased gradually during reperfusion from 725 ± 146 at 90 min occlusion to 10642 ± 2073 U/L after 6 hours of reperfusion in CON group. Similar changes were measured in HEP group (657 ± 97 to 9376 ± 3478 U/L) and the SK group (443 ± 65 to 9546 ± 1594 U/L). However, increases in the ENOX (737 ± 277 to 4736 ± 1098 U/L), and the ENOX+SK group (527 ± 80 to 5776 ± 1662 U/L) were reduced by about 50% as compared to control, suggesting a milder myocardial damage in ENOX treated groups, but these differences were not statistically significant.

3.5 *Platelet accumulations in myocardium (Figure 2)*

^{111}In -platelets circulating at onset reperfusion averaged $992\pm88 \times 10^6$, and differences between groups were not statistically significant. Figure 2 illustrates the ^{111}In -platelet accumulations in the non-ischemic, the viable area at risk and the infarcted myocardium. Values in 3 dogs (1 ENOX; 1 ENOX+SK; 1 SK) were excluded because of excessive ($>75\%$) ^{111}In -platelets sequestration off the circulating pool.

Intragroup analysis of ^{111}In -platelet accumulations indicated that differences in the platelet counts between the viable area at risk and the normal non-ischemic zone were not significant in the 5 study groups, with values ranging between 37,274 and 86,260 ^{111}In -platelet/g myocardium. These results contrast with the accumulations seen in the infarcted myocardium that exceeded statistically ($P<.05$) those in the viable area at risk and the normal myocardium in all groups, with the exception of the ENOX group. ^{111}In -platelet accumulations in both the viable area at risk and the non-ischemic myocardium were also statistically similar between groups. However, values per g of infarct were reduced by about 64% in the ENOX group ($77,178\pm16,853$; $P<.01$), and by 42% in ENOX+SK group ($122,648\pm10,822$;NS) as compared to CON ($213,040\pm37,230$); values

between ENOX+SK ($122,648 \pm 10,822$) and SK ($367,951 \pm 32,782$) groups differed statistically ($P < .01$). Values in the HEP and SK groups were not statistically significant from the CON group.

Accumulation ratios (data not shown) between the outer epicardial and inner endocardial layers of the infarct were statistically similar among groups (CON: 0.50 ± 0.11 ; HEP: 0.37 ± 0.13 ; ENOX: 0.35 ± 0.10 ; ENOX+SK: 0.40 ± 0.09 ; SK: 0.31 ± 0.12) and indicate that about twice as many ^{111}In -platelets accumulated deep in the infarct as compared to the outer top layer.

3.6 ^{51}Cr -RBC counts in myocardial tissue

The mean count of circulating ^{51}Cr -RBC of all dogs at onset of reperfusion was $215 \pm 12 \times 10^9$ cells. Normalized ^{51}Cr -RBC mean counts ($\times 10^6/\text{g}$) were not statistically significant between groups in the different myocardial areas (infarct: 5.51 ± 1.01 to 15.16 ± 4.35 ; area at risk: 4.18 ± 0.58 to 5.85 ± 1.59 ; non ischemic: 4.31 ± 0.58 to 10.83 ± 2.87), indicating that none of the treatments enhanced intramyocardial hemorrhage as compared to the CON group. However, upon intragroup comparisons, only the SK group showed increased ($P < .05$) ^{51}Cr -RBC counts/g in the infarct versus non-ischemic myocardium and the viable area at risk respectively ($15.2 \pm 4.3 \times 10^9$ vs $4.7 \pm 1.4 \times 10^9$ and 4.3 ± 0.6 ^{51}Cr -RBC/g).

3.7 Neutrophil accumulations in myocardial tissue (Figure 3)

Neutrophil counts in the non-ischemic myocardium varied non significantly between groups from 0.18 ± 0.08 to $1.52 \pm 0.55 \times 10^6/\text{g}$. For the viable area at risk, only the SK group showed a significant increase in neutrophils as compared to non-ischemic myocardium, indicating that the viable area at risk does not mobilize significant numbers of neutrophils in CON and in the other treated groups (HEP, ENOX, ENOX+SK).

Accumulation of neutrophils in the infarct was however reduced ($P < .05$) versus CON group in dogs given ENOX±SK (CON: 13.6 ± 2.0 ; ENOX: 2.6 ± 0.8 ; ENOX+SK: $3.2 \pm 0.8 \times 10^6/\text{g}$), but not in HEP ($15.4 \pm 4.4 \times 10^6/\text{g}$) and SK ($16.4 \pm 3.3 \times 10^6/\text{g}$) groups. Neutrophils in the infarct were reduced in the ENOX+SK group as compared to the SK group ($P < .05$).

3.8 Blood coagulation assays (Figure 4)

As compared to values measured before reperfusion, the aPTT was prolonged ($P < .05$) throughout reperfusion in HEP, ENOX and ENOX+SK groups, and after 6 hours of reperfusion in the SK

group. However, only HEP group differed statistically ($P<.05$) from CON group at 2 hours of reperfusion ($P<.05$). Also, the aPTT were significantly shorter in SK group as compared to ENOX+SK treated dogs after 4 and 6 hours of reperfusion.

Thrombin time was increased ($P<.05$) in HEP group and to a much lesser extent in ENOX group throughout reperfusion, and after 6 hours of reperfusion in ENOX+SK group. Changes in SK group were not significant. However, thrombin time was slightly prolonged in the SK group ($P<.05$) as compared to control at onset of reperfusion, but only the HEP group differed statistically throughout reperfusion from CON group.

Plasma anti-Xa activity was below detectable levels (<0.01 U/mL) in every group just prior reperfusion and throughout reperfusion in CON and SK groups. Levels initially increased in HEP group to 0.56 ± 0.14 U/mL ($P<.05$) after 2 hours of reperfusion, but declined to 0.34 ± 0.10 U/mL ($P<.05$) and to 0.28 ± 0.1 U/mL (NS) after respectively 4 and 6 hours of reperfusion. However, the anti-Xa activity remained stable (0.60 to 0.75 U/mL) and significantly increased ($P<.05$) throughout reperfusion in groups given ENOX and ENOX+SK.

Between group differences in anti-Xa activity versus CON group were significant ($P<.05$) at only 2 hours in HEP, and throughout reperfusion in ENOX and ENOX+SK groups. Anti-Xa activity levels in ENOX+SK group also differed significantly ($P<.05$) from the SK group.

3.9 *Effect of HEP and ENOX on platelet-neutrophil adhesion (Figure 5)*

Platelet adhesion to neutrophils when tested with cell preparation in PBS was inhibited ($P<.05$) to the same degree by HEP and ENOX and in a dose dependent manner, values ranging between $11\pm 3.2\%$ at $10\ \mu\text{g/mL}$ and $30\pm 5.2\%$ at $100\ \mu\text{g/mL}$. However, while ENOX maintained a similar inhibitory ($P<.05$) activity in plasma, HEP was devoid of significant activity at a concentration of $100\ \mu\text{g/mL}$ ($4.0\pm 2.6\%$).

4. Discussion

The present study demonstrates that LMWH enoxaparin, started intravenously a few minutes before the end of a 90 min coronary occlusion and through reperfusion reduced infarct size by about 50%. The cardioprotection was associated with decreases in both platelet and neutrophil accumulations in the reperfused infarct, suggesting that enoxaparin has likely interacted with platelet-leukocyte interrelated mechanisms.

Platelets and neutrophils are found together in thrombosis and inflammatory sites, and cooperation between these cellular elements modulates each other function, and results into increased production of free radical [25], and lipid mediators of the inflammatory response including leukotrienes, and new lipid derivatives [26]. Platelets thus play an active role in the inflammatory processes either directly by producing or releasing active agents, or by activating neutrophils [27]. Activation induces expression on platelet membrane of P-selectin (GMP-140) stored in alpha-granules, allowing platelet binding to neutrophil ligand sialyl Lewis-X (SLe^x), a tetrasaccharide [28]. Activated endothelial cells also express P-selectin which is involved with L-selectin, a leukocyte selectin, in leukocyte rolling and initial adhesion to endothelial cells, a first step in neutrophil trafficking to inflammatory sites. P and L-selectins appear to play an important role in reperfusion injury [29]. Inhibition of P-selectin by a SLe^x analog [30] or with a monoclonal antibody against P-selectin [31], reduce neutrophil accumulation in the reperfused myocardium and infarct size in dog and feline models of ischemia and reperfusion. In the present study, we found that enoxaparin can modulate P-selectin-mediated platelet-neutrophil adhesion in a plasmatic milieu, supporting the hypothesis that reduction of infarct size by enoxaparin could be related, at least in part, with an inhibition of P-selectin function or blockade of P-selectin receptor sites on leukocytes by yet unidentified enoxaparin fragments, preventing both platelet and neutrophil accumulations in reperfused myocardium. Failure of heparin to influence platelet and neutrophil accumulations is likely related to its neutralization by nonspecific binding [18], or its inhibition by platelet factor 4 [32].

Over the past decade, several studies [33] have established the concept that neutrophils invading the myocardium attenuate the benefits of coronary reperfusion on infarct size limitation. An early and massive accumulation at reperfusion has been correlated to an increase of infarct size [34]. Plugging of the microvasculature and release of vasoactive substances by neutrophils are features of the no-reflow phenomenon [2] that may contribute to postischemic damage or reperfusion injury. The release of toxic material, such as free oxygen radicals and lysosomal enzymes may compromise reversibly injured myocardium [33], and limitation of infarct size by interfering with leukocyte counts, activation, adhesion and function has been generally successful [35]. On the other hand, presence of a residual critical stenosis during reperfusion in the dog is responsible for a

further increment of infarct size through a platelet dependent mechanism [3]. Therefore, observed benefits of enoxaparin on infarct size with such a model give further support to the hypothesis of an interaction of the LMWH with platelet-related mechanisms.

Despite our failure to reduce infarct size with unfractionated heparin, there was a favorable trend toward a reduction in the treated group, suggesting that additional mechanisms than P-selectin modulation by heparins may be involved, or that the dose of unfractionated heparin used in our study was too low to achieve cardioprotection. The dosage of heparin that we used was derived from clinical protocols assessing the benefits of unfractionated heparin with thrombolytics in acute myocardial infarction [6]. After adjustment for body weight, the treatment doubled the aPTT during the first two hours of reperfusion and elicited anti-Xa plasma levels within the clinical range, and similar to those produced by enoxaparin. However, in contrast to enoxaparin, levels of anti-Xa activity declined in the last hours of reperfusion in the unfractionated heparin treated dogs, suggesting that blood anticoagulation was not then optimal. Whether or not the maintenance of the stable anti-Xa activity obtained with enoxaparin throughout reperfusion is connected to the limitation of infarct size by the LMWH cannot be ruled out. However, as only unfractionated heparin prolonged the thrombin time, it is unlikely that thrombin inhibition be related to the observed reduction of infarct size by enoxaparin. This conclusion is in agreement with the study of Friedrichs et al. [36] who observed reduction of CK release following global ischemia and reperfusion of isolated rabbit hearts, and that of Black et al. [7] who limited infarct size with *N*-acetyl heparin, which is devoid of anticoagulant activity.

High doses of unfractionated heparin were reported to reduce neutrophil accumulation and to limit infarct size in a similar dog model as the one we used in the present study [7], and the cardioprotection was associated to an inhibition of complement-induced tissue damage. Complement activation is another mechanism implied in reperfusion injury [37], with the production of neutrophil chemotactic fragments C3a and C5a, the expression of P-selectin [38] and the cellular damage mediated by the membrane attack complex C5b-9. Because enoxaparin could be even more potent in this regard than unfractionated heparin [39], we cannot rule out an inhibition of the complement system as being also involved in the cardioprotection seen with enoxaparin. Additional studies are needed to clarify this issue.

Unfractionated heparin has ambivalent effects that could influence its benefits on reperfusion injury. Low and therapeutic concentrations are promoting platelet [40] and neutrophil functions [17], whereas high doses have opposite effects [11]. Recently, heparin was reported to up-regulate neutrophil adhesion molecule Cd11b and to release IL-8 [41] a neutrophil activator associated with reperfusion injury. In contrast with this, LMWHs do not activate platelets [16], and inhibit neutrophil function at low and high concentrations [42].

Infusion of a therapeutically relevant dose of SK before release of the coronary occlusion failed to alter platelet and neutrophil accumulations in the reperfused myocardium and to limit infarct size. These results are in agreement with other studies [43,44], but contrast with reports suggesting that SK may exhibit cardioprotective effects independent of clot lysis and coronary reperfusion [45,46]. Interestingly, the cardioprotection elicited by enoxaparin was not altered by concomitant administration of SK, although it has been reported in patients with acute myocardial infarction that SK activates complement [47], and primes oxidative metabolism of neutrophils [48].

Intramyocardial hemorrhages estimated by ^{51}Cr -RBC were not exacerbated after 6 hours of reperfusion by neither heparin, enoxaparin, and SK, nor by the association of enoxaparin and SK, although there was a trend for aggravation with SK. Therefore, the benefits of enoxaparin over heparin on infarct size are unrelated to development of intramyocardial hemorrhages which occurred, as reported [14], within the borders of the infarct.

Conclusions. We conclude that limitation of infarct size by enoxaparin likely involves, at least in part, an interaction with P-selectin-mediated platelet and neutrophil adhesion reactions in the reperfused myocardium, an effect that could not be achieved by a corresponding therapeutic anti-Xa dose of unfractionated heparin. Future experiments are needed to determine if the observed cardioprotection with enoxaparin is sustained or transient, if the benefits are conditioned by the presence of a residual critical stenosis during reperfusion, and if unfractionated heparin in the upper therapeutic dose range can also limit infarct size.

Acknowledgements

The study was supported by grants from Rhône-Poulenc Rorer Canada Inc. and the Montreal Heart Institute Research Found (MHIRF).

The authors wish to thank Yahye Merhi PhD, Robert Clément BSc, Claudette Léger-Gauthier PhD for their professional support, Duc C Tran MD, MSc, for the MPO measurements, and Nicole Serruys for her secretarial assistance.

References

- [1] Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
- [2] Latour JG. Impaired postischemic reflow and myocardial reperfusion injury. In: *The Age of Reperfusion*. New York, NY: Cahnners Med Com, 1992:4:5-11.
- [3] Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour JG. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
- [4] The TIMI Study Group. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1989;320:618-627.
- [5] Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976;54:365-370.
- [6] Becker RC, Gore JM. The challenge of maintaining coronary arterial patency with intravenous heparin following tissue plasminogen activator administration. *Cardiology* 1993;83:100-106.
- [7] Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi BR. Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;29:629-636.
- [8] Redini F, Tixier JM, Petitou M, Choay J, Robert L, Hornebeck W. Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem J* 1988;252:515-519.
- [9] Edens RE, Linhardt RJ, Weiler JM. Heparin is not just an anticoagulant anymore: six and one-half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. In: Cruse JM, Lewis RE Jr. ed. *Complement profiles*. Basel, Switzerland: Karger S. 1993;1:96-120.
- [10] Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-3258.

- [11] Silvestro L, Viano I, Macario M, Colangelo D, Montrucchio G, Panico S, Fantozzi R. Effects of heparin and its desulfated derivatives on leukocyte-endothelial adhesion. *Semin Thromb Haemost* 1994;20:254-258.
- [12] Grant D, Long WF, Mackintosh G, Williamson FB. Heparins as essential antioxidants. *Agents Actions* 1994;41:C214-C215.
- [13] Buckley MM, Sorkin EM. Enoxaparin. A review of its pharmacology and clinical applications in the prevention and treatment of thrombotic disorders. *Drugs* 1992;44:465-497.
- [14] Higginson LAJ, White F, Heggtveit HA, Sanders TM, Bloor CM, Covell JW. Determinants of myocardial hemorrhage after coronary reperfusion in the anesthetized dog. *Circulation* 1982;65:62-69.
- [15] Blajchman MA, Young E, Ofosu FA. Effects of unfractionated heparin, dermatan sulfate and low molecular weight heparin on vessel wall permeability in rabbits. In: Ofosu FA, Danishefsky I, Hirsh J. ed. *Heparin and related polysaccharides. Structure and activities.* New York, NY: The New York Academy of Sciences, 1989;556:245-254.
- [16] Landolfi R, De Candia E, Rocca B, Ciabattini G, Antinori A, Masetti R, Patrono C. Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on platelet thromboxane biosynthesis "in vivo". *Thromb Haemost* 1994;72:942-946.
- [17] Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H. Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res* 1995;27:184-188.
- [18] Young E, Cosmi B, Weitz J, Hirsh J. Comparison of the non-specific binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin (enoxaparin) to plasma proteins. *Thromb Haemost* 1993;70:625-630.
- [19] Antman EM, McCabe CH, Marble SJ, Cannon CP, Feldman R, Papuchis G, Moore PB. Dose ranging trial of enoxaparin for unstable angina: results of TIMI 11A. *Circulation* 1996, 94:I-554.
- [20] Rousseau G, Provost P, Tran D, Caillé G, Latour JG. Clentiazem given at reperfusion improves subendocardial reflow and reduces myocardial infarct size in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:1252-1260.

- [21] Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM. Nafazatrom-induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function. *Circ Res* 1985;57:131-141.
- [22] Handeland G. Simplified chromogenic substrate assay for low molecular weight heparin. *Thromb Res* 1986;42:105-108.
- [23] Doré M, Burns AR, Hughes BJ, Entman ML and Smith, CW: Chemoattractant-induced changes in surface expression and redistribution of a functional ligand for P-selectin on neutrophils. *Blood* 1996;87 (5):2029-2037.
- [24] Spagenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M and Kehrel B: The platelet glycoprotein IIb/IIIa is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemostas* 1993;70 (3):514-521.
- [25] Ward PA, Cunningham TW, McCulloch KK, Phan SH, Powell J, Johnson KJ. Platelet enhancement of O_2^- responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 1988;58:37-47.
- [26] Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:130-137.
- [27] Tsuji T , Nagata K, Koike J, Todoroki N, Irimura T. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin - sialyl Lewis X interaction. *J Leukoc Biol* 1994;56:583-587.
- [28] McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270:11025-11028.
- [29] Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-294.
- [30] Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ: A novel sialyl Lewis^x analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994;90:2390-2401.

- [31] Weyrich AS, Ma XL, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-2629.
- [32] Lane DA, Pejler G, Flynn AM, Thompson EA, Lindahl U. Neutralization of heparin-related saccharides by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4. *J Biol Chem* 1986;261:3980-3986.
- [33] Lucchesi BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 1990;52:561-576.
- [34] de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran DC, Latour JG. Spatial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-154.
- [35] de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour JG. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532.
- [36] Friedrichs GS, Kilgore KS, Manley PJ, Gralinski MR, Lucchesi BR. Effects of heparin and N-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res* 1994;75:701-710.
- [37] Lucchesi BR. Complement activation, neutrophils, and oxygen radicals in reperfusion injury. *Stroke* 1993;24(suppl 1):I-41-I-47.
- [38] Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 1989;264:9053-9060.
- [39] Gikasis N, Khan MMH, Hiramatsu Y, Gorman JH, Hack CE, Sun L, Rao AK, Niewiarowski S, Colman RW, Edmunds LH. Effect of factor Xa inhibitors on thrombin formation and complement and neutrophil activation during in vitro extracorporeal circulation. *Circulation* 1996;94[suppl II]:II-341-II-346.

- [40] Noris P, Bertolino G, Previtali M, Ferrario M, Balduini CL. Heparin infusion facilitates ex vivo spontaneous platelet aggregation in patients with acute myocardial infarction who have undergone thrombolytic therapy. *Haemostasis* 1993;23:185-191.
- [41] El Habbal MH, Smith L, Elliott MJ, Strobel S. Effect of heparin anticoagulation on neutrophil adhesion molecules and release of IL8: C3 is not essential. *Cardiovasc Res* 1995;30:676-681.
- [42] Léculier C, Couprie N, Adeleine P, Leitienne P, Francina A, Richard M. The effects of high molecular weight- and low molecular weight-heparins on superoxide ion production and degranulation by human polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res* 1993;69:519-531.
- [43] Mickelson JK, Simpson PJ, Lucchesi BR, Gallas MT, Cronin M, Hoff PJ, McGillem M. Streptokinase improves reperfusion blood flow after coronary artery occlusion. *Int J Cardiol* 1989;23:373-384.
- [44] Higginson LAJ, Sheldrick KR, Temple SV, Beanlands DS. Intracoronary streptokinase: effects on reperfusion hemorrhage and regional myocardial blood flow in the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;9:509-514.
- [45] Puckett SW, Digerness SB, Bowdon HR, Rogers WJ, Rackley CE. Direct effects of streptokinase on the isolated rat myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:1120-1123.
- [46] Smith EF III, Nichols AJ, Selers TS, O'Brien SR, Griswold DE, Egan JW, Hillegas LM, Vasko JA, Slivjak MJ, Davis PA, Wolff CE, DiMartino MJ. Reduction in myocardial ischemic/reperfusion injury and neutrophil accumulation after therapeutic administration of streptokinase. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;18:729-738.
- [47] Frangi D, Gardinali M, Conciato L, Cafaro C, Pozzoni L, Agostoni A. Abrupt complement activation and transient neutropenia in patients with acute myocardial infarction treated with streptokinase. *Circulation* 1994;89:76-80.
- [48] Hansen PR, Kharazmi A. Effect of streptokinase on human neutrophil function in vitro and in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:1061-1068.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Relationship between infarct size (% of area at risk) and transmural collateral blood flow (mL/min/g) in CON and treated groups. Analysis of covariance confirms that infarct size is smaller ($P<.05$) only in the ENOX and ENOX + SK groups.

Figure 2. ^{111}In -platelet accumulation per gram of infarcted, viable area at risk, and normal non-ischemic myocardium between experimental groups; values are mean \pm SE. Platelet accumulation was reduced in the infarcted area in the ENOX group as compared to CON ($*P<.05$), and in the ENOX + SK group ($\dagger P<.05$) versus the SK group.

Figure 3. Neutrophil accumulation per gram of infarcted, viable area at risk, and non-ischemic myocardium; values are mean \pm SE. Differences between the non-ischemic myocardium and the viable area at risk were not significant in any groups. Neutrophil counts in the infarcts were reduced significantly ($*P<.05$) only in the ENOX and ENOX + SK groups. Differences were also significant between ENOX + SK and SK groups ($\dagger P<.05$).

Figure 4. Blood coagulation assays; values are mean \pm SE. Only comparisons between treated and CON groups are illustrated; for intragroups comparisons, please refer to the result section. *Top panel:* only HEP group at 2 hrs of reperfusion showed significant prolongation (about 2 fold) of the aPTT ($*P<.05$). After 6 hrs of reperfusion, the SK group had shorter aPTT than ENOX + SK group ($\dagger P<.05$). *Middle panel:* thrombin time was slightly prolonged after SK administration versus CON ($*P<.05$) at onset of reperfusion, but only the HEP group differed statistically ($*P<.05$) from CON group during reperfusion. *Bottom panel:* anti-Xa levels remained unchanged in CON and SK groups throughout reperfusion. Levels differed statistically ($*P<.05$) from CON in HEP at 2 hrs but not after 4 and 6 hrs of reperfusion. In the ENOX and ENOX + SK groups, the increases ($*P<.05$) in anti-Xa were stable throughout reperfusion. Anti-Xa activity also differed statistically ($\dagger P<.05$) between ENOX + SK and SK groups, throughout reperfusion.

Figure 5. Inhibition by ENOX and unfractionated HEP on platelet-neutrophil adhesion in phosphate buffered saline (PBS, left panel) and in hirudin anticoagulated dog plasma (right panel). ENOX and HEP were equally effective in PBS at tested concentrations. However, whereas ENOX retained its full inhibitory activity in plasma, no significant inhibition could be measured with HEP at 100 $\mu\text{g/mL}$ ($*P<.05$ vs CON).

Figure 1

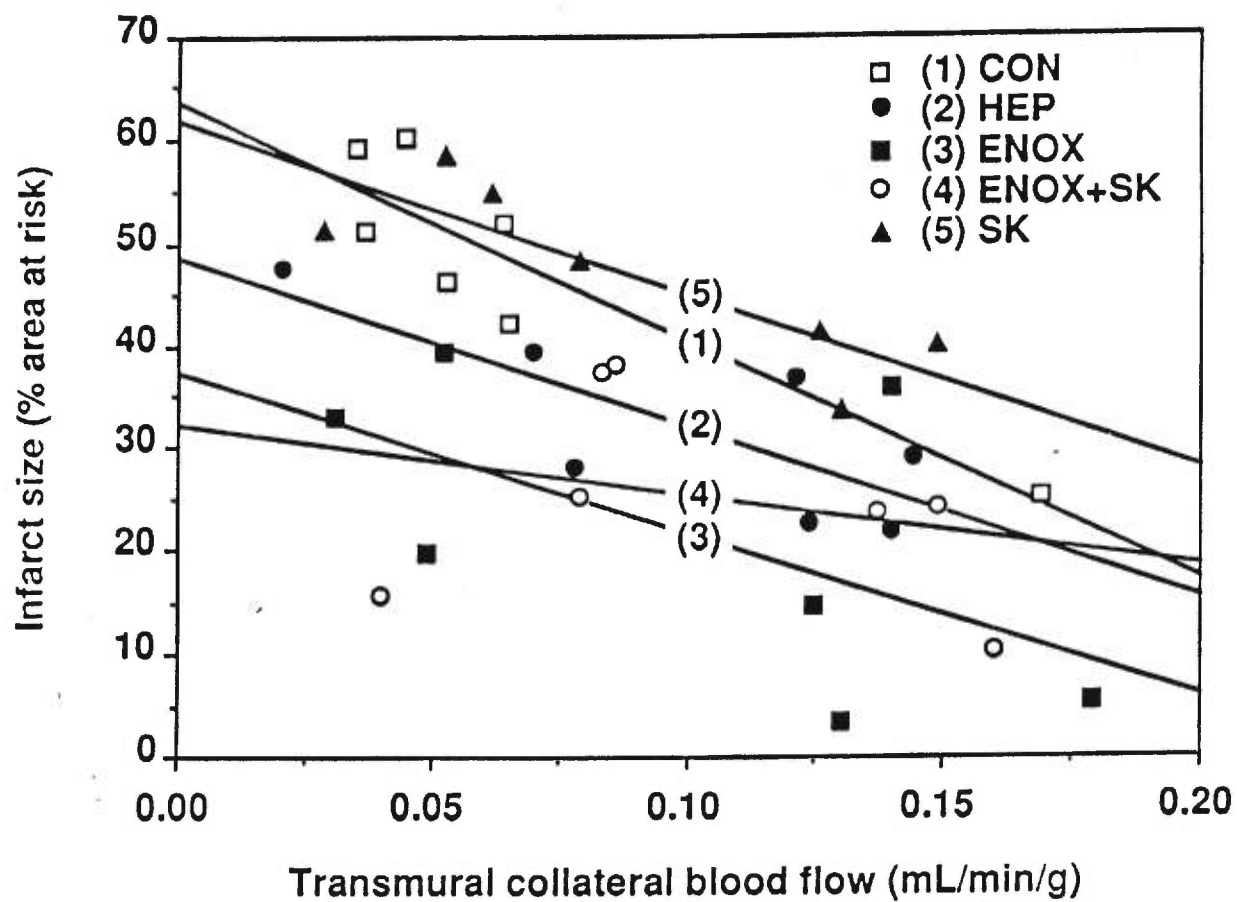


Figure 2

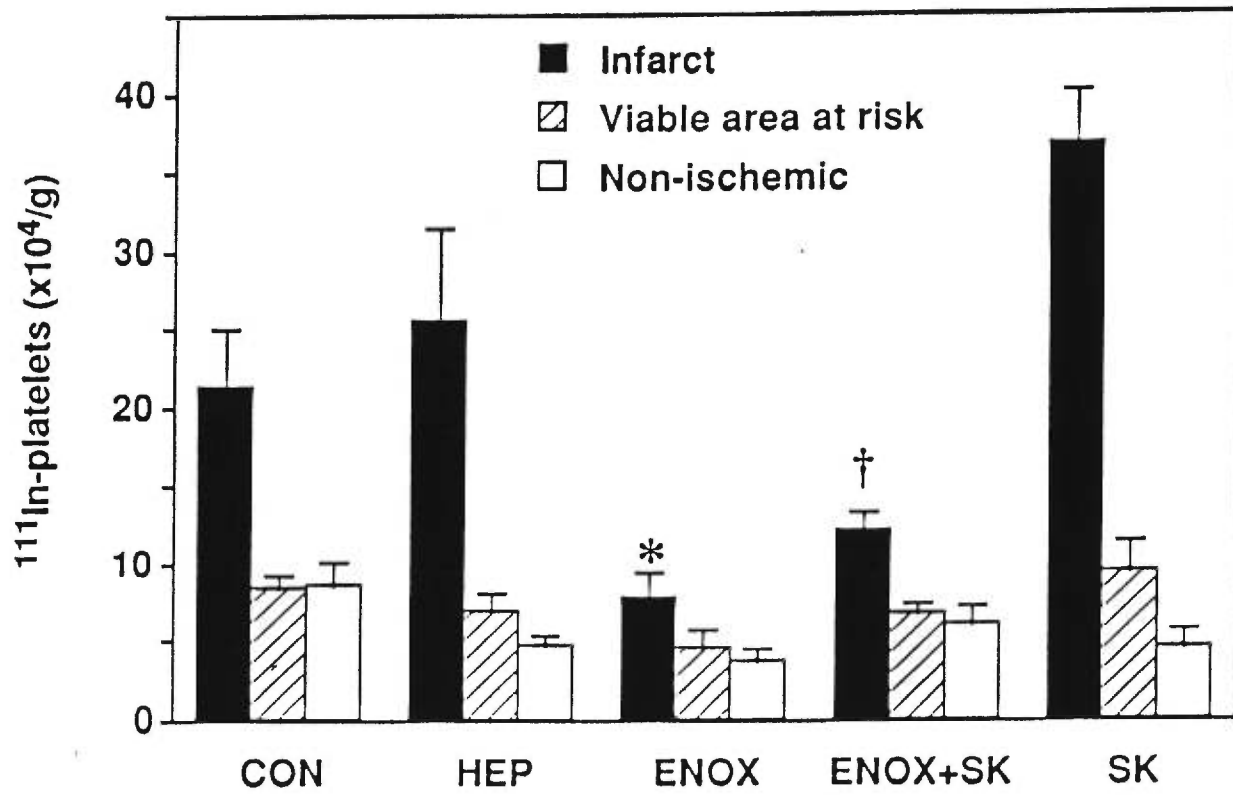
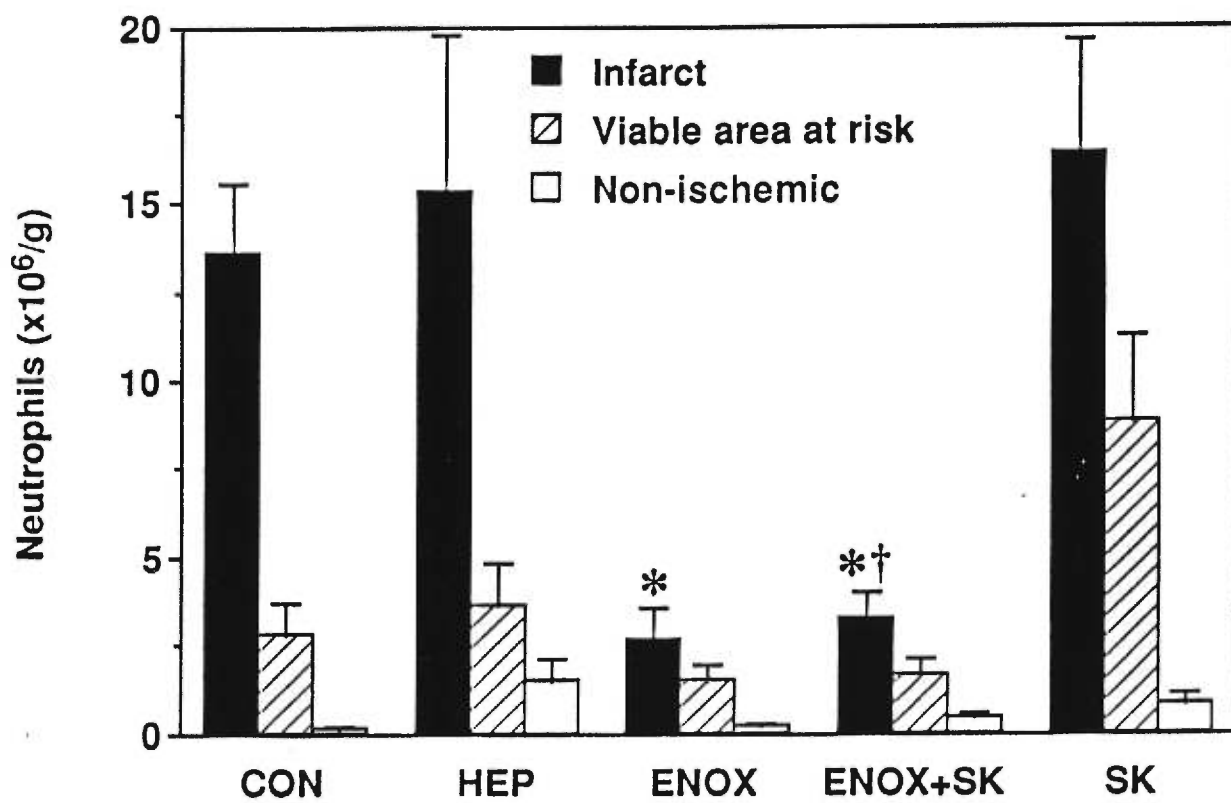


Figure 3



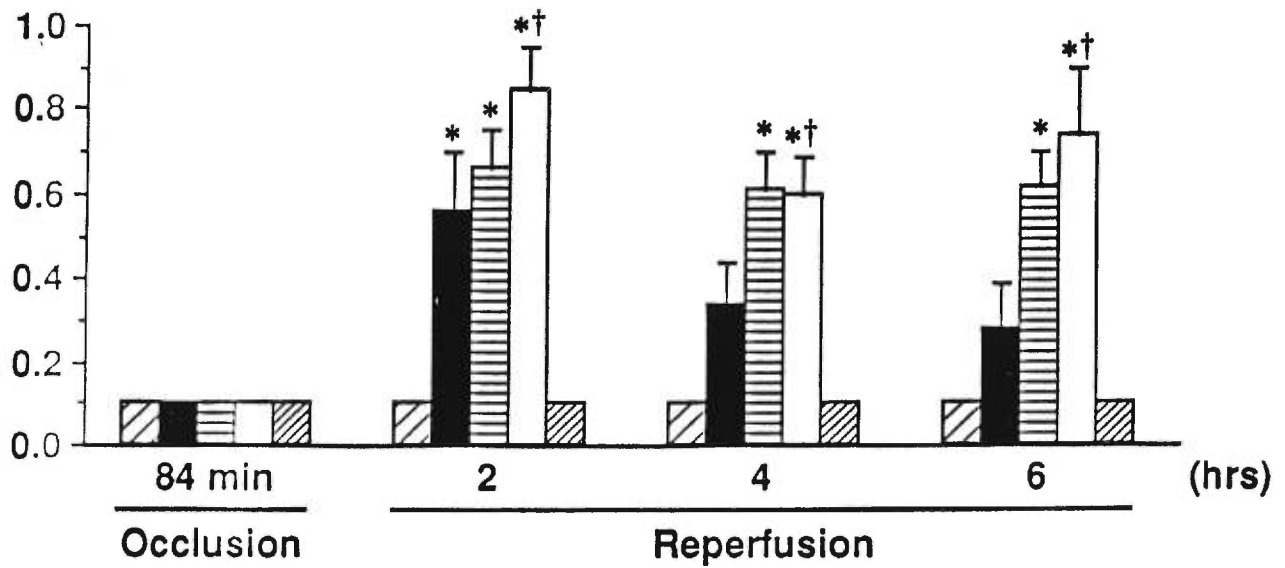
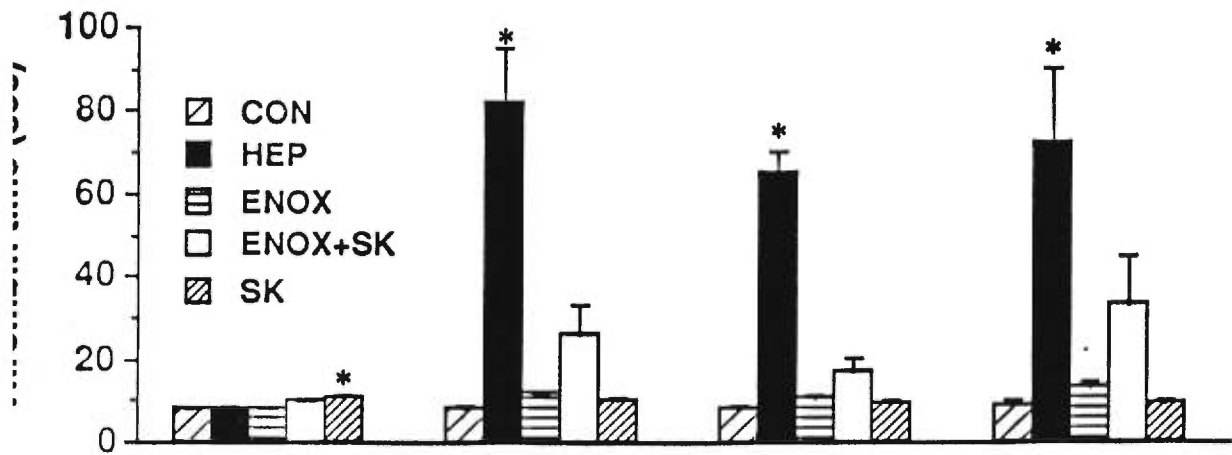
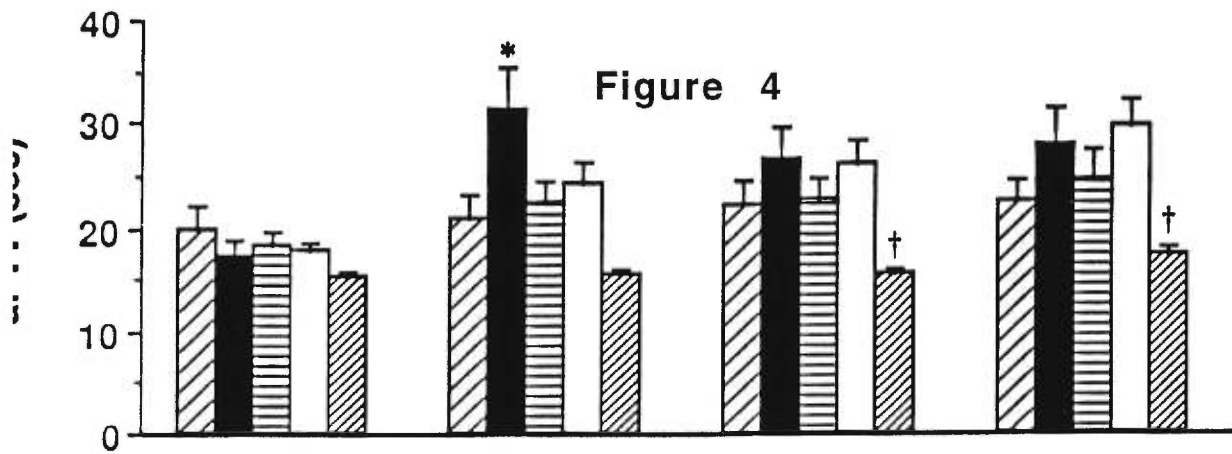


Figure 5

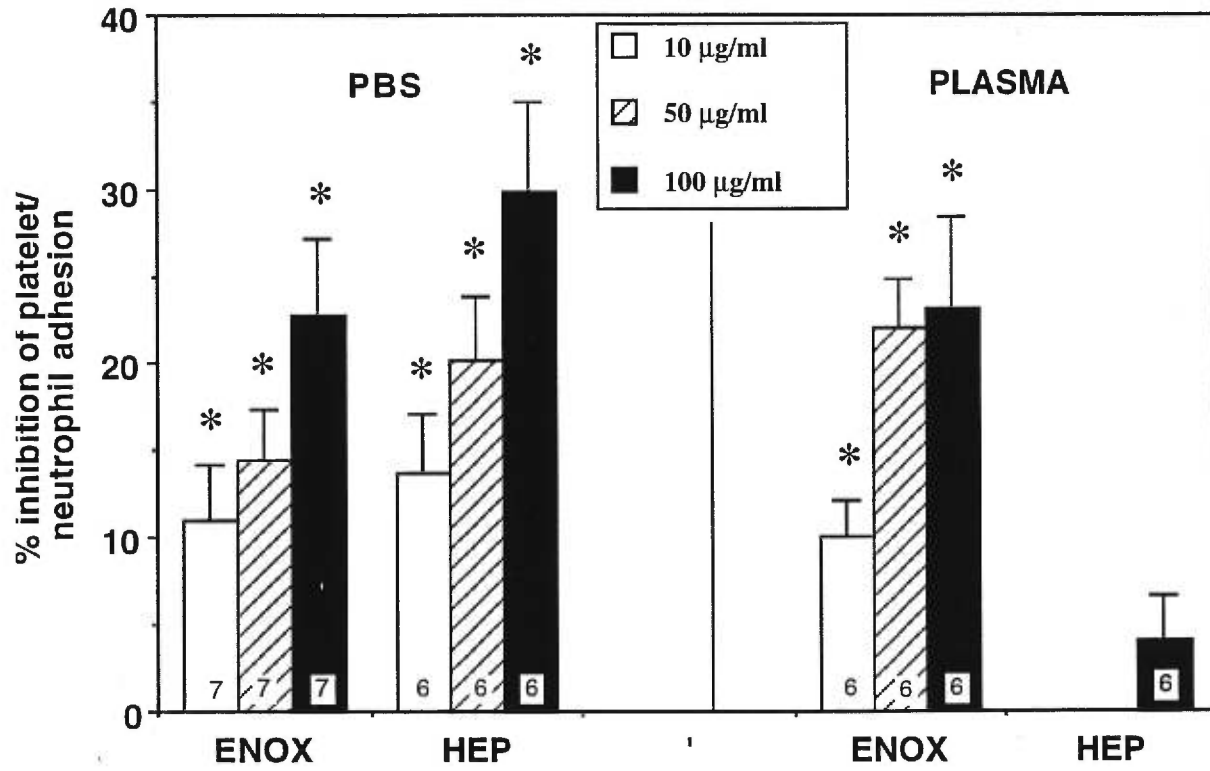


TABLE 1. Myocardial Area at Risk, Infarct Size, Collateral and Regional Blood Flow

GROUPS	1	2	3	4	5
Treatment	Control	Heparin	Enoxaparin	Enoxaparin + Streptokinase	Streptokinase
Number of dogs	7	7	7	7	7
Area at risk (AR) (% of LV)	38.4±1.7	44.7±5.4	44.0±3.0	35.8±3.1	44.8±2.0
Infarct size (% of AR)	48.1±4.5	32.2±3.6	21.6±5.5*	24.9±3.9*†	46.8±3.4
BLOOD FLOW (ml/min/g)					
(15 min of occlusion)					
Ischemic area					
Subendocardium	0.04±0.01	0.04±0.02	0.06±0.02	0.07±0.01	0.03±0.01
Mesomyocardium	0.06±0.02	0.07±0.01	0.09±0.02	0.1±0.02	0.07±0.03
Subepicardium	0.11±0.03	0.19±0.03	0.15±0.04	0.15±0.02	0.16±0.04
Transmural	0.07±0.02	0.10±0.02	0.10±0.02	0.11±0.02	0.09±0.02
Non-ischemic area					
Subendocardium	1.42±0.22	1.34±0.15	0.83±0.19	0.72±0.10*†	1.41±0.10
Mesomyocardium	1.34±0.18	1.35±0.16	1.01±0.20	0.78±0.06†	1.30±0.09
Subepicardium	1.19±0.16	1.18±0.08	1.0±0.22	0.92±0.08	1.31±0.07
Transmural	1.32±0.18	1.29±0.13	0.94±0.20	0.80±0.07	1.34±0.08

Results: means ± SE. LV: left ventricle. * $P < .05$ vs control; † $P < .05$ vs streptokinase.

Intravenous Aspirin at Reperfusion Does not Reduce Infarct Size in the Dog¹

DANIELLE LIBERSAN^{2,4}, ERIC QUAN^{1,4}, YAHYE MERHI^{3,4}, ANDRE UZAN⁵ AND JEAN-GILLES LATOUR^{1,4}

From the Departments of Pathology¹, Pharmacology² and Medicine³, Université de Montréal, the Laboratory of Experimental Pathology⁴, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada, and Rhône Poulenc Rorer Inc⁵. France.

Running title : Aspirin and infarct size

Address for proofs and reprints: Dr. Jean-Gilles Latour, Director, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. East, Montreal, Quebec, Canada. Tel. (514) 376-3330 #3610, Fax: (514) 376-1441.

Abbreviations: ASA, aspirin; acetylsalicylic acid; LADCA, left anterior descending coronary artery; MPO, myeloperoxidase; MDA, malondialdehyde; ANOVA, one-way analysis of variance; PGI₂, Prostaglandin I₂; prostacyclin; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; TxA₂, Thomboxane A₂; KCl, potassium chloride; PRP, pressure-rate product.

Abstract

Because platelet-related events are associated with the increment of infarct size by reperfusion in the presence of a residual critical stenosis, we tested if low (2 and 6 mg) and moderate (12 mg) intravenous doses of aspirin (ASA) could limit infarct size in the dog. The left anterior descending coronary artery was occluded for 90 min and then reperfused for 6 hrs in the presence of a residual critical stenosis. Controls received saline and treated groups were given 2, 6 or 12 mg/kg ASA i.v., 5 min before reperfusion. Infarct size did not differ significantly between groups (Control: $43.80 \pm 6.28\%$; ASA 2 mg: 41.07 ± 7.78 ; ASA 6 mg: 37.55 ± 3.44 ; ASA 12 mg: 29.40 ± 5.41) as well as transmural collateral blood flow. Platelet accumulation in the infarcted myocardium varied non significantly between groups (2.5 to 3.6×10^5 platelets/g). However, myocardial neutrophil counts estimated by tissue myeloperoxidase activity was significantly reduced ($P < .05$) in groups given 6 ($15.0 \pm 2.6 \times 10^6$ /g tissue) and 12 mg (18.4 ± 3.8) ASA, but not in the 2 mg group (21.0 ± 5.2) as compared to control animals (32.0 ± 7.2). Ex-vivo platelet aggregation to collagen was reduced during reperfusion in all treated groups ($P < .05$). Transcardiac arteriovenous differences in 6-keto-PGF_{1 α} were reduced significantly 1 hr after reperfusion in groups given ASA 6 or 12 mg (94.7 ± 13.1 ; and 71.7 ± 19.2 pg/ml respectively) but not in the ASA 2 mg group (178.3 ± 78.2), as compared to control (405.4 ± 171.6). We conclude that intravenous ASA given before reperfusion does not reduce infarct size in a dog model reperfusing with a residual critical stenosis. The platelet accumulation in the reperfused myocardium appears to be ASA-insensitive. Platelet activation at the site of stenosis and inhibition of prostacyclin production by ASA may be connected to the lack of effect of ASA in this study.

Early reperfusion of ischemic myocardium limits the extent of necrosis (Reimer et al., 1977) and preserves left ventricular function (GUSTO, 1993). However, numerous studies support the concept that benefits of reperfusion on infarct size may be attenuated by reperfusion injury (Braunwald and Kloner, 1985) which appears to be mediated by cytotoxic materials such as free oxygen radicals (Jolly et al., 1984), lysosomal enzymes (Wildenthal, 1978) and lipid metabolites (McCluskey et al., 1985), and vasoactive reactions (Gavin et al., 1983) including leukocyte microcirculatory plugging (Engler et al., 1983), which may compromise reflow and survival of jeopardized but viable myocardium.

Although neutrophils are suspected to play a key role in reperfusion injury, reperfusion in the presence of a residual critical stenosis has been reported to increase infarct size through a platelet-dependent mechanism (Rousseau et al., 1993). This finding is clinically relevant as more than 75% of patients with successful thrombolytic therapy present a significant residual stenosis in the infarct related coronary artery (Van Lierde et al., 1990), suggesting that inhibition of platelet function may potentially salvage myocardium under these conditions. This hypothesis is supported by a recent study (Barrabés et al., 1996) reporting limitation of infarct size by aspirin (ASA) in a pig model of myocardial ischemia and reperfusion with intimal injury, but contrast with failures of antiplatelet therapies to reduce infarct size in dog models without induced intimal injury and sustained residual stenosis during reperfusion (Mullane and Fornabaio, 1988; Grover and Shumacher, 1989).

In addition to its inhibitory effect on platelet function, ASA has diffuse effects *in vivo*. ASA interferes with release of vasoactive agents such as serotonin (Raymenants et al., 1993), modulates leukocyte chemotaxis (Haşçelik et al., 1994), adhesion (Dembinska-Kiec et al., 1993; Merhi et al., 1997) and oxidative stress (Haynes et al., 1993), influences expression of adhesion molecules (Díaz-González et al., 1995), complement components (Trinder et al., 1995) and inflammatory cell transcription factors (Weber et al., 1995). Although some of these effects being potentially beneficial on reperfusion injury, it is not clear if ASA can limit reperfusion injury and infarct size by other mechanisms than preventing vessel reocclusion, and if this effect is dose-

dependent.

The present study was designed to investigate in a canine model of myocardial ischemia with a residual critical stenosis at reperfusion, the effects of low and moderate intravenous doses of ASA on infarct size.

Methods

Ischemia and reperfusion. Mongrel dogs of either sex weighing 18 to 28 kg were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.v.), intubated and ventilated mechanically with room air. Blood gases and pH were kept within physiologic range, and lead II electrocardiogram was monitored continuously. Catheters were inserted in the right femoral vein and artery for blood sampling and in the left artery for blood pressure monitoring. After injecting pancuronium bromide (0.1 mg/kg, i.v.), a left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the heart suspended in a pericardial cradle. A catheter was introduced in the left atrium for radioactive microsphere injections. An 8F micromanometer-tipped pigtail catheter pressure transducer (Model SPC-484A; Millar Instruments Inc., Houston, TX) was introduced in the left femoral artery and advanced into the left ventricle for pulsatile blood pressure monitoring.

The left anterior descending coronary artery (LADCA) was isolated distal to its first diagonal branch and an electromagnetic flowmeter was fitted to measure coronary blood flow. Five min before occlusion, a micrometer occluder was adjusted on the LADCA to produce an eccentric critical coronary stenosis sufficient to abolish the hyperemic response produced after the release of a 10-sec occlusion without affecting basal blood flow. In all groups, the LADCA was occluded for 90 min followed by 6 hrs reperfusion in the presence of the critical stenosis. Animals that failed to develop persistent cyanosis of the epicardial surface and ST segment changes (< 0.1 mV) after 10 min of occlusion were excluded from the study. Animals presenting refractory ventricular fibrillation after 3 successive attempts for cardioversion were also excluded.

Studies adhered to the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Care and were approved by a local committee.

Experiments. Animals were allocated at random among groups. Controls received an intravenous injection of physiologic saline (10 ml), 5 min before reperfusion. Treated dogs were given an intravenous injection of soluble aspirin (Lysine-ASA, Aspegic, Synthélabo, France) corresponding to 2, 6, or 12 mg/kg standard ASA, 5 min before onset of reperfusion.

Infarct sizing. Infarct sizing has been described in details elsewhere (Chatelain et al.,

1987). Briefly, after 6 hrs reperfusion, heparin (10 000 U) was given and the animals were sacrificed. The heart was rapidly excised, and the site of the LADCA occlusion and the aorta above the coronary ostia were cannulated and perfused with saline (0.9%) and, subsequently, by perfusion of the aorta with Evans blue dye 0.5% (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). The left heart was then embedded in a polyurethane foam and cut into 7 mm thick transverse slices. The slices were weighed and immersed in triphenyltetrazolium chloride (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) 1.5% in Tris buffer (2.4%, pH 7.8) for 10 min at 37°C. The normally perfused myocardium, the area at risk of ischemia, the necrotic myocardium and the hemorrhagic areas were delineated and respective areas were measured on each slice by computerized planimetry. The area at risk was expressed as a percentage of the left ventricle and the infarct size as a percentage of the area at risk.

Regional and collateral myocardial blood flow. Regional and collateral blood flow were measured as described previously (de Lorgeril et al., 1989) after 15 min of coronary occlusion and at 3 hrs reperfusion using microspheres (15 μ m) labeled with ^{57}Co or ^{85}Sr (NEN Dupont Canada Inc., Mississauga, Ontario). Approximately 3-4 million microspheres were injected into the left atrium and a reference arterial blood sample was withdrawn from the femoral artery at a constant rate with a syringe pump (Harvard Apparatus Corp., USA) for 150 sec. Three to four central slices were divided into non-ischemic and ischemic regions. Sections from the central ischemic area and from the wall opposite to the area at risk were dissected into three equal subepicardial, mesomyocardial, and subendocardial portions. Each sample was weighed and counted in a gamma counter (Packard 5000, Downers Grove, IL) with selected energy windows. Myocardial blood flow was calculated and expressed in ml/min/g of tissue.

Platelet isolation and ^{111}In -labeling. Preparation of autologous labeled platelet suspensions has been described previously (Rousseau et al., 1993). Briefly, platelets were isolated from each dog by centrifuging citrated venous blood. After four successive washings with tyrode, the platelets were incubated for 1 min with approximately 300 μCi ^{111}In -oxine (Amersham, Canada). Platelet-poor supernatant was added to bind excess free ^{111}In -oxine and discarded after

centrifugation. The platelets were resuspended in 5 ml platelet-poor plasma and injected intravenously (mean: $2077 \pm 134 \times 10^6$), prior to occlusion.

Platelet accumulation in myocardial tissue. Infarcted, ischemic and normal non-ischemic myocardium from the opposite free wall were dissected, weighed and counted in a gamma counter for 5 min. The labeled-cell counts were determined by reporting the values obtained over that of the standard (1×10^6 platelets), and accumulations were estimated per gram of tissue for each region. As variable amounts of labeled platelets were injected, the values were normalized between dogs by using the mean cell counts ($1182 \pm 70 \times 10^6$) circulating prior reperfusion from all experiments (Rousseau et al., 1993), assuming a blood volume of 75 ml/kg of body weight (Rapaport et al., 1956).

Neutrophil accumulation in myocardial tissue. Neutrophil counts in myocardial tissue were estimated by neutrophil-specific myeloperoxidase (MPO) activity as described previously (Rousseau et al., 1991) using *O*-dianisidine and hydrogen peroxide as substrates. To establish a reference curve in each dog between MPO activity and neutrophil counts, blood neutrophils were isolated from venous blood withdrawn immediately after anesthesia. Briefly, following centrifugation, the neutrophils were recovered from the second layer and washed twice in a double volume Hank's balanced salt solution. Contaminating red blood cells were eliminated by hypotonic hemolysis. The cells were counted with an electronic cell counter (Coulter Corporation, USA), and suspensions containing 1×10^6 to 4×10^6 neutrophils were prepared and frozen at -70°C for later use.

Myocardial tissue MPO activity was assayed in all dogs using a central ventricular slice rapidly removed and stored at -70°C . Tissue samples (100 mg) were taken from the subepicardial layer of the infarct approximately 1-1.5 mm under the salvaged myocardium; small ($< 5\%$ area at risk) and patchy infarcts were not assayed. Briefly, samples were thawed and refrozen once in liquid nitrogen, crushed with a pillar and homogenized in 1.5 ml hexyl at 4°C . The homogenate was freeze-thawed three times in liquid nitrogen with 10-sec sonication over ice between each freezing. The homogenate was centrifuged 20 min at 12500g, and the supernatant was assayed for

MPO by adding to a 0.1 ml of sample, 2.9 ml of phosphate buffer containing $8.35 \times 10^{-3}\%$ *O*-dianisidine dihydrochloride and hydrogen peroxide 0.3%. Absorbency was read at 460 nm over 3 min. Results were expressed as 10^6 neutrophils/g of wet tissue by referring to the neutrophil reference curve constructed with MPO values of each animal neutrophil concentrates.

Tissue malondialdehyde assays. Thiobarbituric acid reactive materials, an index of malondialdehyde (MDA) and lipid peroxidation, were measured according to the method of Ohkawa et al., (1979). Myocardial samples were obtained from the same slices and areas as used for MPO determinations; 100 mg tissue samples were homogenized in 1 ml 1.15% KCl for 60 sec at 4°C. Aliquots (0.25 ml) were mixed with 0.25 ml sodium dodecyl sulfate and then with 0.75 ml 20% acetic acid, 0.75 ml 0.8% thiobarbituric acid and 0.5 ml bidistilled water in Pyrex tubes. After mixing thoroughly, tubes were heated at 95°C for 1 hr and cooled rapidly over ice. After adding 0.5 ml bidistilled water and 3 ml of a 15:1 (v/v) mixture of *n*-butanol and pyridine 4:1 (v/v), the tubes were shaken vigorously and centrifuged at 3000g for 10 min. Absorbency of the organic upper layer was measured at 532 nm. Values were estimated by referring to a reference curve, where MDA standards (2, 4, 6 and 8 nmol/l) were substituted to tissue extracts, and expressed in nmol/mg of myocardial protein.

Plasma 6-keto-PGF_{1α}. Prostacyclin (PGI₂) stable metabolite (6-keto-PGF_{1α}) was extracted from plasma and assayed by radioimmunoassay using a commercial kit (Amersham International, UK). Blood samples (2.25 ml) were collected simultaneously from the left coronary vein and the aorta at 84 min occlusion and 1 hr reperfusion into an EDTA anticoagulant mixture containing aspirin. After centrifugation (3000g, 30 min, 4°C), plasma was collected and stored at -70°C until assay.

Platelet aggregation. Platelet aggregation was tested by impedance aggregometry (Chrono-Log Corp., USA) within 1 min of sampling on heparinized (5U/ml) venous whole blood (Diodati et al., 1990) obtained just prior to ASA injection (84 min occlusion), and 5 min later (89 min occlusion), and after 1hr, 3hrs and 6hrs of reperfusion. Blood (490 μl) diluted with 500 μl saline (37°C) was challenged with 1 μg (10 μl) collagen (Yu and Latour, 1977) and the extent of

aggregation estimated as the surface area under the curve response obtained during 5 min after adding collagen.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm S.E. for each group. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a Levene test for equal variance were used to investigate treatment differences coupled to a Dunnett's test for mean comparison between treated and control groups. Intragroup comparisons of hemodynamic and aggregation data were analyzed with ANOVA for repeated measures followed by a Dunnett's test between time values and values at baseline. A covariance analysis between infarct size (dependent variable) and collateral blood flow (covariate) was used in controlling the variability in infarct size due to collateral blood flow. A two-tail Fisher exact test was applied to the incidence of ventricular fibrillation and gender distribution. Platelet accumulations, MPO and MDA determinations in respective myocardial tissue areas were analyzed by non-paired and pairwise ANOVA and Bonferroni t-test. Transcardiac differences in plasma $\text{PGF}_{1\alpha}$ concentrations between baseline and 1 hr reperfusion were analyzed by a paired Student's t-test and ANOVA with a P value set at 0.0167 as 3 comparisons were made. If not otherwise specified, differences were considered statistically significant with $P < .05$.

Results

Group characteristics and hematologic data (Table 1). One hundred and eleven dogs were used in the study. Fourteen dogs were excluded (5 Controls; 3 ASA 2 mg; 2 ASA 6 mg; 4 ASA 12 mg) because of collateral subendocardial blood flow > 0.15 ml/g/min (Rousseau et al., 1993). Fifty-five dogs died of refractory ventricular fibrillation; 19 at occlusion before initiating experimental treatments and 36 during reperfusion. Differences in the incidence of ventricular fibrillation between groups were not statistically significant. Thus, 42 dogs were included in the final analysis. There were no statistical differences between groups regarding gender distribution, weight or hematologic data.

Hemodynamic data (Table 2). Differences in heart rate, peak left ventricular pressure, pressure-rate product (PRP) and LADCA flow were not statistically significant between groups before and during ischemia and in the course of reperfusion. However, as indicated in table 2, intragroup comparisons indicate that the PRP decreased in a significant manner ($P<.05$) in all the groups during the last hour of reperfusion. As well, the LADCA flow decreased significantly ($P<.05$) in every group during the last 3 hours of reperfusion.

Infarct size and collateral blood flow (Table 3 and Figure 1). The area at risk of ischemia involved approximately 40% of the left ventricle in each group. Infarct size expressed as a percentage of the area at risk was not different statistically (ANOVA) between groups (Control: 43.80 ± 6.28 ; ASA 2 mg: 41.07 ± 7.78 ; ASA 6 mg: 37.55 ± 3.44 ; ASA 12 mg: 29.39 ± 5.41). As shown in table 3, transmural and regional collateral blood flows in the ischemic areas at 15 min occlusion and after 3 hrs of reperfusion were not different statistically between groups. In the non-ischemic region, transmural collateral blood flows approximate 1 ml/min/g in all groups (P : NS). Covariance analysis between infarct size and transmural collateral blood flow (Figure 1) confirms that infarct size does not differ significantly between control and treated groups. Increases in serum creatine phosphokinase concentrations were not statistically significant between control and ASA treated groups. Mean group values ranged between 274 and 323 at baseline and between 9023 and 11308 U/l serum after 6 hrs of reperfusion. Intramyocardial hemorrhages were located within the

infarct; their surface areas expressed in percent of the infarcted zone were not statistically different between control and ASA treated groups (Control: 34.80 ± 10.47 ; ASA 2 mg: 35.46 ± 11.52 ; ASA 6 mg: 52.07 ± 8.00 ; ASA 12 mg: 39.17 ± 9.32).

^{111}In -Platelet accumulations (Figure 2). ^{111}In -platelet counts in the infarcted myocardium varied from 2.5 to 3.6×10^5 platelets/g between groups. These counts were about 2 to 3 times those estimated in the viable area at risk (0.9 to 1.3×10^5 platelets/g) and the normal non-ischemic myocardium. Differences between groups in these respective areas were not statistically significant, indicating that ASA had no effect on platelet accumulation in the reperfused myocardium.

Neutrophil accumulations (Figure 3) and malondialdehyde concentrations (Figure 4). Neutrophil counts in normal non-ischemic myocardium were below $0.230 \times 10^6/\text{g}$ in all groups. In contrast to this, mean counts in the infarcted samples of control group were $32.0 \pm 2.7 \times 10^6/\text{g}$. Neutrophil counts in the infarcts of ASA treated groups were reduced as compared to control group, but differences were significant only with ASA 6 mg ($15.0 \pm 2.6 \times 10^6/\text{g}$) and ASA 12 mg ($18.4 \pm 3.8 \times 10^6/\text{g}$) and not with ASA 2 mg ($21.0 \pm 5.2 \times 10^6/\text{g}$). Tissue MDA levels were reduced significantly and parallel in both the infarct and the normal non-ischemic myocardium in groups given ASA 2, 6 and 12 mg as compared to control group.

Platelet aggregation (Figure 5). Ex-vivo platelet aggregation to collagen was virtually abolished ($P < .05$) 5 min after administering 6 and 12 mg/kg ASA and throughout reperfusion. Platelet aggregation was also inhibited ($P < .05$) during reperfusion in the ASA 2 mg group, but inhibition was achieved after 1 hr of reperfusion.

Plasma 6-keto-PGF_{1 α} (Figure 6). Transcardiac arteriovenous differences in 6-keto-PGF_{1 α} levels were similar between groups before ASA treatment. However, after 1 hr reperfusion, values in transcardiac PGF_{1 α} levels were reduced significantly in groups given 6 mg (94.7 ± 13.1) and 12 mg/kg ASA (71.7 ± 19.2 pg/ml) as compared to control group (405.4 ± 171.6). However, the

lower values measured in the 2 mg ASA group (178.3 ± 78.2 pg/ml) were not statistically different from that of the control group.

Discussion

The results of the present study demonstrate that neither low or moderate intravenous doses of ASA, given just prior to reperfusion and inhibiting ex-vivo platelet aggregation, limited myocardial platelet accumulation and infarct size, in a model of myocardial ischemia with reperfusion in the presence of a residual critical stenosis, without induced intimal damage. It appears that ASA does not prevent tissue necrosis associated with reperfusion injury in this model, in spite of reductions in neutrophil accumulation in the reperfused myocardium, and myocardial lipid peroxidation.

The purpose of testing ASA in such a model was motivated by : -our previous observation (Rousseau et al., 1993) that persistence of a residual critical stenosis during reperfusion results into a platelet-mediated increase of infarct size; -the observation that >75% of patients with successful thrombolysis present a significant residual stenosis in the infarct related artery (Van Lierde et al., 1990); -the use and benefits of ASA to limit coronary reocclusion after thrombolytic therapy (Roux et al., 1992); -a recent study (Barrabés et al., 1996) reporting limitation of infarct size by 10 mg/kg ASA in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion, with induced intimal damage.

Because platelets do not apparently play a major role on ultimate infarct size and reperfusion injury in models with full restoration of the coronary lumen following occlusion as indicated by failure of thrombocytopenia to limit infarct size under such conditions (Jolly et al., 1985; Mullane and McGiff, 1985; Mullane and Fornabaio, 1988), it is not surprising that inhibition of thromboxane A₂-mediated platelet aggregation by low (3-5 mg/kg) (Mullane and Fornabaio, 1988) or high (40 mg/kg) doses of ASA (Grover and Schumacher, 1989) failed to reduce infarct size. However, in the present study, ASA also failed to reduce infarct size in a model where a residual critical stenosis at reperfusion enhances platelet accumulation in the reperfused myocardium, and increases infarct size by a platelet-dependent mechanism, as indicated by its prevention by thrombocytopenia (Rousseau et al., 1993). If ASA appears ineffective to protect jeopardized reperfused myocardium in our platelet-sensitive model, Barrabés et al., (1996), successfully reduced infarct size with ASA in a model with an intimal damage-induced residual

stenosis made of deposition of thrombotic materials. Therefore, the benefits of ASA on infarct size in their model may have been more likely related to an action of ASA at the site of the intimal damage, such as preventing or reducing cyclic platelet occlusive thrombi formation, rather than by inhibiting ASA-sensitive platelet reactions and release of materials potentially harmful to jeopardized reperfused myocardium. In other terms, ASA appears ineffective for prevention of cell death associated with reperfusion injury, but may otherwise salvage myocardium during reperfusion, by modulating reocclusion processes at the sites of arterial injury.

This study rules out platelet aggregation as an important mechanism regulating platelet accumulation in the reperfused myocardium. At doses inhibiting severely platelet aggregation and the cyclooxygenase activity, as indicated by reductions in transcardiac levels of PGI₂, ASA failed to attenuate myocardial platelet accumulation. It remains unclear how platelets interact in the reperfused myocardium, and how their presence becomes so critical when reperfusion takes place through a residual critical stenosis. If platelet activation mediated by ASA-insensitive pathways cannot be excluded, one alternative mechanism consists in the platelet activation (Barstad et al., 1996) by shear forces and expression of P-selectin at the level of the stenosis, and adhesion downstream in the reperfused vasculature. P-selectin stored in platelet α -granules is expressed upon platelet activation and mediates platelet-leukocytes adhesion by way of binding to neutrophil ligand sialyl Lewis^X (McEver et al., 1995). The fact that platelets can express P-selectin despite cyclooxygenase inhibition by ASA (Rinder et al., 1993), may explain the lack of effect of ASA in our study on myocardial platelet accumulation. Importance of P-selectin in the pathogenesis of reperfusion injury has been documented by the efficacy of a selectin blocker (Flynn et al., 1996; Lefer et al., 1994) or monoclonal antibody to P-selectin (Weyrich et al., 1993) to reduce infarct size in experimental models of myocardial ischemia and reperfusion.

Platelets and neutrophils are found together at sites of inflammation and thrombosis (Bazzoni et al., 1991; Merhi et al., 1995). Cooperation between adherent platelets and neutrophils modulates each other function and results in enhanced release of free radicals (Ward et al., 1988) and vasoactive substances (Maugeri et al., 1992). Platelets thus play an active role in the

inflammatory processes either directly by producing or releasing active agents, by interacting or activating neutrophils (Tsuji et al., 1994), or by exchanging lipid precursors and generating new lipid derivatives by transcellular metabolism (Maugeri et al., 1992). On the other hand, it is well known that acetylation of cyclooxygenase by ASA shift arachidonic acid metabolism toward the lipoxygenase pathway (Brezinski et al., 1992) with increased production of leukotrienes. Simultaneous inhibition of both the lipoxygenase and the cyclooxygenase pathways of arachidonic acid metabolism reduces platelet and neutrophil interactions at the sites of arterial injury (Provost and Merhi, 1996) and limits infarct size in animal models of ischemia and reperfusion (Jolly and Lucchesi, 1983).

The lack of effect of ASA in our model may also be related to the severity of the residual stenosis increasing shear stress locally. Folts and colleagues (1976) have demonstrated that cyclic flow variations could be abolished by ASA when coronary narrowing averaged 70%, but increasing the stenosis to 80% caused increase in shear stress by 56%, and re-establishment of cyclic flow variations (Maalej and Folts, 1996). Our approach to establish the critical stenosis leads to a coronary lumen narrowing by more than 70% (Gallagher et al., 1978; Mullane and McGiff, 1985; Jolly et al., 1985). Shear stress is a powerful platelet activation factor (Ruggeri, 1993) and severity of our stenosis may have overwhelmed the ability of ASA to prevent shear stress-induced platelet activation at the stenosis (Barstad et al., 1996). Studies with ASA in the presence of milder residual stenosis should clarify this issue, but more potent and specific platelet antagonists, such as GPIIb-IIIa receptor blockers, may afford better protection.

It can also be argued that ASA-inhibition of prostaglandins (Mullane et Fornabaio, 1988) and PGI₂ synthesis may be detrimental for reperfused ischemic myocardium, PGI₂ being a natural and potent cytoprotective agent inhibiting both platelet function and neutrophil adhesion. Supplementation with PGI₂ analogs during reperfusion reduces both myocardial neutrophil accumulation and infarct size (Simpson et al, 1987; Hohlfeld et al., 1993). Eventhough endothelial inhibition of cyclooxygenase and PGI₂ synthesis is less susceptible to ASA therapy than platelet TxA₂ formation, the lowest dose of ASA that we used reduced PGI₂ production by reperfused

myocardium, although not to a significant level as seen with doses of 6 and 12 mg/kg. Higher circulating levels of ASA produced by intravenous injection as compared to orally administered ASA which is rapidly transformed into salicylate (Pedersen and FitzGerald, 1984)) may explain the trend for PGI₂ inhibition with the low dose of ASA and the lack of benefit on infarct size.

In the present study, ASA reduced neutrophil sequestration and myocardial lipid peroxidation as estimated by malondialdehyde activity. ASA may have elicited these effects through interference with neutrophil chemotaxis (Hasçelik et al., 1994) and by reducing oxidative stress, or by scavenging free oxygen radicals through salicylate production (van Jaarsveld et al., 1994). Arachidonic acid metabolism via cyclooxygenase pathway is a major source of superoxide anion radicals (Armstead et al., 1988), and reactive oxygen species activate platelets (Ikeda et al., 1994), leukocytes and endothelium. ASA-induced cyclooxygenase inhibition may be responsible for the inhibition of neutrophil mobilization and associated production of oxygen-derived radicals. The decrease in neutrophil accumulation in the presence of ASA can also be related to its inhibitory effect on neutrophil L-selectin, which mediates neutrophil rolling and adhesion to the endothelium (Díaz-González et al., 1995). Eventhough numerous studies have proven successful in limiting infarct size by interfering with neutrophils (de Lorgeril et al., 1989; Kilgore and Lucchesi, 1993; Lefer et al., 1994), the reduction in neutrophil accumulation and lipid peroxidation observed in the present study with ASA did not translate into limitation of infarct size. This observation may be connected to the fact that platelets may play a primary role as compared to neutrophils in the increment of infarct size upon reperfusion in the presence of a residual critical stenosis, as suggested by the observation that combined neutropenia and thrombocytopenia does not afford better limitation of infarct size than thrombocytopenia alone under these conditions (Rousseau et al., 1993).

We conclude that ASA at reperfusion does not limit infarct size in a dog model where a sustained residual critical stenosis during reperfusion results into a platelet-mediated increase of infarct size. Platelet accumulation and involvement in reperfusion injury thus appears ASA-insensitive, and benefits of ASA for limitation of infarct size may be limited to its ability to interfere

with coronary reocclusion at sites of vessel damage. A search for more potent and specific antiplatelet drugs not interacting with prostacyclin synthesis may prove to be a better approach to limit tissue injury and optimize myocardial salvage by reperfusion.

Acknowledgments

The authors wish to thank Robert Clément BSc, Claudette Léger-Gauthier PhD, Duc C. Tran MD, MSc for their technical assistance, and Nicole Serruys for her secretarial support.

References

- Armstead, W.M., Mirro, R., Busija, D.W. and Leffler, C.W.: Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am. J. Physiol.* 255: H401-H403, 1988.
- Barrabés, J.A., Garcia-Dorado, D., Oliveras, J., González, M.A., Ruiz-Meana, M., Solares, J., García Burillo, A., Lidón, R-M., Antolín, M., Castell, J. and Soler-Soler, J.: Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Eur. J. Physiol.* 432: 663-670, 1996.
- Barstad, R.M., Ørvim, U., Hamers, M.J.A.G., Tjønnfjord, G.E., Brosstad, F.R. and Sakariassen, K.S.: Reduced effect of aspirin on thrombus formation at high shear and disturbed laminar blood flow. *Thromb. Haemost.* 75: 827-832, 1996.
- Bazzoni, G., Dejana, E. and Del Maschio, A.: Platelet-neutrophil interactions: possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica.* 76: 491-499, 1991.
- Braunwald, E. and Kloner, R.A.: Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76: 1713-1719, 1985.
- Brezinski, DA., Nesto, RW. and Serhan, CN.: Angioplasty triggers intracoronary leukotrienes and lipoxin A₄. Impact of aspirin therapy. *Circulation.* 86: 56-63, 1992.
- Chatelain, P., Latour, J-G., Tran, D., de Lorgeril, M., Dupras, G. and Bourassa, M.: Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation.* 75: 1083-1090, 1987.
- de Lorgeril, M., Basmadjian, A., Lavallée, M., Clément, R., Millette, D., Rousseau, G. and Latour JG.: Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am. Heart J.* 117: 523-532, 1989.
- Dembinska-Kiec, A., Zmuda, A., Wenhryniewicz, O., Stachura, J., Peskar, B.A. and Gryglewski, R.J.: Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int. J. Tiss. Reac.* 15: 55-64, 1993.
- Díaz-González, F., González-Alvaro, I., Campanero, M.R., Mollinedo, F., del Pozo, M.A.,

- Muñoz, C., Pivel, J.P. and Sánchez-Madrid, F.: Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Clin. Invest.* 95: 1756-1765, 1995.
- Diodati, J., Thérroux, P., Latour, J-G., Lacoste, L., Lam, J.Y.T. and Waters, D.: Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 66: 683-688, 1990.
- Engler, R.L., Schmid-Schönbein, G.W. and Pavelec, R.S.: Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am. J. Pathol.* 111: 98-111, 1983.
- Flynn, D.M., Buda, A.J., Jeffords, P.R. and Lefer, D.J.: A sialyl Lewis^x-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 271: H2086-H2096, 1996.
- Folts, J.D., Crowell, Jr., E.B. and Rowe, G.G.: Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation.* 54: 365-370, 1976.
- Gallagher, K.P., Folts, J.D. and Rowe, G.G.: Comparison of coronary arteriograms with direct measurements of stenosed coronary arteries in dogs. *Am. Heart J.* 95: 338-347, 1978.
- Gavin, J.B., Humphrey, S.M. and Herdson, P.B.: The no-reflow phenomenon in ischemic myocardium. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 25: 361-383, 1983.
- Grover, G.J. and Schumacher, W.A.: Effect of the thromboxane A₂ receptor antagonist SQ 30,741 on ultimate myocardial infarct size, reperfusion injury and coronary flow reserve. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 484-491, 1989.
- GUSTO Angiographic Investigators.: The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 329: 1615-1622, 1993.
- Hasçelik, G., Sener, B. and Hasçelik, Z.: Effect of some anti-inflammatory drugs on human neutrophil chemotaxis. *J. Int. Med. Res.* 22: 100-106, 1994.
- Haynes, D.R., Wright, P.F.A., Gadd, S.J., Whitehouse, M.W. and Vernon-Roberts, B.: Is aspirin a prodrug for antioxidant and cytokine-modulating oxymetabolites? *Agents Actions.*

- 39: 49-58, 1993.
- Hohlfeld, T., Strobach, H. and Schrör, K.: Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 397-405, 1993.
- Ikeda, H., Koga, Y., Oda, T., Kuwano, K., Nakayama, H., Ueno, T., Toshima, H., Michael, L.H. and Entman, M.L.: Free oxygen radicals contribute to platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured canine coronary arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24: 1749-1756, 1994.
- Jolly, S.R. and Lucchesi B.R.: Effect of BW755C in an occlusion-reperfusion model of ischemic myocardial injury. *Am. Heart J.* 106: 8-13, 1983.
- Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, M.B., Abrams, G.D. and Lucchesi, B.R.: Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* 54: 277-285, 1984.
- Jolly, S.R., Schumacher, W.A., Kunkel, S.L., Abrams, G.D., Lidicoat, J. and Lucchesi, B.R.: Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 80: 269-279, 1985.
- Kilgore, K.S. and Lucchesi, B.R.: Reperfusion injury after myocardial infarction: the role of free radicals and the inflammatory response. *Clin. Biochem.* 26: 359-370, 1993.
- Lefer, D.J., Flynn, D.M., Phillips, M.L., Ratcliffe, M. and Buja, A.J.: A novel sialyl Lewis^x analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation.* 90: 2390-2401, 1994.
- Maalej, N. and Folts, J.D.: Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation.* 93: 1201-1205, 1996.
- Maugeri, N., Evangelista, V., Piccardoni, P., Dell'Elba, G., Celardo, A., de Gaetano, G. and Cerletti, C.: Transcellular metabolism of arachidonic acid: increased platelet thromboxane generation in the presence of activated polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 80: 447-451, 1992.

- McCluskey, E.R., Murphree, S., Saffitz J.E., Morrison, A.R. and Needleman, P.: Temporal changes in 12-HETE formation in two models of canine myocardial infarction. *Prostaglandins*. 29: 387-403, 1985.
- McEver, R.P., Moore, K.L. and Cummings, R.D.: Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* 270: 11025-11028, 1995.
- Merhi, Y., Guidoin, R., Provost, P., Leung, T-K. and Lam, J.Y.T.: Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty. *Am. Heart J.* 129: 445-451, 1995.
- Merhi, Y., Provost, P., Guidoin, R. and Latour, J-G.: Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction following arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1185-1191, 1997.
- Mullane, K.M. and Fornabaio, D.: Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent, aspirin-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 62: 668-678, 1988.
- Mullane, K.M. and McGiff, J.C.: Platelet depletion and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7: 733-738, 1985.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358, 1979.
- Pedersen, AK. and FitzGerald, GA.: Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N. Engl. J. Med.* 311: 1206-1211, 1984.
- Provost, P. and Merhi, Y.: BW755C, a dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, reduces mural platelet and neutrophil deposition and vasoconstriction after angioplasty injury in pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 17-21, 1996.
- Rapaport, E., Kuida, H., Haynes, F.W. and Dexter, L.: Pulmonary red cell and plasma volumes and pulmonary hematocrit in the normal dog. *Am. J. Physiol.* 185: 127-132, 1956.
- Raymenants, E., Yang, B., Nicolini, F., Behrens, P., Lawson, D. and Mehta, J.L.: Verapamil and aspirin modulate platelet-mediated vasomotion in arterial segments with intact and

- disrupted endothelium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22: 684-689, 1993.
- Reimer, K.A., Lowe, J.E., Rasmussen, M.M. and Jennings, R.B.: The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 56: 786-794, 1977
- Rinder, C.S., Student, L.A., Bonan, J.L., Rinder, H.M. and Smith, B.R.: Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet α -granule release. *Blood.* 82: 505-512, 1993.
- Rousseau, G., St-Jean, G., Latour, J-G., Merhi, Y., Nattel, S. and Waters, D.: Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc. Res.* 25: 319-329, 1991.
- Rousseau, G., Hébert, D., Libersan, D., Khalil, A., St-Jean, G. and Latour, J-G.: Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am. Heart J.* 125: 1553-1563, 1993.
- Roux, S., Christeller, S. and Lüdin, E.: Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 19: 671-677, 1992.
- Ruggeri, Z.M.: Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost.* 70: 119-123, 1993.
- Simpson, P.J., Mitsos, S.E., Ventura, A., Gallagher, K.P., Fantone, J.C., Abrams, G.D., Schork, M.A. and Lucchesi, B.R.: Prostacyclin protects ischemic reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am. Heart J.* 113: 129-137, 1987.
- Trinder, P.K.E., Faust, D., Petry, F. and Loos, M.: Modulation of mRNA expression and secretion of C1q in mouse macrophages by anti-inflammatory drugs and cAMP: evidence for the partial involvement of a pathway that includes cyclooxygenase, prostaglandin E₂ and adenylate cyclase. *Immunology.* 84: 638-644, 1995.
- Tsuji, T., Nagata, K., Koike, J., Todoroki, N. and Irimura, T.: Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J. Leukoc. Biol.* 56: 583-587, 1994.

- van Jaarsveld, H., Kuyl, J.M., van Zyl, G.F. and Barnard, H.C.: Salicylate in the perfusate during ischemia/reperfusion prevented mitochondrial injury. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 86: 287-295, 1994.
- Van Lierde, J., De Geest, H., Verstraete, M. and Van de Werf, F.: Angiographic assessment of the infarct-related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 16: 1545-1549, 1990.
- Ward, P.A., Cunningham, T.W., McCulloch, K.K., Phan, S.H., Powell, J. and Johnson, K.J.: Platelet enhancement of O_2^- responses in stimulated human neutrophils. *Lab. Invest.* 58: 37-47, 1988.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A. and Weber, P.C.: Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation.* 91: 1914-1917, 1995.
- Weyrich, A.S., Ma, X.L., Lefer, D.J., Albertine, K.H. and Lefer, A.M.: *In vivo* neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* 91: 2620-2629, 1993.
- Wildenthal, K.: Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 595-603, 1978.
- Yu, S.K. and Latour, J-G.: Potentiation by α and inhibition by β -adrenergic stimulations of rat platelet aggregation. A comparative study with human and rabbit platelets. *Thromb. Haemost.* 3: 413-422, 1977.

Footnotes

¹The study was supported by grants from the Quebec Heart and Stroke Foundation and Rhône Poulenc Rorer Canada Inc.

Legends for figures

Figure 1. Relationship between infarct size and transmural collateral blood flow in control and ASA treated groups. No statistical difference was observed between groups.

Figure 2. ¹¹¹In-platelet accumulation in infarcted, viable area at risk, and normal non-ischemic myocardium in the different groups. No statistical difference was observed between groups in respective myocardial areas as compared with the control group.

Figure 3. Neutrophil accumulation in infarcted myocardium was significantly reduced (*P<.05) in the ASA 6 and 12 mg groups as compared with the control group. MPO activity was below the detectable level in normal non-ischemic myocardium

Figure 4. Malondialdehyde activity, expressed as nmol/g proteins, in infarcted and normal non-ischemic myocardium. MDA activity was significantly reduced (*P<.05) in both areas in all treated groups as compared with the control group.

Figure 5. ASA 6 and 12 mg significantly inhibited (*P<.05) platelet aggregation 5 min after administration and throughout reperfusion. Inhibition by ASA 2mg was only significant (*P<.05) after 1 hr reperfusion.

Figure 6. Transcardiac arteriovenous differences in plasma PGF_{1α} (pg/ml). Transcardiac PGF_{1α} was significantly inhibited (*P<.05) at 1 hour reperfusion in both ASA 6 and 12 mg groups as compared with the control group. However, the lower values measured in the ASA 2mg group did not reach statistical significance.

TABLE 1. Group characteristics and hematologic data

	Control	ASA 2 mg	ASA 6 mg	ASA 12 mg
Dogs (Total)	28	15	32	36
Dogs excluded	5	3	2	4
VF occlusion	3	2	5	9
VF reperfusion	11	2	11	12
Dogs included	9	8	14	11
Sex (M)(F)	(5)(4)	(5)(3)	(6)(8)	(7)(4)
Weight (kg)	22.3 ± 1.2	22.4 ± 1.2	22.5 ± 0.7	24.0 ± 1.3
Hematocrit (%)	45.3 ± 1.5	47.5 ± 1.5	45.7 ± 1.0	46.3 ± 1.4
Hemoglobin (g/dl)	155.9 ± 5.3	163.5 ± 5.8	155.3 ± 3.9	157.3 ± 4.2
Leukocytes (10 ⁹ /l)	13.8 ± 1.1	12.5 ± 0.9	12.8 ± 0.6	13.9 ± 0.8
Platelets (10 ⁹ /l)	306 ± 30	299 ± 37	282 ± 17	279 ± 14

VF: Ventricular fibrillation

TABLE 2. Hemodynamic data

	Control	ASA 2 mg	ASA 6 mg	ASA 12 mg
Before occlusion PRP	190.0 ± 15.4	198.2 ± 22.1	201.2 ± 12.5	187.0 ± 12.2
LADCA Flow	23.4 ± 4.2	24.4 ± 4.1	25.5 ± 2.9	27.2 ± 2.3
90 min occlusion PRP	178.9 ± 13.2	200.2 ± 17.7	185.8 ± 12.2	174.3 ± 13.7
3 hr reperfusion PRP	165.1 ± 8.4	170.6 ± 23.9	188.6 ± 15.0	165.5 ± 13.9
LADCA Flow	15.1 ± 2.0 *	15.8 ± 2.1 *	14.0 ± 1.3 *	16.5 ± 1.8 *
6 hr reperfusion PRP	140.2 ± 8.4 *	154.8 ± 26.7 *	152.9 ± 11.7 *	153.8 ± 18.8 *
LADCA Flow	11.2 ± 1.1 *	12.1 ± 2.3 *	12.6 ± 1.3 *	14.3 ± 1.7 *

PRP: pressure-rate product (heart rate × blood pressure/100); LADCA flow: left anterior descending coronary artery flow (ml/min).

* P < 0.05 versus before occlusion.

TABLE 3. Myocardial area at risk, infarct size, collateral and regional blood flow

	Control	ASA 2 mg	ASA 6 mg	ASA 12 mg
Area at risk (AR)(%LV)	37.64 ± 1.82	37.43 ± 1.8	38.75 ± 1.79	41.18 ± 1.16
Infarct size (% AR)	43.80 ± 6.28	41.07 ± 7.78	37.55 ± 3.44	29.39 ± 5.41
Blood flow (ml/min/g), 15 min occlusion in ischemic region				
Subendocardium	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Transmural	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Blood flow (ml/min/g), 3 hr reperfusion in ischemic region				
Subendocardium	0.35 ± 0.12	0.41 ± 0.09	0.36 ± 0.07	0.39 ± 0.05
Transmural	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.05	0.47 ± 0.06

LV: Left ventricle

Figure 1

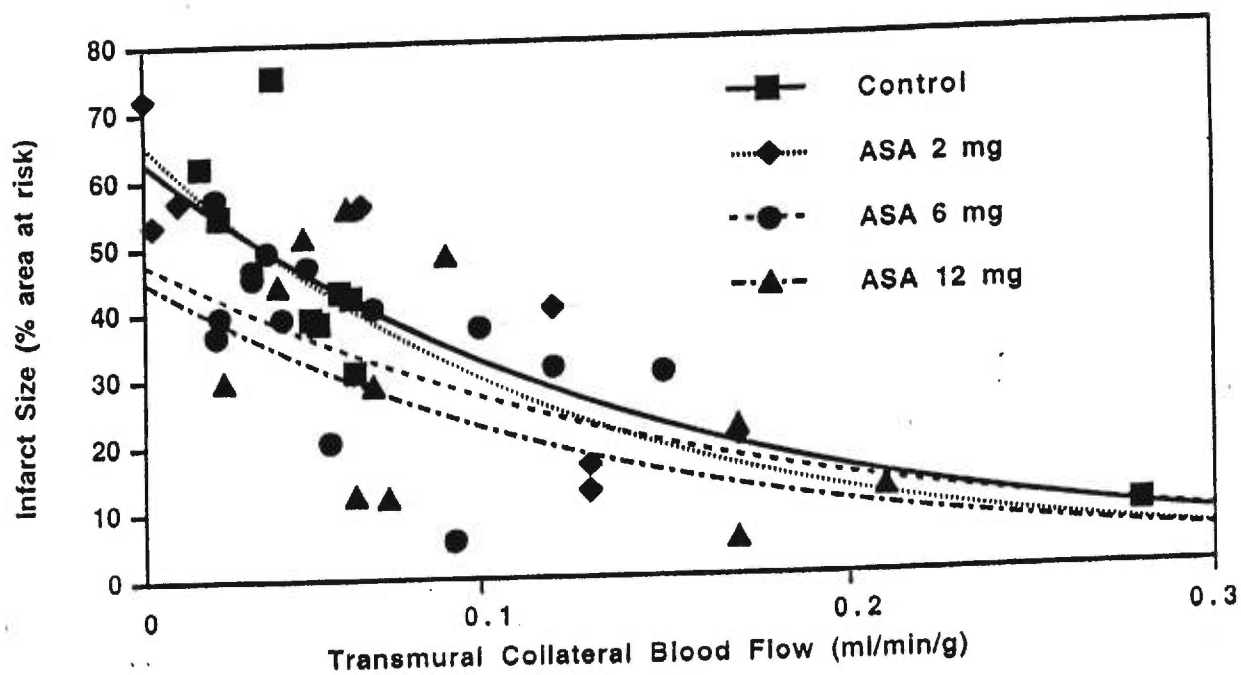


Figure 2

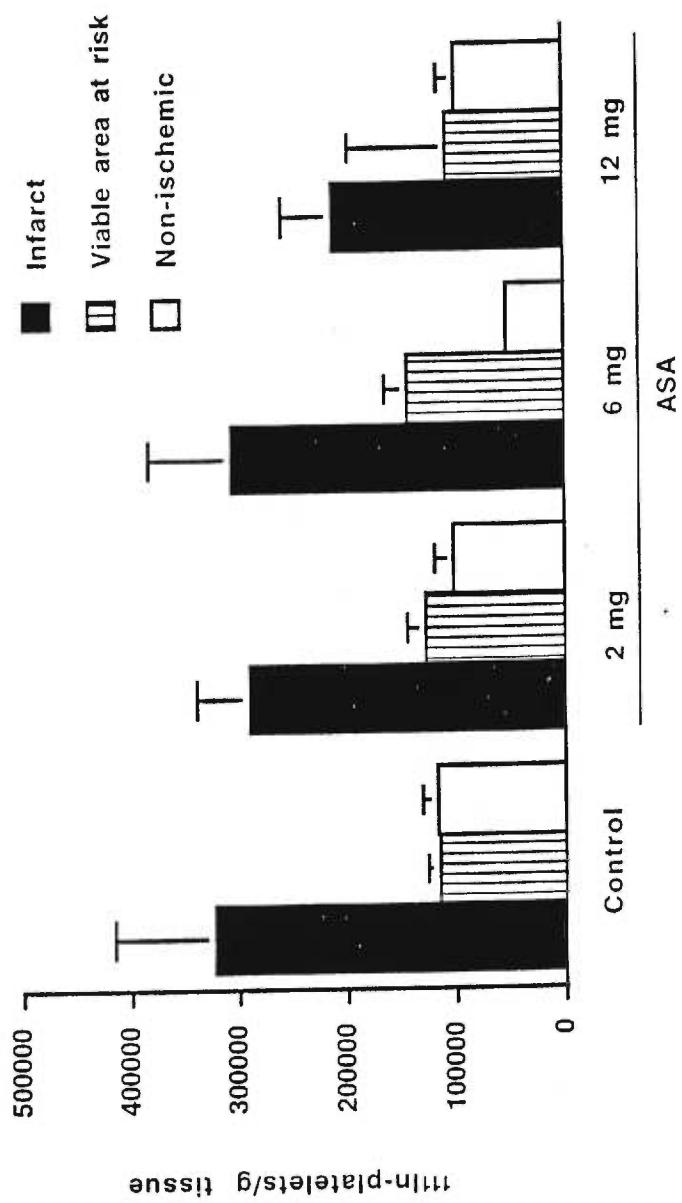


Figure 3

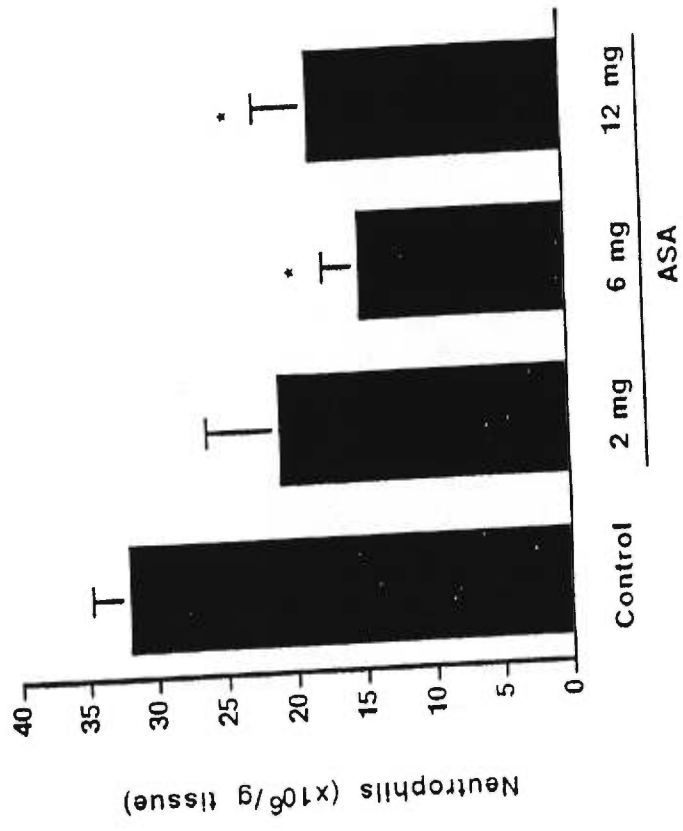


Figure 4

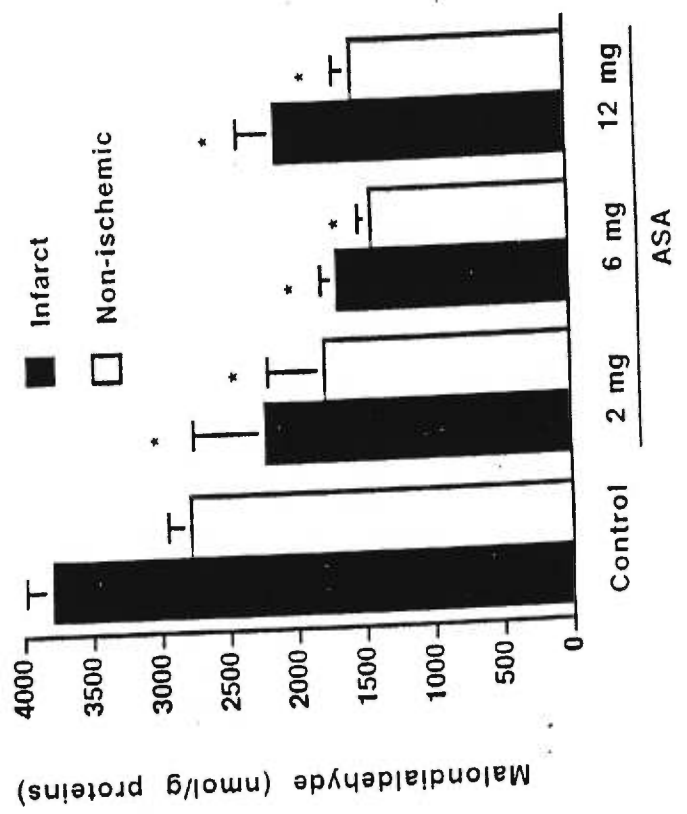


Figure 5

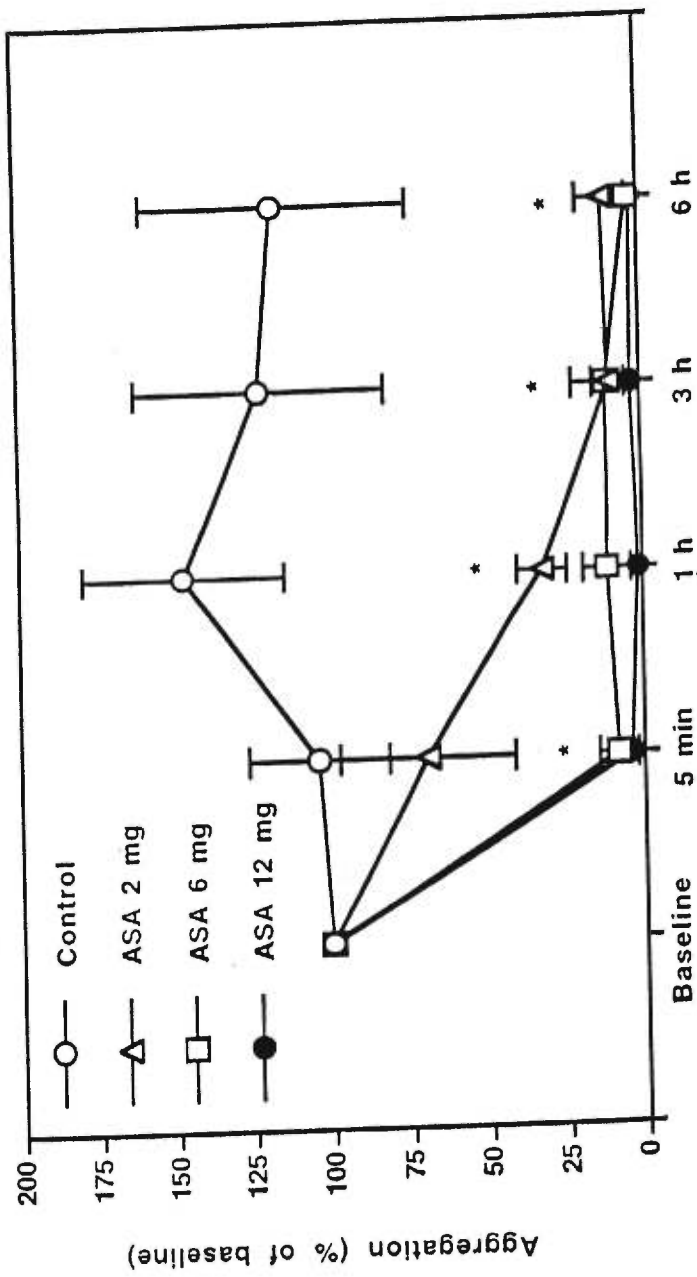
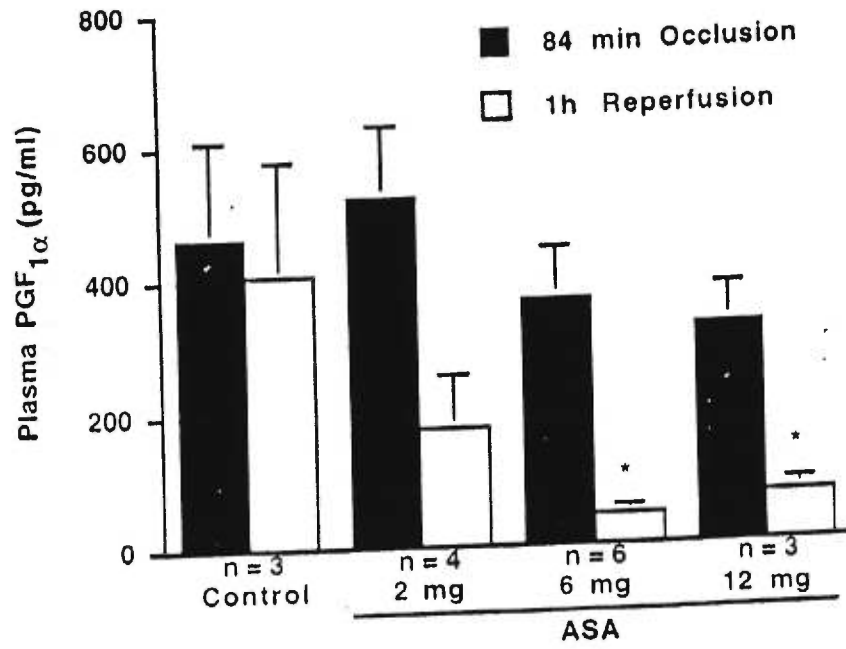


Figure 6



Combination of Aspirin with a low molecular weight heparin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog

Danielle Libersan ^{1,3}, Yahye Merhi ^{1,4}, André Uzan ⁵, Luc Laperrière ⁶ and Jean-Gilles Latour ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute

² Department of Pathology, Université de Montréal

³ Department of Pharmacology, Université de Montréal

⁴ Department of Medicine, Université de Montréal

⁵ Rhône Poulenc Rorer France

⁶ Rhône Poulenc Rorer Canada Inc

* Corresponding author: Jean-Gilles Latour, director, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8.

Tel: (+ 1-514) 376-3330 #3610; fax (+ 1-514) 376-1441.

Abstract:**Combination of Aspirin with a low molecular weight heparin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog. Danielle Libersan, Yahye Merhi, André Uzan, Luc Laperrière and Jean-Gilles Latour**

We have recently demonstrated that the low molecular weight heparin (LMWH) enoxaparin (Enox) given at reperfusion reduces infarct size in the dog. Because platelet-related events are associated with infarct size increment when a residual critical stenosis is present during reperfusion, the aims of the present study were to evaluate if a low dose Enox is equally effective and if aspirin (ASA) could potentiate limitation of infarct size by the LMWH. The left anterior descending coronary artery was occluded for 90 min and reperfused for 6 hrs in the presence of a residual critical stenosis. Five min before reperfusion, two groups received a low dose Enox (bolus: 0.5 mg/kg i.v. + perfusion: 0.085 mg/kg/hr), and one group given a regular dose (bolus: 1 mg/kg iv + perfusion: 0.17 mg/kg/min). The later group and one of the two low dose Enox groups were also given at 5 min before reperfusion 2 mg/kg ASA i.v.. Control group received saline. The area at risk averaged 40% of the left ventricle in the four groups. Infarct size differences between groups were not significant before (Control: 43.8 ± 6.3 %; Enox 0.5 mg: 41.0 ± 5.9 ; Enox 0.5 mg + ASA: 44.4 ± 5.8 ; Enox 1 mg + ASA: 32.8 ± 5.5) and after covariance adjustment for collateral flow. ^{111}In -platelet accumulation in the infarct was not modified by any treatment, but myocardial neutrophil sequestration estimated by tissue myeloperoxidase activity was reduced ($P < .05$) by near 60% in groups given Enox + ASA as compared to controls, and by 27% in the low dose Enox group. Whole blood platelet aggregation to collagen was not significantly modified by treatments, but transcardiac arteriovenous differences in 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ were reduced ($P < .05$) by more than 60% after 1 hr reperfusion in groups given ASA (Enox 0.5 mg + ASA: 199.2 pg/mL, $P < .05$; Enox 1 mg + ASA: 179.4, NS) whereas no significant changes could be observed in controls (405.4 pg/mL) and in the low dose Enox group (290.6 pg/mL). We conclude that the low dose Enox (0.5 mg/kg) is ineffective for infarct size limitation, and that its effect is not enhanced by ASA. On the contrary, ASA abolished the limiting effect of Enox (1 mg/kg) on infarct size as previously reported, by a mechanism which appear to imply a reduction of PGI $_2$ production by the reperfused jeopardized myocardium, suggesting that reported cardioprotection by Enox could involve ASA-sensitive-mechanisms.

Keywords: Aspirin; low molecular weight heparin; myocardial infarct; reperfusion; neutrophils; platelets; dog.

1. Introduction

It is well established that timely reperfusion of ischemic myocardium limits the extent of necrosis [1]. However, salvaged myocardium may be compromised by reperfusion injury [2], which involves the production and release of cytotoxic materials such as proteolytic enzymes [3], free oxygen radicals [4] and lipid metabolites [5] derived from tissues and invading platelets and neutrophils. Microcirculatory failure associated with the release of vasoactive agents [6], leukocyte capillary plugging [7] and loss of vessel relaxation [8] may further compromise reflow and survival of jeopardized myocardium.

Drugs protecting the reperfused myocardium in the setting of coronary thrombolysis could be beneficial in limiting infarct size. Recently, we reported that therapeutic doses of enoxaparin (Enox), a low molecular weight heparin, administered prior to reperfusion limits infarct size in the dog, by a process involving reductions in both platelet and neutrophil accumulations in the reperfused territory [9]. In contrast, intravenous doses of aspirin (ASA) alone failed, under similar experimental conditions, to limit infarct size [10]. However, ASA has proven beneficial as an adjuvant to thrombolysis [11] by preventing vessel reocclusion and thereby aiding preservation of reperfused myocardium. On the other hand, inhibition of tissue cyclooxygenase may be detrimental on myocardial salvage elicited by drugs through aspirin-sensitive mechanisms [12], and by inhibiting synthesis of cytoprotective prostaglandins such as prostacyclin, which is known to limit infarct size [13].

Accordingly, the present study was designed to investigate the effects of combining Enox to ASA on infarct size in a dog model of myocardial ischemia and reperfusion.

2. Methods

2.1 *Ischemia and reperfusion.*

Mongrel dogs of either sex weighing 18 to 28 kg were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.v.), intubated and ventilated mechanically with room air. Blood gases and pH were measured and kept within physiologic range, and lead II electrocardiogram was monitored continuously. Catheters were inserted in the right femoral vein and artery for blood sampling and in the left artery for blood pressure monitoring. After injecting pancuronium bromide (0.1 mg/kg, i.v.), a left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the heart suspended in a pericardial cradle. A catheter was introduced in the left atrium for radioactive microsphere injections. An 8F micromanometer-tipped pigtail catheter pressure transducer (Model SPC-484A; Millar Instruments Inc., Houston, TX) was introduced in the left femoral artery and advanced into the left ventricle for pulsatile blood pressure monitoring.

The left anterior descending coronary artery (LADCA) was isolated distal to its first diagonal branch and an electromagnetic flowmeter (Carolina Medical, King, NC) was fitted to measure coronary blood flow. Five minutes before occlusion, a micrometer occluder was adjusted on the LADCA to produce an eccentric critical coronary stenosis sufficient to abolish the hyperemic response produced after the release of a 10-second occlusion without affecting basal blood flow. In all groups, the LADCA was occluded for 90 min followed by 6 hrs reperfusion in the presence of the critical stenosis. Animals that failed to develop persistent cyanosis at the epicardial surface and ST segment changes (< 0.1 mV) after 10 minutes of occlusion were excluded from the study. Animals presenting refractory ventricular fibrillation after 3 successive attempts for cardioversion were also excluded.

Studies adhered to the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Care and were approved by a local committee.

2.2 *Experimental studies.*

Animals were allocated at random among groups. Controls received an intravenous perfusion of saline 5 min before reperfusion and lasting throughout the experiment. Enoxaparin (Rhône-

Poulenc Rorer, Canada) 0.5 mg/kg was given intravenously in bolus injection 5 min before reperfusion, followed by perfusion of 0.085 mg/kg/hr (groups 2 and 3) until sacrifice. Animals in group 4 received a bolus of 1 mg/kg Enox followed by 0.17 mg/kg/hr perfusion. In addition, groups 3 and 4 also received, prior to Enox, an intravenous injection of lysine-ASA (Aspegic, Synthélabo, France) corresponding to 2 mg/kg ASA.

2.3 *Infarct sizing.*

Infarct sizing has been described in details elsewhere [14]. Briefly, after 6 hrs of reperfusion, heparin (10 000 U) was given and the animals were sacrificed. The heart was rapidly excised, and the site of the LADCA occlusion and the aorta above the coronary ostia were cannulated and perfused with saline (0.9%) and, subsequently, by perfusion of the aorta with Evans blue dye 0.5% (Sigma Chemical Co., USA). The left heart was then embedded in a polyurethane foam and cut into 7 mm thick transverse slices. The slices were weighed and immersed in triphenyltetrazolium chloride (Sigma Chemical Co., USA) 1.5% in Tris buffer (2.4%, pH 7.8) for 10 min at 37° C. The normally perfused myocardium, the area at risk of ischemia, the necrotic myocardium and the hemorrhagic areas were delineated and respective areas were measured on each slice by computerized planimetry. The area at risk was expressed as a percentage of the left ventricle and the infarct size as a percentage of the area at risk.

2.4 *Regional and collateral myocardial blood flow.*

Regional and collateral blood flows were measured as described previously [15] after 15 min of coronary occlusion and after 3 hrs reperfusion using microspheres (15 µm) labeled with ⁵⁷Co and ⁸⁵Sr (NEN Dupont Canada Inc., Canada). Approximately 3-4 million microspheres were injected into the left atrium and a reference arterial blood sample was withdrawn from the femoral artery at a constant rate with a syringe pump (Harvard Apparatus Corp., USA) for 150 sec. Three or four central slices were divided into non-ischemic and ischemic regions. Sections from the central ischemic area and from the wall opposite to the area at risk were dissected into three equal subepicardial, mesomyocardial, and subendocardial portions. Each sample was weighed and counted in a gamma counter (Packard 5000, USA) with selected energy windows. Myocardial

blood flow was calculated and expressed in mL/min/g of tissue.

2.5 Platelet isolation and ^{111}In -labeling.

Preparation of autologous labeled platelet suspensions has been described previously [16]. Briefly, platelets were isolated from each dog by centrifuging citrated venous blood. After four successive washings with tyrode, the platelets were incubated for 1 min with approximately 300 μCi ^{111}In -indium-oxine (Amersham, Canada). Platelet-poor supernatant was added to bind excess free ^{111}In -indium-oxine and discarded after centrifugation. The platelets were resuspended in 5 mL of citrated platelet-poor plasma and injected intravenously (mean: $2011 \pm 154 \times 10^6$) prior to occlusion

2.6 Platelet accumulation in myocardial tissue.

Infarcted, ischemic and normal non-ischemic myocardium from the opposite free wall were dissected, weighed and counted in a gamma counter for 5 min. The labeled-cell counts were determined by reporting the values obtained over that of a standard (1×10^6 platelets), and accumulations were estimated per gram of tissue for each region. As variable amounts of labeled platelets were injected, the values were normalized between dogs by using the mean cell counts ($1144 \pm 89 \times 10^6$) circulating prior reperfusion from all experiments [16], assuming a blood volume of 75 mL/kg of body weight [17].

2.7 Neutrophil accumulation in myocardial tissue.

Neutrophil counts in myocardial tissue were estimated by neutrophil-specific myeloperoxidase (MPO) activity as described previously [18] using *O*-dianisidine and hydrogen peroxide as substrates [19]. To establish a reference curve in each dog between MPO activity and neutrophil counts, neutrophils were isolated from venous blood withdrawn immediately after anesthesia. Briefly, following centrifugation, the neutrophils were recovered from the second layer and washed twice in a double volume Hank's balanced salt solution (HBSS). Contaminating red blood cells were eliminated by hypotonic hemolysis. The cells were counted with an electronic cell counter (Coulter Corporation, USA) and suspensions containing 1×10^6 to 4×10^6 neutrophils were prepared and frozen at -70°C for later use.

Myocardial tissue MPO activity was assayed in all dogs using a central ventricular slice

rapidly removed and stored at -70°C . Tissue samples (100 mg) were taken from the subepicardial layer of the infarct approximately 1-1.5 mm under the salvaged myocardium; small ($< 5\%$ area at risk) and patchy infarcts were not assayed. Briefly, samples were thawed and refrozen once in liquid nitrogen, crushed with a pillar and homogenized in 1.5 mL hexyl at 4°C . The homogenate was freeze-thawed three times in liquid nitrogen with 10-second sonication over ice between each freezing. The homogenate was centrifuged 20 min at 12500g, and the supernatant was assayed for MPO by adding to a 0.1 mL of sample, 2.9 mL of phosphate buffer containing $8.35 \times 10^{-3} \%$ *O*-dianisidine dihydrochloride and hydrogen peroxide 0.3%. Absorbency was read at 460 nm over 3 min. Results were expressed as 10^6 neutrophils/g of wet tissue by referring to the neutrophil reference curve constructed by using MPO values of each animal neutrophil concentrates.

2.8 *Tissue malondialdehyde assays.*

Thiobarbituric acid reactive materials, an index of malondialdehyde (MDA) and lipid peroxidation, were measured according to the method of Ohkawa [20]. Myocardial samples were obtained from the same slices and areas as used for MPO determinations; 100 mg samples were homogenized in 1 mL 1.15% KCl for 60 sec at 4°C . Aliquots (0.25 mL) were mixed with 0.25 mL sodium dodecyl sulfate and then with 0.75 mL 20% acetic acid, 0.75 mL 0.8% thiobarbituric acid and 0.5 mL bidistilled water in Pyrex tubes. After mixing thoroughly, tubes were heated at 95°C for 1 hr and cooled rapidly over ice. After adding 0.5 mL bidistilled water and 3 mL of a 15:1 (v/v) mixture of *n*-butanol and pyridine 4:1 (v/v), the tubes were shaken vigorously and centrifuged at 3000g for 10 min. Absorbance of the organic upper layer was measured at 532 nm. Values were estimated by referring to the reference curve, where MDA standards (2, 4, 6 and 8 nmol/L) were substituted to tissue extracts, and expressed in nmol/mg of myocardial protein [21].

2.9 *Plasma 6-keto-PGF_{1 α}*

Prostacyclin (PGI_2) stable metabolite 6-keto-PGF_{1 α} was extracted from plasma and assayed by radioimmunoassay using a commercial kit (Amersham International, UK). Blood samples (2.25 mL) were collected simultaneously from the left coronary vein and the aorta at 84 min occlusion and 1 hr reperfusion into an EDTA anticoagulant mixture containing ASA [22]. After centrifugation

(3000g, 30 min, 4° C) plasma was collected and stored at -70° C until assay.

2.10 Platelet aggregation.

Platelet aggregation was tested by impedance aggregometry (Chrono-Log Corp. USA) within one min of sampling on heparinized (5 U/mL) venous whole blood [23] obtained just prior to Enox treatment (84 min occlusion), and 5 min later (89 min occlusion), and after 1, 3 and 6 hrs reperfusion. Blood (490 µl) diluted with 500 µl saline (37°C) was challenged with 1µg (10 µl) collagen [24] and the extent of aggregation estimated as the surface area under the curve response obtained over 5 min.

2.11 Blood coagulation assays.

Venous blood (9 parts) was withdrawn from the femoral vein immediately before treatment (84 min occlusion) and after 2, 4 and 6 hrs reperfusion into 3.8% sodium citrate (1 part). After 30 min centrifugation (1000 g, 4° C), the plasma was frozen at -70° C until assay.

The activated partial thromboplastin time (aPTT) was measured with the phospholipid reagent Neothromtin (Behring, Canada) using a Coag-a-Mate X2 (General Diagnostics, USA). Anti-factor Xa activity was determined with the Coatest heparin kit (Kabivitrum, Stockholm, Sweden) using a spectrophotometer equipped for kinetic studies [25]. Thrombin/antithrombin III complexes were determined using the enzyme immunoassay Enzygnost-TAT (Behring, Germany) according to the recommended procedure.

2.12 Statistical analysis.

Results are expressed as mean \pm S.E. for each group. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a Levene test for equal variance were used to investigate treatment differences coupled to a Dunnett's test for mean comparison between treated and control groups. Intragroup comparisons of hemodynamic, aggregation and coagulation data were analyzed with a one-way analysis of variance for repeated measures followed by a Dunnett's test between time values and values at baseline. A covariance analysis between infarct size (dependent variable) and collateral blood flow (covariate) was used in controlling the variability in infarct size due to collateral blood flow. A two-tail Fisher exact test was applied to the incidence of ventricular fibrillation and gender distribution. Platelet

accumulations, MPO and MDA determinations in respective myocardial tissue areas were analyzed by non-paired and pairwise ANOVA and Bonferroni t-test. Transcardiac differences in plasma $\text{PGF}_{1\alpha}$ concentrations between baseline and 1 hr reperfusion were analyzed by ANOVA and a paired Student's t-test with a P value set at 0.0167 as 3 comparisons were made. If not otherwise specified, differences were considered statistically significant when $P < .05$.

3. Results

3.1 *Group characteristics and hematologic data (Table 1).*

Ninety-four dogs were used in the study. Eleven dogs were excluded (5 Controls; 2 Enox .5 mg + ASA; 4 Enox 1 mg + ASA) because of collateral subendocardial blood flow $> 0.15 \text{ mL/g/min}$ [16]. Forty-nine dogs died of refractory ventricular fibrillation; 16 at occlusion before initiating experimental treatments and 33 during reperfusion. Differences in the incidence of ventricular fibrillation between groups were not statistically significant. Thus, 34 dogs were included in the final analysis. There were no statistical differences between groups regarding gender distribution, weight or hematologic data.

3.2 *Hemodynamic data (Table 2).*

Differences in heart rate, peak left ventricular pressure, pressure-rate product and LADCA flow were not statistically significant between groups before and during occlusion, and during reperfusion. However, intragroup comparisons indicate that the pressure-rate product was decreased in a significant manner ($P < .05$) in all groups during the last hour of reperfusion. These changes were already present after 3 hrs reperfusion in the Enox .5 mg and the Enox .5 mg + ASA groups. Likewise, LADCA flow declined significantly ($P < .05$) from the 3rd hour of reperfusion, and mean values averaged about 50% of baseline values after 6 hrs of reperfusion in all groups.

3.3 *Infarct size and collateral blood flow (Table 3).*

The area at risk of ischemia involved approximately 40% of the left ventricle in all groups. Infarct size expressed as a percentage of the area at risk varied between 33 and 44% with no statistical differences between groups. A trend for smaller infarcts was seen in the Enox 1mg + ASA group but found not significant at covariance analysis between collateral flow and infarct size. Transmural

and regional collateral blood flow in the ischemic area at 15 min occlusion and 3 hrs reperfusion respectively were not different between groups. Transmural reflow at 3 hrs averaged about 50% normal non-ischemic flow which varied between 0.74 to 1.22 mL/min/g. Intramyocardial hemorrhagic areas were confined to the infarcted area and differences between groups were not significant (% of infarct area: Control: 34.8 ± 10.5 ; Enox .5 mg: 41.5 ± 7.9 ; Enox .5 mg + ASA: 47.9 ± 12.8 ; Enox 1 mg + ASA: 26.1 ± 12.2).

3.4 Myocardial ^{111}In -Platelet accumulations (Figure 1).

Accumulation of ^{111}In -platelets in reperfused myocardium in control dogs was clearly restricted to the infarct where about three times ($P < .05$) as many platelets were sequestered as compared to the viable area and non-ischemic myocardium. None of the drug regimens reduced significantly ^{111}In -platelet accumulation, although a favorable non-significant trend was observed in the Enox 1 mg + ASA group ($212,672 \pm 45,885$ platelets/g) as compared to the control group ($323,201 \pm 92,328$).

3.5 Myocardial neutrophil accumulations (Figure 2) and MDA concentrations.

Neutrophil accumulation in the infarct was reduced ($P < .05$) by respectively 59% and 57% versus control group in the Enox .5 mg + ASA and the Enox 1 mg + ASA groups. The slight reduction in the Enox .5 mg was not significant. Similarly, MDA concentrations (not shown) were reduced ($P < .05$) to a similar degree in all treated groups in the infarct (with values ranging from 1451 to 2070 nmol/g proteins) as well as in the non-ischemic myocardium (1119 to 1713 nmol/g) as compared to control dogs (3791 and 2785 nmol/g respectively).

3.6 Coagulation and platelet aggregation assays.

In spite of slight increases ($P < .05$) in aPTT in all treated groups, mean aPTT values varied non-significantly (18 to 24 sec) between groups before and during the study.

As shown in Figure 3, plasma anti-Xa activities were below detectable levels ($< .01 \text{ U/mL}$) in all groups before treatment and increased significantly ($P < .05$) in treated groups during reperfusion as compared to controls. Mean anti-Xa activity ranged between 0.68 and 0.98 U/mL in Enox 1 mg + ASA group and between 0.40 and 0.51 in the Enox .5 mg \pm ASA groups.

Thrombin/antithrombin III (TAT) complexes increased ($P < .05$) in controls during reperfusion,

whereas their concentration was below baseline values in treated groups; the difference was however statistically significant only in the group with the high dose of Enox + ASA. Between group differences were significant ($P < .05$) from controls in all treated groups.

3.7 Plasma 6-keto-PGF_{1 α} (Figure 4).

Transcardiac arteriovenous differences in plasma 6-keto-PGF_{1 α} levels varied non significantly between 462 ± 146 and 644 ± 105 pg/mL among groups before initiation of treatment. After 1 hr reperfusion, transcardiac 6-keto-PGF_{1 α} levels were reduced to 199.2 ± 54.7 ($P < .05$) in the Enox .5 mg + ASA group and to 179.4 ± 92.7 pg/mL in the Enox 1 mg + ASA (NS), whereas values in controls (404 ± 171 pg/mL) and in animals receiving Enox .5 mg (290.6 ± 77 pg/mL) alone were not significantly modified.

4. Discussion

The role of platelets in the pathophysiology of reperfusion injury is not completely elucidated, but reperfusion through a residual critical stenosis increases infarct size by a platelet-dependent mechanism [16] which may involve multiple cell interactions including neutrophils on vascular endothelium. Platelet aggregates within the vasculature may exacerbate ischemia [26] by releasing vasoactive components [27]; these platelet-related phenomena [28] may compromise reflow and jeopardize myocardial survival. If thromboxane A_2 -induced platelet aggregation is involved in the pathogenesis of reperfusion injury, use of ASA may prove beneficial on reperfused myocardium. Because a significant residual stenosis have been documented in most patients following successful thrombolysis [29], therapies aim at inhibiting both platelet and neutrophils functions may help preserve and salvage jeopardized reperfused ischemic myocardium.

Recently, we have reported that a therapeutic intravenous dose of Enox (1 mg/kg + perfusion of .017 mg/kg/min) given a few minutes before and during reperfusion reduced infarct size by approximately 50% in a canine model of occlusion (90 min) and reperfusion (6 hrs) in the presence of a residual critical stenosis [9]. The cardioprotection was associated with marked reductions in both platelet and neutrophil accumulations in the reperfused myocardium that appeared mediated, at least in part, through interactions of Enox with P-selectin mediated platelet-neutrophil, and neutrophil-endothelium adhesion [30].

ASA inhibits platelet aggregation through cyclooxygenase inhibition, and help preventing vessel reocclusion [11]. Recently, ASA was reported to reduce infarct size in a model in the pig with induced intimal injury [31], suggesting that ASA could theoretically enhance cardioprotection by Enox. However, the results of the present study demonstrate that the low dose Enox, alone or in combination with a small dose of ASA does not limit infarct size. Therefore, the low dose Enox is not cardioprotective, and ASA failed to potentiate the action in spite of a greater reduction of neutrophils accumulation in the infarct. The observation that neither treatments prevented platelet accumulation in the reperfused infarcts give further support for a key role played by platelets on ultimate infarct size following reperfusion of ischemic myocardium in the presence of a residual

stenosis [16]. Failure to elicit cardioprotection with the low dose Enox is in accordance with the study of Hasdai et al. [32] who failed to reduce infarct size in the rat using a near similar dose of LMWH fragmin. Our low dose Enox (.5 mg/kg) was chosen because of its clinical efficacy on venous thrombosis [33], whereas 1 mg/kg is used clinically in arterial thrombosis [34]. However the low dose Enox elicited suboptimal anti-Xa plasma levels in our dogs ($< 0.5\text{U/mL}$), whereas the 1 mg/kg dose produced optimal levels (0.7 to 1U/mL).

Our failure to limit infarct size with the 1 mg/kg dose of Enox in combination with ASA contrast with the marked reduction of infarct size that we reported recently [9], and suggest that Enox-induced cardioprotection may be mediated by ASA-sensitive mechanisms. However, although we used a low dose ASA (2 mg/kg), the platelet inhibitor was given intravenously. This route of administration is generating instantaneously higher ASA circulating levels that may account for the decreased in PGI_2 production by reperfused myocardium in ASA treated dogs as indicated by decreased transcardiac concentrations of 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, the stable metabolite of PGI_2 , and for the failure of Enox (1 mg/kg) to elicit reduction of infarct size. PGI_2 and other prostaglandins are cytoprotective, and PGI_2 supplementation reduces neutrophil accumulation and infarct size in ischemia-reperfusion models [35,36].

In this study, we observed that low dose Enox does not modify *ex vivo* whole blood platelet aggregation to collagen. However, when Enox was associated with ASA, collagen-induced platelet aggregation was not significantly inhibited whereas myocardial PGI_2 production was decreased. Tissue cyclooxygenase is normally less susceptible to ASA inhibition than the platelet enzyme. The reversal of ASA-dependent platelet aggregation inhibition by heparin or low molecular weight heparin has been reported previously, and it was suggested that either increased lipoprotein lipase activity [37] or conformational modification in the GPIIb-IIIa receptor complex [38] may explain this phenomenon. These results raise important questions as to the clinical relevance of this interaction, but adding ASA to heparin or low molecular weight heparin has been proven successful in patients with coronary heart diseases [39,40].

We reported previously that Enox inhibition of P-selectin mediated platelet adhesion to neutrophils

is a likely mechanism to limit infarct size [9]. P-selectin is expressed by activated platelet and endothelial cells, and binds to the neutrophil ligand sialyl Lewis-X (Sle^x) [41]. P-selectin, and L-selectin expressed by leukocytes, mediate leukocyte rolling and adhesion in their transmigration process. Experimental studies have demonstrated that blockade of P-selectin with Sle^x analog [42] or a monoclonal antibody [43] reduces neutrophil accumulation and infarct size. ASA does not inhibit platelet P-selectin [44] as opposed to low molecular weight heparin [45], but low concentrations of ASA were reported to enhance platelet adhesion to neutrophils [46]. These effects may potentially counteract the benefits of Enox on infarct size limitation as platelet-neutrophil interactions appear as key elements in reperfusion injury .

We conclude that low dose Enox (.5 mg/kg) does not limit infarct size in the dog and that associating ASA to Enox does not potentiate the cardioprotective potential of the LMWH, but rather abolishes the infarct limiting ability of a higher dose (1 mg/kg) of Enox, suggesting that limitation of infarct size by Enox involves ASA sensitive mechanisms.

Acknowledgements

The study was supported by grants from Rhône-Poulenc Rorer Canada Inc. and the Montreal Heart Institute Research Found (MHIRF).

The authors wish to thank Robert Clément BSc, Claudette Léger-Gauthier PhD for their professional support, Duc C Tran MD, MSc, for the MPO measurements, and Nicole Serruys for her secretarial assistance.

References

- [1] Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death.I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-794.
- [2] Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
- [3] Wildenthal K. Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:595-603.
- [4] Lucchesi BR, Mullane KM. Leukocytes and ischemia-induced myocardial injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986;26:201-204.
- [5] McCluskey ER, Murphree S, Saffitz JE, Morrison AR, Needleman P. Temporal changes in 12-HETE formation in two models of canine myocardial infarction. *Prostaglandins* 1985;29:387-403.
- [6] Seccombe JF, Schaff HV. Reperfusion injury. In: *Vasoactive factors produced by the endothelium: physiology and surgical implications*. Austin: RG Landes Company, 1994:60-78.
- [7] Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983;111:98-111.
- [8] Mehta JL, Nichols WW, Donnell WH, Lawson DL, Saldeen TGP. Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. *Circ Res* 1989;64:43-54.
- [9] Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, Latour J-G. The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* (submitted)
- [10] Libersan D, Quan E, Merhi Y, Uzan A, Latour J-G. Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* (submitted)

- [11] Roux S, Christeller S, Lüdin E. Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta analysis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:671-677.
- [12] Mullane KM, Fornabaio D. Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent aspirin-sensitive mechanism. *Cir Res* 1988;62:668-678.
- [13] Simpson PJ, Mickelson J, Fantone JC, Gallagher KP, Lucchesi BR. Iloprost inhibits neutrophil function in vitro and in vivo and limits experimental infarct size in canine heart. *Circ Res* 1987;60:666-673.
- [14] Chatelain P, Latour J-G, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa, M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75:1083-1090.
- [15] de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour J-G. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532.
- [16] Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
- [17] Rapaport E, Kuida H, Haynes FW, Dexter L. Pulmonary red cell and plasma volumes and pulmonary hematocrit in the normal dog. *Am J Physiol* 1956;185:127-132.
- [18] Rousseau G, St-Jean G, Latour J-G, Merhi Y, Nattel S, Waters D. Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1991;25:319-329.
- [19] Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM. Nafazatrom induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function. *Circ Res* 1985;57:1342-1348.
- [20] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.

- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-256.
- [22] Thérooux P, Latour J-G, Léger-Gauthier C, De Lara J. Fibrinopeptide A and platelet factor levels in unstable angina pectoris. *Circulation* 1987;75:156-162.
- [23] Diodati J, Thérooux P, Latour J-G, Lacoste L, Lam JYT, Waters D. Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;66:683-688.
- [24] Yu SK, Latour J-G. Potentiation by α and inhibition by β -adrenergic stimulations of rat platelet aggregation. A comparative study with human and rabbit platelets. *Thromb Haemost* 1977;37:413-422.
- [25] Handeland, G. Simplified chromogenic substrate assay for low molecular weight heparin. *Thromb Res* 1986;42:105-108.
- [26] Parratt JR. Pathophysiology of myocardial ischemia: importance of platelet-vessel wall interactions. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988;2:35-40.
- [27] Golino P, Ambrosio G, Villari B, Ragni M, Focaccio A, Pace L, De Clerk F, Condorelli M, Chiariello M. Endogenous prostaglandin endoperoxides may alter infarct size in the presence of thromboxane synthase inhibition: studies in a rabbit model of coronary artery occlusion-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:493-501.
- [28] Dinerman JL, Mehta JL. Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:207-222.
- [29] van Lierde J, De Geest H, Verstraete M, Van de Werf F. Angiographic assessment of the infarct-related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:1545-1549.
- [30] Kitamura N, Yamaguchi M, Shimabukuro K, Miyasaka M, Nakano H, Kumada K. Heparin-like glycosaminoglycans inhibit leukocyte adhesion to endotoxin-activated human vascular endothelial cells under nonstatic conditions. *Eur Surg Res* 1996;28:428-435.

- [31] Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Oliveras J, González MA, Ruiz-Meana M, Solares J, García Burillo A, Lidon RM, Antoli M, Castell J, Soler-Soler J. Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Eur J Physiol* 1996;432:663-670.
- [32] Hasdai D, Varda-Bloom N, Blumberg N, Ohad D, Kornowski R, Battler A. The effect of low molecular weight heparin (fragmin) on myocardial neutrophil accumulation and infarct size in a rat model of myocardial infarction. *Angiology* 1996;47:491-497.
- [33] Noble S, Peters DH, Goa KL. Enoxaparin. A reappraisal of its pharmacology and clinical applications in the prevention and treatment of thromboembolic disease. *Drugs* 1995;49:388-410.
- [34] The thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11A trial investigators. Dose-ranging trial of enoxaparin for unstable angina - Results of TIMI 11A. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:1474-1482.
- [35] Simpson PJ, Mitsos SE, Ventura A, Gallagher KP, Fantone JC, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Prostacyclin protects ischemic reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am Heart J* 1987;113:129-137.
- [36] Hohlfeld, T., Strobach, H. and Schror, K.: Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:397-405.
- [37] Chen J, Karlberg K-E, Sylvén C. Heparin and low molecular weight heparin but not hirudin stimulate platelet aggregation in whole blood from acetylsalicylic acid treated healthy volunteers. *Thromb Res* 1991;63:319-329.
- [38] Chen J, Sylvén C. Heparin potentiation of collagen-induced platelet aggregation is related to the GPIIb/GPIIIa receptor and not to the GPIb receptor, as tested by whole blood aggregometry. *Thromb Res* 1992;66:111-120.
- [39] Oler A, Whooley MA, Oler J, Grady D. Adding heparin to aspirin reduces the incidence of myocardial infarction and death in patients with unstable angina. *JAMA* 1996;276:811-815.

- [40] Melandri G, Semprini F, Cervi V, Candiotti N, Palazzini E, Branzi A, Magnani B. Benefit of adding low molecular weight heparin to the conventional treatment of stable angina pectoris. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* 1993;88:2517-2523.
- [41] McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 1995;270:11025-11028.
- [42] Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ. A novel sialyl Lewis^x analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994;90:2390-2401.
- [43] Weyrich AS, Ma XL, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-2629.
- [44] Rinder CS, Student LA, Bonan JL, Rinder HM, Smith BR. Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet α -granule release. *Blood* 1993;82:505-512.
- [45] Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-3258.
- [46] Dembinska-Kiec A, Zmuda A, Wenhryniewicz O, Stachura J, Peskar BA, Gryglewski RJ. Selectin-P-mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanoids and nitric oxide. *Int J Tiss Reac* 1993;XV:55-64.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. ^{111}In -platelet accumulation in infarcted, viable area at risk and normal non-ischemic myocardium in the different groups. No statistical difference was observed between groups in respective myocardial areas compared with the control group.

Figure 2. Neutrophil accumulation in infarcted myocardium was significantly reduced ($*P<.05$) in both groups given Enox + ASA. MPO activity was below the detectable level in normal non-ischemic myocardium.

Figure 3. Blood coagulation assays. *Top panel:* anti-Xa levels remained unchanged in the control group throughout reperfusion. However, in all treated groups, plasma anti-Xa levels increased significantly ($*P<.05$) and remained elevated during the course of reperfusion. *Bottom panel:* thrombin/antithrombin III (TAT) complexes increased significantly ($*P<.05$) during the last hours of reperfusion, while animals treated with Enox 1 mg + ASA had a lower concentration ($*P<.05$) of TAT complexes throughout reperfusion than that measured at baseline.

Figure 4. Transcardiac arteriovenous differences in plasma $\text{PGF}_{1\alpha}$ (pg/mL). Transcardiac $\text{PGF}_{1\alpha}$ values at four reperfusion differed statistically ($*P<.05$) from baseline values only in the Enox 0.5 mg + ASA group.

Figure 1

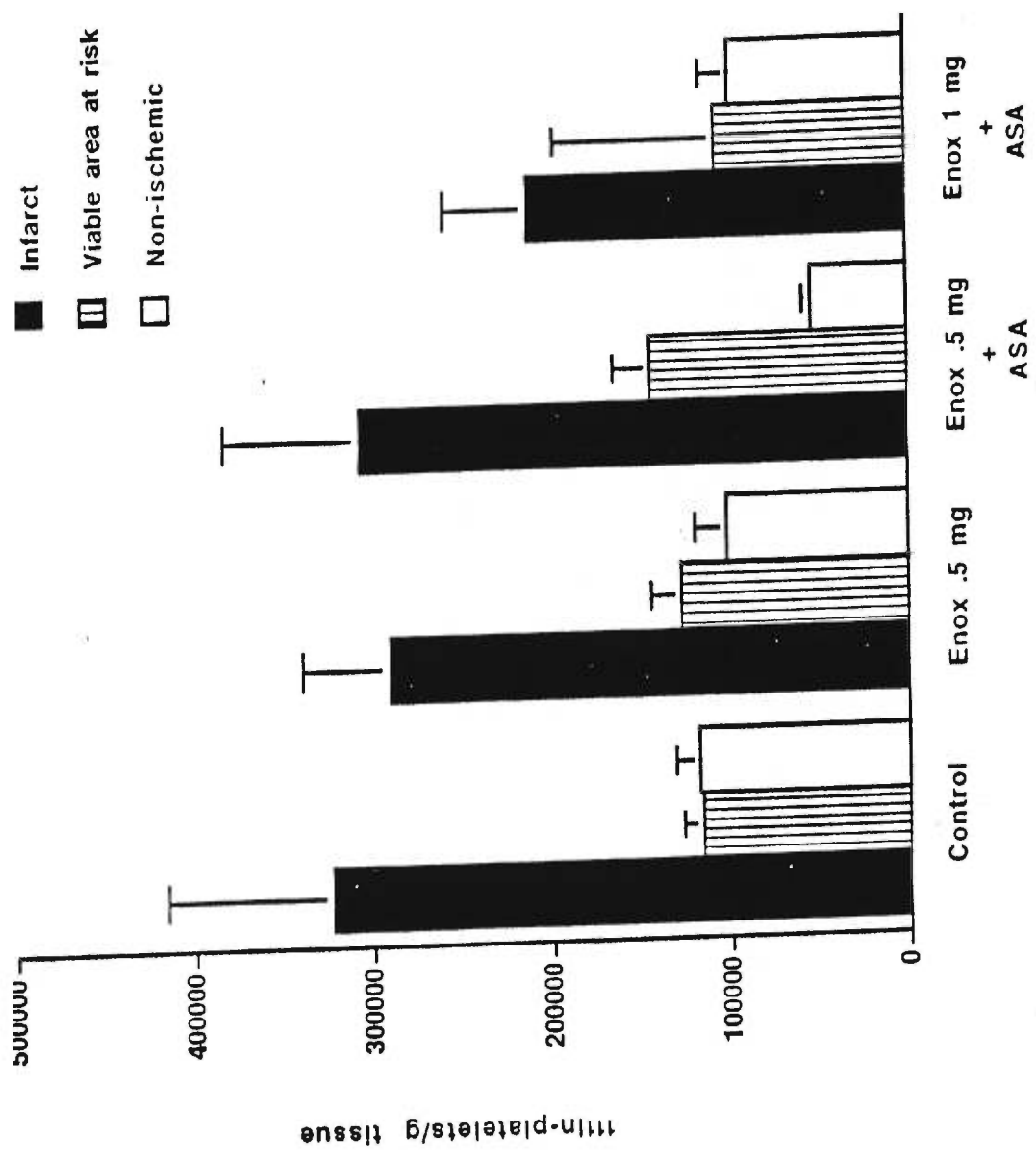


Figure 2

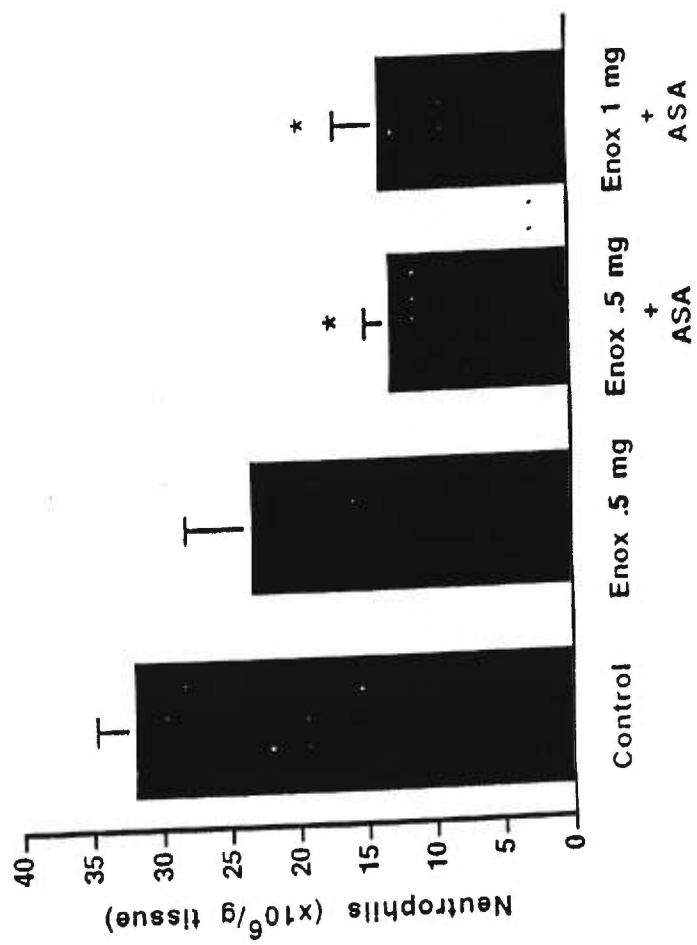


Figure 3

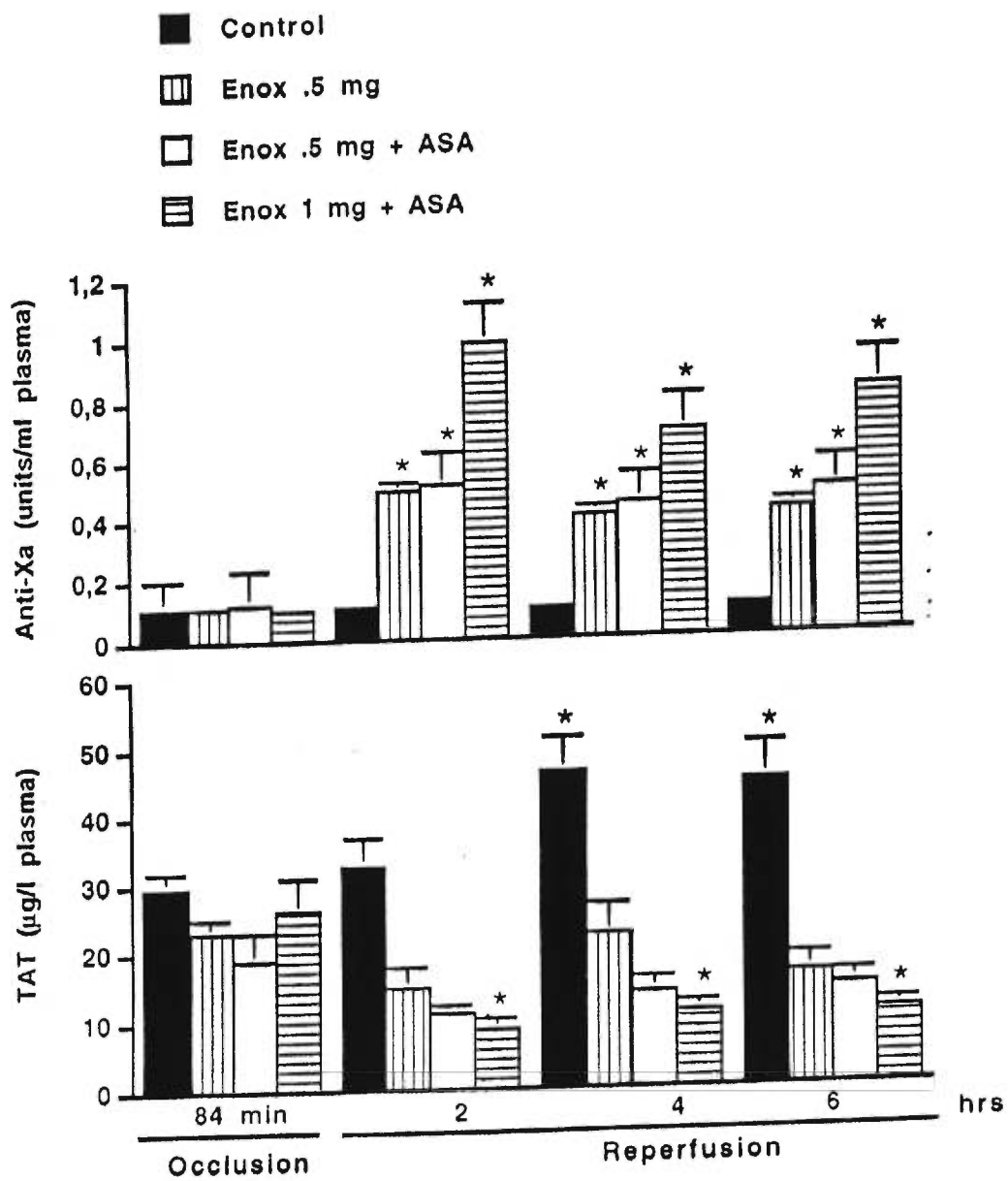


Figure 4

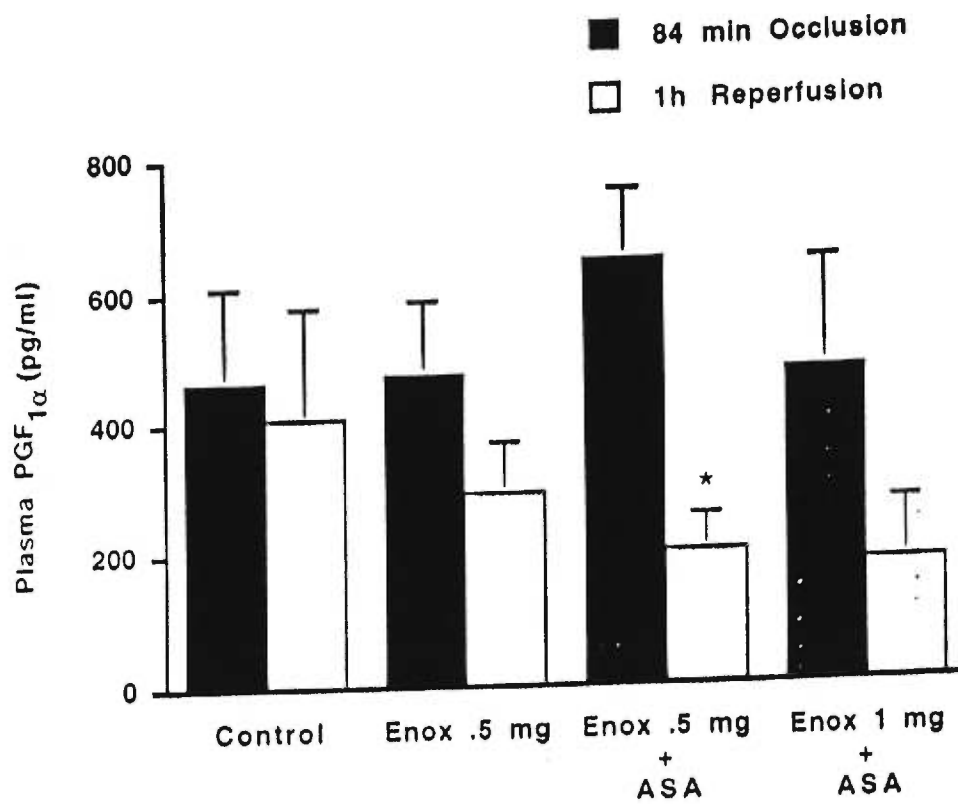


TABLE 1. Group characteristics and hematologic data

	Control	Enoxaparin .5 mg	Enoxaparin .5 mg + ASA	Enoxaparin 1 mg + ASA
Dogs (Total)	28	17	23	26
Dogs excluded	5	0	2	4
VF occlusion	3	2	5	6
VF reperfusion	11	5	8	9
Dogs included	9	10	8	7
Sex (M)(F)	(5)(4)	(3)(7)	(1)(7)	(3)(4)
Weight (kg)	22.3 ± 1.2	23.6 ± 1.0	22.8 ± 1.3	22.9 ± 1.2
Hematocrit (%)	45.3 ± 1.5	44.9 ± 1.6	48.1 ± 0.8	47.6 ± 1.5
Hemoglobin (g/dl)	155.9 ± 5.3	157.0 ± 4.9	165.3 ± 2.8	162.7 ± 5.4
Leukocytes (10 ⁹ /l)	13.8 ± 1.1	15.5 ± 0.8	13.9 ± 1.4	12.8 ± 1.1
Platelets (10 ⁹ /l)	306 ± 30	305 ± 20	273 ± 17	261 ± 19

Results are Mean ± S.E.
VF: Ventricular fibrillation.

TABLE 2. Hemodynamic data

	Control	Enoxaparin .5 mg	Enoxaparin .5 mg + ASA	Enoxaparin 1 mg + ASA
Before occlusion PRP	190.0 ± 15.4	227.1 ± 8.4	207.3 ± 18.4	191.2 ± 16.7
LADCA Flow	23.4 ± 4.2	29.7 ± 3.7	30.1 ± 4.7	31.4 ± 4.5
90 min occlusion PRP	178.9 ± 13.2	209.5 ± 12.2	188.0 ± 24.4	161.8 ± 14.5
3h reperfusion PRP	165.1 ± 8.4	196.4 ± 12.4 *	157.9 ± 17.6 *	167.7 ± 18.7
LADCA Flow	15.1 ± 2.0 *	16.9 ± 1.8 *	18.1 ± 3.2 *	16.1 ± 1.3 *
6h reperfusion PRP	140.2 ± 8.4 *	172.4 ± 16.9 *	162.7 ± 20.9 *	144.8 ± 16.5 *
LADCA Flow	11.2 ± 1.1 *	13.5 ± 1.9 *	14.4 ± 1.9 *	10.4 ± 1.7 *

Results are Mean ± S.E.

PRP: pressure-rate product (heart rate × blood pressure/100); LADCA flow: left anterior descending coronary artery flow (ml/min).

* $P < .05$ versus before occlusion.

TABLE 3. Myocardial area at risk, infarct size, collateral and regional blood flow

	Control	Enoxaparin .5 mg	Enoxaparin .5 mg + ASA	Enoxaparin 1 mg + ASA
Area at risk (AR)(%LV)	37.64 ± 1.82	40.02 ± 2.05	40.89 ± 2.29	42.93 ± 2.12
Infarct size (% AR)	43.80 ± 6.28	41.04 ± 5.87	44.41 ± 5.75	32.82 ± 5.50
Blood flow (mL/min/g), 15 min occlusion in ischemic region				
Subendocardium	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Transmural	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.03
Blood flow (mL/min/g), 3h reperfusion in ischemic region				
Subendocardium	0.35 ± 0.12	0.31 ± 0.09	0.40 ± 0.20	0.45 ± 0.12
Transmural	0.43 ± 0.09	0.46 ± 0.08	0.42 ± 0.13	0.44 ± 0.04

Results are Mean ± S.E.
LV: Left ventricle.

GPIIb/IIIa Receptor Blockade at Reperfusion Reduces Infarct Size in the Dog*

PIERRE DAGENAIS^{1,4}, DANIELLE LIBERSAN^{2,4}, YAHYE MERHI^{3,4}, GUY ROUSSEAU^{1,4},
and JEAN-GILLES LATOUR^{1,4}

From the Departments of Pathology¹, Pharmacology² and Medicine³, Université de Montréal, the Laboratory of Experimental Pathology⁴, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada.

*The study was supported by grants from the Quebec Heart and Stroke Foundation and Rhône Poulenc Rorer Canada Inc.

Running title: GPIIb/IIIa and infarct size.

Address for proofs and reprints: Dr. Jean-Gilles Latour, Director, Laboratory of Experimental Pathology, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. East, Montreal, Quebec, Canada. Tel. (514) 376-3330 #3610, Fax: (514) 376-1441.

ABBREVIATIONS: ADP, adenosine diphosphate; LADCA, left anterior descending coronary artery; MPO, myeloperoxidase; GPIIb/IIIa, glycoprotein IIb/IIIa

ABSTRACT

We reported previously that infarct size progression following myocardial ischemia and reperfusion in the presence of a residual critical stenosis is platelet-dependent. In this study, we have investigated the effect of Lamifiban, a nonpeptidic antagonist of the platelet β_3 -integrin (GPIIb/IIIa), on infarct size in the dog. The left anterior descending coronary artery was occluded for 90 min in anesthetized dogs followed by 6 hrs of reperfusion with a residual critical stenosis in place. Five min before reperfusion, the treated group (n=10) received a 360 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bolus i.v. of Lamifiban followed by 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ perfusion until sacrifice. The control group (n=10) received saline. Collateral blood flow measured with radioactive microspheres and the area at risk delimited by dye perfusion were statistically similar between groups. Covariance analysis between infarct size (% of area at risk) delimited with triphenyltetrazolium and collateral blood flow confirmed that Lamifiban-treated dogs developed smaller infarcts ($22.0 \pm 5.3\%$) as compared to controls ($41.4 \pm 6.3\%$, $P < 0.05$). This beneficial effect of Lamifiban was associated with a significant reduction (48%) of ^{111}In -platelet deposition in the infarct zone and a complete inhibition of whole blood platelet aggregation to ADP + epinephrine. Neutrophil accumulation in the infarcts was statistically similar between groups. This study highlights the cardioprotection afforded by the GPIIb/IIIa receptor blocker Lamifiban and strengthens the importance of platelets on infarct size during reperfusion following myocardial ischemia.

The efficacy of anticoagulant and antiplatelet therapies in association with thrombolytics is now well accepted as useful therapeutic measures to reduce the time to myocardial reperfusion and/or the frequency of reocclusion [1]. Early reperfusion limits the extent of necrosis and salvages jeopardized myocardium [2] but overall benefits may be limited by reperfusion injury [3]. Reperfusion injury is a complex pathophysiologic process involving production or release of cytotoxic and vasoactive materials such as free oxygen radicals [4], lysosomal enzymes [5], and prostaglandins and leukotrienes [6] derived from ischemic tissue, platelets and leukocytes. Invading neutrophils also contribute to capillary plugging [7] which may further compromise reflow and survival of jeopardized myocardium [8], and this adverse reaction may be potentiated by aggregating platelets.

Presence of a residual stenosis in the infarct-related artery during early reperfusion exacerbates tissue injury and increases infarct size by a platelet-dependent mechanism [9]. These observations are clinically relevant because angiographically significant residual stenosis has been documented in >75% of patients following successful thrombolysis [10], and platelet activation occurring at the site of severe coronary stenosis is responsible for cyclic flow variations [11], and other platelet-related phenomena in the reperfused vasculature. The contribution of platelets to these events is related to their ability to form aggregates, to produce potent vasoactive substances, and to interact with leukocytes [12].

Recently, we reported that therapeutic doses of a low molecular weight heparin limits infarct size in the dog by a process involving reductions in both platelet and neutrophil accumulations in the reperfused myocardium [13]. In contrast, intravenous doses of aspirin failed, under similar experimental conditions, to limit infarct size [14]. Current antiplatelet drugs are relatively weak inhibitors of platelet aggregation due to their specificity for only one of the many platelet activators (thromboxane A₂, thrombin, ADP, epinephrine and collagen). Independent of the agonist, the final common pathway of platelet aggregation is mediated through an adhesive interaction between platelet glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) complex, or β_3 integrin, and fibrinogen, von Willebrand factor, fibronectin and thrombospondin [15]. Blockade of platelet GPIIb/IIIa has proven superior

to commonly used antiplatelet and anticoagulant therapies on coronary artery reperfusion and reocclusion after thrombolytic therapy [16]. In addition to their beneficial effects at the site of arterial injury, GPIIb/IIIa receptor antagonists may be effective in reducing infarct size and platelet-related events in the reperfused myocardium.

This study was designed to assess, in a canine model of myocardial ischemia and reperfusion in the presence of a critical coronary stenosis, the potential effects of Lamifiban, a selective nonpeptidic low molecular weight GPIIb/IIIa antagonist, on infarct size.

Materials and Methods

Ischemia and reperfusion. Mongrel dogs of either sex weighing 18 to 28 kg were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.v.), intubated and ventilated mechanically with room air. Blood gases and pH were kept within physiologic range, and lead II electrocardiogram was monitored continuously. Catheters were inserted in the right femoral vein and artery for blood sampling and in the left artery for mean blood pressure monitoring. After injecting pancuronium bromide (0.1 mg/kg, i.v.), a left thoracotomy was performed at the fifth intercostal space and the heart suspended in a pericardial cradle. Catheters were introduced in the left atrium for radioactive microsphere injections, and in the left ventricle through the left atrial appendage for pressure monitoring.

As described previously [9], the left anterior descending coronary artery (LADCA) was isolated distal to its first diagonal branch and an electromagnetic flowmeter was fitted to measure coronary blood flow. Five min before occlusion, a micrometer occluder was adjusted on the LADCA to produce an eccentric critical coronary stenosis sufficient to abolish the hyperemic response produced after the release of a 10-sec occlusion without affecting basal blood flow. The LADCA was occluded for 90 min in every group followed by 6 hrs reperfusion in the presence of the critical stenosis. Animals that failed to develop persistent cyanosis of the epicardial surface and ST segment changes (< 0.1 mV) after 10 min of occlusion were sacrificed and excluded from the study. Animals presenting refractory ventricular fibrillation after 3 successive attempts for cardioversion were excluded.

Studies adhered to the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Care and were approved by a local committee.

Animal groups. Animals were allocated at random among groups. Controls received an intravenous bolus of physiologic saline (10 ml) 5 min before reperfusion followed by a perfusion throughout the experiment. Likewise, treated dogs were given an intravenous bolus of Lamifiban (Hoffman-La-Roche Ltd, Switzerland) (360 μ g/kg) followed by a perfusion of 6 μ g/kg/min during the course of reperfusion.

Infarct sizing. Infarct sizing has been described in details elsewhere [17]. Briefly, after 6 hrs reperfusion, heparin (10 000 U) was injected in the left atrium and the animals were sacrificed by fibrillation. The heart was rapidly excised, and the site of the LADCA occlusion and the aorta above the coronary ostia were cannulated and perfused with saline (0.9%) and, subsequently, by perfusion of the aorta with Evans blue dye 0.5% (Sigma, Canada) at a constant pressure of 100 mmHg for 10 min. After removal of the right heart, the left heart was embedded in a polyurethane foam and cut into 7 mm thick transverse slices. The slices were weighed and immersed in triphenyltetrazolium chloride (Sigma, Canada). The normally perfused myocardium, the area at risk of ischemia and the necrotic myocardium were delineated, and respective areas were measured on each slice by computerized planimetry. The area at risk was expressed as a percentage of the left ventricle and the infarct size as a percentage of the area at risk.

Regional and collateral myocardial blood flow. Regional and collateral blood flow were measured as described previously [18] after 15 min of coronary occlusion and at 3 hrs reperfusion using microspheres (15 μm) labeled with ^{57}Co or ^{85}Sr (NEN Dupont Canada Inc., Canada). Approximately 3-4 million microspheres were injected into the left atrium and a reference arterial blood sample was withdrawn from the femoral artery at a constant rate with a syringe pump (Harvard Apparatus Corp., USA) for 150 sec, starting 15 sec before microsphere injection. For regional blood flow analysis, three to four central slices were divided into non-ischemic and ischemic regions. Sections from the central ischemic area and from the wall opposite to the area at risk were dissected into three equal subepicardial, mesomyocardial, and subendocardial portions. Each sample was weighed and counted in a gamma counter (Packard 5000, USA) with selected energy windows. Myocardial blood flow was calculated and expressed in ml/min/g.

Platelet isolation and ^{111}In -labeling. Preparation of autologous labeled platelet suspensions has been described previously [9]. Briefly, platelets were isolated from each dog by centrifuging venous blood. After four successive washings with tyrode, the platelets were incubated for 1 min with approximately 300 μCi ^{111}In -indium-oxine (Amersham, Canada). Platelet-poor supernatant was added to bind excess free ^{111}In -oxine and discarded after centrifugation. The

platelets were resuspended in 5 ml citrated platelet-poor plasma and injected intravenously prior to occlusion.

Platelet accumulation in myocardial tissue. Infarcted, ischemic and normal non-ischemic myocardium from the opposite free wall were dissected, weighed and counted in a gamma counter over a period of 5 min. The labeled-cell counts were determined by reporting the values obtained over that of the standard (1×10^6 platelets) and accumulations were estimated per gram of tissue for each region. The results were then expressed as a ratio between the ischemic and normal regions.

Neutrophil accumulation in myocardial tissue. Neutrophil counts in myocardial tissue were estimated by neutrophil-specific myeloperoxidase (MPO) activity as described previously [19] using *O*-dianisidine and hydrogen peroxide as substrates [20]. To establish a reference curve in each dog between MPO activity and neutrophil counts, neutrophils were isolated from venous blood withdrawn immediately after anesthesia. Briefly, following centrifugation, the neutrophils were recovered from the second layer and washed twice in a double volume Hank's balanced salt solution. Contaminating red blood cells were eliminated by hypotonic hemolysis. The cells were counted with an electronic cell counter (Coulter Corporation, USA) and suspensions containing 1×10^6 to 4×10^6 neutrophils were prepared and frozen at -70°C for later use.

Myocardial tissue MPO activity was assayed in all dogs using a central ventricular slice rapidly frozen on a stainless steel plate and stored at -70°C . Tissue samples (100 mg) were taken from the subepicardial layer of the infarct approximately 1-1.5 mm under the salvaged myocardium; small (< 5% area at risk) and patchy infarcts were not assayed. Briefly, samples were thawed and refrozen once in liquid nitrogen, crushed with a pillar and homogenized in hexyl at 4°C . The homogenate was freeze-thawed three times in liquid nitrogen with 10-sec sonication over ice between each freezing. The homogenate was centrifuged, and the supernatant was assayed for MPO by adding to a 0.1 ml of sample, 2.9 ml of phosphate buffer containing *O*-dianisidine dihydrochloride and hydrogen peroxide 0.3%. Absorbency was read at 460 nm over 3 min. Results were expressed as 10^6 neutrophils/g of wet tissue by referring to the neutrophil reference curve constructed with MPO values of each animal neutrophil concentrates.

Platelet aggregation and bleeding time. Platelet aggregation was tested by impedance aggregometry (Chrono-Log Corp., USA) within one minute of sampling on heparinized (5U/ml) venous whole blood [21] obtained just prior to Lamifiban injection (84 min occlusion), 5 min later (89 min occlusion), and after 1, 3 and 6 hrs of reperfusion. Blood (490 μ l) diluted with 500 μ l saline (37°C) was challenged with 10 μ l of ADP (20 μ M) and epinephrine (20 μ M) and the extent of aggregation was estimated as the surface area under the curve response obtained during five minutes after adding the agonists.

Bleeding time was determined in the dog ear using a template blade device (Organon Teknika Co, USA) before treatment and 35 min after the infusion of saline or Lamifiban.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm S.E. for each group. Intergroup comparisons were analyzed by unpaired Student t-test. Intragroup comparisons of hemodynamic data, hematologic parameters, bleeding time and aggregation were analyzed with a one-way analysis of variance for repeated measures followed by a Dunnett's test between time values and values at baseline. A covariance analysis between infarct size (dependent variable) and collateral blood flow (covariate) was used in controlling the variability in infarct size due to collateral blood flow. Platelet accumulation ratios were analyzed with a one tail unpaired t-test. Differences were considered statistically significant with $P < 0.05$.

Results

Group Characteristics: Forty four dogs underwent surgery; 20 (10 in each group) completed the study. Twenty-four were excluded because of ventricular fibrillation that occurred in 14 dogs during occlusion (seven in each group) and in 10 dogs during reperfusion (5 in each group). No statistical difference in terms of weight, hematocrit, hemoglobin, platelet and leukocyte counts was observed between groups (table 1). All these parameters were within the normal range.

Hemodynamic data: There was no significant difference between groups for heart rate, peak systolic left ventricular pressure, pressure-rate product and LADCA flow before or during the experiments.

However, as indicated in table 2, intragroup comparisons show that LADCA flow and pressure-rate product were decreased in control and treated groups at 6 hrs of reperfusion compared to values obtained before occlusion indicating that some damage occurred in the ischemic region during reperfusion.

Infarct size and collateral flow: As shown in figure 1, the area at risk was virtually the same in the two groups, and involved approximately 40% of the left ventricle. However, infarct size reported in percentage of the area at risk was approximately 50% smaller ($P < 0.05$) in treated animals as compared to controls (22.0 ± 5.3 vs $41.4 \pm 6.3\%$)

Transmural collateral blood flows, during occlusion (control: 0.11 ± 0.02 and Lamifiban: 0.13 ± 0.3 ml/min/g) and during reperfusion (control: 0.36 ± 0.04 and Lamifiban: 0.50 ± 0.08 ml/min/g) in the ischemic region, were statistically similar between groups and no difference was observed independently of the myocardial layer analyzed. In the non-ischemic region, regional myocardial blood flow was approximately 1 ml/min/g and no difference was observed between values obtained in control and treated groups during ischemia and at 3 hrs of reperfusion.

Figure 2 illustrates the correlation between infarct size and transmural collateral blood flow measured at 15 min of occlusion. Analysis of covariance confirms that for similar levels of collateral flow, Lamifiban-treated dogs developed smaller infarcts than controls.

Neutrophil and platelet accumulations: Lamifiban reduced non-significantly the

neutrophil counts in the infarct from 7.8 ± 1.1 in the control to $5.6 \pm 1.8/g$ in the treated group. Platelet deposition (figure 3) expressed as a ratio between the infarct and the normal region was 2 folds higher in the control than in the Lamifiban group ($P < 0.05$).

Platelet aggregation (figure 4): Platelet aggregation induced by ADP and epinephrine remained unchanged in the control group throughout the experiment. However, the administration of Lamifiban reduced platelet aggregation to an undetectable level throughout the reperfusion period.

Bleeding time: There was no difference between groups before treatment. At 30 min of reperfusion, bleeding time remained unchanged in the control group. However, in the treated group, bleeding time was increased significantly from 2.9 ± 0.3 min at baseline to 11.8 ± 1.7 min following Lamifiban administration.

Discussion

The present study demonstrates that Lamifiban, a new selective nonpeptidic inhibitor of platelet GPIIb/IIIa, administered 5 min before reperfusion reduces infarct size in a canine model of myocardial ischemia and reperfusion in the presence of a residual coronary stenosis. This effect was associated with a significant reduction of platelet accumulation, inhibition of platelet aggregation and prolongation of bleeding time but was without any significant effect on neutrophil accumulation in the reperfused infarcts. Because Lamifiban has been identified to inhibit platelet-platelet interactions, these results indicate that platelets are important mediators of infarct size progression during reperfusion.

In the present study, we have used a well established canine model of myocardial infarction with fixed periods of coronary occlusion and reperfusion. We avoided the use of an experimental model with an occlusive thrombus followed by thrombolysis because, in such models, thrombolysis initiates gradual reperfusion leading to different periods of ischemia and erroneous comparisons of infarct size between animals. However, since dissolution of a thrombotic plug usually unmasks a partial eccentric stenosis consisting of an atheromatous plaque [10], reperfusion of the infarct-related coronary artery, in our model, was done in the presence of a critical stenosis.

Presence of a critical stenosis has important effects on the evolution of infarct size during reperfusion. Indeed, we have previously reported that reperfusing through a stenosis increases infarct size by a platelet-dependent mechanism [9]. Moreover, our observation of enhanced platelet accumulation in reperfused myocardium in this setup suggests that some platelet activation occurs within the stenosis. Folts and colleagues [11] have demonstrated that platelet activation at the site of stenosis is responsible for cyclic flow variations that can be abolished with aspirin. However, increasing the stenosis to 80%, as in our model, cause a 50% increase in shear-stress and re-establishment of cyclic flow variations [22]. As shear-stress is a powerful platelet activation factor [23] insensitive to aspirin [24], it is not surprising that the more potent and specific platelet antagonist Lamifiban efficaciously attenuated platelet accumulation in the reperfused myocardium

and, consequently, infarct size.

Injection of Lamifiban almost immediately abolished platelet aggregation induced by ADP and epinephrine. This effect was expected since, independently of the platelet agonist, Lamifiban blocks the interaction between fibrinogen and the active form of the GPIIb/IIIa receptors present at the platelet surface, inhibiting the final step of the aggregation process [15]. However, it is surprising that specific inhibition of platelet aggregation induced a reduction of infarct size. Indeed, our group showed, using the same protocol as the present one, that different concentrations of intravenous aspirin (2 to 12 mg/kg) could not salvage jeopardized myocardium even though *ex vivo* platelet aggregation to collagen was abolished [14]. Similar results were also obtained by others [25, 26] suggesting that inhibition of platelet activation pathway is not sufficient to reduce infarct size. However, the failure of aspirin to protect post-ischemic myocardium may be attributed to the fact that blockade of cyclooxygenase is not sufficient for ablation of thrombus formation when concentration of platelet agonists such as thrombin and collagen is high. These highly potent agonists can stimulate other pathways of platelet activation providing diversity in the ways platelets respond to stimulation. Multiple pathways pose a challenge for effective inhibition of platelet activation because pharmacological blockade of one signal-transducing pathway may not be sufficient for a complete inhibition of platelet function. However, decreased production of PGI₂ by reperfused myocardium in the presence of ASA may explain the lack of benefit of ASA on infarct size, because PGI₂ is a cytoprotective agent with antithrombotic, vasodilatory and antiadhesive properties known to limit infarct size when administered at therapeutic dose. The beneficial effects of Lamifiban on platelet accumulation and infarct size progression may be due in part to its ability to block the final step of platelet aggregation induced by all agonists but other mechanisms are likely involved. Inhibition of microaggregate formation could theoretically explain the effect of lamifiban, but our study failed to document a significant improvement of reflow in treated animals. Nevertheless, the involvement of the no-reflow phenomenon in the development of reperfusion injury remains questionable.

Neutrophil adhesion is predominantly mediated by sequential steps involving L-selectin and

β_2 -integrin on neutrophils, and P- and E-selectin as well as ICAM on activated endothelial cells [27]. Recently, the platelet GPIIb/IIIa complex has also been implicated in the adhesion of activated platelets to leukocytes [28]. The fact that fibrinogen binds to activated platelets via GPIIb/IIIa and to neutrophils via their activated CD11b/CD18 [29] is particularly important and may constitute a new mechanism for neutrophil adhesion to thrombogenic surfaces. As shown in the present study, it is not surprising that Lamifiban was without any significant effect on neutrophil accumulation in the reperfused infarcts. However, the slight reduction of neutrophil adhesion may be attributed to an effect of Lamifiban on neutrophil-platelet interactions. Inhibition of platelet-neutrophil interactions is associated with reduced secretion of vasoactive substances such as thromboxane A_2 and LTC_4 [30] which may contribute to reduce infarct size.

In conclusion, inhibition of platelet GPIIb/IIIa receptors by Lamifiban reduces infarct size. This effect is related to a complete inhibition of platelet aggregation and a significant attenuation of platelet accumulation in the reperfused infarcts. These results highlight the cardioprotection afforded by the GPIIb/IIIa receptor blocker Lamifiban and strengthen the involvement of platelets on infarct size increment during reperfusion following myocardial ischemia.

Acknowledgments

The authors wish to thank Robert Clément BSc, Claudette Léger-Gauthier PhD, Duc C. Tran MD, MSc for their technical assistance, and Nicole Serruys for her secretarial support.

We are also grateful to Dr. Sebastien Roux (Hoffman-La-Roche, Switzerland) for his supply of Lamifiban.

References

- [01] Roux S, Christeller S, Lüdin E. Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta analysis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:671-677.
- [02] Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death.I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-794.
- [03] Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
- [04] Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;54:277-285.
- [05] Wildenthal K. Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:595-603.
- [06] McCluskey ER, Murphree S, Saffitz JE, Morrison AR, Needleman P. Temporal changes in 12-HETE formation in two models of canine myocardial infarction. *Prostaglandins* 1985;29:387-403.
- [07] Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983;111:98-111.
- [08] Lucchesi BR, Mullane KM. Leukocytes and ischemia-induced myocardial injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986;26:201-204.
- [09] Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G. Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
- [10] van Lierde J, De Geest H, Verstraete M, Van de Werf F. Angiographic assessment of the infarct-related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:1545-1549.

- [11] Folts JD, Crowell Jr. EB, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976;54:365-370.
- [12] Dinerman JL, Mehta JL. Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:207-222.
- [13] Libersan D, Khalil A, Dagenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, Latour J-G. The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* (submitted)
- [14] Libersan D, Quan E, Merhi Y, Uzan A, Latour J-G. Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* (submitted)
- [15] Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843.
- [16] Roux SP, Tschopp TB, Kuhn H, Steiner B, Hadvary P. Effects of heparin, aspirin and a synthetic platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonist (Ro 43-5054) on coronary artery reperfusion and reocclusion after thrombolysis with time-type plasminogen activator in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:501-508.
- [17] Chatelain P, Latour J-G, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa, M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75:1083-1090.
- [18] de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour J-G. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532.
- [19] Rousseau G, St-Jean G, Latour J-G, Merhi Y, Nattel S, Waters D. Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1991;25:319-329.
- [20] Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM. Nafazatrom induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function.

- Circ Res 1985;57:1342-1348.
- [21] Diodati J, Théroux P, Latour J-G, Lacoste L, Lam JYT, Waters D. Effects of nitroglycerin at therapeutic doses on platelet aggregation in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;66:683-688.
- [22] Maalej N, Folts JD. Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996;93:1201-1205.
- [23] Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993;70:119-123.
- [24] Barstad RM,   rvim U, Hamers MJ, Tjønnfjord GE, Brosstad FR, Sakariassen KS. Reduced effect of aspirin on thrombus formation at high shear and disturbed laminar blood flow. *Thromb Haemost* 1996;75:827-832.
- [25] Mullane KM, Fornabaio D. Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent, aspirin-sensitive mechanism. *Circ Res* 1988;62:668-678.
- [26] Grover GJ, Schumacher WA. Effect of the thromboxane A₂ receptor antagonist SQ 30,741 on ultimate myocardial infarct size, reperfusion injury and coronary flow reserve. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:484-491.
- [27] Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in acute inflammation and atherogenesis. In: Simionescu N, Simionescu M, eds. *Endothelial cell dysfunctions*, New York: Plenum Press, 1992: 129-140
- [28] Spagenberg P, Redlich H, Bergmann I, L  sche W, G  tzrath M and Kehrel B: The platelet glycoprotein IIb/IIIa is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemostas* 1993;70 (3):514-521.
- [29] Kuijper PH, Gallardo Torres HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelets and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* 1997;89:166-175.
- [30] Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in

thromboxane B₂ and leukotriene C₄ cooperative synthesis. *Thromb Haemostas* 1994;72:450-456.

Footnotes

¹The study was supported by grants from the Quebec Heart and Stroke Foundation and Rhône Poulenc Rorer Canada Inc.

Legends for figures

Figure 1. The area at risk (AR) presented as percentage of left ventricle (LV) and infarct size (I) presented as percentage of the area at risk and of the left ventricle in control and treated groups. (* P<0.05 vs control)

Figure 2. Relationship between infarct size (% of area at risk) and transmural collateral blood flow in control and treated groups. Analysis of covariance confirms that infarct size is smaller (P<0.05) in the Lamifiban group.

Figure 3. Platelet accumulation expressed as ratio between ischemic and normal zones in the control and Lamifiban groups. (*P<0.05 vs control)

Figure 4. Platelet aggregation in response to ADP and epinephrine at baseline before the injection of Lamifiban and at 4 min, 1, 3 and 6 hrs post injection.

TABLE 1. Group characteristics and hematologic data

Groups	Control	Lamifiban
N =	10	10
Weight (kg)	22.9 ±0.92	21.7 ± 0.93
Hematocrit (%)	44.0 ± 1.0	44.0 ± 1.0
Hemoglobin (g/dl)	154.5 ± 5.34	152.7 ± 2.75
Leukocytes (10 ⁹ /l)	12.18 ± 1.15	12.82 ±1.52
Platelets (10 ⁹ /l)	366.4 ± 29.9	294.8 ± 19.0

TABLE 2. Hemodynamic data

Groups		Control	Lamifiban
Before occlusion	PRP	207.7 ± 16.5	189.8 ± 14.5
	LADCA Flow	27.7 ± 2.7	29.1 ± 3.4
90 min occlusion	PRP	188.6 ± 12.3	165.2 ± 12.8
6 hrs reperfusion	PRP	153.6 ± 18.0 *	109.6 ± 18.8 *
	LADCA Flow	14.7 ± 2.9 *	11.2 ± 2.1 *

Mean ± SE; PRP: pressure-rate product (heart rate × blood pressure/100);

LADCA flow: left anterior descending coronary artery flow (ml/min).

* P < 0.05 versus before occlusion.

Figure 1

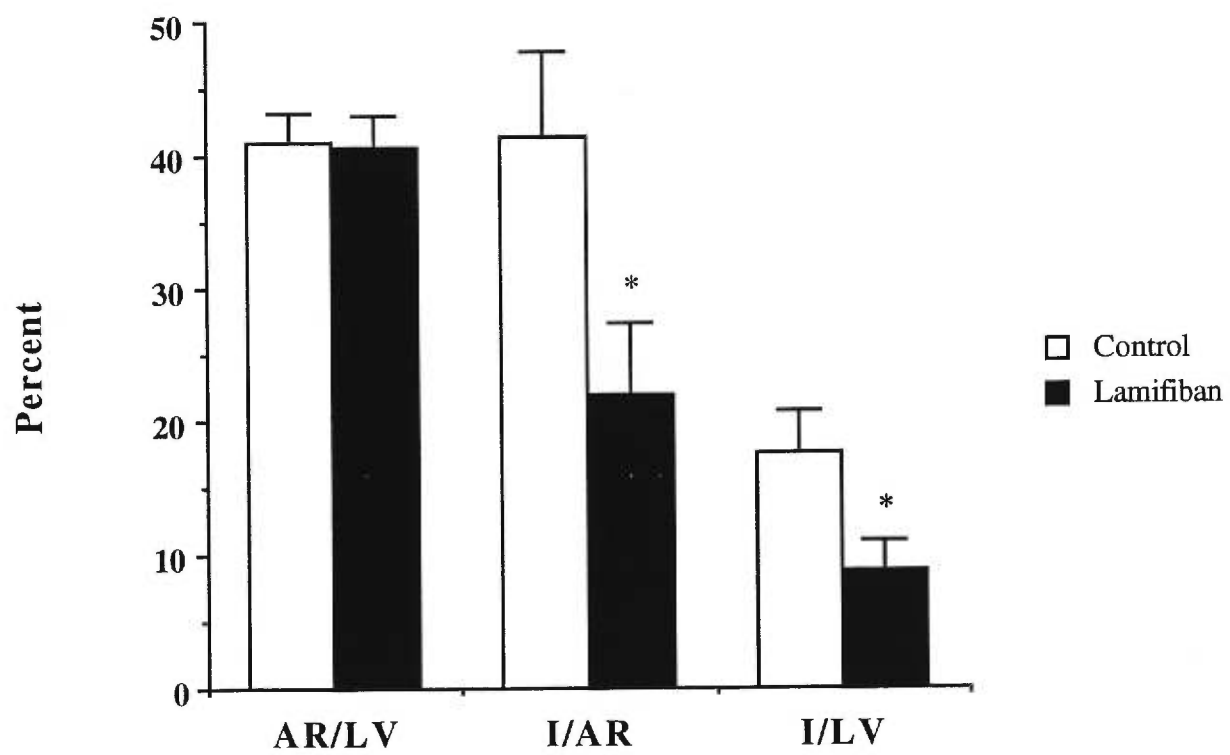


Figure 2

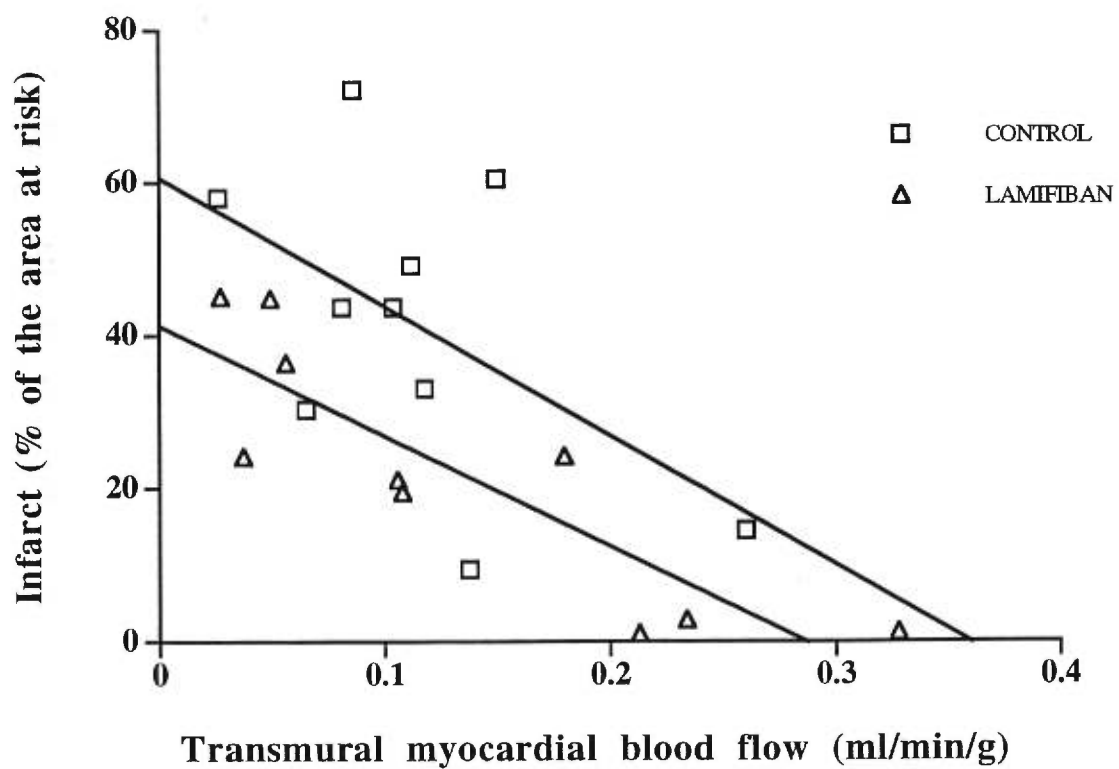


Figure 3

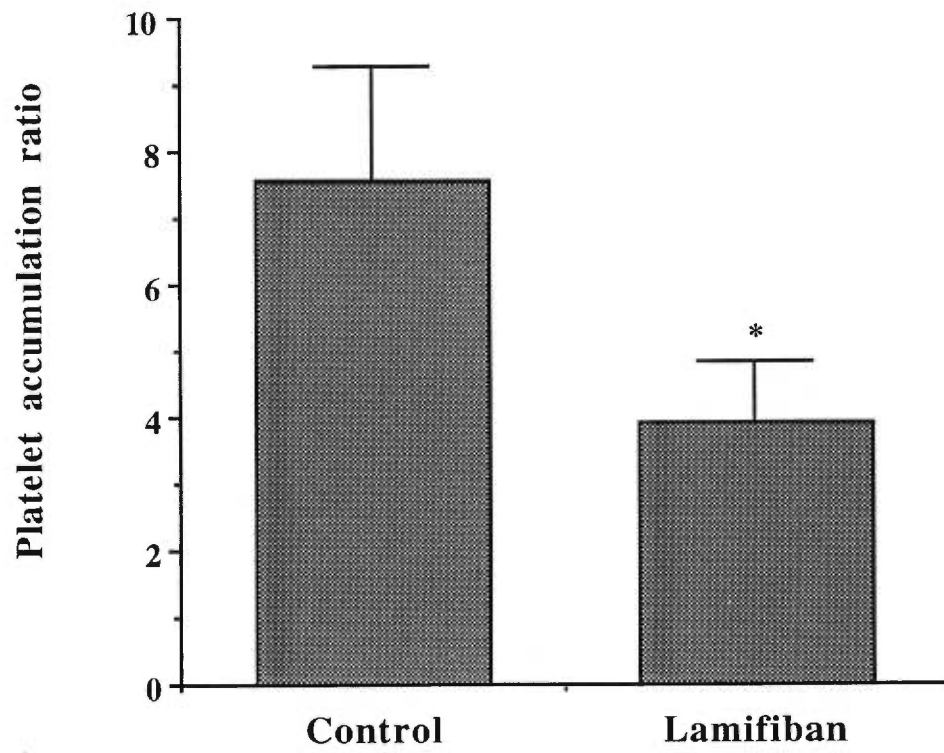
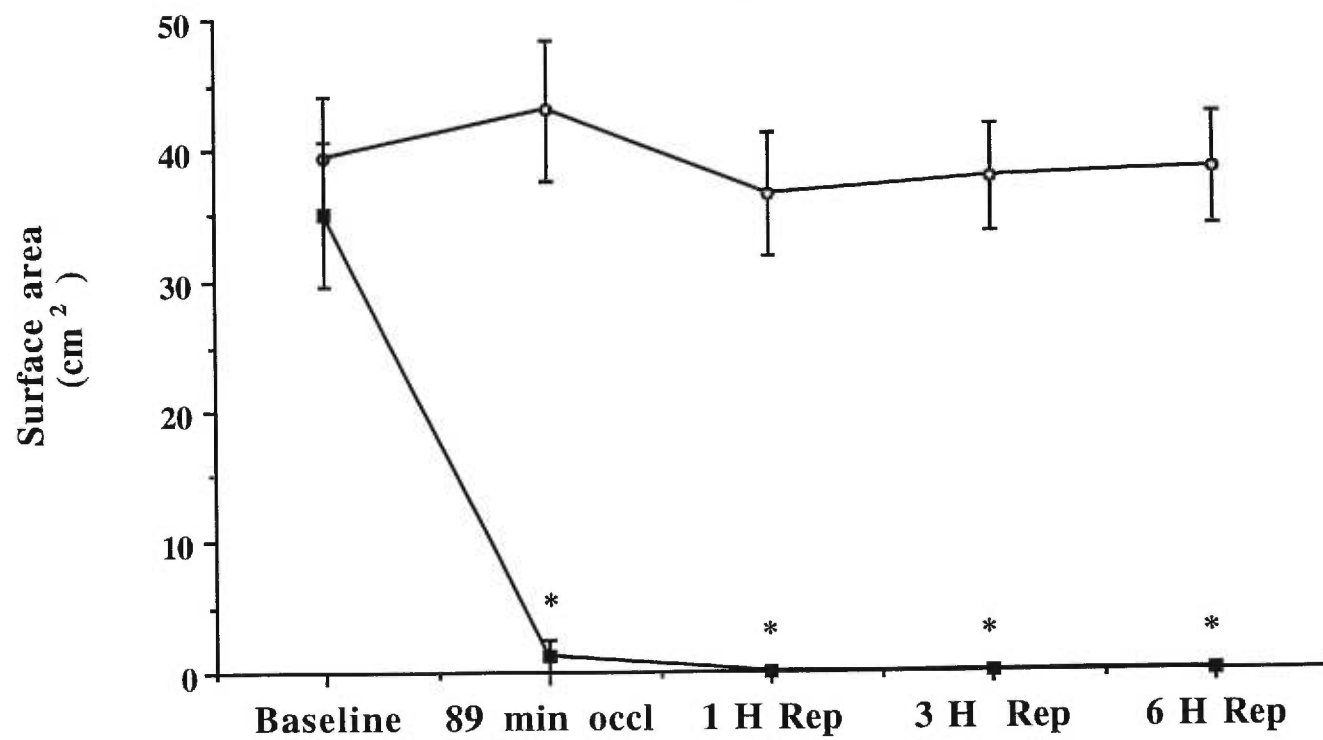


Figure 4



Discussion

Il existe dans la littérature scientifique, un nombre impressionnant d'études concernant la physiopathologie des lésions de reperfusion et leurs séquelles sur la survie du myocarde post-ischémique. De même, le bien-fondé de l'administration d'un traitement pharmacologique associé à la reperfusion et ayant pour but d'améliorer la sauvegarde du myocarde ischémique en prévenant les lésions de reperfusion est largement accepté. Cependant, certains aspects des lésions de reperfusion sont encore peu connus. C'est notamment le cas des plaquettes sanguines.

Bien que l'on ait remarqué une accumulation massive de plaquettes dans le myocarde reperfusé, très peu d'études ont documenté leurs rôles dans le développement de l'infarctus en cours de reperfusion. Ce manque d'information contraste avec les connaissances acquises à ce jour sur les effets délétères des neutrophiles pour le myocarde post-ischémique. La migration massive des neutrophiles vers le territoire ischémique pendant la reperfusion est associée à la progression de l'infarctus pendant les premières heures de reperfusion. Sous-jacents au phénomène de non reperfusion, les neutrophiles libèrent une multitude d'agents bioactifs, facteurs cytotoxiques comme les radicaux libres dérivés de l'oxygène, métabolites lipidiques et enzymes lysosomiales qui compromettent la survie du myocarde reperfusé. Il est néanmoins possible que les plaquettes jouent un rôle prépondérant dans la progression de l'infarctus sous certaines conditions. Par exemple, suite au traitement thrombolytique, plus de 75% des patients présentent toujours une sténose sur l'artère irrigant le foyer ischémique. L'activation plaquettaire intense qui se produit au foyer de la sténose pourrait favoriser la mobilisation des plaquettes vers le territoire ischémique et accélérer le développement de la nécrose pendant la reperfusion. Si tel est le cas, un traitement antiplaquettaire pourrait

minimiser les effets délétères des plaquettes sur la sauvegarde du myocarde post-ischémique. Ainsi, la présente étude vise à documenter le rôle des plaquettes dans le développement de l'infarctus en cours de reperfusion et le potentiel cardioprotecteur d'un traitement antithrombotique au moment et pendant la reperfusion.

Dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion, nous avons en premier lieu documenté l'influence d'une sténose critique résiduelle pendant la reperfusion sur la capture des plaquettes par le myocarde reperfusé et la taille ultime de l'infarctus. Les résultats de cette première étude démontrent qu'une sténose critique sur l'artère reperfusée augmente le taux d'accumulation des plaquettes dans la zone nécrosée de 55% en plus d'accroître de 40% la taille de l'infarctus. L'induction d'une thrombocytémie sévère (réduction de 90% des plaquettes en circulation) abolit cet accroissement de l'infarctus, mais seulement dans les groupes reperfusant avec une sténose critique. Ces résultats démontrent que la présence d'une sténose critique compromet la sauvegarde du myocarde reperfusé et suggèrent un lien direct entre les plaquettes et l'accroissement de l'infarctus. Les plaquettes semblent donc jouer un rôle beaucoup plus important qu'on le croyait, hypothèse qui est corroborée par l'observation que la neutropénie simultanée (réduction de 85% des neutrophiles en circulation) ne peut amplifier la cardioprotection observée dans le cas de la thrombocytémie.

Les mécanismes par lesquels les plaquettes favorisent le développement de l'infarctus ne sont pas élucidés, mais il est possible qu'une augmentation de la turbulence du sang et des forces de cisaillement au foyer de la sténose stimulent l'activation des plaquettes avant même qu'elles accèdent au territoire ischémique, amplifiant ainsi les lésions vasculaires par la libération de médiateurs bioactifs d'origine plaquettaire. Ainsi, le développement de thérapies

antiplaquettaires adjuvantes pourrait s'avérer bénéfique pour les patients ayant subi une thrombolyse coronarienne précoce.

Suite à ces premières observations, nous avons évalué le potentiel cardioprotecteur des anticoagulants héparine et énoxaparine ainsi que du thrombolytique streptokinase sur la taille de l'infarctus et l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé. Les résultats de cette étude démontrent que l'administration d'un bolus d'énoxaparine 5 minutes avant le début de la reperfusion suivie d'une perfusion continue réduit de 55% la taille de l'infarctus par rapport aux animaux témoins. Cet effet s'accompagne d'une inhibition significative du taux d'accumulation des plaquettes (64%) et des neutrophiles (81%) dans le myocarde reperfusé, ce qui suggère que l'énoxaparine agit probablement sur des mécanismes responsables de l'adhésion entre les plaquettes et les neutrophiles.

L'inefficacité de l'héparine à réduire de façon significative la taille de l'infarctus contraste avec l'étude de Black et coll. (1995). Cette divergence pourrait s'expliquer par notre utilisation d'une dose thérapeutique d'héparine suffisante pour prolonger le temps de thromboplastine activée et maintenir une activité anti-Xa optimale au cours des premières heures de reperfusion, mais ne permettant pas de diminuer de façon significative la séquestration des plaquettes et des neutrophiles et, par conséquent, la taille de l'infarctus. Il est possible qu'une dose d'héparine se situant dans la portion supérieure de la fenêtre thérapeutique et maintenant de façon soutenue l'activité anti-Xa soit plus efficace.

L'administration d'une dose thérapeutique de streptokinase n'a pas permis d'atténuer l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé et de limiter la

taille de l'infarctus. Ces résultats contrastent avec certaines études qui démontrent les effets bénéfiques de la streptokinase. Cependant, ces études reposent sur des critères de finalité indirects pour quantifier la nécrose (libération de créatine phosphokinase) ou des modèles expérimentaux avec occlusion thrombotique. Dans ce dernier cas, la réduction de la taille de l'infarctus est fonction de la vitesse de recanalisation de l'artère thrombosée. L'administration concomitante de streptokinase n'altère pas la cardioprotection associée à l'énoxaparine

Les mécanismes fondamentaux de la cardioprotection de l'énoxaparine ne sont pas connus. Le fait que l'énoxaparine ait réduit simultanément l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans l'infarctus reperfusé suggère que cet agent intervient au niveau de leur liaison. De fait, une étude de Nelson et coll. (1993) démontre que l'énoxaparine, contrairement à l'héparine, est un inhibiteur efficace de la molécule d'adhésion P-sélectine. A ce propos, l'étude que nous avons réalisé sur la formation de rosettes plaquettes-neutrophiles confirme qu'en milieu physiologique, l'énoxaparine inhibe l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. Cette observation renforce l'hypothèse que la réduction de la taille de l'infarctus par l'énoxaparine pourrait être, en partie, dépendante d'une inhibition de la fonction de la P-sélectine et/ou des récepteurs de la P-sélectine sur les neutrophiles. Cette inhibition préviendrait l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles dans le myocarde reperfusé et possiblement la libération de médiateurs bioactifs et cytotoxiques interférant ainsi avec le développement de l'infarctus. Néanmoins, nous ne pourrions tirer de conclusions définitives sur la cardioprotection associée à l'administration d'énoxaparine qu'après avoir effectué des études chroniques qui nous permettront de déterminer si l'énoxaparine réduit de façon permanente la taille de l'infarctus ou si elle ne fait que retarder le développement de

la nécrose.

Etant donné que les plaquettes jouent un rôle primordial dans le développement de l'infarctus en cours de reperfusion, nous avons donc évalué le potentiel cardioprotecteur de l'aspirine, un antiplaquettaire couramment utilisé en post-thrombolyse coronarienne pour prévenir la réocclusion de l'artère recanalisée. Des doses variables d'aspirine intraveineuse administrées sous forme de bolus quelques minutes avant la reperfusion, ce qui inhibe l'agrégation plaquettaire au collagène *ex-vivo*, n'ont pu diminuer l'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé et la taille de l'infarctus malgré l'inhibition de la capture des neutrophiles et de la peroxydation lipidique. L'agrégation plaquettaire ne semble pas être un mécanisme prépondérant dans la genèse des lésions de reperfusion, mais nous ne pouvons exclure que l'inhibition de la libération de PGI₂ endothéliale, un agent cytoprotecteur naturel et synthétisé à partir de l'acide arachidonique via la voie de la cyclo-oxygénase, soit en partie responsable de cet effet. Plusieurs études ont démontré que la PGI₂ réduisait l'étendue de la nécrose dans des modèles d'ischémie-reperfusion. Il est probable que l'activation plaquettaire et l'expression de P-sélectine au foyer de la sténose, par des voies de signalisation indépendantes de la cyclo-oxygénase, favoriserait l'adhésion des plaquettes dans le myocarde reperfusé. Le degré de sévérité de la sténose utilisé dans notre modèle (réduction de la lumière du vaisseau > 70%) expliquerait, en partie, l'inefficacité de l'aspirine à réduire la taille de l'infarctus. Des études récentes ont démontré qu'une augmentation de la sévérité de la sténose de 10% (de 70% à 80%) résultait en une augmentation des forces de cisaillement de 56% (Maalej et Folts, 1996). Les forces de cisaillement étant un agoniste très puissant de l'activation plaquettaire (Ruggeri, 1993), la sévérité de notre sténose aurait pu

contrecarrer la capacité de l'aspirine à inhiber l'activation des plaquettes dépendante des forces de cisaillement (Barstad et coll. 1996). Ces résultats font ressortir le rôle des plaquettes dans la progression de l'infarctus en cours de reperfusion et l'importance de la sténose critique sur l'artère reperfusée dans ce processus physiopathologique, hypothèse corroborée par l'observation que l'inhibition de la peroxydation lipidique et de l'accumulation des neutrophiles dans le myocarde reperfusé en présence d'aspirine ne peut limiter le développement de l'infarctus. Les voies d'activation des plaquettes semblent donc insensibles à l'inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase par l'aspirine.

Parallèlement à cette étude, nous avons déterminé si l'administration concomitante d'aspirine (la cardioprotection de l'aspirine ayant été présumée) pouvait potentialiser la cardioprotection précédemment observée avec l'énoxaparine. Les résultats de cette étude démontrent que l'administration simultanée d'aspirine neutralise la cardioprotection associée à l'énoxaparine en termes de diminution de la taille de l'infarctus ainsi qu'au niveau de l'accumulation des plaquettes intramyocardiques, mais sans toutefois altérer la capacité de l'énoxaparine d'atténuer l'accumulation des neutrophiles et la peroxydation lipidique. L'effet cardioprotecteur de l'énoxaparine semble donc se faire via des mécanismes qui sont sensibles à l'aspirine. Par ailleurs, l'administration d'aspirine semble interférer, par des mécanismes non identifiés, avec la capacité de l'énoxaparine à inhiber la P-sélectine (P Dagenais; observations non publiées). D'autres études seront nécessaires pour élucider ce phénomène.

Les études que nous avons réalisées à partir de l'aspirine ont clairement fait ressortir que les mécanismes responsables de l'accumulation des plaquettes dans le myocarde reperfusé sont insensibles à l'inhibition de l'activité de la cyclo-oxygénase. Nous avons donc

chercher à savoir si un antiplaquettaire plus puissant et spécifique pouvait être plus efficace. Suite à l'administration de Lamifiban (un inhibiteur spécifique des GPIIb/IIIa plaquettaires), le taux d'accumulation des plaquettes a chuté de 48%, ce qui correspond à une diminution de 47% de la taille de l'infarctus et ce, sans altérer l'accumulation des neutrophiles. Ces résultats confirment donc l'importance des plaquettes dans le développement de l'infarctus en cours de reperfusion et suggèrent que l'activation des plaquettes, en présence d'une sténose critique, est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation. Le mécanisme de cardioprotection du Lamifiban n'est pas identifié, mais pourrait impliquer l'inhibition de l'interaction entre les plaquettes (ou ses sous-produits) et les neutrophiles et les tissus ischémiques pour la production de facteurs cytotoxiques.

Conclusion

Nos travaux ont permis de mettre à jour plusieurs points importants au niveau de la compréhension des mécanismes physiopathologiques des lésions de reperfusion. La présence d'une sténose critique sur l'artère reperfusée compromet la sauvegarde du myocarde post-ischémique en augmentant la taille de l'infarctus par un mécanisme qui implique les plaquettes. Ces observations appuient donc le bien-fondé d'une thérapie antithrombotique adjuvante pouvant préserver le myocarde des lésions de reperfusion et assurer une meilleure survie.

Ainsi, l'administration d'énoxaparine (mais non d'héparine) avant et pendant la reperfusion prévient l'accroissement de l'infarctus grâce à une inhibition de l'accumulation des plaquettes et des neutrophiles. L'inhibition de la P-sélectine semble être un élément clé de cette cardioprotection. De même, le Lamifiban est efficace pour protéger le myocarde post-ischémique. L'inhibition de la fonction plaquettaire indépendamment de la voie de signalisation serait en relation directe avec la réduction de la taille de l'infarctus possiblement en prévenant la libération de dérivés plaquettaires bioactifs pouvant interagir avec les neutrophiles et les tissus ischémiques.

Des études plus approfondies seront nécessaires pour définir avec précision les mécanismes d'action de l'énoxaparine et du Lamifiban dans la protection du myocarde post-ischémique. Les mécanismes impliqués dans la modulation de l'interaction plaquettes-neutrophiles en présence de ces agents devront aussi être caractérisés.

Bibliographie

- Abildgaard U.** Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:89-91.
- Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Haines K, Reibman J.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects on a GTP binding protein within the neutrophil plasma membrane. *Biochem Pharmacol* 1991;41:1567-1573.
- Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Clancy RM, Philips M, Weissmann G.** Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDS): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. *Biochem Pharmacol* 1994;47:563-572.
- Adachi T, Fukushima T, Usami Y, Hirano K.** Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J* 1993;289:523-527.
- Adachi T, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K.** Heparin-induced release of extracellular-superoxide dismutase form (V) to plasma. *J Biochem* 1995;117:586-590.
- Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Ashby B, Walsh PN.** Platelet receptor-mediated factor X activation by factor IXa. High-affinity factor IXa receptors induced by factor VIII are deficient on platelets in Scott syndrome. *J Clin Invest* 1989;84:824-828.
- Alanen J, Nevalainen TJ, Lipasti J.** Ischemic contracture and myocardial perfusion in isolated rat heart. *Virchows Arch [A]* 1980;385:143-149.
- Alhaddad IA, Tkaczewski L, Siddiqui F, Mir R, Brown EJ Jr.** Aspirin enhances the benefits of late reperfusion on infarct shape. A possible mechanism of the beneficial effects of aspirin on survival after acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;91:2819-2823.
- Allibritton NL, Verret CR, Wolley RC, Eisen HN.** Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1988;167:514-527.
- Allen DG, Lee JA, Smith GL.** The effects of simulated ischaemia on intercellular calcium and

tension in isolated ferret ventricular muscle. *J Physiol* 1998;400:91P-92P.

- Alloatti G, Montrucchio G, Emanuelli G, Camussi G.** Platelet-activating factor (PAF) induces platelet/neutrophil co-operation during myocardial reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:163-171.
- Altavilla D, Squadrito F, Iocolano M, Canale P, Campo GM, Zingarelli B, Caputi AP.** E-selectin in the pathogenesis of experimental myocardial ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 1994;270:45-51.
- Altieri DC.** Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion. *Blood* 1993;81:569-579.
- Altman RD.** Neutrophil activation: an alternative to prostaglandin inhibition as the mechanism of action of NSAIDs. *Semin Rheumatol* 1990;19(Suppl 2):1-5.
- Amaro A, Gude F, González-Juanatey R, Iglesias C, Fernández-Vázquez F, García-Acuña J, Gil M.** Plasma leukocyte elastase concentration in angiographically diagnosed coronary artery disease. *Eur Heart J* 1995;16:615-622.
- Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC.** Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation* 1989;80:1846-1861.
- Amsterdam EA, Stahl GL, Pan H-L, Rendig SV, Fletcher MP, Longhurst JC.** Limitation of reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol* 1995;268:H448-H457.
- Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, Cala PM.** Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol* 1990;259:C940-C948.
- Anderson HV, Kirkeeide RL, Krishnaswami A, Weigelt LA, Revana M, Weisman HF, Willerson JT.** Cyclic flow variations after coronary angioplasty in humans: clinical and

- angiographic characteristics and elimination with 7E3 monoclonal antiplatelet antibody. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1031-1037.
- Andersson L-O, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Söderström G.** Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. *Thromb Res* 1979;15:531-541.
- Arai M, Lefer DJ, So T, DiPaula A, Aversano T, Becker LC.** An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1278-1285.
- Arfors K-E, Lundberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty PG, Harlan JM.** A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987;69:338-340.
- Arminger LC, Gavin JB.** Changes in the microvasculature of ischemic and infarcted myocardium. *Lab Invest* 1975;33:51-56.
- Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW.** Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 1988;255:H401-H403.
- Arora AS, Gores GJ.** The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin Liver Dis* 1996;16:31-38.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT.** Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973;52:741-744.
- Badwey JA, Karnovsky ML.** Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem* 1980;49:695-726.
- Bakker HM, Tans G, Janssen-Claessen T, Thomassen MC, Hemker HC, Griffin JH, Rosing J.** The effect of phospholipids, calcium ions and protein S on rate constants of human factor Va inactivation by activated human protein C. *Eur J Biochem* 1992;208:171-178.

- Bara L, Billaud E, Gramond G, Kher A, Samama M.** Comparative pharmacokinetics of a low molecular weight heparin (PK 10169) and unfractionated heparin after intravenous and subcutaneous administration. *Thromb Res* 1985;39:631-636.
- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA.** Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med* 1994;180:1785-1792.
- Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Oliveras J, González MA, Ruiz-Meana M, Solares J, García Burillo A, Lidón R-M, Antolín M, Castell J, Soler-Soler J.** Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Eur J Physiol* 1996;432:663-670.
- Barrowcliffe TW, Merton RE, Gray E.** Heparin and bleeding: an association with lipase release. *Thromb Haemost* 1988;60:434-436.
- Barstad RM, Ørvim U, Hamers MJAG, Tjønnfjord GE, Brosstad FR, Sakariassen KS.** Reduced effect of aspirin on thrombus formation at high shear and disturbed laminar blood flow. *Thromb Haemost* 1996;75:827-832.
- Bârză T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J.** Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:196-203.
- Bârză T, Van Rijn JLML, Petitou M, Molha P, Tobelem G, Caen JP.** Endothelial binding sites for heparin. Specificity and role in heparin neutralization. *Biochem J* 1986;238:847-854.
- Bârză T, Lormeau JC, Petitou M, Michelson S, Choay J.** Heparin-derived oligosaccharides: affinity for acidic fibroblast growth factor and effect on its growth-promoting activity for human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1989;140:538-548.
- Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA.** Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991;91(Suppl 3C):3C-2S - 3C-13S.

- Bates EJ, Harvey DP, Ferrante A.** Inhibition of neutrophil respiratory burst and degranulation responses to platelet-activating factor by antagonists WEB 2086, CV 6209 and CV 3988. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;97:50-56.
- Bazzoni G, Beltrán Nuñez A, Mascellani G, Bianchini P, Dejana E, Del Maschio A.** Effect of heparin, dermatan sulfate, and related oligo-derivatives on human polymorphonuclear leukocyte functions. *J Lab Clin Med* 1993;121:268-275.
- Becker RC, Gore JM.** The challenge of maintaining coronary arterial patency with intravenous heparin following tissue plasminogen activator administration. *Cardiology* 1993;83:100-106.
- Becker M, Menger MD, Lehr H-A.** Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 1994;267:H925-H930.
- Bednar M, Smith B, Pinto A, Mullane KM.** Neutrophil depletion suppresses ¹¹¹In-labeled platelet accumulation in infarcted myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:906-912.
- Béguin S, Mardiguian J, Lindhout T, Hemker HC.** The mode of action of low molecular weight heparin preparation (PK 10169) and two of its major components on thrombin generation in plasma. *Thromb Haemost* 1989;61:30-40.
- Belkin M, Wright JG, Hobson RW.** Intraarterial urokinase increases skeletal muscle viability after acute ischemia. *J Vasc Surg* 1989;9:161-168.
- Bell D, Jackson M, Nicoll JJ, Millar A, Dawes J, Muir AL.** Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction: effect of thrombolytic treatment. *Br Heart J* 1990;63:82-87.
- Bengtsson T, Zalavary S, Stendahl O, Grenegård M.** Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. *Blood* 1996;87:4411-4423.
- Bennett JS, Vilare G.** Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin*

Invest 1979;64:1393-1398.

Benveniste J, Chignard M. A role for PAF-acether (platelet-activating factor) in platelet-dependent vascular diseases. *Circulation* 1985;72:713-717.

Bergqvist D, Nilsson B, Hedner U, Pedersen PC, Østergaard PB. The effects of heparin fragments of different molecular weights on experimental thrombosis and haemostasis. *Thromb Res* 1985;38:589-601.

Bernier M, Hearse DJ, Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "acute-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986;58:331-340.

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gibrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9238-9242.

Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;45:361-378.

Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996;149:367-380.

Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi BR. Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;29:629-636.

Blajchman MA, Young E, Ofosu FA. Effects of unfractionned heparin, dermatan sulfate and low molecular weight heparin on vessel wall permeability in rabbits. In: Ofosu FA, Danishefsky I, Hirsh J, eds. *Heparin and related polysaccharides. Structure and activities*. New York: The New York Academy of Sciences, 1989;556:245-254.

Blombäck B. Fibrinogen and fibrin - Proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis.

Thromb Res 1996;83:1-75.

Bolli R. Postischemic myocardial "stunning". Pathogenesis, pathophysiology, and clinical relevance.

In: Yellon DM, Jennings RB eds. *Myocardial protection: the pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury*. New York: Raven Press, 1992;105-149.

Bolli R, Zhu W-X, Hartley CJ, Michael LH, Repine JE, Hess ML, Kukreja RC, Roberts R.

Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthiourea. *Circulation* 1987;76:458-468.

Bolli R, Zhu WX, Thornby JI, O'Neil PG, Roberts R. Time-course and determinants of recovery

of function after reversible ischemia in conscious dogs. *Am J Physiol* 1988;254:H102-H114.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB. Marked reduction

of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989;65:607-622.

Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB. Direct evidence that

oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989a;86:4695-4699.

Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO. Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible

ischemia. Evidence for microvascular stunning. *Circ Res* 1990;67:332-343.

Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Li XY, Triana JF, Lai EK, McCay PB. Iron-mediated radical

reactions upon reperfusion contribute to myocardial "stunning". *Am J Physiol* 1990a;259:H1901-H1911.

Boogaerts MA, Yamada O, Jacob HS, Moldow CF. Enhancement of granulocyte-endothelial

adherence and granulocyte-induced cytotoxicity by platelet release products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7019-7023.

- Borgeat P, Samuelsson B.** Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes: formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* 1979;254:2643-2646.
- Bosse R, Vestweber D.** Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol* 1994;24:3019-3024.
- Boveris A, Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-716.
- Braaten JV, Jerome WG, Hantgan RR.** Uncoupling fibrin from integrin receptors hastens fibrinolysis at the platelet-fibrin interface. *Blood* 1994;83:982-993.
- Brace LD, Fareed J.** Heparin induced platelet aggregation. II. Dose/response relationships for a low molecular weight heparin derivative (PK 10169) and its subfractions. *Thromb Res* 1986;42:769-782.
- Braun JEA, Severson DL.** Release of lipoprotein lipase from cardiac myocytes by low-molecular weight heparin. *Lipids* 1993;28:59-61.
- Braunwald E, Kloner RA.** The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66:1146-1149.
- Braunwald E, Kloner RA.** Myocardial reperfusion: a double edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
- Brew EC, Mitchell MB, Rehring TF, Gamboni-Robertson F, McIntyre RC Jr, Harken AH, Banerjee A.** Role of bradykinin in cardiac functional protection after global ischemia-reperfusion in rat heart. *Am J Physiol* 1995;269:H1370-H1378.
- Briginshaw GF, Shanberge JN.** Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification. *Arch Biochem Biophys* 1974;161:683-690.
- Briginshaw GF, Shanberge JN.** Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma:

II. Inhibition of thrombin and activated factor X. *Thromb Res* 1974a;4:463-477.

Bringmann P, Gruber D, Liese A, Toschi L, Krätzschmar J, Schleuning W-D, Donner P.

Structural features mediating fibrin selectivity of vampire bat plasminogen activator. *J Biol Chem* 1995;270:25596-25603.

Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. The inhibition of blood clotting: an

unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. *Am J Physiol* 1939;125:683-687.

Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Streptokinase: a review of its clinical pharmacology,

mechanism of action and therapeutic uses. *Drugs* 1973;5:357-445.

Brömme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem* 1996;163/164:261-

275.

Brower MS, Levin RI, Garry K. Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited

proteolysis of membrane glycoproteins. *J Clin Invest* 1985;75:657-666.

Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med*

1995;46:103-112.

Broze GJ Jr, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-

associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988;71:335-343.

Buerke M, Weyrich AS, Lefer AM. Isolated cardiac myocytes are sensitized by hypoxia-

reoxygenation to neutrophil released mediators. *Am J Physiol* 1994;266:H128-H136.

Buerke M, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FCA, Forrest MJ, Lefer AM. Sialyl Lewix^x-containing

oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest* 1994a;93:1140-1148.

Buerke M, Weyrich AS, Murohara T, Queen C, Klingbeil CK, Co MS, Lefer AM. Humanized

- monoclonal antibody DREG-200 directed against L-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994b;271:134-142.
- Buerke M, Murohara T, Lefer AM.** Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:393-402.
- Bulkley BH, Hutchins GM.** Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery: the paradox of necrosis in areas of revascularization. *Circulation* 1977;56:906-913.
- Burch JW, Stanford N, Majerus PW.** Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J Clin Invest* 1978;61:314-319.
- Butcher EC.** Leukocyte-endothelial cell recognition - three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-1036.
- Cannon CP, McCabe CH, Gibson CM, Ghali M, Sequeira RF, McKendall GR, Breed J, Modi NB, Fox NL, Tracy RP, Love TW, Braunwald E, TIMI 10A Investigators.** TNK-tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 10A dose-ranging trial. *Circulation* 1997;95:351-356.
- Carlos TM, Harlan JM.** Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.
- Carr J.** The anti-inflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E₁. *Thromb Res* 1979;16:507-516.
- Carrea FP, Lesnefsky EJ, Repine JE, Shikes RH, Horwitz LD.** Reduction of canine myocardial infarct size by a diffusible reactive oxygen metabolite scavenger. Efficacy of dimethylthiourea given at the onset of reperfusion. *Circ Res* 1991;68:1652-1659.
- Carter CJ, Kelton JG, Hirsh J, Cerskus AL, Santos AV, Gent M.** The relationship between the hemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparins and heparin. *Blood* 1982;59:1239-1245.
- Cederholm-Williams SA, de Cook F, Lijnen HR, Collen D.** Kinetics of the reactions between

- streptokinase, plasmin and alpha-2-antiplasmin. *Eur J Biochem* 1979;100:125-132.
- Cerletti C, Rajtar G, Marchi E, de Gaetano G.** Interaction between glycosaminoglycans, platelets, and leukocytes. *Semin Thromb Hemost* 1994;20:245-253.
- Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G.** Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost* 1995;74:218-223.
- Chakrabarty S, Thomas P, Sheridan DJ.** Contribution of platelets and platelet-activating factor (PAF) to the arrhythmogenic, haemodynamic and necrotic effects of acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 1991;12:583-589.
- Chakrabarty S, Fluck DS, Flores NA, Sheridan DJ.** Effects of streptokinase on infarct size in rabbits in the presence and absence of coronary artery recanalization. *Eur Heart J* 1994;15:699-704.
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM.** Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:145-152.
- Chan PH.** Role of oxidants in ischemic brain injury. *Stroke* 1996;27:1124-1129.
- Chao BH, Kalkunte S, Maraganore JM, Stone SR.** Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor. *Biochemistry* 1992;31:6175-6178.
- Chatelain P, Latour J-G, Tran D, de Lorgeril M, Dupras G, Bourassa M.** Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987;75:1083-1087.
- Chen J, Karlberg K-E, Sylvén C.** Heparin enhances platelet aggregation irrespective of anticoagulation with citrate or with hirudin. *Thromb Res* 1992;67:253-262.
- Chen LY, Nichols WW, Hendricks JB, Yang BC, Mehta JL.** Monoclonal antibody to P-selectin (PB1.3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc Res* 1994;28:1414-

1422.

- Chen LY, Nichols WW, Hendricks J, Mehta JL.** Myocardial neutrophil infiltration, lipid peroxidation, and antioxidant activity after coronary artery thrombosis and thrombolysis. *Am Heart J* 1995;129:211-218.
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P.** Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 1995;96:2247-2259.
- Chien KR, Reeves JP, Buja LM, Bonte F, Parkey RW, Willerson JT.** Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium. Temporal and topographical correlations with Tc-99m-PPi accumulation and an in vitro sarcolemmal Ca²⁺ permeability defect. *Circ Res* 1981;48:711-719.
- Chien KR, Han A, Sen A, Buja LM, Willerson JT.** Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membrane phospholipids. *Circ Res* 1984;54:313-322.
- Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J.** The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* 1979;279:799-800.
- Chilton FH, O'Flaherty JT, Walsh CE, Thomas MJ, Wykle RL, DeChatelet LR, Waite BM.** Platelet activating factor: stimulation of the lipoxygenase pathway in polymorphonuclear leukocytes by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-3-phosphocholine. *J Biol Chem* 1982;257:5402-5407.
- Chintala MS, Bernardino V, Chiu PJS.** Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1203-1208.
- Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G.** Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116:492-499.
- Christian TF, Gibbons RJ, Gersh BJ.** Effect of infarct location on myocardial salvage assessed by

- technetium-99m isonitrite. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:1303-1308.
- Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ.** Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1992;86:81-90.
- Christian TF, Gibbons RJ, Clements IP, Berger PB, Selvester RH, Wagner GS.** Estimates of myocardium at risk and collateral flow in acute myocardial infarction using electrocardiographic indexes with comparison to radionuclide and angiographic measures. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:388-393.
- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB.** Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992;90:1116-1121.
- Clark RA, Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase-mediated platelet release reaction. *J Clin Invest* 1979;63:177-183.
- Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA.** Suppression of thromboxane A₂ but not of systemic prostacyclin by controlled-released aspirin. *N Engl J Med* 1991;325:1137-1141.
- Clements IP, Christian TF, Higano ST, Gibbons RJ, Gersh BJ.** Residual flow to the infarct zone as a determinant of infarct size after direct angioplasty. *Circulation* 1993;88:1527-1533.
- Clowes AW, Clowes MM.** Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Circ Res* 1986;58:839-845.
- Coëffier E, Delautier D, Le Couedic J-P, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J.** Cooperation between platelets and neutrophils for Paf-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol* 1990;47:234-243.
- Collen D.** Fibrin-selective thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:857-865.
- Collen D, Lijnen HR.** Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*

1991;78:3114-3124.

Coller BS. Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med* 1990;322:33-42.

Coller BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995;92:2373-2380.

Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Plasma coagulation factors. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994;3-18.

Corr PB, Snyder DW, Lee BI, Gross RW, Keim CR, Sobel BE. Pathophysiological concentrations of lysophosphatides and the slow response. *Am J Physiol* 1982;243:H187-H195.

Corr PB, Gross RW, Sobel BE. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ Res* 1984;55:135-154.

Corr PB, Saffitz JE, Sobel BE. What is the contribution of altered lipid metabolism to arrhythmogenesis in the ischemic heart? In: Hearse DJ, Manning AS, Janse MJ, eds. *Life-threatening arrhythmias during ischemia and infarction*. New York: Raven Press, 1987;91-114.

Crawford MH, Grover FL, Kolb WP, McMahan CA, O'Rourke RA, McManus LM, Pinckard RN. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation* 1988;78:1449-1458.

Cronstein BN, Duguma L, Nicholls D, Hutchinson A, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved. Human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors which promote chemotaxis and inhibit O₂⁻, respectively. *J Clin Invest* 1990;85:1150-1157.

Cronstein BN, Van de Stouwe M, Druska L, Levin RI, Weissmann G. Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms. *Inflammation* 1994;18:323-335.

Crossman DC, Carr DP, Tuddenham EGD, Pearson JD, McVey JH. The regulation of tissue

- factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem* 1990;265:9782-9787.
- Crozatier B, Ross J Jr, Franklin D, Bloor CM, White FC, Tomoike H, McKown DP.** Myocardial infarction in the baboon: regional function and the collateral circulation. *Am J Physiol* 1978;235:H413-H421.
- D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF.** Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* 1991;16:246-250.
- Dahlén SE, Björk J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, Samuelsson B.** Leukotrienes promote plasma leakage and leucocyte adhesion in post-capillary venules, *in vivo* effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3887-3891.
- Danielsson A, Raub E, Lindahl U, Björk I.** Role of ternary complexes in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reactions between antithrombin and thrombin or factor Xa. *J Biol Chem* 1986;261:15467-15473.
- Darius H, Yanagisawa A, Brezinski ME, Hock CE, Lefler AM.** Beneficial effects of tissue-type plasminogen activator in acute myocardial ischemia in cats. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:125-131.
- Datta YH, Romano M, Jacobson BC, Golan DE, Serhan CN, Ewenstein BM.** Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1995;92:3304-3311.
- Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefler AM.** Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994;107:1050-1058.
- Davie EW, Ratnoff OD.** Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964;145:1310-1312.

- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W.** The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-10370.
- Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, Hangartner JR.** Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 1986;73:418-427.
- de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallée M, Clément R, Millette D, Rousseau G, Latour J-G.** Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532.
- de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, St-Jean G, Tran DC, Latour J-G.** Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-154.
- de Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Angoli L, Valentini P, Boschetti E, Specchia G.** Expression of neutrophil and monocyte CD11b/CD18 adhesion molecules at different sites of the coronary tree in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1996;78:564-568.
- Del Balzo U, Engler RL, Ito BR.** Complement C5a-mediated myocardial ischemia and neutrophil sequestration: two independent phenomena. *Am J Physiol* 1993;264:H336-H344.
- Delyani JA, Murohara T, Lefler AM.** Novel recombinant serpin, LEX-032, attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *Am J Physiol* 1996;270:H881-H887.
- Depré C, Fiérain L, Hue L.** Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc Res* 1997;33:82-87.
- Deuel TF, Senior KM, Chang D, Griffin GL, Heinrichson RL, Kaiser ET.** Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4584-4587.
- Deuel TF, Senior RM, Huang JS.** Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet derived growth factor. *J Clin Invest* 1982;69:1046-1049.

- Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JJ, Herrmann HC, Laskey WK.** Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990;82:2044-2051.
- Devine DV, Carter CJ.** Profibrinolytic and antifibrinolytic effects of platelets. *Coron Art Dis* 1995;6:915-922.
- DeWitt DL, Smith WL.** Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1412-1416.
- DeWood MA, Spores J, Nortske R, Mouser LT, Burroghs R, Golden MS, Lang HT.** Prevalence of total coronary occlusion during early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980;303:897-902.
- Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA.** Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 1991;65:961-971.
- Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA.** Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1995;130:1473-1482.
- Díaz-González F, González-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Muñoz C, Pivel JP, Sánchez-Madrid F.** Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995;95:1756-1765.
- Díaz-Vélez CR, García-Castiñeiras S, Mendoza-Ramos E, Hernández-López E.** Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:146-152.
- Dinerman JL, Mehta JL.** Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:207-

222.

- Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TGP, Emerson S, Wallin R, Davda R, Davidson A.** Increased neutrophil elastase in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1559-1563.
- Doolittle RF, Everse SJ, Spraggon G.** Human fibrinogen: anticipating a 3-dimensional structure. *FASEB J* 1996;10:1464-1470.
- Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW.** P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 1993;82:1308-1316.
- Doutremepuich C, Lalanne MC, Doutremepuich F, Puyal C.** Low molecular weight heparins today: pharmacological consideration. In: Doutremepuich C. ed. *Low molecular weight heparins in clinical practice*. New York: Marcel Dekker, 1992;85-96.
- Doutremepuich C, Aguejof O, Pintigny D, Sertillanges M-N, De Sèze O.** Thrombogenic properties of ultra-low-dose of acetylsalicylic acid in a vessel model of laser-induced thrombus formation. *Thromb Res* 1994;76:225-229.
- Doutremepuich C, Aguejof O, Belon P.** Effects of ultra-low-dose aspirin on embolization in a model of laser-induced thrombus formation. *Semin Thromb Hemost* 1996;22(Suppl 1):67-70.
- Downey JM, Downey HF, Kirk ES.** Effects of myocardial strains on coronary blood flow. *Circ Res* 1974;34:286-292.
- Downey JM, Miura T, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, Yellon DM.** Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:1053-1060.
- Downey JM, Liu GS, Thornton JD.** Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993;27:3-8.
- Drag B, Petersen LC.** Activation of pro-urokinase by cathepsin G in the presence of

glycosaminoglycans. *Fibrinolysis* 1994;8:192-199.

Dreyer WJ, Smith CW, Michael LH, Rossen RD, Hughes BJ, Entman ML, Anderson DC.

Canine neutrophil activation by cardiac lymph obtained during reperfusion of ischemic myocardium. *Circ Res* 1989;65:1751-1762.

Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, Entman

ML. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:400-411.

Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with

intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988;107:321-331.

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon-

gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137:245-254.

Edens RE, Linhardt RJ, Weiler JM. Heparin is not just an anticoagulant anymore: six and one-half

decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. In: Cruse JM, Lewis RE Jr, eds. *Complement profiles*. Basel: Krager, 1993;1:96-120.

Egashira K, Kawai K, Nagano M, Sakuma, A, Nakamura M, Tomoike H. Recombinant tissue-

type plasminogen activator ameliorates ischemic derangements induced by thrombotic occlusion in closed chest anesthetized dogs. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:218-225.

Eisenberg PR, Sherman LA, Schectman K, Perez J, Sobel BE, Jaffe AS. Fibrinopeptide A: a

marker of acute coronary thrombosis. *Circulation* 1985;71:912-918.

Eng C, Cho S, Factor SM, Kirk ES. A nonflow basis for the vulnerability of the subendocardium.

J Am Coll Cardiol 1987;9:374-379.

- Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS.** Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983;111:98-111.
- Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schönbein.** Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986;251:H314-H322.
- Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-Schönbein G.** Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1986a;251:H93-H100.
- Erikson JM, Velasco CE.** Endothelin-1 and myocardial preconditioning. *Am Heart J* 1996;132:84-90.
- Esmon CT.** Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:1-26.
- Esmon CT, Owen WG.** Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2249-2252.
- Factor SM.** Pathophysiology of myocardial ischemia. In: Hurst JW, Schlant RC, Rackley CE, Sonnenblick EH, Kass Wenger N. eds. *The heart. Arteries and veins 7th ed* New York: McGraw-Hill, 1990.
- Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D, Huan X, Racanelli A.** Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low-molecular weight heparins. *Haemostasis* 1988;18(Suppl 3):3-15.
- Fareed J, Jeske E, Hoppensteadt D, Clarizio R, Walenga JM.** Are the available low-molecular-weight heparin preparations the same? *Semin Thromb Hemost* 1996;22(Suppl 1):77-91.
- Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW.** Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10729-10732.
- Fay PJ, Coumans J-V, Walker FJ.** von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from

- activated protein C-catalyzed inactivation. *J Biol Chem* 1991;266:2172-2177.
- Feiring AJ, Johnson MR, Kioschos JM, Kirchner PT, Marcus ML, White CW.** The importance of the determination of the myocardial area at risk in the evaluation of the outcome of acute myocardial infarction in patients. *Circulation* 1987;75:980-987.
- Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D.** Cloning of two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 1993;307:361-388.
- Fernandez F, N'guyen P, Van Ryn J, Oforu FA, Hirsh J, Buchanan MR.** Hemorrhagic doses of heparin and other glycosaminoglycans induce a platelet defect. *Thromb Res* 1986;43:491-495.
- Ferrari R.** The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28(S1):S1-S10.
- Ferrari R, Albertini A, Curello S, Ceconi C, Di Lisa F, Raddino R, Visioli O.** Myocardial recovery during post-ischaemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium and magnesium. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:487-498.
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR.** The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978;73:843-849.
- Fishbein MC, Yrit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Ganz W.** The relationship of vascular injury and myocardial hemorrhage to necrosis after reperfusion. *Circulation* 1980;62:1274-1279.
- FitzGerald GA.** Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 1991;68:11B-15B.
- Fliss H, Gattinger D.** Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-956.
- Folts J.** An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991;83(Suppl IV):IV-3 - IV-14.

- Folts JD, Rowe GG.** Epinephrine potentiation of in vivo stimuli reverses aspirin inhibition of platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. *Thromb Res* 1988;50:507-516.
- Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG.** Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976;54:365-370.
- Folts JD, Gallagher K, Rowe GG.** Blood flow reductions in stenosed canine coronary arteries: vasospasm or platelet aggregation? *Circulation* 1982;65:248-255.
- Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward PA.** C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:1147-1155.
- Forman MB, Puett DW, Bingham SE, Virmani R, Tantengo MV, Light RT, Bajaj A, Price R, Friesinger G.** Preservation of endothelial cell structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation* 1987;76:469-479.
- Forman MB, Perry JM, Wilson BH, Verani MS, Kaplan PR, Shawl FA, Friesinger GC.** Demonstration of myocardial reperfusion injury in humans: results of a pilot study utilizing acute coronary angioplasty with perfluorochemical in anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:911-918.
- Forman MF, Velasco CE, Jackson EK.** Adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1993;27:9-18.
- Forrest I, Lindsay TF, Romaschin AD, Walker PM.** The rate and distribution of muscle blood flow after prolonged ischemia. *J Vasc Surg* 1989;10:83-88.
- Fox KAA, Bergmann SR, Sobel BE.** Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Annu Rev Med* 1985;36:125-144.
- Freed MS, Needelman P, Dunkel CG, Saffitz JE, Evers AS.** Role of invading leukocytes in enhanced atrial eicosanoid production following rabbit left ventricular myocardial infarction. *J*

Clin Invest 1989;83:205-212.

Freischlag JA, Colburn MD, Quiñones-Baldrich WJ, Moore WS. Heparin, urokinase, and ancrod alter neutrophil function. *J Vasc Surg* 1992;16:565-574.

Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:239-257.

Friedl, HP, Till GO, Ryan US, Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989;3:2512-2518.

Friedrichs GS, Kilgore KS, Manley PJ, Gralinski MR, Lucchesi BR. Effects of heparin and *N*-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res* 1994;75:701-710.

Frishman WH, Burns B, Atac B, Alturk N, Altajar B, Lerrick K. Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease: inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor. *Am Heart J* 1995;130:877-892.

Frydman A. Low-molecular-weight heparins: an overview of their pharmacodynamics, pharmacokinetics and metabolism in humans. *Haemostasis* 1996;26(Suppl 2):24-38.

Fujimura K, Phillips DR. Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membranes. *J Biol Chem* 1983;258:10247-10252.

Fujiwara H, Ashraf M, Sato S, Millard RW. Transmural cellular damage and blood flow distribution in early ischemia in pig hearts. *Circ Res* 1982;51:683-693.

Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984;63:486-489.

Fulton WFM. Arterial anastomoses in the coronary circulation. I. Anatomical features in normal and diseased hearts demonstrated by stereoarteriography. *Scott Med J* 1963;8:420-434.

- Fung AYM, Rabkin SW.** Beneficial effects of streptokinase on left ventricular function after myocardial reoxygenation and reperfusion following global ischemia in the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:429-435.
- Furie B, Furie BC.** Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992;326:800-806.
- Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS, Hennekens C.** Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:659-675.
- Gallagher KP, Folts JD, Rowe GG.** Comparison of coronary arteriograms with direct measurements of stenosed coronary arteries in dogs. *Am Heart J* 1978;95:338-347.
- Garcia-Dorado D, Thérroux P, Tornos P, Sambola A, Oliveras J, Santos M, Soler Soler J.** Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995;92:1743-1748.
- Gho BCG, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD.** Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996;94:2193-2200.
- Gibbs SAL, Weiser MR, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition. *Surgery* 1996;119:652-656.
- Gimbrone MA, Brock AF, Schafer AI.** Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;74:1552-1555.
- Girard T, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ Jr.** Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 1989;338:518-520.
- Goetzl EJ, Woods JM, Gorman RR.** Stimulation of human eosinophil and neutrophil PMN leukocyte chemotaxis and random migration by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid (HETE). *J Clin Invest* 1977;59:179-183.

- Goldberg S, Greenspon AJ, Urban PL, Muza B, Berger B, Walinsky P, Maroko PR.** Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1983;105:26-32.
- Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Thromboxane mediates diapedesis after ischemia by activation of neutrophil adhesion receptor interacting with basally expressed intercellular adhesion molecule-1. *Circ Res* 1991;68:1013-1019.
- Goldstein IM, Malmsten CL, Samuelsson B, Weissmann G.** Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1977;2:309-317.
- Golino P, Maroko PR, Carew TE.** Efficacy of platelet depletion in counteracting the detrimental effect of acute hypercholesterolemia on infarct size and the no-reflow phenomenon in rabbits undergoing coronary artery occlusion-reperfusion. *Circulation* 1987;76:173-180.
- Golino P, Buja LM, Ashton JH, Kulkarni P, Taylor A, Willerson JT.** Effect of thromboxane and serotonin receptor antagonists on intracoronary platelet deposition in dogs with experimentally stenosed coronary arteries. *Circulation* 1988;78:701-711.
- Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT.** Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo. Thromboxane A₂ and serotonin are possible mediators. *Circulation* 1989;79:154-166.
- Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, McNatt J, Buja LM, Condorelli M, Chiariello M, Willerson JT.** Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation* 1993;88:1205-1214.
- Golino P, Ambrosio G, Villari B, Ragni M, Focaccio A, Pace L, De Clerck F, Condorelli M, Chiariello M.** Endogenous prostaglandin endoperoxides may alter infarct size in the presence of thromboxane synthase inhibition: studies in a rabbit model of coronary artery occlusion-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1993a;21:493-501.

- Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, Ambrosio G.** Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nature Med* 1996;2:35-40.
- González-Alvaro I, Carmona L, Díaz-González F, González-Amaro R, Mollinedo F, Sánchez-Madrid F, Laffón A, García-Vicuña R.** Aceclofenac, a new nonsteroidal antiinflammatory drug decreases the expression and function of some adhesion molecules on human neutrophils. *J Rheumatol* 1996;23:723-729.
- Goto S, Handa S, Takahashi E, Abe S, Handa M, Ikeda Y.** Synergistic effect of epinephrine and shearing on platelet activation. *Thromb Res* 1996;84:351-359.
- Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL.** Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-1628.
- Granger DN, Kubes P.** The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662-675.
- Granger DN, Rutili G, McCord JM.** Superoxide radical in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-31.
- Griffith MJ, Noyes CM, Church FC.** Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III. *J Biol Chem* 1985;260:2218-2225.
- Griggs DM Jr, Tchokoev VV, Chen CC.** Transmural differences in ventricular tissue substrate levels due to coronary constriction. *Am J Physiol* 1972;222:705-709.
- Grover GJ, Schumacher WA.** Effect of the thromboxane A₂ receptor antagonist SQ 30,741 on ultimate myocardial infarct size, reperfusion injury and coronary flow reserve. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:484-491.
- Grover GJ, Parham CS, Schumacher WA.** The cardioprotective effects of the thromboxane receptor antagonist SQ 30,741 are not reverse by aspirin. *Basic Res Cardiol* 1991;86:99-106.

- Gruppo Italiano per lo studio della streptochinasi nell'infarcto miocardico (GISSI).** Long-term effects of intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: final report of the GISSI study. *Lancet* 1987;1:871-874.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
- Guarini S, Martini MC, Bertolini A.** Reperfusion-induced arrhythmias and lethality are reduced by a 2KD heparin fragment. *Life Sci* 1995;57:967-972.
- Gudbjarnason S, Mathes P, Ravens KG.** Functional compartmentalisation of ATP and creatine phosphate in most muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1970;1:325-329.
- Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, Jost S, Rafflenbeul W, Daniel WG, Hecker H, Lichtlen PR.** Increased thrombin levels during thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991;83:937-944.
- Gulba DC, Bode C, Runge MS, Huber K.** Thrombolytic agents - An overview. *Ann Hematol* 1996;73(Suppl I):S9-S27.
- Gumina RJ, Schultz JE, Yao Z, Kenny D, Warltier DC, Newman PJ, Gross GJ.** Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1996;94:3327-3333.
- GUSTO Investigators.** An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;329:673-682.
- Hahn RA, MacDonald BR, Chastain M, Grinnell BW, Simpson PJ.** Evaluation of activated protein C on canine infarct size in a nonthrombotic model of myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:1104-1110.
- Håkansson L, Venge P.** Inhibition of neutrophil and eosinophil chemotactic responses to PAF and the PAF-antagonists WEB-2086, L-652,731, and SRI-63441. *J Leukoc Biol* 1990;47:449-456.

- Hamamoto T, Yamamoto M, Nordfang O, Petersen J, Foster D, Kiesel W.** Inhibitory properties of full-length and truncated recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *J Biol Chem* 1993;268:8704-8710.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B.** Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:2294-2298.
- Hamet P, deBlois D, Dam T-V, Richard L, Teiger E, Tea B-S, Orlov SN, Tremblay J.** Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:850-861.
- Handin RI, Karabin R, Boxer GJ.** Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest* 1977;59:959-965.
- Hansen PR.** Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:1872-1885.
- Hansen P-R, Stawski G.** Neutrophil mediated damage to isolated myocytes after anoxia and reoxygenation. *Cardiovasc Res* 1994;28:565-569.
- Harenberg J, Malsch R, Piazzolo L, Huhle G, Heene DL.** Analysis of heparin binding to human leukocytes using a fluorescein-5-isothiocyanate labeled heparin fragment. *Cytometry* 1996;23:59-66.
- Haring H-P, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ.** E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996;27:1386-1392.
- Harris KW, Esmon CT.** Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity. *J Biol Chem* 1985;260:2007-2010.
- Hartman JC, Anderson DC, Wiltse AL, Lane CL, Rosenbloom GL, Manning AM, Humphrey WR, Wall TM, Shebuski RJ.** Protection of ischemic/reperfused canine myocardium by CL18/6, a monoclonal antibody to adhesion molecule ICAM-1. *Cardiovasc Res* 1995;30:47-54.

- Hartsock LA, Seaber AV, Urbaniak JR.** Effect of ischemia on microcirculation thrombosis in skeletal muscle. *Surg Forum* 1989;40:525-527.
- Hasçelik G, Şener B, Hasçelik Z.** Effect of some anti-inflammatory drugs on human neutrophil chemotaxis. *J Int Med Res* 1994;22:100-106.
- Hasche ET, Fernandes C, Freedman SB, Jeremy RW.** Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation* 1995;92:710-719.
- Hasdai D, Varda-Bloom N, Blumberg N, Ohad D, Kornowski R, Battler A.** The effect of low molecular weight heparin (fragmin) on myocardial neutrophil accumulation and infarct size in a rat model of myocardial infarction. *Angiology* 1996;47:491-499.
- Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ.** Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 1989;264:9053-9060.
- Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, Hendricks C, Mehta JL.** Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996;132:1-8.
- Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S.** Platelet receptor recognition domains on the α chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989;28:2902-2914.
- Haynes DR, Wright PFA, Gadd SJ, Whitehouse MW, Vernon-Roberts B.** Is aspirin a prodrug for antioxidant and cytokine-modulating oxymetabolites? *Agents Actions* 1993;39:49-58.
- Hearse DJ.** Myocardial injury during ischemia and reperfusion: concepts and controversies. In: Yellon DM, Jennings RB, eds. *Myocardial protection. The pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury*. New York: Raven Press, 1992;13-33.
- Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR.** The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:641-668.

- Hearse DJ, Crome R, Yellon DM, Wyse R.** Metabolic and flow correlates of myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1983;17:452-458.
- Hearse DJ, Kusama Y, Bernier M.** Rapid electrophysiological changes leading to arrhythmias in the aerobic rat heart: photosensitization studies with rose bengal-derived reactive oxygen intermediates. *Circ Res* 1989;65:146-153.
- Heeb MJ, España F, Griffin JH.** Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989;73:455-461.
- Heiden M, Seitz R, Egbring R.** The role of inflammatory cells and their proteases in extravascular fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:497-501.
- Herbert JM, Corseaux D, Lale A, Bernat A.** Hypoxia primes endotoxin-induced tissue factor expression in human monocytes and endothelial cells by a PAF-dependant mechanism. *J Cell Physiol* 1996;169:290-299.
- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF.** Regional myocardial infarction and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975;56:978-985.
- Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P, Leusen I, Fishbein MC, Vatner SF.** Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am J Physiol* 1978;234:H653-H569.
- Hide EJ, Ney P, Piper J, Thiemermann C, Vane JR.** Reduction by prostaglandin E₁ or prostaglandin E₀ of myocardial infarct size in the rabbit by activation ATP-sensitive potassium channels. *Br J Pharmacol* 1995;116:2435-2440.
- Hiebert LM, Wice SM, McDuffie NM, Jaques LB.** The heparin target organ - the endothelium. Studies in a rat model. *Q J Med* 1993;86:341-348.
- Higginson LAJ, Sheldrick KR, Temple SV, Beanlands DS.** Intracoronary streptokinase: effects on

- reperfusion hemorrhage and regional myocardial blood flow in the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;9:509-514.
- Higgs GA, Moncada S, Salmon JA, Seager K.** The source of thromboxane and prostaglandins in experimental inflammation. *Br J Pharmacol* 1983;79:863-868.
- Higure A, Okamoto K, Hirata K, Todoroki H, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K, Nakamura S.** Macrophages and neutrophils infiltrating into the liver are responsible for tissue factor expression in a rabbit model of acute obstructive cholangitis. *Thromb Haemost* 1996;75:791-795.
- Hill JH, Ward PA.** The physiologic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med* 1971;133:885-900.
- Hillis GS, MacLeod AM.** Integrins and disease. *Clin Sci* 1996;91:639-650.
- Hirsh J, Levine MN.** Low molecular weight heparin. *Blood* 1992;79:1-17.
- Hirsh J, Dalen JE, Fuster V, Harker LB, Patrono C, Roth G.** Aspirin and other platelet-active drugs. The relationship among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 1995;108(Suppl):247S-257S.
- Hisama N, Yamaguchi Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Mori K, Yamada S, Ogawa M.** Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver. *Dig Dis Sci* 1996;41:1481-1486.
- Hobson RW, Wright JG, Fox D, Kerr JC.** Heparinization reduces endothelial permeability and hydrogen ion accumulation in a canine skeletal muscle ischemia-reperfusion model. *J Vasc Surg* 1988;7:585-591.
- Hobson RW, Neville R, Watanabe B, Canady J, Wright JG, Belkin M.** Role of heparin in reducing skeletal muscle infarction in ischemia-reperfusion. *Microc Endoth Lymphatics* 1989;5:259-276.

- Holmer E.** Low-molecular weight heparin. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 1989;575-595.
- Holmgren S, Abrahamsson T, Almgren O.** Adrenergic innervation of coronary arteries and ventricular myocardium in the pig: fluorescence microscopic appearance in the normal state and after ischemia. *Basic Res Cardiol* 1985;80:18-26.
- Homeister JW, Lucchesi BR.** Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:17-40.
- Homeister JW, Satoh P, Lucchesi BR.** Effects of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components. *Circ Res* 1992;71:303-319.
- Homeister JW, Satoh PS, Kilgore KS, Lucchesi BR.** Soluble complement receptor type 1 prevents human complement-mediated damage of the rabbit isolated heart. *J Immunol* 1993;150:1055-1064.
- Hopkins N, Gorman RR.** Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 1981;67:540-546.
- Hoque ANE, Haist JV, Karmazyn M.** Na⁺- H⁺ exchange inhibition protects against mechanical, ultrastructural, and biochemical impairment induced by low concentrations of lysophosphatidylcholine in isolated rat hearts. *Circ Res* 1997;80:95-102.
- Horne MK III.** Heparin binding to normal and abnormal platelets. *Thromb Res* 1988;51:135-144.
- Hortin GL, Tollefsen DM, Benutto BM.** Antithrombin activity of a peptide corresponding to residues 54-75 of heparin cofactor II. *J Biol Chem* 1989;264:13979-13982.
- Huber K, Runge MS, Bode C, Gulba D.** Thrombolytic therapy in acute myocardial infarction - update 1996. *Ann Hematol* 1996;73(Suppl I):S29-S38.
- Humphrey SM, Gavin JB, Herdson PB.** The relationship of ischemic contracture to vascular reperfusion in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12:1397-1406.

- Hung DT, Wong YH, Vu T-KH, Coughlin SR.** The cloned platelet thrombin receptor couples to a least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1992;267:20831-20834.
- Iacoviello L, Kolpakov V, Salvatore L, Amore C, Pintucci G, de Gaetano G, Donati MB.** Human endothelial cell damage by neutrophil-derived cathepsin G: role of cytoskeleton rearrangement and matrix-bound plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2037-2046.
- Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, Ruggeri ZM.** The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991;87:1234-1240.
- Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, Noda T, Sugi K, Imaizumi T.** Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995;92:1693-1696.
- Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F.** Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension* 1993;21:353-358.
- Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR.** Anoxia-reoxygenation-induced, neutrophil-mediated endothelial cell injury: role of elastase. *Am J Physiol* 1990;259:H925-H931.
- Ingraham LM, Coates TD, Allen JM, Higgins CP, Baehner RL, Boxer LA.** Metabolic, membrane, and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* 1982;59:1259-1266.
- Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y.** Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1127-1133.
- Ip M, Lomas DA, Shaw J, Burnett D, Stockley RA.** Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs

- on neutrophil chemotaxis - An *in vitro* and *in vivo* study. *Br J Rheumatol* 1990;29:363-367.
- ISIS-2 collaborative group.** Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:3A-13A.
- Issekutz AC, Ripley M, Jackson JR.** Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *Lab Invest* 1983;49:716-724.
- Ito BR, Roth DM, Chenoweth DE, Lefer AM, Engler RL.** Thromboxane is produced in response to intracoronary infusions of complement C5a in pigs. Cyclooxygenase blockade does not reduce the myocardial ischemia and leukocyte accumulation. *Circ Res* 1989;65:1220-1232.
- Ito BR, Roth DM, Engler RL.** Thromboxane A₂ and peptidoleukotrienes contribute to the myocardial ischemia and contractile dysfunction in response to intracoronary infusion of complement C5a in pigs. *Circ Res* 1990;66:596-607.
- Ito H, Tommoka T, Sakai N, Yu H, Higashino Y, Fujii K, Masuyama T, Kitabatake A, Minamino T.** Lack of myocardial perfusion immediately after successful thrombolysis. A predictor of poor recovery of left ventricular function in anterior myocardial infarction. *Circulation* 1992;85:1699-1705.
- Ito W, Schäfer HJ, Bhakdi R, Hansen S, Schaarschmidt S, Schofer J, Hugo F, Hamdoch T, Mathey D.** Influence of the terminal complement-complex on reperfusion injury, no-reflow and arrhythmias: a comparison between C6-competent and C6-deficient rabbits. *Cardiovasc Res* 1996;32:294-305.
- Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H.** Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res* 1995;27:184-188.
- Ittyerah TR, Rawala R, Colman RW.** Immunochemical studies of factor V of bovine platelets. *Eur J Biochem* 1981;120:235-241.

- Jaffe EA, Weksler BB.** Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *J Clin Invest* 1979;63:532-535.
- Jang I-K, Gold HK, Ziskind AA, Fallon JT, Holt RE, Leinbach RC, May JW, Collen D.** Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation* 1989;79:920-928.
- Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ.** Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601.
- Janoff A.** Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med* 1985;36:207-216.
- Jaques LB, Hiebert LM.** The close relationship of heparin and the vessel wall. *Artery* 1989;16:140-150.
- Jenkins DP, Steare SE, Yellon DM.** Preconditioning the human myocardium: recent advances and aspirations for the development of a new means of cardioprotection in clinical practice. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995;9:739-747.
- Jennings RB, Ganote CE.** Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 1974;34-35(Suppl III):III-156 - III-168.
- Jennings RB, Reimer KA.** Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1981;102:241-255.
- Jennings RB, Reimer KA.** The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991;42:225-246.
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H.** Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960;70:68-78.
- Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA.** Ischemic tissue injury. *Am J Pathol* 1975;81:179-198.
- Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA.** Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in dog. *Am J Pathol* 1978;92:187-214.

- Jennings RB, Steenbergen C, Kinney RB, Hill ML, Reimer KA.** Comparison of the effects of ischaemia and anoxia on the sarcolemma of the dog heart. *Eur Heart J* 1983;4(Suppl);123-137.
- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C Jr.** Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:769-780.
- Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C Jr, Reimer KA.** Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990;82(Suppl II):II-2 - II-12.
- Jeremy RW, Links JM, Becker LC.** Progressive failure of coronary flow during reperfusion of myocardial infarction. Documentation of the no reflow phenomenon with positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:695-704.
- Jerome SN, Smith CW, Korthuis RJ.** CD18-dependent adherence reactions play an important role in the development of the no-reflow phenomenon. *Am J Physiol* 1993;264:H479-H483.
- Jerome SN, Akimitsu T, Korthuis RJ.** Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no-reflow. *Am J Physiol* 1994;267:H1329-H1336.
- Jeroudi MO, Triana FJ, Patel BS, Bolli R.** Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning". *Am J Physiol* 1990;259:H889-H901.
- Jeske W, Hoppensteadt D, Callas D, Koza MJ, Fareed J.** Pharmacological profiling of recombinant tissue factor pathway inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:213-219.
- Jesty J, Lorenz A, Rodriguez J, Wun T-C.** Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1996;87:2301-2307.
- Jolly SR, Lucchesi BR.** Effect of BW755C in an occlusion-reperfusion model of ischemic injury. *Am Heart J* 1983;106:8-13.
- Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR.** Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*

1984;54:277-285.

Jolly SR, Schumacher WA, Kunkel SL, Abrams GD, Liddicoat J, Lucchesi BR. Platelet depletion in experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1985;80:269-279.

Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am Heart J* 1986;112:682-690.

Jordan RE, Favreau LV, Braswell EH, Rosenberg RD. Heparin with two binding sites for antithrombin or platelet factor 4. *J Biol Chem* 1982;257:400-406.

Jugdutt BI, Hutchins GM, Bukley BH, Pitt B, Becker LC. Effect of indomethacin on collateral blood flow and infarct size in the conscious dog. *Circulation* 1979;59:734-743.

Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989;143:3318-3324.

Jy W, Horstman LL, Wang F, Duncan R, Ahn YS. Platelet factor 3 in plasma fractions: its relation to microparticle size and thrombosis. *Thromb Res* 1995;80:471-482.

Kagiyama A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD. Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res* 1989;64:607-615.

Kaikita K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Suefuji H, Sumida H, Okumura K. Soluble P-selectin is released into the coronary circulation after coronary spasm. *Circulation* 1995;92:1726-1730.

Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M. Low molecular weight heparin enhances prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Chem Pharm Bull* 1991;39:3368-3369.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables

- of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
- Kakkar VV, Djazaseri B, Fok J, Fletcher M, Scully MF, Westwick J.** Low molecular weight heparin and the prevention of postoperative deep vein thrombosis. *BMJ* 1982;284:375-379.
- Kamat SG, Schafer AI.** Antiplatelet effects of fibrinolytic agents: a potential contributor to the hemostatic defect after thrombolysis. *Coron Art Dis* 1995;6:930-935.
- Kanayama T, Kimura Y, Tamao Y, Mizogami S.** Beneficial effects of a new prostacyclin analogue, KP-10614, on acute myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:630-637.
- Kansas GS.** Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-3287.
- Kanwar S, Johnston B, Kubes P.** Leukotriene C₄/D₄ induces P-selectin and sialyl Lewis^x-dependent alterations in leukocyte kinetics in vivo. *Circ Res* 1995;77:879-887.
- Karlsson K, Marklund SL.** Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J* 1987;242:55-59.
- Kato M, Tokuyama K, Morikawa A, Kuroume T, Barnes PJ.** Platelet-activating factor-induced enhancement of superoxide anion generation in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 1993;232:7-12.
- Kato N, Wise BC, Kuo JF.** Phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (troponin I) and tropomyosin-binding subunit (troponin T) by cardiac phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase. *Biochem J* 1983;209:189-195.
- Kaul S, Waack BJ, Padgett RC, Brooks RM, Heistad DD.** Interaction of human platelets and leukocytes in modulation of vascular tone. *Am J Physiol* 1994;266:H1706-H1714.
- Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutiérrez-Ramos J-C, Bonventre JV.** Intercellular adhesion molecule-1 -deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996;97:1056-1063.
- Kelton JG, Hirsh J, Carter CJ, Buchanan MR.** Thrombogenic effect of high-dose aspirin in

- rabbits. Relationship to inhibition of vessel wall synthesis of prostaglandin I₂-like activity. *J Clin Invest* 1978;62:892-895.
- Kettle AJ, Winterbourn CC.** Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1991;41:1485-1492.
- Kieffer N, Phillips DR.** Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:329-357.
- Kihara Y, Grossman W, Morgan JP.** Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ Res* 1989;65:1029-1044.
- Kilgore KS, Friedrichs GS, Homeister JW, Lucchesi BR.** The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:437-444.
- Kilgore KS, Flory CM, Miller BF, Evans VM, Warren JS.** The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 1996;149:953-961.
- Kirk ES, Honig CR.** An experimental and theoretical analysis of myocardial tissue pressure. *Am J Physiol* 1964;207:361-367.
- Kirkova M, Ivancheva E, Russanov E.** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in aspirin-treated rats. *Gen Pharmacol* 1995;26:613-617.
- Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC.** Neutrophil MAC-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245:1238-1241.
- Kishimoto TK, Warnock RA, Jutila MA, Butcher EC, Lane C, Anderson DC, Smith CW.** Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro. *Blood* 1991;78:805-811.

- Kitakaze M, Weisman HF, Marban E.** Contractile dysfunction and ATP depletion after transient calcium overload in perfused ferret hearts. *Circulation* 1988;77:685-695.
- Kitakaze M, Node K, Minamino T, Kosaka H, Shinozaki Y, Mori H, Inoue M, Hori M, Kamada T.** Role of nitric oxide in regulation of coronary blood flow during myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1804-1812.
- Klausner JM, Paterson IS, Kobzik I, Rodzen C, Lawrence R, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Leukotrienes but not complement mediate limb ischemia-induced lung injury. *Ann Surg* 1989;209:462-470.
- Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence R, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Post-ischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol* 1989a;256:H794-H802.
- Klein HH, Schubothe M, Nebendahl K, Kreuzer H.** Temporal and spatial development of infarcts in porcine hearts. *Basic Res Cardiol* 1984;79:440-447.
- Klein HH, Pich S, Bohle RM, Wollenweber J, Nebendahl K.** Myocardial protection by Na⁺-H⁺ exchange inhibition in ischemic reperfused porcine hearts. *Circulation* 1995;92:912-917.
- Kloczewiak M, Timmons S, Hawigner J.** Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the gamma chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction. *Thromb Res* 1983;29:249-255.
- Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawinger J.** Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry* 1984;23:1767-1774.
- Kloner RA, Braunwald E.** Observations on experimental myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1980;14:371-395.
- Kloner RA, Alker KJ.** The effect of streptokinase on intramyocardial hemorrhage, infarct size, and

the no-reflow phenomenon during coronary reperfusion. *Circulation* 1984;70:513-521.

Kloner RA, Przyklenk K. Consequences of ischemia-reperfusion on the coronary microvasculature.

In: *Myocardial protection: the pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury*. Yellon DM, Jennings RB, eds New York: Raven Press, 1992;85-103.

Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1133-1142.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;54:1496-1508.

Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LWV, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980;62:945-952.

Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983;68(Suppl I):I-8 - I-15.

Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989;80:1115-1127.

Kloner RA, Alker K, Campbell C, Figures G, Eisenhauer A, Hale S. Does tissue-type plasminogen activator have direct beneficial effects on the myocardium independent of its ability to lyse intracoronary thrombi? *Circulation* 1989a;79:1125-1136.

Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP, McCabe CH, Braunwald E. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995;91:37-45.

Kobayashi K, Neely JR. Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ Res* 1979;44:166-175.

- Koenecki E, Ehrlich YH, De Mars DD, Lenox RH.** Exposure of fibrinogen receptors in human platelets by surface proteolysis with elastase. *J Clin Invest* 1986;77:750-756.
- Koerner JE, Anderson BA, Dage RC.** Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase plus catalase, *N*-2-mercaptopropionyl glycine and captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:185-191.
- Kofsky ER, Julia PL, Buckberg GD, Quillen JE, Acar C.** Studies of controlled reperfusion after ischemia. XXII: reperfusate composition: effects of leukocyte depletion of blood and blood cardioplegic reperfusates after acute coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:350-359.
- Kohno M, Yokokawa K, Horio T, Ikeda M, Kurihara N, Mandal AK, Takeda T.** Heparin inhibits endothelin-1 production in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1994;45:137-142.
- Kolpakov V, D'Adamo MC, Salvatore L, Amore C, Mironov A, Iacoviello L, Donati MB.** Neutrophil derived cathepsin G induces potentially thrombogenic changes in human endothelial cells: a scanning electron microscopy study in static and dynamic conditions. *Thromb Haemost* 1994;72:140-145.
- Konstantopoulos K, Kamat SG, Schafer AI, Bañez EI, Jordan R, Kleiman NS, Hellums JD.** Shear-induced platelet aggregation is inhibited by in vivo infusion of an anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody fragment, c7E3 Fab, in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1995;91:1427-1431.
- Kopia GA, Kopaciewicz LJ, Ruffolo RR Jr.** Coronary thrombolysis with intravenous streptokinase in the anesthetized dog: a dose-response study. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:956-962.
- Kopp E, Ghosh S.** Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-959.
- Koudsi B, Chatman DM, Ballinger BA, Ferguson EW, Kraemer BA, Miller GA, Wun T-C,**

- Farr G, Money SR.** Tissue factor pathway inhibitor protects the ischemic spinal cord. *J Surg Res* 1996;63:174-178.
- Kroll MH, Schafer AI.** Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989;74:1181-1195.
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL.** Platelets and shear stress. *Blood* 1996;88:1525-1541.
- Kubes P, Ibbotson G, Russell, J, Wallace JL, Granger DN.** Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990;259:G300-G305.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes. *Am J Physiol* 1990a;258:G158-G163.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990b;259:G859-G864.
- Kuehl FA Jr, Humes JL, Eagan RW, Beveridge GG, van Arman CG.** Role of prostaglandin endoperoxide PGG₂ in inflammatory processes. *Nature* 1977;265:170-173.
- Kuhn W, Müller T, Büttner T, Gerlach M.** Aspirin as a free radical scavenger: consequences for therapy of cerebrovascular ischemia. *Stroke* 1995;26:1959-1960.
- Kuhn W, Müller Th, Büttner Th, Gerlach M.** Antioxidative properties of aspirin: dose dependence and clinical implications. *Eur J Neurol* 1996;3:275-277.
- Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, Rot A, Entman ML.** Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:89-103.
- Kukreja RC, Hess ML.** The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992;26:641-655.
- Kukreja RC, Hess ML.** *Free radicals, cardiovascular dysfunction and protection strategies.* Medical intelligence unit. Austin: R.G. Landes Company, 1994.

- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF.** PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-619.
- Kuroda T, Shiohara E.** Leukocyte and platelet depletion protects the liver from damage induced by cholestasis and ischemia-reperfusion in the dog. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:182-190.
- Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E.** Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium: depressed Ca^{2+} activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987;79:950-961.
- Kusuoka H, Jacobus WE, Marban E.** Calcium oscillations in digitalis-induced ventricular fibrillation: pathogenetic role and metabolic consequences in isolated ferret hearts. *Circ Res* 1988;62:609-619.
- Kuzuya T, Fuji H, Hoshida S, Kitabatake A, Tada M.** Neutrophil-induced myocardial cell damage and active oxygen metabolites. *Jpn Circ J* 1991;55:1127-1131.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M.** Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;72:1293-1299.
- Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Harbison ML, Kontgen F, Stewart CL, McIntyre RW, Will PC, Burns DK, Wolitzky BA.** Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1994;1:709-720.
- Laghi Pasini F, Pasqui AL, Ceccatelli L, Capecchi PL, Orrico A, Di Perri T.** Heparin inhibition of polymorphonuclear leukocyte activation in vitro. A possible pharmacological approach to granulocyte-mediated vascular damage. *Thromb Res* 1984;35:527-537.
- Lalanne MC, Ramboer I, de Sèze O, Doutremepuich C.** In vitro platelets/endothelial cells interactions in presence of acetylsalicylic acid at various dosages. *Thromb Res* 1992;65:33-43.
- Lamping KA, Gross GJ.** Improved recovery of myocardial segment function following a short

- coronary occlusion in dogs by nicorandil, a potential new antianginal agent, and nifedipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:158-166.
- Landolfi R, De Candia E, Rocca B, Ciabattoni G, Antinori A, Masetti R, Patrono C.** Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on platelet thromboxane biosynthesis "in vivo". *Thromb Haemost* 1994;72:942-946.
- Lane DA.** Heparin binding and neutralizing proteins. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 1989;363-391.
- Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U.** Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* 1984;218:725-732.
- Lane DA, Pejler G, Flynn AM, Thompson EA, Lindahl U.** Neutralization of heparin-related saccharides by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4. *J Biol Chem* 1986;261:3980-3986.
- Langford EJ, Wainwright RJ, Martin JF.** Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:51-55.
- Langlois PF, Gawryl MS.** Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1985;70:95-105.
- Larsson PT, Wallén NH, Hjemdahl P.** Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation* 1994;89:1951-1957.
- Latour J-G.** Impaired post-ischemic reflow and myocardial reperfusion injury. *The age of reperfusion*. New York; Cahners Medical Communications, 1992;4:5-11.
- Lavallée M, Vatner SF.** Regional myocardial blood flow and necrosis in primates following coronary occlusion. *Am J Physiol* 1984;246:H635-H639.
- Lavallée M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF.** Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2, and 3 hours after occlusion in conscious dogs. *Circ Res* 1983;53:235-247.

- Lawrence RA, Burk RF.** Species, tissue, and subcellular distribution of selenium dependent glutathione peroxidase activity. *J Nutr* 1978;108:211-215.
- Lawrence MB, Springer TA.** Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 1993;151:6338-6346.
- Laws KH, Clanton JA, Starnes VA, Lupinetti FM, Collins JC, Oates JA, Hammon JW Jr.** Kinetics and imaging of indium-111-labeled autologous platelets in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1983;67:110-116.
- Léculier C, Benzerara O, Couprie N, Francina A, Lasne Y, Archimbaud E, Fiere D.** Specific binding between human neutrophils and heparin. *Br J Haematol* 1992;81:81-85.
- Léculier C, Couprie N, Adeleine P, Leitiene P, Francina A, Richard M.** The effects of high molecular weight- and low molecular weight heparins on superoxide ion production and degranulation by human polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res* 1993;69:519-531.
- Lee JT, Ideker RE, Reimer KA.** Myocardial infarct size and location in relation to the coronary vascular bed at risk in man. *Circulation* 1981;64:526-534.
- Lefer AM, Ma X-I.** Endothelial dysfunction in the splanchnic circulation following ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(Suppl 3):S186-S190.
- Lefer AM, Lefer DJ.** The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996;32:743-751.
- Lefer DJ, Shandelya SML, Serrano CV Jr, Becker LC, Kuppusamy P, Zweier JL.** Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1993;88(part 1):1779-1787.
- Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M.** Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-294.
- Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, Ratcliffe M, Buda AJ.** A novel sialyl Lewis analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion. *Circulation*

1994a;90:2390-2401.

Lefkovits J, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease.

Eur Heart J 1996;17:9-18.

Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine.

N Engl J Med 1995;332:1553-1559.

Lefkowitz CA, Pace DP, Gallagher KP, Buda AJ. The effects of a critical stenosis on myocardial

blood flow, ventricular function, and infarct size after coronary reperfusion. *Circulation* 1988;77:915-926.

Lehr HA, Guhlmann A, Nolte D, Keppler D, Messmer K. Leukotriene as mediators in ischemia-

reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 1991;87:2036-2041.

Leinberger H, Suehiro GT, McNamara JJ. Myocardial platelet trapping after coronary ligation in

primates (*Papio anubis*). *J Surg Res* 1979;27:36-40.

Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator

release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;74:1988-1995.

Levine PH, Weinger RS, Simon J, Scoon KL, Krinsky NI. Leukocyte-platelet interactions. Release

of hydrogen peroxide by granulocytes as a modulator of platelet reactions. *J Clin Invest* 1976;57:955-963.

Ley K, Gaetgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion

molecule-1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991;77:2553-2555.

Ley K, Cerrito M, Arfors K-E. Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in rabbit

mesentery venules. *Am J Physiol* 1991a;260:H1667-H1673.

Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by

prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992;26:226-231.

Li YW, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on

- myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J* 1992;123:346-353.
- Li X, Cooley BC, Fowler JD, Gould JS.** Intravascular heparin protects muscle flaps from ischemia/reperfusion injury. *Microsurgery* 1995;16:90-93.
- Li JM, Hajarizadeh H, La Rosa CA, Rohrer MJ, Vander Salm ThJ, Cutler BS.** Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg* 1996;37:445-452.
- Light JT Jr, Bellan JA, Roberts MP, Force SD, Chen I-L, Kerstein MD, Kadowitz PJ, McNamara DB.** Heparin treatment enhances the recovery of neoendothelial acetylcholine-induced vascular relaxation after balloon catheter injury in the rabbit aorta. *Circulation* 1993;88:413-419.
- Lijnen HR, Collen D.** Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin Thromb Hemost* 1982;8:2-10.
- Linas SL, Whittenburg D, Repine JE.** Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol* 1990;258:F711-F716.
- Lindahl U, Backström G, Höök M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A.** Structure of the antithrombin-binding site of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3198-3202.
- Lindahl U, Thunberg L, Backström G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I.** Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984;259:12368-12376.
- Lindahl AK, Abildgaard U, Larsen ML, Staalesen R, Hammer AKG, Sandset PM, Nordfang O, Beck TC.** Extrinsic pathway inhibitor (EPI) released to the blood by heparin is a more powerful coagulation inhibitor than is recombinant EPI. *Thromb Res* 1991;62:607-614.
- Lindahl U, Lidholt K, Spillmann D, Kjellén L.** More to "heparin" than anticoagulation. *Thromb Res* 1994;75:1-32.
- Lindsberg PJ, Carpén O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg M-L, Kaste M.** Endothelial ICAM-1

- expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996;94:939-945.
- Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC.** Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1989;80:1816-1827.
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM.** Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991;84:350-356.
- Lonky SA, Wohl H.** Stimulation of human leukocyte elastase by platelet factor 4. Physiologic, morphologic, and biochemical effects on hamster lungs in vitro. *J Clin Invest* 1981;67:817-826.
- Lormeau J-C.** Les activités pharmacologiques non anticoagulantes de l'héparine. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1991;3:117-123.
- Lotner GZ, Lynch JM, Betz SJ, Henson PM.** Human neutrophil-derived platelet activating factor. *J Immunol* 1980;124:676-684.
- Lucchesi BR, Burmeister WE, Lomas TE, Abrams GD.** Ischemic changes in the canine heart as affected by the dimethyl quaternary analog of propranolol, UM-272 (SC-27761). *J Pharmacol Exp Ther* 1976;199:310-328.
- Lynch JM, Lotner GZ, Betz SJ, Henson PM.** The release of a platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. *J Immunol* 1979;123:1219-1226.
- Ma X-I, Tsao PS, Lefler AM.** Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991;88:1237-1243.
- Ma X-I, Lefler DJ, Lefler AM, Rothlein R.** Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992;86:937-946.

- Ma X-I, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM.** Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993;72:403-412.
- Ma X-L, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefer AM.** Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993a;88:649-658.
- Maalej N, Folts JD.** Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996;93:1201-1205.
- MacDonald BR, Chastain M, Shuman RT, Smith G, Hahn RA.** Salvage of reperfused ischemic myocardium by LY293435 (LY), a thrombin inhibitor, in a non-thrombotic canine model. *FASEB J* 1995;9:A623 (Abstract).
- MacFarlane RG.** An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964;202:498-499.
- Maclouf J, Fruteau de Laclos B, Borgeat P.** Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-eicosatetranoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6042-6046.
- Maes A, Van de Werf F, Nuyts J, Bormans G, Desmet W, Mortelmans L.** Impaired myocardial tissue perfusion early after successful thrombolysis. Impact on myocardial flow, metabolism, and function at late follow-up. *Circulation* 1995;92:2072-2078.
- Maimone MM, Tollefsen DM.** Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1056-1061.
- Mainardi CL, Hasty DL, Seyer JM, Kang AH.** Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 1980;255:12006-12010.
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*

- 1995;146:3-15.
- Malhotra R, Taylor NR, Bird ML.** Anionic phospholipids bind to L-selectin (but not E-selectin) at a site distinct from the carbohydrate-binding site. *Biochem J* 1996;314:297-303.
- Mallory GK, White PD, Salcedo-Salgar J.** The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J* 1939;18:647-671.
- Mandal AK, Lyden TW, Saklayen MG.** Heparin lowers blood pressure: biological and clinical perspectives. *Kidney Int* 1995;47:1017-1022.
- Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J.** Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1989;257:G299-G307.
- Manning AS, Hearse DJ.** Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497-518.
- Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Porterfield JK, Yue DT, Chacko VP.** Intracellular free calcium concentration measured with ¹⁹F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6005-6009.
- Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusuoka H.** Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 1989;80(Suppl IV):IV-17 - IV-22.
- Marber VJ, Sherry S.** Thrombolytic therapy: current status (first of two parts). *N Engl J Med* 1988;318:1512-1520.
- Marber VJ, Sherry S.** Thrombolytic therapy: current status (second of two parts). *N Engl J Med* 1988a;318:1585-1595.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM.** Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-1272.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N.** Formation of leukotrienes and other

- hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:130-137.
- Marguerie GA, Edgington TS, Plow EF.** Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 1980;255:154-160.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L.** Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982;126:41-51.
- Maroko PR, Carpenter CB, Chiareillo M, Fishbein MC, Radvany P, Knostman JD, Hale SL.** Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest* 1978;61:661-670.
- Mathey D, Schofer J, Schäfer HJ, Hamdoch T, Joachim HC, Ritgen A, Hugo F, Bhakdis S.** Early accumulation of the terminal complement-complex in the ischaemic myocardium after reperfusion. *Eur Heart J* 1994;15:418-423.
- Matsuzaki M, Gallagher KP, Kemper WS, White F, Ross J Jr.** Sustained regional dysfunction produced by prolonged coronary stenosis: gradual recovery after reperfusion. *Circulation* 1983;68:170-182.
- Matzner Y, Marx G, Drexler R, Eldor A.** The inhibitory effect of heparin and related glycosaminoglycans on neutrophil chemotaxis. *Thromb Haemost* 1984;52:134-137.
- Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C.** Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B₂ and leukotriene C₄ cooperative synthesis. *Thromb Haemost* 1994;72:450-456.
- Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM.** Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1987;21:737-746.
- Mazzone A, de Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati D, Bramucci E, Angoli L, Marsico**

- F, Specchia G, Notario A.** Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;88:358-363.
- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittler BJR, Moncada S.** Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils: release and interactions with superoxide anion. *Biochem J* 1989;261:293-296.
- McClintock DK, Bell PH.** The mechanism of action of human plasminogen by streptokinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:694-702.
- McCluskey ER, Murphree S, Saffitz JE, Morrison AR, Needleman P.** Temporal changes in 12-HETE formation in two models of canine myocardial infarction. *Prostaglandins* 1985;29:387-403.
- McCord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-163.
- McDonald PP, McColl SR, Braquet P, Borgeat P.** Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br J Pharmacol* 1994;111:852-860.
- McEver RP.** GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991;45:156-161.
- McGhie AI, McNatt J, Ezov N, Cui K, Mower LK, Hagay Y, Buja LM, Garfinkel LI, Gorecki M, Willerson JT.** Abolition of cyclic flow variations in stenosed, endothelium-injured coronary arteries in nonhuman primates with a peptide fragment (VCL) derived from human plasma von Willebrand factor-glycoprotein Ib binding domain. *Circulation* 1994;90:2976-2981.
- McKay EJ, Laurell CB.** The interaction of heparin with plasma proteins. Demonstration of different binding sites for antithrombin III complexes and antithrombin III. *J Lab Clin Med* 1980;95:69-80.
- McLean J.** The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol* 1916;41:250-257.

- McManus LM, Kolb WP, Crawford MH, O'Rourke RA, Grover FL, Pinckard RN.** Complement localization in ischemic baboon myocardium. *Lab Invest* 1983;48:436-447.
- Meade EA, Smith WL, DeWitt DL.** Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993;268:6610-6614.
- Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YP, Belkina LM, Arkhipenko YV.** The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol* 1982;77:465-485.
- Mehta P, Mehta JL.** Effects of aspirin in arterial thrombosis: why don't animals behave the way humans do? *J Am Coll Cardiol* 1993;21:511-513.
- Mehta JL, Mehta P, Lopez L, Ostrowski N, Aguila E.** Platelet function and biosynthesis of prostacyclin and thromboxane A₂ in whole blood after aspirin administration in human subjects. *J Am Coll Cardiol* 1984;4:806-811.
- Mehta JL, Nichols WW, Mehta P.** Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischemia: relevance to reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1309-1316.
- Mehta JL, Nichols WW, Donnelly WH, Lawson DL, Saldeen TGP.** Impaired canine coronary vasodilatory response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. *Circ Res* 1989;64:43-54.
- Mehta J, Dinerman J, Mehta P, Saldeen TGP, Lawson D, Donnelly WH, Wallin R.** Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989a;79:549-556.
- Mehta JL, Nichols WW, Nicolini FA, Hendricks J, Donnelly WH, Saldeen TGP.** Neutrophil elastase inhibitor ICI 200,880 protects against attenuation of coronary flow reserve and myocardial dysfunction following temporary coronary artery occlusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1994;28:947-956.

- Menasché P.** La protection myocardique endogène. *Sang Thrombose Vaisseaux* 1996;8:229-2335.
- Messmore HL, Griffin B, Fareed J, Coyne E, Seghatchian J.** In-vitro studies of the interaction of heparin, low molecular weight heparin and heparinoids with platelets. *Ann N Y Acad Sci* 1989;556:217-231.
- Messmore HL, Griffin B, Koza M, Seghatchian J, Fareed J, Coyne E.** Interaction of heparinoids with platelets: comparison with heparin and low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 1991;17(Suppl 1):57-59.
- Meyer D, Girma J-P.** Von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 1993;70:99-104.
- Mickelson JK, Simpson PJ, Jackson CV, Lucchesi BR.** Protection of myocardial function and coronary vasculature by streptokinase. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;12:186-195.
- Mickelson JK, Simpson PJ, Lucchesi BR.** Streptokinase improves reperfusion blood flow after coronary artery occlusion. *Int J Cardiol* 1989;23:373-384.
- Mickelson JK, Hoff PT, Homeister JW, Fantone JC, Lucchesi BR.** High dose intravenous aspirin, not low dose intravenous or oral aspirin, inhibits thrombus formation and stabilizes blood flow in experimental coronary vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 1993;21:502-510.
- Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW.** Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345-353.
- Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW.** Interaction of coagulation factor Xa with human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:4033-4036.
- Millar CGM, Baxter GF, Thiemermann C.** Protection of the myocardium by ischaemic preconditioning: mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 1996;69:143-151.
- Mirshahi Mc, Soria J, Neuhart E, Steg PG, Jacob P, Combe S, Soria C.** Effect of heparin and

- enoxaparin on platelet interaction with fibrin clot. *Thromb Res* 1992;65:187-191.
- Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD.** Involvement of large plasma von Willebrand factor multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 1986;78:1456-1461.
- Molino M, Di Lallo M, Martelli N, de Gaetano G, Cerletti C.** Effects of leukocyte-derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa complexes: a comparison with thrombin. *Blood* 1993;82:2442-2451.
- Moncada S, Vane JR.** The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* 1979;38:66-71.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR.** An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976;263:663-665.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
- Montrucchio G, Alloatti G, Tatta C, De Luca R, Saunders RN, Emanuelli G, Camussi G.** Release of platelet-activating factor from ischemic-reperfused rabbit heart. *Am J Physiol* 1989;256:H1236-H1246.
- Montrucchio G, Alloatti G, Mariano F, Comino A, Cacace G, Polloni R, De Filippi PG, Emanuelli G, Camussi G.** Role of platelet-activating factor in polymorphonuclear neutrophil recruitment in reperfused ischemic rabbit heart. *Am J Pathol* 1993;142:471-480.
- Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Fugang L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP.** P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophil on P-selectin. *J Cell Biol* 1995;128:661-671.
- Morel F, Doussi re J, Vignais PV.** The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991;201:523-546.

- Mosesson MW, Amrani DL.** The structure and biologic activities of plasma fibronectin. *Blood* 1980;56:145-158.
- Mousa SA, DeGrado WF, Mu D-X, Kapil RP, Lucchesi BR, Reilley TM.** Oral antiplatelet, antithrombotic efficacy of DMP 728, a novel platelet GPIIb/IIIa antagonist. *Circulation* 1996;93:537-543.
- Mruk JS, Chesebro JH, Webster MWI.** Platelet aggregation and interaction with the coagulation system: implications for antithrombotic therapy in arterial thrombosis. *Coron Artery Dis* 1990;1:149-158.
- Mullane K.** Acadesine: the prototype adenosine regulating agent for reducing myocardial ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 1993;27:43-47.
- Mullane KM, McGiff JC.** Platelet deposition and infarct size in an occlusion-reperfusion model of myocardial ischemia in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985;7:733-738.
- Mullane KM, Fornabaio D.** Thromboxane synthetase inhibitors reduce infarct size by a platelet-dependent aspirin-sensitive mechanism. *Circ Res* 1988;62:668-678.
- Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S.** Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;228:510-522.
- Mullane KM, Kraemer R, Smith B.** Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 1985;14:157-167.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM.** PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-460.
- Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA.** Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* 1992;90:1600-1607.
- Muntz KH, Hagler HK, Boulas HJ, Buja LM.** Redistribution of catecholamines in the ischemic

zone of the dog heart. *Am J Pathol* 1984;114:64-78.

Murohara T, Margiotta J, Phillips LM, Paulson JC, DeFrees S, Zalipsky S, Guo LSS, Lefer AM. Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewis^x-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;30:965-974.

Murohara T, Guo J-P, Lefer AM. Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1995a;274:1246-1253.

Murohara T, Delyani JA, Albelda SM, Lefer AM. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol* 1996;156:3550-3557.

Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991;68:1250-1258.

Murphy E, Glasgow W, Fralix T, Steenbergen C. Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning. *Circ Res* 1995;76:457-467.

Murry C, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.

Myers DW, Nohara A, Abendschein DR, Saffitz JE, Sobel BE, Bergmann SR. Compromise of beneficial effects of reperfusion on myocardium supplied by vessels with critical residual stenosis. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1078-1086.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 1985;72:915-921.

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Michael LH, Roberts R. N-2-mercaptopropionylglycine improves recovery of myocardial function following reversible regional ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1986;8:1161-1168.

- Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M, Kusuoka H, Hori M, Kuzuya T, Higashino Y, Fujii K, Minamino T.** Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction: retrospective clinical evidence of "preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1076-1083.
- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M.** Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996;46:15-32.
- Nao BS, McClanahan TB, Groh MA, Schott RJ, Gallagher KP.** The time limit of effective preconditioning in dogs. *Circulation* 1990;82(Suppl III):III-271 (Abstract).
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw B-A.** Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335:1182-1189.
- Näslund J, Häggmark, Johansson G, Marklund SL, Reiz S, Öberg A.** Superoxide dismutase and catalase reduce infarct size in porcine myocardial occlusion-reperfusion model. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:1077-1084.
- Neely JR, Grotyohann LW.** Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 1984;55:816-824.
- Nejima J, Knight DR, Fallon JT, Uemura N, Manders WT, Canfield DR, Cohen MV, Vatner SF.** Superoxide dismutase reduces reperfusion arrhythmias but fails to salvage regional function or myocardium at risk in conscious dogs. *Circulation* 1989;79:143-153.
- Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP.** Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-3258.
- Nesheim ME, Pittman DD, Wang JH, Slonosky D, Giles AR, Kaufman RJ.** The binding of 35S-

- labeled recombinant factor VIII to activated and unactivated human platelets. *J Biol Chem* 1988;263:16467-16470.
- Neumann F-J, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A.** Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819-824.
- Nicklas JM, Gips SJ.** Decreased coronary flow reserve after transient myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:195-199.
- Nilsson UA, Haraldsson G, Bratell S, Sørensen V, Åkerlund S, Pettersson S, Scherstén T, Jonsson O.** ESR-measurement of oxygen radicals *in vivo* after renal ischaemia in the rabbit. Effects of pre-treatment with superoxide dismutase and heparin. *Acta Physiol Scand* 1993;147:263-270.
- Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Tada M, Inoue M, Hori M, Kamada T.** Plasma nitric oxide end products are increased in the ischemic canine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:370-374.
- Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Tada M, Hori M, Kamada T.** Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation* 1996;93:356-364.
- Norgard-Sumnicht KE, Varki NM, Varki A.** Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* 1993;261:480-483.
- Noris P, Bertolino G, Previtali M, Ferrario M, Balduino CL.** Heparin infusion facilitates ex vivo spontaneous platelet aggregation in patients with acute myocardial infarction who have undergone thrombolytic therapy. *Haemostasis* 1993;23:185-191.
- Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K.** Leukocyte rolling *in vivo* is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995;86:4417-4421.

- Norrby K.** Heparin and angiogenesis: a low-molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fraction stimulates angiogenesis systematically. *Haemostasis* 1993;23(Suppl 1):141-149.
- Ofosu FA, Modi GJ, Hirsh J, Buchanan M, Blajchman MA.** Mechanisms for inhibition of the generation of thrombin activity by sulfated polysaccharides. *Ann N Y Acad Sci* 1986;485:41-55.
- Ohmuro S, Tsukada Y, Taga F, Ohkubo H, Uchida H.** Protective effect of the new antiplatelet agent 2-methyl-3-(1,4,5,6-tetrahydronicotinoyl)pyrazolo[1,5-a]pyridine on myocardial damage due to coronary occlusion and reperfusion in rabbit. *Arzneimittelforschung* 1992;42:39-42.
- Okano K, Kokudo Y, Okajima K, Hossain MA, Ishimura K, Yachida S, Tsubouchi T, Wakabayashi H, Maeba T, Maeta H.** Protective effects of antithrombin III supplementation on warm ischemia and reperfusion injury in rat liver. *World J Surg* 1996;20:1069-1075.
- Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CV, Friesinger GC, Virmani R.** Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987;76:1135-1145.
- Olson ST, Björk I.** Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. In: Berliner LJ, ed. *Thrombin: structure and function*. New York: Plenum Press, 1992;159-217.
- O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW.** Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993;330:156-160.
- Opie LH.** Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989;80:1049-1062.
- Opie LH.** Myocardial ischemia - Metabolic pathways and implications of increased glycolysis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990;4:777-790.
- Opie LH.** *The heart. Physiology and metabolism 2nd ed.* New York: Raven Press, 1991.
- Opie LH.** Cardiac metabolism - emergence, decline and resurgence. Part I. *Cardiovasc Res* 1992;26:721-733.
- Opie LH.** The mechanism of myocyte death in ischaemia. *Eur Heart J* 1993;14(Suppl G):31-33.

- Opie LH, Coetzee WA.** Are calcium ions involved in the genesis of early ischemic ventricular arrhythmias? In: Hearse DJ, Manning AS, Janse MJ, eds. *Life-threatening arrhythmias during ischemia and infarction*. New York: Raven Press, 1987;63-75.
- Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A.** Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-1246.
- Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F.** Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation* 1995;91:291-297.
- Ōyanagui Y, Sato S.** Heparin, a potent releasing agent of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD C), suppresses ischaemic paw oedema in mice. *Free Radic Res Commun* 1990;9:87-99.
- Pabla R, Buda AJ, Flynn DM, Blesse SA, Shin AM, Curtis MJ, Lefer DJ.** Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1996;78:65-72.
- Packham MA.** Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1994;72:278-284.
- Pairat M, Engelhardt G.** Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996;10:1-15.
- Parise LV, Phillips DR.** Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor: fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1985;260:10698-10707.
- Parks DA, Granger DN.** Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:87-99.
- Parratt JR.** Pathophysiology of myocardial ischemia: importance of platelet-vessel wall interactions. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988;2:35-40.
- Parratt JR.** Protection of the heart by ischaemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:19-25.

- Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C.** Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982;69:1366-1372.
- Patrono C.** Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994;330:1287-1294.
- Patrono C, Ciabattoni G, Pinca E, Pugliese F, Castrucci G, De Salvo A, Satta Ma, Peskar BA.** Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B₂ production in healthy subjects. *Thromb Res* 1980;17:317-327.
- Pedersen AK, FitzGerald GA.** Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med* 1984;311:1206-1211.
- Petersen L, Bjorn S, Nordfang O.** Effects of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1992;67:537-541.
- Peterson DM, Stathopoulos NA, Giorgio TD, Hellums JD, Moake JL.** Shear-induced aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoprotein Ib and IIb-IIIa. *Blood* 1986;69:625-628.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA.** The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843.
- Piana RN, Shafique T, Dai HB, Sellke FW.** Epicardial and endocardial coronary microvascular responses: effects of ischemia-reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:539-546.
- Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C.** Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 1996;76:780-785.
- Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC.** The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991;66:921-933.
- Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T.** Salicylate inhibit IκB-α

- phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996;156:3961-3969.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E.** Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984;309:30-33.
- Pinckard RN, Hawkins D, Farr RS.** In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. *Nature* 1968;219:68-69.
- Pinckard RN, Olson MS, Kelley RE, Dexter DH, Palmer JD, O'Rourke RA, Goldfein S.** Antibody-independent activation of human C1 after interaction with heart subcellular membranes. *J Immunol* 1973;110:1376-1382.
- Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA.** Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 1975;56:740-750.
- Pinckard RN, O'Rourke RA, Crawford MH, Grover FS, McManus LM, Ghidoni JJ, Storrs SB, Olson MS.** Complement localization and mediation of ischemic injury in baboon myocardium. *J Clin Invest* 1980;66:1050-1056.
- Pizcueta P, Luscinskas FW.** Monoclonal antibody blockade of L-selectin inhibits mononuclear leukocyte recruitment to inflammatory sites in vivo. *Am J Pathol* 1994;145:461-469.
- Plescia J, Altieri DC.** Activation of MAC-1 (CD11b/CD18)-bound factor X released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. *Biochem J* 1996;319:873-879.
- Plow EF.** Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest* 1982;69:564-572.
- Plow EF, Collen D.** The presence and release of alpha-2-antiplasmin from human platelets. *Blood* 1981;58:1069-1074.

- Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL Jr, Marguerie GA, Ginsberg MH.** Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1985;66:724-727.
- Plow EF, Marguerie G, Ginsberg M.** Fibrinogen, fibrinogen receptors, and the peptides that inhibit these interactions. *Biochem Pharmacol* 1987;36:4035-4040.
- Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH.** Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:324-332.
- Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS.** Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 1987;262:8476-8482.
- Pou S, Nguyen SY, Gladwell T, Rosen GM.** Does peroxynitrite generate hydroxyl radical? *Biochim Biophys Acta* 1995;1244:62-68.
- Pratt CW, Church FC.** Heparin binding to protein C inhibitor. *J Biol Chem* 1992;267:8789-8794.
- Preissner KT, Müller-Berghaus G.** Neutralization and binding of heparin by S-protein/vitronectin in the inhibition of factor Xa by antithrombin III. *J Biol Chem* 1987;262:12247-12253.
- Preston FE, Whipps S, Jackson CA, French AJ, Wyld PJ, Stoddard CJ.** Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A₂ after low-dose aspirin. *N Engl J Med* 1981;304:76-79.
- Preston SJ, Arnold MH, Beller EM, Brooks PM, Buchanan WW.** Comparative analgesic and anti-inflammatory properties of sodium salicylate and acetylsalicylic acid (aspirin) in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 1989;27:607-611.
- Prinzen FW, Van der Vusse GJ, Arts T, Roemen THM, Coumans WA, Reneman RS.** Accumulation of nonesterified fatty acids in ischemic canine myocardium. *Am J Physiol* 1984;247:H264-H272.
- Pryor WA, Squadrito GL.** The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide

- with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268:L699-L722.
- Przyklenk K, Kloner RA.** Effect of verapamil on postischemic "stunned" myocardium: importance of the timing of treatment. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:614-623.
- Przyklenk K, Ghafari GB, Eitzman DT, Kloner RA.** Nifedipine administered after reperfusion ablates systolic contractile dysfunction of postischemic "stunned" myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1176-1183.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P.** Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893-899.
- Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, Kloner RA.** Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? *Circulation* 1995;92:1546-1557.
- Pucheu S, Coudray C, Vanzetto G, Favier A, Machecourt J, de Leiris J.** Assessment of radical activity during the acute phase of myocardial infarction following fibrinolysis: utility of assaying plasma malondialdehyde. *Free Radic Biol Med* 1995;19:873-881.
- Puckett SW, Digerness SB, Bowdon HR, Rogers WJ, Rackley CE.** Direct effects of streptokinase on the isolated rat myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:1120-1123.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;ii:1057-1058.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987a;148:1482-1489.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987b;92:639-646.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** An L-arginine/nitric oxide pathway present in human

- platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:10043-10047.
- Raitt MH, Maynard C, Wagner GS, Cerqueira MD, Selvester RH, Weaver WD.** Relation between symptom duration before thrombolytic therapy and final myocardial infarct size. *Circulation* 1996;93:48-53.
- Rao LV, Rapaport SI.** Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6687-6691.
- Ray SD, Kamendulis LM, Gurule MW, Yorkin RD, Corcoran GB.** Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J* 1993;7:453-463.
- Reantragoon S, Arrigo LM, Abou Seoud MM, Dweck HS, Rosenfeld L.** Specific heparin fractions suppress endothelin-1 production in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1994;314:315-322.
- Redini F, Tixier J-M, Petitou M, Choay J, Robert L, Hornebeck W.** Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem J* 1988;252:515-519.
- Reimer KA, Jennings RB.** The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979;40:633-644.
- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB.** The wavefront phenomenon of ischemic cell death. I. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-794.
- Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH.** Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 1983;52:72A-81A.
- Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR, Murdock RH, Greenfiels JC Jr, Becker LC, Bulkley BH, Hutchins GM, Schwartz RP Jr, Bailey KR, Passamani ER.** Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI cooperative study. Comparison of unconscious and

- conscious dog models. *Circ Res* 1985;56:651-665.
- Reverter JC, Béguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS.** Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J Clin Invest* 1996;98:863-874.
- Reynolds JM, McDonagh PF.** Early in reperfusion, leukocytes alter perfused coronary capillarity and vascular resistance. *Am J Physiol* 1989;256:H982-H989.
- Rhee BG, Hall ER, McIntire LV.** Platelet modulation of polymorphonuclear leukocyte shear induced aggregation. *Blood* 1986;67:240-246.
- Richard V, Murry CE, Reimer KA.** Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation* 1995;92:1891-1901.
- Rickles FR, Hair GA, Zeff RA, Lee E, Bona RD.** Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells. *Thromb Haemost* 1995;74:391-395.
- Riesenberg K, Schlaeffer F, Katz A, Levy R.** Inhibition of superoxide production in human neutrophils by combinations of heparin and thrombolytic agents. *Br Heart J* 1995;73:14-19.
- Rimele TJ, Sturm RJ, Adams LM, Henry DE, Heaslip RJ, Weichman BM, Grimes D.** Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:102-111.
- Rink TJ, Sage SO.** Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* 1990;52:431-449.
- Robbie LA, Booth NA, Croll AM, Bennett B.** The roles of alpha 2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in the inhibition of clot lysis. *Thromb Haemost* 1993;70:301-306.
- Rodén L.** Highlights in the history of heparin. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 1989;1-23.
- Romson JL, Bush LR, Haack D, Lucchesi BR.** The beneficial effects of oral ibuprofen on coronary

- artery thrombosis and myocardial ischemia in the conscious dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;215:271-278.
- Romson JL, Hook BG, Rigot VH, Schork MA, Swanson DP, Lucchesi BR.** The effect of ibuprofen on accumulation of Indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1982;66:1002-1011.
- Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork A, Lucchesi BR.** Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;67:1016-1023.
- Root RK, Metcalf JA.** H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. *J Clin Invest* 1977;60:1266-1279.
- Rosenberg RD, Lam L.** Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1218-1222.
- Rosenberg RD, Bauer KA.** The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994;837-860.
- Rosenkranz ER, Buckberg GD.** Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1983;1:1235-1246.
- Rossen RD, Swain JL, Michael LH, Weakley S, Giannini E, Entman ML.** Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle. A possible initiator of an extra myocardial mechanism of ischemic injury. *Circ Res* 1985;57:119-130.
- Rote WE, Werns SW, Davis JH, Feigen LP, Kilgore KS, Lucchesi BR.** Platelet GPIIb/IIIa receptor inhibition by SC-49992 prevents thrombosis and rethrombosis in the canine carotid artery. *Cardiovasc Res* 1993;27:500-507.
- Roth GJ.** Developing relationships: arterial adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood* 1991;77:5-19.

- Roth GJ, Majerus PW.** The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975;56:624-632.
- Roth GJ, Calverley DC.** Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* 1994;83:885-898.
- Roth GJ, Stanford N, Majerus PW.** Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3073-3076.
- Roth GJ, Machuga ET, Strittmatter P.** The heme-binding properties of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J Biol Chem* 1981;256:10018-10022.
- Roth GJ, Machuga ET, Ozols J.** Isolation and covalent structure of the aspirin-modified, active-site region of prostaglandin synthetase. *Biochemistry* 1983;22:4672-4675.
- Rousseau G, St-Jean G, Latour J-G, Merhi Y, Nattel S, Waters D.** Diltiazem at reperfusion reduces neutrophil accumulation and infarct size in dogs with ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* 1991;25:319-329.
- Rousseau G, Hébert D, Libersan D, Khalil A, St-Jean G, Latour J-G.** Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J* 1993;125:1553-1563.
- Rousseau G, Provost P, Tran D, Cailé G, Latour J-G.** Clentiazem given at reperfusion improves subendocardial reflow and reduces myocardial infarct size in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:1252-1260.
- Roux S, Christeller S, Lüdin E.** Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:671-676.
- Roux SP, Tschopp TB, Kuhn H, Steiner B, Hadvary P.** Effects of heparin, aspirin and a synthetic platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonist (Ro 43-5054) on coronary artery reperfusion and reocclusion after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in the dog. *J Pharmacol*

Exp Ther 1993;264:501-508.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-H827.

Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of posts ischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *J Appl Physiol* 1996;80:369-387.

Rucinski B, Niewiarowski S, Strzyewski M, Holt JC, Mayo KH. Human platelet factor 4 and its C-terminal peptides: heparin binding and clearance from the circulation. *Thromb Haemost* 1990;63:493-498.

Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993;70:119-123.

Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J* 1993;7:308-316.

Rus HG, Niculescu F, Vlaicu R. Presence of C5b-9 complement complex and S-protein in infarcted areas with necrosis and sclerosis. *Immunol Lett* 1987;16:15-20.

Saadi S, Holzknrecht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med* 1995;182:1807-1814.

Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. Human platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979;279:636-638.

Saliba MJ Jr, Covell JW, Bloor CM. Effects of heparin in large doses on the extent of myocardial ischemia after acute coronary occlusion in dog. *Am J Cardiol* 1976;37:599-604.

Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest* 1980;65:64-73.

Sandset PM, Abildgaard U. Extrinsic pathway inhibitor - The key to feedback control of blood coagulation initiated by tissue thromboplastin. *Haemostasis* 1991;21:219-239.

- Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML.** Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988;50:803-813.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L-M.** Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-323.
- Schaefer S, Camacho SA, Gober J, Obregon RG, DeGroot MA, Botvinick EH, Massie B, Weiner MW.** Response of myocardial metabolites to graded regional ischemia: ³¹P NMR spectroscopy of porcine myocardium in vivo. *Circ Res* 1989;64:968-976.
- Schäfer H, Mathey D, Hugo F, Bhakdi S.** Deposition of the terminal C5b-9 complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol* 1986;137:1945-1949.
- Schaper W, Ito WD.** Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996;79:911-919.
- Scheidt S.** Basic electrocardiography: abnormalities of electrocardiographic patterns. *Clin Symp* 1985;37:1-32.
- Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt F.** Expression of *c-fos* and *c-jun* during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996;23:1546-1555.
- Schmidt SB, Varghese PJ, Bloom S, Yackee JM, Ross AM.** The influence of residual coronary stenosis on size of infarction after reperfusion in a canine preparation. *Circulation* 1986;73:1354-1359.
- Schofer J, Montz R, Mathey DG.** Scintigraphic evidence of the "no reflow" phenomenon in human beings after coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:593-598.
- Schott R, Rohmann S, Braun ER, Schaper W.** Ischaemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990;66:1133-1142.
- Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C.** Reactive oxygen species rapidly increase endothelial

- ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 1994;83:2669-2677.
- Serebruany VL, Herzog WR, Gurbel PA.** Serial changes of natural antithrombotics during myocardial ischemia-reperfusion in swine. Effects of magnesium, diltiazem, and a novel Mac-1 inhibitor. *Blood Coag Fibrinol* 1996;7:632-640.
- Serhan CN.** Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim Biophys Acta* 1994;1212:1-25.
- Serhan CN, Sheppard K-A.** Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A₄ by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest* 1990;85:772-780.
- Shacter E, Lopez RL, Pati S.** Inhibition of the myeloperoxidase-H₂O₂-Cl⁻ system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1991;41:975-984.
- Shandelya SML, Kuppusamy P, Weisfeldt ML, Zweier JL.** Evaluation of the role of polymorphonuclear leukocytes on contractile function in myocardial reperfusion injury. Evidence for plasma-mediated leukocyte activation. *Circulation* 1993;87:536-546.
- Shandelya SML, Kuppusamy P, Herskowitz A, Weisfeldt ML, Zweier JL.** Soluble complement receptor type 1 inhibits the complement pathway and prevents contractile failure in the postischemic heart. Evidence that complement activation is required for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1993a;88:2812-2826.
- Shen AC, Jennings RB.** Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 1972;67:417-440.
- Shen AC, Jennings RB.** Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1972a;67:441-452.
- Sheridan DJ, Penkoske PA, Sobel BE, Corr PB.** Alpha adrenergic contributions to dysrhythmia

during myocardial ischemia and reperfusion in cats. *J Clin Invest* 1980;65:161-171.

Sheridan FM, Dauber IM, McMurty IF, Lesnefsky EJ, Horwitz LD. Role of leukocytes in coronary vascular endothelial injury due to ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1991;69:1566-1574.

Shimokawa T, Smith WL. Essential histidines of prostaglandin endoperoxide synthase. *J Biol Chem* 1991;266:6168-6173.

Sigurdsson GH, Youssef HAF, Owunnwanne A. Effects of two different inhibitors of the arachidonic acid metabolism on platelet sequestration in endotoxic shock. *Res Exp Med* 1994;194:287-295.

Silver MJ, Sutton JM, Hook S, Lee P, Malycky JL, Phillips ML, Ellis SG, Topol EJ, Nicolini FA. Adjunctive selectin blockade successfully reduces infarct size beyond thrombolysis in the electrolytic canine coronary artery model. *Circulation* 1995;92:492-499.

Silvestro L, Viano I, Macario M, Colangelo D, Montrucchio G, Panico S, Fantozzi R. Effects of heparin and its desulfated derivatives on leukocyte-endothelial adhesion. *Semin Thromb Hemost* 1994;20:254-258.

Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995;16:160-170.

Simpson PJ, Mickelson JK, Fantone JC, Gallagher KP, Lucchesi BR. Iloprost inhibits neutrophil function in vitro and in vivo and limits experimental infarct size in canine heart. *Circ Res* 1987;60:666-673.

Simpson PJ, Mitsos SE, Ventura A, Gallagher KP, Fantone JC, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Prostacyclin protects ischemic reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am Heart J* 1987a;113:129-137.

Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase

complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *J Biol Chem* 1989;264:17049-17057.

Slungaard A, Vercellotti GM, Walker G, Nelson RD, Jacob HS. Tumor necrosis factor alpha/cachetin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity toward human endothelium. *J Exp Med* 1990;171:2025-2041.

Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biol* 1971;231:235-237.

Smith WL, Lands WE. Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem* 1971;246:6700-6702.

Smith CW, Entman ML, Lane CL, Beaudet AL, Ty TI, Youker K, Hawkins HK, Anderson DC. Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1991;88:1216-1223.

Smith EF III, Nichols AJ, Sellers TS, O'Brien SR, Griswold DE, Egan JW, Hillegass LM, Vasko JA, Slivjak MJ, Davis PA, Wolff CE, DiMartino MJ. Reduction in myocardial ischemic/reperfusion injury and neutrophil accumulation after therapeutic administration of streptokinase. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991a;18:729-738.

Snow TR, Deal MT, Dickey DT, Esmon CT. Protein C activation following coronary artery occlusion in the in situ porcine heart. *Circulation* 1991;84:293-299.

Snyder F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990;259:C697-C708.

Sobel M, Adelman B. Characterization of platelet binding of heparins and other glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1988;50:815-826.

Sobel M, McNeill PM, Carlson PL, Kermode JC, Adelman B, Conroy R, Marques D. Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo. *J Clin Invest*

1991;87:1787-1793.

Sommers HM, Jennings RB. Experimental acute myocardial infarction: histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery. *Lab Invest* 1964;13:1491-1502.

Sommers HM, Jennings RB. Ventricular fibrillation and myocardial necrosis after transient ischemia: effect of treatment with oxygen, procainamide, reserpine and propranolol. *Arch Int Med* 1972;129:780-789.

Southorn PA. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-389.

Spanguolo PJ, Ellner JJ, Hassid A. Thromboxane A₂ mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1980;66:406-414.

Spector AA, Gordon JA, Moore SA. Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs). *Prog Lipid Res* 1988;27:271-323.

Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K⁺ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ Res* 1995;77:1030-1035.

Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin TC, Nemerson Y, Konigsberg WH. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5148-5152.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.

Stahl GL, Reenstra WR, Frenzl G. Complement-mediated loss of endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries. Role of the terminal membrane attack complex. *Circ Res* 1995;76:575-583.

- Starke PE, Hoek JB, Farber JL.** Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of irreversible cell injury in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261:3006-3012.
- Staunton DE, Dustin ML, Springer TA.** Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61-64.
- Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB.** Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total *in vitro* ischemia in canine hearts. *Circ Res* 1987;60:478-486.
- Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE.** Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987a;60:700-707.
- Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE.** Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990;66:135-146.
- Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E.** Role of increased cytosolic free calcium concentrations in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993;88:456-470.
- Stern DM, Nawroth PP, Harris K, Esmon CT.** Culture bovine aortic endothelial cells promote activated protein C-protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem* 1986;261:713-718.
- Sternbergh WC III, Makhoul RG, Adelman B.** Heparin prevents postischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg* 1993;17:318-327.
- Sternbergh WC III, Sobel M, Makhoul RG.** Heparinoids with low anticoagulant potency attenuate postischemic endothelial cell dysfunction. *J Vasc Surg* 1995;21:477-483.
- Stone D, Darley-USmar V, Smith DR, O'Leary D.** Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca²⁺ in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:963-973.

- Strasser RH, Braun-Dullaes R, Waldenzik H, Marquetant R.** Alpha 1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ Res* 1992;70:1304-1312.
- Stricker RB, Wong D, Shiu DT, Reyes PT, Shuman MA.** Activation of plasminogen by tissue plasminogen activator on normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation. *Blood* 1986;68:275-280.
- Sudo Y, Kilgore KS, Lucchesi BR.** Monoclonal antibody [7E3 F(ab')₂] prevents arterial but not venous rethrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:241-250.
- Sun JZ, Tang XL, Knowlton AA, Parks SW, Qui Y, Bolli R.** Late preconditioning against myocardial stunning. An endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs. *J Clin Invest* 1995;95:388-403.
- Svensden JH, Hansen PR, Ali S, Baandrup U, Haunso S.** Leukocyte depletion attenuates the early increase in myocardial capillary permeability to small hydrophilic solutes following ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993;27:1288-1294.
- Szabó C.** The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79-88.
- Tanaka M, Brooks SE, Richard VJ, FitzHarris GP, Stoler RC, Jennings RB, Arfors K-E, Reimer KA.** Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993;87:526-535.
- Tanaka Y, Adams DH, Shaw S.** Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 1993a;3:111-115.
- Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M.** Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured

- neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994;75:426-433.
- Tangelder GJ, Arfors K-E.** Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood* 1991;77:1565-1571.
- Tauber AI, Babior BM.** Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J Clin Invest* 1977;60:374-379.
- Taylor AL, Golino P, Eckels R, Pastor P, Buja LM, Willerson JT.** Differential enhancement of postischemic segmental systolic thickening by diltiazem. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:737-747.
- Tennant R, Wiggers C.** The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935;112:351-361.
- Thakur ML, Gottschalk A, Zaret BL.** Imaging experimental myocardial infarction with Indium-111-labeled autologous leukocytes: effects of infarct age and residual regional myocardial blood flow. *Circulation* 1979;60:297-305.
- Thakur ML, Walsh LJ, Zaret BL, Gottschalk A.** Effect of antiarrhythmic drugs on In-111-labeled leukocytes: chemotaxis and adherence to nylon wool. *J Nucl Med* 1982;23:131-135.
- Thanos D, Maniatis T.** NF- κ B - A lesson in family value. *Cell* 1995;80:529-532.
- Théroux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S.** Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. *Am J Cardiol* 1976;38:599-606.
- Théroux P, Kouz S, Roy L, Knudtson ML, Diodati JG, Marquis J-F, Nasmith J, Fung AY, Boudreault J-R, Delage F, Dupuis R, Kells C, Bokslag M, Steiner B, Rapold HJ.** Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina. The canadian lamifiban study. *Circulation* 1996;94:899-905.
- Thompson JA, Hess ML.** The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1986;28:449-462.

- Thunberg L, Lindahl U, Tengblad A, Laurent TC, Jackson CM.** On the molecular-weight dependence of the anticoagulant activity of heparin. *Biochem J* 1979;181:241-243.
- Thunberg L, Bäckström G, Lindahl U.** Further characterization of antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr Res* 1982;100:393-410.
- Tollefsen DM.** Heparin cofactor II. In: Lane DA, Lindahl U, eds. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications*. Boca Raton: CRC Press, 1989;257-273.
- Tollefsen DM, Blank MK.** Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Clin Invest* 1981;68:589-596.
- Tollefsen DM, Pestka CA.** Modulation of heparin cofactor II activity by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4. *J Clin Invest* 1985;75:496-501.
- Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK.** Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* 1982;257:2162-2169.
- Tollefsen DM, Peacock ME, Monafó WJ.** Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofactor II. *J Biol Chem* 1986;261:8854-8858.
- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De PR, Penta DPA, Chiariello L, Gioffre PA.** Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation* 1994;90:700-705.
- Topol EJ.** Prevention of cardiovascular ischemic complications with new platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J* 1995;130:666-672.
- Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G III, Lefer AM.** Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990;82:1402-1412.
- Tsuchida A, Miura T, Miki T, Shimamoto K, Jimura O.** Role of adenosine receptor activation in myocardial infarct size limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1992;26:456-

461.

Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. α_1 -adrenergic agonists precondition rabbit ischaemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res* 1994;75:576-585.

Turner NA, Moake JL, Kamat SG, Schafer AI, Kleiman NS, Jordan R, McIntire LV. Comparative real-time effects on platelet adhesion and aggregation under flowing conditions of in vivo aspirin, heparin, and monoclonal antibody fragment against glycoprotein IIb-IIIa. *Circulation* 1995;91:1354-1362.

Tyrrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:198-204.

Ueda N, Shah SV. Apoptosis. *J Lab Clin Med* 1994;124:169-177.

Umeki S. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human neutrophil NADPH oxidase in both whole cell and cell-free systems. *Biochem Pharmacol* 1990;40:559-564.

Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation* 1987;75:1237-1248.

Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tissue React* 1986;8:99-103.

Van de Werf F, Arnold AER. Intravenous tissue plasminogen activator and infarct size, left ventricular function, and survival in acute myocardial infarction. *BMJ* 1988;297:1374-1379.

Van Lierde J, De Geest H, Verstraete M, Van de Werf F. Angiographic assessment of the infarct-related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:1545-1549.

Van Obberghen-Schilling E, Pouyssegur J. Signaling pathways of the thrombin receptor. *Thromb*

- Haemost* 1993;70:163-167.
- Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971;231:232-235.
- Vane JR, Botting RM.** Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol* 1996;25(Suppl 102):9-21.
- Vane JR, Flower RJ, Botting RM.** History of aspirin and its mechanism of action. *Stroke* 1990;21(Suppl IV):12-23.
- Vander Heide RS, Schwartz LM, Jennings RB, Reimer KA.** Effect of catecholamine depletion on myocardial infarct size in dogs: role of catecholamines in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1995;30:656-662.
- Vanhoutte PM, Mombouli J-V.** Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis* 1996;39:229-238.
- Varani J, Ward PA.** Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury. *Biol Signals* 1994;3:1-14.
- Varani J, Ginsburg I, Schuger L, Gibbs DF, Bromberg J, Johnson KJ, Ryan US, Ward PA.** Endothelial cell killing by neutrophils: synergistic interaction of oxygen radical products and proteases. *Am J Pathol* 1989;135:435-438.
- Vargaftig BB.** Salicylic acid fails to inhibit generation of thromboxane A₂ activity in platelets after *in vivo* administration to the rat. *J Pharm Pharmacol* 1978;30:101-104.
- Vasdev S, Ford CA, Longerich L, Barrett B, Parai S, Campbell N.** Oral treatment with low molecular weight heparin normalizes blood pressure in hypertensive rats. *Artery* 1994;21:1-28.
- Vassallo RR Jr, Kieber-Emmons T, Cichowski K, Brass LF.** Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem* 1992;267:6081-6085.

- Vaughan DE, Mendelsohn ME, Declerck PJ, Van Houtte E, Collen D, Loscalzo J.** Characterization of the binding of human tissue-type plasminogen activator to platelets. *J Biol Chem* 1989;264:15869-15874.
- Vegh A, Papp JG, Parratt JR.** Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing. *Br J Pharmacol* 1994;113:1081-1082.
- Velasco CE, Turner M, Inagami T, Atkinson JB, Virmani R, Jackson EK, Murray JJ, Forman MB.** Reperfusion enhances the local release of endothelin after regional myocardial ischemia. *Am Heart J* 1994;128:441-451.
- Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH, Dalmasso AP.** Neutrophil adhesion to xenogenic endothelium via iC3b. *J Immunol* 1991;146:730-734.
- Viehman GE, Ma X-L, Lefer DJ, Lefer AM.** Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during coronary arterial occlusion. *Am J Physiol* 1991;261:H874-H881.
- von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K-E, Butcher EC.** Two step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7538-7542.
- von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Filho IT, Butcher EC, Arfors K-E.** L-selectin function is required for β_2 -integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:H1034-H1044.
- Vogt W.** Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiol* 1996;195:334-346.
- Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR.** Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;64:1057-1068.
- Wagdy HM, Christian TF.** Determinants of infarct size in acute myocardial infarction patients treated with reperfusion therapy. *Curr Opin Cardiol* 1996;11:369-377.

- Wagner CL, Mascelli MA, Neblocks DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE.** Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996;88:907-914.
- Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, Kawaguchi H, Murota S-i.** Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils: involvement of adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta* 1995;1265:103-109.
- Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK.** Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation on P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:1081-1087.
- Walenga JM, Fareed J, Hoppensteadt DA.** In vitro coagulant and amidolytic methods for evaluating the activity of heparin and a low molecular weight derivative (PK 10169). *Semin Thromb Hemost* 1985;11:17-25.
- Walker FJ, Sexton PW, Esmon CT.** The inhibition of blood coagulation by activated protein C through the selective inactivation of activated factor V. *Biochim Biophys Acta* 1979;571:333-342.
- Walsh RL, Dillon TJ, Scicchitano R, McLennan G.** Heparin and heparan sulphate are inhibitors of human leucocyte elastase. *Clin Sci* 1991;81:341-346.
- Wang Y, Walsh SW.** Aspirin inhibits both lipid peroxides and thromboxane in preeclamptic placentas. *Free Radic Biol Med* 1995;18:585-591.
- Watson BD, Ginsberg MD, Busto R.** Macroscopic indices of lipid peroxidation in cerebral ischemia/reperfusion: validity and sensitivity enhancement in terms of conjugated diene detection. *Neurochem Int* 1996;29:173-186.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC.** Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995;91:1914-1917.
- Weiler JM, Edens RE, Linhardt RJ, Kapelanski DP.** Heparin and modified heparin inhibit

- complement activation in vivo. *J Immunol* 1992;148:3210-3215.
- Weisman HF, Bulkley BH.** Pathophysiology of atherosclerotic heart disease. *Cardiol Clin* 1984;2:555-569.
- Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
- Weiss HJ, Hawiger J, Ruggeri ZM, Turitto VT, Thiagarajan P, Hoffmann T.** Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on sub-endothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J Clin Invest* 1989;83:288-297.
- Weksler BB, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P, Subramanian V, Tack-Goldman K, Gay WA Jr.** Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* 1983;308:800-805.
- Weksler BB, Jaffe EA, Brower MS, Cole OF.** Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells. *Blood* 1989;74:1627-1634.
- Werns SW, Shea MJ, Driscoll EM, Cohen C, Abrams GD, Pitt B, Lucchesi BR.** The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size reduction by superoxide dismutase and not catalase. *Circ Res* 1985;56:895-898.
- Wesson DE, Elliott SJ.** Xanthine oxidase inhibits transmembrane signal transduction in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1197-1207.
- West PN, Connors JP, Clark RE, Weldon CS, Ramsey DL, Roberts R, Sobel BE, Williamson JR.** Compromised microvascular integrity in ischemic myocardium. *Lab Invest* 1978;38:677-684.
- Weyrich AS, Buerke M, Albertine KH, Lefer AM.** Time course of coronary vascular endothelial adhesion molecule expression during reperfusion of ischemic feline myocardium. *J Leukoc Biol* 1995;57:45-55.
- Whatley RE, Fennell DF, Kurrus JA, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM.** Synthesis

of platelet-activating factor by endothelial cells: the role of G proteins. *J Biol Chem* 1990;265:15550-15559.

Wilson JL, Ramanathan KB, Ingram LA, Mirvis DM. Effects of residual stenosis on infarct size and regional transmural myocardial blood flow after reperfusion. *Am Heart J* 1988;116:1523-1529.

Witt DP, Lander AD. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* 1994;4:394-400.

Wong PY-K, Westlund P, Hamberg M, Granstrom E, Chao PHW, Samuelson B. ω -hydroxylation of 12-*R*-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1984;259:2683-2686.

Wright JG, Kerr JC, Valeri CR, Hobson RW. Heparin decreases ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis model. *Arch Surg* 1988;123:470-472.

Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J Int Med* 1996;239:17-34.

Wu K, Urano T, Ihara H, Tanaka Y, Fujie M, Shikimori M, Hashimoto K, Takada A. The cleavage and inactivation of plasminogen activator inhibitor type 1 by neutrophil elastase: the evaluation of its physiologic relevance in fibrinolysis. *Blood* 1995;86:1056-1061.

Wun T-C. Lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) is a cofactor for heparin: synergistic anticoagulant action between LACI and sulfated polysaccharides. *Blood* 1992;79:430-438.

Wun T-C, Kretzmer KK, Girard T, Miletich JP, Broze GJ Jr. Cloning and characterization of cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988;263:6001-6004.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad*

Sci USA 1991;88:2692-2696.

- Yamada T, Matsushima M, Inaka K, Ohkubo T, Uyeda A, Maeda T, Titani K, Sekiguchi K, Kikuchi M.** Structural and functional analyses of the Arg-Gly-Asp sequence introduced into human lysozymes. *J Biol Chem* 1993;268:10588-10592.
- Yamaguchi Y, Akizuki E, Ichiguchi O, Matsumura F, Goto M, Miyanari N, Mori K, Yamada S, Ogawa M.** Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver. *Gastroenterology* 1997;112:551-560.
- Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H.** Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:1404-1411.
- Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Oegema TR Jr, Low WC, Camarata PJ.** Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. I. Protective mechanism. *J Neurosurg* 1996;85:1102-1107.
- Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Low WC, Camarata PJ.** Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. II. Dose-response effect and the therapeutic window. *J Neurosurg* 1996a;85:1108-1112.
- Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML.** Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol* 1996;149:1617-1626.
- Yang X-M, Baxter GF, Heads RJ, Yellon DM, Downey JM, Cohen MV.** Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc Res* 1996a;31:777-783.
- Yang J, Galipeau J, Kozak CA, Furie BC, Furie B.** Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* 1996b;87:4176-7186.
- Yao S-K, Benedict CR, Rosolowsky M, McNatt J, Falinska B, Campbell WB, Buja LM, Willerson JT.** Effect of aspirin on local prostaglandin production and serotonin accumulation in

a canine model with coronary cyclic flow variations or thrombosis. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:473-482.

Yasuda M, Takeuchi K, Hiruma M, Iida H, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, Teragaki M, Oku H, Kanayama Y, Takeda T, Kolb WP, Tamerius JD. The complement system in ischemic heart disease. *Circulation* 1990;81:156-163.

Yeh ETH. Life and death in the cardiovascular system. *Circulation* 1997;95:782-786.

Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1023-1034.

Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993;342:276-277.

Yokokawa K, Mandal AK, Kohno M, Horio T, Murakawa K-I, Yasunari K, Takeda T. Heparin suppresses endothelin-1 action and production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992;263:R1035-R1041.

Yokokawa K, Kohne M, Mandal AK, Tahara H, Yanagisawa M, Takeda T. Heparin suppresses endothelin-1 peptide mRNA expression in cultured endothelial cells of spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1683-1689.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989;169:1747-1756.

Youker KA, Hawkins HK, Kukielka GL, Perrard JL, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Molecular evidence for induction of intracellular adhesion molecule-1 in the viable border zone associated with ischemia-reperfusion injury of the dog heart. *Circulation* 1994;89:2736-2746.

Young E, Prins M, Levine MN, Hirsh J. Heparin binding to plasma proteins, an important

- mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost* 1992;67:639-643.
- Young E, Wells P, Holloway S, Weitz J, Hirsh J.** Ex-vivo and in-vivo evidence that low molecular weight heparins exhibit less binding to plasma proteins than unfractionated heparin. *Thromb Haemost* 1994;71:300-304.
- Zamarron C, Lijnen HR, Collen D.** Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1983;259:2080-2083.
- Zhou X, Zhai X, Ashraf M.** Preconditioning of bovine endothelial cells. The protective effect is mediated by an adenosine A₂ receptor through a protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996;78:73-81.
- Zhou L, Pope BL, Chourmouzis E, Fung-Leung W-P, Lau CY.** Tepoxalin blocks neutrophil migration into cutaneous inflammatory sites by inhibiting Mac-1 and E-selectin expression. *Eur J Immunol* 1996a;26:120-129.
- Zimmerman BJ, Granger DN.** Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am J Physiol* 1990;259:H390-H394.
- Zimmerman BJ, Grisham MB, Granger DN.** Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990;258:G185-G190.
- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM.** Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;13:93-100.
- Zwaal RFA, Schroit AJ.** Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121-1132.